

2.6.6 毒性試験の概要文の目次

2.6.6.1	まとめ.....	4
2.6.6.2	単回投与毒性試験.....	14
2.6.6.2.1	0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A 又は SH L562AA) のマウス単回 投与毒性試験.....	14
2.6.6.2.2	ラット単回投与毒性試験.....	15
2.6.6.2.2.1	1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) のラット単回静脈内投与 予備試験.....	15
2.6.6.2.2.2	1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) のラット拡張型単回静脈内 投与毒性試験.....	15
2.6.6.2.2.3	0.5mmol/mL 製剤のラット単回静脈内及び単回胃内投与 毒性試験.....	16
2.6.6.2.3	イヌ単回投与毒性試験.....	17
2.6.6.2.3.1	1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) の雄イヌでの単回静脈内 投与による用量設定試験.....	17
2.6.6.2.3.2	1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) のイヌ拡張型単回静脈内 投与毒性試験.....	17
2.6.6.2.3.3	0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のイヌ単回静脈内投与 毒性試験.....	18
2.6.6.2.4	単回投与毒性試験成績のまとめ.....	18
2.6.6.3	反復投与毒性試験 (トキシコキネティクス評価を含む).....	19
2.6.6.3.1	ラットにおける反復投与毒性試験.....	20
2.6.6.3.1.1	1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) のラット4週間静脈内 投与試験及び10週間回復性試験.....	20
2.6.6.3.1.2	0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) の雄ラット2日間静脈内 投与試験.....	21
2.6.6.3.1.3	1.0mmol/mL 製剤 (SH L562B) とその0.5mmol/mL 調製液 のラット8日間静脈内反復投与試験.....	21
2.6.6.3.1.4	0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のラット4週間 (16~18 回) 反復静脈内投与及び8週間回復性試験.....	22
2.6.6.3.1.5	0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のラット4週間反復静脈内 投与及び2週間回復性試験.....	23
2.6.6.3.2	イヌにおける反復投与毒性試験.....	23
2.6.6.3.2.1	1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) のイヌにおける4週間反復 静脈内投与及び8週間回復性試験.....	23
2.6.6.3.2.2	0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のイヌにおける16~18回 (4週) 反復静脈内投与試験.....	25

2.6.6.3.2.3	0.5mmol/mL 製剤 (SH L562AA) のイヌにおける 4 週間 反復静脈内投与及び 4 週間回復性試験	25
2.6.6.3.3	反復投与毒性試験成績のまとめ	26
2.6.6.4	遺伝毒性試験	28
2.6.6.4.1	細菌を用いる復帰変異原性試験	28
2.6.6.4.2	ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験	28
2.6.6.4.3	チャイニーズハムスターV79 培養細胞を用いる HPRT 試験	29
2.6.6.4.4	マウス骨髄小核試験	29
2.6.6.5	がん原性試験	29
2.6.6.6	生殖発生毒性試験 (用量設定試験及びトキシコキネティクス 評価を含む)	30
2.6.6.6.1	ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	30
2.6.6.6.1.1	1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) による試験	30
2.6.6.6.1.2	0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) による試験	31
2.6.6.6.2	胚・胎児発生に関する試験	31
2.6.6.6.2.1	ラット胚・胎児発生に関する試験	31
2.6.6.6.2.2	ウサギ胚・胎児発生に関する試験	33
2.6.6.6.2.3	サル胚・胎児発生に関する試験	35
2.6.6.6.3	ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する 試験	36
2.6.6.6.3.1	1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) による試験	36
2.6.6.6.3.2	0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) による試験	37
2.6.6.6.4	生殖発生毒性試験成績のまとめ	38
2.6.6.7	新生児を用いた試験	39
2.6.6.8	局所刺激性試験	40
2.6.6.8.1	静脈内投与による局所刺激性試験	41
2.6.6.8.2	誤投与により接触する可能性のある動脈、静脈周囲又は 筋肉内投与による局所刺激性試験	42
2.6.6.8.2.1	動脈内投与による局所刺激性試験	42
2.6.6.8.2.2	静脈周囲投与による局所刺激性試験	42
2.6.6.8.2.3	筋肉内投与による局所刺激性試験	43
2.6.6.8.3	特殊な局所刺激性試験	43
2.6.6.9	その他の毒性試験	43
2.6.6.9.1	抗原性及び接触皮膚感作性試験	43
2.6.6.9.1.1	モルモット ASA 試験及び同種 PCA 試験	44

2.6.6.9.1.2	マウス-ラット系 PCA 試験	44
2.6.6.9.1.3	イヌ抗原性試験	44
2.6.6.9.1.4	接触感作性試験	45
2.6.6.9.2	その他の毒性試験	45
2.6.6.9.2.1	添加剤 CaNa-butrol のマウス静脈内単回投与毒性試験	45
2.6.6.9.2.2	不純物の毒性試験	46
2.6.6.9.2.3	ラット血中ホルモン濃度に及ぼす影響に関する比較試験	47
2.6.6.9.2.4	NSF 関連病変の動物における検討	47
2.6.6.10	考察及び結論	50
2.6.6.11	図表	51
参考文献	52

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

SH L562BB（以下、申請製剤）はガドブトロール（gadobutrol）を有効成分とする磁気共鳴コンピュータ断層撮影（Magnetic Resonance Imaging：MRI）用造影剤である。ガドブトロールは非イオン性のマクロ環構造を有するガドリニウムキレートであり、静脈内投与後には血漿及び細胞外液に分布して速やかに尿中排泄される性質を有することから、その製剤は細胞外液性造影剤に分類される。その化学構造に起因する物理化学的性質により、現在上市されている細胞外液性造影剤の2倍のガドリニウム濃度である1.0mmol/mL製剤として処方することが可能である。今回、「MRIにおける脳・脊髄造影及び躯幹部・四肢造影」を効能・効果とし、「通常、0.1mL/kg（0.1mmol/kg）を（単回）静脈内投与する」との用法・用量で当該製剤を承認申請するにあたり、毒性試験成績よりガドブトロールの安全性を評価した。

ガドブトロールの毒性試験では4種の製剤を使用した（表2.6.6.1-1）。開発初期の毒性試験では、旧処方の0.5mmol/mL製剤（SH L562A）又は1.0mmol/mL製剤（SH L562B）を使用し、製剤変更以降の毒性試験では、新処方の0.5mmol/mL製剤（SH L562AA）並びに申請製剤である1.0mmol/mL製剤（SH L562BB）を用いた¹⁾。各製剤の組成を表2.6.6.1-1に示す。

表2.6.6.1-1 毒性試験で使用した4製剤の組成

Formulation	1.0 mmol/mL formulation		0.5 mmol/mL formulation	
	SH L562BB*	SH L562B	SH L562AA	SH L562A
Gadobutrol (active ingredient)	604.720 mg	■	■	■
Calcobutrol sodium (excess ligand)	0.513 mg	■	■	■
Trometamol (buffer)	1.211 mg	■	■	■
■ (pH adjustment)	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
Water for injection (solvent)	■ mg	■	■	■

*: Currently submitted formulation, ■, q.s.: Quantum sufficit

ガドブトロール製剤開発の初期には、0.5mmol/mL製剤を開発予定であったことから、初期の毒性試験は0.5mmol/mL製剤（主としてSH L562A、一部SH L562AA）を使用して実施された。その後、1.0mmol/mL製剤の開発に方針が変更されたが、全身毒性は概して有効成分ガドブトロールの総負荷量（mmol/kg）に依存することから、同一のガドブトロール負荷量であれば0.5mmol/mLと1.0mmol/mL製剤による全身毒性は異ならないと考えられた。したがって、0.5mmol/mL製剤を用いた毒性試験結果より、1.0mmol/mL製剤（SH L562BB）のリスク評価は可能と考えられた。しかしながら、単回投与毒性試験（ラット及びイヌ）及び反復投与毒性試験

¹⁾ 旧製剤（SH L562A及びSH L562B）■では、有効成分ガドブトロール■、■及びCalcobutrol sodium（カルコブトロールナトリウム；安定剤、以下、CaNa-butrolと省略）■ていた。一方、新製剤（SH L562AA及びSH L562BB）では■CaNa-butrol■に変更された。その結果、■が、ガドリニウム■濃度はSH L562AとSH L562AAでは共に0.5mmol/mL、SH L562BとSH L562BBでは共に1.0mmol/mLである。

(ラット及びイヌ)に関しては、1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) を用いた毒性試験を追加実施し、0.5mmol/mL 製剤の毒性試験中では実施されなかった全身曝露の評価も加えて、申請製剤による毒性及び安全性を確認した。

さらに、1.0mmol/mL 製剤は0.5mmol/mL 製剤に比して、同一容量でより高用量の投与が可能であることから、生殖発生毒性試験 (ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験、並びにラット出生前及び出生後の発育並びに母体の機能に関する試験) に関しても、1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) を用いた試験を追加実施し、主としてより高用量を投与した際の毒性所見を確認するとともに、全身曝露の評価も追加した。また、海外で近年、1歳未満の乳児に対する1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) の安全性情報を得る目的で、新生児ラットを用いた拡張型単回投与毒性試験及び短期反復投与毒性試験が実施されたことから、その試験成績も記載した。局所刺激性については、主にガドリニウム濃度がSH L562BBと同じ1.0mmol/mL 製剤 (SH L562B) を用いた試験成績より評価した。

使用した製剤の情報を加えた毒性試験一覧 (GLP/非GLP) を、表 2.6.6.1-2 毒性試験一覧、並びに 2.6.7.1 毒性試験：一覧表に示す。

表 2. 6. 6. 1- 2 毒性試験一覧

Type of Study and Treated Period	Route of Administration	Species/ Test system	Formulation/ Compound used	GLP compliance	
Single Dose Toxicity	intravenous	Mouse	SH L562A CaNa-butrol, SH L562AA	Yes Yes	
	intra-gastric		SH L562A	Yes	
	intravenous	Rat	SH L562A, SH L562AA	Yes	
	intra-gastric		SH L562BB	Yes	
	intravenous	Dog	SH L562A	Yes	
Repeated Dose Toxicity 2 days 8 days DRF 2 weeks 4 weeks (5/week, 16-18 times) 4 weeks (28-31 times) 4 weeks (5/week, 16-18 times) 4 weeks (28-31 times)	intravenous	Rat	SH L562A	Yes	
			SH L562B	No	
			impurity A* + impurity B*	Yes	
			SH L562A	Yes	
			SH L562A	No	
		Dog	SH L562BB	Yes	
Genotoxicity Bacteria system Mammalian cell system Micronucleus test	<i>in vitro</i>	<i>Salmonella & E. coli</i>	SH L562A	Yes	
		<i>Salmonella</i>	impurity A* impurity B*	Yes	
		Human lymphocyte	SH L562A	Yes	
			impurity A* impurity B*	Yes	
		V79 cells	SH L562A	Yes	
Reproductive Toxicity Fertility and early development Embryo-fetal toxicity Peri- & postnatal development	intravenous	Rat	SH L562A, SH L562BB	Yes	
		Rat (DRF)	SH L562BB	No	
		Rat	SH L562A, SH L562BB	Yes	
		Rabbit (DRF)	SH L562A, SH L562BB	No	
		Rabbit	SH L562A, SH L562BB	Yes	
		Monkey	SH L562A	Yes	
		Rat (DRF)	SH L562BB	No	
		SH L562A, SH L562BB	Yes		
	Study in juvenile animal Single dose 3 time repeated	intravenous	Rat (4 days of age)	SH L562BB	Yes
			Rat (10 days of age)	SH L562BB	Yes
Local tolerance	intravenous	Rabbit, Dog	SH L562A, SH L562B	Yes	
	intra-arterial	Rabbit, Rat	SH L562A, SH L562B	Yes	
	paravenous	Rabbit	SH L562A, SH L562B	Yes	
	intra-muscular	Rabbit	SH L562B	Yes	
	liver parenchyma	Rat	SH L562BB	Yes	
Others Antigenicity/ Optimization Study on serum hormone NSF-related investigation	sc & id	Guineapig	SH L562A	Yes	
	intraperitoneal	Mouse-Rat	SH L562A	Yes	
	intravenous	Dog	SH L562BB	Yes	
	intravenous	Rat	SH L562A	No	
	intravenous	Rat (intact and renal impaired)	SH L562BB	No	

DRF: Dose Range Finding, impurity A* and impurity B*: impurities found in old drug substance, sc: subcutaneous, id: intradermal, 5/ week, 16 -18 times: 5 times per week, total 16 to 18 times administration

毒性試験プログラムとして、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験及び抗原性その他の毒性試験を含む一連の試験を実施した。なお、用量設定試験（予備検討試験）、種々の臨床試験相の開始に特に関連せず実施された血中ホルモン濃度検討試験（類薬ガドペンテ酸メグルミン製剤でホルモン濃度変動の可能性が示唆されたために実施）、並びにガドリニウム含有 MRI 造影剤の臨床使用において、稀に報告されている腎性全身性線維症（Nephrogenic Systemic Fibrosis : NSF）の病理発生に関する動物実験を除き、主要な試験は GLP に従って実施した。

毒性試験成績の概略を以下に示す。

単回投与毒性

ガドブトロールの単回静脈内投与毒性を、雌雄マウス、雌雄ラット、幼若雄ラット及び雌雄イヌで評価した。ガドブトロール投与に起因した主な所見は、一般症状ではマウス又はラットの自発運動低下又はアパシー、呼吸促拍又は呼吸不整、腹臥又は横臥、失調性歩行、間代性又は強直性痙攣及び振戦、イヌの嘔吐、アパシー、粘膜発赤、一過性の血圧低下及び心拍数増加であった。病理組織学的検査ではラット及びイヌの腎尿細管上皮細胞の空胞化であり、ラットへの致死量付近の高用量投与では一部肝細胞にも空胞化が観察された。これら腎尿細管上皮細胞及び肝細胞の空胞化は、時間経過とともに消失又は軽減する可逆的变化であった。単回静脈内投与時の概略の致死量はマウスで25mmol/kg、ラットで20mmol/kg、イヌでは10mmol/kgより大きかった。体表面積に換算すると、ラットでの20mmol/kgは120mmol/m²に、イヌの10mmol/kgは200mmol/m²に相当した。すなわち、予定臨床用量(0.1mmol/kg、3.7mmol/m²)と比較して十分高かった。トキシコキネティクス(TK)では、ラット(2、6及び20mmol/kg)及びイヌ(0.3、1.7及び10mmol/kg)への単回静脈内投与後のC_{max}及びAUCは、概して投与量にほぼ比例して増加し、排泄は速やかであった。薬物動態に性差は認められなかった。マウス及びラットに単回経口投与可能最大用量である、25及び20mmol/kg(0.5mmol/mL製剤50及び40mL/kg)を強制胃内投与したところ、薬剤投与の影響は認められず、概略の致死量は各々25及び20mmol/kgより大きかった。

反復投与毒性

ガドブトロール製剤の臨床適用は原則単回静脈内投与であり、連日反復投与されないことから、げっ歯類としてラットを、また非げっ歯類としてはイヌを用いて4週間までの反復静脈内投与試験を実施した。

1) ラットにおける反復投与毒性試験

ラットに0.6、1.2又は3.0mmol/kg(SH L562BB)を1日1回4週間反復静脈内投与した試験では、0.6mmol/kg以上に腎重量の増加ないし増加傾向及び腎尿細管上皮、膀胱上皮及び尿管上皮の空胞化が用量依存的に観察された。さらに、3.0mmol/kg群雄3匹に尿細管上皮細胞の単細胞壊死が観察された。雄3.0mmol/kg群の腎尿細管上皮の単細胞壊死を軽微な毒性兆候と判断し、無毒性量は雄では1.2mmol/kg/日、雌では3.0mmol/kg/日と算定された。TKでは、血清中動態に性差は認められず、全身曝露量は投与量にほぼ比例して増加した。投与されたガドブトロールは急速に体内から消失し、投与初日及び最終投与時共にすべての投与群で、投与7時間後には定量下限未満となり、反復投与による蓄積性は認められなかった。

ラットに1.0、2.5及び5.0mmol/kg(SH L562A)を5回/週、計16~18回反復静脈内投与した試験では、5.0mmol/kg群で雌2匹の死亡が観察された。また、5.0mmol/kg群の雄において、MCH(Mean Corpuscular Hemoglobin)の軽度な上昇、赤血球数及びヘマトクリット値の低下が認められた。当該赤血球系パラメータの低下はこれらに関連する骨髄及び病理組織学的所見は認められなかったものの、軽微な毒性兆候と考えられた。また、雄では1.0mmol/kg以上、雌では2.5mmol/kg以上に腎重量の増加が観察され、病理組織学的検査では1.0mmol/kg以上のすべての群に腎臓の尿細管上皮の空胞化が用量依存的に観察されたが、腎機能への影響は認められなかった。したがって、5.0mmol/kg群雌での死亡、同群雄での赤血球系パラメータの変化を毒性所見と判断し、無毒性量は雌雄共に2.5mmol/kg/日と算定された。

ラットに0.1、0.25、0.75及び2.5mmol/kg(SH L562A)を1日1回4週間反復静脈内投与した試験では、雄2.5mmol/kg群で4週目にPSP(phenolsulfonphthalein)排泄率の低下傾向が観

察され、軽度ながらも毒性兆候と考えられた。雌雄 2.5mmol/kg 群では腎重量の増加が観察され、病理組織学的検査では 0.25mmol/kg 以上から、腎臓近位尿細管上皮の空胞化が全例に用量依存的に観察された。また、膀胱上皮の軽度空胞化が 0.25mmol/kg 以上で用量依存的に観察された。雄 0.75mmol/kg 以下及び雌のすべての投与群では、PSP 検査も含め腎臓及び膀胱の機能障害を示唆する変化は認められなかった。以上の成績から、雄 2.5mmol/kg 群の PSP 排泄遅延傾向を軽微ながらも毒性兆候と判断し、無毒性量は雄で 0.75mmol/kg/日、雌で 2.5mmol/kg/日と算定された。

2) イヌにおける反復投与毒性試験

ビーグル犬に 0.3、1.0 及び 3.0mmol/kg (SH L562BB) を 1 日 1 回 4 週間反復静脈内投与した試験では、1.0mmol/kg 以上の群で投与直後の嘔吐又はリッキング、可視粘膜の赤色化が散発的に、3.0mmol/kg 群では一過性軽度のアパシー、閉眼又は内耳表面の発赤が観察された。さらに 3.0mmol/kg 群では投与後に心拍数の一過性かつ軽度な増加が認められたが、投与翌日及び休薬時にかかる変化は認められなかった。3.0mmol/kg 群の一般症状変化及び心拍数の一過性増加は、軽度ながらも毒性兆候と考えられた。雌の 1.0mmol/kg 以上で、尿中 NAG (N-acetyl- β -D-glucosaminidase) 及び γ -GT (gamma-glutamyl transferase) の軽度増加が観察されたが、休薬期間終了時の検査では影響を認めなかった。投与終了時、0.3mmol/kg 以上で腎尿細管上皮の用量依存的な空胞化が観察された。しかしながら、血清クレアチニンや尿素窒素などの腎機能検査値に影響は認められず、これらは毒性所見とは考えられなかった。また、8 週間の休薬後に検査した 1.0mmol/kg に上記変化は認められず、いずれも可逆性変化であった。以上の成績から、3.0mmol/kg 群の一般症状及び心拍数増加を毒性所見と判断したため、無毒性量は雌雄共に 1.0mmol/kg/日と算定された。血清中動態に性差は認められず、全身曝露量は投与量に比例して増加した。投与されたガドブトロールは急速に血清中から消失し、投与初日及び最終投与日共に、投与 7 時間後にはほぼ定量下限未満となり、反復投与による蓄積性は認められなかった。

ビーグル犬に 0.25、1.0 及び 2.5mmol/kg (SH L562A) を静脈内に週 5 回 4 週間 (計 16~18 回) 反復投与した試験では、雌 1.0mmol/kg 以上及び雄 2.5mmol/kg 群で尿中 γ -GT の増加が観察されたが、前述のイヌ 4 週間投与試験と同様毒性所見とは考えられなかった。1.0mmol/kg 以上で腎尿細管上皮細胞に用量依存性の空胞化が観察されたが、腎機能検査値への影響は認められなかった。以上のように、最高用量まで毒性所見は認められなかったことから、無毒性量は雌雄共に 2.5mmol/kg/日と算定された。

ビーグル犬に 0.1、0.5 及び 2.5mmol/kg (SH L562AA) を 1 日 1 回 4 週間反復静脈内投与した試験では、雌雄 2.5mmol/kg 群に尿中 γ -GT の増加、同群雄に尿中 NAG の増加が観察されたが、4 週間の休薬後にはかかる変化は認められなかった。腎尿細管上皮に 0.5mmol/kg 以上で空胞化及び硝子滴が観察された。しかしながら、他の一般的な腎機能パラメータ (血清尿素窒素、クレアチニン値及び尿中たん白) に影響は認められず、毒性所見とは考えられなかった。4 週間の休薬後、雌ではいずれの所見も認められず、雄では軽度な空胞化と硝子滴が少数例に観察され、回復傾向が確認された。以上の成績から、無毒性量は雌雄共に 2.5mmol/kg/日と算定された。

遺伝毒性

ガドブトロールの遺伝毒性試験では、*in vitro* 試験として細菌を用いる復帰変異原性試験、ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験、チャイニーズハムスター V79 培養細胞を用いる HPRT (Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase) 試験を、*in vivo* 試験としてマウス骨髄小核試験を実施した。その結果、いずれの試験においても陰性結果が得られ、ガドブトロールに遺伝毒性は認められなかった。

生殖発生毒性

1) ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

雌雄ラットに0.6、2.2及び7.5mmol/kg (SH L562BB) を、雄では交配前4週間及び交配期間中と剖検前日まで、雌では交配前2週間及び交配期間中並びに妊娠7日目まで反復静脈内投与した。その結果、雄では2.2mmol/kg以上で、投与部位の局所障害、剖検時の用量依存的な腎腫脹と腎重量の増加が観察され、雌でも7.5mmol/kg群で同様の腎臓の変化が観察されたものの、いずれも毒性所見とは考えられなかった。雌7.5mmol/kg群ではさらに、投与初日に重度の一般症状を伴う急性死亡、投与直後の発作性呼吸困難と腹臥又は横臥が少数例で観察され、これらは全身性の毒性所見と考えられた。一方、交配成績、妊娠及び生殖パラメータに薬剤投与の影響は認められなかった。以上の成績から、雄動物の一般毒性学的及び生殖能に対する無毒性量はいずれも7.5mmol/kg/日、雌動物の一般毒性学的無毒性量は2.2mmol/kg/日、生殖能に対する無毒性量は7.5mmol/kg/日と算定された。TK測定を実施した雄ラットにおいて、初回投与後及び43日間反復投与後のAUC及びCmaxは投与量にほぼ比例して増加した。ガドプトロールは投与5分後を最高に、急速に血漿中から消失した。投与初日のAUC及びCmaxと比較して、投与43日目の0.6及び7.5mmol/kg投与群のAUC及びCmax値に大きな変動は認められなかったが、2.2mmol/kg投与群のAUC及びCmaxはやや高かった。

雌雄ラットに0.25、0.75及び2.5mmol/kg (SH L562A) を、雄では交配前60日間及び交配期間終了まで、雌では交配前2週間及び交配期間並びに妊娠7日目まで静脈内に反復投与した。その結果、いずれのパラメータに関しても、最高用量2.5mmol/kgまで薬剤投与の影響は認められなかった。したがって無毒性量は、雌雄親動物（一般毒性学的及び生殖能）及び初期胚発生に対して、いずれも2.5mmol/kg/日と算定された。

2) 胚・胎児発生に関する試験

① ラットにおける胚・胎児発生に関する試験

交尾の成立した雌ラットに5.0、7.5及び10.0mmol/kg (SH L562BB) を、妊娠6～17日目に反復静脈内投与した。その結果、母動物では7.5mmol/kg群で重度の一般症状が1匹に、10.0mmol/kg群で2匹の死亡、4匹に重度の一般症状（振戦、呼吸不整及び腹臥）が観察された。10.0mmol/kg群に体重増加抑制及び摂餌量の減少が、7.5mmol/kg群で投与初期摂餌量の軽度減少が観察された。妊娠及び生殖パラメータに関しては、10.0mmol/kg群で早産発生頻度が対照群と比較してわずかに増加した。胎児に関しては、10.0mmol/kg群で平均胎児体重の減少が観察された。胎児の外表及び内臓検査において、薬剤投与の影響は認められなかった。骨検査においては、7.5mmol/kg以上の群で骨変異の発生頻度の増加が観察された。しかしながら、奇形の発現頻度に薬剤投与の影響は認められなかった。以上の成績から、無毒性量は、母動物の一般毒性学的に5.0mmol/kg/日、その生殖毒性に対しては7.5mmol/kg/日、胎児に対しては5.0mmol/kg/日と算定された。初回投与後（妊娠6日目）及び12日間反復投与後（妊娠17日目）のCmax及びAUCは投与量にほぼ比例して増加した。投与初日と投与12日目を比較したとき、7.5及び10.0mmol/kg群では反復投与後にAUCが増大した。したがって、10.0mmol/kgという高用量の反復投与時には軽度な蓄積傾向が示唆され、当該用量投与後に死亡例が観察されたことと関連するものと考えられた。

交尾の成立した雌ラットを帝王切開及び自然分娩群に分け、0.5、1.5及び5.0mmol/kg (SH L562A) を、妊娠6～15日目まで反復静脈内投与した。帝王切開群では妊娠末期に帝王切開し、自然分娩群では出生児を身体、機能及び行動検査に供した。その結果、5.0mmol/kg群では着床

後死亡の軽度増加、母動物あたりの生存胎児数の軽度な減少及び骨化の軽度遅延が観察された。1.5mmol/kg以下の群に薬剤投与の影響は認められず、また、出生児の生後発達には影響は認められなかった。以上の成績から、無毒性量は、母動物の一般毒性学的に5.0mmol/kg/日、その生殖能に対しては1.5mmol/kg/日、胎児に対しては1.5mmol/kg/日、出生児に対しては5.0mmol/kg/日と算定された。

② ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験

交尾の成立した雌ウサギに2.5、5.0及び10.0mmol/kg (SH L562BB)を、妊娠6～18日目に反復静脈内投与し、妊娠末期に帝王切開した。さらに、TK評価用サテライト動物を割り付けて同様に処置した。その結果、母動物では10mmol/kg群で妊娠15～20日目に3匹が死亡し、1匹が重度の一般症状を呈したため、切迫屠殺した。さらに同群では、2匹に流産と、別の2匹に早期分娩が観察され、母動物の体重及び摂餌量減少による全身毒性の二次的影響と考えられた。生存例の一般症状として、10.0mmol/kg群では排便の減少又は消失が対照群に比して増加した。また、10.0mmol/kg群では、体重増加抑制又は体重減少及び摂餌量の減少が観察された。胎児においては2.5mmol/kg以上のすべての投与群において、骨変異（主として未骨化及び不完全骨化骨）の増加が観察され、軽度な発育遅延性変化と考えられた。以上の成績から、無毒性量は母動物の一般毒性学的に5.0mmol/kg/日、その生殖能に対しては5.0mmol/kg/日、胎児に対しては2.5mmol/kg/日未満と推定された。なお、ウサギ器官形成期に連続投与可能な最大用量（10.0mmol/kg）を反復静脈内投与した場合においても、奇形発生を含めた重度な次世代への影響は認められなかった。初回投与後（妊娠6日目）及び13日間反復投与後（妊娠18日目）の曝露には、用量依存的な全身曝露の増加がみられ、死亡例が出現した高用量（10.0mmol/kg）群では、初回投与時と比較して反復投与時にはAUCの増加が観察された。

交尾の成立した雌ウサギに0.5、1.5及び5.0mmol/kg (SH L562A)を、妊娠6～18日目まで反復静脈内投与し、妊娠28日目に帝王切開した。その結果、5.0mmol/kg群では流産頻度の軽度増加が観察され、薬剤投与の影響と考えられた。着床数、生存胎児数、着床後死亡数、性比及び胎児体重に薬剤投与の影響は認められなかった。外表、内臓及び骨奇形の種類及び発生頻度に薬剤投与の影響は認められなかった。以上の成績から、ウサギ器官形成期投与試験における無毒性量は、母動物の一般毒性学的に5.0mmol/kg/日、その生殖能に対しては1.5mmol/kg/日、胎児に対しては1.5mmol/kg/日と算定された。

③ サルにおける胚・胎児発生に関する試験

超音波検査にて妊娠が確認された雌カニクイザルに0.75又は2.5mmol/kg (SH L562A)を、妊娠20～50日目まで反復静脈内投与し、妊娠末期に帝王切開した結果、2.5mmol/kg群では流産頻度の増加が観察された。胎児体重、胎盤重量、胎児臓器重量及び胎児体長に薬剤投与の影響は認められなかった。外表、内臓及び骨奇形の種類及び発生頻度に薬剤投与の影響は認められなかった。以上の成績から、無毒性量は母動物の一般毒性学的に2.5mmol/kg/日、その生殖能に対しては0.75mmol/kg/日、胎児に対しては0.75mmol/kg/日と算定された。

3) ラット出生前及び出生後の発育並びに母体の機能に関する試験

雌ラットに0.6、2.2又は7.5mmol/kg (SH L562BB)を、妊娠6日目から分娩後21日目まで反復静脈内投与した結果、2.2mmol/kg群1匹に振戦が、7.5mmol/kg群に重度一般症状（痙攣、運動性低下、横臥又は呼吸不整）が散発的に観察された。妊娠期間、出産経過、平均周産期死亡数、平均胎児数、授乳指数及びF₁出生児性比に薬剤投与の影響は認められなかった。一方、7.5mmol/kg群ではF₁出生児の生存指数、出生時体重及びF₁出生児の初期生存率の軽微な低下が

観察されたが、奇形及び肉眼的異常所見は認められなかった。F₁ 出生児の身体発達にも薬剤投与の影響は認められなかった。さらに、7.5mmol/kg 群 F₁ 出生児では運動性の減少、反射及び行動試験で軽度な薬剤投与の影響が観察されたが、F₁ 出生児の交配前、交配及び妊娠期間の一般症状、体重増加及び摂餌量並びに剖検所見に薬剤投与の影響は認められなかった。F₁ 世代の受胎能検査においても、授精期間、妊娠期間、着床数、周産期死亡数、F₂ 胎児数及び性比、F₂ 出生児の一般症状、外表奇形及び体重に薬剤投与の影響は認められなかった。TKにおいて、分娩後 21 日目の AUC 及び C_{max} は用量にほぼ比例して増加し、すべての群で妊娠 6 日目と同様であった。以上の成績から、無毒性量は母動物の一般毒性学的には 0.6mmol/kg/日、生殖能に対しては 2.2mmol/kg/日、出生児に対しては 2.2mmol/kg/日（出生前及び生後発育に対しては 2.2mmol/kg/日、F₁ 世代の生殖能を含む後期発育に対しては 7.5mmol/kg/日）と算定された。

雌ラットに 0.5、1.5 又は 4.5mmol/kg (SH L562A) を、妊娠 15 日目から分娩後 21 日目まで反復静脈内投与した結果、一般症状、体重及び摂餌量に薬剤投与の影響は認められなかった。妊娠期間、着床痕数、出産生児数、性比、周産期死亡数、出産率及び出生率にも薬剤投与の影響は認められなかった。出生児の外表奇形、骨異常、骨変異及び骨化進行度、4 日生存率、離乳率、成育率にも薬剤投与の影響は認められなかった。出生児の外表分化及び体重推移にも薬剤投与の影響は認められず、機能検査、水迷路検査、情動性及び探索行動検査にも薬剤投与の影響は認められなかった。一方、条件回避反応検査において、雌出生児 4.5mmol/kg 群では条件回避数の軽度な減少が観察された。以上の成績から、無毒性量は母動物（一般毒性学的及び生殖能）に対して 4.5mmol/kg/日、出生児に対しては 1.5mmol/kg/日と算定された。

新生児を用いた試験

新生児ラットを用いた単回及び短期反復投与試験（生後 4 及び 10 日目投与）では、腎臓において成熟動物でみられた尿細管上皮の空胞化に加えて、少数例に明細胞性尿細管がみられた。また、生後 4 日目投与では脳の小膠細胞の大きさ及び数の増加がみられたが、生後 10 日目以降の投与では認められなかった。ラットの腎臓及び血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) は生後発達するが、ヒトではいずれも妊娠末期までには発達が完了することから、新生児ラットの毒性試験でみられた上記の所見は、乳幼児への本剤投与に当たってのリスクとなるものではない。

局所刺激性

予定臨床投与経路が静脈内投与であるため、単回静脈内投与による局所刺激性試験を実施した。造影剤投与が想定される成人血管に比してより細い血管としてウサギ耳介周縁静脈を選択し、うっ血下及び非うっ血下に薬剤を投与し、局所刺激性を評価した。また、成人血管に近い血管径と考えられるイヌ前腕静脈を用いて、単回静脈内投与時の局所刺激性を評価した。その結果、1.0mol/mL 製剤は細い血管径の静脈への投与時には軽度な刺激性（一過性の発赤及び腫脹）を発現したが、通常の成人前腕部静脈と同様の血管径である静脈内への投与では、生理食塩液投与時と同程度の一過性の発赤及び腫脹が観察されたのみであったことから、臨床で問題となる刺激性は発現しないと考えられた。

また、誤投与により接触する可能性のある組織に対する影響を検討する目的で、動脈内投与、静脈周囲投与及び筋肉内投与による局所刺激性試験を実施した。その結果、1.0mmol/mL 製剤は径の細いウサギ耳介動脈内投与時には生理食塩液よりやや強い局所刺激性が観察されたが、やや太いラット大腿動脈内投与時には明らかな刺激性は認められなかった。一方、ウサギ伏在静脈周囲投与時には炎症細胞浸潤を伴う中等度の刺激性が観察され、臨床で造影剤が静脈周囲に漏れた場合には局所刺激性が発現する可能性が示唆された。ウサギ仙棘筋内単回投与による局所刺激性試験においても、軽度の局所刺激性所見が観察されたものの、その影響は生理食塩液投与時と同

程度であった。さらに、肝腫瘍のレーザー治療や超音波治療の治療前後に造影検査が想定され、その場合に障害部位から漏れた造影剤が健康な肝組織と接触する可能性が考えられたことから、ラット肝実質に対する局所刺激性も検討した。その結果、1.0mmol/mL 製剤に肝実質に対する局所刺激性は認められなかった。

その他の試験

1) 抗原性及び皮膚感作性試験

モルモット全身性アナフィラキシー (Active Systemic Anaphylaxis : ASA) 試験、モルモット同種受身皮膚アナフィラキシー (Passive Cutaneous Anaphylaxis : PCA) 試験、マウスラット系 PCA 試験及びイヌを用いた抗原性試験を、また、接触感作性試験としてモルモットを用いたオプティマイゼーション試験を実施した。その結果、いずれの試験においても陽性所見は認められず、抗原性及び皮膚感作性は陰性であった。

2) 添加剤の毒性試験

カルコブトロールナトリウム (CaNa-butrol) は 1.0mmol/mL 製剤及び 0.5mmol/mL の両製剤中に、0.001mmol/mL の濃度で含有されている添加剤 (安定剤) である。本添加剤の単回静脈内投与時の急性毒性を、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562AA ; 主成分/有効成分ガドブトロール) と比較する目的で、マウスにおける単回静脈内投与毒性試験を実施した。雌雄マウスに、CaNa-butrol 5 及び 25mmol/kg、0.5mmol/mL 製剤 25mmol/kg を静脈内単回投与した。その結果、CaNa-butrol 5mmol/kg 群では死亡例は認められず、25mmol/kg 群では雌雄全例が投与直後に死亡した。比較対照 0.5mmol/mL 製剤 25mmol/kg 群では雌雄共に 1/5 例が投与直後に死亡した。CaNa-butrol 投与後の主な一般症状として排尿が、死亡例ではさらに眼球突出、腹臥及び呼吸困難が観察され、剖検で急性循環障害を示唆する肺の暗赤色化と腎皮質の退色が観察された。以上のように、CaNa-butrol のマウス単回静脈内投与時の概略の致死量は、雌雄共に 5mmol/kg と 25mmol/kg の間にあり、0.5mmol/mL 製剤 (ガドブトロール) よりやや強かった。CaNa-butrol のマウス単回静脈内投与時に死亡が認められない用量 (5mmol/kg) は、体重換算で当該添加剤の推定臨床用量 (1 μ mol/kg) の 50,000 倍の負荷量に相当した。

3) ホルモン濃度への影響、不純物の反復投与毒性試験、及び NSF に関する試験

類薬の動物実験で造影剤投与後に血中ホルモン濃度が変動する可能性が示唆されたために、雄ラットに 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) 、数種類のガドリニウム含有 MRI 造影剤 (いずれも 0.5mmol/mL) の 5.0mmol/kg を静脈内に 2 日間反復投与し、血清中のホルモン濃度 (テストステロン、FSH 及び LH) を経時的に測定・評価した。その結果、いずれの場合にも薬剤投与に関連したホルモン濃度への影響は認められなかった。

開発過程において、一部旧製法のガドブトロール原薬中には不純物として■%までの不純物 A* 及び不純物 B* が含有されていたことから、これら不純物の *in vitro* 遺伝毒性を、細菌を用いる復帰変異原性試験及びヒトリンパ球を用いる染色体異常試験により評価したところ、いずれも陰性であった。さらに、分離した両不純物をモル比 1 : 1 で混合したものを被験物質として、ラットにおける 2 週間反復静脈内投与試験を実施した。雌雄ラットに、不純物 A* と不純物 B* の混合調製物 (モル比 1 : 1) 0.02 及び 0.1mmol/kg を、それぞれ 2 週間反復静脈内投与した。その結果、両不純物 0.02mmol/kg 群に薬剤投与の影響は認められず、0.1mmol/kg 群で腎尿細管上皮の微小空胞のみが観察された。当該変化は製剤投与時に認められたものと同様であり、細胞の変性・壊死や腎機能検査における異常を伴わず、毒性所見とは考えられなかった。な

お、申請製剤 (SH L562BB) 中における両不純物の規格値は共に ■■■%以下と、安全性確認が必要ない量に規定されている。

主として重度腎障害患者へのガドリニウム含有 MRI 造影剤の適用時に稀ではあるが、重篤な疾患として報告されている「腎性全身性線維症 (NSF)」に関連して、動物実験における類似皮膚病変の発生可能性の検討、並びにガドリニウム含有 MRI 造影剤投与後のラットの皮膚、加えて肝臓及び大腿骨中のガドリニウム、亜鉛及び銅濃度の変動について、ガドブトロール 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) を含む種々のガドリニウム含有 MRI 造影剤 (ガドジアミド水和物を含む; いずれも 0.5mmol/mL 市販製剤) を用いて比較検討した (探索的実験)。ラットに各造影剤の 2.5mmol/kg を、週 5 回 4 週間反復静脈内投与した。最終投与の 5 日後に、皮膚 (背部)、肝臓及び大腿骨を採取し、上記の重金属濃度を測定した。その結果、ガドブトロール製剤投与群のラット皮膚に病理組織学的異常は認められなかった。皮膚、肝臓及び大腿骨中の亜鉛及び銅濃度に、ガドブトロール製剤投与による明らかな変動は認められなかった。一方、ガドジアミド水和物群では NSF 類似の皮膚変化 (肉眼的に潰瘍及び痂皮形成、組織学的に真皮肥厚、線維化及びコラーゲン沈着など) が認められ、皮膚、肝臓及び大腿骨中に高濃度のガドリニウムが検出された。ガドブトロール製剤を含むマクロ環構造の造影剤群のガドリニウム濃度は最も低かった。さらに、重度腎障害モデルラットに、ガドブトロール 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) 又は 3 種のガドリニウム含有 MRI 造影剤 (ガドジアミド水和物及びガドペンテト酸メグルミンを含む; いずれも 0.5mmol/mL 市販製剤) 2.5mmol/kg を 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与し、皮膚の肉眼的病理検査とガドリニウム濃度測定を実施したところ、前述の正常ラットにおける結果と同様に、ガドジアミド水和物群に NSF 類似の皮膚変化及び皮膚に高濃度のガドリニウムが認められた。他の造影剤群に皮膚変化は認められず、皮膚のガドリニウム濃度は、上記ガドジアミド水和物群に比してガドペンテト酸メグルミン群ではより低く、ガドブトロール群では最も低かった。加えて、ガドブトロール 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) を 4 週間並びに同 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) を 16~18 回反復静脈内投与したラット及びイヌの皮膚に、NSF 類似病変が認められるか否かについて、反復静脈内投与毒性試験で採取された皮膚を病理組織学的に追加検索したところ、いずれの試験群においても NSF に類似する皮膚変化は認められなかった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

げっ歯類として、マウス、ラット及び幼若ラットを、非げっ歯類としてイヌを用いた単回静脈内投与毒性試験を実施した。さらに、誤って経口摂取した場合の毒性を評価するために、マウス及びラットを用いた強制胃内投与による単回投与毒性試験も実施した。反復投与毒性試験の対象動物種である、ラット及びイヌにおいては0.5mmol/mL製剤（主としてSH L562A）による試験に加えて、1.0mmol/mL製剤（SH L562BB）を用いた試験を実施し、マウスにおいては0.5mmol/mL製剤（SH L562A及びSH L562AA）による試験のみを実施した。

試験成績の概略を2.6.7.5 単回投与毒性試験 に示す。

2.6.6.2.1 0.5mmol/mL製剤（SH L562A又はSH L562AA）のマウス単回投与毒性試験

参照項目：4.2.3.1.1	9345
4.2.3.1.2	9346
4.2.3.1.3	9331
4.2.3.7.7.1	SG/130

1群雌雄3匹のNMRI系マウスに0（生理食塩液）又は0.5mmol/mL製剤（SH L562A）の25mmol/kgを、尾静脈内へ投与速度0.2mL/分で単回投与し、14日間観察後剖検に供した。その結果、25mmol/kg投与群の雌雄各1匹で、投与10分後にアパシーが観察されたが、30分後には回復した。死亡は認められず、剖検で異常所見も認められなかった（報告書9345及び9346）。

