4-Amino-1-hydroxybutylidene-1, 1-bisphosphonate (alendronate)

の体内動態研究 (第2報):

反復投与時の7週齢ラット, 単回投与時の30週齢ラットにおける
血中濃度, 分布, 排泄, および雌性ラットにおける
胎仔移行性, 乳汁移行性

望月 勉・西村 真一・岡部宏一郎・東 由明
梅田 晋・工藤 諭*・原川 則子*・石井 成幸*
太田 知裕・近藤 史郎・清木 護

Metabolic Fate of 4-amino-1-hydroxybutylidene-1, 1-bisphosphonate (alendronate) (II):

Plasma Concentration, Distribution and Excretion after Repeated Intravenous Administration to 7-week Old Rats and after Single Intravenous Administration to 30-week Old Rats, and Transfer into the Fetus and Milk in Rats

Tsutomu MOCHIZUKI, Shin-ichi NISHIMURA, Koichiro OKABE, Yoshiaki AZUMA,
Shin UMEDA, Satoshi KUDOH*, Noriko HARAKAWA*, Shigeyuki ISHII*,
Tomohiro OHTA, Shiro KONDO, Mamoru KIYOKI

*Pharmacological Research Department, Pharmaceuticals Development Laboratories,
Teijin Institute for Bio-Medical Research, Tokyo;*

**Department of Drug Metabolism and Pharmacokinetics Research, Hamura Institute
for Clinical Chemistry, Teijin Bio-Laboratories Inc., Tokyo*

Summary

Plasma concentration, distribution, and excretion of [^{14}C]-alendronate were investigated after repeated intravenous administration once a day for 7 days to 7-week old male rats and after a single intravenous administration to 30-week old male rats. Feto-placental transfer in pregnant rats and the transfer into the milk in lactating rats were also investigated.

1. The plasma radioactivity after repeated administration at 0.05 mg/kg of [^{14}C]-alendronate to 7-week old male rats was higher than in single administration. However, there was no difference in the half-lives. The level of radioactivity in noncalcified tissues after repeated administration were also higher than in a single administration, but no accumulation was observed. The maximum level of radioactivity in bones was 6.2-7.5 times higher than in a single dose experiment.

帝人株式会社 医薬開発研究所 薬理研究部 〒191 東京都日野市旭が丘 4-3-2

* 株式会社帝人バイオ・ラボラトリーズ 羽村検査所 日野分室 〒191 東京都日野市旭が丘 4-3-2

The concentration in vertebra was the highest among bones, followed by long bones (femur, tibia, humerus) and calvaria. By the 24th day after final administration, 32.2% of the dosed radioactivity was excreted in the urine and 2.1% in the feces, and the excretion in urine was almost completed within 24 hours. These results suggest that there is no alteration in the disposition of alendronate after repeated administration compared with single administration.

2. The AUC of plasma radioactivity after single administration of 0.05 mg/kg of [^{14}C]-alendronate to 30-week old male rats was 2 times higher than in 7-week old rats. The radioactivity in the liver, kidneys, spleen, and heart was also higher. The maximum level of radioactivity in calvaria in 30-week old rats were similar to those in 7-week rats, but was approximately 50% lower in vertebra and long bones than in 7-week old rats. Therefore, the difference of concentration among bones in 30-week old rats was less than in 7-week old rats. The cumulative urinary excretion at 216 hours after administration to 30-week rats was higher (46% of dose) than in 7-week old rats. On the basis of these results, it is suggested that the increase of concentration of radioactivity in plasma and noncalcified tissues and urinary excretion in 30-week rats is due to the decrease in the bone uptake of alendronate as a consequence of decline of bone turnover.

3. After single administration of [^{14}C]-alendronate at 0.05 mg/kg to female rats on day 19 of pregnancy, the concentration of radioactivity in plasma was similar to that of 7-week old male rats. Radioactivity was not detected in fetus, indicating that fetoplacental transfer of alendronate was low.

4. After administration of [^{14}C]-alendronate to female rats 14 days post partum, the concentration of radioactivity in the milk was higher than in plasma. The transfer of radioactivity into milk was observed.

Key words : Alendronate, Bisphosphonate, Rat, Plasma concentration, Fetal transfer, Transfer in milk

緒 言

ビスフォスホン酸は癌の骨転移、甲状腺機能亢進症に伴う骨疾患および paget's 症等の治療に有効な合成有機化合物である¹⁻³⁾。ビスフォスホン酸は骨組織を構成するハイドロキシアパタイトに強い親和性を有し、骨組織に特異的に分布するとともに、破骨細胞に作用し骨吸収抑制作用を示す^{4,5)}。

Sodium 4-amino-1-hydroxybutylidene-1, 1-bisphosphonate (alendronate) は新規に合成されたビスフォスホン酸誘導体で、同様に破骨細胞による骨吸収に対して強い抑制作用を示し^{6,7)}、癌の骨転移による高カルシウム血症および骨粗鬆症等の治療薬として開発が進められている。

前報⁸⁾において7週齢ラットにおける単回静脈内投与後の [^{14}C]-alendronate の体内動態を検討した。その中で、alendronate は骨組織に高い親

和性を示し、特に骨代謝回転の速い骨組織により高濃度に分布することを報告した。一方、加齢による骨代謝回転の変化や反復投与が alendronate の体内動態にどのような影響をおよぼすかは興味深い。そこで、本報では7週齢ラットに7日間反復静脈内投与したのちおよび30週齢ラットに単回静脈内投与したのちの生体内動態について検討した。さらに、胎仔移行性および乳汁移行性についても検討したので、併せて報告する。

