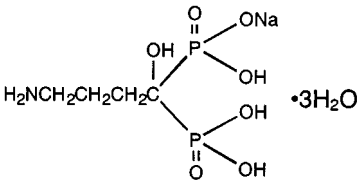


水．薬理作用

目 次

	頁
1．効力を裏付ける薬理試験	153
総括	153
(1) 骨吸収抑制の作用機序	161
1) 破骨細胞の Na^+ 非依存性 H^+ 放出に対する作用	163
2) 破骨細胞の蛋白チロシンフォスファターゼに対する作用	164
3) 骨における分布	165
4) 骨髄除去ラットにおける骨髄腔での骨形成と骨吸収に対する作用	169
(2) 骨量減少及び骨強度に対する作用	170
1) 卵巣摘出ラット	171
2) 卵巣摘出ヒヒ	178
3) 不動化ラット	188
4) 甲状腺ホルモン誘発ラットモデル	190
5) 卵巣摘出ラットにおける投与頻度による作用の比較	192
(3) 正常動物の骨に対する影響	193
1) 正常イヌにおける3年間経口投与試験	193
(4) 骨折修復に対する影響	197
1) 骨折イヌにおける25週間経口投与試験	197
(5) 動物を用いた薬効薬理試験のまとめ	199

ホ．薬用作用の項の略号表

略 号 (略称)	化 学 名 (一般名)	構 造 式	由来
アレンドロネート ALN	monosodium 4-amino-1-hydroxybutylidene-1, 1-diphosphonate trihydrate JAN : アレンドロン酸ナトリウム 水和物 alendronate sodium hydrate r-INN : alendronic acid (フリー体)		原薬

略 号	名 称
エチドロネート ETDN	エチドロロン酸二ナトリウム (ビスホスホネート系化合物)

水．薬理作用

1．効力を裏付ける薬理試験

総 括

骨粗鬆症とは加齢とともに、骨吸収と骨形成のバランスが崩れ、相対的に骨吸収が優位になったために、骨量の減少が起こり、更に骨の微細構造の変化により骨の強度が低下し、骨折が起こりやすくなる病態である¹⁾。アレンドロネートは、本疾患に対する治療を目的として開発された新規のビスホスホネート系薬剤である。なお、効力を裏付ける薬理試験の概略を表水 - 1 に示した。また、本項でのアレンドロネートの投与量は、特に断りのない限り、アレンドロン酸換算値として示す。

作用機序

骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成という、骨代謝回転（骨リモデリング）を常に受けており、骨吸収が骨形成を上回った状態が続くことにより、骨量減少が起こる。骨吸収の主体である破骨細胞は、骨吸収面に接着した後、組織学的に明帯と呼ばれる領域を作り、その内部に周囲から閉鎖された環境を形成する。破骨細胞は、骨側の細胞膜を波状縁という特異な構造に変化させ、波状縁を介して各種蛋白分解酵素とともに水素イオンを放出する。このため酸性となった閉鎖環境において骨のハイドロキシアパタイトの溶解及び骨有機基質の分解が起こり、破骨細胞に吸収される。

アレンドロネートは、破骨細胞下の骨吸収面に特異的な分布を示し、中性条件下（pH7.0）ではハイドロキシアパタイトに強く結合しているが、酸性条件下になるとpH依存的に遊離する^{2, 3, 4)}。すなわち、アレンドロネートは、破骨細胞により作られる酸性の閉鎖環境下で遊離し、破骨細胞に選択的に作用するものと考えられている^{2, 3, 4)}。アレンドロネートを投与されたラットの骨面における破骨細胞には、活性化破骨細胞にみられる波状縁が認められないこと²⁾、及び培養破骨細胞からの水素イオンの放出抑制がみられることから破骨細胞の骨吸収活性をアレンドロネートが抑制していることが示唆されている⁵⁾。

蛋白チロシンキナーゼc-Srcは、本酵素のノックアウトマウスを用いた試験結果から破骨細胞の骨吸収活性に必須の酵素であることが示されている⁶⁾。近年、アレンドロネートは蛋白チロシンフ

1) 厚生省・骨粗鬆症用薬の臨床評価法ガイドライン作成に関する研究班：骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドライン（案）（改訂1版）平成7年6月30日

2) Sato, M. *et al.* : Bisphosphonate action-Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure, J. Clin. Invest. 88 : 2095-2105, 1991

3)

4) Azuma, Y. *et al.* : Effect of alendronate on plasma calcium levels, urinary calcium excretion, and bone resorption markers in normal rats, Comparison with elcatonin, synthetic eel calcitonin, Endocrinology 137 : 2586-2592, 1996

5) Azuma, Y. *et al.* : Alendronate distributed on bone surface inhibits osteoclastic bone resorption *in vitro* and experimental hypercalcemia models, Bone 16 : 235-245, 1995

6) Boyce, B.F. *et al.* : Requirement of pp60^{csrc} expression for osteoclasts to form ruffled borders and resorb bone in mice, J. Clin. Invest. 90 : 1622-1627, 1992

ォスファターゼ（PTP）活性を抑制することが明らかとなった⁷⁾。PTPは、c-Src活性の制御に関連することから、破骨細胞の活性化に関与している可能性が考えられる。

骨面に残存したアレンドロネートの上には、新たに骨が形成されることがマイクロオトラジオグラムにより示された⁸⁾。ラット脛骨の骨髓を除去すると、一過性に海綿骨が形成された後、海綿骨は吸収され骨髓が再生する⁷⁾。このモデルにおいて、アレンドロネートは、骨髓腔内での海綿骨形成には影響を与えず、その後の骨吸収のみを抑制した⁸⁾。これらの結果から、アレンドロネートは骨形成に直接影響を与えないことが示された。

このように、アレンドロネートは骨吸収面に特異的に分布し、破骨細胞により形成される酸性条件下で閉鎖環境に遊離することで、破骨細胞に選択的に作用し、水素イオン放出の抑制や波状縁を消失させることで、破骨細胞の骨吸収活性を抑制する。これらの破骨細胞抑制機構の一つとして、破骨細胞に取り込まれたアレンドロネートが、骨吸収活性に必須の酵素活性を抑制することが考えられる。更に、アレンドロネートは骨形成には直接影響せず、アレンドロネートが分布した骨面の上に新たに骨が形成されるものと考えられた。

