
総 説 第28回学術集会 会長賞受賞記念論文**ガドリニウムの生体に対する影響評価：
オートファジーを指標として**

清 野 正 子 中 村 亮 介 大 城 有 香 浦 口 晋 平
高 根 沢 康 一

北里大学薬学部公衆衛生学教室

**Toxicological assessment of gadolinium *in vitro* and
in vivo : Autophagy as a toxic indicator**

Masako Kiyono, Ryosuke Nakamura, Yuka Ohshiro, Shimpei Uraguchi,
Yasukazu Takanezawa

Department of Public Health, School of Pharmacy, Kitasato University

要旨

ガドリニウム造影剤は、核磁気共鳴画像法の造影剤として広く使用されている。近年、ガドリニウム造影剤が脳に残存するという報告をはじめ、複数の毒性研究報告がみられ、造影剤から遊離したガドリニウムイオン (Gd^{3+}) の潜在的な毒性が懸念されている。そこで、筆者らは、*in vitro* および *in vivo* においてガドリニウム毒性を検討した。培養細胞に Gd^{3+} をばく露させると、細胞バイアビリティが低下するとともに、オートファジー活性化が認められた。BALB/c マウスにオムニスキャン[®]、ガドビスト[®] または Gd^{3+} を単回投与した。オムニスキャン[®]、ガドビスト[®] 投与群の脾臓においてガドリニウム濃度は低く、異常は観察されなかったが、 Gd^{3+} 投与群の脾臓において、高濃度のガドリニウムが検出され、脾臓の肥大が観察された。これらの結果は、造影剤から遊離する Gd^{3+} が脾臓に対する毒性作用を及ぼす可能性を示しているものと考えられた。

(臨床環境 30 : 1 - 6, 2021)

《キーワード》 MRI 造影剤、ガドリニウム、オートファジー、組織蓄積、脾臓

受付：2021年10月6日 採用：2021年11月2日

責任著者：清野正子

北里大学薬学部

〒108-8641 東京都港区白金5-9-1

Abstract

Gadolinium-based contrast agents are widely used to improve tissue contrast during magnetic resonance imaging. Exposure to gadolinium-based contrast agents can potentially result in gadolinium deposition within several human tissues and has become a clinical concern because of the potential toxic effects of free gadolinium (Gd^{3+}). However, little information is available on the differences in tissue dynamics and tissue toxicities between Gd^{3+} and gadolinium-based contrast agents. The present study focused on the effect of Gd^{3+} on autophagy *in vitro* and its tissue distribution and impact of Gd^{3+} on tissues *in vivo*. Exposure of cells to Gd^{3+} resulted in decreased cell proliferation and increased autophagy. In addition, the inhibition of autophagy by chloroquine resulted in enhancement of Gd^{3+} -induced cell death. Thus, it has been proposed that autophagy plays a protective role in Gd^{3+} -induced cytotoxicity. *In vivo* study, we investigated tissue distribution and toxicities of Gd^{3+} , Omniscan[®], and Gadovist[®] after single administration on BALB/c mice. Seven days after injection, relatively high levels of gadolinium were detected in the spleen, liver, skin, and kidneys of the Gd^{3+} group; in the bones, kidneys, and skin of the Omniscan[®] group; and in the kidneys, and skin of the Gadovist[®] group. Enlargement of the spleen was observed in the Gd^{3+} group, but not in the Omniscan[®] or Gadovist[®] groups. Our results may help elucidate relative risks of different types of gadolinium agents, mechanisms involved and even recognition of potential toxic effects of gadolinium-based contrast agents.