実験材料および方法

1. 標識化合物および非標識化合物

^{14}C 標識化合物 ([^{14}C]-alendronate) は前報⁸⁾と同じものを使用し、その標識位置も前報に示した。

2. 実験動物

雄性ラットは Sprague-Dawley 系 SPF ラット

を日本チャールスリバー社より購入し、1週間の馴化期間を置いたのち7週齢（体重：200～250 g）または30週齢（体重：530～830 g）で実験に供した。雌性ラットはSprague-Dawley系SPFラットを同じく日本チャールスリバー社より妊娠7日目で購入し、妊娠19日目（体重：310～380 g）または出産後14日目（体重：290～340 g）で実験に供した。予備飼育および実験の間、飼料（CE-2；日本クレア）および水は自由に与えた。例数は1群3または4匹とした。

3. 薬物投与方法

投与量は0.05 mg/kgとし、標識化合物をリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.2）に溶解して投与液を調製した。30週齢ラットを用いた試験では0.1 mg/mlの投与液を0.5 ml/kgの割合で尾静脈に投与し、他の試験では0.05 mg/mlの投与液を1.0 ml/kgの割合で投与した。投与放射能量は胎児移行性および乳汁移行性試験では370 kBq/kgとし、他の試験では302 kBq/kgとした。

4. 放射能の測定

放射能の測定は液体シンチレーションカウンター（Beckman LS-3801 および LS-5801）により測定した。クエンチングは ^{137}Cs を用いた外部標準線源法により自動補正し、放射能の検出限界はバックグラウンドの測定値の2倍とした。

5. 血漿中放射能濃度の測定

7週齢雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kgを1日1回7日間反復静脈内投与したのち、5, 15, 30分、1時間に軽度のエーテル麻酔下で眼窩静脈叢よりヘパリン処理を施した毛細管を用いて採血した。また投与後2, 4, 8および24時間にエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血した。また、30週齢雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kgを単回静脈内投与したのち、5, 15, 30分、1および2時間に軽度のエーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血した。前報⁸⁾に従って血液を処理し、血漿中の放射能を測定した。

6. 軟組織中放射能濃度の測定

7週齢雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kgを7日間反復静脈内投与したのち30分、2, 8, 24, 72時間、30, 60および90日に、また30週齢雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kgを静脈内投与したのち30分、2, 8, 24, 72時間および30日にエーテル麻酔下開腹し、腹部大動脈より採血致死させ各種組織を摘出した。前報⁸⁾に従って、血漿、血液および各組織中の放射能を測定した。

7. 骨組織中放射能濃度の測定

7週齢雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kgを7日間反復静脈内投与したのち、30分、2, 8, 24, 72時間、30, 60および90日に、また30週齢雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kgを静脈内投与したのち、30分、2, 8, 24, 72時間、30, 60, 90および180日にエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血致死させ骨組織を摘出した。前報⁸⁾に従って各骨組織を処理し、放射能を測定した。

8. 尿糞中排泄率の測定

7週齢雄性ラットを代謝ケージ（メタボリカ、杉山元医理器）に収め、 $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kgを7日間反復静脈内投与したのち、投与開始から31日目までに自然排泄される尿および糞を経時的に分別採取した。また、同様に30週齢雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kgを静脈内投与し、投与後7日間までに自然排泄される尿および糞を経時的に分別採取した。前報に従って尿および糞を処理し、放射能を測定した。

9. 胎仔移行性

妊娠19日目のラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronateを0.05 mg/kg静脈内投与したのち、15, 30分、2, 8, 24時間にエーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血致死させ母獣組織および胎仔を摘出した。血液および血漿では前述の方法により放射能

を測定した。羊水 0.5 ml を採取し 15 ml の親水性シンチレータを添加して放射能を測定した。母獣の脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、気管、胎盤、卵巣、子宮、および胎仔の頭部、体部をそれぞれホモジナイズし、その 0.5 ml を採取し 0.1 ml の 0.1 N 水酸化ナトリウムを用いて塩基性にしたのち、0.1 ml の過酸化水素水を用いて内容物を脱色した。次いでソルバブル® (New England Nuclear) を 1 ml 添加して内容物を溶解し、0.1 ml の酢酸を用いて試料を酸性にしたのち、15 ml の親水性シンチレータを添加して放射能を測定した。

10. 妊娠ラットの全身オートラジオグラフィ

妊娠19日目のラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate を 0.05 mg/kg 静脈内投与したのち、15, 30分および24時間にエーテル麻酔死させた。前報に従って全身凍結切片を作製し、X線フィルム (Hyperfilm- β max, Amersham) と密着させ、40日間露光した。露光したX線フィルムを現像し、全身オートラジオグラムを作成した。

11. 乳汁移行性

出産14日目のラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate を 0.05 mg/kg を静脈内投与したのち、15, 30分、1, 2, 4, 8, 24および48時間に軽いエーテル麻酔下で眼窩静脈から血液を採取するとともに乳汁を採取した。血漿および乳汁は体積を測定したのち、15 ml の親水性シンチレータを添加して放射能を測定した。

結 果

1. 反復投与後の血漿中放射能濃度

7週齢の雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kg を1日1回7日間反復静脈内投与したときの、最終回投与後の血漿中放射能濃度および薬物速度論的パラメータを Fig. 1 に示した。比較のために単回静脈内投与後の血漿中放射能濃度および薬物速度論的パラメータを併せて示した。血漿中放射能濃度は alendronate 相当量に換算し

ng eq./ml で示し、半減期は最小二乗法プログラム MULTI⁹⁾を用い3-exponential式に当てはめて計算した。AUC_{0-2hr} は台形法によって計算し、AUC_{0-∞} は得られた exponential 式から計算した。7日間反復投与後の血漿中放射能濃度は単回投与後より高値を示して推移したが、その消失半減期は単回投与後と同様であった。

