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

の体内動態研究 (第3報):

ビーグル犬における血中濃度, 骨内分布および排泄

望月 勉・岡部宏一郎・梅田 晋・工藤 諭*
原川 則子*・石井 成幸*・近藤 史郎・清木 護

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

Plasma Concentration, Distribution in Bone and Excretion after Intravenous Administration to Beagle Dogs

Tsutomu MOCHIZUKI, Koichiro OKABE, Shin UMEDA, Satoshi KUDO*,
Noriko HARAKAWA*, Shigeyuki ISHII*, Shiro KONDO, Mamoru KIYOKI

*Pharmacological Research Department, Pharmaceuticals Development Research Laboratories,
Teijin Insititute 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, bone distribution, and excretion after single intravenous administration of [^{14}C]-alendronate to beagle dogs were investigated.

1. The levels of plasma radioactivity after administration of 0.05 mg/kg of [^{14}C]-alendronate to beagle dogs declined triphasically, and the half-life of each phase was 25 minutes, 1.6 and 12.2 hours, respectively.

2. The cumulative excretion rates of radioactivity within 168 hours after administration of [^{14}C]-alendronate was 36% of dose in urine and 8% in feces. Radioactivity was mainly excreted in the urine as in the case of rats, and the excretion in urine was almost completed in 24 hours after administration.

3. The levels of radioactivity in bones at 168 hours after administration of 0.05 mg/kg of [^{14}C]-alendronate was 248.9 to 391.7 ng eq./g in vertebra and long bones, and 40.0 ng eq./g in calvaria. The difference of the concentration among bones was observed as in the case of rats. The autoradiography of the long bones revealed the higher level of radioactivity in the epiphysis and metaphysis than that in the diaphysis. High levels of radioactivity were observed along the growth plate of the long bone. On the basis of these results, it is suggested that alendronate is distributed in bones, especially in the high turnover region.

Key words : Alendronate, Bisphosphonate, Dog, Plasma concentration, Distribution, Excretion

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

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¹⁻³⁾の治療に有効な合成有機化合物である。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。

我々はラットに $[^{14}\text{C}]$ -alendronate を静脈内投与したときの血漿中動態、分布および排泄について既に報告した^{8,9)}。今回、 $[^{14}\text{C}]$ -alendronate をイヌに静脈内投与して血漿中濃度推移、骨中への放射能の分布および尿糞中排泄を検討したので報告する。

実験材料および実験方法

1. 標識化合物および試薬

^{14}C による標識化合物 ($[^{14}\text{C}]$ -alendronate) は、前報⁸⁾と同様のものを使用した。比放射能は 7.40 MBq/mg であり、放射化学的純度は 98.5% であった。

2. 実験動物

ビーグル犬 (雄性, Hazelton Research P, VA, USA, 8ヵ月齢, 入荷時体重 9.7~10.6 kg) を実験に供した。約 1ヵ月間の馴化飼育を経たのちに試験に供した。馴化飼育期間および試験期間を通してビーグル犬を温度 23.0~24.4°C, 湿度 49~57% および照明時間 12 時間 (6:00~18:00 点灯) に調節された飼育室で、1 ケージ当たり 1 匹ずつ収容し、固形試料 (DS-5, オリエンタル酵母) を 1 日 1 回および水道水を自由摂取させた。

3. 投与液の調製および投与方法

$[^{14}\text{C}]$ -alendronate をリン酸緩衝生理食塩水 (pH. 7.2) に溶解して、0.05 mg/ml の投与液を調製し、3 頭のビーグル犬に 1 ml/kg の投与液量で上腕静脈より投与した (投与放射能 370 kBq/kg)。

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-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た。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

$[^{14}\text{C}]$ -alendronate の投与後 5, 15, 30 分, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 168 時間に投与部位と反対側の上腕静脈より、ヘパリン処理を施したガラス注射器を用いて採血した。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. 骨中放射能の測定

$[^{14}\text{C}]$ -alendronate の投与後 168 時間にネプタール®を用いてビーグル犬を麻酔し、頸動脈より放血させて致死せしめた。速やかに両脚より大腿骨および脛骨を、両腕より上腕骨を、頭部より頭蓋冠を摘出した。また、腹部の筋肉および内臓を除去し、椎骨 (第 2~5 腰椎) を摘出した。大腿骨、脛骨および上腕骨の左側、頭蓋冠および第 3~5 腰椎を 0.2 N 水酸化カリウム水溶液中で室温に 7 日間、更に 37°C に 3 日間放置して、付着した肉片を溶解除去した。更に骨組織をエタノールおよびエーテル中に浸し脱水処理したのち、室温にて乾燥した。乾燥した骨を 3~4 g に切断し、個々の骨片の重量を測定した。骨片を更に 1 cm 大の大きさに破碎し、6 N 塩酸を加え 37°C で約 1 週間放置して溶解した。骨溶解液の一部を採り、親水性シンチレータ (0.4% オムニフロー®; New England Nuclear, 40% エチレングリコールモノエチルエーテル, 60% トルエン) を加えて放射