骨量減少に対する作用

閉経後骨粗鬆症では、エストロゲン分泌の低下により、主に骨吸収の促進と骨代謝回転の亢進に基づく骨量の減少を呈する⁸⁾。

卵巣を両側摘出しエストロゲン欠乏状態にしたラットにおいて、骨代謝回転が亢進し、骨量の減少及び骨強度の低下がみられた。この卵巣摘出骨量減少モデルにおいて、2ヵ月間あるいは1年間の経口投与で、1 mg/kg以上（2ヵ月）ないし0.5mg/kg（1年間）のアレンドロネートは、その骨吸収抑制作用に基づいて骨代謝回転を抑制し、骨量減少を抑制した⁹⁾。更に、腰椎の骨強度は、アレンドロネート0.5mg/kgの1年間経口投与により、卵巣非摘出ラットと同様の値を維持した。卵巣摘出6ヵ月後の骨量が減少しているラットに対する、週に2回、1年間のアレンドロネート皮下投与は、14 µg/kg/回で、腰椎の骨量、骨灰分重量及び骨強度を卵巣摘出溶媒処置群に比して増加させた¹⁰⁾。また、骨塩密度や骨灰分重量と腰椎の力学的強度の間には、正の相関が認められ、骨量の増加が骨強度に反映されていることが示された。

卵巣摘出を行ったヒヒ成獣に、アレンドロネート0.04及び0.19mg/kgの投与量で2週に1回、2年間静脈内投与した。卵巣摘出によって増加した血液あるいは尿の骨代謝マーカーは、アレンドロネート投与により卵巣非摘出群のレベルまで減少した¹¹⁾。アレンドロネートは卵巣摘出による腸骨稜の骨生検試料や腰椎の海綿骨量の減少、腰椎の骨梁幅の減少を抑制し、更に、皮質骨の粗鬆性の増加を皮質骨構造に影響を与えることなく抑制した¹²⁾。腰椎の骨強度にも増加が認められ、この骨強度と骨塩密度の間には、正の相関が認められたことから、骨量の増加は骨強度の増加に反映されていた。

7) Suva, L.J. *et al.* : Pattern of gene expression following rat tibial marrow ablation, J. Bone Miner. Res. 8 : 379-388, 1993

8) 松本俊夫：骨代謝における骨細胞の役割と骨粗鬆症，Prog. Med. 16 : 1916-1919, 1996

運動や体重などの負荷を取り除いたとき、すなわち、骨にかかる力学的ストレスを取り除いたときに、骨量の急激な減少と骨強度の低下がみられる⁹⁾。また、甲状腺機能亢進症¹⁰⁾や甲状腺ホルモン長期投与¹¹⁾によっても、骨代謝回転の増加と骨量の減少が起こることが知られている。アレンドロネートは、ラットにおける坐骨神経切断による後肢不動化モデル、甲状腺ホルモン誘発モデルにおける骨量減少についても抑制作用を示した。

アレンドロネートの投与頻度の骨量に与える影響を卵巣摘出ラットモデルを用いて検討した。アレンドロネートは卵巣摘出によって減少した骨量を増加させ、この作用は、総投与量が同じ場合には、投与回数が多い方がより顕著であった。

以上の骨量減少モデルにおける結果から、アレンドロネートは、エストロゲン欠乏、不動、甲状腺ホルモンによる骨吸収亢進による骨量減少を抑制し、骨強度の減少も抑制した（表ホ - 2）。投与頻度の比較試験において、総投与量が同じ場合には頻回投与でより顕著な骨量増加作用が認められた。

骨石灰化と骨折治癒に対する影響

ビスホスホネート系薬物では骨吸収抑制作用とともに骨石灰化障害作用が知られており、骨折治癒を遅延させることが報告されている¹²⁾。アレンドロネートは、卵巣摘出による骨量減少モデルにおいて、長期間投与（ラット1年、ヒヒ2年）を行っても、骨量減少を抑制する投与量では、骨石灰化障害を示唆する結果を与えていない。成長過程のラット（Schenk評価系）において、骨吸収を抑制する投与量と骨石灰化を障害する投与量を比較すると、その比は6000であり、広い安全域が示されている¹³⁾。予定臨床使用量（5 mg/man/day：約0.1mg/kg/day）の約10倍量のアレンドロネートを3年間、正常イヌに投与した試験では、微小骨折、骨軟化症を疑わせる結果は得られなかった。更に、イヌ骨折モデルにおいて、骨折前と骨折後あわせて、25週間の間、予定臨床使用量の約20倍量のアレンドロネートを投与しても、骨折治癒に影響を与えることはなかった。これらの結果は、アレンドロネートが、予定臨床使用量を大きく上回った投与量でも骨石灰化や骨折治癒に影響を与えることなく、骨量及び骨強度の減少を抑制する作用を示すものと考えられる。

類薬との比較

成長過程のラットにおける骨吸収抑制作用発現投与量のアレンドロネートは、破骨細胞下の骨吸収面に特異的に分布する。しかしながら、エチドロネートでは、骨吸収抑制作用発現投与量では、アレンドロネートにみられるような特異的分布は認められなかった。成長過程のラットを用いた試験において、骨吸収抑制と骨石灰化に影響を及ぼす投与量の比は、エチドロネートでは1であるのに対し、アレンドロネートでは6000と大きく異なった¹³⁾。卵巣摘出ラットの2ヵ月間経口投与試験

9) 楊鴻生：骨に対する運動効果と骨粗鬆症の運動療法，Prog. Med. 16：1984-1990, 1996

10) Perry, H. M. III：Thyroid hormones and mineral metabolism. Bone Miner. Res. 6：113-137, 1989

11) Franklyn, J.A. and Sheppard, M.C.：The thyroid and osteoporosis, Trends Endocrinol. Metab. 3：113-116, 1992

12) Lenahan, T.M. *et al.*：Effect of EHDP on fracture healing in dogs, J. Orthop. Res. 3：499-507, 1985

13)