2. 反復投与後の軟組織中放射能濃度

7週齢の雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kg を反復静脈内投与したときの最終投与後30分、2, 8, 24, 72時間、30, 60および90日後の軟組織中放射能濃度を Table I に示した。表中の数値は、組織湿重量 1 g または血漿、血液 1 ml 中の放射能量を alendronate に換算して ng eq./g または ng eq./ml で示した。

投与後30分で血漿中の放射能濃度より高い放射能分布を示した組織は腎臓および気管のみであった。各組織からの放射能の消失は速やかであり、特定の組織に残留する傾向は見られなかった。

3. 反復投与後の骨組織中放射能濃度

7週齢の雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kg を反復静脈内投与したのちの骨組織中放射能濃度を Table II に示した。表中の数値は骨組織乾燥重量 1 g あたりの放射能量を alendronate に換算し ng eq./g で表示した。投与30日以降は動物の成長による骨組織重量増加が放射能濃度に大きな影響を与えられたので、骨組織中に分布した放射能量を alendronate に換算し Table III に示した。反復投与後の骨組織中の最高放射能濃度は大腿骨、脛骨、上腕骨、頭蓋冠および椎骨でそれぞれ 6202.6 ± 343.3 , 5881.3 ± 270.6 , 5467.0 ± 545.1 , 1943.1 ± 315.8 および 7565.3 ± 419.5 ng eq./g であった。また、骨組織中放射能濃度は骨組織の種類によって異なり、頭蓋冠に分布する放射能は長管骨 (大腿骨、脛骨、上腕骨) に比較して有意に低濃度であり ($p < 0.05$, t 検定)、椎骨に分布する放射能濃度は長管

Pharmacokinetic parameters

	$T_{1/2}$ (5-30 min) (hr)	$T_{1/2}$ (30 min-2 hr) (hr)	$T_{1/2}$ (2-24 hr) (hr)	$AUC_{0-2\text{ hr}}$ (ng·hr/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/ml)
Repeated	0.07	0.25	21.2	30	42
Single	0.12	1.00	—	21	20

Fig. 1 Concentration of radioactivity in plasma after 7-day repeated intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to male rats (Mean $\pm$ S.D., $n=3$ or 4)

骨に比較して高濃度である傾向が観察された。

長管骨および椎骨中の放射能濃度は48から57日の半減期で減少し、頭蓋冠の放射能濃度はそれぞれ97日の半減期で減少した。一方、分布放射能量としては長管骨および椎骨ではそれぞれ120から163日および379日の半減期で消失したが、頭蓋冠では投与後90日を経ても消失しなかった。

4. 反復投与後の尿糞中排泄

7週齢の雄性ラットに [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を反復静脈内投与したときの投与開始から31日目までの尿および糞中の累積放射能排泄率を **Fig. 2** に示した。図中の値は総投与量に対する% of dose で示した。投与した放射能は投与開始から31日目までに尿中および糞中にそれぞれ総投与量の32.2および2.1%が排泄され、その

ほとんどが最終投与の1日のちまでに排泄された。

5. 30週齢ラットにおける血漿中放射能濃度

30週齢の雄性ラットに [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を単回静脈内投与したときの血漿中放射能濃度と、これらの濃度推移から算出した薬物速度論的パラメータを **Fig. 3** に示した。比較のために7週齢の雄性ラットに 0.05 mg/kg を単回静脈内投与したときの血漿中放射能濃度と薬物速度論的パラメータも同時に示した。なお、血漿中放射能濃度は alendronate 相当量に換算し ng eq./ml で示し、半減期は前述の方法を用い7週齢ラットの単回投与と同様に 2-exponential 式に当てはめて計算した。 $AUC_{0-2\text{ hr}}$ は台形法によって計算し、 $AUC_{0-\infty}$ は得られた exponential 式か

Table I Concentration of radioactivity in tissues after 7-day repeated intravenous administration of [¹⁴C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to male rats