(Jpn J Clin Ecol 30 : 1 – 6, 2021)

《Key words》Magnetic resonance imaging contrast agents; Gadolinium; Autophagy; Tissue deposition; Spleen

I. はじめに

ガドリニウム造影剤は、Magnetic resonance imaging (MRI) 検査の画像診断の向上に欠かすことのできないものであり、世界中の臨床で広く用いられ、開発・使用されてから約30年が経過している。ガドリニウムは原子番号64の重金属で、ガドリニウムイオンは生体内のカルシウムと拮抗することで強い毒性を示す¹⁾。その毒性を抑制するため、ガドリニウム造影剤はキレート構造が付与されて使用されている。このキレート構造の違いによってガドリニウム造影剤は大きく直鎖型と環状型に分類されるが、環状型は直鎖型と比較してガドリニウムとの結合力が強い²⁾。いずれのガドリニウム造影剤も尿中排泄され、投与後1日以内にそのほとんど(98%以上)が人体外に排泄される³⁾。ガドリニウム造影剤は重度の腎障害患者において、腎性全身性線維症(nephrogenic systemic fibrosis; NSF)という重篤な副作用を引き起こすことが報告されているが⁴⁾、その他の軽微な副作用出現率は1~2%程度であり、比較的安全性が高いと考えられてきた。ところが、2013年

にガドリニウム造影剤を複数回投与した患者の脳(淡蒼球や小脳歯状核)にガドリニウムの蓄積が確認され、人体に対する潜在的な毒性が指摘された⁵⁾。当初、直鎖型ガドリニウム造影剤の使用によりガドリニウムの蓄積が生じると報告されたが⁶⁾、その後、軽度であるが環状型ガドリニウム造影剤でも同様のガドリニウムの蓄積が確認された⁷⁾。また、マウスやラットを使用した動物実験においても脳の広範囲でガドリニウムが検出されている^{8,9)}。さらに、脳以外の組織(腎臓、肝臓、皮膚、骨等)への蓄積の報告があり¹⁰⁾、それらの蓄積濃度は脳よりも高い。現在のところ、各組織に蓄積したガドリニウムがどのような生体影響を及ぼすのかについて明確なエビデンスはない。しかし、2017年に厚生労働省は、脳に残存するMRI造影剤が、潜在的なリスクとなる可能性が否定できないとして、「MRI検査の必要性を慎重に判断する」「MRI造影剤には環状型ガドリニウム造影剤を第一選択とする」よう、医療機関に注意を喚起している。

組織で検出されるガドリニウムは、ガドリニウ

ム造影剤のまま蓄積するのか、あるいはキレートから離れたガドリニウムイオンが蓄積するのか、現在のところ不明である。ガドリニウム造影剤をヒト血清中で加温した *in vitro* 実験では、直鎖型ガドリニウム造影剤から遊離するガドリニウムイオンの量は環状型ガドリニウム造影剤より顕著に多く、7日間の加温で約20%の遊離ガドリニウムイオンが検出されている¹¹⁾。したがって、体内でガドリニウム造影剤のキレートから離れたガドリニウムイオンが生じる可能性が十分に考えられる。本稿では、ガドリニウム造影剤とガドリニウムイオンの潜在的な毒性について、筆者らがこれまで解析した *in vitro* 実験について最初に概説する。次に、マウスを用いた *in vivo* 実験の知見について紹介し、最後に将来を展望する。

II. ガドリニウム造影剤とガドリニウムイオンの毒性解析 (*in vitro*)

様々な培養細胞を用いて、ガドリニウム造影剤とガドリニウムイオンの細胞毒性を調べた。本実験では、臨床において広く用いられているオムニスキャン® (直鎖型) とガドビスト® (環状型) を、ガドリニウムイオンとして硝酸ガドリニウムを用いて評価した。オムニスキャンあるいはガドビスト添加による細胞増殖率の変化は10 mM 添加群においても僅かであった (データ未掲載)。一方、硝酸ガドリニウム添加群は調べた全ての培養細胞 [マウス線維芽細胞 (MEF; Mouse embryonic fibroblasts)、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y)、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549)、ヒト胎児腎臓由来細胞 (HEK293; Human embryonic kidney cells 293)] において、濃度依存的に細胞生存率が低下した。特に、HEK293細胞は高濃度 (800 μ M) 添加群で細胞生存率が顕著に低下した (図1)。

筆者らはこれまでにオートファジーがメチル水銀により活性化すること¹²⁾、オートファジーカーゴ分子 p62がメチル水銀毒性を軽減することを明らかにしてきた¹³⁾。さらに、ヒ素、カドミウム、クロム等様々な有害金属のばく露に対してオートファジーが細胞防御的な役割を果たすことが報告