における骨量減少抑制作用は、アレンドロネートでは1 mg/kg以上で認められたが、類薬のエチドロネートでは125mg/kgでみられた。また、骨石灰化障害を示唆する結果がエチドロネートにおいて得られた。更に、エチドロネートでは、イヌにおける骨折治癒の遅延が報告されているが¹²⁾、アレンドロネートでは予定臨床使用量(5 mg/man/day：約0.1mg/kg/day)の約20倍量の投与においても、イヌにおける骨折治癒に影響を与えなかった。以上のことから、アレンドロネートは、エチドロネートと比較してより強い骨吸収抑制薬であり、骨吸収抑制発現投与量での骨石灰化障害の可能性は低いことが示された。

臨床投与量と非臨床試験における薬効用量との関係

本薬は、生物学的利用率がラットでは0.95%、イヌでは1.76%、サルでは1.72%と経口吸収性が低い(p.212)。そこで、ラットを用いた初期の実験は、本薬の薬理学的性格を明らかにするために、経口吸収の影響を受けない皮下投与で実施した。また、ヒヒの実験では静脈内投与とした。ラットを用いた後期の実験では、臨床投与経路である経口投与経路で、本薬の有効性について検討した。

成長過程のラットでの骨吸収及び骨石灰化作用を比較した実験¹³⁾(Schenk評価系)において、10日間の皮下投与により、最低投与量の0.004mg/kg/day以上で骨吸収を抑制した。また、卵巣摘出ラットでは、卵巣摘出直後から3ヵ月間、月2回または8回皮下投与により、最低投与量の0.224mg/kg/month(1日あたりに換算すると、約0.008mg/kg/day)以上で、卵巣摘出6ヵ月後から1年間週2回の皮下投与では、最低投与量の1.4 µg/kg(1日あたりに換算すると、約0.0004mg/kg/day)以上で、卵巣摘出による骨量減少を抑制した。不動化ラットにおいても、2日間の皮下投与により最低投与量の0.04mg/kg/day以上で、不動による骨量減少を抑制した。ラットにおける生物学的利用率(0.95%)を用いて、これらの投与量を経口投与量に換算すると、0.04~4.21mg/kg/dayとなる。これらの皮下投与による結果をもとに、経口投与による実験は、卵巣摘出ラットでは、0.04~5 mg/kg/dayの投与量で2ヵ月間、もしくは0.1及び0.5mg/kg/dayの投与量で1年間の実験を行った。また、甲状腺ホルモン誘発骨減少ラットでは、1.34mg/kgの週2回、3週間経口投与(1日あたりの経口投与量に換算すると約0.38mg/kg/day)の実験を行った。その結果、卵巣摘出ラットでは、0.04または0.1mg/kg/dayの経口投与量より骨吸収抑制作用が認められ、0.5mg/kg/day以上で卵巣摘出による骨量減少の抑制が認められた。ヒトに比べてラットの生物学的利用率は約1/3と低いこと[日本人高齢者：2.83%、ラット：0.95%(p.222、p.212)]を考慮すると、この経口投与での骨量減少抑制発現投与量は、ヒトの予定臨床使用量(約0.1mg/kg/day)に近い。更に、卵巣摘出ヒヒにおいては、卵巣摘出直後から2年間、2週に1回の静脈内投与により、0.04mg/kg(1日あたりに換算すると約0.003mg/kg/day)で、卵巣摘出による骨量減少を抑制した。ヒヒの生物学的利用率は求められていないが、サルの1.72%の値を用いると、0.17mg/kg/dayの経口投与量に相当する。この投与量も、ヒトでの予定臨床使用量(約0.1mg/kg/day)と近接した値である。

以上のように、予定臨床使用量(約0.1mg/kg/day)とほぼ同程度の用量でラット及びヒヒを用いた各種病態モデルにおいて、本薬の薬効が認められている(表ホ-2)。

以上、アレンドロネートは、実験動物において骨石灰化、骨折治癒に影響を与えることなく、卵巣摘出、不動等による骨量及び骨強度減少を抑制する。これらの作用は破骨細胞の機能抑制に基づく骨吸収抑制作用によること、且つ、骨面に残存したアレンドロネートは新生骨の形成には直接影響を及ぼさないことが考えられる。更に本薬は類薬のエチドロネートと比べ、より強い骨吸収抑制薬であり、また骨吸収抑制発現投与量での骨石灰化障害の可能性が低いことが示された。

これらの薬効薬理試験の結果から、アレンドロネートは、骨粗鬆症に対し、破骨細胞の機能を抑制することで骨吸収を抑制し、骨量及び骨強度の減少を抑制することが期待される。

なお、統計解析は、特に断りのない限り、分散分析後、多重比較を行った。

表水 - 1 効力を裏付ける薬理試験 (1)