Tissue	Concentration of radioactivity (ng eq. of alendronate/g or ml)							
	30 min	2 hr	8 hr	24 hr	72 hr	30 day	60 day	90 day
Blood	13.37±3.71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Plasma	25.22±7.49	1.04±0.05	0.30±0.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Brain	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.76(n=2)	n.d.	n.d.
Submaxillary gland	8.95±1.68	6.92(n=2)	3.84(n=2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Thymus	5.70±0.47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Heart	9.16±1.79	4.44±0.32	2.97±0.30	n.d.	n.d.	1.91(n=2)	n.d.	n.d.
Lung	18.17±3.19	8.82±0.67	6.11±0.77	3.93±0.30	3.57±0.88	2.15±0.29	n.d.	n.d.
Liver	10.04±2.25	7.41±0.52	5.65±0.34	3.26±0.20	2.75±0.10	1.92±0.18	n.d.	1.27±0.40
Kidney	131.69±17.82	69.84±2.67	51.76±3.78	36.45±5.08	21.12±5.88	4.40±0.29	n.d.	2.23±0.35
Spleen	16.89±4.23	14.69±0.70	11.17±1.45	7.32±0.68	9.31±0.95	9.83±3.30	9.06±0.86	7.07±1.90
Pancreas	7.02±0.76	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Testis	6.52±1.05	1.73±0.19	1.16±0.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Muscle	3.35±0.67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
White fat	3.92(n=2)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epididymis	12.01±1.34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pituitary gland	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Thyroid	12.69±0.59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Submaxillary Lymph	13.67±2.25	9.18±2.55	8.14±1.69	5.61±0.54	5.01±0.79	1.33(n=2)	n.d.	n.d.
Mesenteric Lymph	13.24±2.56	6.82±1.69	4.89±1.04	5.04±0.07	3.54±0.53	n.d.	n.d.	0.28(n=2)
Eyeball	8.10±0.44	3.29±1.07	1.38±0.43	2.68±1.26	1.65±0.85	n.d.	n.d.	4.93±2.48
Adrenal gland	16.38±11.07	6.05±0.08	4.56±0.24	4.43±0.54	3.46±0.53	4.46(n=2)	n.d.	n.d.
Trachea	342.60±114.17	438.73±189.99	247.68±20.04	439.97±109.64	230.75±78.30	201.20±83.67	193.74±9.59	118.30±29.57
Prostate	6.33±1.20	2.04±0.23	1.44±0.72	1.10±0.25	2.26±1.36	0.77(n=2)	n.d.	n.d.
Brown fat	5.90±0.90	2.09±0.07	2.57(n=2)	1.70±0.37	1.09±0.15	0.90(n=2)	n.d.	0.24(n=2)
Stomach*	0.09±0.03	0.22±0.09	0.07±0.08	0.09±0.03	0.15±0.07	n.d.	n.d.	0.03(n=2)
Small intestine*	0.21±0.06	0.49±0.41	0.11±0.05	0.06±0.02	0.03±0.01	0.25±0.12	n.d.	n.d.
Large intestine*	0.07±0.01	0.06±0.02	0.15±0.04	0.05±0.02	0.02±0.01	0.11(n=2)	n.d.	n.d.

Mean±S.D. (n=3): not detected; *: percent of dose

Table II Concentration of radioactivity in bones after 7-day repeated intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to male rats

Bone	Concentration of radioactivity (ng eq. of alendronate/g)							
	30 min	2 hr	8 hr	24 hr	72 hr	30 day	60 day	90 day
Femur	5882.4 $\pm$ 562.8	6000.6 $\pm$ 79.3	6202.6 $\pm$ 343.3	5585.5 $\pm$ 336.9	5062.0 $\pm$ 29.9	2607.8 $\pm$ 103.7	2263.0 $\pm$ 71.7	1855.8 $\pm$ 113.6
Tibia	5530.6 $\pm$ 324.3	5704.9 $\pm$ 219.9	5881.3 $\pm$ 270.6	5224.9 $\pm$ 351.8	4617.8 $\pm$ 164.5	2550.6 $\pm$ 50.7	2206.2 $\pm$ 133.2	1898.3 $\pm$ 56.3
Humerus	5327.4 $\pm$ 553.3	5226.0 $\pm$ 73.3	5467.0 $\pm$ 545.1	4792.7 $\pm$ 146.3	4399.1 $\pm$ 24.2	2194.2 $\pm$ 106.9	1931.8 $\pm$ 52.0	1634.2 $\pm$ 136.1
Calvaria	1815.0 $\pm$ 119.2	1638.5 $\pm$ 89.4	1943.1 $\pm$ 315.8	1399.6 $\pm$ 187.7	1511.2 $\pm$ 123.9	1013.0 $\pm$ 112.1	962.0 $\pm$ 38.7	891.5 $\pm$ 91.3
Vertebra	7565.3 $\pm$ 419.5	7505.1 $\pm$ 294.0	7205.3 $\pm$ 451.5	6516.7 $\pm$ 411.3	6125.2 $\pm$ 99.0	2727.5 $\pm$ 193.0	2217.5 $\pm$ 165.2	2432.7 $\pm$ 110.9

Mean $\pm$ S.D. (n=3)**Table III** Content of radioactivity in bones after 7-day repeated intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to male rats

Bone	Content of radioactivity (ng eq. of alendronate)							
	30 min	2 hr	8 hr	24 hr	72 hr	30 day	60 day	90 day
Femur	2146.7 $\pm$ 150.3	2085.7 $\pm$ 57.8	2126.6 $\pm$ 148.2	1963.3 $\pm$ 106.6	1933.5 $\pm$ 165.8	1616.5 $\pm$ 80.8	1523.8 $\pm$ 89.2	1460.8 $\pm$ 105.5
Tibia	1777.7 $\pm$ 179.9	1826.5 $\pm$ 91.3	1790.1 $\pm$ 94.6	1594.4 $\pm$ 148.5	1617.9 $\pm$ 124.6	1394.5 $\pm$ 32.4	1181.1 $\pm$ 114.2	1164.3 $\pm$ 116.5
Humerus	870.1 $\pm$ 38.2	888.3 $\pm$ 44.3	907.8 $\pm$ 80.8	831.6 $\pm$ 18.5	804.2 $\pm$ 31.8	605.1 $\pm$ 52.7	557.9 $\pm$ 18.9	528.9 $\pm$ 34.2
Calvaria	141.2 $\pm$ 5.0	115.0 $\pm$ 7.5	150.7 $\pm$ 29.6	90.6 $\pm$ 14.7	132.4 $\pm$ 25.6	137.7 $\pm$ 20.5	145.0 $\pm$ 24.6	192.8 $\pm$ 29.4
Vertebra	2405.7 $\pm$ 106.5	2309.0 $\pm$ 83.9	2199.9 $\pm$ 97.5	2067.5 $\pm$ 205.1	2217.3 $\pm$ 73.6	1817.3 $\pm$ 46.6	1673.0 $\pm$ 82.4	2138.3 $\pm$ 179.4