1群雌雄5匹のICR系マウスに0.5mmol/mL製剤（SH L562AA）の25mmol/kgを、尾静脈内へ投与速度2mL/分で単回投与した試験（添加剤CaNa-butrolの単回静脈内投与毒性試験における比較対照群）では、雌雄各1匹が投与直後に死亡し、一般症状として活動性の減少、呼吸不整、痙攣及び排尿が観察され、一過性（投与翌日）の体重減少も認められた。死亡動物の剖検所見として、腎皮質の退色及び肺の暗赤色化が見られ、循環障害による死亡が示唆された（報告書SG/130）。

以上の成績から、マウス単回静脈内投与時の概略の致死量は、0.2mL/分の投与速度では25mmol/kgより大きく、より速い2mL/分では25mmol/kgと算定された。

さらに、1群3匹のNMRI系雄マウスに、0（生理食塩液）又は25mmol/kgの0.5mmol/mL製剤（SH L562A）を、単回経口投与可能な最大容量50mL/kgにて胃内へ強制単回投与した試験では、一般症状及び死亡の発現は認められなかった。したがって、マウス強制経口単回投与時の概略の致死量は25mmol/kgより大きいと算定された（報告書9331）。

2.6.6.2.2 ラット単回投与毒性試験

2.6.6.2.2.1 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) のラット単回静脈内投与予備試験

参照項目：4.2.3.1.4 A28236

総計 14 匹 (雄 6 匹、雌 8 匹) の Wistar 系ラットを用いて、1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) の静脈内投与による単回投与予備試験を実施した。14 匹中 6 匹 (雌雄各 3 匹) には生理食塩液 40mL/kg を、0.8mL/分の投与速度で尾静脈内へ単回投与して陰性対照とした。一般症状を投与日に 4 回 (15 分後まで、45 分後、3 時間後及びその後 1 回) と投与 2~14 日目まで 1 日 1 回観察し、体重を投与日、8 及び 14 日目に測定後、安楽殺して剖検した。なお、瀕死状態で安楽殺した動物は速やかに剖検した。

はじめに、雄ラット 3 匹に 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) 25mmol/kg を、0.8mL/分の投与速度で単回尾静脈内投与した。その結果、呼吸促拍又は呼吸不整及び閉眼が投与 15 分後までに、尾の青色変色が 3 時間後まで観察されたが、それ以降で異常所見は認められなかった。次に、雌 1 匹に 40mmol/kg を同じ投与速度で単回尾静脈内投与したところ、投与 15 分後までに呼吸促拍又は呼吸不整、あえぎ、発声及び頻回跳躍を呈して、瀕死状態と判断されたため投与 45 分後に安楽殺した。残りの雌 1 匹には 25mmol/kg を同じ投与速度で単回尾静脈内投与したが、40mmol/kg 投与動物と同様に瀕死状態を呈したため、同様に安楽殺した。最後に、他の雌 3 匹には 25mmol/kg を、0.4mL/分という遅い投与速度で単回静脈内投与した結果、3 匹中 1 匹が 40mmol/kg 投与時とほぼ同様な瀕死状態を呈し、投与 3 時間後に安楽殺した。残り 2 匹の雌には、投与日に限定して閉眼、軽度アパシー、痙性歩行、呼吸促拍又は呼吸不整又は粗毛が観察されたが、2 日目以降に異常は認められなかった。剖検では、瀕死状態で屠殺した動物に共通して腎髄質の淡色化が観察されたが、投与 14 日後屠殺動物に異常所見は認められなかった。

以上の成績から、概略の致死量は雄 (投与速度 0.8mL/分) で 25mmol/kg より大きく、雌 (投与速度 0.4mL/分) では 25mmol/kg と算定された。

2.6.6.2.2.2 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) のラット拡張型単回静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.1.5 A28309

各群雌雄 16 匹の Wistar 系ラットに、0 (生理食塩液)、1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) の 2、6 及び 20mmol/kg を、0.4mL/分の投与速度で尾静脈内に単回投与した。それらの動物の内雌雄 10 匹/群を試験 3 日目に、残りの雌雄 6 匹/群を試験 22 日目に安楽殺後に剖検した。薬剤投与の影響を一般症状、体重、摂餌量・摂水量、眼科学的検査、血液学的検査、尿検査、血液生化学的検査、血液凝固能検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査の所見より評価した。さらに、サテライト群として各群雌雄 5 匹を割付け、ガドブトロールの血漿中濃度を測定した (投与 5 分、1、2、3 及び 6 時間後に採血)。

その結果、20mmol/kg を投与した雄 1 匹が投与日に死亡し、同群雄 1 匹と雌 2 匹が瀕死状態を呈したため安楽死させた。死亡前の一般症状として発声、周辺物体を噛む行動、間代性又は強直性痙攣及び呼吸不整が、さらに雌にはアパシー、腹臥、横臥又は仰臥が観察された。生存動物でも同様に、アパシー、腹臥又は仰臥、発声、周辺物体を噛む行動、間代性又は強直性痙攣、呼吸不整及び閉眼が、さらに数匹の雌では振戦及び失調性歩行もみられた。また、局所刺激性を示唆する一過性の投与部位の変色 (組織学的には血管周囲の出血、血管炎又は血管周囲炎) が、対照群よりやや強く観察された。2 及び 6mmol/kg 群に異常症状は認められなかった。

体重、摂餌量・摂水量、眼科学的検査、尿検査、血液凝固能検査、血液生化学的検査及び剖検所見に薬剤投与に関連した影響は認められなかった。なお、20mmol/kg 群の雌雄各 1 匹に、好中球、単球、リンパ球及び白血球数並びにフィブリノーゲンの増加が、一過性（試験 2 日目）に観察されたが、投与部位の局所刺激性所見に関連したものと考えられた。

20mmol/kg 群では試験 3 日目に腎重量の増加が観察されたが、22 日目に変化は消失した。病理組織学的検査では、試験 3 日目には 2mmol/kg 以上の群で、投与量に依存して尿細管上皮の空胞化が観察された。試験 22 日目にはこの空胞化が、2mmol/kg 群では消失・回復し、6 及び 20mmol/kg 群ではその程度が軽減して、回復傾向が認められた。さらに、20mmol/kg 群では試験 3 日目に肝細胞の空胞化（主として小葉中心域）が観察されたが、22 日目には認められなかった。

以上の成績から、概略の致死量（投与速度 0.4mL/分）は雌雄共に 20mmol/kg と算定された。

全身曝露（AUC）は 20mmol/kg まで投与量に比例して増加した（2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 参照）。また、薬物動態に性差は認められなかった。

2.6.6.2.2.3 0.5mmol/mL 製剤のラット単回静脈内及び単回胃内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.1.6 9330
4.2.3.1.7 B600
4.2.3.1.8 9344
4.2.3.1.9 9329

1 群 3 匹の Wistar 系雄ラット（体重 94～106g）に、0.5mmol/mL 製剤（SH L562A）20mmol/kg 又は陰性対照として生理食塩液（40mL/kg）を、0.8mL/分の投与速度で尾静脈内に単回投与した。その後、14 日目まで一般症状観察及び体重を測定し、安楽殺後に剖検した。その結果、一般症状として、投与直後～3 時間後までにアパシー、発声、周辺物体を噛む行動、失調性歩行、振戦、呼吸不整が観察されたが、翌日以降の観察で異常所見は認められなかった。体重及び剖検で薬剤投与の影響は認められなかった。以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤の雄ラットにおける静脈内単回投与時の概略の致死量（投与速度 0.8mL/分）は 20mmol/kg より大きいと算定された（報告書 9330）。

1 群 3 匹の Wistar 系幼若雄ラット（体重 63～72g）に、0.5mmol/mL 製剤（SH L562A）15 及び 20mmol/kg、又は陰性対照として生理食塩液（40mL/kg）を、0.8mL/分の投与速度で尾静脈内に単回投与し、14 日目まで一般症状観察及び体重を測定し、安楽殺後に剖検した。その結果、15 及び 20mmol/kg 投与動物では、一般症状として投与直後～3 時間後までに、アパシー、発声、失調性歩行、粗毛、振戦及び痙攣を呈し、20mmol/kg の 1 匹が投与 5～10 分の間に死亡した。翌日以降の観察で異常所見は認められなかった。20mmol/kg の生存動物 1 匹で体重増加の減少が観察されたが、その他の動物の体重及び剖検で薬剤投与の影響は認められなかった。以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤の幼若雄ラットにおける静脈内単回投与時の概略の致死量（投与速度 0.8mL/分）は 20mmol/kg と算定された（報告書 9344）。

1 群雌雄 5 匹の SD 系ラットに、0.5mmol/mL 製剤（SH L562AA）の 5、10 及び 20mmol/kg 又は陰性対照として生理食塩液（40mL/kg）を、2mL/分の投与速度で尾静脈内に単回投与し、14 日目まで一般症状観察及び体重を測定し、安楽殺後に剖検した。その結果、20mmol/kg 群では投与直後～30 分後まで、自発性運動の低下、呼吸不整、呼吸緩除、腹臥又は不完全閉眼、失調性歩行及び一過性の腹部単収縮が観察されたが、投与 1 時間以降に異常所見は認められなかった。10mmol/kg 群では投与直後～30 分後までに自発性運動の低下が観察されたが、投与 30 分後以降で異常所見は認められなかった。5mmol/kg 群に薬剤投与の影響は認められなかった。体重、剖

検所見及び臓器重量に薬剤投与の影響は認められなかった。以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤の雌雄ラット静脈内単回投与時の概略の致死量（投与速度 2.0mL/分）は 20mmol/kg より大きいと算定された（報告書 B600）。

さらに、1群3匹のWistar系雄ラットに、単回経口投与可能な最大容量として、0.5mmol/mL 製剤（SH L562A）20mmol/kg 又は陰性対照として生理食塩液（40mL/kg）を、胃ゾンデを用いて強制胃内単回投与した。その後、14日目まで一般症状の観察及び体重測定を行い、安楽殺後に剖検した。その結果、薬剤投与に関連した影響は認められなかった。したがって、ラット強制経口単回投与時の概略の致死量は 20mmol/kg より大きいと算定された（報告書 9329）。

2.6.6.2.3 イヌ単回投与毒性試験

2.6.6.2.3.1 1.0mmol/mL 製剤（SH L562BB）の雄イヌでの単回静脈内投与による用量設定試験

参照項目：4.2.3.1.10 A41286

各群2頭の雄性ビーグル犬を用いて、1.0mmol/mL 製剤（SH L562BB）6及び10mmol/kgを、8mL/分の投与速度で静脈内へ単回投与した。一般症状を毎日1～2回観察し、体重を1（投与日）、3及び8日目に、摂餌量を毎日、試験8日目まで測定した。その結果、10mmol/kg群では投与日にアパシー、自発運動の減少あるいは運動性の亢進、結膜発赤、リッキング、嘔気又は嘔吐が観察されたが、翌日以降異常は認められなかった。6mmol/kg群では投与日に閉眼が観察されたが、翌日以降異常は認められなかった。体重及び摂餌量に薬剤投与による影響は認められなかった。以上から、雄イヌにおける静脈内単回投与時の概略の致死量は、10mmol/kgより大きいと算定された。

2.6.6.2.3.2 1.0mmol/mL 製剤（SH L562BB）のイヌ拡張型単回静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.1.11 A41318

各群雌雄5頭（計10頭）のビーグル犬に、陰性対照として生理食塩液（10mL/kg）、1.0mmol/mL 製剤（SH L562BB）0.3、1.7及び10mmol/kgを、8mL/分の投与速度で橈側皮静脈内に単回投与した。動物は試験3日目に雌雄各3頭（計6頭）を、試験22日目に雌雄各2頭（計4頭）を、安楽殺後に剖検した。薬剤投与の影響は、一般症状、体重、摂餌量、血圧・心電図検査（投与前、投与5分、24時間後及び3週目）、眼科学的検査、神経学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固能検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査所見より評価した。さらに、投与20分、1、3、7及び24時間後に採血して、ガドブトロールの血漿中濃度を測定した。

その結果、最高用量まで死亡動物は認められなかった。1.7mmol/kgの雌1頭及び10mmol/kg群では投与日に嘔吐及びリッキングといった一過性の悪心症状が観察された。さらに、10mmol/kg群では投与直後に、一過性の眼瞼閉鎖及び軽度から中等度のアパシー（雄3頭と雌2頭）、粘膜又は皮膚の一過性発赤、頭部の一過性腫脹（雌雄各1頭）が観察された。また、同群雄で投与5分後に収縮期血圧の軽度な一過性減少が、さらに同群雌雄でR-R間隔とQT時間の短縮を伴う心拍数の一過性増加が観察された。0.3mmol/kg群では投与日に雌雄各1頭で耳内面皮膚又は全身皮膚の一過性発赤が観察された以外に、異常は認められなかった。いずれの場合も、試験2日目以降で異常は認められなかった。また、体重・摂餌量、臨床検査（眼科学的検査、血液学的検査及び血液生化学的検査など）において、薬剤投与の影響は認められなかった。

病理組織学的検査では近位尿細管上皮の空胞化が、2日目には0.3mmol/kg以上の群に最小～軽度までの程度で観察されたが、試験22日目にはその回復傾向が認められた。すなわち、0.3mmol/kg群では空胞化は完全に回復・消失し、1.7mmol/kg以上の群においては最小の変化が残存したのみであった。

以上の成績から、1.0mmol/mL製剤の雌雄イヌ拡張型単回静脈内投与毒性試験における概略の致死量は10mmol/kgより大きいと算定された。

血漿中濃度には投与量依存性が認められ、投与量の増加率に比してAUCの増加率はやや小さかった(2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 参照)。薬物動態に性差は認められなかった。

2.6.6.2.3.3 0.5mmol/mL製剤(SH L562A)のイヌ単回静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.1.12 9883

各群雄2頭と雌1頭(計3頭)のビーグル犬に、0.5mmol/mL製剤(SH L562A) 6.0mmol/kg又は陰性対照として生理食塩液(12mL/kg)を、10mL/分の投与速度で橈側皮静脈内へ単回投与した。投与14日後までの一般症状、血液学的検査、血液生化学的検査及び血液凝固能検査(投与前後及び2日目)、及び尿検査(投与後と2日目)の結果から、薬剤投与の影響を評価した。

その結果、6.0mmol/kgを投与した動物には一般症状として、投与中のリッキング又は浅呼吸、あるいは投与中～30分後までに嘔吐が観察されたが、以降の観察で異常症状は認められなかった。なお、投与後の尿検査で尿比重の上昇がみられたが、ガドブトロール未変化体の尿中排泄に起因した変化と考えられた。血液学的及び血液生化学的検査、並びに血液凝固能検査で、薬剤投与に関連した変化は認められなかった。以上の成績から、0.5mmol/mL製剤のイヌ静脈内単回投与時の概略の致死量は6.0mmol/kgより大きいと算定された。

2.6.6.2.4 単回投与毒性試験成績のまとめ

マウス、ラット及びイヌを用いた単回静脈内投与毒性試験で得られた概略の致死量及び最大非致死量を表2.6.6.2.4-1及び表2.6.7.5に示す。1.0mmol/mL製剤(SH L562BB)の単回静脈内投与時の最大非致死量は、ラットで6～25mmol/kg(概略の致死量としては20mmol/kg)、イヌでは10mmol/kgより大きかった。体表面積に換算すると、ラットでの最大非致死量6～25mmol/kgは36～150mmol/m²に、イヌでの最大非致死量10mmol/kgは200mmol/m²に相当した。すなわち、SH L562BBの予定臨床用量(0.1mmol/kg、3.7mmol/m²)と比較して十分高かった。

各試験で用いた投与速度及び用量が異なっているため、0.5mmol/mL製剤と1.0mmol/mL製剤投与時の試験成績の直接的な比較はできなかった。しかしながら、0.5mmol/mL製剤単回静脈内投与時の概略の致死量又は最大非致死量は、マウス、ラット及びイヌのいずれの動物種においても、1.0mmol/mL製剤での試験成績と同様に、予定臨床用量(0.1mmol/kg、3.7mmol/m²)と比較して十分高かった。

表 2.6.6.2.4- 1 主要な静脈内単回投与毒性試験における概略の致死量及び最大非致死量

Species/Strain (Gender)	Conc., and Formulation used	Injection speed [mL/min]	Test dose [mmol/kg]	Approximate lethal dose [mmol/kg]	Maximal non-lethal dose [mmol/kg]	Report number
Mouse/ NMRI (M, F) n=3	0.5M, A	0.2	0, 25	>25	25	9345, 9346
Rat/ Wistar (M&F) n=16	1M, BB	0.4	0, 2, 6, 20	20	6	A28309
Rat/ SD(M&F) n=5	0.5M, AA	2	0, 5, 10, 20	>20	20	B600
Dog/ Beagle (M&F) n=5	1M, BB	8	0, 0.3, 1.7, 10	>10	10	A41318
Dog/ Beagle (M&F) n=1-2	0.5M, A	10	0, 6	>6	6	9883

Formulations; A=SH L562A, AA=SH L562AA, BB=SH L562BB, M: Males, F: Females

さらに、単回静脈内投与後のラット及びイヌにおける概略の致死量又は最大非致死量を、類薬（ガドリニウム含有細胞外液性 MRI 造影剤）の単回投与毒性試験の成績^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)}と比較した場合、ラットでの概略致死量がガドペンテト酸メグルミン製剤及びガドテリドール製剤よりやや大きい傾向が窺われるものの、明らかな差異は認められなかった（表 2.6.6.2.4- 2）。また、ガドブトロール製剤投与後に観察された一般症状及び死亡は、類薬^{1~8)}の単回投与毒性試験でも観察され、いずれも高張及び高粘度の投与液の急速大量投与による循環障害が主因と推察されている所見と同様であった。

表 2.6.6.2.4- 2 ラット及びイヌ単回静脈内投与毒性試験における概略の致死量及び最大非致死量の類薬との比較一覧

	Species/Strain	Injection speed [mL/min]	Test dose [mmol/kg]	Approximate lethal dose [mmol/kg]	Maximal non-lethal dose [mmol/kg]	Reference
SH L562BB	Rat/ Wistar	0.4	0, 2, 6, 20	20	6	A28309
MV	Rat/ SD	2	0, 4.5-8.9	M: 5.5, F: 5.0-6.7	M: 5.0, F: 4.5	1)
PH	Rat/ SD	3	0, 2, 5, 10	M:5, F:10	M: 2, F: 5	3)
OS	Rat/ SD	2	0, 20	> 20	20	5)
MS	Rat/ SD	2	0, 0.5, 1.5, 5, 15	> 15	15	6)
SH L562BB	Dog/ Beagle	8	0, 0.3, 1.7, 10	>10	10	A41318
MV	Dog/ Beagle	9	6	> 6	6	2)
PH	Dog/ Beagle	n.a.	n.a.	>5	5	4)
OS	Cynomolgus monkey	10	20	>20	20	5)
MS	Dog/ Beagle	10	0, 2.5, 5, 10	>10	10	6)

n.a: not available, M: males, F: females, MV: meglumine gadopentetate formulation, PH: gadoteridol formulation, OS: gadodiamide hydrate formulation, MS: meglumine gadoterate formulation

2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

ガドブトロール製剤の臨床適用は原則単回静脈内投与であり、連日反復投与されないことから、4週間までの反復投与毒性試験を実施した。げっ歯類としてラットを、非げっ歯類としてイヌを用いて、いずれも静脈内へ反復投与した。いずれの場合でも、初期の開発過程で 0.5mmol/mL 製剤（SH L562A）の 16~18 回静脈内投与試験（主としてヨーロッパでの初期開発・申請目的に実施）及び用量設定試験、連日 4 週間反復静脈内投与試験（主として本邦での初期開発目的に実施）を実施し、その後 1.0mmol/mL 製剤（SH L562BB）での連日 4 週間反復静脈内投与試験を実施した。以下の項では、最初に申請製剤である 1.0mmol/mL 製剤（SH L562BB）での試験成績を、次いで 0.5mmol/mL 製剤（SH L562A 又は SH L562AA）での試験成績を、ラット、イヌの順に記載する。

2.6.6.3.1 ラットにおける反復投与毒性試験

2.6.6.3.1.1 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) のラット 4 週間静脈内投与試験及び 10 週間回復性試験

参照項目：4.2.3.2.1 A08936

試験条件及び試験成績を 2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 A08936 に示す。

各群雌雄 10 匹の Wistar 系ラットへ、生理食塩液 (3.0mL/kg)、1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) の 0.6、1.2 又は 3.0mmol/kg を、6mL/分の投与速度で 1 日 1 回 4 週間 (7 回/週、28~31 回投与) 尾静脈内へ反復投与した。さらにサテライト群として、各群雌雄 9 匹の同系ラットを別途割り付け、ガドブトロール (ガドリニウム) の血清中濃度の測定、及び投与終了後 10 週間の休薬期間を設けて回復性の評価を行った。投与量は 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のラットにおける 4 週間 (5 回/週、計 16~18 回投与) 静脈内反復投与毒性試験成績 (2.6.6.3.1.4 報告書 9658) を考慮して設定した。薬剤投与の影響は一般症状、体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固能検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査成績より評価した。さらに、ガドブトロールの主排泄器官である腎臓に関しては、透過型電子顕微鏡による超微形態学的検索も実施した。薬物動態パラメータは、投与初日及び投与 28 日目の投与後 5、20 分、1、3、7 及び 24 時間後の各採血時点で雌雄各 3 匹 (計 6 匹) から得た血清中濃度より評価した。

その結果、一般症状、体重、摂餌量及び摂水量に、薬剤投与に関連した影響は認められなかった。眼科学的検査、尿検査、血液学的検査及び血液凝固能検査結果にも、薬剤投与の影響は認められなかった。血液生化学的検査において投与後 24~25 日目に、雌 0.6mmol/kg 以上の群で β グロブリン、並びに雌 3.0mmol/kg 群で α グロブリンの軽度減少が観察された。当該変化は血清たん白や他の検査項目への影響は伴わず、軽度であったことから毒性所見とは考えられなかった。また、休薬期間終了時には回復した。

投与終了時の剖検所見として、3.0mmol/kg 群の腎臓において、退色が雄 4 匹と雌 1 匹に、腫大が雄 3 匹に観察された。当該変化は休薬期間終了時には認められなかった。投与終了時の臓器重量では、0.6mmol/kg 以上のすべての雌雄において、相対腎重量の増加及び絶対腎重量の増加ないし増加傾向が観察された。10 週間の休薬後には当該変化の軽減が認められたが、雄 3.0mmol/kg の絶対及び相対重量、並びに雌 1.2mmol/kg 群の相対重量には有意な増加が残存した。

投与終了時の病理組織学的検査においては、0.6mmol/kg 以上のすべての雌雄に腎尿細管上皮、膀胱上皮及び尿管上皮の空胞化が用量依存的に観察された。最も顕著な変化として、腎尿細管上皮の空胞化が、すべての動物に軽度から重度までのグレードで観察された。一方、膀胱及び尿管上皮の空胞化は軽微から軽度までのわずかな変化であった (30~100%の発現率)。10 週間の休薬後、すべての空胞化所見の軽減が認められたものの、0.6mmol/kg 群を含むすべての投与群において依然として残存した。さらに、投与終了時の 3.0mmol/kg 群雄 3 匹においては、腎尿細管上皮の重度な空胞化に加えて、尿管上皮細胞の単細胞壊死が観察された。単細胞壊死は軽度な毒性兆候と考えられたが、10 週間の休薬後には認められなかった。透過型電子顕微鏡による腎臓の超微形態学的検査では、近位尿管上皮細胞 (Segment I 及び II 領域) に軽微から重度の空胞が観察されたものの、尿管上皮細胞の超微形態学的構造に機能障害を示唆する変化は認められなかった。

ガドブトロールの血清中動態に性差は認められず、全身曝露は投与量にほぼ比例して増加した。投与されたガドブトロールは急速に体内から消失し、投与初日及び最終投与日共にすべての投与

群で、投与7時間後には定量下限未満となり、反復投与による蓄積性は認められなかった

(2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 参照)。終末相半減期は投与量、性及び投与回数にかかわらず約20分であり、分布容積は反復投与により変動せず、いずれの用量群でも0.2L/kgであった。

以上の成績から、1.0mmol/mL製剤(SH L562BB)のラット4週間反復静脈内投与試験における無毒性量は、雄3.0mmol/kg群の腎尿細管上皮の単細胞壊死を軽微な毒性兆候と判断し、雄では1.2mmol/kg/日、雌では3.0mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.3.1.2 0.5mmol/mL製剤(SH L562A)の雄ラット2日間静脈内投与試験

参照項目：4.2.3.2.2 9926

試験成績を2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験へ示す。

各群10匹のWistar系雄ラットへ、陰性対照として生理食塩液(2.0mL/kg)又は0.5mmol/mL製剤(SH L562A)1.0mmol/kgを、6mL/分の投与速度で1日1回2日間尾静脈内へ反復投与し、3日目に安楽殺した。本試験の目的はラットにおける0.5mmol/mL製剤(SH L562A)の4週間(5回/週、計16~18回投与)静脈内反復投与試験(2.6.6.3.1.4 報告書9658)において、最低用量の1.0mmol/kg群で観察された軽度の腎尿細管空胞化が2回の投与で発現するか否かを検討することであった。薬剤投与の影響は一般症状、体重、剖検所見、臓器重量及び病理組織学的検査所見より評価した。

その結果、薬剤投与の影響は病理組織学的検査で認められた腎臓近位尿細管上皮の微細小胞のみであった。当該所見は尿細管上皮空胞化とは異なり、造影剤の貯蔵というより細胞内移送系の活性化像と考えられた。

2.6.6.3.1.3 1.0mmol/mL製剤(SH L562B)とその0.5mmol/mL調製液のラット8日間静脈内反復投与試験

参照項目：4.2.3.2.3 SG/069

試験成績を2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験へ示す。

各群雌雄5匹のSD系ラットに、陰性対照として生理食塩液(9mL/kg)、0.5mmol/mL調製液(SH L562Bの生理食塩液希釈液)の0.5及び4.5mmol/kg、1.0mmol/mL製剤(SH L562B)の4.5mmol/kgを、2.0mL/分の投与速度で、尾静脈内に1日1回8日間静脈内投与し、最終投与の翌日に安楽殺した。本試験は0.5mmol/mL製剤(SH L562A)のラット4週間反復静脈内投与毒性試験の用量設定試験として実施した。さらに、0.5と1.0mmol/mL濃度液反復投与時の影響を比較することを試験目的に加えた。ガドブトロール投与の影響は一般症状、体重、血液学的検査、血液凝固能検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査所見より評価した。

その結果、薬剤投与と関連した影響は病理学的検査でのみ観察され、0.5mmol/kg(0.5mmol/mL調製液)群では尿細管上皮の軽度空胞化、0.5mmol/mL調製液及び1.0mmol/mL製剤の両4.5mmol/kg群では腎臓の絶対及び相対重量の増加又は増加傾向、並びに腎尿細管上皮の中等度の空胞化が認められた。腎尿細管上皮の空胞化及び腎重量の増加は、糸球体から濾過され尿細管上皮内に再吸収された造影剤分子の一過性貯蔵像と考えられ、いずれも毒性所見とは考えられなかったことから、ラットにおける8日間反復静脈内投与試験の無毒性量は0.5mmol/mL調製液及

び 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562B) 共に 4.5mmol/kg/日と算定された。4.5mmol/kg の 8 日間反復静脈内投与時の影響は、0.5mmol/mL と 1.0mmol/mL 濃度の投与液間で相違は認められなかった。

2.6.6.3.1.4 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のラット 4 週間 (16~18 回) 反復静脈内投与及び 8 週間回復性試験

参照項目 : 4.2.3.2.4 9658

試験条件及び試験成績を 2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験 9658 に示す。

各群雌雄 10 匹の Wistar 系ラットを用い、陰性対照として生理食塩液 (10mL/kg) 又は 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) の 1.0、2.5 及び 5.0mmol/kg を、6mL/分の投与速度で 4 週間 (5 回/週、計 16~18 回) 尾静脈内へ反復投与し、最終投与の翌日に安楽殺した。さらに、回復性評価群として、対照及び 5.0mmol/kg 群に各々雄 20 匹を割り付け、4 週間の投与終了後に 8 週間の休薬期間を設けて、回復性を評価した。投与量及び試験デザインは予定臨床用量及び類薬 (ガドリニウム含有 MRI 造影剤) のラット 16~18 回反復静脈内投与毒性試験を考慮して設定した。薬剤投与の影響は一般症状、体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査、骨髓検査、血液凝固能検査、血液生化学的検査値及び血清中ホルモン (LH、FSH 及びテストステロン) 濃度、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査成績より評価した。

その結果、雌 5.0mmol/kg 群の 2 匹が、投与 4 及び 11 日目の投与直後に一般症状として痙攣、周辺物体を噛む行動及び意識消失を呈して死亡した。雄の 5.0mmol/kg 群、2.5mmol/kg 以下の投与群に異常所見は認められなかった。体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、骨髓検査、血液凝固能検査所見及び血清中ホルモン濃度、剖検所見には薬剤投与の影響は認められなかった。

投与終了時の血液学的及び血液生化学的検査で、対照群と比較して雄において、総 β グロブリンの軽度増加 (1.0mmol/kg 以上)、 α_1 グロブリンの軽度減少 (2.5mmol/kg 以上) 並びに MCH の軽度な増加、赤血球数及びヘマトクリット値の軽度な減少 (5.0mmol/kg 群) が認められた。8 週間の休薬後 (5.0mmol/kg 群) には α_1 、 α_2 及び総 α グロブリンの軽度な減少及び総 β グロブリン、白血球、単球、リンパ球及び網状赤血球数の軽度増加が観察された。5.0mmol/kg 群雄に観察された当該変化 (赤血球系パラメータの減少) は、骨髓検査及び病理組織学的検査で造血器系に関連する影響は認められなかったものの、軽微な毒性兆候と考えられた。また、試験 18 日目の尿検査において、雄では 1.0mmol/kg 以上の群、雌では 2.5mmol/kg 以上の群に尿比重の上昇がみられたが、ガドブトロール未変化体の尿中排泄に関連した影響であり、毒性学的意義は小さいと考えられた。

投与終了時、雄では 1.0mmol/kg 以上、雌では 2.5mmol/kg 以上に腎重量 (絶対及び相対重量) の増加が観察され、8 週間休薬後の雄 5.0mmol/kg 群にも同変化が残存した。病理組織学的検査では、1.0mmol/kg 以上のすべての投与動物で、腎臓の近位尿細管上皮の空胞化が用量依存的にグレード増加を伴って観察された。8 週間の休薬後 (5.0mmol/kg 群) にも依然として尿細管上皮の空胞化が観察されたが、頻度 (100%→90%) 及びグレード (3.7→1.1) 共に回復傾向が認められた。腎機能の障害所見は認められず、尿細管上皮の空胞化は毒性所見とは判断しなかった。

以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のラットにおける 16~18 回反復静脈内投与試験の無毒性量は、5.0mmol/kg 群雌での死亡、同群雄での赤血球系パラメータの減少を毒性所見と判断し、雌雄共に 2.5mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.3.1.5 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のラット 4 週間反復静脈内投与及び 2 週間回復性試験

参照項目：4.2.3.2.5 A03528

試験成績を 2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 A03528 へ示す。

各群雌雄 10 又は 16 匹の SD 系ラットに、陰性対照として生理食塩液 (0.9mL/kg)、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) の 0.1、0.25、0.75 及び 2.5mmol/kg を、いずれも 2mL/分の投与速度で尾静脈内に 1 日 1 回 4 週間静脈内へ投与した。対照群、0.75 及び 2.5mmol/kg 群には雌雄各 16 匹を割付け、その内雌雄各 6 匹を 2 週間の回復性評価用に供した。その他の動物は 4 週間の最終投与翌日に安楽殺後に剖検した。投与量は前述のラット 8 日間静脈内投与による用量設定試験 (2.6.6.3.1.3 報告書 SG/069) 及びラット 16~18 日間静脈内投与試験 (2.6.6.3.1.4 報告書 9658) を参考に設定した。毒性は、一般症状、体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、尿検査、腎機能検査 (PSP 排泄試験を含む)、血液学的検査 (末梢血及び骨髓検査)、血液凝固能検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量及び組織学的検査所見より評価した。

その結果、一般症状、体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査 (末梢血及び骨髓検査)、血液凝固能検査、血液生化学検査及び剖検所見に薬剤投与の影響は認められなかった。雄 2.5mmol/kg 群では試験 4 週目に PSP 排泄率の低下傾向が観察され、軽度ながらも毒性兆候と考えられた。休薬 2 週目の検査では対照群との間に相違は認められなかった。

投与終了時、雌雄 2.5mmol/kg 群では腎臓重量 (絶対及び相対重量) の増加が観察された。2 週間の休薬期間終了時にも腎重量の増加又は増加傾向が観察されたが、対照群との差は減少傾向にあった (対照絶対重量平均値を 1 とした場合、雄：1.3 倍→1.1 倍、雌：1.2 倍→1.1 倍)。病理組織学的検査においては、0.25mmol/kg 以上から腎臓近位尿細管上皮の空胞化が、全例にかつ用量依存的にグレード増加 (部分的、軽度、中等度及び重度) を伴って観察された。また、膀胱上皮の軽度空胞化が 0.25mmol/kg 以上で、少数~全例まで発生頻度に用量依存的増加が観察された。2 週間の休薬後、0.75mmol/kg 以上の群で依然として腎尿細管上皮の空胞化が観察されたが、グレードの軽減が認められた。膀胱上皮の軽度空胞化は、最終投与後及び休薬後共に同様の低い頻度で観察された。しかしながら、これら腎臓及び膀胱の機能障害を示唆する変化は認められず、毒性所見とは考えられなかった。

以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のラット 4 週間反復静脈内投与毒性試験における無毒性量は、雄 2.5mmol/kg 群の PSP 排泄遅延傾向を軽微ながらも毒性所見と判断し、雄で 0.75mmol/kg/日、雌で 2.5mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.3.2 イヌにおける反復投与毒性試験

2.6.6.3.2.1 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) のイヌにおける 4 週間反復静脈内投与及び 8 週間回復性試験

参照項目：4.2.3.2.6 A10548

試験条件及び試験成績を 2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 A10548 に示す。

各群雌雄 3 又は 5 頭のビーグル犬に、陰性対照として生理食塩液 (3.0mL/kg)、1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) の 0.3、1.0 及び 3.0mmol/kg を、静脈内に 1 日 1 回 4 週間 (計 28~31 回) 反復投与した (投与速度 9mL/分)。対照及び 1.0mmol/kg 群では雌雄 5 頭ずつを割り付け、その内

雌雄各2頭ずつ(計4頭/群)を4週間の投与終了後に8週間の休薬期間を設けた回復性評価群とした。雌雄各3頭(計6頭/群)は最終投与の翌日に安楽殺した。投与量は0.5mmol/mL製剤(SH L562A)のイヌ4週間(5回/週、計16~18回投与)静脈内投与試験(2.6.6.3.2.2 報告書A031)成績を参考に設定した。薬剤投与の影響は、一般症状、体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、尿検査、血圧・心電図検査、神経学的検査、血液学的検査、血液凝固能及び血液生化学的検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査成績に基づいて評価した。さらに、TK評価のために、初回投与前及び初回と28日目の投与5、20分、1、3、7及び24時間後に各々雌雄3頭から採血して血清中ガドリニウム濃度を測定した。

一般症状として、1.0mmol/kg以上の群で投与直後の嘔吐又はリッキング(悪心兆候)、可視粘膜の赤色化が散発的に、3.0mmol/kg群では一過性軽度のアパシー、閉眼又は耳介内面の発赤が観察された。体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、神経学的検査、血液学的検査及び血液生化学的検査においては、薬剤投与の影響は観察されなかった。3.0mmol/kg群では試験3週目の投与1時間後に心拍数の一過性かつ軽度な増加が認められたが、投与翌日及び休薬時(試験13週)にかかる変化は認められなかった。以上の所見の内、3.0mmol/kg群の一般症状及び心拍数の増加は軽度ながらも毒性兆候と考えられた。

尿検査においては1.0mmol/kg以上で尿比重の上昇が観察されたが、0.5mmol/mL製剤のイヌ単回静脈内投与試験(2.6.6.2.3.3 報告書9883)でも観察されたガドブトロール未変化体の尿中排泄に起因した変化であり、毒性学的意義に乏しいと考えられた。また、試験3及び21日目に雌の1.0mmol/kg以上で、尿中NAG及び γ -GTの軽度増加が観察されたが、休薬期間中の検査

(試験81日目)では影響を認めなかった。尿中NAGは尿細管上皮細胞のライソゾーム活性の指標であり、尿中 γ -GTは同じく尿細管上皮細胞の主として冊子縁由来の遊離酵素である。病理組織学的検査で観察された腎尿細管上皮細胞の空胞化は、雌よりもむしろ雄で強く発現し、雌雄共に壊死性変化は認められなかったことから、これら尿中酵素排泄の増加は毒性所見とは考えられなかった。

投与終了時、剖検では1.0mmol/kg群の雌1/3頭、3.0mmol/kg群の雄3/3頭、雌2/3頭で腎臓の淡明化が観察され、病理組織学的検査では0.3mmol/kg以上のすべての薬剤投与動物に、腎尿細管上皮の空胞化が用量依存的に観察された(空胞化のグレード;0.3mmol/kg群では雌雄共に軽微、1.0mmol/kg群では雄で軽度、雌で軽微~軽度、3.0mmol/kg群の雄では中等度から重度、雌では軽微から中等度まで)。8週間の休薬後、1.0mmol/kg群に上記空胞化は認められず、可逆性変化であることが確認された。

以上の成績から、1.0mmol/mL製剤(SH L562BB)のイヌ4週間反復静脈内投与試験における無毒性量は、3.0mmol/kg群の一般症状及び心拍数増加を毒性所見と判断したことから、雌雄共に1.0mmol/kg/日と算定された。

ガドブトロールの血清中動態に性差は認められず、全身曝露は投与量に比例して増加した(2.6.7.3 トキシコキネティクス:トキシコキネティクス試験成績の一覧 参照)。投与されたガドブトロールは急速に血清中から消失し、投与初日及び最終投与時共にほとんどの動物で、投与7時間後にはほぼ定量下限(10 μ mol/L)未満となり、反復投与による蓄積性は認められなかった。終末相半減期は用量、性及び投与回数に影響されず約43分であった。

2.6.6.3.2.2 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のイヌにおける 16~18 回 (4 週) 反復静脈内投与試験

参照項目 : 4.2.3.2.7 A031

試験条件及び試験成績を 2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験 A031 に示す。

各群雌雄各 3 頭 (計 6 頭) のビーグル犬に、陰性対照として生理食塩液 (5mL/kg)、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) 0.25、1.0 及び 2.5mmol/kg を、静脈内に 1 日 1 回、週 5 回で 4 週間 (計 16~18 回) 反復投与した。なお、投与部位として左右橈側皮静脈及び伏在静脈をほぼ毎日変更して用い、投与速度は 10mL/分とした。薬剤投与の影響は、一般症状、体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、尿検査、血圧・心電図検査、神経学的検査、血液学的検査、血液凝固能・血液生化学的検査、骨髓検査、剖検所見、臓器重量及び病理組織学的検査成績に基づいて評価した。

その結果、0.25mmol/kg 群に薬剤投与の影響は認められなかった。

試験 22 日目に血液学的検査で、雄 2.5mmol/kg 群に血小板数の軽度な減少が観察されたが、血液凝固能や骨髓検査並びに病理組織学的検査で薬剤投与の影響は認められず、毒性学的意義は小さいと考えられた。また、試験 3 及び 18 日目の尿検査において、雌雄 1.0mmol/kg 以上に尿比重の上昇ないし上昇傾向が観察されたが、前述のごとくガドブトロール未変化体の尿中排泄に関連したもので毒性所見ではないと考えられた。また、雌 1.0mmol/kg 以上及び雄 2.5mmol/kg 群で尿中 γ -GT の増加が観察され、尿細管上皮細胞の冊子縁からの酵素遊離が示唆されたが、腎臓の病理組織学的検査では尿細管上皮細胞に空胞化のみが、雌でよりむしろ雄で強く観察され、雌雄共に壊死性変化は認められなかったことから、雌でより顕著に観察された尿中 γ -GT 排泄増加は前述のイヌ 4 週間投与試験 (2.6.6.3.2.1 報告書 A10548) と同様に、毒性所見とは考えられなかった。

病理組織学的検査の結果、1.0mmol/kg 以上で腎尿細管上皮細胞には空胞化が用量依存的変化として観察された。

以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のイヌにおける 16~18 日間反復静脈内投与試験における無毒性量は、雌雄共に最高用量まで毒性所見は認められなかったことから、2.5mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.3.2.3 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562AA) のイヌにおける 4 週間反復静脈内投与及び 4 週間回復性試験

参照項目 : 4.2.3.2.8 SG/135

試験条件及び試験成績を 2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験 SG/135 に示す。

各群雌雄 3 又は 6 頭のビーグル犬に、陰性対照として生理食塩液 (5mL/kg)、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562AA) の 0.1、0.5 及び 2.5mmol/kg を、1 日 1 回 4 週間連日 10mL/分の投与速度で橈側皮静脈に反復投与した。対照群及び 2.5mmol/kg 群には各群雌雄 6 頭を割付け、その内雌雄 3 頭については、4 週間の投与期間終了後に 4 週間の休薬期間を置く回復性評価群とした。動物は最終投与翌日又は休薬期間終了後に安楽殺し、剖検に供した。薬剤投与の影響は、一般症状、体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、尿検査、血圧・心電図検査、血液学的検査、骨髓検査、血液凝固能検査、血液生化学的検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査所見に基づいて評価した。