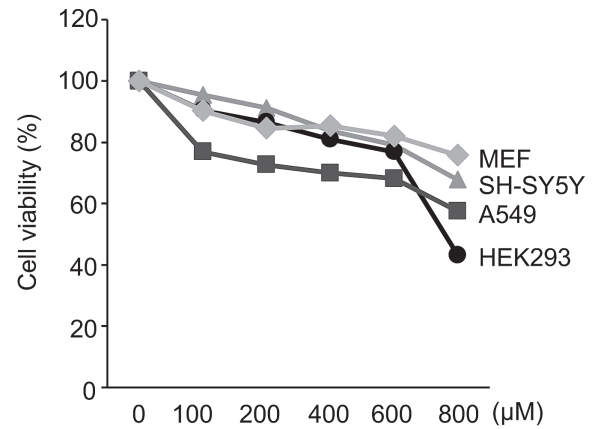


図1 ガドリニウムイオンに対する感受性 (文献18より改変)

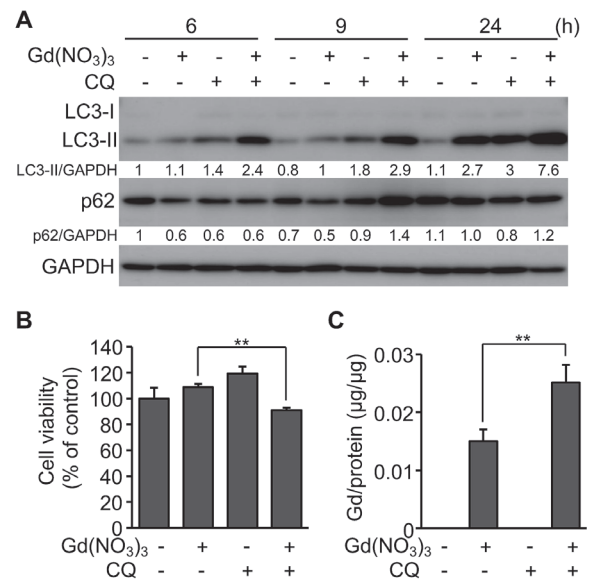


図2 ガドリニウムイオンに対するオートファジーの防御的役割 (文献18より改変)

され¹⁴⁻¹⁶⁾、有害金属に対するオートファジー応答と重要性が注目されている。

そこで、筆者らは、ガドリニウムによるオートファジーへの影響について HEK293細胞に100 μ M の濃度で硝酸ガドリニウムを添加し、オートファジーの活性化の指標となる LC3 (Microtubule light chain 3) の変化をウエスタンブロット法により調べた。LC3 は LC3-I として細胞質に存在し、オートファジーが誘導されると、LC3-I の C 末端にホスファチジルエタノールアミンが共有結合して LC3-II となる¹⁷⁾。図2A に示すよ

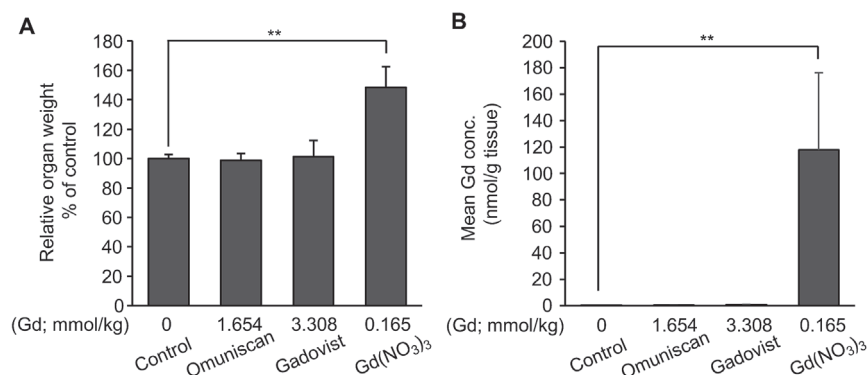


図3 ガドリニウムイオンによる脾臓重量増加とガドリニウムの脾臓蓄積 (文献19より改変)