Mean $\pm$ S.D. (n=3)

Fig. 2 Urinary and fecal excretion of radioactivity after 7-day repeated intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to male rats (Mean $\pm$ S.D., $n=3$)

Pharmacokinetic parameters

	$T_{1/2}$ (5-30 min) (hr)	$T_{1/2}$ (30 min-2 hr) (hr)	$AUC_{0-2\text{ hr}}$ (ng·hr/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/ml)
30-week old	0.07	1.06	43	52
7-week old	0.12	1.00	21	20

Fig. 3 Concentration of radioactivity in plasma after single intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to 30-week and 7-week old rats (Mean $\pm$ S.D., $n=3$)

Table IV Concentration of radioactivity in tissues after intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to 30-week rats

Tissue	Concentration of radioactivity (ng eq. of alendronate/g)				
	30 min	2 hr	8 hr	24 hr	72 hr
Liver	6.01 $\pm$ 0.54	4.66 $\pm$ 0.97	3.13 $\pm$ 0.68	2.71 $\pm$ 0.44	2.65 $\pm$ 0.33
Kidney	190.25 $\pm$ 60.33	76.60 $\pm$ 16.26	36.22 $\pm$ 4.37	38.92 $\pm$ 7.19	29.96 $\pm$ 5.75
Spleen	12.10 $\pm$ 2.00	8.80 $\pm$ 0.79	6.84 $\pm$ 1.42	8.99 $\pm$ 1.24	6.37 $\pm$ 0.96
Heart	15.50 $\pm$ 3.99	17.29 $\pm$ 24.07	4.52 $\pm$ 3.91	4.23 $\pm$ 4.07	2.55 $\pm$ 1.25

Mean $\pm$ S.D. (n=3)

ら計算した.

30週齢ラットの血漿中放射能濃度は投与後5分で7週齢の約2倍の濃度を示し、そののうちも7週齢より高濃度で推移した. AUC_{0-2 hr} も7週齢ラットの約2倍高値を示した.

6. 30週齢ラットにおける軟組織中放射能濃度

30週齢の雄性ラットに [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を静脈内投与したときの肝臓、腎臓、脾臓および心臓中放射能濃度を **Table IV** に示した. 表中の数値は組織湿重量 1 g 中の放射能量を alendronate に換算した ng/g として表示した. 投与後30分で腎臓に血漿中より高濃度の放射能が分布したが、他の組織では血漿中より低濃度であった. 各組織からの放射能の消失は血漿中より遅く、血漿中放射能濃度が検出限界以下となる投与後8時間以降も組織中の放射能は検出された.

7. 30週齢ラットにおける骨組織中放射能濃度

30週齢の雄性ラットに [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を静脈内投与したときの骨組織中放射能濃度を **Table V** に、骨組織中放射能量を **Table VI** に示した. 表中の数値は放射能量を alendronate に換算した ng eq./g および ng eq. として表示した.

いずれの骨組織にも投与30分後に血漿中の放射能濃度の10倍以上の放射能が分布し、その後も放射能濃度は増加した. 大腿骨、脛骨、上腕骨、頭蓋冠および椎骨の最高放射能濃度はそれぞ

れ381.4 $\pm$ 24.6, 359.7 $\pm$ 57.1, 399.5 $\pm$ 26.0, 246.9 $\pm$ 40.2および682.7 $\pm$ 74.7 ng eq./g であった. 頭蓋冠に分布する放射能は長管骨に比較して有意に低濃度であり、椎骨に分布する放射能は長管骨に比較して有意に高濃度であった ($p<0.05$, t 検定). 放射能濃度の半減期は長管骨では189~224日、頭蓋冠および椎骨ではそれぞれ350~216日であった. 一方、放射能量としての半減期は、長管骨では232~291日、頭蓋冠および椎骨ではそれぞれ549および356日であった.

8. 30週齢ラットにおける尿糞中排泄

30週齢の雄性ラットに [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を静脈内投与したときの投与量に対する尿および糞中への放射能の累積排泄率を **Fig. 4** に示した. 投与された放射能は投与後7日までに尿および糞中にそれぞれ投与量の43.9および2.5%が排泄され、その大部分は投与後12時間以内に排泄された.

9. 胎仔移行性

妊娠19日目のラットに [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を単回静脈内投与したのちの母獣軟組織中および胎仔中放射能濃度を **Table VII** に、また母獣の骨組織中放射能濃度を **Table VIII** に示した. 表中の数値は組織重量 1 g 中または血液、血漿、羊水 1 ml 中の放射能量を alendronate に換算した ng eq./g または ng eq./ml として表示した.

投与15分後に血漿中よりも高濃度の放射能が

Table V Concentration of radioactivity in bones after intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to 30-week old rats