その結果、死亡例は認められず、一般症状、体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査及び心電図検査成績に薬剤投与の影響は認められなかった。血液学的検査、骨髄検査、血液凝固能検査、血液生化学的検査、剖検所見及び臓器重量にも薬剤投与の影響は認められなかった。

投与終了時尿検査において、雌雄 2.5mmol/kg 群に γ -GT の増加、同群雄に NAG の増加が観察されたが、4 週間の休薬後の検査では認められなかった。

病理組織学的検査では、0.5mmol/kg 以上で尿細管上皮に軽度な空胞化及び軽度から中等度の硝子滴が観察された。しかしながら、他に変性又は壊死性組織変化は認められず、尿検査や他の腎機能検査においても腎障害を示唆する所見は認められなかったことから、これらは毒性所見とは考えられなかった。4 週間の休薬後 (2.5mmol/kg 群)、雌にはいずれの所見も認められず、雄には軽度な空胞化と硝子滴が 3 頭中 1 頭にのみ観察され、回復傾向が確認された。

以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562AA) のイヌにおける 4 週間反復静脈内投与試験の無毒性量は雌雄共に 2.5mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.3.3 反復投与毒性試験成績のまとめ

いずれの反復投与毒性試験においても、高用量では腎重量増加を伴い、用量依存的な尿細管上皮の空胞化が認められた。このような尿細管上皮の空胞化は、類薬 (ガドリニウム含有 MRI 造影剤)^{9, 10, 11, 12, 13, 14}、ヨード X 線造影剤^{15, 16, 17, 18, 19, 20} の毒性試験、及び高張な多糖類溶液^{21, 22, 23, 24} の大量投与時にも認められ、尿細管上皮による造影剤分子のエンドサイトーシスによる取り込み又は再吸収、若しくは浸透圧に起因した変化と考えられている。当該変化は腎機能への影響を伴わず、また、休薬によって回復する可逆性変化であり、毒性所見とは考えられていない。ガドブトロール製剤を用いた毒性試験においても、尿細管上皮に空胞化が観察されたものの、血中クレアチニンや尿素窒素など腎機能検査値への影響は認められなかった。さらに、透過型電子顕微鏡においても、尿細管上皮細胞の微細構造に変性又は壊死など機能障害を示唆する超微形態学的変化は認められなかった。また、ラット 4 週間反復投与試験では膀胱上皮の軽度な空胞化も観察されたが、このような変化も類薬¹⁰又はヨード X 線造影剤¹⁷のラット 4 週間反復投与毒性試験で観察され、同様の機序が想定されている。同様に、一過性の尿中 NAG 排泄増加も類薬の毒性試験¹²において観察されているが、毒性所見とはみなされていない。すなわち、これらの所見は生体の外来物に対する適応性変化であって、いずれも毒性所見とは考えられなかった。

ラット及びイヌの 4 週間又は 16~18 日間反復静脈内投与試験から得られた無毒性量及び毒性所見を、表 2.6.6.3.3-1 に示す。製剤濃度の違いによる毒性所見、及び無毒性量の明らかな相違は認められなかった。さらに、各種反復投与毒性試験で無毒性量推定の根拠となった毒性所見はいずれも軽微で、複数の試験で共通して認められず、明らかな臓器又は組織の変性・壊死所見は認められなかった。ラットに申請製剤 (SH L562BB) 3.0mmol/kg を 4 週間反復静脈内投与した場合、尿細管上皮に単細胞壊死が観察された。当該所見は雌では観察されず、雄少数 (3/10 例) にのみ観察された。また、休薬により消失・回復した可逆性変化であること、イヌ 4 週間反復投与毒性試験では観察されなかったこと、3.0mmol/kg は後述のように予定臨床用量

(0.1mmol/kg) に比して十分高い用量であることを考慮すると、通常は単回投与が想定される臨床使用状況においては問題となる所見とは考えられなかった。

表 2. 6. 6. 3. 3- 1 各種 4 週間反復静脈内投与試験で得られた無毒性量及びその根拠とした毒性所見の一覧

Species	Conc. and formulation used	Duration of administration	Injection speed [mL/min]	Dose [mmol/kg]	Adverse findings/ NOAEL	Report no.
Rat	1M, BB	4 weeks (7 times/week)	6	1.2 3.0	M: NOAEL M: single cell necrosis in tubule F: NOAEL	A08936
Rat	0.5M, A	4 weeks (7 times/week)	2	0.75 2.5	M: NOAEL M: tendency of delay of PSP excretion F: NOAEL	A03528
Rat	0.5M, A	4 weeks (5 times/week) 16-18 times	6	2.5 5.0	NOAEL M: slight effect on hematology parameters F: 2/10 mortalities	9658
Dog	1M, BB	4 weeks (7 times/week)	9	1.0 3.0	NOAEL slight apathy, reddening of inner ears/ mucosal membranes and transient increase of heart rate	A10548
Dog	0.5M, AA	4 weeks (7 times/week)	10	2.5	NOAEL	SG/135
Dog	0.5M, A	4 weeks (5 times/week) 16-18 times	10	2.5	NOAEL	A031

Formulations; A=SH L562A, AA=SH L562AA, BB=SH L562BB, M: Males, F: Females, NOAEL: No Observed Adverse Effect Level

1. 0mmol/mL 製剤 (SH L562BB : 申請製剤) のラット及びイヌ 4 週間反復静脈内投与試験で得られた無毒性量又は毒性用量と予定臨床用量との関係について、体重比及び体表面積比での比較を表 2. 6. 6. 3. 3- 2 に示す。予定臨床用量 (0. 1mmol/kg) と比較して、ラット 4 週間反復投与試験の無毒性量 (1. 2mmol/kg/日) は体重換算で 12 倍、体表面積換算では約 2 倍であった。イヌ 4 週間反復静脈内投与試験の無毒性量 (1. 0mmol/kg/日) は体重換算で 10 倍、体表面積換算では約 5 倍であった。

表 2. 6. 6. 3. 3- 2 1. 0mmol/mL 申請製剤のラット及びイヌ 4 週間静脈内投与毒性試験の無毒性量及び軽度な毒性発現量と予定臨床用量の比 (体重及び体表面積換算)

Species	Dose [mmol/kg]	Margin based on body weight	Dose [mmol/m ³]	Margin based on body surface area
Human	0.1	1	3.7	1
Rat	1.2 : NOAEL	12	7.2	1.95
	3.0 : slight effect	30	18.0	4.86
Dog	1.0 : NOAEL	10	20.0	5.41
	3.0 : slight effect	30	60.0	16.22

Body surface areas were calculated based on each factors²⁵⁾ of rats: 6, dog: 20 and human: 37

さらに、上述の申請製剤 (SH L562BB) を用いたラット及びイヌ 4 週間反復静脈内投与試験で得られた無毒性量を、健康成人 (日本人) における予定臨床用量 (0. 1mmol/kg) 投与時の薬物動態パラメータ (C_{max} 及び AUC) で比較した結果を表 2. 6. 6. 3. 3- 3 に示す。4 週間反復投与試験で得られた無毒性量を AUC で比較すると、ラットでの無毒性量 (1. 2mmol/kg/日) は予定臨床用量投与時 AUC の約 3 倍、イヌでの無毒性量 (1. 0mmol/kg/日) は約 5 倍相当であった。また、両動物種で軽微な毒性所見が観察された用量 (3. 0mmol/kg/日) は AUC で比較すると、ラットでは予定臨床用量投与時の約 8 倍に、イヌでは約 19 倍に相当した。さらに、SH L562BB は造影剤であり、連日に渡って反復投与されることは想定されないこと (原則単回投与) を考慮するとき、一連の反復投与毒性試験の結果から、臨床使用上問題となる所見は観察されなかったと結論できる。

表 2.6.6.3.3- 3 申請製剤の 4 週間反復投与毒性試験における無毒性量及び軽度な毒性発現量と予定臨床用量での薬物動態パラメータの比較

Species	Dose [mmol/kg]	Cmax ^{a)} [μmol/L]	Ratio based on human Cmax	AUC _(0-∞) [μmol·h/L]	Ratio based on human AUC	Reference [Report no.]
Human	0.1	1218	1	1026	1	A39759 ^{b)}
Rat	1.2 : NOAEL	6408	5.3	3233	3.2	A08936
	3.0 : slight effect	14785	12.1	8590	8.4	(day 28)
Dog	1.0 : NOAEL	5630	4.6	5227	5.1	A10548
	3.0 : slight effect	16612	13.6	19381	18.9	(day 28)

a): Data were at the first sampling point (Human: at 2 minutes p.i., Rat and Dog : at 5 minutes p.i.)

b): Open study for healthy Japanese volunteer (n=8), Refer to Table 2.7.2.2.2.1-1

2.6.6.4 遺伝毒性試験

ガドブトロールの遺伝毒性試験として、細菌を用いる復帰変異原性試験、ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験、チャイニーズハムスターV79 培養細胞を用いる HPRT 試験（以上、*in vitro* 試験）及びマウス骨髄小核試験（*in vivo* 試験）を実施した。被験物質は、いずれの試験においても 0.5mmol/mL 製剤（SH L562A）を用いた。

2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰変異原性試験

参照項目 : 4.2.3.3.1.1 9503

4.2.3.3.1.2 9501

4.2.3.3.1.3 9502

試験条件及び試験成績を 2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性 9503、9501 及び 9502 に示す。

ガドブトロールの遺伝子突然変異誘発性を、*S. typhimurium* のヒスチジン要求性株 4 種（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）及び *E. coli* のトリプトファン要求株（WP2uvrA）を用い、プレート法及びプレインキュベーション法にて、代謝活性化系の添加時及び非添加時で検討した。最高濃度は *E. coli* のプレート法では 10,000 μg (10mg) /プレート、その他の試験では、いずれも 6,000 μg (6mg) /プレートとした。その結果、いずれの試験でも代謝活性化系の添加及び非添加にかかわらず復帰変異コロニー数の増加は観察されず、ガドブトロールは遺伝子突然変異を誘発しなかった。

2.6.6.4.2 ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験

参照項目 : 4.2.3.3.1.4 9616

4.2.3.3.1.5 9972

試験条件及び試験成績を 2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性 9616 及び 9972 に示す。

ガドブトロールの *in vitro* 染色体異常誘発性を、ヒトリンパ球を用い、代謝活性化系の添加時及び非添加時で検討した。最高濃度は約 6,000 μg (6mg) /mL とし、独立した 2 回の試験を実施した。処理時間は代謝活性化系非添加時では 20 及び 27 時間、代謝活性化系添加時には 3 時間の処理と 17 及び 24 時間回復期間終了後とした。その結果、いずれの場合も染色体異常細胞出現頻度の増加は認められなかった。

2.6.6.4.3 チャイニーズハムスターV79 培養細胞を用いる HPRT 試験

参照項目：4.2.3.3.1.6 9592

試験条件及び試験成績を 2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性 9592 に示す。

ガドブトロールの遺伝子突然変異誘発性を、チャイニーズハムスターV79 培養細胞を用いる HPRT 試験で評価した。最高濃度は約 6,000 μg (6mg) /mL とし、代謝活性化系の添加時及び非添加時共に、独立した 2 回の試験を実施した。その結果、いずれの場合も突然変異コロニー数の増加は認められず、突然変異誘発性は陰性と判断された。

2.6.6.4.4 マウス骨髄小核試験

参照項目：4.2.3.3.2.1 9823

試験条件及び試験成績を 2.6.7.9 In vivo 遺伝毒性に示す。

各群雌雄 5 匹の NMRI 系マウスに、0 (生理食塩液 ; 16mL/kg) 、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) 2、4 及び 8mmol/kg を尾静脈内に単回投与し、24、48 及び 72 時間後に骨髄細胞を採取し、小核誘発性を評価した。最高用量はマウス単回静脈内投与試験成績 (2.6.6.2.1 報告書 9345 及び 9346) 及び試験実施当時にヨーロッパで推奨されていた最高用量 (5,000mg/kg) を考慮して設定した (8mmol/kg=約 4,836mg/kg) 。陽性対照として、triaziquone 0.15mg/kg を単回腹腔内投与し、約 24 時間後に採取した骨髄細胞を用いた。その結果、陽性対照では小核を有する多染性赤血球の増加が観察されたが、ガドブトロール投与群ではいずれの採取時間、投与量又は雌雄いずれにおいても、小核誘発性は認められなかった。

以上のように、*in vitro* 及び *in vivo* のいずれの試験系においても、ガドブトロールに遺伝毒性は認められなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

SH L562BB は造影剤であり、臨床上長期にわたって連続投与されることがない (原則単回投与) 。ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において、前腫瘍性変化或いは慢性炎症性変化は観察されなかった。また、ガドブトロールは静脈内投与後に速やかに尿中排泄され、蓄積性は認められていない。さらに、遺伝毒性も認められなかった。これらのことから、がん原性は懸念されず、がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.6.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.6.6.1.1 1.0mmol/mL 製剤（SH L562BB）による試験

参照項目：4.2.3.5.1.1 A39049

試験条件及び試験成績を 2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期発生に関する試験 A39049 に示す。

各群雌雄 20 匹の Wistar 系ラットに、1.0mmol/mL 製剤（SH L562BB）0.6、2.2 及び 7.5mmol/kg、又は陰性対照として生理食塩液 7.5mL/kg を、尾静脈内に反復投与した。雄では交配前 4 週間及び交配期間中と剖検前日まで、雌では交配前 2 週間及び交配期間中並びに妊娠 7 日目まで投与した。さらに、各群雄 6 匹を TK 測定用サテライト群として設け、投与初日、22 及び 43 日目の血漿中ガドブトロール濃度（投与 5 分、3、7 及び 24 時間後）を測定し、全身曝露を評価した。投与量は 0.5mmol/mL 製剤（SH L562A）のラット受胎能及び着床までの初期発生に関する試験（2.6.6.6.1.2 報告書 SG/124）及び 1.0mmol/mL 製剤のラット 4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.1 報告書 A08936）において、3.0mmol/kg まで明らかな一般毒性所見が認められないことが明らかにされている。さらに 1.0mmol/mL 製剤（SH L562BB）を、妊娠ラット妊娠 6 日目から授乳 21 日目まで約 39 日間反復投与した出生前及び出生後の母体発育に関する試験の用量設定試験（2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 報告書 PH-35165 参照）において、5.0、7.5 及び 10.0mmol/kg の投与量を反復静脈内投与した結果、10.0mmol/kg は反復投与可能な用量を超えていることが示された。以上の試験結果に基づいて、7.5mmol/kg を最高用量に、2.2mmol/kg（中間用量）及び 0.6mmol/kg（最低用量）を設定した。なお、最高用量（7.5mmol/kg）群の雌 2 匹が投与初日に死亡したため、2 匹を追加割付けした。薬剤投与の影響は、一般症状、体重及び摂餌量、交配成績、妊娠及び生殖パラメータに基づいて評価した。

その結果、雄では 2.2mmol/kg 以上で、投与部位の明らかな局所障害、剖検時の用量依存的な腎腫脹と腎重量の増加が観察され、雌では 7.5mmol/kg 群で同様の腎臓の変化が観察されたものの、投与部位の局所障害は体重・摂餌量など全身性の一般状態に影響は認められなかったこと、腎の腫脹及び重量増加は反復投与試験の項（2.6.6.3.3）で考察したように腎機能へ影響しない可逆性変化であることが知られていることから、いずれも毒性所見とは考えられなかった。雌 7.5mmol/kg 群ではさらに、投与初日に重度一般症状を伴う急性死亡（2 匹）、投与直後の発作性呼吸困難と腹臥又は横臥（3 匹）が観察され、これらは全身毒性所見と考えられた。一方、交配成績、妊娠及び生殖パラメータに薬剤投与の影響は認められなかった。

雄ラットにおいて初回投与後及び 43 日間の反復投与後の AUC 及び C_{max} は投与量にほぼ比例して増加した。ガドブトロールは急速に血漿中から消失した。初回投与後の AUC 及び C_{max} と比較して、反復投与 43 日目の 0.6mmol/kg 群及び 7.5mmol/kg 群の値に意義のある増加は認められなかったが、2.2mmol/kg 群の AUC 及び C_{max} はやや高かった（2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 参照）。

以上の成績から、雄動物の一般毒性学的及び生殖能に対する無毒性量はいずれも 7.5mmol/kg/日、雌動物の一般毒性学的無毒性量は 2.2mmol/kg/日、生殖能に対する無毒性量は 7.5mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.6.1.2 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) による試験

参照項目：4.2.3.5.1.2 SG/124

試験条件及び試験成績を 2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期発生に関する試験 SG/124 に示す。

各群雌雄 22 匹の SD 系ラットに、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) 0.25、0.75 及び 2.5mmol/kg、又は陰性対照として生理食塩液 5.0mL/kg を尾静脈内に反復投与した。雄では交配前 60 日間及び交配期間終了日まで、雌では交配前 2 週間及び交配期間中並びに妊娠 7 日目まで投与した。投与量はラットにおける 8 日間反復静脈内投与による用量設定試験 (2.6.6.3.1.3 報告書 SG/069) 及び類薬 (ガドリニウム含有 MRI 造影剤) の Segment I 試験結果を参考に設定した。薬剤投与の影響は、一般症状、体重及び摂餌量、交配成績、妊娠及び生殖パラメータ、胎児検査成績に基づいて評価した。

その結果、いずれのパラメータに関しても最高用量 2.5mmol/kg まで、薬剤投与の影響は認められなかった。したがって、0.5mmol/mL 製剤のラットにおける受胎能及び着床までの初期発生に関する試験における無毒性量は、雌雄親動物 (一般毒性学的及び生殖能) 及び初期胚発生に対して、いずれも 2.5mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1 ラット胚・胎児発生に関する試験

1) 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) による試験

参照項目：4.2.3.5.2.2 A34150

4.2.3.5.2.1 A30997

試験条件及び試験成績を 2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 A34150 に示す。

交尾の成立した Wistar 系雌ラット総計 80 匹を 4 群に群分けし (20 匹/群)、1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) 5.0、7.5 及び 10.0mmol/kg、又は陰性対照としての生理食塩液 (10mL/kg) を、妊娠 6~17 日目まで約 1mL/分の投与速度で、尾静脈内に反復投与した。投与量は 1.0mmol/mL 製剤のラット胚・胎児毒性に関する用量設定試験 (2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験報告書 A30997 参照) における最高用量 (10.0mmol/kg；ラットに尾静脈内反復投与が可能な最大容量 10mL/kg を考慮して設定) 群の母動物に体重増加抑制及び摂餌量減少が認められたが、胎児に対しては 10.0mmol/kg まで明らかな毒性所見は観察されなかったこと、0.5mmol/mL 製剤のラット胚・胎児発生毒性試験 (2.6.6.6.1.2 報告書 A576) において、ガドブトロール 0.5~5.0mmol/kg での毒性プロファイルが既に明らかにされていることを考慮して設定した。さらに、TK 測定用サテライト動物として、各群 8 匹ずつの妊娠ラットを割り付け、投与初日 (一部翌日) 及び最終投与日の投与 5 分、1、3、7 及び 24 時間後に各時点 3~4 匹から採血して、血漿中 TK パラメータを評価した。動物は妊娠 21 日目に帝王切開し、胎児検査に供した。薬剤投与の影響は、一般症状、体重、妊娠・生殖パラメータ及び胎児検査 (外表、内臓及び骨格検査) 成績に基づいて評価した。

その結果、母動物では 10.0mmol/kg 群では 2 匹の死亡 (主試験群及びサテライト群；投与 3 及び 4 日目)、4 匹に重度の一般症状 (発声、振戦、呼吸促拍又は呼吸不整、腹臥、横臥又は仰

臥)が観察された。また、投与初日(初回採血日)の1匹(サテライト群)が重度の臨床症状(腹臥、横臥又は仰臥、痙攣及び呼吸不整)により切迫殺された。これら死亡及び切迫殺例の内、採血日の切迫殺1匹については、採血部位である頸部皮下に出血が認められ、薬剤投与による直接的影響よりも採血時の不注意な止血操作に基づく出血の寄与が大きいと推察された。他の死亡例の剖検所見では死因を特定できる所見は認められなかったものの、1.0mmol/mL 製剤のラットの静脈内単回投与毒性試験(2.6.6.2.2.2 報告書 A28309)において観察されたと同様の一般症状が認められたことから、急性循環障害による死亡が示唆された。7.5mmol/kg 群では、1匹(主試験群)に、重度の一般症状(アパシー、発声、強直性又は間代性痙攣)が観察された。なお、7.5mmol/kg 以上の群においては、投与部位の局所刺激性所見(投与部位付近皮膚の蒼白化、痲痺形成、損傷及び滲出液)が観察された。体重に関しては、10.0mmol/kg 群に増加抑制が観察されたが、7.5mmol/kg 以下の群に影響は認められなかった。摂餌量に関しては、10.0mmol/kg 群では試験期間を通して減少が観察され、7.5mmol/kg 群で投与初期に軽度減少し、その後回復した。5.0mmol/kg 群に薬剤投与の影響は認められなかった。

妊娠及び生殖パラメータに関しては、黄体数、着床前死亡率、着床痕数及び着床後死亡率に薬剤投与の影響は認められなかった。10.0mmol/kg 群では妊娠21日目の早産が2匹(サテライト群)に、観察されたが、対照群にも1匹の早産が観察されていることから、薬剤投与の影響とは考えられなかった。

胎児に関しては、最高用量10.0mmol/kg まで胎児死亡は認められず、性比にも薬剤投与の影響は認められなかった。10.0mmol/kg 群では平均胎児体重の減少が観察された。7.5mmol/kg 以下の群に薬剤投与の影響は認められなかった。

胎児の外表及び内臓検査において薬剤投与の影響は認められなかった。一方、骨検査においては、7.5mmol/kg 以上の群で軽度の骨変異発生頻度の増加(近位指/趾節骨の未骨化及び肋骨変異の増加に関連した波状肋骨の発生頻度増加)が観察された。加えて、10.0mmol/kg 群では頭骨の変異(主として下顎骨及び頬骨の不完全骨化)及び踵骨の骨化頻度減少が観察された。すなわち、観察された変化はいずれも発育遅延と考えられる骨化不全所見であり、奇形の発現頻度に薬剤投与の影響は認められなかった。

TKにおいて、初回投与後(妊娠6日目)及び反復投与12日目(妊娠17日目)のいずれにおいても、C_{max}及びAUCは投与量に依存して増加した。初回投与後(妊娠6日目)と反復投与12日目(妊娠17日目)を比較したとき、7.5及び10.0mmol/kg 投与群では反復投与後のAUCは初回投与時のAUCより高値であった(2.6.7.3 トキシコキネティクス:トキシコキネティクス試験成績の一覧 参照)。

以上の成績から、1.0mmol/mL 製剤のラット胚・胎児発生に関する試験における無毒性量は、母動物の一般毒性学的には5.0mmol/kg/日、その生殖能に対しては7.5mmol/kg/日、胎児に対しては5.0mmol/kg/日と算定された(報告書 A34150)。

2) 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) による試験

参照項目: 4.2.3.5.2.3 A576

試験条件及び試験成績を2.6.7.13 生殖発生毒性試験:胚・胎児発生に関する試験 A576 に示す。

交尾の成立したWistar系雌ラット総計144匹を、各々帝王切開24匹及び自然分娩12匹(計36匹/群)を含む4用量群に群分けし、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) 0.5、1.5及び5.0mmol/kg、陰性対照としての生理食塩液(10mL/kg)を、妊娠6~15日目まで約10mL/分の投与速度で尾静

脈内に反復投与した。帝王切開群では妊娠 21 日目に帝王切開し、自然分娩群では出生児を身体、機能及び行動検査に供した。最高用量 5.0mmol/kg はラット 16~18 日間反復投与試験

(2.6.6.3.1.4 報告書 9658) で雌動物に死亡を含む一般毒性所見が観察された投与量であり、10mL/kg はラットに連続ボーラス静脈内投与可能な最大容量であること、及び試験当時の予定臨床用量より十分高いことを考慮して設定した。また、当該予定臨床用量を考慮して中間用量

(1.5mmol/kg) 及び最低用量 (0.5mmol/kg) を設定した。薬剤投与の影響は、一般症状、体重、妊娠・生殖パラメータ及び胎児検査 (外表、内臓及び骨格検査)、並びに出生児の生後発達検査成績に基づいて評価した。

その結果、母動物の一般症状、体重、胎児の外表及び内臓検査成績 (奇形発生を含む) に、薬剤投与の影響は認められなかった。5.0mmol/kg 群では着床後死亡の軽度増加、母動物あたりの生存胎児数の軽度な減少及び骨化の軽度遅延が観察された。1.5mmol/kg 以下の群に薬剤投与の影響は認められず、また、いずれの群でも出生児の生後発達に影響は認められなかった。

以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤のラット胚・胎児発生に関する試験における無毒性量は、母動物の一般毒性学的には 5.0mmol/kg/日、その生殖能に対しては 1.5mmol/kg/日、胎児に対しては 1.5mmol/kg/日、出生児に対しては 5.0mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.6.2.2 ウサギ胚・胎児発生に関する試験

1) 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) による試験

参照項目 : 4.2.3.5.2.5 A36661
4.2.3.5.2.4 A32272

試験条件及び試験成績を 2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A36661 に示す。

交尾の成立した New Zealand White (NZW) 系雌ウサギ総計 80 匹を、各群 20 匹ずつ 4 群に分け、1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) 2.5、5.0 及び 10.0mmol/kg、陰性対照としての生理食塩液 (10mL/kg) を、妊娠 6~18 日目まで、5mL/分の投与速度で耳介辺縁静脈内に反復投与し、妊娠 28 日目に帝王切開した。さらに、TK 測定用サテライト動物として各群あたり 4 匹ずつを割り付け、同様に投与処置を施した。

投与量設定に関しては、0.5mmol/mL 製剤での試験成績及び以下の用量設定試験成績を考慮した。1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) の妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生毒性に関する用量設定試験 (投与量 5.0、7.5 及び 10.0mmol/kg) で、5.0mmol/kg 以上に母動物の体重増加量及び体重減少、用量依存性が明らかでない摂餌量減少が観察され、7.5mmol/kg 以上に胎児体重の減少傾向が観察された (2.6.7.11 生殖発生毒性試験 : 重要な試験以外の試験 報告書 A32272)。一方、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) を用いたウサギ胚・胎児発生毒性試験 (2.6.6.6.2.2 報告書 A420) においては、ガドブトロールとして 0.5~5.0mmol/kg 投与時の毒性及び安全性プロファイルは既に明らかにされていること (胎児の無毒性量 1.5mmol/kg/日) から、本試験では投与量として 2.5、5.0 及び 10.0mmol/kg を設定し、より高用量曝露時の毒性所見を確認することとした。すなわち、無毒性量を求めることは試験目的とはしなかった。薬剤投与の影響は、一般症状、体重、摂餌量、妊娠パラメータ及び胎児検査 (外表、内臓及び骨格検査) 成績に基づいて評価した。また、帝王切開 (剖検) 時には主試験群の腎臓重量を測定した。投与初日 (一部翌日) 及び最終投与日の投与 5 分、1、3、7 及び 24 時間後に採血して、血漿中 TK パラメータを評価した。

その結果、母動物では10.0mmol/kg群の3匹が妊娠15～20日目までに散発的に死亡した。さらに、1匹を妊娠15日目に切迫屠殺した。3匹の死亡例では死亡の数日前に2匹で排便欠如、1匹で血尿が観察され、また共に剖検で腎臓の蒼白化がみられた。さらに10mmol/kg群では2匹に流産が、別の2匹に早期分娩（帝王切開予定日）が観察され、後述する母動物の体重及び摂餌量減少による全身毒性の二次的影響と考えられた。なお、5.0mmol/kg群の1匹が妊娠26日目に死亡したが、最終投与から8日間経ており、剖検で肺に感染症を示唆する変化が観察されたことから、薬剤投与に起因した死亡とは考えられなかった。生存例の一般症状として、10.0mmol/kg群では投与期間中、排便の減少又は消失が対照群に比して増加した。また、局所刺激性を示唆する投与部位（耳介辺縁静脈）周辺の所見（痲痺形成又は蒼白化）が観察された。5.0mmol/kg以下に明らかな一般症状は認められなかった。

10.0mmol/kg群で妊娠12～28日目まで体重増加抑制又は体重減少及び摂餌量の減少が観察された。5.0及び2.5mmol/kg群に体重及び摂餌量への影響は認められなかった。

母動物の剖検では2.5、5.0及び10.0mmol/kg群の各々1、1及び9匹に腎臓の蒼白化が観察された。10mmol/kg群1匹の場合は腫脹を伴って観察され、5.0mmol/kg以上より腎重量の増加が観察された。これらの変化は前述の反復投与試験の項（2.6.6.3.3）で考察したように、毒性所見とは判断しなかった。

黄体数、着床前死亡数、着床数、着床後死亡数、生存胎児数、性比及び胎児体重に薬剤投与の影響は認められなかった。外表、内臓及び骨奇形の発生及び頻度に薬剤投与の影響は認められなかった。一方、2.5mmol/kg以上のすべての投与群において、骨変異（主として未骨化及び不完全骨化）の増加が観察され、軽度な発育遅延性変化と考えられた。

初回投与後（妊娠6日目）及び13日間反復投与後（妊娠18日目）共に、Cmax及びAUCは投与量にほぼ比例して増加した。13日間反復投与後（妊娠18日目）において、10.0mmol/kg群では5.0mmol/kg群と比較したとき、2倍の用量増加に対して、AUCは約3倍増加し、軽度の蓄積傾向が認められた。Cmaxに関しては、検討用量範囲ではほぼ直線的な増加が観察されたが、用量の増加率に比してやや少なかった（2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 参照）。

以上の成績から、1.0mmol/mL製剤のウサギ胚・胎児発生に関する試験における無毒性量は、母動物の一般毒性及び生殖毒性に対しては5.0mmol/kg/日、胎児に対しては2.5mmol/kg/日未満であった。また、ウサギ器官形成期に連続投与可能な最大用量（10mmol/kg）を反復静脈内投与した場合においても、奇形発生を含めた重度な次世代への影響は認められなかった（報告書A36661）。

2) 0.5mmol/mL製剤（SH L562A）による試験

参照項目：4.2.3.5.2.7 A420
4.2.3.5.2.6 9927

試験条件及び試験成績を2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 A420に示す。

交尾の成立したNZW系雌ウサギ総計87匹を、各群22又は21匹ずつ4群に分け、0.5mmol/mL製剤（SH L562A）0.5、1.5及び5.0mmol/kg、陰性対照としての生理食塩液（10mL/kg）を、妊娠6～18日目まで、5mL/分の投与速度で耳介辺縁静脈内に反復投与し、妊娠28日目に帝王切開した。最低用量0.5mmol/kgは試験実施当時の予定臨床用量に近似する用量として、最高用量5.0mmol/kgはウサギ用量設定試験（2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 報

告書 9927 参照) で軽微な胚致死作用が示唆されたこと、及び試験当時の予定臨床用量と比較して十分高いことを考慮して設定した。薬剤投与の影響は、一般症状、体重、妊娠パラメータ及び胎児検査 (外表、内臓及び骨格検査) 成績に基づいて評価した。

その結果、母動物の一般症状及び体重増加に薬剤投与の影響は認められなかった。5.0mmol/kg 群では流産頻度の軽度増加が観察され (各群の流産母動物数; 対照群 1 匹、0.5mmol/kg 群 1 匹、1.5mmol/kg 群 0 匹、5.0mmol/kg 群 3 匹)、5.0mmol/kg 群の流産はいずれも薬剤投与終了日付近で観察されたこと、その内 2 匹の母動物は体重増加抑制も伴っていたことから、頻度は高くないながらも薬剤投与の影響と考えられた。

着床数、生存胎児数、着床後死亡数、性比及び胎児体重に薬剤投与の影響は認められなかった。外表、内臓及び骨奇形の発生及び頻度に薬剤投与の影響は認められなかった。

以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤のウサギ胚・胎児発生に関する試験における無毒性量は、母動物の一般毒性学的には 5.0mmol/kg/日、その生殖能に対しては 1.5mmol/kg/日、胎児に対しては 1.5mmol/kg/日と算定された (報告書 A420)。

2.6.6.6.2.3 サル胚・胎児発生に関する試験

参照項目: 4.2.3.5.2.8 A894

試験条件及び試験成績を 2.6.7.13 生殖発生毒性試験: 胚・胎児発生に関する試験 A894 に示す。

超音波検査にて妊娠が確認された各群 12 頭の雌カニクイザルに、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) 0.75 又は 2.5mmol/kg、陰性対照としての生理食塩液 (5.0mL/kg) を、妊娠 20~50 日目まで、10mL/分の投与速度で橈側皮静脈内に反復投与し、妊娠 100±1 日目に帝王切開した。投与量は、1) ラット 16~18 日間反復静脈内投与試験 (2.6.6.3.1.4 報告書 9658) で雌 5.0mmol/kg 群に死亡例が観察されたこと、2) イヌにおける 16~18 日間反復静脈内投与試験 (2.6.6.3.2.2 報告書 A031) で 2.5mmol/kg 群に毒性所見は観察されなかったこと、3) ウサギ胚・胎児発生に関する用量設定試験 (2.6.7.11 報告書 9927) で 5.0mmol/kg 群に母動物毒性及び明らかな胚毒性は観察されなかったものの、軽微な胚致死作用が示唆されたこと、さらに 4) MRI 造影剤の通常臨床用量が 0.1mmol/kg であることを考慮し、その約 7 倍及び 25 倍を投与量に設定した。薬剤投与の影響は、一般症状、体重、妊娠パラメータ及び胎児検査 (外表、内臓及び骨格検査) 成績に基づいて評価した。

その結果、母動物の一般症状及び体重増加に薬剤投与の影響は認められなかった。2.5mmol/kg 群では、流産頻度の増加が観察された。この増加は試験実施施設のバックグラウンドデータの上限ではあったが、薬剤投与の可能性のある影響と考えられた。

胎児体重、胎盤重量、胎児臓器重量及び胎児体長に薬剤投与の影響は認められなかった。外表、内臓及び骨奇形の発生及び頻度に薬剤投与の影響は認められなかった。

以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤のサル胚・胎児発生に関する試験における無毒性量は、母動物の一般毒性学的には 2.5mmol/kg/日、その生殖能に対しては 0.75mmol/kg/日、胎児に対しては 0.75mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.6.3 ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.6.6.3.1 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) による試験

参照項目 : 4.2.3.5.3.1 PH-35165

4.2.3.5.3.2 PH-35738

試験条件及び成績を 2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 PH-35738 に示す。

Wistar 系受精雌ラット各群 22 匹を用い、1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) 0.6、2.2 及び 7.5mmol/kg、陰性対照としての生理食塩液 (7.5mL/kg) を、妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで尾静脈内に反復投与した。投与量は 1.0mmol/mL 製剤 5.0、7.5 及び 10.0mmol/kg を同系雌ラット (各群 5 匹) の妊娠 6 日目から分娩後 21 日目まで反復静脈内投与した用量設定試験 (2.6.7.11 重要な試験以外の試験、報告書 PH-35165 参照) の結果を参考に設定した。すなわち、10mmol/kg は母動物に重度一般症状及び投与部位の重度局所刺激性を示したことから、連続投与が困難な用量であると判断した。7.5 及び 5.0mmol/kg は母動物に散発的に投与部位の局所刺激性を示したものの、評価可能な用量と考えられたことから、本試験の最高用量は 7.5mmol/kg に、以下、中間用量 (2.2mmol/kg) 及び最低用量 (0.6mmol/kg) を設定した。

本試験では主試験群動物各群 22 匹に加えて、各群 5 匹の雌ラットを TK 測定用動物に割り付けた。主試験群では分娩後、母動物各々の出生児を生後 21 日目まで哺育させた。F₁ 出生児は哺育期間の期間中及びその終了後、身体及び機能発達をモニターした。同腹児あたり可能な限り、雌雄 1 匹ずつを性成熟まで飼育し、受胎能試験に供した。薬剤投与による母動物の一般毒性及び生殖能と共に、F₁ 世代の離乳後の後期発達及び生殖能に及ぼす影響を検討した。TK 測定用母動物については妊娠 6 日目と生後 21 日目 (投与 5 分、3、7 及び 24 時間後) に採血し、血漿中濃度を測定した。

授乳期間中に対照群母動物 1 匹が死亡し、対照群 1 匹及び 7.5mmol/kg 群 2 匹が全胚吸収を呈したために安楽殺した。7.5mmol/kg 群では散発的な一般症状、すなわち、痙攣、運動性低下、呼吸不整 (又は gasping) 及び立毛、並びに投与部位の局所刺激性所見が認められた。また、2.2mmol/kg 群 1 匹に一過性で短期の振戦が合計 2 日間観察された。7.5mmol/kg 群では授乳期間中の体重増加量が増加した。母動物の剖検では 2.2mmol/kg 以上の投与群に腎臓の腫大並びに絶対及び相対重量の増加が見られた。腎の腫脹及び重量増加は前述の反復投与試験の項 (2.6.6.3.3) で考察したように、毒性所見とは考えられなかった。

7.5mmol/kg 群 1 匹は少ない同腹児数であり、かつ全胚吸収を呈した。対照群及び 7.5mmol/kg 群 (上述の 1~2 匹に見られた全胚吸収) では、高容量の投与に起因した母体へのストレスに関連して、哺育指数が軽度に減少した。薬剤投与に関連した影響は 7.5mmol/kg 群に観察された哺育指数の減少に関連したものと考えられた。

妊娠期間、出産経過、平均周産期死亡数、同腹児数、授乳指数及び F₁ 出生児性比に薬剤投与の影響は認められなかった。

7.5mmol/kg 群では授乳行動への影響 (milk spot の視認困難な出産児の軽度増加に起因)、生存児出産指数と F₁ 生存出産児体重の軽微な減少、F₁ 産児生存率の減少 (milk spot 視認困難、皮膚の蒼白調変化のような一般症状、並びに生後早期死亡率の軽度増加) が観察され、薬剤投与に関連したものと推察された。

F₁ 出生児の生後 4 日以降の体重増加量、耳介展開、毛生、切歯の萌出、眼瞼開裂及び正常歩行発達という身体発達並びに性成熟への影響は認められなかった。反射（平地正向反射、負の走地性、聴覚反応及び瞳孔反射）及び行動（学習能、記憶及び反復学習能検査のための運動性及び水迷路試験）検査において、2.2mmol/kg までの投与群に薬剤投与の影響は認められなかった。一方、7.5mmol/kg 群 F₁ 出生児においては、活動性減少が観察され、薬剤投与による母動物への影響に関連した二次的な影響と推察された。

F₁ 出生児に薬剤投与に関連した奇形や肉眼的異常所見、及び一般症状は認められなかった。

F₁ 世代の受胎能検査では、授精期間、受胎、妊娠率、交配期間、妊娠期間、着床数、出生前死亡率、同腹児数並びに F₂ 出生児の性比、一般症状、外表奇形及び体重に薬剤投与に関連した影響は認められなかった。

TK では初回投与後（妊娠 6 日目）及び最終投与後（分娩後 21 日目）共に、0.6～7.5mmol/kg のすべての投与量範囲で、C_{max} 及び AUC が投与量に比例して増加し、また、反復投与による C_{max} 及び AUC の変化は認められなかった（2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 参照）。

以上の成績から、1.0mmol/mL 製剤による試験の無毒性量は、母動物の一般毒性学的には 0.6mmol/kg/日、その生殖能に対しては 2.2mmol/kg/日、出生児に対しては 2.2mmol/kg/日（出生前及び出生後早期発育については 2.2mmol/kg/日、生殖能を含む後期発育については 7.5mmol/kg/日）と算定された。

2.6.6.6.3.2 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) による試験

参照項目：4.2.3.5.3.3 SG/127

試験条件及び成績を 2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 SG/127 に示す。

SD 系受精雌ラット各群 24 匹を用い、0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) 0.5、1.5 又は 4.5mmol/kg、陰性対照としての生理食塩液 (9.0mL/kg) を、妊娠 15 日目から分娩後 21 日目まで、2.0mL/分の投与速度で尾静脈内に反復投与した。投与量は類薬（ガドリニウム含有 MRI 造影剤）のラット Segment III 試験において、3.6mmol/kg 群雌動物に摂餌量減少が観察されたこと、並びに 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) のラット受胎能及び着床までの初期発生に関する試験

(2.6.6.6.1.2 報告書 SG/124) では 2.5mmol/kg 群に毒性所見は認められなかったことを考慮して設定した。薬剤投与の影響は、母動物の一般症状及び分娩検査、出生児の分娩時及び生後発育、行動検索並びに生殖機能検査結果に基づいて評価した。

投与期間中、母動物に死亡例は認められず、一般症状、体重及び摂餌量に薬剤投与の影響は認められなかった。妊娠動物は全例が生存児を分娩した。妊娠期間、着床痕数、出産生児数、性比、周産期死亡数、出産率及び出生率にも薬剤投与の影響は認められなかった。

出生児に関しては、外表奇形、骨奇形、骨変異及び骨化進行度に薬剤投与の影響は認められなかった。4 日生存率、離乳率、成育率にも薬剤投与の影響は認められなかった。出生児の外表分化（耳介の展開、腹部の毛生、切歯の萌出、眼瞼開裂、精巣下降及び膈開口）及び体重推移にも影響は認められなかった。また、機能検査（正向反射、負の走地性、聴覚性驚愕反応、牽引力及び瞳孔反射）所見にも薬剤投与の影響は認められなかった。さらに、水迷路検査、情動性及び探