うに、硝酸ガドリニウムを添加した細胞では時間の経過とともに LC3-II が増加し、24 時間後が最も高値となった。これらの変化はオムニスキャンあるいはガドビスト添加では確認できなかった (データ未掲載)。また、硝酸ガドリニウムによる LC3-II の増加がオートファジーの活性化によるものかをオートファジーの阻害剤であるクロロキン (chloroquine; CQ) を用いて調べたところ、CQ と硝酸ガドリニウムを同時に添加すると、LC3-II は CQ 単独より増加した (図 2 A)¹⁸⁾。これらの結果から、硝酸ガドリニウムによる LC3-II の増加はオートファジーの活性化によるものであると考えられた。また、CQ と硝酸ガドリニウムの同時添加群はそれぞれの単独処理群より細胞生存率が低下し、硝酸ガドリニウムの細胞毒性に対するオートファジーの細胞保護効果が示唆された (図 2 B)。さらに、硝酸ガドリニウム添加による細胞内ガドリニウム濃度を誘導結合プラズマ (ICP) 発光分析装置 (ICP-AES) により測定したところ、CQ と硝酸ガドリニウムの同時添加群は硝酸ガドリニウム単独処理群より細胞内ガドリニウム濃度が増加していた (図 2 C)。以上の結果から、硝酸ガドリニウムによるオートファジーの活性化は、細胞内のガドリニウム濃度を減少させることで細胞を保護する役割を果たす可能性が考えられた¹⁸⁾。

Ⅲ. ガドリニウム造影剤とガドリニウムイオンの毒性解析 (*in vivo*)

個体レベルにおけるガドリニウム造影剤とガドリニウムイオンの潜在的な毒性を検証するため、BALB/c、雄性、5 週齢マウスを用いた単回投与試験を実施した。ガドリニウム造影剤として、オムニスキャン[®] (直鎖型) とガドビスト[®] (環状型) を、ガドリニウムイオンとして硝酸ガドリニウムを用いて評価した。オムニスキャン[®] の投与量は、ヒト投与等価相当量 (100 mg/kg) とした群 (0.165 m mol/kg) とその 10 倍の高用量群 (1.65 m mol/kg)、ガドビスト[®] の投与量は、ヒト投与等価相当量群 (0.165 m mol/kg) とその 20 倍の高用量群 (3.308 m mol/kg)、硝酸ガドリニウムの投与量は、造影剤のヒト投与等価相当量の 20% がキレートから離れたと仮定した用量 (0.308 m mol/kg)、100% キレートから離れたと仮定した高用量群 (1.65 m mol/kg) とし、コントロール群を含めた計 7 群に分けた。各群は 10 匹ずつランダムに分け、経尾静脈注射により 1 回投与し、7 日後に解剖した。脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣を摘出し組織の重量を測定した。

その結果、硝酸ガドリニウム投与群 (1.65 m mol/kg) において、脾臓重量の有意な増加が認められた (図 3 A)。また、この硝酸ガドリニウム投与群の脾臓では、オムニスキャン[®] やガドビスト[®] 投与群と比較して有意に高いガドリニウム濃度が検出された (図 3 B)。一方、オムニスキャン