試験項目及び動物種		投与方法 ^{a)}	結果	(実施施設)
作用機序	マウス、ラット：破骨細胞のH ⁺ 放出に対する作用	ALN : 0.022 ~ 220pmol/mm ² ETDN : 2200pmol/mm ² sCT : 10 ⁻⁸ mol/L (<i>in vitro</i>)	アレンドロネートを骨面に前処理することにより、破骨細胞からのNa ⁺ 非依存性H ⁺ 放出が抑制された。同様の作用は、エチドロネートとサケカルシトニンでもみられた。	()
	マウス：蛋白チロシンフォスターゼに対する作用	ALN : 1x10 ⁻⁹ ~ 1x10 ⁻³ mol/L (<i>in vitro</i>)	アレンドロネートは、マウス破骨細胞に存在する蛋白チロシンフォスターゼ活性を、濃度に依存して抑制した。	()
	マウス、ラット：骨における分布	ALN : 0.03、0.32mg/kg 単回皮下投与 ETDN : 0.3 ~ 15mg/kg 単回皮下投与	アレンドロネートは、幼若ラットの破骨細胞面に特異的に分布した。この分布特異性は、エチドロネートに勝っていた。アレンドロネートの分布した骨面の上には、新たに骨が形成された。	()
	骨髄除去ラット：骨形成及び骨吸収	ALN : 0.8 ~ 30.6 μg/kg 骨髄除去後、1日1回、 6日間皮下投与	アレンドロネートは、骨髄除去ラットにおいて、骨形成に影響を与えることなく、骨吸収を抑制した。	()
骨量減少に対する作用	卵巣摘出ラット：2カ月間経口投与試験	ALN : 0.04 ~ 5 mg/kg ETDN : 5 ~ 125mg/kg 卵巣摘出翌日から1日1回、 2ヵ月間経口投与	アレンドロネートは、1.0mg/kg以上の投与量において、卵巣摘出による骨量減少を骨石灰化に障害を与えることなく抑制した。エチドロネートでは125mg/kgで、骨量減少を抑制する作用が認められると同時に、本投与量では骨石灰化障害が示唆された。	()
	卵巣摘出ラット：1年間経口投与試験	ALN : 0.1、0.5mg/kg 卵巣摘出翌日から1日1回、 1年間経口投与	アレンドロネートは、0.5mg/kg/dayの1年間の長期経口投与において、卵巣摘出により生じる腰椎の骨量と骨強度の減少を抑制した。大腿骨の骨強度に影響を与えることなく、骨塩密度減少を抑制した。	()
	卵巣摘出ラット：1年間皮下投与治療試験	ALN : 1.4、14 μg/kg 卵巣摘出6ヵ月後から週2回、 1年間皮下投与	アレンドロネートは、卵巣摘出による腰椎の骨量と骨強度減少に対して、1.4 μg/kg以上の週2回投与により治療効果を示した。更に、骨強度と、骨灰分重量、骨梁間隙及び皮質骨量との間の有意な相関関係から、アレンドロネート投与に起因した骨量の増加が、骨強度に反映されていることが示された。	()

ALN : アレンドロネート、ETDN : エチドロネート、sCT : サケカルシトニン

a) 投与量はアレンドロン酸として表記した。

表ホ - 1 効力を裏付ける薬理試験（２）

試験項目及び動物種		投与方法 ^{a)}	結果	(実施施設)
骨量減少に対する作用	卵巣摘出ヒヒ： ２年間 静脈内 投与試験	ALN：0.04、0.19mg/kg 卵巣摘出後、２週に１回、 ２年間静脈内投与	２週に１回のアレンドロネート0.04mg/kg以上の投与は、卵巣摘出による骨代謝回転増加を抑制することが、生化学的マーカー及び骨形態計測パラメータにより示された。また、骨石灰化障害を伴うことなく海綿骨量及び海綿骨強度を増加させ、皮質骨の粗鬆性をも減少させた。更に、骨量と骨強度には、正の相関が認められることから、アレンドロネート投与により増加した骨量は、骨強度に反映されていることが示された。	()
	不動化ラット	ALN：0.04～4 mg/kg 坐骨神経切断前１日１回、 ２日間皮下投与	アレンドロネート前処置は骨代謝回転を抑制することにより、骨石灰化に影響を与えず、不動化による骨量減少を0.04mg/kg以上で抑制した。	()
	甲状腺ホルモン投与ラット	ALN：1.34mg/kg 週に２回、３週間経口投与 同時に、サイロキシン250 µg/kg を週に６回皮下投与	アレンドロネートは、甲状腺ホルモンによる骨代謝回転増加を介した骨量減少作用に拮抗した。	()
	卵巣摘出ラット： 投与頻度による作用の比較	ALN：総投与量として、 0.224～28.0mg/kgを月に２回または ８回、３ヵ月間皮下投与	アレンドロネートは、卵巣摘出ラットにおける脛骨の骨量減少に対し同投与量では頻回に投与した場合に、より顕著な増加効果が認められた。	()
正常動物の骨に対する影響	イヌ： ３年間 経口投与試験	ALN：0.25～1.0mg/kg １日１回、３年間経口投与	予定臨床用量（5 mg/man/day：約0.1mg/kg/day）の約10倍の３年間経口投与によっても、正常イヌの骨強度に対する影響、微小骨折、骨軟化症は認められなかった。	()
骨折修復に対する影響	骨折イヌ： 25週間 経口投与試験	ALN：2 mg/kg １日１回、骨折前９週間、骨折前 ９週間及び骨折後16週間、あるいは、 骨折後16週間、経口投与	予定臨床用量（5 mg/man/day：約0.1mg/kg/day）の約20倍の投与によっても、骨折修復部位の骨強度に変化は認められず、骨折修復に対し影響を与えないことが示された。	()

ALN：アレンドロネート

a) 投与量はアレンドロン酸として表記した。

表水 - 2 非臨床試験での薬効発現投与量から 1 日あたりの経口投与量 (mg/kg/day) に換算したアレンドロネートの投与量と海綿骨における作用の関連

動物種	投与量	投与頻度と投与方法	骨形態計測結果				骨灰分重骨 または 骨塩密度 ^{a)}	骨強度 ^{a)}	(実施施設)
			骨吸収 指標 ^{a)}	骨形成 指標 ^{a)}	骨 石灰化 ^{b)}	骨量 ^{a)}			
成長過程 ラット	0.004 ~ 24.1 mg/kg	1 日 1 回 10日間 皮下投与	NT	NT	↓ 24.1 (2537)	↑ 0.004 (0.42)	NT	NT	()
卵巣摘出 ラット	0.224 ~ 28 mg/kg/ month	月 2 又は 8 回 3 ヶ月間 皮下投与	↓ 0.224 (0.84)	↓ 0.224 (0.84)	→	↑ 0.224 (0.84)	↑ 0.224 (0.84)	NT	()
	1.4及び14 µg/kg	週 2 回 1 年間 皮下投与	↓ 0.0014 (0.04)	↓ 0.0014 (0.04)	→	↑ 0.0014 (0.04)	↑ 0.0014 (0.04)	↑ 0.014 (0.4)	()
	0.04 ~ 5 mg/kg	1 日 1 回 2 ヶ月間 経口投与	↓ 0.04 (0.04)	↓ 0.2 (0.2)	→	↑ 1.0 (1.0)	↑ 1.0 (1.0)	NT	()
	0.1及び0.5 mg/kg	1 日 1 回 1 年間 経口投与	↓ 0.1 (0.1)	↓ 0.1 (0.1)	→	↑ 0.5 (0.5)	↑ 0.5 (0.5)	↑ 0.5 (0.5)	()
卵巣摘出 ヒヒ	0.04及び 0.19mg/kg	2 週に 1 回 2 年間 静脈内投与	↓ 0.04 (0.17)	↓ 0.04 (0.17)	→	↑ 0.04 (0.17)	↑ 0.19 (0.79)	↑ 0.19 (0.79)	()
不動化 ラット	0.04 ~ 4 mg/kg	2 日間 皮下投与	↓ 0.04 (4.21)	↓ 0.04 (4.21)	→	↑ 0.04 (4.21)	↑ 0.04 (4.21)	NT	()
甲状腺ホル モン誘 発ラット	1.34mg/kg	週 2 回 3 週間 経口投与	↓ 1.34 (0.38)	↓ 1.34 (0.38)	→	↑ 1.34 (0.38)	NT	NT	()