索行動検査所見にも薬剤投与の影響は認められなかった。一方、条件回避反応検査において、雌4.5mmol/kg群では条件回避数の軽度な減少が観察された。

以上の成績から、0.5mmol/mL 製剤による試験における無毒性量は、母動物（一般毒性学的及び生殖能）に対して4.5mmol/kg/日、出生児に対しては1.5mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.6.4 生殖発生毒性試験成績のまとめ

1.0mmol/mL 製剤（SH L562BB）及び0.5mmol/mL 製剤（SH L562A）を用いて実施された、一連の生殖・発生毒性試験から得られた無毒性量の一覧を表2.6.6.6.4-1に示す。

表2.6.6.6.4-1 各種生殖発生毒性試験より得られた無毒性量の一覧

Test system	Species	Formulation used	Dose [mmol/kg]	NOAEL [mmol/kg]				Report no.
				P - Systemic tox	P- Repro-tox	Fetus	Offspring	
Fertility and early development tox	Rat	SH L562BB	0.6, 2.2, 7.5	M7.5, F2.2	M&F: 7.5	(7.5) ^{a)}	-	A39049
	Rat	SH L562A	0.25, 0.75, 2.5	M&F: 2.5	M&F: 2.5	2.5	-	SG/124
Embryo-fetal tox	Rat	SH L562BB	5.0, 7.5, 10.0	5.0	7.5	5.0	-	A34150
	Rat	SH L562A	0.5, 1.5, 5.0	5.0	1.5	1.5	5.0	A576
	Rabbit	SH L562BB	2.5, 5.0, 10.0	5.0	5.0	(<2.5) ^{b)}	-	A36661
	Rabbit	SH L562A	0.5, 1.5, 5.0	5.0	1.5	1.5	-	A420
	Monkey	SH L562A	0.75, 2.5	2.5	0.75	0.75	-	A894
Peri- and postnatal development	Rat	SH L562BB	0.6, 2.2, 7.5	0.6	2.2	-	2.2	PH-35738
	Rat	SH L562A	0.5, 1.5, 4.5	4.5	4.5	-	1.5	SG/127

P: parent animals, M: males, F: Females, - : not applicable,

a): no fetal examination conducted, b): NOAEL determination was not included in the purpose of the study

ラット受胎能及び着床までの初期発生に関する試験では、雌動物に死亡を含む重度の全身毒性を発現する用量7.5mmol/kg（1.0mmol/mL 製剤）を雌雄ラット、交配前及び交配期間中並びに妊娠初期まで反復静脈内投与した場合においても、雌雄動物の生殖能には影響しないことが確認された。0.5mmol/mL 製剤を用いて実施された試験より、胎児に対する無毒性量は2.5mmol/kgと算定された。

ラット胚・胎児発生に関する試験では、母動物に死亡を含む重度の全身毒性を発現する用量である10mmol/kg（1.0mmol/mL 製剤）を、ラット器官形成期に反復静脈内投与した場合においても、胎児には軽度な骨変異の増加が観察されたが、次世代に奇形を含む重度な影響は及ぼさないことが確認された。0.5mmol/mL 製剤を用いて実施された試験より、胎児に対する無毒性量は1.5mmol/kg、出生児に対する無毒性量は5.0mmol/kgと算定された。ウサギ胚・胎児発生に関する試験では、死亡を含む重度の全身毒性を発現する用量10mmol/kg（1.0mmol/mL 製剤）を、ウサギ器官形成期に反復静脈内投与した場合においても、流産、早産の増加傾向、胎児には軽度な骨変異の増加が観察されたが、奇形を含む重度な影響を次世代に及ぼさないことが確認された。2.5mmol/kg以上の投与時には胎児に骨変異の増加が観察された。0.5mmol/mL 製剤を用いて実施された試験より、胎児に対する無毒性量は1.5mmol/kgであった。サル胚・胎児発生に関する試験は0.5mmol/mL 製剤を用いて実施され、母動物の生殖能及び胎児に対する無毒性量は0.75mmol/kgであった。

ラット出生前・出生後投与試験は1.0mmol/mL及び0.5mmol/mL 製剤を用いて実施され、出生児に対する無毒性量は各々2.2及び1.5mmol/kg/日であった。

さらに、上述の各試験で得られた無毒性量と予定臨床用量を血中濃度で比較した結果を表2.6.6.6.4-2に示す。いずれの無毒性量も予定臨床用量投与時の血中濃度より高かった。

表 2. 6. 6. 6. 4- 2 生殖発生毒性試験の無毒性量と予定臨床用量の動態パラメータ比較

Test system	Species	Dose [mmol/kg]	Cmax ^{a)} [μmol/L]	Ratio based on human Cmax	AUC _(0-∞) [μmol·h/ L]	Ratio based on human AUC	Report no.
Open clinic study	Human	0.1	1218	1	1026	1	A39759 ^{b)}
Fertility and early development tox	Rat (NOAEL)	P(F)- systemic tox. : 2.2	8710	7.2	6560	6.4	A39049
		P(M)- systemic tox., P(M&F)- reproductive tox and F ₁ fetus : 2.5	8710 ^{c)}	7.2	6560 ^{c)}	6.4	SG/124
Embryo-fetal tox	Rat (NOAEL)	P- systemic tox and offspring : 5.0	18600	15.2	9820	9.6	A576
		P- reproductive tox and F ₁ fetus : 1.5	6410 ^{d)}	5.3	2640 ^{d)}	2.6	
	Rabbit (NOAEL)	P- systemic tox : 5.0	26100	21.4	27700	27.0	A420
		P- reproductive tox and F ₁ fetus : 1.5	8640 ^{e)}	7.1	7740 ^{e)}	7.5	
Peri- and postnatal development	Rat (NOAEL)	P- systemic tox : 0.6	2750	2.3	1390	1.4	PH-35738
		P- repro-tox and F ₁ - early dev. of: 2.2	8690	7.1	4170	4.1	
		F ₁ -offspring late effect :7.5	28900	23.7	14550	14.2	
		F ₁ offspring : 1.5	4455 ^{f)}	3.7	2603 ^{f)}	2.5	SG/127

a) Data were at the first sampling point (human: at 2 minutes post injection, rat and rabbit: at 5 minutes post injection)

b) Open study for healthy Japanese volunteer (n=8), Refer to Table 2.7.2.2.2.1-1

c) Data based on day 43 in male rats at the dose of 2.2 mmol/kg in fertility and early development study (Report no. A39049)

d) Data based on day 28 in rats at the dose of 1.2 mmol/kg in 4 weeks repeated dose toxicity study (Report no. A08936)

e) Data were calculated at the dose of 1.5 mmol/kg from the data at the dose of 2.5 mmol/kg at gestation day 18 in embryo-fetal development study in rabbits considering linearity through datum point (Report no. A36661)

f) Data were calculated on day 21 of delivery in maternal rats as the dose of 1.5 mmol/kg estimated from the data at the dose of 0.6 mmol/kg and the data at the dose of 2.2 mmol/kg in peri- and postnatal development study (Report no. PH-35738)

以上を総括すると、得られた各無毒性量と予定臨床用量 (0.1mmol/kg) 及び通常の臨床用法 (単回静脈内投与) から、臨床使用上問題となる所見は観察されなかったと結論できる。

2. 6. 6. 7 新生児を用いた試験

Bayer Pharma 社は、1 歳未満の乳児に対する 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) の安全性情報を収集する目的で、新生児ラットを用いた拡張型単回投与毒性試験及び短期反復投与毒性試験を実施した。

1) 拡張型単回投与試験

参照項目 : 4. 2. 3. 5. 4. 1 PH-36304

生後 4 日齢の Wistar 系ラット各群雌雄各 10 匹の頸静脈内に、SH L562BB の 0.6、2.0 又は 6.0mmol/kg を、対照群には生理食塩液 6.0mL/kg を各々単回静脈内投与し、投与翌日 (2 日目) に剖検して組織学的検査に供した。また、対照群、0.6 及び 6.0mmol/kg 群には各群雌雄各 10 匹を追加割付し、28 日間の休薬群とした。一般症状、体重、血液生化学的検査 (2 及び 25 日目)、尿検査 (23 日目) 及び病理学的検査 (2 及び 29 日目) の成績より本剤投与の影響を評価した。さらに、各群雌雄 12 匹をサテライト動物に設定し、TK を測定した。

その結果、6.0mmol/kg 群では雄に血漿たん白の減少 (2 日目のみ)、雌に軽度な体重増加抑制 (11 日目以降) が観察されたが、その他の臨床検査項目に薬剤投与の影響は認められなかった。病理組織学的検査において、2.0mmol/kg 以上で腎皮質尿細管の空胞化が観察されたが、休薬終了時には明らかな回復が確認された。また、休薬終了時 6.0mmol/kg 群では複数例の腎皮質尿細管に明細胞が配列した径の小さい孤立性尿細管が、また同群 1 例に再生性変化と推察される単純過形成が観察された。さらに、通常正常な新生児ラットで小膠細胞が分布する大脳局所において、2.0mmol/kg 以上を投与した翌日に小膠細胞の大きさ又は細胞数の増加が観察されたが、脳組織

に変性・壊死及び炎症反応などは認められず、当該所見も休薬期間終了時には完全に消失した。したがって、当該所見は毒性とは考えなかった。0.6mmol/kg 群に投与の影響は認められなかった。小膠細胞の組織変化は、使用した生後 4 日齢のラットにおいて血液脳関門が未発達であったことに起因して生じた変化であり、後述する生後 10 日齢のラットでは認められず、出生前に血液脳関門発達が完了するヒト（乳幼児）ではリスクとなるものではない。

TK を含む試験成績の概略を 2.6.7.15 新生児を用いた試験 PH-36304 に示す。

2) 短期反復投与試験

参照項目：4.2.3.5.4.2 PH-36683

Wistar 系ラット（各群雌雄各 12 匹）の生後 10（頸静脈内）、17 及び 24 日目（尾静脈内）に、SH L562BB の 0.3、1.0 又は 3.0mmol/kg を、対照群には生理食塩液 3mL/kg を各々計 3 回反復投与した。体重測定、一般症状観察、臨床病理学的検査及び眼科学的検査を実施し、最終投与 8 日後（生後 32 日目）に剖検（臓器重量測定を含む）して病理組織学的検査に供した（主試験群）。また、各群雌雄各 10 匹を回復試験群として同様に各処置後、生後 88 日目（最終投与 64 日後）に病理学的検査に供した。さらにサテライト群（投与 5 分、1、4 及び 24 時間後の各採取時点当たり各群雌雄各 3 匹）を設けて、生後 10 及び 24 日目の各薬剤投与後の血漿中 TK を測定した。また、主試験・回復試験及びサテライト各群の生後 32、53 及び 88 日目に血漿及び組織を採取して血漿中及び組織中薬物濃度推移を検討した。

その結果、雄の 3.0mmol/kg 群で、白血球・好塩基球・単球数の一過性増加、及び軽度 ALP 増加がみられたが、関連する組織（脾臓・リンパ節等）に影響は認められなかったことから、毒性的意義は乏しいと考えられた。その他に薬剤投与に関連した検査値変化は認められなかった。

病理組織学的検査において、生後 32 日目には 1.0mmol/kg 以上で腎皮質に用量依存的な尿細管上皮の空胞化が観察されたが、成熟動物での変化と同様に組織障害を示唆する所見を伴わず、また生後 88 日目には完全に消失する可逆性変化であった。生後 32 日目にはさらに、0.3mmol/kg 以上の雌及び 1.0mmol/kg 以上の雄に、孤在性の委縮した明細胞性尿細管がみられた。この所見は生後 88 日目の休薬群においては 1.0mmol/kg 以上の雌及び 3.0mmol/kg 群雄の少数例に依然として残存したものの、0.3mmol/kg 群雌及び 1.0mmol/kg 群雄では消失したことから、8 週間以上の回復期間にて完全に回復する可逆性変化と考えられた。また、尿検査及び血液生化学検査を含め関連する変化は認められなかったことから腎機能障害を示唆するものとは考えられなかった。なお、生後 4 日目に投与を実施した先の単回投与試験で観察された大脳の組織所見（小膠細胞の数及び大きさの増加）は、生後 10 日目以降に投与を実施した本試験では認められなかった。

TK を含む試験成績の概略を、2.6.7.15 新生児を用いた試験 PH-36683 に示す。

2.6.6.8 局所刺激性試験

予定臨床投与経路が静脈内投与であるため、静脈内単回投与による局所刺激性試験を実施した。成人血管に比してより細い血管としてウサギ耳介周縁静脈を選択し、うっ血下及び非うっ血下に薬剤を投与し、局所刺激性を評価した。また、成人血管の一部とほぼ同様の血管径と考えられるイヌ前腕静脈に関しても、静脈内単回投与時の局所刺激性を評価した。さらに、誤投与により薬剤に接触する可能性のある組織についても、単回投与時の局所刺激性を評価した。すなわち、動脈内投与、静脈周囲投与及び筋肉内投与による局所刺激性試験を実施した。以上の試験では、被験物質として 1.0mmol/mL 製剤（SH L562B）を用いたが、試験当時は 0.5mmol/mL 製剤による開発

も検討されていたことから、一部の試験では0.5mmol/mL製剤による試験も実施した。また、肝腫瘍のレーザー治療や超音波治療の治療前後に造影検査が想定され、その場合に障害部位から漏れた造影剤が健康な肝組織と接触する可能性が考えられたことから、肝実質に対する

1.0mmol/mL製剤 (SH L562BB) の局所刺激性も検討した。

試験成績の概略を2.6.7.16 局所刺激性試験 に示す。

2.6.6.8.1 静脈内投与による局所刺激性試験

参照項目：4.2.3.6.1 9622

4.2.3.6.2 9690

4.2.3.6.3 9736

各群雌雄2匹(計4匹/群)のNZW系ウサギの右耳介周縁静脈内に、うっ血下又は非うっ血下に1.0mmol/mL製剤(SH L562B)を0.5mL/匹の容量で単回ボラス投与した。陰性対照として、同様の条件下に左耳介周縁静脈内に生理食塩液を0.5mL/匹の容量で単回投与した。被験物質の投与後、8日目まで投与部位を肉眼観察し、その後剖検して病理組織学的検査に供した。その結果、1.0mmol/mL製剤投与群ではうっ血下又は非うっ血下のいずれの投与においても、投与部位に最長4日目まで一過性かつ軽度の発赤及び腫脹が観察された。うっ血下での投与では、これらに加えて3日目まで中等度の発赤も観察された。病理組織学的検査では異常所見は認められなかった(報告書9622)。

上述した1.0mmol/mL製剤(SH L562B)を用いたウサギ耳介辺縁静脈内単回投与試験と同様の条件下で、各群雌雄2匹(計4匹/群)のNZW系ウサギを用いて0.5mmol/mL製剤(SH L562A)投与時の局所刺激性を検討した。その結果、0.5mmol/mL製剤投与後には投与部位の肉眼観察及び病理組織学的検査において異常所見は認められなかった(報告書9690)。

雌雄2頭(計4頭)のビーグル犬の右前腕静脈内に、1.0mmol/mL製剤(SH L562B)を1.5mL/kgの容量で単回ボラス投与した(投与速度1mL/秒)。陰性対照として、同様の条件下に左前腕静脈内に生理食塩液を1.5mL/kgの容量で単回投与した。被験物質の投与後、8日目まで投与部位を肉眼観察し、その後剖検して病理組織学的検査に供した。その結果、1.0mmol/mL製剤投与に起因した異常所見は観察されず、投与部位の発赤及び腫脹が、陰性対照群と同様の頻度及び程度で観察されたのみであった(報告書9736)。

以上の成績から、1.0mmol/mL製剤は細い血管径の静脈への投与時には軽度な刺激性を発現するが、重篤な刺激性が認められる可能性は低く、通常の成人前腕部静脈と同様の血管径を有する静脈内への投与に際しては、問題となる刺激性は発現しないと考えられた。

2.6.6.8.2 誤投与により接触する可能性のある動脈、静脈周囲又は筋肉内投与による局所刺激性試験

2.6.6.8.2.1 動脈内投与による局所刺激性試験

参照項目：4.2.3.6.4 9569

4.2.3.6.5 AA28

4.2.3.6.6 A601

雌雄2匹（計4匹）のNZWウサギの右耳介中心動脈内に1.0mmol/mL製剤（SH L562B）0.5mL/匹を、また、左耳介中心動脈内には陰性対照として生理食塩液を0.5mL/匹単回投与した（投与速度；1mL/分）。被験物質の投与後、8日目まで投与部位を肉眼観察し、その後剖検して病理組織学的検査に供した。その結果、1.0mmol/mL製剤投与時には投与部位周辺皮膚に一過性蒼白化の頻度増加（4/4、対照1/4）及び一過性発赤（1/4）が観察されたが、病理組織学的検査で異常所見は認められなかった（報告書9569）。

雌雄2匹（計4匹）のWistar系ラットの左大腿動脈内に、1.0mmol/mL製剤（SH L562B）0.1mL/匹（約0.4mL/kg相当）又は陰性対照として生理食塩液0.1mL/匹を、麻酔下に単回ボラス投与した。被験物質の投与後、15日目まで投与部位を肉眼観察し、その後剖検して病理組織学的検査に供した。さらに、姿勢保持反射（holding reflex）、握力反射（grasping reflex）、指間疼痛検査及び協調運動性検査を、投与2～15日目まで毎日実施した。その結果、肉眼観察、各種臨床検査及び病理組織学的検査で1.0mmol/mL製剤投与に関連した所見は認められなかった（報告書AA28）。

上述のラット大腿動脈内単回投与による局所刺激性試験を、同様の試験条件下に0.5mmol/mL製剤（SH L562A）を用いて実施した。その結果、0.5mmol/mL製剤投与に関連した所見は認められなかった（報告書A601）

2.6.6.8.2.2 静脈周囲投与による局所刺激性試験

参照項目：4.2.3.6.7 9566

4.2.3.6.8 9689

雌雄2匹（計4匹）のNZW系ウサギの右伏在静脈周囲に1.0mmol/mL製剤（SH L562B）1.0mL/匹を、また、左伏在静脈周囲には陰性対照として生理食塩液1.0mL/匹を、単回ボラス投与した。被験物質の投与後、7日目まで肉眼観察し、その後剖検して投与部位周囲を病理組織学的検査に供した。その結果、1.0mmol/mL製剤投与後には投与部位に軽度～中等度の発赤及び腫脹（2匹）、蒼白化（1匹）並びに後肢全体の腫脹（1匹）が観察され、7日目の組織学的検査で、軽微ないし軽度な炎症反応（軽度浮腫、線維細胞/線維芽細胞及び白血球浸潤）が観察された。したがって、1.0mmol/mL製剤は静脈周囲投与時に軽度ないし中等度の局所刺激性を有すると考えられた（報告書9566）。

上述のウサギ静脈周囲単回投与による局所刺激性試験を、同様の試験条件下に0.5mmol/mL製剤（SH L562A）を用いて実施した。その結果、0.5mmol/mL製剤投与に関連した所見は認められなかった（報告書9689）。

2.6.6.8.2.3 筋肉内投与による局所刺激性試験

参照項目：4.2.3.6.9 9599

雌雄4匹（計8匹）のNZW系ウサギの片側仙棘筋内へ、1.0mmol/mL製剤（SH L562B）1mL/匹を、また、反対側仙棘筋内へは陰性対照として生理食塩液を1mL/匹の容量で単回投与した。被験物質投与後、投与部位を肉眼的に観察し、3日目に雌雄2匹（計4匹）を、7日目に残りの雌雄2匹を剖検して、肉眼的異常部位の病理組織学的検査を実施した。また、剖検時には変性筋肉重量を測定した。

その結果、肉眼観察では1.0mmol/mL製剤の局所刺激性を示唆する所見は認められなかった。3日目の剖検では、陰性対照投与側及び1.0mmol/mL製剤投与側に共通して、投与部位の発赤及び出血が同様の頻度及び程度で観察され、7日目に異常所見は認められなかった。また、3日目の変性筋肉重量にも陰性対照側及び1.0mmol/mL製剤投与側で差異は認められなかった。投与部位の病理組織学的検査（3日目）では、剖検所見と同様に陰性対照投与側及び1.0mmol/mL製剤投与側に共通して、筋組織の巣状壊死と隣接した単一筋線維の変性又は壊死が観察されたが、生理食塩液投与側の組織変化の程度及び頻度と差異は認められなかった。7日目の剖検では変性組織が認められなかったことから、組織学的検査は実施しなかった。以上の成績から、1.0mmol/mL製剤の筋肉内投与時の局所刺激性は生理食塩液と同程度と考えられた。

2.6.6.8.3 特殊な局所刺激性試験

肝実質内投与による局所刺激性試験

参照項目：4.2.3.6.10 AH95

各群雌雄6匹（計12匹/群）のWistar系ラットを用い、麻酔開腹下に肝臓（左葉）実質内へ、1.0mmol/mL製剤（SH L562BB）又は陰性対照としての生理食塩液を0.03mL/匹の容量で各々単回投与した。被験物質の投与後、一般症状を毎日観察し、雌雄各3匹（計6匹）を8日目に、残り計6匹を15日目に剖検後、肝臓左葉を病理組織学的検査に供した。また、2日目（投与24時間後）、4及び8日目に採血して血清中のALT、AST、ALP及び総ビリルビンを測定した。その結果、1.0mmol/mL製剤投与に関連した所見は一般症状、血液生化学的検査、剖検及び病理組織学的検査のいずれにおいても観察されなかった。

2.6.6.9 その他の毒性試験

試験成績の概略を2.6.7.17 その他の毒性試験 に示す。

2.6.6.9.1 抗原性及び接触皮膚感作性試験

ガドブトロールの抗原性試験として、モルモットASA試験、モルモットPCA試験、マウスーラット系PCA試験及びイヌを用いた抗原性試験を、また、接触感作性試験として、モルモットを用いたオプティマイゼーション試験を実施した。被験物質として、イヌを用いた抗原性試験では1.0mmol/mL製剤（SH L562BB）を、その他の試験では0.5mmol/mL製剤（SH L562A）を使用した。

2.6.6.9.1.1 モルモット ASA 試験及び同種 PCA 試験

参照項目：4.2.3.7.1.1 SG/143

1) ASA 試験

1群6匹のHartley系雄モルモットの背部皮膚に、フロイント完全アジュバント(FCA)を含有するガドブトロールを動物あたり24mg(容量0.16mL;低用量群)又は120mg(容量0.8mL;高用量群)を15日間に5回皮下投与し感作した。これらの用量は動物当たり体重400gとして、ガドブトロールの予定臨床用量(0.1mmol/kg)及びその5倍量に相当した。最終感作後21日目に、感作に用いたものと同じ投与液0.5mLを静脈内に惹起投与した。惹起直後から最大2日間アナフィラキシー反応を観察し剖検した。その結果、ガドブトロール投与に関連したアナフィラキシー反応の発現は認められなかった。

2) 同種 PCA 試験

上述のASA試験で使用したモルモットから能動感作14日後に採取した血清を、無処置の雄モルモットに皮内投与し感作を行った。感作の4及び24時間後にエバンスブルー0.5%含有ガドブトロール20mg/mL溶液0.5mLを静脈内投与して、PCA反応の有無を観察した。その結果、ガドブトロール感作血清投与群におけるPCA反応はすべて陰性であった。

2.6.6.9.1.2 マウスラット系 PCA 試験

参照項目：4.2.3.7.1.2 SG/144

1群5匹のBALB/c系雄マウスに対し、ガドブトロール0.001mg/動物(低用量群)又は0.1mg/動物(高用量群)の用量で腹腔内に、28日間に2回投与して感作した。いずれの投与液にもアジュバントとして水酸化アルミニウムゲル(Alum)を混合した。最終感作後14日目に、各動物から血液を採取し血清を分離した。得られた血清を生理食塩液にて1~1024倍に希釈し、SD系雄ラット(1群5匹)の背部に50 μ Lずつ皮内投与した。投与翌日に、ガドブトロール10mg/匹をエバンスブルーとともに尾静脈内に投与し、PCA反応の有無を観察した。その結果、ガドブトロール感作マウス血清投与群におけるPCA反応はすべて陰性であった。

2.6.6.9.1.3 イヌ抗原性試験

参照項目：4.2.3.7.1.3 A20948

本試験は1.0mmol/mL製剤(SH L562BB)を用いたイヌ4週間反復静脈内投与試験(2.6.6.3.2.1 報告書A10548)において、被験薬投与後に観察された一過性の一般症状(可視粘膜及び耳介内面の発赤)に関して、特異的免疫反応が関与した可能性が考えられたことから、イヌにI型過敏反応が誘発されるか否かを検討する目的で実施した。総計8頭の雌性ビーグル犬を1群4頭ずつ2群に分け、陰性対照としての生理食塩液(3.0mL/kg)又は被験物質投与群として1.0mmol/mL製剤(SH L562BB)3.0mmol/kgを、静脈内に9mL/分の投与速度で1日1回4週間反復投与した(前惹起期間)。1週間の無処置期間を置き、すべての動物に1.0mmol/mL製剤(SH L562BB)3.0mmol/kgを単回静脈内投与した(惹起操作)。前惹起及び惹起期間中の一般症状、体重及び摂餌量、ヒスタミン遊離、補体活性化、抗ガドブトロール特異抗体形成の有無及び惹起期間中の血圧及び心拍数よりガドブトロールの影響を評価した。その結果、前惹起期間中に認められた薬剤投与に関連した所見は、耳介内面皮膚、歯肉、上唇及び結膜の発赤(以上、1/4頭の前惹起全期間)、投与初日の嘔気、体重増加量及び摂餌量の軽度減少であった。無処置期間中に異常は認められなかった。惹起後には耳介内面皮膚及び結膜の発赤が前惹起期間中と同

様の頻度で観察された。1頭に観察された呼吸不整、また惹起投与2～10分間に観察された収縮期血圧の減少傾向及び心拍数の増加傾向は薬剤投与と関連すると考えられた。血漿中ヒスタミン濃度及び補体活性に薬剤投与の影響は認められず、また、前惹起期間及び惹起後共にガドブトロール特異抗体は検出されなかった。以上のように、I型過敏反応に関連した免疫学的検査項目（血漿中ヒスタミン濃度、補体活性及び特異抗体）に薬剤投与の影響は認められなかった。すなわち、イヌにおいて1.0mmol/mL製剤（SH L562BB）3.0mmol/kgの単回静脈内投与後に観察された可視粘膜の発赤の成因として、特異的免疫反応を介した反応である可能性は低いと結論された。

2.6.6.9.1.4 接触感作性試験

参照項目：4.2.3.7.1.4 9642

4.2.3.7.1.5 9728

接触感作性をモルモットオプティマイゼーション試験により評価した。最初の試験（報告書9642）では、1群雌雄5匹のPirbright White系モルモットに0.5mmol/mL製剤（SH L562A）0.05mmol/匹（0.1mL/匹）を、FCAとの混合又は非混合により、3週間に計10回皮内投与した。最終感作の13日後（試験32日目）、ガドブトロール0.05mmol/匹を皮内投与する初回惹起を行った。初回惹起の13日後（試験45日目）に再びガドブトロール0.05mmol/匹を経皮投与し2回目の惹起を行った。同様にその12日後（試験53日目）に皮内投与による3回目の惹起を行った。その結果、初回惹起後第1週目観察でガドブトロール群の7/10匹で皮膚反応の増強が観察された。2回目の経皮惹起後に局所反応は認められなかった。3回目の惹起後の皮膚に石灰化を伴う粘液腫様浮腫、巨細胞反応、線維化初期像及び軽度炎症細胞反応などの変化が、すべての0.5mmol/mL製剤感作動物に観察された。これらの所見は2回目の経皮惹起後には発現しなかったことから、0.5mmol/mL製剤の局所刺激性による可能性も示唆されたものの、接触皮膚感作性であるのか、局所刺激性であるのかを明確に区別することができなかった。したがって、より濃度の低いガドブトロール被験液を用い、以下の追加試験（報告書9728）を実施した。1群雌雄5匹のPirbright White系モルモットに、FCAの混合又は非混合により、0.5mmol/mL製剤（SH L562A）の生理食塩液希釈液0.00156mmol/匹を、3週間に10回皮内投与して感作した。試験32日目に感作時に用いた被験液を皮内投与して初回惹起した。上述の試験系と同様に、試験45日目に経皮投与による2回目の惹起操作を行った。その結果、いずれの惹起時においても、ガドブトロール感作群に特記すべき皮膚反応は観察されなかった。追加試験に使用したガドブトロール希釈液は原法で要求されている濃度と比較して依然として高く得られた結果は妥当と考えられた。以上の成績から、ガドブトロールに皮膚感作性は認められないと結論された。

2.6.6.9.2 その他の毒性試験

2.6.6.9.2.1 添加剤 CaNa-butrol のマウス静脈内単回投与毒性試験

参照項目：4.2.3.7.7.1 SG/130

CaNa-butrol（カルコブトロールナトリウム）は、1.0mmol/mL製剤及び0.5mmol/mL製剤中に、0.001mmol/mL（0.513mg/mL）の濃度で含有されている添加剤（安定剤）である。本添加剤の単回静脈内投与時の急性毒性を、0.5mmol/mL製剤（SH L562AA；主成分/有効成分ガドブトロール）と比較検討する目的で、マウス静脈内単回投与毒性試験を実施した。

各群雌雄5匹（計10匹）のICR系マウスに、CaNa-butrol（0.5mmol/mL溶液）5及び25mmol/kg、比較対照0.5mmol/mL製剤（SH L562AA）25mmol/kg、陰性対照としての生理食塩液（50mL/kg）を、2.0mL/分の投与速度で尾静脈内に単回投与した。生存動物では14日間の観察期

間終了後、死亡動物は死後速やかに剖検した。薬剤投与の影響は、一般症状、体重及び剖検所見に基づいて評価した。

その結果、CaNa-butrol 5mmol/kg 群では死亡例は認められず、25mmol/kg 群では雌雄全例が投与直後に死亡した。比較対照 0.5mmol/mL 製剤 25mmol/kg 群では雌雄共に 1/5 例が投与直後に死亡した。CaNa-butrol 投与後の主な一般症状として排尿が、死亡例では更に、眼球突出、腹臥及び呼吸困難が観察され、剖検で急性循環障害を示唆する肺の暗赤色化と腎皮質の退色が観察された。比較対照の 0.5mmol/mL 製剤投与後には一過性の体重減少、活動性の減少、呼吸不整、排尿及び痙攣、死亡例の剖検所見として、添加剤投与後と同様に急性循環障害を示唆する肺の暗赤色化と腎皮質の退色が観察された。

以上の成績から、CaNa-butrol のマウス静脈内単回投与時の概略の致死量は、雌雄共に 5mmol/kg と 25mmol/kg の間にあり、0.5mmol/mL 製剤（ガドブトロールとして 25mmol/kg）よりやや低いと算定された。CaNa-butrol のマウス静脈内単回投与時に死亡が認められなかった用量（5mmol/kg）は、体重換算で当該添加剤の推定臨床用量〔0.1mmol (0.1mL)/kg×0.001mmol/mL=0.0001mmol (0.1 μmol/kg)〕の 50,000 倍に相当した。

2.6.6.9.2.2 不純物の毒性試験

開発過程の旧製法で合成された一部原薬中に不純物として不純物A* 及び不純物 B* が ■■■% ■■■含有されていたことから、これらの不純物の *in vitro* 遺伝毒性試験及び 2 週間反復投与毒性試験を実施した。なお、申請製剤 (SH L562BB) 中におけるこれら不純物の規格値は共に ■■■% ■■■で、いずれも安全性の確認を必要とする閾値以下である。

1) 不純物不純物A* 及び不純物 B* の *in vitro* 遺伝毒性試験

参照項目 : 4.2.3.7.6.2 AL74
4.2.3.7.6.3 AM22
4.2.3.7.6.4 AM72
4.2.3.7.6.5 AL58
4.2.3.7.6.6 AM21
4.2.3.7.6.7 AM73

試験条件及び試験成績を 2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性 AL74、AM22、AM72、AL58、AM21 及び AM73 に示す。

不純物A* 及び不純物B* の遺伝子突然変異誘発性を、*S. typhimurium* のヒスチジン要求性株 4 種 (TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538) を用い、プレート法及びプレインキュベーション法にて代謝活性化系の添加時及び非添加時に検討した。最高濃度はいずれも 5000 μg (5mg) / プレートとした。その結果、いずれの試験においても代謝活性化系の添加時及び非添加時共に、復帰変異コロニー数の増加は観察されず、遺伝子突然変異を誘発しなかった（報告書 AL74、AM22、AL58 及び AM21）。

さらに上述の両不純物の染色体異常誘発性を、ヒトリンパ球を用い、代謝活性化系の添加時及び非添加時に検討した。最高濃度は 5000 μg (5mg) / mL とし、独立した 2 回の試験を実施した。処理時間は代謝活性化系添加時及び非添加時共に 22 及び 46 時間とした。その結果、いずれの場合も染色体異常細胞出現頻度の増加は認められなかった（報告書 AM72 及び AM73）。

以上のように、不純物不純物A* 及び不純物 B* の *in vitro* 遺伝毒性は陰性であった。

2) 不純物不純物A* 及び不純物 B* の2週間反復投与毒性試験

参照項目：4.2.3.7.6.1 AK84

各群雌雄10匹(計20匹)のWistar系ラットに、不純物A* と不純物 B* の混合調製物(モル比1:1)それぞれ0.02及び0.1mmol/kg、陰性対照としての製剤媒体(1mL/kg)を、尾静脈内に6mL/分の投与速度で2週間(14~16日間)反復投与した。両不純物混合物投与の影響は、一般症状、体重、摂餌量、尿検査、眼科学的検査、血液学的検査、骨髄検査、血液生化学的検査、血液凝固能検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査所見に基づいて評価した。

その結果、両不純物の混合物0.02mmol/kg群に薬剤投与の影響は認められなかった。0.1mmol/kg群で観察された唯一の変化は、病理組織学的検査での腎尿細管上皮の微小空胞であった。当該変化は製剤投与時に認められたものと同様であり、細胞の変性・壊死や腎機能検査における異常を伴わず、毒性所見とは考えられなかった。

以上の成績から、不純物A* と不純物 B* 混合物のラット2週間反復静脈内投与試験における無毒性量は0.1mmol/kg/日と算定された。

2.6.6.9.2.3 ラット血中ホルモン濃度に及ぼす影響に関する比較試験

参照項目：4.2.3.7.7.2 A010

類薬(ガドペンテト酸メグルミン製剤)のラットにおける高用量投与後、単発的な血清ホルモン値低下が観察されたものの、個体間変動が大きく、また単発的に検査されたため、連続的な測定が為されていなかった。したがって、本試験では、各群10ないし20匹のWistar系雄ラットに、0.5mmol/mLガドブトロール製剤(SH L562A)又は類薬(0.5mmol/mL濃度)の5.0mmol/kg、陰性対照としての生理食塩液(10mL/kg)を、6mL/分の投与速度で尾静脈内に2日間反復投与し、雄性生殖組織への影響の有無を検討する目的で、血清中のホルモン濃度(テストステロン、FSH及びLH)を経時的に測定・評価した。1日目の投与2、4、6及び8時間後、2日目の投与2、4、6、8及び24時間後のホルモン濃度を測定した。

その結果、ガドブトロール0.5mmol/mL製剤(SH L562A)5.0mmol/kg群では、1日目に1/10例が死亡した。

ホルモン濃度には薬剤投与に関連した変化は認められなかった。

2.6.6.9.2.4 NSF関連病変の動物における検討

主として重度腎障害患者におけるガドリニウム含有MRI造影剤の臨床使用と関連する可能性が報告されている腎性全身性線維症(NSF)について、動物実験における類似皮膚病変の発生可能性、並びに皮膚、肝臓及び大腿骨中のガドリニウム、亜鉛及び銅濃度の変動可能性を検討する目的で、ガドブトロール1.0mmol/mL製剤(SH L562BB)を含む種々のガドリニウム含有MRI造影剤を用いて、ラットでの比較試験を実施した。

1) 正常ラットにおける検討

参照項目：4.2.3.7.7.3 Sieber MA et al. Eur Radiol 18:2164-2173:2008

各群6匹のWistar系ラットに、ガドブトロール1.0mmol/mL製剤(SH L562BB)、数種類のガドリニウム含有MRI造影剤〔ガドジアミド水和物、ガドペンテト酸メグルミン、ガドテル酸メグルミン、OptiMARK(gadoversetamide)及びMultiHance(gadobenate dimeglumine)〕;いずれも

0.5mmol/mL 市販製剤] の 2.5mmol/kg 及び陰性対照としての生理食塩液 (5.0mL/kg) を、週 5 回 4 週間 (計 20 回) 反復静脈内投与した。最終投与の 5 日後に動物を安楽殺して、皮膚 (背部及び頸部)、肝臓及び大腿骨を採取し、前述の重金属濃度を測定した。その結果、ガドブトロール群に、剖検及び皮膚の組織学的検査で異常所見は認められなかった。一方、ガドジアミド水和物群 4/6 匹の皮膚に、潰瘍及び痂皮形成が認められた。その他の群の動物に異常所見は認められなかった。皮膚の組織学的検査では、ガドジアミド水和物群 5/6 匹に NSF 類似の皮膚病変 (線維化、コラーゲン沈着、細胞外間隙の欠失、真皮肥厚及び細胞密度の増加) が認められたが、ガドブトロール製剤を含む他の造影剤群に異常所見は認められなかった。皮膚、肝臓及び大腿骨中のガドリニウム濃度はガドジアミド水和物群で高値 (最も高濃度の皮膚; ガドペンテト酸メグルミン群の約 10 倍、ガドブトロール群の約 30 倍) を示したが、ガドブトロールやガドテル酸メグルミン群では低かった。臓器又は組織中の亜鉛及び銅濃度については、いずれの造影剤群にも薬剤投与による変動は認められなかった。

上記試験で造影剤間の差異は皮膚のガドリニウム濃度において最も顕著であったことから、Pietsch H ら²⁶⁾は、造影剤投与後の皮膚のガドリニウム濃度の長期推移を検討した。各群 6 匹の Wistar 系ラットに、ガドブトロール 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) を含む 7 種類のガドリニウム含有 MRI 造影剤 (上記試験に用いた市販製剤に加えてガドテリドール 0.5mmol/mL 市販製剤) の 2.5mmol/kg を 5 日間反復静脈内投与 (生理食塩液投与及び無処置群を含む) し、経時的に皮膚生検で採取した皮膚小片中のガドリニウム濃度を処置約 1 年後まで測定した。その結果、皮膚のガドリニウムの大半は約 2 ヶ月以内に消失したが、ガドジアミド水和物などの直鎖構造の造影剤群ではその一部が長期残存した。処置 1 年後の皮膚のガドリニウム濃度は非イオン性直鎖構造のガドジアミド水和物群で最も高く、イオン性直鎖構造のガドペンテト酸メグルミン群ではより低い濃度であったが、同様に約 1 年後にも陰性対照群に比して高濃度に検出された。ガドブトロールを含むマクロ環構造の造影剤群における皮膚のガドリニウム濃度は、無処置対照群に近い低濃度のまま推移した。

さらに、1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) を 4 週間反復静脈内投与したラット (2.6.6.3.1.1 報告書 A08936 参照) 及びイヌ (2.6.6.3.2.1 報告書 A10548 参照) の皮膚、並びに 0.5mmol/mL 製剤 (SH L562A) を 16~18 回反復静脈内投与したラット (2.6.6.3.1.4 報告書 9658 参照) 及びイヌ (2.6.6.3.2.2 報告書 A031 参照) の皮膚に NSF 類似病変 (真皮肥厚、線維化、細胞増殖又はコラーゲン沈着など) が認められるか否かに関して、保存されていた皮膚を病理組織学的に追加検索したところ、いずれの試験群においても NSF 類似の皮膚病変は認められなかった。

2) 重度腎障害モデルラットにおける検討

参照項目 : 4.2.3.7.7.4 Pietsch H et al. Invest Radiol 44:226-233:2009

各群 6 ないし 12 匹の Wistar 系ラットの片側腎を全摘出し、残側腎 2/3 を摘出することによって、計 5/6 腎摘出による重度腎障害モデルを作製した。ガドブトロール 1.0mmol/mL 製剤 (SH L562BB) 又は 3 種類のガドリニウム含有 MRI 造影剤 [ガドジアミド水和物、OptiMARK (gadoversetamide) 及びガドペンテト酸メグルミン: いずれも 0.5mmol/mL 市販製剤] の 2.5mmol/kg を、1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与した。処置後、麻酔下に皮膚から微小片を経時的に採取し、最大 24 週 (168 日後) までガドリニウム濃度を測定した。また、最終投与 5 日後に皮膚の肉眼的病理検査を実施した。なお、5/6 腎摘出モデルラットでは重度腎障害患者と同様に、造影剤の血中循環時間が延長し、総クリアランスが遅延することを血清中濃度推移より確認した。本実験の結果、皮膚のガドリニウム濃度は、ガドジアミド水和物群で最も高く、次いでガドジアミド水和物と同じく非イオン性直鎖構造の gadoversetamide 群で高かった。これらに比して、イオン性直鎖構造であるガドペンテト酸メグルミン群ではより低く、マクロ環構造を有するガドブ

トロール群では、これら3製剤群よりガドリニウム濃度は更に低かった。皮膚の肉眼的病理検査では、ガドジアミド水和物投与動物12匹のうち、皮膚のガドリニウム濃度が最も高かった3匹において、前述の正常ラットで2.5mmol/kgを4週間(20回)反復静脈内投与後に認められたと同様のNSF類似の皮膚病変が認められた。ガドブトロールを含む他の群の皮膚に病理学的異常は認められなかった。

2.6.6.10 考察及び結論

ガドブトロールの毒性を明らかにするために、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験、並びに抗原性及び感作性試験を実施した。これらのうち *in vivo* 試験は、主として臨床適用経路である静脈内投与により行った。また、ガドリニウム含有細胞外液性 MRI 造影剤の臨床使用で稀に報告されている NSF に関して、動物で類薬と比較して検討を加えた。これらの試験成績を以下に考察する。