Bone	Concentration of radioactivity (ng eq. of alendronate/g)								
	30 min	2 hr	8 hr	24 hr	72 hr	30 day	60 day	90 day	180 day
Femor	282.6 $\pm$ 83.3	352.3 $\pm$ 51.8	364.2 $\pm$ 31.8	373.8 $\pm$ 23.2	369.6 $\pm$ 67.0	381.4 $\pm$ 24.6	276.7 $\pm$ 19.7	227.7 $\pm$ 31.4	222.2 $\pm$ 37.7
Tibia	275.0 $\pm$ 98.0	319.8 $\pm$ 37.3	343.4 $\pm$ 37.4	332.5 $\pm$ 15.8	359.7 $\pm$ 57.1	340.1 $\pm$ 24.9	235.5 $\pm$ 23.9	220.2 $\pm$ 49.0	199.2 $\pm$ 33.4
Humerus	313.5 $\pm$ 104.7	351.0 $\pm$ 49.3	399.5 $\pm$ 26.0	389.4 $\pm$ 11.6	396.2 $\pm$ 48.8	375.4 $\pm$ 27.6	275.9 $\pm$ 19.6	232.0 $\pm$ 34.5	222.4 $\pm$ 23.1
Calvaria	173.9 $\pm$ 67.2	206.3 $\pm$ 21.9	216.1 $\pm$ 51.0	212.9 $\pm$ 32.5	246.9 $\pm$ 40.2	153.0 $\pm$ 24.9	147.7 $\pm$ 17.4	149.4 $\pm$ 26.5	147.9 $\pm$ 14.8
Vertebra	490.0 $\pm$ 161.2	542.5 $\pm$ 73.3	660.8 $\pm$ 131.7	682.7 $\pm$ 74.7	610.7 $\pm$ 52.8	581.6 $\pm$ 35.5	487.1 $\pm$ 26.0	417.4 $\pm$ 64.5	377.1 $\pm$ 79.5

Mean $\pm$ S.D. (n=4)**Table VI** Content of radioactivity in bones after intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to 30-week old rats

Bone	Content of radioactivity (ng eq. of alendronate)								
	30 min	2 hr	8 hr	24 hr	72 hr	30 day	60 day	90 day	180 day
Femor	244.6 $\pm$ 68.9	309.6 $\pm$ 50.7	325.6 $\pm$ 37.1	295.0 $\pm$ 17.6	344.1 $\pm$ 88.1	352.4 $\pm$ 11.5	261.0 $\pm$ 53.4	236.6 $\pm$ 34.5	228.3 $\pm$ 24.9
Tibia	182.1 $\pm$ 70.2	210.5 $\pm$ 26.5	236.6 $\pm$ 23.8	205.1 $\pm$ 11.9	256.3 $\pm$ 44.5	243.0 $\pm$ 33.4	170.0 $\pm$ 35.8	173.2 $\pm$ 24.7	151.7 $\pm$ 11.7
Humerus	117.9 $\pm$ 38.6	135.8 $\pm$ 19.4	153.7 $\pm$ 15.2	137.2 $\pm$ 3.9	162.3 $\pm$ 16.9	157.8 $\pm$ 17.3	121.2 $\pm$ 20.9	109.1 $\pm$ 9.0	106.2 $\pm$ 3.5
Calvaria	32.2 $\pm$ 11.6	37.6 $\pm$ 6.1	39.4 $\pm$ 5.6	35.8 $\pm$ 3.3	41.7 $\pm$ 2.3	25.9 $\pm$ 2.9	28.0 $\pm$ 6.7	32.9 $\pm$ 3.1	33.3 $\pm$ 4.5
Vertebra	382.8 $\pm$ 146.6	476.5 $\pm$ 60.4	557.9 $\pm$ 28.8	544.4 $\pm$ 38.9	547.4 $\pm$ 64.4	559.7 $\pm$ 45.7	457.2 $\pm$ 67.7	428.8 $\pm$ 44.9	398.5 $\pm$ 46.2

Mean $\pm$ S.D. (n=4)

Fig. 4 Urinary and fecal excretion of radioactivity after intravenous administration of [¹⁴C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to 30-week old rats (Mean±S.D., n=4)

Table VII Concentration of radioactivity in tissues after intravenous administration of [¹⁴C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to pregnant rats

Tissue	Concentration of radioactivity (ng eq. of alendronate/g or ml)				
	15 min	30 min	2 hr	8 hr	24 hr
Blood	49.73±8.96	24.26±1.88	1.78±0.03	n.d.	n.d.
Plasma	97.55±15.95	44.15±1.67	2.51±0.23	0.53±0.14	n.d.
Brain	1.76±0.38	1.19(n=2)	1.61(n=2)	n.d.	n.d.
Heart	13.27±1.96	11.04±0.82	3.11±0.70	n.d.	2.24(n=2)
Lung	28.71±7.59	18.38±2.25	5.56±0.53	2.88±0.58	3.28±0.77
Liver	13.41±8.36	10.55±0.92	4.78±0.76	6.04±0.76	3.99±0.55
Spleen	12.78±2.06	8.46±0.63	4.11±0.57	4.29±0.26	4.38(n=2)
Kidney	289.50±10.18	109.80±25.64	27.00±1.43	25.07±6.96	18.43±2.88
Adrenal	10.74±2.72	10.01±1.44	3.20±1.63	2.59(n=2)	1.45(n=2)
Placenta	45.44±3.38	37.51±6.81	26.74±1.88	16.51±2.50	13.31±1.48
Ovary	41.55±9.09	20.64±3.56	14.04±4.24	12.72(n=2)	23.57±14.63
Uterus	22.24±4.43	24.93±1.19	8.40±0.45	7.01±1.97	3.58±0.52
Amnion	5.88±0.57	7.64±0.66	13.01±6.06	18.74±5.78	18.55±2.33
Aminion fluid	0.35±0.19	0.52±0.37	0.21(n=2)	n.d.	n.d.
Fetal head	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fetal body	n.d.	3.10(n=2)	n.d.	n.d.	n.d.