↓ : 減少、↑ : 増加、→ : 変化なし、NT : 測定せず

a) : 骨量減少処置 (卵巣摘出、不動化、甲状腺ホルモン投与) を行った溶媒投与群との比較 (成長過程のラットでは、溶媒投与群との比較)

b) : 骨量減少処置を行っていない群との比較 (成長過程のラットでは溶媒投与群との比較)

・表中の数字は動物における作用発現投与量 (mg/kg : アレンドロン酸換算値) を示し、括弧内の数字は 1 日あたりの経口投与量として換算した場合の作用発現投与量 (mg/kg/day : アレンドロン酸換算値) を示す。

・皮下投与及び静脈内投与量から経口投与量への換算式

1 日あたりの経口投与量 = 1 日あたりに換算した投与量 / 動物の生物学的利用率 (ラット : 0.95%、サル : 1.72%)

(1) 骨吸収抑制の作用機序

現在、ビスホスホネート系薬剤による破骨細胞活性抑制の作用機序について、完全に解明されたわけではない¹⁴⁾。現在のところ、ビスホスホネートに対するレセプターの存在は証明されていない。アレンドロネート、あるいはエチドロネートは破骨細胞に取り込まれている像が認められている。ビスホスホネートは、細胞の脂質二重膜を通過しづらいため、この取り込みは破骨細胞が持つ飲作用によるものと考えられており、これはビスホスホネートの破骨細胞に対する選択性の理由の一つと思われる。取り込まれたビスホスホネートは、破骨細胞内の生化学的経路に対して何らかの影響を与えて、破骨細胞機能を抑制している可能性が考えられている¹⁵⁾。ビスホスホネートによるスクワレン合成酵素の阻害が報告されている^{16,17)}。またごく最近、アレンドロネートをはじめとする、窒素原子含有タイプのビスホスホネートが、ステロール生合成の抑制を介して、GTP結合蛋白質であるRas蛋白質などのプレニル化を阻害することが報告された¹⁸⁾。

アレンドロネートは、*in vitro*で破骨細胞の骨吸収活性に必須な蛋白チロシンフォスファターゼ活性を抑制し、破骨細胞からのH⁺放出を抑制した。骨吸収抑制作用を発現する投与量のアレンドロネートをラットに皮下投与したところ、アレンドロネートは骨芽細胞面に比較して破骨細胞面に約8倍多く分布していた。一方、エチドロネートでは、骨吸収抑制作用を発現する投与量において骨芽細胞面と破骨細胞面との分布に差はみられず、アレンドロネートはエチドロネートに比較して、より高い選択性をもって骨吸収面に分布することが示された。また、骨面に残存したアレンドロネートは新骨の形成に影響を与えなかった。

以上より、アレンドロネートは骨吸収面に分布し、破骨細胞の機能を抑制することで骨吸収を抑制し、骨形成には影響を与えないことが示唆された(図水-1)。

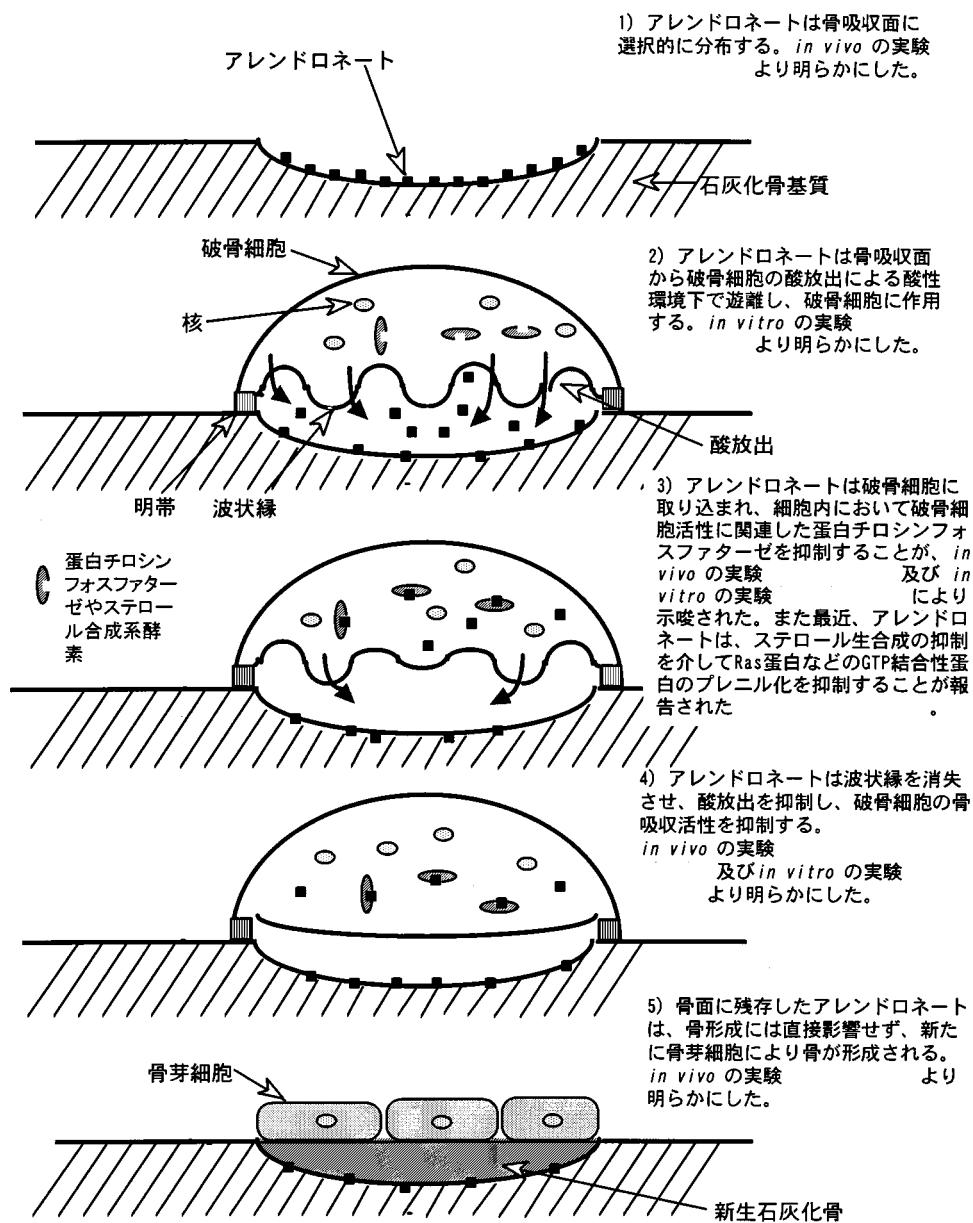
14) Fleisch, H. : Bisphosphonates : Mechanisms of action, Endocrine Reviews 19 : 80-100, 1998