マウス、ラット、幼若雄ラット及びイヌを用いてガドブトロールの静脈内単回投与毒性試験を実施したところ、これらの動物における概略の致死量及び最大非致死量は、SH L562BB の予定臨床用量 (0.1mmol/kg、3.7mmol/m²) と比較して十分高かった。

ラット及びイヌへのガドブトロールの反復静脈内投与後に共通して観察された最も顕著な所見は、類薬 (ガドリニウム含有細胞外液性 MRI 造影剤)^{9~14)} 及びヨード X 線造影剤^{15~20)} の毒性試験、及び高張溶液の大量投与^{21~24)} においても報告されている腎尿細管上皮の空胞化であった。この所見は 1.0mmol/mL 製剤 (申請製剤) 又は 0.5mmol/mL 製剤のいずれの投与においても観察された。当該所見はラット 8 日間静脈内反復投与試験結果で示されたように、同一の総負荷量であれば、1.0mmol/mL と 0.5mmol/mL 濃度液間で所見の程度及び頻度に差異は認められなかった。

腎尿細管上皮の空胞化以外の所見として、ラットにおいては、申請製剤 3.0mmol/kg を 4 週間反復静脈内投与した場合、尿細管上皮に単細胞壊死が雄少数例に観察された。1) 休薬により完全に消失した変化であること、2) イヌ 4 週間反復静脈内投与試験では 3.0mmol/kg の投与時にも観察されなかったこと、3) 投与量 3.0mmol/kg は予定臨床用量 (0.1mmol/kg) と比較して十分高い用量であることを考慮すると、単回投与の臨床使用において問題となる所見とは考えられなかった。

イヌにおいては、投与直後に一過性の嘔吐又はリッキング (悪心兆候と考えられる)、可視粘膜の赤色化、一過性軽度のアパシー、閉眼又は耳介内面の発赤が 1.0mmol/mL 製剤の投与後のみ観察されたが、0.5mmol/mL 製剤より高い浸透圧の寄与が考えられた。これらの症状は、1) 主として 1.0mmol/kg (予定臨床用量 0.1mmol/kg の体重換算で 10 倍) 以上をイヌに投与した場合に観察され、2) 一過性でかつ散発的な発生であったこと (投与後毎回観察されたものではない)、3) 同様の所見は臨床で汎用されている類薬ガドペンテト酸メグルミン製剤においても、ガドブトロール製剤の毒性試験実施試験と同一の施設で行われたイヌにおける 16~18 回反復静脈内投与試験²⁷⁾ あるいはイヌ単回静脈内投与試験²⁾ において同様の投与量で観察されていることを考慮すると、臨床使用において問題となる可能性は低いと考えられた。

一連の遺伝毒性試験の結果、ガドブトロールに遺伝毒性は認められなかった。

生殖発生毒性試験において、ラット胚・胎児発生毒性試験では母動物に死亡を含む重度の全身毒性が発現する用量を、器官形成期に反復静脈内投与した場合においても、胎児に軽度な骨変異の増加が観察されたのみで、次世代に奇形を含む重度な影響は及ぼさないことが確認された。ウサギ胚・胎児発生毒性試験では、死亡を含む重度の全身毒性を発現する用量を、器官形成期に反復静脈内投与した場合においても、流産、早産の増加傾向、胎児には軽度な骨変異の増加が観察されたものの、次世代に奇形を含む重度な影響は及ぼさないことが確認された。また、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、出生前及び出生後投与試験を含む一連の生殖発生毒性試験で得られた各無毒性量及び毒性発現用量と予定臨床用量 (0.1mmol/kg の単回投与) 及び検査頻度 (通常数週間以上の間隔) を考慮すると、臨床使用上問題となる所見は観察されなかった。

申請製剤 (SH L562BB) の単回及び 4 週間反復投与毒性試験並びに生殖発生毒性試験で TK を検討した。曝露量は投与量にほぼ比例して増大し、概して排泄は速やかで性差も認められなかった。

新生児ラットを用いた試験 (生後 4 及び 10 日目投与) では、腎臓において成熟動物でみられた尿細管上皮の空胞化に加えて、少数例に明細胞性尿細管がみられた。また、ラットの生後 4 日目投与では脳の小膠細胞の大きさ及び数の増加がみられた (生後 10 日目以降の投与では観察されず)。ラットの腎臓は生後 11 日目以前には未熟である²⁸⁾が、ヒトでは腎血管の成長が妊娠 35 週に終了し、出生時には腎臓の解剖学的発達完了していることが報告されている²⁹⁾。また、ラットの脳は生後発達し³⁰⁾、血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) も生後 3~4 週と遅い時期に発達することが知られている^{31, 32)}。一方、ヒトでは妊娠第 3 期の終わりに BBB の形成及び成熟が完成することが報告されている³³⁾。すなわち、新生児ラットの毒性試験でみられた上記いずれの所見も、乳幼児への本剤投与に当たってのリスクとなるものではないと考えられる。

局所刺激性試験、抗原性及び皮膚感作性の各試験、その他の毒性試験においても、特に問題となる所見は見出せなかった。

さらに、ガドリニウム含有 MRI 造影剤の臨床使用と関連する可能性が報告されている NSF に関し、動物実験における類似皮膚病変の発生可能性を検討する目的で、ガドブトロール製剤 (1.0mmol/mL 製剤) を含む種々のガドリニウム含有 MRI 造影剤 (ガドジアミド水和物を含む; いずれも 0.5mmol/mL 市販製剤) を用いて、ラット反復投与後の影響を比較検討した。各種 MRI 造影剤の 2.5mmol/kg を、週 5 回 4 週間反復静脈内投与し、皮膚、肝臓及び大腿骨を組織学的に検索すると共に、それぞれの組織中に含まれる重金属濃度を測定した。その結果、ガドジアミド水和物群の皮膚に、NSF の皮膚病変に類似した潰瘍及び痂皮形成 (組織学的に線維化、コラーゲン沈着、細胞外間隙の欠失、真皮肥厚及び細胞密度の増加) が認められたが、ガドブトロール製剤を含む他の群に異常は認められなかった。皮膚、肝臓及び大腿骨中のガドリニウム濃度は、いずれの組織及び臓器においてもガドジアミド水和物群で高値を示し、ガドブトロール製剤を含むその他の群では低かった。加えて、SH L562BB を 4 週間反復静脈内投与したラット及びイヌの皮膚、並びに SH L562A を 16~18 回反復静脈内投与したラット及びイヌの皮膚を病理組織学的に追加検索したが、NSF 類似の皮膚病変は認められなかった。さらに、重度腎障害モデルラットに、ガドブトロール製剤 (1.0mmol/mL 製剤) 又は 3 種のガドリニウム含有 MRI 造影剤 (ガドジアミド水和物及びガドペンテト酸メグルミンを含む; いずれも 0.5mmol/mL 市販製剤) 2.5mmol/kg を 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与し、皮膚の病理学的検索とガドリニウム濃度測定を実施したところ、前述の正常ラットにおける結果と同様に、ガドジアミド水和物群に NSF 類似の皮膚病変の発生並びに最も高いガドリニウム濃度が認められた。他の群に皮膚病変は認められず、皮膚のガドリニウム濃度は、上記ガドジアミド水和物を含む非イオン性直鎖構造の造影剤群に比して、イオン性直鎖構造のガドペンテト酸メグルミン群ではより低く、マクロ環構造のガドブトロール群で最も低かった。ガドブトロールはマクロ環構造を有し、キレート安定度が高いこと³⁴⁾ からも、特に重度腎障害患者において遊離ガドリニウムに起因してその発生可能性が指摘されている NSF の発生リスクが低いことが期待される。

ガドブトロール製剤を用いて実施した一連の毒性試験成績から、予定臨床用量 (0.1mmol/kg の単回投与) を用いる診断目的での臨床使用にあたっては、問題となる毒性所見が発現する可能性は低いと考えられた。

2.6.6.11 図表

図表は本文中に記載した。

参考文献

- 1) 石田小津枝ら、日独医報 1987:32:476-484 (4.3.22 添付)
- 2) Schöbel Chr et al., Schering AG (Current Bayer Pharma AG) report no. 5550:1983 : マグネビスト初回申請時評価資料
- 3) 武田量雄ら、診療と新薬 1991:28:1956-1961 (4.3.23 添付)
- 4) プロハンス注、医薬品インタビューフォーム 2012年5月改訂(改訂第14版) ; エーザイ(株)
- 5) 源田百合ら、薬理と治療 1993:21, S:757-763 (4.3.24 添付)
- 6) マグネスコープ、同シリンジ公開資料概要(毒性 2 : 急性毒性) : 平成12年9月承認分、栄研化学(株)
- 7) 知本忠士ら、J Toxicol Sci 1999:24, SI:1-6 (4.3.25 添付)
- 8) 関戸 徹ら、J Toxicol Sci 1999:24, SI:7-18 (4.3.26 添付)
- 9) 岩井克己ら、日独医報 1987:32:485-501 (4.3.4 添付)
- 10) 武田量雄ら、診療と新薬 1991:11:1962-1986 (4.3.5 添付)
- 11) 源田百合ら、薬理と治療 1993:21, S:765-783 (4.3.6 添付)
- 12) マグネスコープ、同シリンジ公開資料概要(毒性 2 : 反復投与毒性) : 平成12年9月承認分、栄研化学(株)
- 13) 青木豊彦ら、J Toxicol Sci 1999:24, SI:19-39 (4.3.7 添付)
- 14) 勝谷成男ら、J Toxicol Sci 1999:24, SI:41-60 (4.3.8 添付)
- 15) 中尾寿夫ら、日独医報 1984:29(1):1-19 (4.3.9 添付)
- 16) 清水康資ら、Prog Med 1986:6, S2:2503-2523 (4.3.10 添付)
- 17) Oberto G et al., Prog. Med. 1992:12, S2:1690-1699 (4.3.11 添付)
- 18) 古野 徹ら、薬理と治療 1993:21, S:1463-1483 (4.3.12 添付)
- 19) 大野広志ら、J Toxicol Sci 1995:20, SI:67-85 (4.3.13 添付)
- 20) Battenfeld R et al., Invest Radiol 1991:26(1):35-39 (4.3.14 添付)
- 21) Glaister JR : 毒性病理学の基礎、ソフトサイエンス社 1992:114-115 (4.3.15 添付)
- 22) Simon G et al., Lab Invest 1964:13:1381-1393 (4.3.16 添付)
- 23) Maunsbach AB et al., Lab Invest 1962:11:421-432 (4.3.17 添付)
- 24) Merski JA et al., Food Chem Toxicol 1985:23:923-930 (4.3.18 添付)
- 25) Freireich EJ et al., Cancer Chemother Rep 1966:50(4):219-244 (4.3.3 添付)
- 26) Pietsch H et al., Eur Radiol 2009:19:1417-1424 (4.3.27 添付)
- 27) Lehmann M et al., Schering AG (Current Bayer Pharma AG) report no. 5667:1984 : マグネビスト初回申請時評価資料
- 28) Zoetis T et al., Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2003:68:111-120 (4.3.28 添付)
- 29) Rhodin MM et al., Pediatr Nephrol 2009:24:67-76 (4.3.29 添付)
- 30) Romijn HJ et al., Early Hum Dev 1991:26:61-67 (4.3.30 添付)
- 31) Utsumi H et al., Am J Physiol Cell Physiol 2000:279:C361-C368 (4.3.31 添付)
- 32) Caley DW et al., J Comp Neurol 1970:138:31-47 (4.3.32 添付)
- 33) Cucullo L; "Prenatal Development of the Human Blood-Brain-Barrier." in Mammalian Brain Development; D. Janigro (ed.), Humana Press (Totowa, NJ) 2009:53-75 (4.3.33 添付)
- 34) Frenzel T et al., Invest Radiol 2008:43(12):817-828 (4.3.19 添付)

2.6.7.1 毒性試験 : 一覧表

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 9

2.6.7.1 毒性試験 : 一覧表

Test Article: Gadobutrol

Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Dosing Period	Dose ^a [mmol/kg]	GLP	Study Facility	Report no.	Study no.	Location Section
Single Dose Toxicity studies									
Single dose toxicity	Mouse (M) /NMRI	intravenous	Single	0, 25 (0.5M) ^b	Yes	Schering AG ^c	9345	TX ■■■.124	4.2.3.1.1
	Mouse (F) / NMRI	intravenous	Single	0, 25 (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9346	TX ■■■.125	4.2.3.1.2
	Mouse (M) / NMRI	intragastric	Single	0, 25 (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9331	TX ■■■.128	4.2.3.1.3
	Rat (M&F) / Wistar	intravenous	Single	0, 25 (M), 0, 25, 40 (F) (1.0M) ^d	Yes	Schering AG	A28236	TXST ■■■0138	4.2.3.1.4
(Extended single dose toxicity study with TK)	Rat (M&F) /Wistar	intravenous	Single	0, 2, 6, 20 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Schering Pharma AG	A28309	TXST ■■■0112	4.2.3.1.5
	Rat (M) / Wistar	intravenous	Single	0, 20 (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9330	TX ■■■.126	4.2.3.1.6
	Rat (M&F) / SD	intravenous	Single	0, 5, 10, 20 (0.5M) ^e	Yes	Nihon Schering KK ^f B600	■005	■005	4.2.3.1.7
	Weaned Rat (M) / Wistar	intravenous	Single	0, 15, 20 (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9344	TX ■■■.127	4.2.3.1.8
	Rat (M) / Wistar	intragastric	Single	0, 20 (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9329	TX ■■■.129	4.2.3.1.9
	Dog (M) / Beagle	intravenous	Single	6, 10 (1.0M) ^d	No	Bayer Schering Pharma AG	A41286	TXST ■■■0310	4.2.3.1.10
(Extended single dose toxicity study with TK)	Dog (M&F) / Beagle	intravenous	Single	0, 0.3, 1.7, 10.0 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Schering Pharma AG	A41318	TXST ■■■0301	4.2.3.1.11
	Dog (M&F) / Beagle	intravenous	Single	0, 6 (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9883	TX ■■■.220	4.2.3.1.12

M : male, F : female

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 9

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表（続き）

Test Article: Gadobutrol

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Dosing Period	Dose/Concentration [mmol/kg] ^a	GLP	Study Facility	Report no.	Study no.	Location Section
Repeated Dose Toxicity Studies									
4 weeks (7 times/week) study with TK	Rat (M&F) / Wistar	intravenous	4 weeks + withdrawal 10 weeks	0, 0.6, <u>1.2</u> , 3.0 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Schering Pharma AG)	A08936	TXST-0145	4.2.3.2.1
2 days study	Rat (M) / Wistar	intravenous	2 days	0, <u>1.0</u> (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9926	TX-242	4.2.3.2.2
8 days dose-range finding study	Rat (M&F) / SD	intravenous	8 days	0, 0.5 ^g , <u>4.5</u> ^h (0.5 M ^g & 1.0 M ^h)	No	Nihon Schering KK	SG/069	-004	4.2.3.2.3
4 weeks (5 times/week) study	Rat (M&F) / Wistar	intravenous	16-18 days + withdrawal 8 weeks	0, 1.0, <u>2.5</u> , 5.0 (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9658	TX-139	4.2.3.2.4
4 weeks (7 times/week) study	Rat (M&F) / SD	intravenous	4 weeks + withdrawal 2 weeks	0, 0.1, 0.25, <u>0.75</u> , 2.5 (0.5M) ^b	No	Nihon Schering KK	A03528	-002	4.2.3.2.5
4 weeks (7 times/week) study with TK	Dog (M&F) / Beagle	intravenous	4 weeks + withdrawal 8 weeks	0, 0.3, <u>1.0</u> , 3.0 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Schering Pharma AG	A10548	TXST-0146	4.2.3.2.6
4 weeks (5 times/week) study	Dog (M&F) / Beagle	intravenous	16-18 days	0, 0.25, 1.0, <u>2.5</u> (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	A031	TX-230	4.2.3.2.7
4 weeks (7 times/week) study	Dog (M&F) / Beagle	intravenous	4 weeks + withdrawal 4 weeks	0, 0.1, 0.5, <u>2.5</u> (0.5M) ^e	Yes	-	SG/135	2500	4.2.3.2.8

M: male, F: female

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 3 of 9

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表（続き）

Test Article: Gadobutrol

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Dosing Period	Dose/Concentration [mmol/kg] ^a	GLP	Study Facility	Report no.	Study no.	Location Section
Genotoxicity Studies									
Ames test	<i>Salmonella typhimurium in vitro</i>	-	-	0.1875- 6.0 mg/plate (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9503	TX ■■■.134	4.2.3.3.1.1
	<i>Salmonella typhimurium in vitro</i>	-	-	0.1875- 6.0 mg/plate (preincubation) (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9501	TX ■■■.135	4.2.3.3.1.2
	<i>Escherichia coli</i>	<i>in vitro</i>	-	0.3125-10mg/plate, 0.1875- 6.0 mg/plate (preincubation) (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9502	TX ■■■.103	4.2.3.3.1.3
Chromosome aberration test	Human lymphocytes	<i>in vitro</i>	-	0.61-6.05 mg/mL (1x10 ⁻³ -1x10 ⁻² M) (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9616	TX ■■■.138	4.2.3.3.1.4
	Human lymphocytes	<i>in vitro</i>	-	0.61-6.05 mg/mL (independent 2 nd assay) (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9972	TX ■■■.213	4.2.3.3.1.5
HPRT test	Chinese hamster V79 cells	<i>in vitro</i>	-	0.5-10 mM (0.3-6 mg/mL) (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9592	TX ■■■.136, TX ■■■.137	4.2.3.3.1.6
Micronucleus test	Mice / MNRI	intravenous	Single dose	0, 2, 4, 8 mmol/kg (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9823	TX ■■■.173	4.2.3.3.2.1

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 4 of 9

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Gadobutrol

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Dosing Period	Dose/Concentration [mmol/kg] ^a	GLP	Study Facility	Report no.	Study no.	Location Section
Reproductive and Developmental Toxicity Studies									
Fertility & early development toxicity study	Rat / Wistar	intravenous	M: 4 ws pre-mating, F: 2 ws pre-mating - G7	0, 0.6, 2.2, 7.5 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Schering Pharma AG	A39049	TXST-0103	4.2.3.5.1.1
	Rat / SD	intravenous	M: 60 days pre-mating, F: 2 ws pre-mating - G7	0, 0.25, 0.75, 2.5 (0.5M) ^b	Yes	Nihon Schering KK	SG/124	-002	4.2.3.5.1.2
Embryo-fetal toxicity study	Rat / Wistar	intravenous	G6-G17 (DRF)	0, 5.0, 7.5, 10.0 (1.0M) ^d	No	Schering AG	A30997	TXST-0329	4.2.3.5.2.1
	Rat / Wistar	intravenous	G6-G17	0, 5.0, 7.5, 10.0 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Schering Pharma AG	A34150	TXST-0144	4.2.3.5.2.2
	Rat / Wistar	intravenous	G6-G15	0, 0.5, 1.5, 5.0 (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	A576	TX-310	4.2.3.5.2.3
	Rabbit / NZW	intravenous	G6-G18 (DRF)	0, 5.0, 7.5, 10.0 (1.0M) ^d	No	Schering AG	A32272	TXST-0068	4.2.3.5.2.4
	Rabbit / NZW	intravenous	G6-G18	0, 5.0, 7.5, 10.0 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Schering Pharma AG	A36661	TXST-0242	4.2.3.5.2.5
	Rabbit / NZW	intravenous	G6-G18 (DRF)	0, 2.5, 5.0 (0.5M) ^b	No	Schering AG	9927	TX-281	4.2.3.5.2.6
	Rabbit / NZW	intravenous	G6-G18	0, 0.5, 1.5, 5.0 (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	A420	TX-311	4.2.3.5.2.7
	Cynomolgus Monkey / Macaca fascicularis	intravenous	G20-G50	0, 0.75, 2.5 (0.5M) ^b	Yes	Deutschland	A894	TX-075 (project no. 014-068)	4.2.3.5.2.8

M : male, F : female, ws : weeks, G: gestation, DRF: dose range finding, NZW : New Zealand White

2.6.7.1 毒性試験 : 一覧表

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 5 of 9

2.6.7.1 毒性試験 : 一覧表 (続き)

Test Article: Gadobutrol

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Dosing Period	Dose/Concentration [mmol/kg] ^a	GLP	Study Facility	Report no.	Study no.	Location Section
Reproductive and Developmental Toxicity Studies (continued)									
Peri- and post-natal development study	Rats/ Wistar	intravenous	G6-D21 (DRF)	5.0, 7.5, 10.0 (1.0M) ^d	No	Bayer Schering Pharma AG	PH-35165 T	076743	4.2.3.5.3.1
	Rats/ Wistar	intravenous	G6-D21	0, 0.6, 2.2, 7.5 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Schering Pharma AG	PH-35738 T	076752	4.2.3.5.3.2
	Rats/ SD	intravenous	G15-D21	0, 0.5, 1.5, 4.5 (0.5M) ^b	Yes	Nihon Schering KK	SG/127	014	4.2.3.5.3.3
Studies in Juvenile Animals									
Extended single-dose toxicity study	Rats/ Wistar 4 days of age (newborn)	intravenous	Single (PND 4)	0, 0.6, 2, 6 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Schering Pharma AG	PH-36304 T	079918	4.2.3.5.4.1
Short-term repeated-dose toxicity study	Rats/ Wistar 10 days of age (newborn)	intravenous	3 days (PND 10, 17 & 24)	0, 0.3, 1.0, 3.0 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Pharma AG	PH-36683 T	082538	4.2.3.5.4.2

G : gestation, D : delivery, DRF: dose range finding, PND: postnatal day

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 6 of 9

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表（続き）

Test Article: Gadobutrol

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Dosing Period	Dose/Concentration [mmol/kg] ^a	GLP	Study Facility	Report no.	Study no.	Location Section
Local Tolerance Studies									
	Rabbit / NZW	intravenous ear vein	Single dose	0.5 mL(1.0M) ^h	Yes	Schering AG	9622	TX ■.130	4.2.3.6.1
	Rabbit / NZW	intravenous ear vein	Single dose	0.5 mL (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9690	TX ■.234	4.2.3.6.2
	Dog / Beagle	intravenous cephalic vein	Single dose	1.5 mL(1.0M) ^h	Yes	Schering AG	9736	TX ■.031	4.2.3.6.3
	Rabbit / NZW	intra-arterial ear artery	Single dose	0.5 mL(1.0M) ^h	Yes	Schering AG	9569	TX ■.131	4.2.3.6.4
	Rat / Wistar	intra-arterial femoral artery	Single dose	0.1 mL(1.0M) ^h	Yes	Schering AG	AA28	TX ■.298	4.2.3.6.5
	Rat / Wistar	intra-arterial femoral artery	Single dose	0.1 mL(0.5M) ^b	Yes	Schering AG	A601	TX ■.022	4.2.3.6.6
	Rabbit / NZW	paravenous	Single dose	1.0 mL(1.0M) ^h	Yes	Schering AG	9566	TX ■.133	4.2.3.6.7
	Rabbit / NZW	paravenous	Single dose	1.0 mL(0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9689	TX ■.235	4.2.3.6.8
	Rabbit / NZW	intra-muscular	Single dose	1.0 mL(1.0M) ^h	Yes	Schering AG	9599	TX ■.132	4.2.3.6.9
	Rat / Wistar	liver parenchyma	Single dose	0.03 mL(1.0M) ^d	Yes	Schering AG	AH95	TX ■.103	4.2.3.6.10

NZW : New Zealand White

2.6.7.1 毒性試験 : 一覧表

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 7 of 9

2.6.7.1 毒性試験 : 一覧表 (続き)

Test Article: Gadobutrol

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Dosing Period	Dose/Concentration [mmol/kg] ^a	GLP	Study Facility	Report no.	Study no.	Location Section
Other Studies									
Antigenicity test	Guinea pig / Hartley	subcutaneous (sensitize) intravenous (challenge)	5 times over 15 days (sensitize) Single (challenge)	0, 24, 120 mg/animal (0.5M) ^b (sensitization) 10 mg/animal (challenge)	Yes	Nihon Schering KK	SG/143	■■003	4.2.3.7.1.1
	Mouse/ BALB/cA, Rat/ SD	intraperitoneal (sensitized in mice) intradermal (sensitized in rats) intravenous (challenge)	twice at days 0 and 28 (sensitized in mice), Single (sensitized in rats) Single (challenge)	0, 0.001, 0.1 mg/animal (0.5M) ^b (sensitized in mice) 50µL serum from mice /animal(sensitized in rats) 10 mg/animal (challenge)	Yes	Nihon Schering KK	SG/144	■■004	4.2.3.7.1.2
	Dog / Beagle	intravenous	intravenous 4 weeks (pre- challenge) + intravenous single (challenge)	0, 3.0 (1.0M) ^d	Yes	Bayer Schering Pharma AG	A20948	TXST■■0066	4.2.3.7.1.3
Optimization test	Guinea pig/ Pirbright White	Intradermal (induction, 1 st and 3 rd challenge) epidermal (2 nd challenge)	10 times in 3 weeks (days 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 15, 17 & 19)	0, 0.05 mmol/animal (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9642	TX■■.140	4.2.3.7.1.4
	Guinea pig/ Pirbright White	intradermal (induction and 1 st challenge), epidermal (2 nd challenge)	10 times in 3 weeks (days 1x2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17 & 19)	0, 1.56 mmol/animal (0.5M) ^b	Yes	Schering AG	9728	TX■■.304	4.2.3.7.1.5

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 8 of 9

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 (続き)

Test Article: Gadobutrol

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Dosing Period	Dose/Concentration [mmol/kg] ^a	GLP	Study Facility	Report no.	Study no.	Location Section
Other Studies (Continued)									
Repeated dose toxicity for impurity (impurity A* +impurity B*)	Rat/ Wistar	intravenous	2 weeks	0, 0.02+0.02, 0.1+0.1 mmol/kg	Yes	Schering AG	AK84	TX ■■■223	4.2.3.7.6.1
Ames test for impurity (impurity A*)	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>in vitro</i>	-	0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/plate	Yes	Schering AG	AL74	TX ■■■279	4.2.3.7.6.2
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>in vitro</i>	-	0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/plate (preincubation)	Yes	Schering AG	AM22	TX ■■■280	4.2.3.7.6.3
Chromosomal abberation for impurity (impurity A*)	Human lymphocytes	<i>in vitro</i>	-	0, 500, 2500, 5000 µg/mL	Yes	■■■■■, Germany	AM72	TX ■■■259 (■■■■ Project 530800)	4.2.3.7.6.4
Ames test for impurity (impurity B*)	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>in vitro</i>	-	0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/plate	Yes	Schering AG	AL58	TX ■■■277	4.2.3.7.6.5
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>in vitro</i>	-	0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/plate (preincubation)	Yes	Schering AG	AM21	TX ■■■278	4.2.3.7.6.6
Chromosomal abberation for impurity (impurity B*)	Human lymphocytes	<i>in vitro</i>	-	0, 500, 2500, 5000 µg/mL	Yes	■■■■■, Germany	AM73	TX ■■■276 (■■■■ Project 530900)	4.2.3.7.6.7

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 9 of 9

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表（続き）

Test Article: Gadobutrol

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Dosing Period	Dose/Concentration [mmol/kg] ^a	GLP	Study Facility	Report no.	Study no.	Location Section
Other Studies (Continued)									
Single dose toxicity study of CaNa-butrol	Mice/ ICR	intravenous	Single	0, 5, 25 mmol/kg of CaNa-butrol (cf. 25 mmol/kg of 0.5M formulation ^e)	Yes	Nihon Schering KK	SG/130	■001	4.2.3.7.7.1
Comparative study on serum hormone levels	Rat/ Wistar	intravenous	2 days	0, 5.0 mmol/kg (0.5M) ^b cf. 5.0 mmol/kg of MV and Gadopenamide	No	Schering AG	A010	TX ■.146	4.2.3.7.7.2
NSF related investigation	Rat/ Wistar	intravenous	4 weeks (5 times/w) total 20 times	2.5 mmol/kg (1.0M) ^d cf. same dose of MV, OS, MS, OM and MH	No	Bayer Schering Pharma AG	-	-	4.2.3.7.7.3
	Rat/Wistar (5/6 nephrectomized)	intravenous	5 days	2.5 mmol/kg (1.0M) ^d cf. same dose of MV, OS and OM	No	Bayer Schering Pharma AG	-	-	4.2.3.7.7.4

a (The lowest) NOAELs in repeated dose toxicity studies were underlined.

b 0.5 M formulation [SH L 562 A]

c Schering AG or Bayer Schering Pharma AG is current Bayer Pharma AG (Germany)

d 1.0 M formulation [SH L 562 BB]

e 0.5 M formulation [SH L 562 AA]

f Nihon Schering KK is current Bayer Yakuhin Ltd.(Japan)

g 0.5 M solution (1.0 M formulation [SH L 562 B] was diluted by 0.9% NaCl solution)

h 1.0M formulation [SH L 562 B]

NSF : nephrogenic systemic fibrosis, MV : meglumine gadopentetate formulation, OS: gadodiamide hydrate formulation, MS: meglumine gadoterate formulation, OM : gadoversetamide formulation, MH : gadobenate dimeglumine formulation

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 1

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Gadobutrol

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose [mmol/kg]	GLP compliance	Report No.	Study No.	Location Section
Extended single dose toxicity study (with 3 and/or 22 days observation period)	Rat/ Wistar	intravenous	2, 6, 20	Yes	A28309	TXST [REDACTED] 0112	4.2.3.1.5
						KINE [REDACTED] 0118	
Extended single dose toxicity study (with 3 and/or 22 days observation period)	Dog/ Beagle	intravenous	0.3, 1.7, 10	Yes	A41318	TXST [REDACTED] 0301	4.2.3.1.11
						KINE [REDACTED] 0011	
4 weeks Repeat-dose toxicity study (4 week + 10 week observation)	Rat/ Wistar	intravenous	0.6, 1.2, 3.0	Yes	A08936	TXST [REDACTED] 0145,	4.2.3.2.1
						KIST [REDACTED] 0214	
4 weeks Repeat-dose toxicity study (4 week + 8 week observation)	Dog/ Beagle	intravenous	0.3, 1.0, 3.0	Yes	A10548	TXST [REDACTED] 0146	4.2.3.2.6
Fertility and early fetal development study	Rat/ Wistar	intravenous	0.6, 2.2, 7.5	Yes	A39049	TXST [REDACTED] 0103	4.2.3.5.1.1
						KINE [REDACTED] 0089	
Embryofetal development toxicity study (G6-G17)	Rat/ Wistar	intravenous	5, 7.5, 10	Yes	A34150	TXST [REDACTED] 0144,	4.2.3.5.2.2
						KINE [REDACTED] 0170	
Embryofetal development toxicity study (G6-G18)	Rabbit/ New Zealand White	intravenous	2.5, 5, 10	Yes	A36661	TXST [REDACTED] 0242,	4.2.3.5.2.5
						KINE [REDACTED] 0004	
Peri- and postnatal development study (G6-D21)	Rat/ Wistar	intravenous	0.6, 2.2, 7.5	Yes	PH-35738	T [REDACTED] 076752	4.2.3.5.3.2
						KINE [REDACTED] 0095	

G: gestation, D: delivery

2.6.7.3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 2

2.6.7.3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: Gadobutrol

Test system	Wistar Rat			Beagle Dog		
	Report A28309, Extended single dose toxicity 3 and/or 22 days observation ^{a)}			Report A41318, Extended single dose toxicity 3 and/or 22 days observation ^{a)}		
Daily Dose (mmol/kg)	2.0	6.0	20.0	0.3	1.7	10.0
Day	1	1	1	1	1	1
C _{max} (mmol/L)	7.46	21.7	49.6	3.16	13.99	33.66
t _{max} ^{b)} (h)	0.0833	0.0833	0.0833	0.00625	0.035	0.287
AUC (mmol · h/L)	3.39	9.79	34.2	1.63	6.82	30.20
Time interval for AUC	0 - 6 h			0 - 24 h		

Test system	Wistar Rat						Beagle Dog						
	Report A08936, Repeated dose toxicity 4 week + 10 week observation ^{a)}						Report A10548, Repeated dose toxicity 4 week + 8 week observation ^{a)}						
Daily Dose (mmol/kg)	0.6		1.2		3.0		0.3		1.0		3.0		
Day	1	28	1	28	1	28	1	28	1	28	1	28	
C _{max} (mmol/L)	M+F	2.82	2.73	5.75	6.41	14.6	14.8	1.73	1.69	5.22	5.63	16.6	16.6
	M/F	2.64/3.01	3.14/2.33	5.65/5.85	6.75/6.07	14.9/14.1 ^{c)}	15.4/14.1	1.71/1.76	1.59/1.80	5.09/5.34	5.88/5.38	16.9//16.2	17.6/15.6
t _{max} ^{b)} (h)	0.0833		0.0833		0.0833		0.0833		0.0833		0.0833		
AUC (mmol · h/L)	M+F	1.14	n.e. ^{d)}	2.31	2.64	6.09	7.19	1.47	1.45	4.50	4.52	15.5	15.8
	M/F	n.c. ^{d)} /1.17	n.c. ^{d)} /n.c. ^{d)}	2.47/2.15	2.93/2.35	6.37/n.c. ^{d)}	8.01/6.39	1.44/1.49	1.42/1.48	4.49/4.51	4.57/4.46	17.6/13.4	18.2/13.5
Time interval for AUC	0.1 - 3 h						0.1 - 3 h						

a) The units were converted from µmol to mmol

b) t_{max} is the time of the first sample

c) n = 2

d) n.e.: not evaluated, n.c.: not calculated

2.6.7.3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 2

2.6.7.3 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

Test Article: Gadobutrol

Test system	Wistar Rat (male rat)									Wistar Rat (pregnant rat)					
	Report A39049, fertility study ^{e,f)}									Report A34150, embryo-fetal development toxicity study ^{g)}					
Daily Dose (mmol/kg)	0.6			2.2			7.5			5.0		7.5		10.0	
Day	1	22	43	1	22	43	1	22	43	6 p.c.	17 p.c.	6 p.c.	17 p.c.	6 p.c.	17 p.c.
C _{max} (mmol/L)	2.07	2.50	2.61	6.08	10.2	8.71	25.5	24.6	28.7	18.8	18.6	26.5	29.5	33.2	40.2
t _{max} ^{h)} (h)	0.083			0.083			0.083			0.083		0.083		0.083	
AUC (mmol·h/L)	1.13	1.41	1.40	3.13	5.46	6.56	15.2	16.7	19.0	9.02	9.82	12.5	17.3	17.4	24.9
Time interval for AUC	0 - 24h									0 - 24 h					

Test system	New Zealand White Rabbit (pregnant rabbit)						Wistar Rat (pregnant and delivered rat)					
	Report A36661, embryo-fetal development toxicity study ⁱ⁾						Report PH-35738, peri- and postnatal development toxicity study ^{j)}					
Daily Dose (mmol/kg)	2.5		5.0		10.0		0.6		2.2		7.5	
Day	6 p.c.	18 p.c.	6 p.c.	18 p.c.	6 p.c.	18 p.c.	6 p.c.	21 p.p.	6 p.c.	21 p.p.	6 p.c.	21 p.p.
C _{max} (mmol/L)	17.2	14.4	27.4	26.1	45.8	49.9	2.05	2.75	8.48	8.69	30.1	28.9
t _{max} ^{h)} (h)	0.0833		0.0833		0.0833		0.083		0.083		0.083	
AUC (mmol·h/L)	15.3	12.9	26.0	27.7	53.3	86.5	1.27	1.39	5.42	4.17	17.63	14.55
Time interval for AUC	0 - 24 h						0 - 24 h					

e) The units were converted from µmol to mmol

f) Samples were taken on days 1, 22 and 43 of administrations

g) Samples were taken on day 6 and day 17 of gestation (p.c.: post coitus).

h) t_{max} is the time of the first sample

i) Samples were taken on day 6 and day 18 of gestation (p.c.: post coitus)

j) Samples were taken on day 6 of gestation and the 21 day of delivery (p.c. : post coitus, p.p.: post parturition)

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 5

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: Gadobutrol

Batch No.	Batch No.	Impurities			Report No.	Study No.	Type of Study
		%	%	%			
		SPECIFICATION	%	%			
	(SH L562A)			n.d.	9345	TX .124	Single-dose toxicity
					9346	TX .125	Single-dose toxicity
					9330	TX .126	Single-dose toxicity
					9344	TX .127	Single-dose toxicity
					9331	TX .128	Single-dose toxicity
					9329	TX .129	Single-dose toxicity
	(SH L562A)			n.d.	9883	TX .220	Single-dose toxicity
	(SH L562AA)			n.d.	B600	.005	Single dose toxicity
	(SH L562BB)			n.d.	A28236	TXST .0138	Single-dose toxicity
					A28309	TXST .0112	Single-dose toxicity
	(SH L562BB)			n.d.	A41318	TXST .0301	Single-dose toxicity
	(SH L562BB)			n.d.	A41286	TXST .0310	Single-dose toxicity

n.d. : not detected

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 5

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: Gadobutrol

Batch No.	Batch No.	Impurities			Report No.	Study No.	Type of Study
		%	%	%			
	SPECIFICATION	%	%	%			
	(SH L562A)			n.d.	A031	TX .230	Repeated-dose toxicity
	(SH L562A)			n.d.	9658	TX .139	Repeated-dose toxicity
	(SH L562AA)			n.d.	9926	TX .242	Repeated-dose toxicity
	(SH L562BB)			n.d.	SG/135	2500	Repeated-dose toxicity
	(SH L562A)			n.d.	A08936	TXST .0145	Repeated-dose toxicity
	(SH L562A)			n.d.	A10548	TXST .0146	Repeated-dose toxicity
	(SH L562A)			n.d.	9501	TX .135	Genotoxicity
	(SH L562A)			n.d.	9502	TX .103	Genotoxicity
	(SH L562A)			n.d.	9503	TX .134	Genotoxicity
	(SH L562A)			n.d.	9592	TX .136,	Genotoxicity
	(SH L562A)			n.d.		TX .137	
	(SH L562A)			n.d.	9616	TX .138	Genotoxicity
	(SH L562A)			n.d.	9972	TX .213	Genotoxicity
	(SH L562A)			n.d.	9823	TX .173	Genotoxicity

n.d. : not detected

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 3 of 5

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: Gadobutrol

Batch No.	Batch No.	Impurities			Report No.	Study No.	Type of Study
		%	%	%			
	SPECIFICATION	%	%	%			
	(SH L562A)			n.d.	9927	TX 281	Reproductive toxicity
				n.d.	A576	TX 310	Reproductive toxicity
	(SH L562A)			n.d.	A420	TX 311	Reproductive toxicity
	(SH L562A)			n.d.	SG/124	002	Reproductive toxicity
	(SH L562A)			n.d.	A894	TX 075	Reproductive toxicity
	(SH L562A)			n.d.	SG/127	914	Reproductive toxicity
	(SH L562BB)			n.d.	A30997	TXST 0329	Reproductive toxicity
	(SH L562BB)			n.d.	A32272	TXST 0068	Reproductive toxicity
	(SH L562BB)			n.d.			

n.d. : not detected

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 4 of 5

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: Gadobutrol

Batch No.	Batch No.	Impurities			Report No.	Study No.	Type of Study
		%	%	%			
	SPECIFICATION	%	%	%			
	(SH L562BB)			n.d.	A34150	TXST-0144	Reproductive toxicity
	(SH L562BB)			n.d.	A36661	TXST-0242	Reproductive toxicity
	(SH L562BB)			n.d.	A39049	TXST-0103	Reproductive toxicity
	(SH L562BB)			n.d.	PH-35738	T-076752	Reproductive toxicity
				n.d. : not detected			

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 5 of 5

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: Gadobutrol

Batch No.	Batch No.	Impurities			Report No.	Study No.	Type of Study
		%	%	%			
	SPECIFICATION	%	%	%			
	(SH L562B)			n.d.	9622	TX .130	Local tolerance
					9569	TX .131	Local tolerance
					9599	TX .132	Local tolerance
					9566	TX .133	Local tolerance
					9736	TX .031	Local tolerance
	(SH L562A)			n.d.	9690	TX .234	Local tolerance
				n.d.	9689	TX .235	Local tolerance
	(SH L562A)			n.d.	A601	TX .022	Local tolerance
	(SH L562B)			n.d.	AA28	TX .298	Local tolerance
	(SH L562BB)			n.d.	AH95	TX .103	Local tolerance
				n.d.			
	(SH L562 B), (SH L562 A)			n.d.	9642	TX .140	Other toxicity studies
	(SH L562A)			n.d.			
				n.d.	9728	TX .304	Other toxicity studies
	(SH L562A)			n.d.			
				n.d.	SG/143	.003	Other toxicity studies
				n.d.	SG/144	.004	Other toxicity studies
	(SH L562AA)			n.d.	SG/130	.001	Other toxicity studies
	(SH L562BB)			n.d.	A20948	TXST .0066	Other toxicity studies
							n.d. : not detected