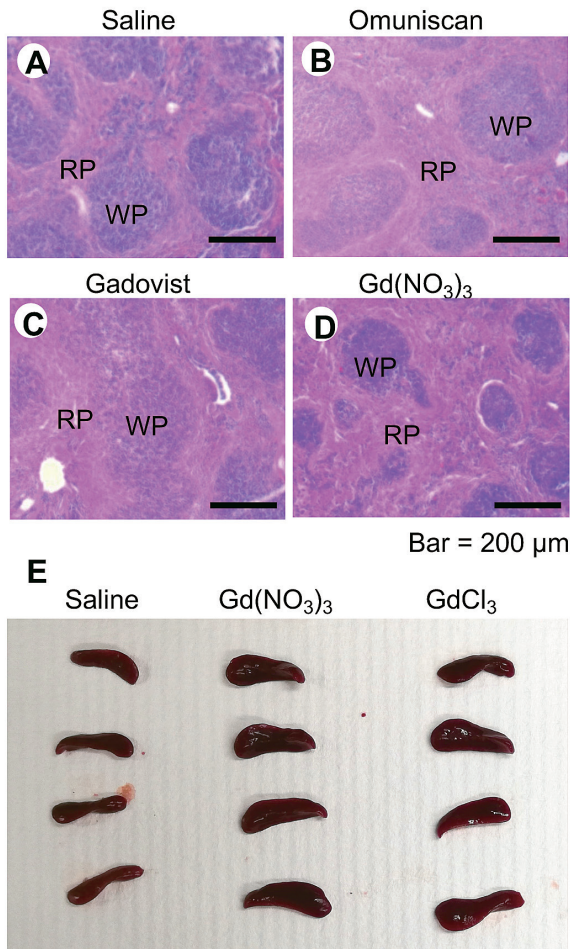


図4 ガドリニウムイオンによる脾臓の肥大化 (文献19より改変)

ン®高用量群では骨、腎臓に、ガドピスト®高用量群では腎臓に高いガドリニウム濃度が検出され、硝酸ガドリニウム高用量群 (1.65 m mol/kg) とほぼ同じ値であった¹⁹⁾。

オムニスキャン®、ガドピスト®, 硝酸ガドリニウムの高用量投与群から摘出した肝臓、腎臓、脾臓のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) によりそれぞれの組織構造を調べた。オムニスキャン®とガドピスト®高用量群の肝臓、腎臓、脾臓では、組織構造の異常は認められなかった¹⁹⁾。また、硝酸ガドリニウム高用量群で組織重量増加が認められた脾臓のHE染色の結果を図4A - Dに示した。脾臓は白血球産生など感染に対する防御を担う白脾髄

(WP) と不要な物質を取り除く赤脾髄 (RP) から形成されているが、これらの構造に顕著な異常は確認されなかった。しかし、硝酸ガドリニウム高用量群では、組織的な異常はないものの、脾臓の重量の肥大が認められ、同濃度の塩化ガドリニウム投与群でも同様の結果となった (図4E)。

以上の結果から、高用量のガドリニウムイオンは脾臓に蓄積することが明らかとなった。この脾臓への蓄積性は経時的に増加していき、単回投与後、56日に脾臓のガドリニウムを測定すると7日の約4倍だった (データ未掲載)。したがって、ガドリニウムは比較的長期間脾臓に蓄積される可能性が考えられた。今後は、ガドリニウムイオンによる脾臓肥大のメカニズムの解明を目指し、ガドリニウムイオンによる毒性を明らかにする予定である。

IV. おわりに

筆者らは、今回紹介した単回投与の *in vitro* 実験に加えて、ガドリニウム造影剤とガドリニウムイオンの反復投与実験を現在進めている。反復投与実験により、ガドリニウムによる脾臓への毒性影響、および、脾臓以外の臓器への毒性影響について検証する予定である。また、本研究のさらなる展望と課題としては、ガドリニウム造影剤がキレート構造のまま何らかの毒性をもつのか、あるいはキレートから離れたガドリニウムイオンがガドリニウム毒性の本体であるのか、について知見を得ることであると考えている。

V. 引用文献

- 1) Yang X, Sachs F. Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* 1989; **243**: 1068-71.
- 2) Malikova H, Holesta M. Gadolinium contrast agents- are they really safe? *The Journal of Vascular Access* 2017; **18**: S1-7.
- 3) Hao J, Bourrinet P, Desché P. Assessment of pharmacokinetic, pharmacodynamic profile, and tolerance of gadopiclesol, a new high relaxivity GBCA, in healthy subjects and patients with brain lesions (Phase I/IIa Study). *Investigative Radiology* 2019; **54**: 396-402.