15) Rodan, G. A. and Fleisch H. A. : Bisphosphonates: Mechanisms of action, J. Clin. Invest. 97 : 2692-2696, 1996

16) Ciosek, C.P.Jr. *et al.* : Lipophilic 1,1-bisphosphonates are potent squalene synthase inhibitors and orally active cholesterol lowering agents *in vivo*, J. Biol. Chem. 268 : 24832-24837, 1993

17) Amin, D. *et al.* : Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. J. Lipid Res. 33 : 1657-1663, 1992

18) Luckman, S. P. *et al.* : Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras., J. Bone. Miner. Res. 13 : 581-589, 1998



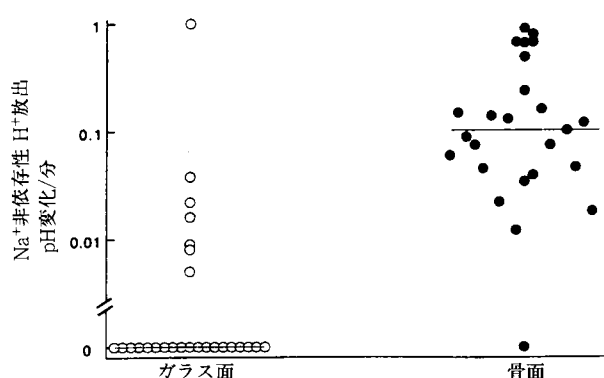
図ホ - 1 アレンドロネートの作用機序の模式図

1) 破骨細胞のNa⁺非依存性H⁺放出に対する作用

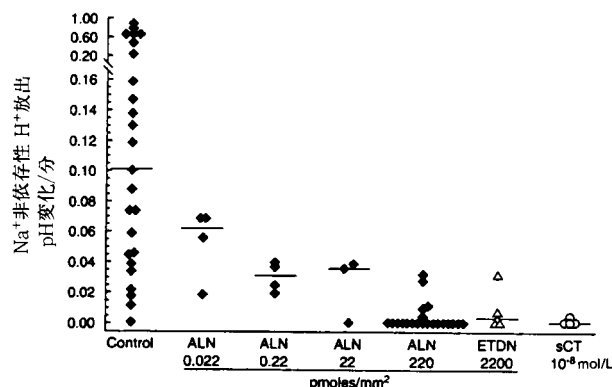
方法：1～5日齢のSD系ラット長管骨より調製した培養破骨細胞、またはマウス骨髄細胞由来の培養破骨細胞を骨スライスまたはガラス上に付着させた後、pH感受性蛍光色素のbiscarboxyethyl - 5 -(6)carboxyfluorescein (BCECF)を取り込ませた。Na⁺非存在下で、20mmol/LのNH₄⁺の短時間処置による、細胞内pH変化を測定した。NH₄⁺の短時間の処置により細胞内はアルカリ性となり、NH₄⁺を除去すると急速に細胞内は酸性側に一旦移行する。その後、H⁺の放出能のある場合は、中性に回復してくる。この回復速度を、H⁺放出の指標とした。アレンドロネート(0.022～220pmol/mm²)及びエチドロネート(2200 pmol/mm²)は、あらかじめ骨スライスに前処理した。

結果：H⁺放出は、破骨細胞をガラスに付着させた状態では、少数の細胞にしかみられなかったが、骨に付着させた場合にはほぼすべての細胞において認められた(図ホ - 2)。骨に付着させた細胞において、アレンドロネートは濃度依存的に、H⁺の放出を抑制し、そのIC₅₀値は、約0.022pmol/mm²の値であった(図ホ - 3)。エチドロネート処置あるいはサケカルシトニン処置によっても同様の抑制作用が認められた。

結論：アレンドロネートは前処理量に依存して、骨に付着させた場合に発現する破骨細胞からのNa⁺非依存性のH⁺放出を抑制した。アレンドロネートと同様に骨吸収抑制作用を示す類薬のエチドロネート及びサケカルシトニンもこのH⁺放出を抑制した。アレンドロネートは、破骨細胞からのH⁺放出抑制作用により、破骨細胞による骨吸収を抑制することが考えられた。



図ホ - 2 ガラスまたは骨に付着させた破骨細胞からのNa⁺非依存性H⁺放出
(個別の値とその中央値)



図ホ - 3 骨に付着させた破骨細胞からのNa⁺非依存性H⁺放出に対するアレンドロネートの作用
(個別の値とその中央値)