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 4

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Doses (mmol/kg)	Gender and No. per Group	Observed Max. Nonlethal Dose (mmol/kg)	Approx. Lethal Dose (mmol/kg)	Noteworthy Findings	Report No. Study No.	Location Section:
Mouse/ NMRI	intravenous (SH L 562 A) 0.5M	0, 25	3M	25	> 25 at injection rate of 0.2 mL/min	Slight to moderate apathy 10 minutes after application. No findings from 30 min after application onwards.	9345 TX ■.124	4.2.3.1.1
Mouse/ NMRI	intravenous (SH L 562 A) 0.5M	0, 25	3F	25	> 25 at injection rate of 0.2 mL/min	Slight to moderate apathy 10 minutes after application. No findings from 30 min. after application onwards.	9346 TX ■.125	4.2.3.1.2
Mouse/ NMRI	intragastric (SH L 562 A) 0.5M	0, 25	3M	25	> 25	No noteworthy finding	9331 TX ■.128	4.2.3.1.3
Rat / Wistar	intravenous (SH L 562 BB) 1.0M	0, 25, 40	3M / 3F for control, 3M / 4F for low dose, 1F for high dose	M: 25, F: <25	M: > 25 at injection speed of 0.8 mL/min, F: 25 at injection speed of 0.4 mL/min	Accelerated and irregular respiration, gasping breathing, spontaneous vocalization, frequent jumping or clonic-tonic seizures in animals, which were then sacrificed in a moribund state (25 and 40 mmol/kg : 3F). Surviving animals showed accelerated and irregular respiration, eyelid closure, ruffled fur on the application day. All surviving animals were without findings on the day after treatment at the latest (25 mmol/kg ; 3M & 2F).	A28236 TXST ■0138	4.2.3.1.4

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 4

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Doses (mmol/kg)	Gender and No. per Group	Observed Max. Nonlethal Dose (mmol/kg)	Approx. Lethal Dose (mmol/kg)	Noteworthy Findings	Report No. Study No.	Location Section:
Rat / Wistar	intravenous (SH L 562 BB) 1.0M	0, 2, 6, 20	16M / 16F	6	20 at injection speed of 0.4 mL/min	2 mmol/kg: vacuolation of proximal tubule on day 3/ recovered on day 22 6 mmol/kg: vacuolation of proximal tubule on days 3 and 22 20 mmol/kg: vacuolation of proximal tubule, centrilobular vacuolation of liver cell and increase of kidney weight on day 3/ recovered on day 22, apathy, prone-lateral or supine position, spontaneous vocalization, biting of objects, clonic-tonic seizures, disturbances in respiration and eyelid closure on day 1. Tremor and disturbances in gait (1-2F). 2M/2F died or sacrificed in moribund status on day 1.	A28309 TXST ■■■■0112	4.2.3.1.5
Rat / Wistar	intravenous (SH L 562 A) 0.5M	0, 20	3M	20	> 20 at injection speed of 0.8 mL/min	Apathy, biting of objects, spontaneous vocalization, gait and respiration disturbance, tremor, blood-stained or blood-encrusted mouth/snout on day 1. No findings from day 2 onwards.	9330 TX■■■■.126	4.2.3.1.6

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 3 of 4

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Doses (mmol/kg)	Gender and No. per Group	Observed Max. Nonlethal Dose (mmol/kg)	Approx. Lethal Dose (mmol/kg)	Noteworthy Findings	Report No. Study No.	Location Section:
Rat / SD	intravenous (SH L 562 AA) 0.5M	0, 5, 10, 20	5M/5F	20	>20 at injection speed of 2 mL/min	5 mmol/kg: no effect 10 mmol/kg : transient hypoactivity (0-30 min; 1M) 20 mmol/kg: transient hypoactivity , irregular respiration, bradypnea, prone position and eyelid closure (0-1hrs; 1-5M/1-5F)	B600 ■005	4.2.3.1.7
Rat / Wistar; Weaned	intravenous (SH L 562 A) 0.5M	0, 15, 20	3M	15	> 15 and presumably close to 20 at injection speed of 0.8 mL/min	≥ 15: apathy, spasmodic twitches, ruffled fur, atactic gait, tremor and vocalization on day 1. 20: 1M died 5-10 min after application and showed paleness of the kidneys at necropsy. 1M: decrease in body weight gain. No findings from day 2 onwards.	9344 TX ■.127	4.2.3.1.8
Rat / Wistar	intra-gastric (SH L 562 A) 0.5M	0, 20	3M	20	> 20	No noteworthy finding	9329 TX ■.129	4.2.3.1.9
Dog / Beagle	intravenous (SH L 562 BB) 1.0M	6, 10	2M	10	> 10 at injection speed of 8 mL/min	6 mmol/kg: eyelid closure (1/2M), 10 mmol/kg: eyelid closure (2/2M), apathy, decreased locomotive activity, hyperactivity, conjunctiva reddening, flew licking, retching and vomiting on day 1	A41286 TXST ■0310	4.2.3.1.10

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 4 of 4

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Doses (mmol/kg)	Gender and No. per Group	Observed Max. Nonlethal Dose (mmol/kg)	Approx. Lethal Dose (mmol/kg)	Noteworthy Findings	Report No. Study No.	Location Section:
Dog / Beagle	intravenous (SH L 562 BB) 1.0M	0, 0.3, 1.7, 10.0	5M / 5F	10.0	>10.0 at injection speed of 8 mL/min	0.3 mmol/kg: transient reddening of inner ear (1/5M) or whole body (1/5F) on day 1, vacuolation of proximal tubule on day 2 but disappeared on day 21. 1.7 mmol/kg: vomiting, flew licking on day 1 (1/5F), vacuolation of proximal tubule on days 2 and 21 10.0 mmol/kg: vomiting, transient eyelid closure, apathy on day 1 (3/5M, 2/5F), transient reddening of mucosa/skin on day 1, transient swelling of head on day 1 (1/5M, 1/5F), slight decrease of systolic blood pressure at 5 min in males on day 1, increased heart rate with decreased RR-intervals and QT- times at 5 min on day 1, vacuolation of proximal tubule on days 2 and 21	A41318 TXST 0301	4.2.3.1.11
Dog / Beagle	intravenous (SH L 562 A) 0.5M	0, 6.0	2M / 1F	6.0	> 6.0 at injection speed of 10 mL/min	Signs of nausea during and up to 30 min. after application. Slight increase in urinary specific gravity on day 1	9883 TX 220	4.2.3.1.12

2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 2

2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験

Test Article: Gadobutrol

Location: Section: 4.2.3.2.3

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formu- lation)	Duration of Dosing	Daily Dose (mmol/kg)	Gender (No. of animals per group)	NOAEL (mmol/kg)	Noteworthy findings	Report no.	Study no.
Rat / SD	intravenous	8 days	0 (Saline) 0.5 ^a 4.5 ^a 4.5 ^b	5M/5F	4.5	0.5 mmol/kg: - slight vacuolation of renal tubular epithelium 4.5 mmol/kg (both concentrations): - increase of absolute and relative kidney weights - modulate vacuolation of renal tubular epithelium	SG/069	004

^a 0.5 M solution (1.0 M formulation [SH L 562 B] was diluted by 0.9% NaCl solution)^b 1.0 M formulation [SH L 562 B]

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 2

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Gadobutrol

Location: Section: 4.2.3.2.5

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formu- lation)	Duration of Dosing	Daily Dose (mmol/kg)	Gender (No. of animals per group)	NOAEL (mmol/kg)	Noteworthy findings	Report no.	Study no.
Rat / SD	intravenous	4 weeks + 2 weeks withdrawal period	0 (Saline) 0.1 ^c 0.25 ^c 0.75 ^c 2.5 ^c	16M / 16F (0, 0.75 and 2.5 mmol/kg groups), 10M / 10F (0.1 and 0.25 mmol/kg groups)	M: 0.75 F: 2.5	0.1 mmol/kg: - no treatment-related effects 0.25 mmol/kg: - partial vacuolation of renal proximal tubular epithelium (all animals) - slight vacuolation of urinary bladder epithelium (a few animals) 0.75 mmol/kg: - slight vacuolation of renal proximal tubular epithelium (all animals with one partial change) - slight vacuolation of urinary bladder epithelium (many males and a few females) 2.5 mmol/kg: - increase of absolute and relative kidney weights - moderate to marked vacuolation of renal proximal tubular epithelium (all animals) - slight vacuolation of urinary bladder epithelium (many animals) - delayed tendency of PSP excretion in males Grade of increased kidney-weights and tubular vacuolation was decreased after 2 weeks withdrawal period (remained slight vacuolation of urinary bladder)	A03528	002

^c0.5 M formulation [SH L 562 A]

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 A08936

Report No.: A08936 **Study No.:** TXST-0145/KIST-0214 **Location Section:** 4.2.3.2.1**Test Article:** Gadobutrol**Report Title:** Gadobutrol (SH L562BB)

Systemic toxicity study with daily intravenous administration to rats (M+F) followed by a subsequent observation period of appr. 10 weeks

Species/Strain: Rat/ Wistar**Duration of Dosing:** 4 weeks**GLP Compliance:** Yes**Initial Age:** 6-11 weeks**Duration of Postdose:** appr. 10 weeks**Date of First Dose:** [REDACTED]**Method of Administration:** intravenous**Vehicle/Formulation:** Solution, SH L562BB**Special Features:** Animal collective K0: 10 male and 10 female animals per group, sacrificed at the end of the treatment period.

Animal collective R1: 9 male and 9 female animals per group, sacrificed after the treatment free recovery period.

No Observed Adverse Effect Level: Males: 1.2 mmol/kg/day, Females: 3.0 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		0.6		1.2		3.0		
	M:19	F:19	M:19	F:19	M:19	F:19	M:19	F:19	
Toxicokinetics: ^a									
C_{max}(μmol/L)	Day 1			2820		5749		14550	
	Day 28			2731		6408		14785	
AUC_{0.1-3h} (μmol · h/L)	Day 1			1136		2310		6092	
	Day 28			not evaluable		2638		7191	
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	1 ^b	0
Body Weight (%^c)	Day 28	329 g	189 g	-1	+2	+2	+2	±0	+4
Food Consumption (%^d)	Day 22-28	22.4 g/day	14.5 g/day	-1	+4	+2	+5	-4	+2
Water Consumption (%^d)	Day 22-28	27.7 g/day	23.7 g/day	+3	+10	+11	+1	+6	+6

^a Blood samples were taken from the animal collective R1. Overall means of the 9 male and the 9 female rats per group are shown.^b The death of animal 118M on the first day of the study was clearly considered not to be compound-related (severe preexisting disorder of skeletal muscle with additional stress of handling and treatment)^c At end of dosage period (animal collective K0). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.^d At end of dosage period (animal collective K0+R1). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験 A08936 (続き)

Report No.:	A08936	Study No.:	TXST [REDACTED]0145/KIST [REDACTED]0214	Location	Section:	4.2.3.2.1			
Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		0.6		1.2		3.0		
Number of Animals	M:19	F:19	M:19	F:19	M:19	F:19	M:19	F:19	
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-	
Serum Chemistry									
Total Alpha globulins (%) Day 24-25	27.71	25.77	-	-	-	-	-	24.71*	
Total Beta globulins (%) Day 24-25	15.00	14.00	-	15.81**	-	15.14*	-	15.27*	
Blood Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	
Organ Weights^a (%)									
Kidney absolute	2.03 g	1.15 g	+11	+16*	+14	+19**	+42**	+29**	
Kidney relative	0.62%	0.61%	+11*	+13**	+11*	+17**	+39**	+24**	
Gross Pathology									
Kidney: Discoloration	0	0	0	0	0	0	4/10	1/10	
Enlargement	0	0	0	0	0	0	3/10	0	
Histopathology									
Kidney: Tubular cell vacuolation	-	-	+	+	++	++	+++	++	
Single cell necrosis	-	-	-	-	-	-	(+)	-	
Ureter: Urothelial vacuolation	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
Urinary bladder: Uroth. Vacuolation	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	

^a Organ weights of animal collective K0. Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Dunnett Test, * p<0.05, ** p<0.01

- : no noteworthy findings, (+) Minimal + Slight ++ Moderate +++ Marked

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 3 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験 A08936 (続き)

Report No.:	A08936		Study No.:	TXST [REDACTED]0145/KIST [REDACTED]0214		Location	Section:		4.2.3.2.1	
Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		0.6		1.2		3.0			
Number of Animals	M:19	F:19	M:19	F:19	M:19	F:19	M:19	F:19		
Additional Examinations										
Electronmicroscopy: Vacuolization of renal										
prox. tubular epithelial cells	-	-	(+) - +	(+) - +	+	+	++ - +++	++ - +++		
Granular material: Bowman's space	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)		
Tubular lumen	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-		
Postdose Evaluation										
No. Animals Evaluated	9	9	9	9	9	9	9	9		
Body Weight (% ^a)	435 g	210 g	+1	+6	-3	+10	-2	+7		
Food Consumption (% ^a)	Day 92-97	23.6 g/day	15.3 g/day	+5	+3	+5	+11	+1	+14	
Water Consumption (% ^a)	Day 92-98	28.6 g/day	21.8 g/day	+1	+17	+5	+25	-1	+22	
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-		
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-		
Hematology	Day 98	-	-	-	-	-	-	-		
Blood Coagulation	Day 95	-	-	-	-	-	-	-		
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-		
Organ Weights ^b (%): Kidney absolute		2.34 g	1.32 g	-	-	+10	-	+15*	-	
Kidney relative		0.54%	0.63%	-	-	+13**	-	+17**	-	
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-		

^a At end of postdose period (animal collective R1). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

^b Animal collective R1. Number indicates percent difference for the absolute or relative organ weights. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Dunnett Test, * p<0.05, ** p<0.01

- : no noteworthy findings, (+) Minimal + Slight ++ Moderate +++ Marked

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 4 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験 A08936 (続き)

Report No.:	A08936		Study No.:	TXST [REDACTED]0145/KIST [REDACTED]0214		Location	Section:		4.2.3.2.1	
Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		0.6		1.2		3.0			
Number of Animals	M:19	F:19	M:19	F:19	M:19	F:19	M:19	F:19		
Histopathology										
Kidney:Tubular cell vacuolation	-	-	(+)	(+)	+	+	+	++		
Ureters: Urothelial vacuolation	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)		
Urinary bladder: Uroth. vacuolation	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)		
Additional examinations										
Histopathology of Skin (re-read reg. NSF^a)	-	-	-	-	-	-	-	-		
Electronmicroscopy: Vacuolization of renal prox. tubular epithelial cells	-	-	-	(+)	(+)-+	(+)-+	(+)-+	(+)-+		
Granular material: Bowman's space	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)		
Tubular lumen	-	-	-	-	+	+	+	+		

^a NSF nephrogenic systemic fibrosis

-: no noteworthy findings, (+) Minimal

+ Slight

++ Moderate

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 5 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験 9926

Report No.: 9926 **Study No.:** TX ■■■242 **Location** Section: 4.2.3.2.2
Test Article: Gadobutrol
Report Title: SH L 562 A Systemic tolerance study in rats following once daily i.v. administration on two subsequent days
Species/Strain: Rat/ Wistar **Duration of Dosing:** 2 days **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 8 weeks **Duration of Postdose:** none
Date of First Dose: ■■■■■■■■ **Method of Administration:** intravenous
Vehicle/Formulation: Solution, SH L 562 A
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: 1.0 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)	1.0
Number of Animals	M:10	M:10
Noteworthy Finding		
Died or Sacrificed Moribund	0	0
Body Weight (%^a)	199 g	-1
Clinical Observations	-	-
Organ Weights	-	-
Gross Pathology	-	-
Histopathology Kidney:		
Small vesicles in proximal epithelial tubular cells	0/10	8/10

^a At end of dosage period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

- : no noteworthy findings

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 6 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験 9658

Report No.: 9658 **Study No.:** TX-139 **Location** Section: 4.2.3.2.4
Test Article: Gadobutrol
Report Title: ZK 135.079; SH L 562 A;
 Systemic tolerance study in rats after daily intravenous administration over about 4 weeks (16-18 application days) including a reversibility study

Species/Strain: Rat/ Wistar **Duration of Dosing:** 4 weeks **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 9-11 weeks **Duration of Postdose:** approx. 8 weeks
Date of First Dose: [REDACTED] **Method of Administration:** intravenous
Vehicle/Formulation: Solution, SH L 562 A

Special Features: Included reversibility study with a necropsy time point 8 weeks after the end of the treatment.
No Observed Adverse Effect Level: 2.5 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		1.0		2.5		5.0		0 (Control)		5.0
	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:20	M:20	
Number of Animals											
Noteworthy Findings											
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	1 ^a	0	1 ^{a+2}	0	0	
Body Weight (%^b)	267 g	202 g	+7	+1	+2	+2	+2	±0	284 g	-3	
Food Consumption (%^b)	23 g/day	19 g/day	+9	±0	+4	±0	±0	-5	25 g/day	±0	
Water Consumption (%^b)	32 g/day	28 g/day	-6	±0	-3	-4	-6	+21	31 g/day	±0	
Clinical Observations											
Spasmodic twitches, biting of objects and unconsciousness before death	-	-	-	-	-	-	-	+(2)	-	-	
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

^a Accidental death due to possible bacillary overgrowth of the enteral mucosa

^b At end of dosage period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

- : no noteworthy finding

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 7 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験 9658 (続き)

Report No.:	9658	Study No.:	TX ■■■.139	Location	Section:				4.2.3.2.4	
Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		1.0		2.5		5.0		0	5.0
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:20	M:20
Hematology		Day 23								
MCH (x10 ⁻¹² g)	16	17	16	-	17	-	17**	-	17	-
Erythrocyte Count (x10 ⁶ /mm ³)	9.0	7.6	8.5	-	8.6	-	8.0**	-	8.9	-
Reticulocyte Count (n/1000)	34	35	-	-	-	-	-	-	28	47*
Leucocyte Count (x10 ³ /mm ³)	7.6	5.7	-	-	-	-	-	-	4.2	5.7*
Monocyte Count (n/mm ³)	195	88	-	-	-	-	-	-	69	125*
Lymphocyte Count (n/mm ³)	6433	4693	-	-	-	-	-	-	3330	4759*
Hematocrit (%)	47	41	44	-	44	-	43*	-	50	-
Serum Chemistry		Day 22								
Total α-Globulin (%) relative	31.7	29.3	-	-	-	-	-	-	30.1	28.2*
Total α-Globulin (%) absolute	2.08	2.04	-	-	-	-	-	-	1.88	1.74**
α ₁ -Globulin (%) relative	20.7	20.3	19.6	-	18.4**	-	17.9**	-	18.7	17.5*
α ₁ -Globulin (%) absolute	1.36	1.41	1.27	-	1.22	-	1.14**	-	1.17	1.08**
α ₂ -Globulin (%) relative	7.1	5.4	-	-	-	-	-	-	7.4	6.6**
α ₂ -Globulin (%) absolute	0.46	0.38	-	-	-	-	-	-	0.46	0.41**
Total β-Globulin (%) relative	12.6	13.2	14.5**	-	14.2**	-	14.3**	-	12.9	14.2*
Total β-Globulin (%) absolute	0.82	0.92	0.94*	-	0.94*	-	0.91	-	0.81	0.88
Blood Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	n.e.	n.e.
Urinalysis		Day 18								
Specific Gravity (g/mL)	1.030	1.035	1.048	1.041	1.050	1.050	1.067	1.070	1.032	1.057

- : no noteworthy finding, n.e. : not evaluated
Dunnett Test, * p<0.05, ** p<0.01

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 8 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験 9658 (続き)

Report No.:	9658	Study No.:	TX ■.139	Location	Section:				4.2.3.2.4	
Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		1.0		2.5		5.0		0	5.0
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:20	M:20
Organ Weights^a (%) :										
Kidney absolute	1.55 g	1.24 g	+18**	-	+21**	+10*	+35**	+18**		
Kidney relative	0.65%	0.68%	+8*	-	+18**	+7*	+31**	+21**		
Gross Pathology										
-										
Histopathology										
Kidney: Vacuolization of proximal tubular epithelium	-	-	(+)	(+)	++	++	+++ to ++	+++ to ++		
Skin (re-read regarding NSF)	-	-	-	-	-	-	-	-		
Additional Examinations										
Bone Marrow	-	-	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-	-		
Postdose Evaluation:										
No.Evaluated									20	20
Body Weight (% ^b)									383 g	-3
Food Consumption (% ^b)									24 g	0
Water Consumption (% ^b)									29 g	0
Organ Weights^c (%) :										
Kidney absolute									2.10 g	+13**
Kidney relative									0.59%	+17**

^a At end of dosage period. Number indicates percent difference for the absolute/relative organ weights. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)

^b At end of postdose recovery. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

^c Number indicates percent difference for the absolute or relative organ weights. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

- : no noteworthy finding, NSF: Nephrogenic Systemic Fibrosis, n.e. : not evaluated

Dunnett Test, * p<0.05, ** p<0.01, (+) Minimal, +Slight, ++Moderate, +++Marked

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 9 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 9658（続き）

Report No.:	9658	Study No.:	TX ■.139	Location	Section: 4.2.3.2.4					
Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		1.0		2.5		5.0		0	5.0
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:20	M:20
Postdose Evaluation (continued):										
No.Evaluated									20	20
Gross Pathology									-	-
Histopathology Kidney: Vacuolization of proximal tubular epithelium									-	+
Scarce apical big vacuoles									-	(+)
Additional Examinations										
Bone Marrow									-	-
Hormone determination									-	-

- : no noteworthy finding, (+) Minimal, + Mild

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 10 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験 A10548

Report No.: A10548 **Study No.:** TXST-0146 **Location** Section: 4.2.3.2.6
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol (SH L562BB)

Systemic toxicity study with daily intravenous administration to dogs (M+F) followed by a subsequent observation period of 8 weeks

Species/Strain: Dog/Beagle **Duration of Dosing:** 4 weeks **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 10-11 months **Duration of Postdose:** 8 weeks
Date of First Dose: XXXXXXXXXX **Method of Administration:** intravenous
Vehicle/Formulation: Solution, SH L562BB

Special Features: Animal collective K0: 3 males and 3 females per group, sacrificed at the end of the treatment period.
 Animal collective R1: 2 males and 2 females in groups 1 and 3, sacrificed after the treatment-free recovery period.

No Observed Adverse Effect Level: 1.0 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		0.3		1.0		3.0		
Number of Animals	M:5	F:5	M:3	F:3	M:5	F:5	M:3	F:3	
Toxicokinetics:^a									
C_{max}(μmol/L):	Day 1			1731		5215		16585	
	Day 28			1694		5630		16612	
AUC_{0.1-3h} (μmol x h/L)	Day 1			1465		4500		15532	
	Day 28			1448		4517		15848	
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	
Body Weight (%^b)	9.2 kg	7.2 kg	+9	+19	+1	+8	+13	+13	
Food Consumption (%^b)	Day 28	439.2 g/day	381.6 g/day	-3	-10	-5	+8	+10	-4
Water Consumption (%^b)	Day 28-29	1411.2 g/day	1151.2 g/day	-19	\pm 0	-12	+8	-16	\pm 0

^a Blood samples were taken from 3 male and 3 female animals per sampling time and dose group. Overall means of male and female dogs per group are shown.

^b At end of dosage period. (animal collective K0). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 11 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験 A10548 (続き)

Report No.:	A10548	Study No.:	TXST-0146	Location		Section:	4.2.3.2.6		
Daily Dose [mmol/kg]		0 (0.9% NaCl solution)		0.3		1.0		3.0	
Number of Animals		M:5	F:5	M:3	F:3	M:5	F:5	M:3	F:3
Clinical Observations									
Transient apathy		-	-	-	-	-	-	(+)	(+)
Transient eyelid closure		-	-	-	-	-	-	+	+
Signs of nausea after administration		-	-	-	-	+	+	++	-
Reddening of the visible Mucosa		-	-	-	-	(+)	-	+	+
Reddening of the inner ear surface		-	-	-	-	-	-	++	+++
Ophthalmoscopy									
		-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography									
Heart rate (beats/min)	Week 3	125	98	-	-	-	-	151	121
Hematology									
		-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry									
		-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Coagulation									
		-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis									
Specific Gravity (g/mL)	Day 21	1.0384	1.0376	-	-	1.0704**	1.0592	1.0793**	1.0853*
NAG (mU/h)	Day 3	150.140	41.660	-	-	-	87.260*	-	104.433*
	Day 21	131.600	34.380	-	-	-	105.700*	-	139.467**
γ-GT (mU/h)	Day 3	993.940	279.000	-	-	-	463.040*	-	971.900**
	Day 21	1432.440	234.500	-	-	-	465.660	-	823.800*
Organ Weights^a									
		-	-	-	-	-	-	-	-

a At end of dosage period (Animal collective K0)

- : no noteworthy finding, (+) Minimal + Slight ++ Moderate +++ Marked
Dunnett Test, *p<0.05, **p<0.01

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 12 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験 A10548 (続き)

Report No.:	A10548		Study No.:	TXST-0146		Location	Section:		4.2.3.2.6	
Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		0.3		1.0		3.0			
Number of Animals	M:5	F:5	M:3	F:3	M:5	F:5	M:3	F:3		
Gross Pathology										
Kidney: Pale discoloration	0	0	0	0	0	1/3	3/3	2/3		
Histopathology										
Kidney: Vacuolization of proximal tubular epithelium	-	-	(+)	(+)	+	(+)	+++	+		
Additional Examinations										
Blood Pressure	-	-	-	-	-	-	-	-		
Clinical nervous system function test	-	-	-	-	-	-	-	-		
Histopathology										
Skin (re-read reg. NSF ^a)	-	-	-	-	-	-	-	-		

^a NSF: Nephrogenic Systemic Fibrosis

- : no noteworthy finding, (+) Minimal

+ Slight

++ Moderate

+++ Marked

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 13 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験 A10548 (続き)

Report No.:	A10548	Study No.:	TXST-0146	Location		Section:	4.2.3.2.6
Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		0.3		1.0		3.0
Number of Animals	M:5	F:5	M:3	F:3	M:5	F:5	M:3 F:3
Postdose Evaluation							
No. of Animals Evaluated	M: 2	F: 2	M: 0	F: 0	M: 2	F: 2	M: 0 F: 0
Body Weight (%^a)	10.6 kg	8.9 kg			-8	-4	
Food Consumption (%^a)	Day 86	265.5 g/day				-35	
Water Consumption (%^a)	Day 86-87	870.5 g/day				-44	
Clinical observations		-				-	
Ophthalmoscopy		-				-	
Electrocardiography		-				-	
Hematology		-				-	
Serum Chemistry		-				-	
Blood Coagulation		-				-	
Urinalysis		-				-	
Organ Weights		-				-	
Gross Pathology		-				-	
Histopathology		-				-	
Additional examinations							
Blood Pressure		-				-	

^a At end of postdose period. (Animal collective R1). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

- : no noteworthy finding

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 14 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験 A031

Report No.: A031 **Study No.:** TX-230 **Location** Section: 4.2.3.2.7
Test Article: Gadobutrol
Report Title: SH L 562 A

Systemic tolerance study in Beagle dogs after daily intravenous administration over about 4 weeks (5 times per week) for a total of 16 - 18 administrations

Species/Strain: Dog/Beagle **Duration of Dosing:** 21 - 23 days **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 40 - 67 weeks **Duration of Postdose:** none
Date of First Dose: XXXXXXXXXX **Method of Administration:** intravenous
Vehicle/Formulation: Solution, SH L 562 A

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: 2.5 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		0.25		1.0		2.5	
	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Number of Animals								
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%^a)	12.7 kg	8.9 kg	+9	-2	+18	+18	-8	-6
Food Consumption (%^a)	578 g/day	475 g/day	-2	-7	+3	+9	-15	-19
Water Consumption (%^a)	1729 g/day	1528 g/day	-2	-3	+26	+3	-4	-16
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography and heart rate	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology								
Platelet Count (x10 ³ /mm ³)	311	335	-	-	206	189	114*	166
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-

^a At end of dosage period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

- : no noteworthy finding

Dunnnett Test, * p<0.05

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 15 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験 A031（続き）

Report No.:	A031	Study No.:	TX ■■■.230	Location	Section:	4.2.3.2.7			
Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)			0.25		1.0		2.5	
Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	
Urinalysis									
Specific Gravity (g/mL)	Day 3	1.042	1.038	-	-	1.066**	1.061	1.071**	1.074*
	Day 18	1.043	1.027	-	-	1.044	1.033	1.062	1.047*
γGT (mU/24h)	Day 3	5851	3203	-	-	-	6719**	19684	13063**
	Day 18	2590	2653	-	-	-	8101**	15743*	13716**
Organ Weights^a (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology		-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology Kidney: Vacuolization in proximal tubular epithelial cells		-	-	-	-	+	+	++	+---
Additional Examinations									
Clinical nervous system function test		-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure		-	-	-	-	-	-	-	-
Bone Marrow		-	-	-	-	-	-	-	-

a At end of dosage period

- : no noteworthy finding, + Slight ++ Moderate

Dunnett Test, * p<0.05, ** p<0.01

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 16 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験 : 重要な試験 SG/135

Report No.: SG/135 **Study No.:** 2500 (015-044) **Location Section:** 4.2.3.2.8
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Evaluation of the Report Entitled 'Toxicity Study of SH L 562 AA in Dogs after Daily Intravenous Administration for 4 weeks, including a 4-week Reversibility Study' of [REDACTED] Dated [REDACTED]
Species/Strain: Beagle dogs **Duration of Dosing:** 4 weeks **GLP Compliance:** Yes
Initial Age: Ca. 9 months **Duration of Postdose:** 4 weeks
Date of First Dose: [REDACTED] **Method of Administration:** intravenous
Vehicle/Formulation: Solution, SH L562AA
Special Features: -
No Observed Adverse Effect Level: 2.5 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		0.1		0.5		2.5	
Number of Animals	M:6	F:6	M:3	F:3	M:3	F:3	M:6	F:6
Toxicokinetics AUC:	n.e.							
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%^a)	9.0 kg	8.4 kg	±0	+6	-1	+1	±0	+4
Food Consumption (%^a)	247 g/day	221 g/day	+1	+11	-9	+5	+1	+13
Water Consumption (%^a)	919 g/day	594 g/day	-7	+29	-36	+18	-10	+27
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography and heart rate	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood pressure	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-

^a At the end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

- : no noteworthy finding, n.e. : not evaluated

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 17 of 17

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 SG/135（続き）

Report No.:	SG/135	Study No.:	2500 (015-044)		Location	Section:	4.2.3.2.8		
Daily Dose [mmol/kg]	0 (0.9% NaCl solution)		0.1		0.5		2.5		
Number of Animals	M:6	F:6	M:3	F:3	M:3	F:3	M:6	F:6	
Blood chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	
Urinalysis									
γ-GTP (U/L)	Week 4	32.2	39.2	26.9	22.4	64.9	35.3	81.8*	81.1**
	Week 8	48.1	24.7	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	27.6	36.0
(U/day)	Week 4	7.1	5.5	5.3	5.6	9.8	8.6	17.2*	21.9**
	Week 8	7.5	4.4	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	4.1*	5.6
NAG (U/L)	Week 4	15.0	11.5	11.5	9.0	16.7	12.5	25.0*	13.5
	Week 8	15.0	9.9	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	14.8	8.8
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	
Histopathology									
Kidney									
Tubular vacuolation	Week 4	-:3/3	-:3/3	-:3/3	-:3/3	+:3/3	+:3/3	+:3/3	+:3/3
	Week 8	-:3/3	-:3/3	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-:2/3, +:1/3	-:3/3
Hyaline droplet	Week 4	-:3/3	-:3/3	-:3/3	-:3/3	+:3/3	+:3/3	++:3/3	++:3/3
	Week 8	-:3/3	-:3/3	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-: 2/3, +:1/3	-:3/3

- : no noteworthy finding,
n.e. : not evaluated
Dunnett Test, *p<0.05, **p<0.01

+ Slight

++ Moderate

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 9503

Report No.: 9503 **Study No.:** TX-134 **Location** Section: 4.2.3.3.1.1
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Evaluation of SH L 562 A (ZK 135.079) in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test
Test for Induction of: Reverse mutations in bacteria **No. of Independent Assays:** 1 **GLP Compliance:** Yes
Strains: *S. typhimurium*, TA1535, TA1537, TA98, TA100 and TA 1538 **No. of Replicate Plates:** 3
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Analyzed Cells /Culture:** -- **Date of Treatment:** [REDACTED]
Vehicles: For Test Article: Phosphate buffer For Positive Controls: Phosphate buffer, dimethyl sulfoxide (DMSO)
Treatment: Assay 1 (Direct plate incorporation test): ca. 72 hours
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Assay 1	Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]	Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]				
				TA1535	TA 100	TA1537	TA1538	TA 98
Without S9 mix		Phosphate buffer	0 (50 µL)	16 ± 3	104 ± 15	7 ± 4	11 ± 2	27 ± 5
		DMSO	0 (50 µL)	17 ± 1	99 ± 10	10 ± 1	11 ± 4	25 ± 7
		Gadobutrol	0.1875	15 ± 7	108 ± 4	8 ± 4	8 ± 2	25 ± 2
			0.375	18 ± 7	110 ± 3	8 ± 1	12 ± 4	29 ± 5
			0.75	15 ± 2	90 ± 8	7 ± 2	11 ± 5	28 ± 6
			1.5	17 ± 6	112 ± 12	7 ± 2	15 ± 3	28 ± 6
			3.0	19 ± 3	105 ± 6	9 ± 3	13 ± 3	27 ± 3
			6.0	19 ± 5	124 ± 14	7 ± 2	11 ± 5	24 ± 4
		9-Acridinamine	100 µg	--	--	1192 ± 82	--	--
		2-Nitro-9H-fluorene	10 µg	--	--	--	720 ± 103	741 ± 82
		Sodium azide	5 µg	587 ± 48	724 ± 11	--	--	--

SHL 562 A was tested up to the concentration of 6 mg/plate of the active ingredient Gadobutrol (ZK 135.079)

-- : not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 3 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 9501

Report No.: 9501 **Study No.:** TX-135 **Location** Section: 4.2.3.3.1.2
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Evaluation of SH L 562 A (ZK 135.079) in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test with preincubation
Test for Induction of: Reverse mutations in bacteria **No. of Independent Assays:** 1 **GLP Compliance:** Yes
Strains: *S. typhimurium*, TA1535, TA100, TA1537, TA1538 and TA98 **No. of Replicate Plates:** 3
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Analyzed Cells /Culture:** -- **Date of Treatment:** XXXXXXXXXX
Vehicles: For Test Article: Phosphate buffer For Positive Controls: Phosphate buffer, dimethyl sulfoxide(DMSO)
Treatment: Assay 2 (Pre-incubation test): 1 hour + ca. 72 hours
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Assay 2	Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]	Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]				
				TA1535	TA 100	TA1537	TA1538	TA 98
Without S9 mix		Phosphate buffer	0 (50 µL)	26 ± 5	102 ± 3	12 ± 2	15 ± 6	29 ± 4
		DMSO	0 (50 µL)	23 ± 1	99 ± 4	15 ± 2	12 ± 5	31 ± 3
		Gadobutrol	0.1875	24 ± 3	112 ± 16	11 ± 2	16 ± 5	31 ± 5
			0.375	25 ± 3	103 ± 13	11 ± 1	15 ± 3	33 ± 6
			0.75	21 ± 5	102 ± 11	10 ± 4	17 ± 4	29 ± 2
			1.5	24 ± 4	97 ± 5	10 ± 1	18 ± 3	39 ± 9
			3.0	23 ± 3	102 ± 13	10 ± 2	19 ± 3	30 ± 4
			6.0	23 ± 4	94 ± 14	11 ± 1	14 ± 5	34 ± 1
		9-Acridinamine	60 µg	--	--	119 ± 43	--	--
		9-Acridinamine	80 µg	--	--	238 ± 193	--	--
		2-Nitro-9H-fluorene	10 µg	--	--	--	1248 ± 74	1121 ± 110
		Sodium azide	5 µg	777 ± 32	697 ± 41	--	--	--

SHL 562 A was tested up to the concentration of 6 mg/plate of the active ingredient Gadobutrol (ZK 135.079)

-- : not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 5 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 9502

Report No.: 9502 **Study No.:** TX-103 **Location** Section: 4.2.3.3.1.3
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Evaluation of SH L 562 A (ZK 135.079) in a bacterial mutagenicity test with Escherichia coli, strain WP2uvrA
Test for Induction of: Reverse mutations in bacteria **No. of Independent Assays:** 2 **GLP Compliance:** Yes
Strain: *E. coli* WP 2uvrA **No. of Replicate Plates:** 3
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Analyzed Cells /Culture:** -- **Date of Treatment:** [REDACTED]
Vehicles: For Test Article: Phosphate buffer For Positive Controls: Phosphate buffer, dimethyl sulfoxide (DMSO)
Treatment: Assay 1 (Direct plate incorporation test): ca. 48 -72 hours
 Assay 2 (Pre-incubation test): 1 hour + ca. 48 - 72 hours
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]		Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]	
		Assay 1	Assay 2	Assay 1	Assay 2
Without S9 mix activation	Phosphate buffer	0 (50 µL)	0 (25 µL)	17 ± 1	24 ± 4
	DMSO	0 (50 µL)	0 (25 µL)	12 ± 2	20 ± 5
	Gadobutrol	0.3030 (1µL)	0.1894 (0.625 µL)	15 ± 2	19 ± 8
		0.61 (2µL)	0.3788 (1.25 µL)	15 ± 6	22 ± 5
		1.21 (4µL)	0.7575 (2.50 µL)	11 ± 2	20 ± 1
		2.4 (8 µL)	1.515 (5.00µL)	14 ± 3	21 ± 3
		4.8 (16 µL)	3.03 (10.00µL)	15 ± 2	21 ± 2
		10 (33 µL)	6.06 (20.00µL)	9 ± 0	19 ± 7
		Ethyl methansulfonate	5 µL	2 µL	523 ± 14

SHL 562 A was tested up to the concentration of 10 mg/plate of the active ingredient Gadobutrol (ZK 135.079)

--: not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 6 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 9502 (続き)

Report No.: 9502 **Study No.:** TX■■■■.103 **Location Section:** 4.2.3.3.1.3
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Evaluation of SH L 562 A (ZK 135.079) in a bacterial mutagenicity test with Escherichia coli, strain WP2uvrA

Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]		Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]	
		Assay 1	Assay 2	Assay 1	Assay 2
With S9 mix activation	Phosphate buffer	0 (50 µL)	0 (25 µL)	18 ± 2	32 ± 3
	DMSO	0 (50 µL)	0 (25 µL)	14 ± 6	33 ± 3
	Gadobutrol	0.3030 (1µL)	0.1894 (0.625 µL)	24 ± 5	34 ± 3
		0.61 (2µL)	0.3788 (1.25 µL)	16 ± 5	29 ± 3
		1.21 (4µL)	0.7575 (2.50 µL)	17 ± 4	26 ± 4
		2.4 (8 µL)	1.515 (5.00µL)	20 ± 4	26 ± 3
		4.8 (16 µL)	3.03 (10.00µL)	19 ± 2	33 ± 4
		10 (33 µL)	6.06 (20.00µL)	17 ± 1	32 ± 6
		10.0 µg	20.0 µg	51 ± 12	197 ± 6
	Anthracen-2-amine N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	5.0µg	--	294 ± 19	--

SHL 562 A was tested up to the concentration of 6 mg/plate of the active ingredient Gadobutrol (ZK 135.079)

--: not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 7 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 9616

Report No.: 9616 **Study No.:** TX-138 **Location** Section: 4.2.3.3.1.4
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Evaluation of the clastogenic potential of SH L 562 A in human peripheral blood lymphocytes
Test for Induction of: Chromosome aberrations **No. of Independent Assays:** 1 **GLP Compliance:** Yes
Cells: Human lymphocytes **No. of Replicate Cultures:** 2
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Cells Analyzed/Culture:** 100 **Date of Treatment:** XXXXXXXXXX
Vehicles: For Test Article: Culture medium For Positive Controls: Culture medium
Treatment: Continuous treatment for 20 and 27 hours without S9 mix
 pulse treatment for 3 hours + 17 and 24 hours recovery time with S9 mix
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Metabolic Activation	Treatment Period	Test Article	Concentration [mg/mL]	Cytotoxicity ^{a, b}	Polyploid Cells [%] ^c	Aberrant Cells [%] ^b
Without Activation	20 hours	Medium control	0 (2%)	100	0 ^d	1
		Gadobutrol	0.61	77	1 ^d	0
			3.03	79	0 ^d	1
			6.05	81	0 ^d	0.5
			Triaziquone	1x10 ⁻⁷ M	45	--
	27 hours	Medium control	0 (2%)	100	2 ^d	0
		Gadobutrol	3.03	92	1 ^d	0
			6.05	78	0 ^d	1.5

a Based on mitotic indices (% of control)

b Mean value of 2 replicate cultures

c Including endomitosis

d During the evaluation of 200 cells for structural chromosomal aberrations no relevant increase in the number of polyploid cells was observed

* Fischer's exact test: $p < 0.05$, compared to the concurrent solvent control, -- : not evaluated

SH L 562 A was tested up to the highest recommended concentration of 1×10^{-2} M (Ca. 6.05 mg/mL Gadobutrol=ZK 135.079)

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 8 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 9616 (続き)

Report No.: 9616 **Study No.:** TX■■■■.138 **Location Section:** 4.2.3.3.1.4
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Evaluation of the clastogenic potential of SH L 562 A in human peripheral blood lymphocytes

Metabolic Activation	Treatment Period	Test Article	Concentration [mg/mL]	Cytotoxicity ^{a,b}	Polyploid Cells [%] ^c	Aberrant Cells [%] ^b
With Activation	3 hours + 17 hours recovery	Medium control	0 (2%)	100	1 ^d	0
		Gadobutrol	0.61	82	1 ^d	1
			3.03	82	1 ^d	0.5
			6.05	84	2 ^d	0.5
	3 hours + 24 hours recovery	Cyclophosphamide	2x10 ⁻⁵ M	32	--	18*
		Medium control	0 (2%)	100	2 ^d	0
		Gadobutrol	3.03	82	3 ^d	0.5
			6.05	84	1 ^d	1

a Based on mitotic indices (% of control)

b Mean value of 2 replicate cultures

c Including endomitosis

d During the evaluation of 200 cells for structural chromosomal aberrations no relevant increase in the number of polyploid cells was observed