能を測定した。

結 果

7. 尿糞中排泄率の測定

[^{14}C]-alendronate を投与したビーグル犬をステンレス製代謝ケージ（日本ケージ）に収容し、投与後 6, 12, 24 時間、それ以降 168 時間まで 24 時間毎に尿および糞を分別採取した。前報に従って尿および糞を処理し、放射能を測定した。

8. 骨のオートラジオグラフィ

[^{14}C]-alendronate の投与後 168 時間の大腿骨、脛骨、上腕骨の右側および第 2 腰椎を、4 % カルボキシメチルセルロースナトリウムに包埋し、凍結ブロックを作製した。前報に従って 30 μm 厚の凍結切片を作製し、X 線フィルム（Hyperfilm- β max, Amersham）と 40 日間密着させ、オートラジオグラムを作製した。

1. 血漿中放射能濃度の推移

ビーグル犬に [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を静脈内投与したときの血漿中放射能濃度は投与後 5 分で 119.3 ± 60.9 ng eq./ml、投与後 24 時間で 0.34 ± 0.01 ng eq./ml であったが、48 時間以降は検出限界以下となった（Fig. 1）。血漿中放射能濃度推移の薬物速度論的パラメーターは最小二乗法プログラム MULTI¹⁰ を用い 3-exponential 式に当てはめて計算した。AUC_{0- ∞} は得られた式から計算した。血漿中放射能濃度の半減期は 25 分、1.6 および 12.2 時間で、AUC_{0- ∞} は 112.4 ng eq.·hr/ml であった。

2. 尿糞中排泄率

ビーグル犬に [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を静脈内投与したのちの尿および糞中累積放射能

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

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

排泄率を Fig. 2 に示した。投与後24時間までに投与量の $31.1 \pm 9.4\%$ が尿中に、 $2.4 \pm 1.8\%$ が糞中に排泄された。投与後168時間までに尿中および糞中に排泄された放射能は投与量のそれぞれ $35.5 \pm 10.4\%$ 、 $7.5 \pm 0.2\%$ であり、放射能の総回収量は $42.9 \pm 10.2\%$ であった。

3. 骨組織中放射能濃度

ビーグル犬に [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を静脈内投与したのち168時間の骨組織中放射能

Table I Concentration of radioactivity in bones at 168 hr after intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to male beagle dogs

Bone	Concentration of radioactivity (ng eq. of alendronate/g)
Femur	297.0 ± 7.5
Tibia	248.9 ± 97.4
Humerus	365.2 ± 65.4
Calvaria	40.0 ± 23.6
Verebra	391.7 ± 110.2

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

濃度を Table I に示した。表中の数値は乾燥骨組織 1 g 放射能量を alendronate に換算した ng eq./g として表示した。大腿骨、脛骨、上腕骨、頭蓋冠および椎骨の放射能濃度はそれぞれ 297.0 ± 7.5 、 248.9 ± 97.4 、 365.2 ± 65.4 、 40.0 ± 23.6 および 391.7 ± 110.2 であり、頭蓋冠の放射能濃度は他の骨組織に比較して低値であった。

4. 骨のオートラジオグラフィー

ビーグル犬に [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を静脈内投与したのち168時間の長管骨（大腿骨、脛骨および上腕骨）のオートラジオグラムを Fig. 3 に、椎骨のオートラジオグラムを Fig. 4 にそれぞれ示した。長管骨では骨幹部（diaphysis）より骨幹端（metaphysis）および骨端部（epiphysis）に高い放射能の分布が認められ、特に成長板（growth plate）に沿って高い放射能分布が認められた。骨髄の放射能分布はバックグラウンドとほぼ同等であり、検出限界以下であった。椎骨では椎体上下端（epiphysis of corpus vertebra）に高い放射能分布が認められた。

(A) Femur

(B) Tibia

(C) Humerus

Fig. 3 Autoradiogram of long bones at 168 hr after intravenous administration of $[^{14}\text{C}]$ -alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to male beagle dog

Epiphysis of corpus vertebra

Fig. 4 Autoradiogram of vertebra at 168 hr after intravenous administration of [^{14}C]-alendronate at a dose of 0.05 mg/kg to male beagle dog

考 察

ビーグル犬に [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を静脈内投与して血漿中放射能濃度推移、尿糞中排泄および骨中への放射能の分布を検討した。alendronate はピロリン酸のアナログであるビスフォスホン酸誘導体 (Fig. 1) で P-C-P 構造を有し、この P-C-P 構造は他のビスフォスホン酸誘導体 pamidronate および etidronate と同様に酵素的な加水分解を受けない¹¹⁾。血漿、骨組織および尿中の放射能を HPLC で分析した結果では、ほとんどの放射能が未変化体画分に回収され、代謝物は見いだされなかった (data not shown)。