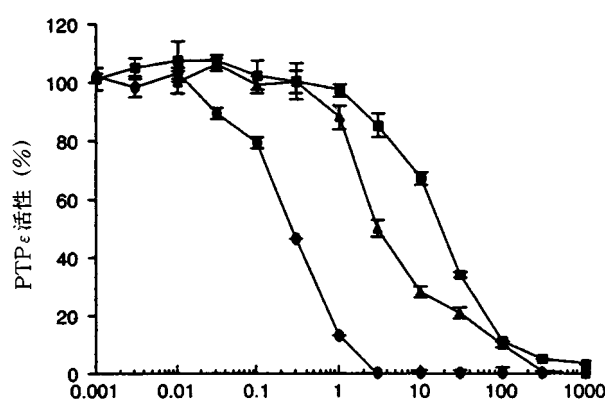
Control：無処置対照、ALN：アレンドロネート
ETDN：エチドロネート、sCT：サケカルシトニン

2) 破骨細胞の蛋白チロシンフォスファターゼに対する作用

方法：蛋白チロシンフォスファターゼ (PTP ϵ) は、破骨細胞の骨吸収活性に必須といわれている蛋白チロシンキナーゼc-Srcの活性の制御に関与すると考えられている。マウス破骨細胞において主に発現したPTP ϵ のcDNAをクローニングして、酵素活性部位を含む領域のリコンビナントを作製し、PTP ϵ の酵素活性に対するアレンドロネートの作用を検討した。

結果：アレンドロネートはPTP ϵ の活性を濃度に依存して抑制し、そのIC₅₀値は3 μ mol/Lであった (図ホ - 4)。代表的な蛋白チロシンフォスファターゼ阻害剤であるオルソバナデート及びフェニラシンオキサイドのIC₅₀値は、それぞれ0.3 μ mol/Lと18.2 μ mol/Lであり、両阻害剤とも*in vitro*での破骨細胞による骨吸収を抑制した。

結論：アレンドロネートは、マウス破骨細胞に主に発現した蛋白チロシンフォスファターゼ活性を抑制した。また、代表的な本酵素阻害剤は、破骨細胞による骨吸収を抑制したことから、アレンドロネートは、この酵素活性阻害作用を介して破骨細胞活性に影響を与えている可能性が考えられた。



図ホ - 4 蛋白チロシンフォスファターゼ活性に対するアレンドロネートの作用

(平均値 $\pm$ 標準偏差、n = 3)

▲ : アレンドロネート、● : オルソバナデート、■ : フェニラシンオキサイド

3) 骨における分布

投与直後の分布

方法：幼若ラット（8日齢）に ^3H -アレンドロネート $0.12\text{ }\mu\text{mol/kg}$ （ 0.03mg/kg ：成長過程のラットにおける骨吸収抑制作用発現投与量）及びその約10倍にあたる $1.28\text{ }\mu\text{mol/kg}$ （ 0.32mg/kg ）を皮下投与し、12～15時間後に後肢の骨を採取し、脛骨近位海綿骨の組織形態計測とマイクロオートラジオグラフィによりアレンドロネートの海綿骨面における分布を調べた。 ^3H -エチドロネートは、アレンドロネートの高用量に相当する $1.29\text{ }\mu\text{mol/kg}$ （エチドロネ酸換算で 0.27mg/kg ）及びエチドロネートの成長過程のラットにおける骨吸収抑制作用発現投与量の $72.8\text{ }\mu\text{mol/kg}$ （ 15.0mg/kg ）を皮下投与し、同様に実験を行った。

結果：アレンドロネートあるいはエチドロネートの骨芽細胞面（骨芽細胞直下の骨面）と破骨細胞面（破骨細胞直下の骨面）への分布を比較した。アレンドロネートは骨吸収抑制作用を発現する $0.12\text{ }\mu\text{mol/kg}$ を投与した場合、骨芽細胞面に比較して破骨細胞面に約8倍多く分布した。アレンドロネートあるいはエチドロネートを約 $1.3\text{ }\mu\text{mol/kg}$ を投与した場合は、骨芽細胞面に比較して破骨細胞面へ3～4倍多く分布した。エチドロネートが骨吸収抑制作用を発現する投与量である $72.8\text{ }\mu\text{mol/kg}$ では、破骨細胞面と骨芽細胞面にほぼ同じ量の分布が認められた（表ホ-3、図ホ-5）。また、いずれの場合にも、計測した破骨細胞の約半数において放射能の分布が観察されたが、他の細胞には認められなかった。