* Fischer's exact test: $p < 0.05$, compared to the concurrent solvent control, -- : not evaluated

SH L 562 A was tested up to the highest recommended concentration of 1×10^{-2} M (Ca. 6.05 mg/mL Gadobutrol =ZK 135.079)

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 9 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 9972

Report No.: 9972 **Study No.:** TX-213 **Location** Section: 4.2.3.3.1.5
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Evaluation of the clastogenic potential of SH L 562 A in human peripheral blood lymphocytes
Test for Induction of: Chromosome aberrations **No. of Independent Assays:** 1 **GLP Compliance:** Yes
Cells: Human lymphocytes **No. of Replicate Cultures:** 2
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Cells Analyzed/Culture:** 100 **Date of Treatment:** XXXXXXXXXX
Vehicles: For Test Article: Culture medium For Positive Controls: Culture medium
Treatment: Continuous treatment for 20 and 27 hours without S9 mix
 pulse treatment for 3 hours + 17 and 24 hours recovery time with S9 mix
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Metabolic Activation	Treatment Period	Test Article	Concentration [mg/mL]	Cytotoxicity ^{a,b}	Polyploid Cells [%] ^c	Aberrant Cells [%] ^b
Without Activation	20 hours	Medium control	0 (2%)	100	1 ^d	0
		Gadobutrol	0.61	74	0 ^d	1
			3.03	72	0 ^d	0.5
			6.05	58	2 ^d	0
	27 hours	Triaziquone	1x10 ⁻⁷ M	37	--	20*
		Medium control	0 (2%)	100	1 ^d	0
		Gadobutrol	3.03	53	0 ^d	1
		Gadobutrol	6.05	54	1 ^d	0.5

a Based on mitotic indices (% of control)

b Mean value of 2 replicate cultures

c Including endomitosis

d During the evaluation of 200 cells for structural chromosomal aberrations no relevant increase in the number of polyploid cells was observed

* Fischer's exact test: p < 0.05, compared to the concurrent solvent control, -- : not evaluated

SH L 562 A was tested up to the highest recommended concentration of 1 x 10⁻² M (Ca. 6.05 mg/mL Gadobutrol=ZK 135.079)

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 11 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 9592

Report No.: 9592 **Study No.:** TX■■136, TX■■137 **Location** Section: 4.2.3.3.1.6
Test Article: Gadobutrol
Report Title: SH L 562A (ZK 135.079)
 Evaluation of gene mutations in mammalian cells in culture: HGPRT-test with V79 cells
Test for Induction of: Gene mutations **No. of Independent Assays:** 2 **GLP Compliance:** Yes
Mammalian cell line: V79 **No. of Replicate Cultures:** 2
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Cells Analyzed/Culture:** Total ca. 2 x 10⁶ cells (in 5 replicates) **Date of Treatment:** ■■■■■
Vehicles: For Test Article: Minimal Essential Medium For positive controls: Minimal Essential Medium; Dimethyl sulfoxide (DMSO)
Treatment: Assay 1 and 2: Pulse treatment for 4 hours without or with S9 mix
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Assay	Test article	Concentration [mg/mL]	Mutant Colonies per 10 ⁶ cells ^a	
			Without Metabolic Activation	With Metabolic Activation
Assay 1	Medium control	0	5	1
	Dimethyl sulfoxide	0 (1 %)	C	2
	Vehicle control	0 (2 %)	10	--
	Gadobutrol	0.3	6	1
		0.6	10	3
		1.51	13	1
		3.03	13	2
		6.05	10	5
		N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	0.2 µg/mL	1260
	7,12-Dimethylbenz[a]anthracene	15 µg/mL	--	183

^a Mean value of 2 replicate cultures, C : contaminated

SH L 562 A was tested up to the highest recommended concentration of 1 x 10⁻² M (Ca. 6.05 mg/mL Gadobutrol =ZK 135.079)

-- : not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 13 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 AL74

Report No.: AL74 **Study No.:** TX-279 **Location** Section: 4.2.3.7.6.2
Test Article: impurity A*
Report Title: Evaluation of impurity A* in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test

Test for Induction of: Reverse mutations in bacteria **No. of Independent Assays:** 2 **GLP Compliance:** Yes
Strains: *S. typhimurium*, TA1535, TA1537, TA98, TA100 and TA 1538 **No. of Replicate Plates:** 3
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Analyzed Cells /Culture:** -- **Date of Treatment:** [REDACTED]
Vehicles: For Test Article: Phosphate buffer For Positive Controls: Phosphate buffer, dimethyl sulfoxide (DMSO)
Treatment: Assay 1 (Direct plate incorporation test): ca. 72 hours
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Assay 1	Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]	Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]				
				TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
Without S9 mix		Phosphate buffer	0 (50 µL)	29 ± 0	121 ± 11	10 ± 2	10 ± 3	31 ± 6
		DMSO	0 (50 µL)	28 ± 5	119 ± 6	13 ± 3	11 ± 3	22 ± 7
		impurity A*	0.10	39 ± 4	129 ± 15	13 ± 6	8 ± 5	36 ± 7
		impurity A*	0.25	34 ± 5	119 ± 6	14 ± 3	9 ± 1	31 ± 5
		impurity A*	0.50	35 ± 4	113 ± 15	15 ± 3	9 ± 2	30 ± 5
		impurity A*	1.00	29 ± 6	130 ± 9	13 ± 3	9 ± 5	29 ± 2
		impurity A*	2.50	33 ± 6	111 ± 10	13 ± 5	14 ± 2	32 ± 6
		impurity A*	5.00	32 ± 3	116 ± 14	14 ± 4	14 ± 6	30 ± 6
		9-Acridinamine	100 µg	--	--	791 ± 104	--	--
		2-Nitro-9H-fluorene	10 µg	--	--	--	1013 ± 122	575 ± 54
Sodium azide	5 µg	738 ± 1	963 ± 16	--	--	--		

--: not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 14 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 AL74 (続き)

Report No.: AL74 **Study No.:** TX-279 **Location** Section: 4.2.3.7.6.2
Test Article: impurity A*
Report Title: Evaluation of impurity A* in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test

Assay 1	Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]	Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]				
				TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
With S9 mix		Phosphate buffer	0 (50 µL)	10 ± 1	95 ± 7	10 ± 2	13 ± 3	33 ± 8
		DMSO	0 (50 µL)	14 ± 2	86 ± 7	10 ± 1	15 ± 2	28 ± 3
		impurity A*	0.10	16 ± 6	101 ± 5	14 ± 1	15 ± 3	29 ± 2
		impurity A*	0.25	11 ± 2	85 ± 23	15 ± 5	20 ± 3	32 ± 4
		impurity A*	0.50	12 ± 4	84 ± 3	17 ± 3	21 ± 3	24 ± 6
		impurity A*	1.00	11 ± 2	92 ± 10	10 ± 4	16 ± 7	31 ± 8
		impurity A*	2.50	8 ± 3	92 ± 6	11 ± 1	10 ± 2	27 ± 3
		impurity A*	5.00	13 ± 5	86 ± 7	12 ± 1	14 ± 3	27 ± 3
		Anthracen-2-amine	2 µg	113 ± 9	1011 ± 47	121 ± 14	665 ± 40	745 ± 55
		Cyclophosphamide	400 µg	282 ± 13	--	--	--	--
		Benzo[a]pyrene	5 or 10 µg	--	388 ± 39	47 ± 7	54 ± 12	110 ± 17

-- : not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 15 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 AM22

Report No.: AM22 **Study No.:** TX-280 **Location** Section: 4.2.3.7.6.3
Test Article: impurity A*
Report Title: Evaluation of impurity A* in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test with preincubation

Test for Induction of: Reverse mutations in bacteria **No. of Independent Assays:** 1 **GLP Compliance:** Yes
Strains: *S. typhimurium*, TA1535, TA100, TA1537, TA1538 and TA98 **No. of Replicate Plates:** 3
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Analyzed Cells /Culture:** -- **Date of Treatment:** [REDACTED]
Vehicles: For Test Article: Phosphate buffer For Positive Controls: Phosphate buffer, dimethyl sulfoxide (DMSO)
Treatment: Assay 2 (Preincubation test): 1 hour + ca. 72 hours
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Assay 2	Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]	Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]				
				TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
	Without S9 mix	Phosphate buffer	0 (50 µL)	34 ± 5	113 ± 10	17 ± 9	12 ± 2	32 ± 2
		DMSO	0 (50 µL)	26 ± 8	123 ± 7	16 ± 3	10 ± 7	21 ± 2
		impurity A*	0.10	31 ± 7	121 ± 17	15 ± 1	9 ± 5	27 ± 5
		impurity A*	0.25	40 ± 7	133 ± 21	16 ± 6	9 ± 4	25 ± 3
		impurity A*	0.50	35 ± 2	125 ± 13	16 ± 2	8 ± 3	30 ± 8
		impurity A*	1.00	33 ± 9	135 ± 12	18 ± 3	8 ± 3	24 ± 1
		impurity A*	2.50	27 ± 5	119 ± 3	18 ± 4	7 ± 2	28 ± 3
		impurity A*	5.00	28 ± 2	118 ± 23	16 ± 7	9 ± 2	31 ± 5
		9-Acridinamine	35 µg	--	--	352 ± 53	--	-
		9-Acridinamine	40 µg	--	--	489 ± 423	--	--
		2-Nitro-9H-fluorene	10 µg	--	--	--	669 ± 120	533 ± 68
		Sodium azide	5 µg	462 ± 7	656 ± 32	--	--	--

-- : not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 17 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 AM72

Report No.: AM72 **Study No.:** TX-259; Project 530800 **Location** Section: 4.2.3.7.6.4
Test Article: impurity A*
Report Title: Evaluation of Report: Chromosome aberration assay in human lymphocytes in vitro with impurity A*; Project 530800
 Prepared by [REDACTED], Germany, [REDACTED]

Test for Induction of: Chromosomal aberrations **No. of Independent Assays:** 2 **GLP Compliance:** Yes
Cells: Human lymphocytes **No. of Replicate Cultures:** 2
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Cells Analyzed/Culture:** 100 **Date of Treatment:** [REDACTED]
Vehicles: For Test Article: Culture medium For Positive Controls: Culture medium
Treatment: Continuous treatment for 22 hours or 46 hours without S9 mix; pulse treatment for 4 hours + 18 hours or 42 hours recovery time with S9 mix
Cytotoxic Effects: Slight cytotoxicity in the assay without S9 mix (first harvesting time)
Genotoxic Effects: None

Metabolic Activation	Treatment period	Test Article	Concentration [µg/mL]	Cytotoxicity ^{a, b}	Polyloid Cells [%] ^{b, c}	Aberrant Cells [%] ^b
Assay without S9 mix	22 hours	Culture medium	0	100.0	0.0	0.0
		impurity A*	500.0	103.6	0.0	0.5
		impurity A*	2500.0	84.2	0.5	0.5
		impurity A*	5000.0	64.7	0.5	1.0
	46 hours	Ethylmethane sulfonate	440.0	42.8	0.0	12.5**
		Culture medium	0	100.0	0.0	2.5
		impurity A*	5000.0	84.0	0.5	2.0

^a Based on mitotic indices (% of control)^b Mean value of 2 replicate cultures^c Including endomitosis

** : Chi-square test: p < 0.01, compared to the concurrent solvent control

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 19 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 AL58

Report No.: AL58 **Study No.:** TX-277 **Location** Section: 4.2.3.7.6.5
Test Article: impurity B*
Report Title: Evaluation of impurity B* in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test
Test for Induction of: Reverse mutations in bacteria **No. of Independent Assays:** 2 **GLP Compliance:** Yes
Strains: *S. typhimurium*, TA1535, TA1537, TA98, TA100 and TA 1538 **No. of Replicate Plates:** 3
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Analyzed Cells /Culture:** -- **Date of Treatment:** [REDACTED]
Vehicles: For Test Article: Phosphate buffer For Positive Controls: Phosphate buffer, dimethyl sulfoxide (DMSO)
Treatment: Assay 1 (Direct plate incorporation test): ca. 72 hours
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Assay 1	Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]	Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]				
				TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
Without S9 mix		Phosphate buffer	0 (50 µL)	34 ± 8	106 ± 11	10 ± 1	9 ± 4	37 ± 4
		DMSO	0 (50 µL)	36 ± 10	110 ± 9	10 ± 3	8 ± 2	28 ± 8
		impurity B*	0.10	36 ± 8	105 ± 6	9 ± 1	8 ± 1	31 ± 2
		impurity B*	0.25	32 ± 4	110 ± 8	15 ± 1	12 ± 4	29 ± 7
		impurity B*	0.50	38 ± 6	113 ± 13	11 ± 6	9 ± 4	25 ± 3
		impurity B*	1.00	28 ± 5	113 ± 6	10 ± 1	9 ± 2	37 ± 4
		impurity B*	2.50	26 ± 1	114 ± 6	11 ± 3	9 ± 5	36 ± 8
		impurity B*	5.00	29 ± 8	111 ± 4	10 ± 3	10 ± 2	30 ± 7
		9-Acridinamine	100 µg	--	--	771 ± 63	--	--
		2-Nitro-9H-fluorene	10 µg	--	--	--	640 ± 86	517 ± 27
Sodium azide	5 µg	511 ± 12	626 ± 16	--	--	--		

-- : not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 20 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 AL58 (続き)

Report No.: AL58 **Study No.:** TX-277 **Location** Section: 4.2.3.7.6.5
Test Article: impurity B*
Report Title: Evaluation of impurity B* in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test

Assay 1	Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]	Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]				
				TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
With S9 mix		Phosphate buffer	0 (50 µL)	14 ± 3	85 ± 4	12 ± 3	19 ± 5	32 ± 5
		DMSO	0 (50 µL)	17 ± 5	78 ± 15	10 ± 2	15 ± 3	42 ± 6
		impurity B*	0.10	17 ± 2	92 ± 7	14 ± 1	16 ± 1	28 ± 7
		impurity B*	0.25	14 ± 3	84 ± 3	20 ± 1	16 ± 4	35 ± 3
		impurity B*	0.50	17 ± 7	84 ± 6	10 ± 2	20 ± 5	35 ± 8
		impurity B*	1.00	17 ± 2	95 ± 10	9 ± 1	17 ± 1	34 ± 9
		impurity B*	2.50	13 ± 5	80 ± 8	15 ± 4	11 ± 6	37 ± 3
		impurity B*	5.00	14 ± 2	81 ± 7	13 ± 1	13 ± 3	34 ± 4
		Anthracen-2-amine	2 µg	56 ± 7	510 ± 66	37 ± 6	278 ± 47	304 ± 28
		Cyclophosphamide	400 µg	201 ± 39	--	--	--	--
Benzo[a]pyrene	10 µg	--	191 ± 9	50 ± 3	48 ± 3	180 ± 17		

-- : not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 21 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 AM21

Report No.: AM21 **Study No.:** TX-278 **Location** Section: 4.2.3.7.6.6
Test Article: impurity B*
Report Title: Evaluation of impurity B* in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test with preincubation

Test for Induction of: Reverse mutations in bacteria **No. of Independent Assays:** 1 **GLP Compliance:** Yes
Strains: S. typhimurium, TA1535, TA100, TA1537, TA1538 and TA98 **No. of Replicate Plates:** 3
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Analyzed Cells / Culture:** -- **Date of Treatment:** [REDACTED]
Vehicles: For Test Article: Phosphate buffer For Positive Controls: Phosphate buffer, dimethyl sulfoxide (DMSO)
Treatment: Assay 2 (Preincubation test): 1 hour + ca. 72 hours
Cytotoxic Effects: None
Genotoxic Effects: None

Assay 2	Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]	Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]				
				TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
S9 mix	Without	Phosphate buffer	0 (50 µL)	38 ± 4	118 ± 6	16 ± 7	11 ± 4	28 ± 4
		DMSO	0 (50 µL)	40 ± 8	114 ± 25	10 ± 2	8 ± 2	34 ± 5
	S9 mix	impurity B*	0.10	39 ± 7	131 ± 7	15 ± 4	6 ± 3	36 ± 3
		impurity B*	0.25	36 ± 4	121 ± 14	13 ± 3	13 ± 3	34 ± 7
		impurity B*	0.50	35 ± 4	126 ± 6	15 ± 4	9 ± 2	35 ± 8
		impurity B*	1.00	40 ± 3	125 ± 6	14 ± 1	10 ± 3	32 ± 7
		impurity B*	2.50	33 ± 7	137 ± 8	12 ± 4	11 ± 6	29 ± 1
		impurity B*	5.00	47 ± 7	114 ± 8	14 ± 6	6 ± 2	27 ± 7
		9-Acridinamine	35 µg	--	--	187 ± 62	--	--
		2-Nitro-9H-fluorene	10 µg	--	--	--	1062 ± 37	836 ± 49
Sodium azide	5 µg	517 ± 34	664 ± 13	--	--	--		

-- : not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 22 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 AM21 (続き)

Report No.: AM21 **Study No.:** TX-278 **Location** Section: 4.2.3.7.6.6
Test Article: impurity B*
Report Title: Evaluation of impurity B* in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test with preincubation

Assay 2	Metabolic Activation	Test Article	Concentration [mg/plate]	Revertant Colony Counts [Mean ± S.D.]				
				TA1535	TA100	TA1537	TA1538	TA98
With S9 mix		Phosphate buffer	0 (50 µL)	18 ± 2	115 ± 8	21 ± 1	14 ± 6	35 ± 6
		DMSO	0 (50 µL)	14 ± 4	111 ± 5	18 ± 8	21 ± 3	22 ± 10
		impurity B*	0.10	17 ± 7	105 ± 6	22 ± 1	14 ± 3	36 ± 3
		impurity B*	0.25	16 ± 5	121 ± 6	21 ± 1	15 ± 3	30 ± 7
		impurity B*	0.50	15 ± 2	108 ± 9	18 ± 5	19 ± 2	31 ± 5
		impurity B*	1.00	15 ± 8	116 ± 11	18 ± 4	15 ± 5	33 ± 3
		impurity B*	2.50	15 ± 3	114 ± 9	21 ± 2	15 ± 3	25 ± 4
		impurity B*	5.00	18 ± 2	109 ± 7	20 ± 5	23 ± 6	31 ± 3
		N-Nitrosodimethylamine	5 µL	--	856 ± 50	--	--	--
		Anthracen-2-amine	5 µg	62 ± 6	406 ± 25	61 ± 5	638 ± 41	651 ± 23
		Cyclophosphamide	400 µg	530 ± 13	--	--	--	--
		Benzo[a]pyrene	5 or 10 µg	--	--	94 ± 7	61 ± 11	131 ± 15

-- : not evaluated

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 23 of 24

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 AM73

Report No.: AM73 **Study No.:** TX-276; [REDACTED] Project 530900 **Location** Section: 4.2.3.7.6.7
Test Article: impurity B*
Report Title: Evaluation of the report: Chromosome aberration assay in human lymphocytes in vitro with impurity B*; [REDACTED] Project 530900
 Prepared by [REDACTED], Germany, [REDACTED]

Test for Induction of: Chromosomal aberrations **No. of Independent Assays:** 2 **GLP Compliance:** Yes
Cells: Human lymphocytes **No. of Replicate Cultures:** 2
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9 **No. of Cells Analyzed/Culture:** 100 **Date of Treatment:** [REDACTED]
Vehicles: For Test Article: Culture medium For Positive Controls: Culture medium
Treatment: Continuous treatment for 22 hours or 46 hours without S9 mix;
 pulse treatment for 4 hours + 18 hours or 42 hours recovery time with S9 mix
Cytotoxic Effects: Yes (only first harvesting time without S9 mix)
Genotoxic Effects: None

Metabolic Activation	Treatment period	Test Article	Concentration [µg/mL]	Cytotoxicity ^{a, b}	Polyploid Cells [%] ^{b, c}	Aberrant Cells [%] ^b
Assay without S9 mix	22 hours	Culture medium	0	100.0	0.0	1.0
		impurity B*	500.0	77.6	0.0	2.5
		impurity B*	2500.0	71.0	0.0	0.5
		impurity B*	5000.0	57.7	0.0	3.0
	46 hours	Ethylmethane sulfonate	440.0	20.8	0.0	13.0**
		Culture medium	0	100.0	0.5	0.0
		impurity B*	5000.0	120.7	0.0	1.0

^a Based on mitotic indices (% of control)^b Mean value of 2 replicate cultures^c Including endomitosis** Chi-square test: $p < 0.01$, compared to the concurrent solvent control

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 2

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 9823

Report No.:	9823	Study No.:	TX ■■■.173	Location	Section:	4.2.3.3.2.1
Test Article:	Gadobutrol					
Report Title:	Studies on the mutagenic potential of SH L 562 A in the mouse micronucleus test					
Test for Induction of:	Micronucleus	Treatment Scheduled:	Single dose	GLP Compliance:	Yes	
Species/Strain:	Mouse/NMRI	Sampling Time:	24, 48 and 72 hours after treatment			
Age:	9-10 weeks	Method of Administration:	intravenous, 0.2 mL/min	Date of Dosing:	■■■■■	
Cells Evaluated:	Polychromatic and Normochromatic erythrocytes in bone marrow	Vehicle/Formulation:	0.9 % (w/v) NaCl solution			
No. of Cells Analyzed/Animal:	2000 polychromatic erythrocytes (PCE), 1000 normochromatic erythrocytes (NCE)					
Special Features:	None					
Toxic/Cytotoxic Effects:	None					
Genotoxic Effects:	None					
Evidence of Exposure:	Intravenous administration					

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 2

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 9823 (続き)

Report No.: 9823 **Study No.:** TX ■.173 **Location Section:** 4.2.3.3.2.1
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Studies on the mutagenic potential of SH L 562 A in the mouse micronucleus test

Test Article	Dose [mmol/kg]	Route of administration	Sampling time [hours]	No. of Animals	MPCE(%) [Mean ± S.D.]	MNCE(%) [Mean ± S.D.]	PCE/NCE Ratio [Mean ± S.D.]
Vehicle control	0 (16 mL/kg)	intravenous	24	5M/5F	0.95 ± 0.28	0.80 ± 0.42	1.10 ± 0.08
Gadobutrol	2	intravenous	24	5M/5F	1.15 ± 0.67	0.60 ± 0.70	1.10 ± 0.07
	4	intravenous	24	5M/5F	0.95 ± 0.44	1.10 ± 0.57	1.12 ± 0.05
	8	intravenous	24	5M/5F	0.95 ± 0.44	0.90 ± 0.74	1.13 ± 0.06
Vehicle control	0 (16 mL/kg)	intravenous	48	5M/5F	0.75 ± 0.42	0.60 ± 0.97	1.10 ± 0.03
Gadobutrol	2	intravenous	48	5M/5F	1.11 ± 0.49	0.67 ± 0.50	1.10 ± 0.05
	4	intravenous	48	5M/5F	1.00 ± 0.33	0.60 ± 0.52	1.09 ± 0.06
	8	intravenous	48	5M/5F	0.90 ± 0.21	0.80 ± 0.63	1.10 ± 0.05
Vehicle control	0 (16 mL/kg)	intravenous	72	5M/5F	0.95 ± 0.37	1.00 ± 0.67	1.08 ± 0.06
Gadobutrol	2	intravenous	72	5M/5F	1.10 ± 0.46	0.50 ± 0.71	1.08 ± 0.05
	4	intravenous	72	5M/5F	0.85 ± 0.34	0.70 ± 0.48	1.08 ± 0.04
	8	intravenous	72	5M/5F	0.80 ± 0.26	0.70 ± 0.67	1.12 ± 0.06
Triaziquone (positive control)	0.15 mg/kg	intraperitoneal	24	5M/5F	12.15* ± 1.47	0.60 ± 0.52	0.83* ± 0.03

MPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes

MNCE: micronucleated normochromatic erythrocytes

* p < 0.05, ANOVA for each variable independently, values of MPCE and MNCE were arcsin-transformed

SH L 562 A (0.5 mol/L Gadobutrol)

2.6.7.10 がん原性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 1

2.6.7.10 がん原性試験

Not performed

2.6.7.11 生殖発生毒性試験 : 重要な試験以外の試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 1

2.6.7.11 生殖発生毒性試験 : 重要な試験以外の試験

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dosing Period	Doses [mmol/kg/day]	No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. Study No.	Location Section
Rat/ Wistar	intravenous 1M (SH L562BB)	days 6 to 17 of gestation	0, 5.0, 7.5, 10.0	8F	5.0-7.5 mmol/kg : no noteworthy findings 10.0 mmol/kg : slight decrease of body weight gain and food consumption in dam but no noteworthy findings in fetus	A30997 TXST-0329	4.2.3.5.2.1
Rabbit/ NZW	intravenous 1M (SH L562BB)	days 6 to 18 of gestation	0, 5.0, 7.5, 10.0	8F	5.0-10.0 mmol/kg : decrease of body weight gain and body weight, non-dose dependent decrease of food consumption in dam 7.5 - 10.0 mmol/kg : non-dose dependent decrease of fetal body weight	A32272 TXST-0068	4.2.3.5.2.4
Rabbit/ NZW	intravenous 0.5M (SH L562A)	days 6 to 18 of gestation	0, 2.5, 5.0	7F	2.5 mmol/kg : no noteworthy findings 5.0 mmol/kg : marginal embryo-lethal effect	9927 TX-281	4.2.3.5.2.6
Rat/ Wistar	intravenous 1M (SH L562BB)	day 6 of gestation to day 21 of post parturition	5.0, 7.5, 10.0	5F	5.0 -10.0 mmol/kg : dosing intermittently not feasible for single days around the time of parturition. 7.5 mmol/kg : 1/5 maternal rat died after 7 th administration with severe clinical symptoms. 10.0 mmol/kg : 2/5 maternal rats sacrificed shortly after parturition due to local intolerability (wound and blue discoloration around injection site). Marginally increased prenatal loss and marginally decreased birth index (final evaluation was not possible since only 4 litters were available).	PH-35165 T-076743	4.2.3.5.3.1

2.6.7.12 生殖発生毒性試験 : 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 8

2.6.7.12 生殖発生毒性試験 : 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 A39049

Report No.: A39049 **Study No.:** TXST-0103 **Location** Section: 4.2.3.5.1.1
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol (SH L562BB) Study of fertility and early embryonic development to implantation in the rat after daily intravenous (i.v.) administration
Design similar to ICH 4.1.3?: Yes **Duration of Dosing:** M; 4 weeks pre mating – post mating period **F;** 2 weeks pre mating – 7 days of post coitus
Species/Strain: Rat/ Wistar **Day of Mating:** Day 0 **Vehicle/Formulation:** Aqueous Solution
Initial Age: Sexual matured at first dosing **Day of C-Section:** G21 **GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: **Method of Administration:** intravenous
Special Features: Determination of kidney weights in male and female F₀-animals
No Observed Adverse Effect Level: F₀ Males: Systemic & Reproductive tox.; 7.5 mmol/kg/day F₀ Females Systemic tox.; 2.2 mmol/kg/day Reproductive tox.; 7.5 mmol/kg/day F₁ Litters: Not applicable (effect on fetus was not assessed)

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	0.6	2.2	7.5
F₀ Males				
Toxicokinetics				
AUC(0-24) (μmol · h/L)		1126	3131	15218
	- Day 1	1414	5455	16688
	- Day 22	1404	6562	19013
	- Day 43			
No. Evaluated	20	20	20	20
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations				
- general symptoms related to treatment	-	-	-	-
- local finding at injection site	+ ^a	++ ^a	+++ ^a	+++ ^a
Body Weight (%^b)	334.4 g	+2	+4	±0

a Findings occurred; ++: mild reaction with increased incidence compared to control (+), +++ : reaction was clear. Local findings : skin discoloration, injuries or scab formation, - :no noteworthy finding

b At day 44 of the dosing (the week of last dosing). For control, group mean are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not based on the percent difference).

2.6.7.12 生殖発生毒性試験 : 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 4 of 8

2.6.7.12 生殖発生毒性試験 : 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 A39049 (続き)

Report No.: A39049**Study No.:** TXST-0103**Location Section:** 4.2.3.5.1.1**Test Article:** Gadobutrol**Report Title:** Gadobutrol (SH L562BB) Study of fertility and early embryonic development to implantation in the rat after daily intravenous (i.v.) administration

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	0.6	2.2	7.5
F₀ Females (continued)				
No. Days Prior to Mating (median)	2	2	3	2
No. of Females Sperm Positive	20	19	20	18
No. of Pregnant Females	20	19	20	18
No. Aborted or with Total Resorption of Litter/ Premature Delivery	0	1	0	0
Mean No. Corpora Lutea	12.45	13.50	13.05	12.61
Mean No. Implantations	10.85	11.78	12.11	11.39
Mean % Preimplantation Loss	12.85	12.76	7.26	9.69
Mean No. Live Conceptuses	10.95	11.82	11.47	10.72
Mean % Postimplantation Loss	4.15	5.19	5.22	5.85

2.6.7.12 生殖発生毒性試験 : 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 5 of 8

2.6.7.12 生殖発生毒性試験 : 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 SG/124

Report No.: SG/124 **Study No.:** ■002 **Location** Section: 4.2.3.5.1.2
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Reproductive and Developmental Toxicity Study of SH L562A in Rats after Administration from Pre-gestation through Early Gestation (Segment I)
Design similar to ICH 4.1.1?: Yes **Duration of Dosing** M: -60 days pre-mating – end of mating period F: -14 days pre-mating - 7 days post coitus
Species/ Strain: Rat/ Jcl: SD **Day of Mating:** day 0 **Vehicle/Formulation:** Aqua solution
Initial Age: 6-9 weeks **Day of Cesarean section:** day 21 of gestation
Date of First Dose: ■■■■■ **Method of Administration:** intravenous **GLP compliance:** Yes
Special Features: -
No Observed Adverse Effect Level: **F₀ Males:** Systemic toxicity and Reproductive performance: 2.5 mmol/kg/day **F₀ Females:** Systemic toxicity and Reproductive performance: 2.5 mmol/kg/day **F₁ Fetus:** 2.5 mmol/kg/day

Daily Dose (mmol/kg)	0 (Control)	0.25	0.75	2.5
F₀ Males				
Toxicokinetics:	Not applicable			
No. Evaluated	22	22	22	22
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1 ^a
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight (%^b)	462 g	+1	±0	±0
Food Consumption (%^c)	28 g/day	±0	+4	-4

^a Highly suspected treatment-unrelated death due to some renal dysfunction, - : no noteworthy finding

^b At week 8 of the dosing (the week of last dosing). For control, group mean is shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not based on the percent difference).

^c For control, group mean in last treatment week is shown. For treated groups, percent differences from controls are shown, Statistical significance is based on actual data (not based on the percent difference).

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A34150

Report No.: A34150 **Study No.:** TXST-0144 **Location Section:** 4.2.3.5.2.2

Test Article: Gadobutrol**Report Title:** Gadobutrol (SH L562BB)

Study for effects on embryo-fetal development in rats after daily intravenous administration from days 6 to 17 of gestation

Design similar to ICH 4.1.3?: Yes **Duration of Dosing:** G6-G17 **Vehicle/Formulation:** Aqueous Solution
Species/Strain: Rat/ Wistar **Day of Mating:** Day 0
Initial Age: > 10 weeks at G0 **Day of C-Section:** G21 **GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: XXXXXXXXXX **Method of Administration:** intravenous
Special Features: Histological examination of fetal livers with macroscopic findings
No Observed Adverse Effect Level: F₀ Females: Systemic tox: 5.0 mmol/kg/day F₁ Litters: 5.0 mmol/kg/day
 Reproductive tox: 7.5 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	5.0	7.5	10.0
Dams				
Toxicokinetics				
AUC _(0-24h) [mmol/L·h]	G6	9.02	12.5	17.4
	G17	9.82	17.3	24.9
No. Females inseminated	20	20	20	20
No. Pregnant	19	19	20	19
No. Died or Sacrificed Moribund (no. non-pregnant)	1 (1) ^a	0	0	2 (1) ^b
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	1	0	0	0
Clinical Observations:				
- Severe clinical signs ^c	-	-	+	+
- Signs of local intolerance	-	-	+	+
- Scabs at injection site (as necropsy finding)	-	-	+	+

^a One non-pregnant animal found dead on day 8 of gestation, without any clinical signs. Thus, cause of death could not be assessed.

^b Two died animals including one animal of the main and one animal of the satellite collective, G : gestation, - : no noteworthy finding, + : observed or observed more frequently than control

^c Severe clinical signs including sporadic apathy, vocalization, seizures clonic-tonic, prone/lateral position, tremor, respiration accelerated/distress

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A34150 (続き)

Report No.: A34150 **Study No.:** TXST-0144 **Location Section:** 4.2.3.5.2.2
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol (SH L562BB)
 Study for effects on embryo-fetal development in rats after daily intravenous administration from days 6 to 17 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	5.0	7.5	10.0
Dams (continued)				
Body Weight (%) ^d	254.3 g	+0.9	-0.6	-4.0
Food Consumption (%) ^e	20.4 g/day	±0	-3.4	-15.2**
Mean No. Corpora Lutea	12.39	12.32	13.20	12.05
Mean No. of Implantations	11.72	11.11	11.95	10.84
Mean % Preimplantation Loss (per group)	5.38	9.83	9.47	10.04
Litters				
No. Litters Evaluated	18	19	20	19
Mean No. Live Fetuses	10.94	10.42	11.20	10.11
Mean No. Resorptions	0.78	0.68	0.75	0.74
No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss (per group)	6.64	6.16	6.28	6.80
Mean Fetal Body Weight (g)	5.181	5.254	5.013	4.980
Fetal Sex Ratios (% males)	50.25	52.53	50.45	46.88

^d At the end of dosage period (Day 17 of gestation). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

^e The food consumption for the dosage period is given (Days 6 to 17 of gestation). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance (** : p<0.01, Dunnett Test) is based on actual data (not on the percent differences).

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 4 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A34150 (続き)

Report No.: A34150 **Study No.:** TXST-0144 **Location Section:** 4.2.3.5.2.2
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol (SH L562BB)
 Study for effects on embryo-fetal development in rats after daily intravenous administration from days 6 to 17 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	5.0	7.5	10.0
Litter (continued)				
Skeletal Malformations:				
- Fused os zygomaticum	2 (2.02) / 2 (11.11)	1 (1.02) / 1 (5.56)	1 (0.88) / 1 (5.00)	0 (0) / 0 (0)
Skeletal Variations:				
- Unossified proximal phalanges (toes, right)	49 (49.49) / 13 (72.22)	55 (56.12) / 15 (83.33)	71 (62.83) / 19 (95.00)	79 (82.29)** / 19 (100)
- Unossified proximal phalanges (toes, left)	43 (43.43) / 14 (77.78)	55 (56.12) / 15 (83.33)	68 (60.18)* / 19 (95.00)	78 (81.25)** / 19 (100)
- Unossified proximal phalanges (digits, right)	12 (12.12) / 8 (44.44)	19 (19.39) / 8 (44.44)	31 (27.43)* / 14 (70.00)	34 (35.42)** / 16 (84.21)
- Unossified proximal phalanges (digits, left)	13 (13.13) / 8 (44.44)	23 (23.47) / 8 (44.44)	34 (30.09)** / 14 (70.00)	40 (41.67)** / 15 (78.95)
- Wavy ribs (both)	2 (2.02) / 2 (11.11)	7 (7.14) / 4 (22.22)	14 (12.39)** / 7 (35.00)	16 (16.67)** / 9 (47.37)
- Wavy ribs (right)	2 (2.02) / 2 (11.11)	1 (1.02) / 1 (5.56)	8 (7.08) / 6 (30.00)	11 (11.46)* / 6 (31.58)
- Rib variations	70 (70.71) / 18 (100)	72 (73.47) / 18 (100)	98 (86.73)* / 20 (100)	79 (82.29) / 19 (100)
- Skull bone variations	35 (35.35) / 14 (77.78)	33 (33.67) / 15 (83.33)	40 (35.40) / 16 (80.00)	51 (53.13)* / 15 (78.95)
- Incompletely ossified mandibles	20 (20.20) / 9 (50.00)	23 (23.47) / 11 (61.11)	24 (21.24) / 13 (65.00)	35 (36.46)* / 15 (78.95)
- Incompletely ossified zygomatic bones	0 (0) / 0 (0)	7 (7.14)* / 4 (22.22)	5 (4.42) / 5 (25.00)	8 (8.33)** / 5 (26.32)
- Ossified calcaneus	57 (57.58) / 15 (83.33)	54 (55.10) / 16 (88.89)	58 (51.33) / 16 (80.00)	31 (32.29)** / 11 (57.89)
Total Affected Fetuses (Litters)				
Malformations	3 (3)	5 (4)	6 (3)	7 (6)
Variations	111 (18)	109 (18)	133 (20)	114 (19)

* : p < 0.05, ** : p < 0.01 Dunnett Test

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 5 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A576

Report No.: A576 **Study No.:** TX ■■■310 **Location Section:** 4.2.3.5.2.3
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol: Embryotoxicity including teratogenicity study in the rat after daily intravenous administration from day 6 to 15 of gestation
Design similar to ICH 4.1.3?: Yes **Duration of Dosing:** G6-G15 **Vehicle/Formulation:** Aqueous Solution
Species/Strain: Rat/ Wistar **Day of Mating:** Day 0
Initial Age: > 12 weeks on G0 **Day of C-Section:** G21 **GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: ■■■■■ **Method of Administration:** intravenous
Special Features: In each study group a lactation subgroup was included, sexual mature F₁-rats were mated and the pregnant F₁-females were sacrificed on day 21 of gestation and examined as well as the F₂-fetuses.
No Observed Adverse Effect Level: F₀ Females: Systemic tox.: 5.0 mmol/kg/day F₁ Litters: 1.5 mmol/kg/day F₂ Litters: 5.0 mmol/kg/day
Reproductive tox.: 1.5 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)		0.5		1.5		5.0	
Dams/Does								
F ₀ Female Subgroups ^a	Section	Lactation	Section	Lactation	Section	Lactation	Section	Lactation
No. Females inseminated	24	12	24	12	24	12	24	12
No. Pregnant	21	11	21	12	23	11	21	11
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	1	0	0	0	1	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (% ^b)		264 g		-2		0		-2
Mean No. Corpora Lutea	13.8	n. e.	13.2	n. e.	13.9	n. e.	14.0	n. e.
Mean No. of Implantations	11.9	n. e.	11.1	n. e.	11.1	n. e.	10.6	n. e.
Mean % Preimplantation Loss (per group)	13.8	n. e.	16.2	n. e.	20.1	n. e.	24.1	n. e.
Findings during Lactation	n. e.	-	n. e.	-	n. e.	-	n. e.	-
Postnatal findings of F ₁ -Pups	n. e.	-	n. e.	-	n. e.	-	n. e.	-

a The animals of the section-subgroups were sacrificed on day 21 of gestation. The females of the lactation subgroups were allowed to deliver and were sacrificed after weaning.

b At end of dosage period (Day 15 of gestation). For controls, study group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

- : no noteworthy findings n.e. : not evaluated G : Gestation

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 7 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A576 (続き)

Report No.: A576 **Study No.:** TX ■.310 **Location Section:** 4.2.3.5.2.3
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol: Embryotoxicity including teratogenicity study in the rat after daily intravenous administration from day 6 to 15 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)		0.5		1.5		5.0	
Litters								
	F₁-Fetuses	F₂-Fetuses	F₁-Fetuses	F₂-Fetuses	F₁-Fetuses	F₂-Fetuses	F₁-Fetuses	F₂-Fetuses
No. Litters Evaluated	21	24	20	22	23	23	20	24
No. Live Fetuses total	243	303	223	277	246	248	203	289
Mean No. Live Fetuses	11.6	12.6	10.6	12.6	10.7	10.8	9.6 ^a	12.0
Mean No. Resorptions	0.3	0.9	0.5	0.6	0.4	1.0	1.0	0.8
No. Dead Fetuses	0	0	0	0	0	1	2	0
Mean % Postimplantation Loss (per group)	2.8	6.5	4.3	4.5	3.5	8.8	9.9*	5.9
Mean Fetal Body Weight (g)	4.9	4.8	5.0	4.9	5.2	4.8	5.1	4.8
Fetal Sex Ratios (% Males)	51.9	51.5	50.7	49.8	57.3	49.2	51.2	48.1

^a The slightly decreased mean number of F₁-fetuses per litter is suspected to be compound-related.

* : p<0.05, Chi-Square Test The slightly increased postimplantation loss is suspected to be compound-related.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 8 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A576 (続き)

Report No.: A576 **Study No.:** TX ■.310 **Location Section:** 4.2.3.5.2.3
Test Article: Gadobutro
Report Title: Gadobutrol: Embryotoxicity including teratogenicity study in the rat after daily intravenous administration from day 6 to 15 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	0.5	1.5	5.0
----------------------	-------------	-----	-----	-----

Litters (continued)**Fetal Anomalies^a**

	F ₁ -Fetuses	F ₂ -Fetuses						
Gross External Malformations								
Severe edema of whole body								
No. Fetuses (%)	0	0	1 (0.4)	0	0	0	0	0
No. Litters (%)	0	0	1 (5.0)	0	0	0	0	0
Umbilical Hernia								
No. Fetuses (%)	0	1 (0.3)	0	0	0	0	0	0
No. Litters (%)	0	1 (4.2)	0	0	0	0	0	0
Gross External Variations								
	-	-	-	-	-	-	-	-
Visceral Malformations								
	0	0	0	0	0	0	0	0
Visceral Variations								
	-	-	-	-	-	-	-	-

^a All malformations are mentioned, thus they were not considered to be compound-related. Variations are mentioned if they are suspected to be compound-related.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 9 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A576 (続き)

Report No.: A576 **Study No.:** TX ■.310 **Location** Section: 4.2.3.5.2.3
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol: Embryotoxicity including teratogenicity study in the rat after daily intravenous administration from day 6 to 15 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	0.5	1.5	5.0				
Fetal Anomalies^a (continued)								
	F₁-Fetuses	F₂-Fetuses	F₁-Fetuses	F₂-Fetuses	F₁-Fetuses	F₂-Fetuses	F₁-Fetuses	F₂-Fetuses
Skeletal Malformations								
Fused ribs								
No. Fetuses (%)	1 (0.8)	0	0	0	0	0	0	1 (0.7)
No. Litters (%)	1 (4.8)	0	0	0	0	0	0	1 (4.2)
Skeletal Variations								
Frontal bones not completely ossified								
No. Fetuses (%)	12 (9.8)	-	10 (9.1)	-	8 (6.5)	-	28 (27.7)*	-
No. Litters (%)	7 (33.3)	-	5 (25)	-	8 (34.8)	-	15 (75.0)*	-
Total Affected Fetuses (Litters)								
Malformations	1 (1)	0	0	0	0	0	0	1 (1)
Anomalies/Variations	12 (7)	-	10 (5)	-	8 (8)	-	28 (15)	-

a All malformations are mentioned, thus they were not considered to be compound-related. Variations are mentioned if they are suspected to be compound-related.