ビーグル犬に [^{14}C]-alendronate を投与したのちの血漿中放射能は 3 相性の消失を示した。半減期はそれぞれ 25 分、1.6 および 12.2 時間であり、ラットの結果⁸⁾に比較すると放射能の消失は遅延していた。

[^{14}C]-alendronate の投与後 168 時間までに尿中へ $35.5 \pm 10.4\%$ 、糞中へ $7.5 \pm 0.2\%$ の放射能が排泄され、尿中の放射能のほとんどは投与後 24 時間までに排泄された。今回の結果は Lin¹²⁾らの

結果に一致するものであり、イヌにおける alendronate の主排泄経路もラットと同様に腎臓を介した尿中であることが確認された。投与後 168 時間までの放射能総排泄量は投与量の 43% であり、残りの放射能は体内に残存しているものと考えられた。ラットの組織内分布の結果では、alendronate は骨および軟骨等の石灰化組織に高濃度に分布することが明らかにされている。そこで、排泄試験終了後のイヌの骨中の放射能を測定したところ、投与後 5 分における血漿中濃度より高濃度の放射能が分布していることが明らかとなった。これらのことより、投与後 168 時間でイヌの体内に残存する放射能の多くは骨に分布しているものと推定された。

骨に分布する放射能の濃度は骨の種類によって異なり、頭蓋冠では他の骨に比較して有意に低値を示した。ラットにおいても同様の傾向が観察されており、頭蓋冠の骨代謝回転速度が他の骨に比較して低いために alendronate の分布が低くなったと推察された。骨内の放射能分布をオートラジオグラフィーによって検討したところ、長管骨 (Fig. 3) では骨幹部 (diaphysis) より骨幹部 (metaphysis) および骨端部 (epiphysis) に高レベルの放射能の分布が観察され、特に成長板に沿って高い放射能の分布が観察された。椎骨 (Fig. 4) では椎体の上下端 (epiphysis of corpus vertebra) に高レベルの放射能分布が観察された。長管骨の成長板および椎体の上下端では骨代謝回転が速く^{13,14)}、alendronate が骨代謝回転の速い組織により高レベルに分布することが示唆された。

今回の結果からイヌにおいてもラット同様 alendronate は血漿中からの消失は速いが、骨組織に高い親和性を示し、特に骨代謝回転が速い組織に高濃度で分布することが明らかとなった。

要 約

ビーグル犬に [^{14}C]-alendronate 0.05 mg/kg を単回静脈内投与したのちの血中動態、骨中分布、代謝および排泄について検討した。

1. ビーグル犬に $[^{14}\text{C}]$ -alendronate を単回静脈内投与したのちの血漿中放射能濃度は3相性の消失を示し、各相の半減期はそれぞれ25分、1.6および12.2時間であった。

2. ビーグル犬に $[^{14}\text{C}]$ -alendronate を単回静脈内投与したのち168時間までの尿糞中累積放射能排泄率はそれぞれ36および8%であり、尿中の放射能のほとんどは投与後24時間までに排泄された。

3. ビーグル犬に $[^{14}\text{C}]$ -alendronate を単回静脈内投与したのち168時間の長管骨中の放射能濃度は249から365 ng/g であり、頭蓋冠および椎骨中の放射能濃度はそれぞれ40および392 ng/g であった。ラット同様骨の種類によって放射能濃度の差が認められた。長管骨のオートラジオグラフィでは、骨幹部に比べ骨幹部および骨端部に高い放射能分布が見られ、特に成長板に沿って最も高い放射能分布が観察された。

文 献

- 1) Douglas, D. L., Russell, R. G. G., Preston, C. J., Preston, M. A., Duckworth, T., Kanis, J. A., Preston, F. E. and Woodhead, S. J.: Effect of dichloromethylene diphosphonate 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) 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: 4-Amino-1-hydroxybutylidene-1, 1-bisphosphonate (alendronate) の体内動態 (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, 分布および排泄, および雌性ラットにおける胎仔移行性, 乳汁移行性. 薬物動態, **10**(2): 174-189 (1995).
- 10) Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. and Uno, T.: A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharm. Dyn.*, **4**: 879-885 (1981).
- 11) Fleisch, H.: Chemistry and mechanism of action of bisphosphonates. In "Bone Resorption, Metastasis, and Diphosphonate" (S. Garattini, ed.), pp. 33-40, Raven Press, New York (1985).
- 12) Lin, J. H., Duggan, D. E., Chen, I-W. and Ellsworth, R. L.: Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. *Drug Metabolism and Disposition*, **19**(5): 926-932 (1991).
- 13) 藤田拓男, 吉本祥生編: 骨形態計測 vol. 7 骨の測定, 西村書店 (1990).
- 14) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明: 骨の科学, 医歯薬出版 (1985).