- 4) Mathur M, Jones JR, Weinreb JC. Gadolinium deposition and nephrogenic systemic fibrosis: a radiologist's primer. *Radiographics* 2020; **40**: 153-62.
- 5) Kanda T, Ishii K, Kawaguchi H, Kitajima K, Takenaka D. High signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images: relationship with increasing cumulative dose of a gadolinium-based contrast material. *Radiology* 2014; **270**: 834-41.
- 6) Ramalho J, Castillo M, AlObaidy M, Nunes RH, Ramalho M, Dale BM, *et al.* High signal intensity in globus pallidus and dentate nucleus on unenhanced T1-weighted MR images: evaluation of two linear gadolinium-based contrast agents. *Radiology* 2015; **276**: 836-44.
- 7) Bjørnerud A, Vatnehol SAS, Larsson C, Due-Tønnessen P, Hol PK, Groote IR. Signal enhancement of the dentate nucleus at unenhanced MR imaging after very high cumulative doses of the macrocyclic gadolinium-based contrast agent gadobutrol: an observational study. *Radiology* 2017; **285**: 434-44.
- 8) Kartamihardja AAP, Nakajima T, Kameo S, Koyama H, Tsushima Y. Distribution and clearance of retained gadolinium in the brain: differences between linear and macrocyclic gadolinium based contrast agents in a mouse model. *The British Journal of Radiology* 2016; **89**: 20160509.
- 9) Robert P, Lehericy S, Grand S, Violas X, Fretellier N, Idée J-M, *et al.* T1-weighted hypersignal in the deep cerebellar nuclei after repeated administrations of gadolinium-based contrast agents in healthy rats: difference between linear and macrocyclic agents. *Investigative Radiology* 2015; **50**: 473.
- 10) McDonald RJ, McDonald JS, Dai D, Schroeder D, Jentoft ME, Murray DL, *et al.* Comparison of gadolinium concentrations within multiple rat organs after intravenous administration of linear versus macrocyclic gadolinium chelates. *Radiology* 2017; **285**: 536-45.
- 11) Frenzel T, Lengsfeld P, Schirmer H, Hütter J, Weinmann H-J. Stability of Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents in Human Serum at 37°C. *Investigative Radiology* 2008; **43**: 817-28. <https://doi.org/10.1097/RLI.0b013e3181852171>.
- 12) Takanezawa Y, Nakamura R, Sone Y, Uruguchi S, Kiyono M. Atg5-dependent autophagy plays a protective role against methylmercury-induced cytotoxicity. *Toxicology Letters* 2016; **262**: 135-41.
- 13) Takanezawa Y, Nakamura R, Harada R, Sone Y, Uruguchi S, Kiyono M. Sequestosome1/p62 protects mouse embryonic fibroblasts against low-dose methylmercury-induced cytotoxicity and is involved in clearance of ubiquitinated proteins. *Scientific Reports* 2017; **7**: 1-11.
- 14) Wang S-H, Shih Y-L, Ko WC, Wei Y-H, Shih C-M. Cadmium-induced autophagy and apoptosis are mediated by a calcium signaling pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2008; **65**: 3640-52.
- 15) Liang Q, Xiao Y, Liu K, Zhong C, Zeng M, Xiao F. Cr (VI)-induced autophagy protects L-02 hepatocytes from apoptosis through the ROS-AKT-mTOR pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018; **51**: 1863-78.
- 16) Wu C-W, Lin P-J, Tsai J-S, Lin C-Y, Lin L-Y. Arsenite-induced apoptosis can be attenuated via depletion of mTOR activity to restore autophagy. *Toxicology Research* 2019; **8**: 101-11.
- 17) Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal* 2000; **19**: 5720-8.
- 18) Takanezawa Y, Nakamura R, Kusaka T, Ohshiro Y, Uruguchi S, Kiyono M. Significant contribution of autophagy in mitigating cytotoxicity of gadolinium ions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2020; **526**: 206-12.
- 19) Nakamura R, Takanezawa Y, Ohshiro Y, Uruguchi S, Kiyono M. Effects of chemical forms of gadolinium on the spleen in mice after single intravenous administration. *Biochemical and Biophysics Reports* 2022; **29**: 101217.