Mean±S.D. (n=3)

Table VIII Concentration of radioactivity in bones after intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to pregnant rats

Tissue	Concentration of radioactivity (ng eq. of alendronate/g)				
	15 min	30 min	2 hr	8 hr	24 hr
Femur	433.0 $\pm$ 63.6	558.5 $\pm$ 87.9	658.2 $\pm$ 38.0	642.4 $\pm$ 39.3	651.2 $\pm$ 38.5
Tibia	361.6 $\pm$ 77.2	479.6 $\pm$ 82.4	561.4 $\pm$ 37.0	537.2 $\pm$ 52.3	592.1 $\pm$ 38.7
Humorous	471.4 $\pm$ 58.5	582.6 $\pm$ 93.7	696.1 $\pm$ 23.7	664.9 $\pm$ 18.0	701.7 $\pm$ 9.6
Calvaria	175.0 $\pm$ 22.4	186.6 $\pm$ 26.1	222.4 $\pm$ 23.7	206.2 $\pm$ 3.9	231.6 $\pm$ 27.2
Vertebra	651.1 $\pm$ 88.2	755.5 $\pm$ 90.8	934.1 $\pm$ 14.0	822.8 $\pm$ 169.2	956.3 $\pm$ 47.2

Mean $\pm$ S.D. (n=3)

分布した軟組織は腎臓のみであり、他の軟組織の放射能濃度はすべて血漿より低値であった。また、各母獣軟組織からの放射能の消失は速やかであった。胎仔頭部、胎仔体部ではいずれもほとんどの測定時点で放射能は検出されなかった。

母獣の骨組織には投与後15分に血漿中よりも高濃度の放射能が分布し、それ以降も放射能濃度は増加した。大腿骨、脛骨、上腕骨、頭蓋冠および椎骨の最高放射能濃度はそれぞれ658.2 $\pm$ 38.2, 592.1 $\pm$ 38.7, 701.7 $\pm$ 9.6, 231.6 $\pm$ 27.2 および 956.3 $\pm$ 47.2 ng eq./g であり、椎骨、長管骨、頭蓋冠の順に高値を示した。

10. 妊娠ラットの全身オートラジオグラフィー

妊娠19日目のラットに [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を静脈内投与したのち、15, 30分および24時間の全身オートラジオグラムをそれぞれ Fig. 5 に示した。投与後15および30分で、母獣骨組織および気管の軟骨に高い放射能の分布が認められた。次いで腎臓、肝臓、胎盤および血液に比較的高い放射能が検出された。胎仔中には放射能は検出されなかった。投与後24時間でも母獣骨組織および気管の軟骨に高い放射能の分布が認められた。それ以外では腎臓の皮質および胎盤にわずかな放射能が認められたのみで、他の組織および胎仔には放射能は認められなかった。

11. 乳汁移行性

出産14日目のラットに [^{14}C]-alendronate

0.05 mg/kg を静脈内投与したのちの母獣の血漿中および乳汁中の放射能濃度を Fig. 6 に示した。表中の数値は血漿および乳汁中の放射能濃度を alendronate に換算した ng eq./ml として表示した。投与後15分で乳汁中の放射能濃度は血漿中放射能濃度の約10%であったが、投与後30分以降は血漿中より高値を示した。血漿中放射能濃度が検出限界値以下になった2時間以降も乳汁中の放射能は検出され、投与4時間に最高値 (28.4 ng eq./ml) を示した。

考 察

7週齢の雄性ラットに [^{14}C]-alendronate を1日1回7日間反復静脈内投与したとき、血漿中放射能濃度は単回投与後⁸⁾に比較して高濃度で推移したが、その消失半減期は単回と同様であった。多くの軟組織中の放射能濃度も単回投与後に比べて高濃度でありその消失もやや遅延したが、気管以外に顕著な蓄積性を示す組織はなかった。気管には高濃度の放射能が分布し長時間滞留した。反復投与後の骨組織中の最高放射能濃度は単回投与後に比較して6.2から7.5倍であり、投与回数に相当した増加を示した。骨組織中の放射能濃度が椎骨>長管骨(大腿骨、脛骨、上腕骨)>頭蓋冠の順となることおよび各骨組織からの放射能の消失速度は単回投与後と同様であった。また、反復投与後の総投与量に対する放射能の尿中排泄率も単回投与と差異がなかった。以上のことから、単回投与に比較して反復投与による alen-

(1) 15 min

(2) 30 min

Fig. 5a Whole body autoradiogram after single intravenous administration of $[^{14}\text{C}]$ -alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to female rats on day 19 of pregnancy
 (1) : 15 min (2) : 30 min

(3) 24 hr

Fig. 5b Whole body autoradiogram after single intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to female rats on day 19 of pregnancy (3) : 24 hr

Fig. 6 Concentration of radioactivity in milk and plasma after intravenous administration at a dose of 0.05 mg/kg to lactating rats (Mean $\pm$ S.D., $n=3$)

dronate の体内動態の変化は少ないものと推察された。

30週齢の雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate を静脈内投与したときの血漿中放射能濃度は7週齢ラットに比較して高濃度で推移し、AUC も約2倍高値を示した。また、肝臓、腎臓、脾臓および心臓中の放射能濃度も7週齢に比較して高値を示し、放射能の尿糞中排泄率も7週齢ラットに比較して高値を示した。しかし、長管骨（大腿骨、脛骨、上腕骨）、椎骨および頭蓋冠中の最高放射能濃度は7週齢ラットに比較してそれぞれ0.4~0.5, 0.6および1.0倍と、頭蓋冠を除いて有意に低値を示した（ t 検定； $p < 0.01$ ）。各骨組織中の放射能濃度は7週齢ラットと同様に椎骨、長管骨、頭蓋冠の順に高値を示したが、その差は7週齢ラットに比較して少なかった。これらの結果から、30週齢ラットでは加齢に伴う骨代謝回転の低下によって長管骨および椎骨中の放射能濃度が減少したため、各骨組織間の濃度差が小さくなり、更に血漿、軟組織中濃度および尿中排泄率が増加したと推察された。