- no noteworthy findings

* : p<0.05, Chi-Square Test. The marginally retarded ossification of the frontal bones of F1-fetuses in the high dose group is suspected to be compound-related.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 10 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A36661

Report No.: A36661 **Study No.:** TXST-0242 **Location** Section: 4.2.3.5.2.5
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol (SH L562BB)

Study for effects on embryo-fetal development in rabbits after daily intravenous administration from day 6 to day 18 of gestation

Design similar to ICH 4.1.3?: Yes **Duration of Dosing:** G6 - G18 **Vehicle/Formulation:** Aqueous solution
Species/Strain: Rabbit / NZW **Day of Mating:** Day 0
Initial Age: 14-17 weeks **Day of C-Section:** G28 **GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: **Method of Administration:** intravenous
Special Features: Weighing of kidneys in dams
No Observed Adverse Effect Level: F₀ Females: Systemic tox.: 5.0 mmol/kg/day F₁ Litters: <2.5 mmol/kg/day
 Reproductive tox.: 5.0 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	2.5	5.0	10.0
Dams/Does				
Toxicokinetics				
AUC(0-24) (mmol · h/L)	G6	15.3	26.0	53.3
	G18	12.9	27.7	86.5
No. Females inseminated	20	20	20	20
No. Pregnant	20	20	20	19
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	1 ^a	4
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	1 ^a	0	5
Clinical Observations (no. of animals)				
- Reduced defecation	1	5 ^a	3 ^a	14
- No defecation	0	1 ^a	1 ^a	8
- Apathy, Seizures clonic, Opisthonus, Tremor ^b	0	0	0	1
- Prone-lateral of supine position ^b	0	0	0	2

a Considered not treatment related.

b Findings were confined to an animal found dead and an animal which was sacrificed moribund

G: gestation,

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 11 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A36661 (続き)

Report No.: A36661**Study No.:** TXST 0242**Location Section:** 4.2.3.5.2.5**Test Article:** Gadobutrol**Report Title:** Gadobutrol (SH L562BB)

Study for effects on embryo-fetal development in rabbits after daily intravenous administration from day 6 to day 18 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	2.5	5.0	10.0
Dams (continued)				
Clinical Observations (no. of animals) (continued)				
- Seizures clonic-tonic ^b	0	0	0	2
- Respiration accelerated, Rhinorrhea, Stained vaginal discharge ^b	0	0	0	1
- Scab formation	0	0	3	1
- Scab removed skin healing up	0	0	0	1
- Discoloration of skin	0	0	0	2
Necropsy Observations (n):				
- Pale kidneys	0	1	1	9
- Enlarged kidneys	0	0	0	1
Kidney weight (absolute, g)	16.58	16.85	19.54**	24.12**
Body Weight (%)^c	3995.50g	-2	+4	-1
Food Consumption (%)^d	160.2g	-6	±0	-25**
Mean No. Corpora Lutea	10.8	11.05	12.11	9.58
Mean No. of Implantations	9.85	10.00	10.74	8.00
Mean. % Preimplantation Loss (group)	8.80	9.50	11.30	16.52

^c After 13 days of dosing (gestation day 6 to 18). For controls, group means are shown for gestation day 28. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

^d For controls, group means are shown for the period from gestation days 6 to 18. For treated groups, percent difference from controls are shown.

** : p<0.01, Dunnett Test

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 12 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A36661 (続き)

Report No.: A36661**Study No.:** TXST 0242**Location Section:** 4.2.3.5.2.5**Test Article:** Gadobutrol**Report Title:** Gadobutrol (SH L562BB)

Study for effects on embryo-fetal development in rabbits after daily intravenous administration from day 6 to day 18 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	2.5	5.0	10.0
Litters				
No. Litters Evaluated	20	19	19	11
No. Live Fetuses	188	187	193	87
Mean No. Resorptions	0.4	0.6	0.42	0.75
No. of Litters with Dead Fetuses	1	1	2	0
Mean No. Postimplantation Loss	0.45	0.65	0.58	0.75
Mean Fetal Body Weight (g)(M/F)	36.7/35.3	34.4/34.4	35.4/34.4	36.1/35.1
Fetal Sex Ratios (% males)	50.00	49.73	56.99	64.37
Fetal Anomalies (n)				
Gross External Malformations				
Fetal incidence (litter incidence)				
- Gastroschisis	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
Gross External Variations				
Fetal incidence (litter incidence)	-	-	-	-
Visceral Malformations				
Fetal incidence (litter incidence)				
- Blood filled inner ear	2 (2)	1(1)	0(0)	2(2)
- Aphakia	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
Visceral Variations				
Fetal incidence (litter incidence)	-	-	-	-

- : no noteworthy finding

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 13 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A36661 (続き)

Report No.: A36661**Study No.:** TXST 0242**Location Section:** 4.2.3.5.2.5**Test Article:** Gadobutrol**Report Title:** Gadobutrol (SH L562BB)

Study for effects on embryo-fetal development in rabbits after daily intravenous administration from day 6 to day 18 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	2.5	5.0	10.0
Litters (continued)				
Skeletal Malformations				
Fetal incidence (litter incidence)				
- Os interparietale: unossified	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
- Os zygomaticum: fused	1(1)	0(0)	3(2)	0(0)
- Os frontale: fused	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
- Sternumbrae: fused	2(2)	1(1)	0(0)	0(0)
- Rib(s) left: absent	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
- Rib(s) left: fused	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
- Rib(s) left: branched	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
- Lumbar vertebrae general: absent	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
- Thoracal vertebrae general: hemivertebrae	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
- Thoracal vertebral bodies: fused	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)

2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 14 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験 A36661 (続き)

Report No.: A36661**Study No.:** TXST 0242**Location Section:** 4.2.3.5.2.5**Test Article:** Gadobutrol**Report Title:** Gadobutrol (SH L562BB)

Study for effects on embryo-fetal development in rabbits after daily intravenous administration from day 6 to day 18 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	2.5	5.0	10.0
Litters (continued)				
Skeletal Variations				
Fetal incidence (litter incidence)				
- Feet bone variations	69(17)	72(16)	96(18)*	41(10)
- Metacarpale(s) right: unossified	33(8)	32(10)	58(15)*	8(4)
- Sternebrae: incompletely ossified	69(17)	67(19)	94(19)*	46(11)*
- Sternbrae: unossified	38(13)	43(14)	71(16)**	23(7)
- Sternum variations	102(19)	109(19)	151(19)**	63(11)*
- Sacral vert. arches(both): Proc. transverses ossified	166(19)	170(19)	168(18)	68(9)*
- Os pubis: incompletely ossified	22(8)	25(13)	28(12)	27(8)**
- Femur: Epicondylus ossified	46(14)	22(11)**	23(8)**	7(5)**
- O. mebr pelvini variations	30(8)	28(14)	35(13)	31(8)**
- Humerus: Epicondylus ossified	121(18)	120(19)	119(19)	33(9)**
- Humerus: Caput, tuberculum ossified	47(14)	31(10)*	28(11)*	9(3)*
Total skeletal variations (Litters)	188(20)	187(19)	191(19)	86(11)

*: p<0.05, **: p<0.01, Dunnett Test

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 15 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A420

Report No.: A420 **Study No.:** TX-311 **Location** Section: 4.2.3.5.2.7
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol: Embryotoxicity including teratogenicity study in the rabbit after daily intravenous administration from day 6 to 18 of gestation
Design similar to ICH 4.1.3?: Yes **Duration of Dosing:** G6-G18 **Vehicle/Formulation:** Aqueous Solution
Species/Strain: Rabbit/ NZW **Day of Mating:** Day 0
Initial Age: Sexually mature animals **Day of C-Section:** G28 **GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: XXXXXXXXXX **Method of Administration:** intravenous
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: F₀ Females: Systemic tox.: 5.0 mmol/kg/day F₁ Litters: 1.5 mmol/kg/day
Reproductive tox.: 1.5 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	0.5	1.5	5.0
Dams/Does				
No. Females inseminated	22	21	22	22
No. Pregnant	17	18	18	18
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	4	1	3	5 ^a
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight (%) ^b	3828 g	+2	+2	-1
Mean No. Corpora Lutea	10.2	10.8	10.1	10.7
Mean No. of Implantations	8.8	9.2	8.7	9.1
Mean % Preimplantation Loss (per group)	13.8	14.9	14.3	15.5

a The slightly increased incidence of abortions in the high dose group was considered to be possibly treatment-related.

b At end of dosage period (Day 18 of gestation). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

- : no noteworthy findings

G : Gestation day

NZW : New Zealand White

2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 16 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験 A420（続き）

Report No.: A420 **Study No.:** TX ■.311 **Location** Section: 4.2.3.5.2.7
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol: Embryotoxicity including teratogenicity study in the rabbit after daily intravenous administration from day 6 to 18 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	0.5	1.5	5.0
Litters				
No. Litters Evaluated	14	18	15	16
No. Live Fetuses total	132	156	133	141
Mean No. Live Fetuses	7.8	8.7	7.4	7.8
Mean No. Resorptions	1.0	0.5	1.3	1.2
No. Dead Fetuses	1	1	0	0
Mean % Postimplantation Loss (per group)	12	6	14.7	13.5
Mean Fetal Body Weight (g)	35.4	38.8	38.9	37.3
Fetal Sex Ratios (% Males)	56.8	54.5	45.9	54.6
Fetal Anomalies				
Gross External Malformations^a				
Umbilical hernia:				
No. Fetuses (%)	0	1 (0.7)	0	0
No. Litters (%)	0	1 (5.9)	0	0
Spina bifida				
No. Fetuses (%)	0	1 (0.7)	0	0
No. Litters (%)	0	1 (5.9)	0	0
Acaudia				
No. Fetuses (%)	0	0	1 (0.8)	0
No. Litters (%)	0	0	1 (6.7)	0

^a All malformations are mentioned, thus they were not considered to be compound-related. Variations are only mentioned if they are suspected to be compound-related.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 17 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A420 (続き)

Report No.: A420 **Study No.:** TX ■.311 **Location Section:** 4.2.3.5.2.7
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Gadobutrol: Embryotoxicity including teratogenicity study in the rabbit after daily intravenous administration from day 6 to 18 of gestation

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	0.5	1.5	5.0
Litters (continued)				
Fetal Anomalies (continued)				
Gross External Variations	-	-	-	-
Visceral Malformations	0	0	0	0
Visceral Variations	-	-	-	-
Skeletal Malformations^a				
7 th Sternebra				
No. Fetuses (%)	0	1 (0.6)	0	0
No. Litters (%)	0	1 (5.6)	0	0
Vertebral bodies fused				
No. Fetuses (%)	0	0	1 (0.8)	0
No. Litters (%)	0	0	1 (6.7)	0
Skeletal Variations	-	-	-	-
Total Affected Fetuses (Litters)				
Malformations	0	3 (3)	1 (1)	0
Variations	-	-	-	-

^a All malformations are mentioned, thus they were not considered to be compound-related. Variations are only mentioned if they are suspected to be compound-related.

- : no noteworthy findings

2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 18 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験 A894

Report No.: A894 **Study No.:** TX-075 **Location Section:** 4.2.3.5.2.8
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Evaluation of the report entitled: "ZK 135.079 - Embryotoxicity including teratogenicity study in Cynomolgus monkeys after daily intravenous administration from day 20 to day 50 of gestation" of [REDACTED] Deutschland [REDACTED], [REDACTED], dated [REDACTED]. [REDACTED]
Design similar to ICH 4.1.3?: Yes **Duration of Dosing:** G20-G50 **Vehicle/Formulation:** Aqueous Solution
Species/Strain: Monkey/ Cynomolgus **Day of Mating:** Day 0
Initial Age: ≥ 4 Years **Day of C-Section:** G100 ± 1 **GLP Compliance:** Yes
Start of Experimental Phase: [REDACTED] **Method of Administration:** intravenous
Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: F₀ Females: Systemic tox.: 2.5 mmol/kg/day F₁ Litters: 0.75 mmol/kg/day
Reproductive tox.: 0.75 mmol/kg/day

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	0.75	2.5
Dams			
No. Pregnant	12	12	12
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0
No. Aborted or with Total Resorption of Litter	1	0	5 ^a
Clinical Observations	-	-	-
Body Weight (%) ^b	3.0 kg	±0	-17
Litters			
No. Litters Evaluated	10	12	7
No. Live Fetuses total	10	12	7
Mean No. Live Fetuses	1	1	1
No. Dead Fetuses	1	0	0

a The increased incidence of abortions in the high-dose group during the treatment period was considered to be compound-related, even though the rate is still within the range of historical control data.

b At end of dosage period (Day 48 of gestation). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

- no noteworthy finding

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 19 of 19

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児発生に関する試験 A894 (続き)

Report No.: A894 **Study No.:** TX ■.075 **Location Section:** 4.2.3.5.2.8
Test Article: Gadobutrol
Report Title: Evaluation of the report entitled: "ZK 135.079 - Embryotoxicity including teratogenicity study in Cynomolgus monkeys after daily intravenous administration from day 20 to day 50 of gestation" of ■■■ Deutschland ■■■, ■■■, dated ■.■.■■■

Daily Dose [mmol/kg]	0 (Control)	0.75	2.5
Litters (continued)			
Mean Fetal Body Weight (g)	121.0	107.7 *	108.9
Fetal Sex Ratios (% Males)	50.0	41.7	42.9
Fetal Anomalies			
Gross External Malformations	0	0	0
Gross External Variations	-	-	-
Visceral Malformations	0	0	0
Visceral Variations	-	-	-
Skeletal Malformations	0	0	0
Skeletal Variations	-	-	-
Total Affected Fetuses (Litters)			
Malformations	0	0	0
Variations	-	-	-

* : p<0.05, Dunnett Test

- : no noteworthy findings

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 10

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 PH-35738 (続き)

Report No.: PH-35738 **Study No.:** T076752 **Location Section:** 4.2.3.5.3.2
Test Article Gadobutrol
Report Title SH L 562 BB; Study for Effects on Pre- and Postnatal Development in Rats Including Maternal Function and Toxicokinetic Investigation after Intravenous Administration

Daily Dose (mmol/kg)	0 (Control)	0.6	2.2	7.5
F₀ Females (Continued)				
Kidney Weight at Necropsy, Combined (%^a)	2.198g	+0.2	+12.3**	+58.1**
Gestation Body Weight (%^b) (Day 20 p.c.)	345.8 g	-1.1	+1.8	+1.2
Lactation Body Weight (%^b) (Day 21 p.p.)	292.8 g	-1.5	+0.2	+5.9*
Gestation Food Consumption (%^b) (Day 0-20 p.c.)	23.0 g/day	-0.9	-3.9	-2.2
Lactation Food Consumption (%^b) (Day 0-14 p.p.)	51.7 g/day	+6.3	+5.4	+8.5
Mean Duration of Gestation (days)	22.74	22.80	22.95	22.84
Abnormal Parturition	-	-	-	--
F₁ Litters (Prewaning)				
No. Litters Evaluated	19	20	20	19
Mean No. of Implantations	13.84	14.35	14.95	14.55
Mean No. Pups/Litter	13.32	12.85	13.75	14.00
Mean No. Liveborn Pups/Litter	13.16	12.75	13.45	13.47
No. of Litters with Stillborn Pups	2	2	3	5
Postnatal Survival to Day 4 (%) <viability index>	94.06	98.90	97.61	84.19
Postnatal Survival to Weaning (%) <lactation index: day 4-21 p.p.>	99.31	98.75	99.38	100.0

^a For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

- : no noteworthy findings, p.c.: post coitus, p.p. : post parturition, * : p<0.05, ** : p<0.01, significantly different from control (Dunnett Test)

^b Body weight at end of gestation or lactation; food intake during the period indicated based on calculation with unrounded raw data; For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 3 of 10

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 PH-35738 (続き)

Report No.: PH-35738 **Study No.:** T076752 **Location Section:** 4.2.3.5.3.2
Test Article Gadobutrol
Report Title SH L 562 BB; Study for Effects on Pre- and Postnatal Development in Rats Including Maternal Function and Toxicokinetic Investigation after Intravenous Administration

Daily Dose (mmol/kg)	0 (Control)		0.6		2.2		7.5		
F₁ Litters (Prewaning) (continued)									
No. of Total Litter Loses	1		0		0		2		
Change in Pup Body Weights (g)^c	44.79		45.60		44.82		43.16		
Pup Sex Ratios (% males)^d	49.53/48.31		47.60/52.38		52.42/51.86		42.61/45.83		
Pup Clinical Signs									
- dead/missing/milk spot not detectable; pale skin	-		-		-		increased		
Pup Necropsy Observations	-		-		-		-		
F₁ Litters (Postweaning)									
No. Evaluated Postweaning (F₁ animals/Group)	22		22		22		22		
No. Died or Sacrificed Moribund	0		0		1M		0		
Clinical observations	-		-		-		-		
Necropsy Observations	-		-		-		-		
	M	F	M	F	M	F	M	F	
Body Weight Change (g)^e	298.4	143.8	310.1	149.5	303.1	150.8	305.9	144.8	
Food consumption (%^f)	27.6 g/day	19.7 g/day	+5.1	-0.5	±0	+0.5	±0	-1.5	

c From birth to weaning (days 0 – 21 p.p.)

d day 0/ day 21 of post partuatiun.; culling on day 4 p.p.

e From weaning to mating (week 6 -15 after birth)

f At end of postweaning period (week 14 of life). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

- : no noteworthy findings, M :males, F: females

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 4 of 10

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 PH-35738 (続き)

Report No.: PH-35738 Study No.: T076752 Location Section: 4.2.3.5.3.2

Test Article Gadobutrol

Report Title SH L 562 BB; Study for Effects on Pre- and Postnatal Development in Rats Including Maternal Function and Toxicokinetic Investigation after Intravenous Administration

Daily Dose (mmol/kg)	0 (Control)	0.6	2.2	7.5
F₁ Litters (Postweaning) (continued)				
Balanopreputial Separation	-	-	-	-
Sensory Function	-	-	-	-
Motor Activity	-	-	-	-
Learning and Memory	-	-	-	-
Mean No. of Days Prior to Mating	3.8	3.7	5.4	4.9
remated females excluded	2.6	2.3	2.3	2.0
No. of Males that Mated	20	19	15(of 21 ^g)	17
No. of Fertile Males ^h	19	19	14	16
Inseminated Index (%)	100	95.5	86.4	95.5
Fertility Index (%)	95.5	100	94.7	95.2
Gestation Index (%)	100	100	100	100

g one male of the 2.2 mmol/kg died during premating

h calculated based on the number of females with litters

- : no noteworthy findings

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 6 of 10

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 SG/127 (続き)

Report No.: SG/127

Study No.: 014

Location Section: 4.2.3.5.3.3

Test Article: Gadobutrol

Report Title: Reproductive and developmental toxicity study with SH L 562 A administration during perinatal and lactation period in rats (Segment III)

Daily Dose (mmol/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	4.5
Abnormal Parturition of F₀ Female	-	-	-	-
F₁ Litters (Prewaning)				
No. Litters Evaluated	24	23	24	23
Mean No. of Implantations	16.3	15.9	16.4	15.4
Mean No. Liveborn Pups/Litter	14.8	14.1	14.3	13.7
Mean No. of Perinatal death/Litter	0.3	0.3	0.5	0.4
No. of Litters with Stillborn Pups (%)	2.2	2.4	3.1	3.1
Postnatal Survival to Day 4 (%)	93.0	96.0	97.5	98.9
Postnatal Survival to Weaning (%)	99.4	100	100	100
No. of Total Litter Losses	0	0	0	0
Change in Pup Body Weights ^b (g) males	53.6	54.6	53.0	53.4
Change in Pup Body Weights ^b (g) females	52.3	52.2	50.7	51.8
Pup Sex Ratios (% males)	53.7	50.9	48.8	52.5
Malformation at birth or day 4				
No. of pups for external examination	356	324	344	322
Type (No.)	-	-	Anury + Anal atresia (1)	Vestigial tail + Anal atresia (1)
No. of pups for skeletal examination	132	112	131	110
Type (No.)	Sutural parietal bone (1)	-	-	-
Progress of ossification				
No. of pups examined at day 4	132	112	131	110
Mean no. of anterior phalanges	25.9	26.0	25.9	26.0
Mean no. of posterior phalanges	26.0	26.8	27.0	27.3
Mean no. of caudal vertebrae	17.4	18.5	18.2	18.0

b From birth to weaning, - : no noteworthy finding

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 7 of 10

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 SG/127 (続き)

Report No.: SG/127

Study No.: 014

Location Section: 4.2.3.5.3.3

Test Article: Gadobutrol

Report Title: Reproductive and developmental toxicity study with SH L 562 A administration during perinatal and lactation period in rats (Segment III)

Daily Dose (mmol/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	4.5
F₁ Litters (Prewaning) (continued)				
Skeletal variation	-	-	-	-
Pup Clinical Signs	-	-	-	-
External Differentiation Examination				
Opening of auricles (%) on day 5	100	100	100	100
Emergence of abdominal hair (%) on day 14	100	100	100	100
Eruption of incisors (%) on day 14	100	100	100	100
Opening of eyelids (%) on day 15	96.9	98.0	97.7	97.0
Functional Development				
No. of pups examined	40	40	40	40
Righting reflex (%) on day 7	100	100	100	100
Negative geotaxis (%) on day 14	100	100	100	100
Auricular startle reaction (%) on day 21	100	100	100	100
Grasp reflex (%) on day 21	100	100	100	100
Pupillary reflex (%) on day 21	100	100	100	100
F₁ Litters (Postweaning)				
No. Evaluated per Litter	5.7	5.9	6.0	5.9
Descending of testis (%) on day 28	100	98.2	100	100
Opening of vagina (%) on day 42	100	100	100	100
Pup Necropsy Observations at Week 8	-	-	-	-

- : no noteworthy finding

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 8 of 10

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 SG/127 (続き)

Report No.: SG/127

Study No.: ■014

Location Section: 4.2.3.5.3.3

Test Article: Gadobutrol

Report Title: Reproductive and developmental toxicity study with SH L 562 A administration during perinatal and lactation period in rats (Segment III)

Daily Dose (mmol/kg)	0 (Control)		0.5		1.5		4.5	
F₁ Litters (Postweaning) (continued)								
Behavior tests								
Water maze task	-		-		-		-	
Exploratory and emotional behavior test	-		-		-		-	
Conditioned avoidance test	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of avoidance at 1 st , 3-10 sessions	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of avoidance at 2 nd session	-	1.0	-	0.9	-	0.1	-	0*
No. of coupled F1 (%)	21(100)		19(100)		22(100)		19(90.5)	
No. of pregnant F1 (%)	19(90.5)		17(89.5)		21(95.5)		17(89.5)	
F₁ females								
No. of pregnant animals evaluated	19		17		20		17	
Gestation Body Weight at G21 (%)	431g		+3.7		+4.2		+5.8	
F₁ males								
No. of animals evaluated	21		19		22		21	
Body Weight at necropsy	423g		-4.0		+2.8		+4.0	
Genital organ weights	-		-		-		-	
No. of animals with sperm (%)	21(100)		19(100)		22(100)		21(100)	

- : no noteworthy finding

- M : males, F: females

* : p<0.05, significantly different from control, Dunnett Test

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 9 of 10

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 SG/127（続き）

Report No.: SG/127

Study No.: ■014

Location Section: 4.2.3.5.3.3

Test Article: Gadobutrol

Report Title: Reproductive and developmental toxicity study with SH L 562 A administration during perinatal and lactation period in rats (Segment III)

Daily Dose (mmol/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	4.5
Cesarean data of F₁ generation				
No. of pregnant animals evaluated	19	17	20	17
No. of corpora lutea per litter	16.2	17.4	18.0	17.0
No. of implantations per litter	14.6	15.5	15.5	15.4
No. of live fetus (F ₂) per litter	14.1	14.1	14.8	14.4
Mean body weight of male fetuses (F ₂) (%)	5.38g	+1.11	±0	+1.30
Mean body weight of female fetuses (F ₂) (%)	5.10g	+1.57	±0	+1.96
Sex Ratios of fetuses (F ₂) (% males)	49.8	50.2	50.7	50.6
Mean resorption and death (%)	0.5 (3.6)	1.4 (9.1)*	0.7 (4.2)	1.0 (6.5)
Mean Early death	0.4	1.2*	0.6	0.9
Mean Late death	0.1	0.1	0.1	0.1
Mean Fetal death	0	0.1	0	0
Malformations in fetus (F₂ generation)				
No. of pregnant animals evaluated	19	17	20	17
External malformation				
No. of specimens evaluated	267	239	296	245
No. of fetus with malformation (%)	0 (0)	1(0.4)	0(0)	0(0)
Type (No.)	-	Exencephaly (1)	-	-
Internal malformation				
No. of specimens evaluated	128	117	145	119
No. of fetus with malformation (%)	1(0.8)	2(1.7)	1(0.7)	1(0.8)
Type (No.)	Vascular ring (1)	Ventricular septal defect(1), Double caudal vena cava(1)	Ventricular septal defect (1)	Microphthalmia(1)

*: p<0.05, significantly different from control, Dunnett Test

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 10 of 10

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 SG/127 (続き)

Report No.: SG/127 Study No.: ■014 Location Section: 4.2.3.5.3.3

Test Article: Gadobutrol

Report Title: Reproductive and developmental toxicity study with SH L 562 A administration during perinatal and lactation period in rats (Segment III)

Daily Dose (mmol/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	4.5
Malformations in fetus (F₂ generation) (continued)				
Skeletal malformation				
No. of specimens evaluated	139	122	151	126
No. of fetus with malformation (%)	0(0)	1(0.8)	0(0)	1(0.8)
Type (No.)	-	Sutural parietal bone (1)	-	Wavy ribs(1)
Progress of ossification				
No. of pups examined at day 4	139	122	151	126
Mean No. of anterior phalanges	15.4	14.6	14.9	14.9
Mean No. of posterior phalanges	11.4	11.5	12.7	11.8
Mean No. of caudal vertebrae	6.3	6.6	6.4	6.7
Skeletal variations	-	-	-	-

- : no noteworthy finding

2.6.7.15 新生児を用いた試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 3

2.6.7.15 新生児を用いた試験

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Doses (mmol/kg)	Gender and No. per Group	Observed Max. Nonlethal Dose (mmol/kg)	Noteworthy Findings	Report No. Study No.	Location Section:
Rat/ Wistar (4 days old)	Single intravenous (SH L 562 BB) 1.0M	0, 0.6, 2, 6 [PND 4]	20M/20F for control, 6 ^a 0.6 and 6 mmol/kg groups (10M/10F for terminal collective [Day 2], other 10M/10F for 28 day recovery collective [Day29]), 10M10F for 2 mmol/kg group (no recovery collectives) +TK satellite 12M/12F for each treatment group ^b	6 ^a	6 mmol/kg; 2F pubs were euthanized due to poor general condition on Day 15 to prevent cannibalism by the dams ^a . Reduced body weight gain of females in recovery period [Day 11-29] and protein concentration decreased in males [Day 2]. Kidneys in 5/10 M and 7/10 F exhibited isolated tubules (reduced diameter and lined by clear cells in cortex) after recovery period. 2 mmol/kg onwards; enlarged and/or increased number of microglia cells in cerebrum [Day 2]. Completely disappeared after recovery period (6 mmol/kg group). 0.6 mmol/kg onward; paler cytoplasm (0.6 mmol/kg group) / vacuolation in renal cortical tubules [Day 2]. Almost completely disappeared after recovery period.	PH-36304 T079918	4.2.3.5.4.1

a: Since no treatment-related necropsy and histopathological findings were found, cause of moribund condition was concluded unlikely to be treatment-related.

b: Gadolinium (Gd) concentration in plasma, skin, heart, liver, kidney and sternum were analyzed (measuring points; 5 min, 3, 7, 24 hrs after administration).

PND: postnatal day

Summary of toxicokinetics in plasma

Dose	[mmol/kg]	0.6	2	6
AUC ₍₀₋₂₄₎	[μ mol·h/L]	2556	8622	15284
C _{max}	[μ mol/L]	1448	4419	4714

2.6.7.15 新生児を用いた試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 3

2.6.7.15 新生児を用いた試験 (続き)

Test Article: Gadobutrol

Location:

Section:

4.2.3.5.4.2

Species/ Strain	Method of Administration (Formulation)	Duration of Dosing	Daily Dose (mmol/kg)	Gender (No. of animals/group)	NOAEL (mmol/kg)	Noteworthy findings	Report no.	Study no.
Rat / Wistar (10 days old: PND10)	Intravenous (SH L 562 BB) 1.0M	PND 10, 17 & 24 (3 times repeated application in 2 weeks)	0 (Saline) 0.3, 1.0 & 3.0	12M / 12F (main) 10M / 10F (recovery) + Satellite TK collectives (each 3 M/3F per time point)	3.0	0.3 mmol/kg: - Isolated cortical atrophie clear cell tubules in the kidneys on PND 32 without impact on kidney function parameters and completely reversible (F) 1.0 mmol/kg: - Isolated cortical atrophie clear cell tubules in the kidneys on PND 32 without impact on kidney function parameters and fully reversible (M) - Diffuse complete reversible renal cortical tubular vacuolation PND 32 (M&F) 3.0 mmol/kg: - Reversible increase in leukocytes, basophiles and monocytes and slight increase of ALP (minor toxicological relevance) (M). - Slight increase in kidney weights and occurrence of enlarged kidneys in single animals at the end of recovery without histopathological correlate (not considered toxicologically relevant) (M&F) - Diffuse complete reversible renal cortical tubular vacuolation PND 32 (M&F)	PH36683	T082503

PND: postnatal day

2.6.7.15 新生児を用いた試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 3 of 3

2.6.7.15 新生児を用いた試験 (続き)

Test Article: Gadobutrol

Location: Section: 4.2.3.5.4.2

Summary of Toxicokinetics in 3-day repeated-dose study in new born rats (PH-36683, geometric mean of 6 [n=3M+3F/time point])

	Dose	[mmol/kg]	PND 10			PND 24		
			0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
Plasma	AUC ₍₀₋₂₄₎	[$\mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$]	1220	4420	13000	602	1840	4940
	C _{max}	[$\mu\text{mol/L}$]	961	2750	7490	1080	3770	9400
Femur	AUC ₍₀₋₂₄₎	[$\mu\text{mol}\cdot\text{h/kg}$]	682	2760	6630	441	1030	3150
	C _{max}	[$\mu\text{mol/kg}$]	168	685	1710	223	741	1890
Liver	AUC ₍₀₋₂₄₎	[$\mu\text{mol}\cdot\text{h/kg}$]	889	3020	8050	291	930	3030
	C _{max}	[$\mu\text{mol/kg}$]	119	350	809	144	470	1280
Heart	AUC ₍₀₋₂₄₎	[$\mu\text{mol}\cdot\text{h/kg}$]	688	2310	6470	180 ^a	759	2160
	C _{max}	[$\mu\text{mol/kg}$]	440	892	2290	315	1160	3010
Skin	AUC ₍₀₋₂₄₎	[$\mu\text{mol}\cdot\text{h/kg}$]	744	2570	6580	420	1410	3970
	C _{max}	[$\mu\text{mol/kg}$]	156	612	1530	417	1390	3000
Kidney	AUC ₍₀₋₂₄₎	[$\mu\text{mol}\cdot\text{h/kg}$]	7790	26900	64000	6370	18700	62000
	C _{max}	[$\mu\text{mol/kg}$]	704	2300	5830	1630	5170	13200
Brain	AUC ₍₀₋₂₄₎	[$\mu\text{mol}\cdot\text{h/kg}$]	225	914	2010	62.5	125	440
	C _{max}	[$\mu\text{mol/kg}$]	23.5	88.2	156	22.7	71.3	222

PND: postnatal day, a: AUC(0-4)

2.6.7.16 局所刺激性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 1

2.6.7.16 局所刺激性試験

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Admin. (single injection)	Administered Volume (used Formula)	Gender and No. of animals	Noteworthy Findings	Report No./ Study No.	Location Section
Rabbit/ New Zealand White	intravenous (ear vein)	0.5 mL/animal 1M (SH L562B)	2M/2F	Slight reddening and swelling at the congested and the uncongested vein, moderate reddening at the congested vein.	9622 TX ■■■.130	4.2.3.6.1
Rabbit/ New Zealand White	intravenous (ear vein)	0.5 mL/animal 0.5M (SH L562A)	2M/2F	No noteworthy finding	9690 TX ■■■.234	4.2.3.6.2
Dog/ Beagle	intravenous (antebranchial vein)	1.5 mL/kg 1M (SH L562B)	2M/2F	No noteworthy finding	9736 TX ■■■.031	4.2.3.6.3
Rabbit/ New Zealand White	intra-arterial (ear artery)	0.5 mL/animal 1M (SH L562B)	2M/2F	Transient paleness of the skin due to decrease in vessel injection (4 animals), transient slight to moderate skin reddening, increase in vessel injection (1 animal).	9569 TX ■■■.131	4.2.3.6.4
Rat/ Wistar	intra-arterial (femoral artery)	0.1 mL/animal 1M (SH L562B)	2M/2F	No noteworthy finding	AA28 TX ■■■.298	4.2.3.6.5
Rat/ Wistar	intra-arterial (femoral artery)	0.1 mL/animal 0.5M (SH L562A)	2M/2F	No noteworthy finding	A601 TX ■■■.022	4.2.3.6.6
Rabbit/ New Zealand White	paravenous (para-saphenous vein)	1.0 mL/animal 1M (SH L562B)	2M/2F	Slight to moderate reddenings and swellings (2 animals), and bluish discoloration (1 animal) in the area of administration. Swelling of the whole leg (1 animal). Histological slight to mild inflammatory reactions (edema, proliferation of fibrocytes/fibroblasts, leucocytic infiltration) at the application site.	9566 TX ■■■.133	4.2.3.6.7
Rabbit/ New Zealand White	paravenous (para-saphenous vein)	1.0 mL/animal 0.5M (SH L562A)	2M/2F	No noteworthy finding	9689 TX ■■■.235	4.2.3.6.8
Rabbit/ New Zealand White	intramuscular (sacrospinal muscle)	1.0 mL/animal 1M (SH L562B)	4M/4F	No noteworthy finding	9599 TX ■■■.132	4.2.3.6.9
Rat/ Wistar	intra-liver parenchyma	0.03 mL/animal 1M (SH L562BB)	6M/6F	No noteworthy finding	AH95 TX ■■■.103	4.2.3.6.10

2.6.7.17 その他の毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 1 of 4

2.6.7.17 その他の毒性試験

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses [mmol/kg] (Volume/ Formula)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. Study No.	Location Section
Antigenicity study							
Guineapig/ Hartley (ASA and PCA)	subcutaneous (sensitization)	5 times over 15 days (sensitization)	0, 24, 120 mg/animal 0.5M (SH L562A) (sensitization)	6M	No antigenicity	SG/143 003	4.2.3.7.1.1
	intravenous (challenge)	Single (challenge)	10 mg/animal (challenge)				
Mouse/ BALB/cA Rat/ SD (PCA)	intraperitoneal (sensitized in mouse)	twice at days 0 and 28 (sensitized in mice)	0, 0.001, 0.1 mg/animal 0.5M (SH L562A) (sensitized in mice)	5M mice and 5M rats	No antigenicity	SG/144 004	4.2.3.7.1.2
	intradermal (sensitized in rat)	Single (sensitized in rats)	50µL serum from mice /animal (sensitized in rats)				
	intravenous (challenge)	Single (challenge)	10 mg/animal (challenge)				
Dog/ Beagle	intravenous	4 weeks (prechallenge period) and no treatment for 1 week, then once (challenge)	0, 3.0 1M (SH L562BB) (prechallenge) 1M (SH L 562 BB)	4F	No antigenicity (no specific immune response in type I hypersensitivity reaction)	A20948 TXST 0066	4.2.3.7.1.3

2.6.7.17 その他の毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 2 of 4

2.6.7.17 その他の毒性試験 (続き)

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses [mmol/kg] (Volume/ Formula)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. Study No.	Location Section
Optimization study							
Guinea-pig/ Pirbright White	intra-dermal (induction, 1 st and 3 rd challenge) epidermal (2 nd challenge)	10 times in 3 weeks ^a (days 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 15, 17 & 19)	0, 0.05 mmol/animal 0.5M (SH L562A)	5M/5F	Already in induction: Reddening and swelling, still present on day 53. Histology: intolerance reaction with edema, calcification, foreign body giant cells, fibrosis and inflammatory cells. 1 st and 3 rd challenge: increased reaction volume (7/10 animals). 2 nd challenge: No local findings.	9642 TX-140	4.2.3.7.1.4
Guinea-pig/ Pirbright White	intra-dermal (induction, 1 st challenge) epidermal (2 nd challenge)	10 times in 3 weeks ^a (days 1x2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 17 & 19)	0, 1.56 mmol/animal 0.5M (SH L562A)	5M/5 F for test group, 5M/5F for control group 1 3M/3F for control group 2 3M/3F for local tolerance test (pre-test)	No noteworthy finding	9728 TX-304	4.2.3.7.1.5

a Study design:

Induction period: Weekly repeated intradermal injections of the test compound (test group) resp. the vehicle (control group)

1st challenge: One intradermal injection of the test compound (test group and control group 2) or the vehicle (control group 1) 13 days after the end of the induction period.

2nd challenge: 13 days after the 1st challenge the epidermal application of the test-compound was carried out in all animals of the test group and control group 1.

2.6.7.17 その他の毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 3 of 4

2.6.7.17 その他の毒性試験 (続き)

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses [mmol/kg] (Volume/ Formula)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. Study No.	Location Section
Repeated dose toxicity for impurity A* and impurity B*							
Rat/ Wistar	intravenous	2 weeks (14-16 days)	0, 0.02, 0.1 (1 mL/kg) for impurity A*+impurity B* at injection rate of 6 mL/min	10M/10F	0.02 mmol/kg: no noteworthy finding 0.1 mmol/kg : microvesicular vacuolation of the renal tubular epithelial cells	AK84 TX-223	4.2.3.7.6.1
Other studies							
Single dose toxicity study for CaNa- butrol							
Mouse/ ICR	intravenous	Single dose	0, 5, 25 (CaNa-butrol = CaNaDO3A butrol) cf. 25 mmol/kg of 0.5M (SHL562AA)	5M/5F	5 mmol/kg: no mortality, urination found as major finding 25 mmol/kg: all animals (5M/5F) died immediately after administration, exophthalmus, prone position, dyspnea observed before died. And discoloration of renal cortex and lung found at necropsy 25 mmol/kg of 0.5M formulation: 1M/1F died immediately after administration. Transient decrease of body weight, hypoactivity, irregular respiration, urination and convulsion observed. And discoloration of renal cortex and lung found at necropsy	SG/130 001	4.2.3.7.7.1

2.6.7.17 その他の毒性試験

Bayer Yakuhin, Ltd.

Page 4 of 4

2.6.7.17 その他の毒性試験 (続き)

Test Article: Gadobutrol

Species/ Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses [mmol/kg] (Volume/ Formula)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. Study No.	Location Section
Other studies (continued)							
Comparative study for the effect on serum hormone levels							
Rat/ Wistar	intravenous	2 days	0, 5.0 0.5M (SH L562A) cf. 5.0 mmol/kg of MV and gadopenamide	10M for control, SH L 562 A, gadopenamide formulation, 20M for MV	No effects on serum levels of testosterone, LH and FSH	A010 TX-146	4.2.3.7.7.2
NSF related investigations							
Rat/ Wistar	intravenous	4 weeks (5 times/week)	0, 2.5 1.0M (SH L562BB) cf. 2.5 mmol/kg of MV, OS, MS, OM and MH ^a	6	No noteworthy findings cf. OS-treated animals; ulcer and crust formation in skin, histologically fibrosis, collagen deposit, loss of extracellular space, thickening of dermis and increased cellularity. High Gd concentration in skin, liver and femor	- Sieber MA ; Eur Radiol (2008)18 : 2164-2173	4.2.3.7.7.3
Rat/ Wistar (5/6 nephrectomized- renal impaired model)	intravenous	5 days	2.5 1.0M (SH L562BB) cf. 2.5 mmol/kg of MV, OS and OM	6M for OM and SH L562BB, 12M for OS and MV	No noteworthy findings (Gd concentration in skin was the lowest among treated groups) cf. OS-treated animals induced NSF like skin lesion. Gd conc in skin; OS>OM>MV>SH L562BB	- Pietsch H ; Invest Radiol (2009) 44: 226-233	4.2.3.7.7.4

NSF : nephrogenic systemic fibrosis, MV : meglumine gadopentetate formulation, OS: gadodiamide hydrate formulation, MS: meglumine gadoterate formulation, OM : gadoversetamide formulation, MH : gadobenate dimeglumine formulation