妊娠19日目の雌性ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate を0.05 mg/kg 静脈内投与したときの血漿中放射能は、雄性ラット同様速やかに消失した。胎盤中の放射能濃度は血漿中放射能が検出限界値以下になった投与後24時間でも 13.31 ± 1.48 ng eq./gを示したが、胎仔頭部および胎仔体部の放射能分布は検出限界以下であった（Table VI）。したがって胎盤を通過して胎仔に移行する放射能は非常に少なく、alendronate の胎仔への移行には血液—胎盤関門による阻止能が働いているものと考えられた。

要 約

7週齢ラットに $[^{14}\text{C}]$ -標識した alendronate を1日1回7日間反復静脈内投与したのちおよび30週齢ラットに単回静脈内投与したのちの血中動態、分布および排泄について検討した。更に、単回静脈内投与したのちの胎仔移行性および乳汁移行性について検討した。

1. 7週齢ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kg を1日1回7日間反復投与したときの血漿中放射能濃度は単回投与に比較してやや高濃度で推移したが、その消失パターンは同様であった。石灰化していない組織中の放射能濃度は単回投与に比較して高値で推移したが、顕著な蓄積性を示す組織はなかった。骨組織中の最高放射能濃度は単回投与に比較してほぼ投与回数に比例した増加を示した。骨組織の中では椎骨に最も高濃度の分布を示し、次いで長管骨、頭蓋冠の順であった。最終投与後24日までの尿および糞中累積放射能排泄率はそれぞれ32.2および2.1%であった。これらの結果から alendronate の体内動態の反復投与による変化は少ないと推察された。

2. 30週齢ラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kg を単回投与したときの血漿中放射能濃度のAUCは7週齢ラットに比較して約2倍高値を示した。肝臓、腎臓、脾臓および心臓中の放射能濃度も7週齢に比較して高値を示した。30週齢ラットにおける頭蓋冠中の最高放射能濃度は7週齢ラットと同様であったが、椎骨および長管骨中では7週齢ラットの約50%であった。したがって、30週齢ラットにおける各々の骨組織の放射能濃度の差は7週齢に比較して少なかった。投与後216時間までの尿中累積放射能排泄率は46%であり、7週齢ラットに比較して高値であった。これらの結果から、30週齢ラットでは骨代謝回転速度の低下に伴う alendronate の骨への取り込みの減少によって、血漿中、軟組織中放射能濃度および尿中放射能排泄が増加したと推察された。

3. 妊娠19日のラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kg を単回投与したときの血漿中放射能濃度推移は雄性ラットに単回投与したときと同様であった。投与後24時間でも胎盤中に放射能が検出されたが、胎仔中の放射能は検出限界以下であった。

4. 出産後14日のラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate 0.05 mg/kg を単回投与したときの乳汁中放射能濃度は投与後30分以降血漿中よりも高濃度であ

り、乳汁への放射能の移行が認められた。

文 献

- 1) Douglas, D. L., Russell, R. G. G., Preston, C. J., Preston, M. A. T., Duckworth, T., Kanis, J. A., Preston, F. E. and Woodhead, S. J.: Effect of dichloromethylene disphosphonate in Paget's disease of bone and in hypercalcaemia due to primary hyperparathyroidism or malignant disease. *Lancet*, **1**: 1043-1047 (1980).
- 2) Johnston, C. C., Khairi, M. R. A. and Meunier P. J.: Use of etidronate (EHDP) in Paget's disease of bone. *Arthritis Rheum.*, **23**: 1172-1176 (1980).
- 3) Fleisch, H.: Experimental basis for the clinical use of diphosphonates in Paget's disease of bone. *Arthritis Rheum.*, **23**: 1162-1171 (1980).
- 4) Fleisch, H. and Felix, R.: *Diphosphonates Calcif. Tissue Int.*, **27**: 91-94 (1979).
- 5) Fleisch, H.: Bisphosphonate: mechanisms of action and clinical application. In "Bone and Mineral Research," Vol. 1 (W. A. Peck, ed.), pp. 319-357. Excerpta Medica, Amsterdam (1983).
- 6) Attardo-Parrinello, G., Merlini, G., Pavesi, F., Crema, F., Fiorentini, M. L. and Ascari, E.: Effects of a new aminodiphosphonate (aminohydroxybutylidene diphosphate) in patients with osteolytic lesions from metastases and myelomatosis: comparison with dichloromethylene diphosphonate. *Arch. Intern. Med.*, **147**: 1629-1633 (1987).
- 7) Adami, S., Salvagno, G., Guarrera, G., Montesanti, F., Garavelli, S., Rosini, S., and Lo Cascio, V.: Treatment of Paget's disease of bone with intravenous 4-amino-1-hydroxybutylidene-1, 1-bisphosphonate. *Calcif. Tissue Int.*, **39**: 226-229 (1986).
- 8) 望月 勉, 西村真一, 岡部宏一郎, 東 由明, 工藤 諭, 石井成幸, 太田知裕, 近藤史郎, 清木 護: 4-Amino-1-hydroxybutylidene-1, 1-bisphosphonate (alendronate) の体内動態 (第1報) ラットにおける単回静脈内投与時の血中濃度, 分布および排泄. 薬物動態, **10**(2): 161-173 (1995).
- 9) Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. and Uno, T.: A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharm. Dyn.*, **4**: 879-885 (1981).