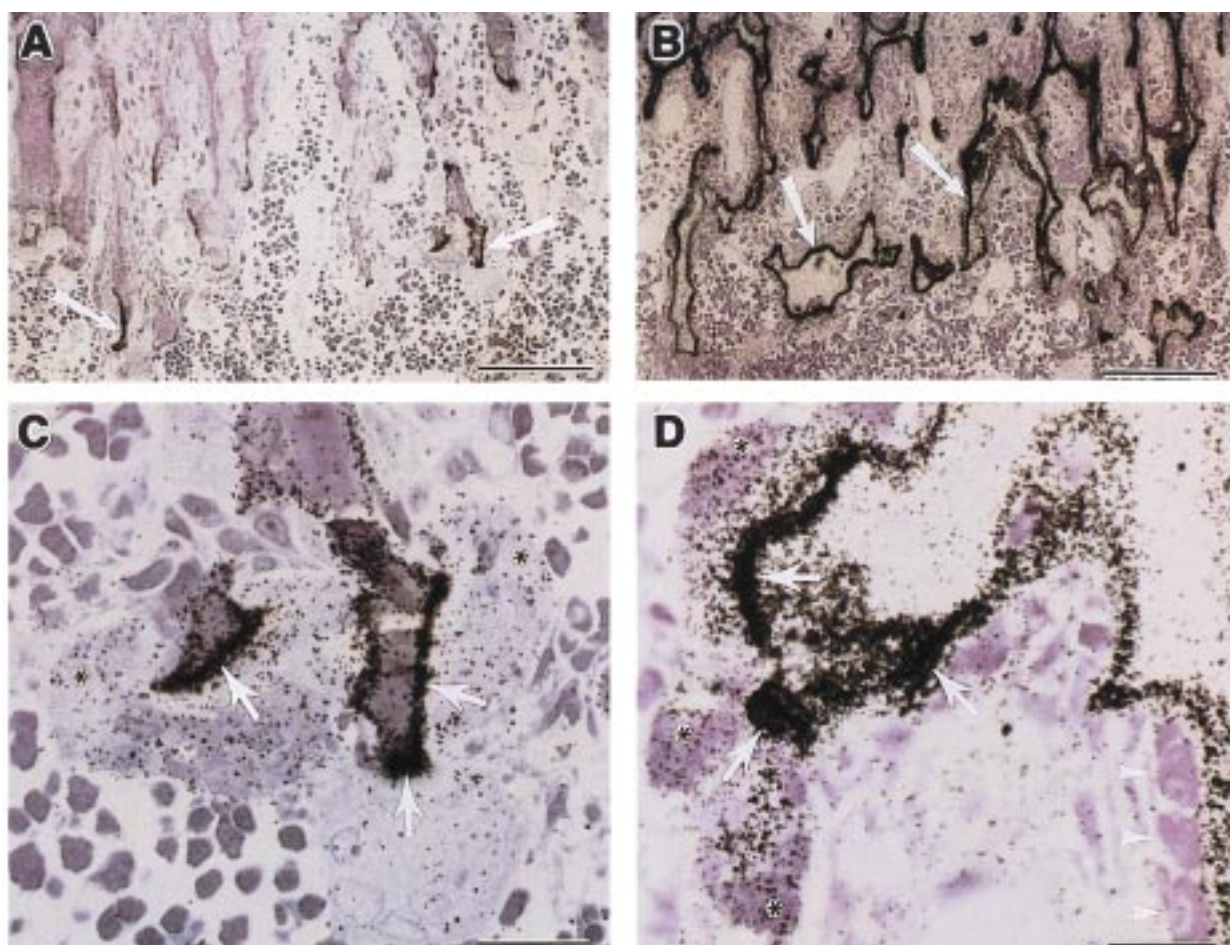
結論：ビスホスホネート系薬物は、ハイドロキシアパタイトに結合する特性を有している。破骨細胞により骨が吸収された面（破骨細胞面）には、ハイドロキシアパタイトが露呈している。骨への分布を検討した本結果から、アレンドロネート、エチドロネートいずれの薬物も投与された後、ハイドロキシアパタイトが露呈している破骨細胞面により多く分布した。ただし骨吸収抑制作用を発現する投与量では、アレンドロネートの場合、破骨細胞面により多く分布が認められるが、エチドロネートの場合、破骨細胞面と骨芽細胞面いずれにも分布した。

ビスホスホネートが、破骨細胞の機能に影響を及ぼす場合、破骨細胞面に分布した薬物の量に依存すると考えられる。*In vitro*で骨吸収抑制作用を両薬で比較すると、アレンドロネートはエチドロネートの約10倍低濃度で作用することが明らかにされている。*In vivo*においては、薬理作用が発現する量で、アレンドロネートはエチドロネートに比較して、薬効を発現する場である破骨細胞面に、骨芽細胞面より多く分布する、すなわち薬理作用量で破骨細胞面に選択的に分布するものと考えられる。このことは、アレンドロネートの破骨細胞に対する選択的な作用発現に寄与すると考えられる。

表水 - 3 投与直後（12～15時間後）の³H-アレンドロネート及び³H-エチドロネートのラット脛骨近位部海綿骨における分布

薬 物	投与量 ($\mu\text{mol/kg}$)	分布が認められた骨芽 細胞面の割合A (%)	分布が認められた破骨 細胞面の割合B (%)	分布破骨細胞面B (%) / 分布骨芽細胞面A (%)
³ H-アレンドロネート	0.12 ^{a)}	4.8 ± 0.8	37.4 ± 3.4	7.8
	1.28	10.4 ± 4.4	43.3 ± 15.3	4.2
³ H-エチドロネート	1.29	15.1 ± 0.7	47.1 ± 1.6	3.1
	72.8 ^{a)}	53.3 ± 1.3	61.8 ± 25.2	1.2

a) 薬効発現投与量 (平均値 $\pm$ 標準偏差；各投与量につき2匹ずつ、1匹あたり2枚の切片から求めた)



図水 - 5 ³H-アレンドロネート及び³H-エチドロネートの骨における分布：ラット脛骨近位部海綿骨のミクロオートラジオグラム（投与12～15時間後）

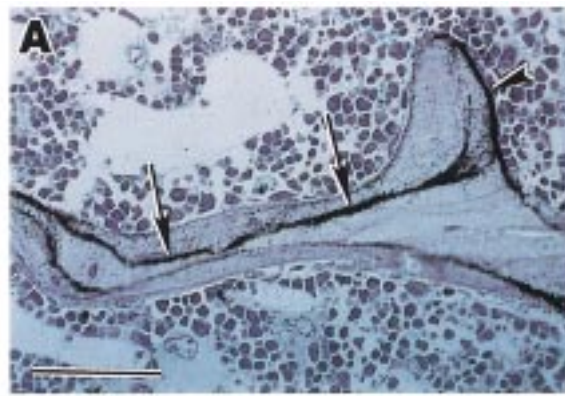
- 図A：**³H-アレンドロネート0.12 $\mu\text{mol/kg}$ 投与（図中の横棒は100 μm を示す）
骨面の一部に³H-アレンドロネート（矢印）の分布が認められる。
- 図B：**³H-エチドロネート72.8 $\mu\text{mol/kg}$ 投与（図中の横棒は100 μm を示す）
³H-エチドロネート（矢印）は、骨面のほぼ全体に存在している。
- 図C：**Aの拡大像（図中の横棒は20 μm を示す）
高密度の³H-アレンドロネートが分布した骨面（矢印）を覆う破骨細胞（*）には、³H-アレンドロネートが分布している。
- 図D：**Bの拡大像（図中の横棒は20 μm を示す）
³H-エチドロネートが高密度に分布した骨面（矢印）を覆う破骨細胞には、³H-エチドロネートが分布している。骨芽細胞（矢頭）には³H-エチドロネートの分布は認められない。

投与49日後の分布

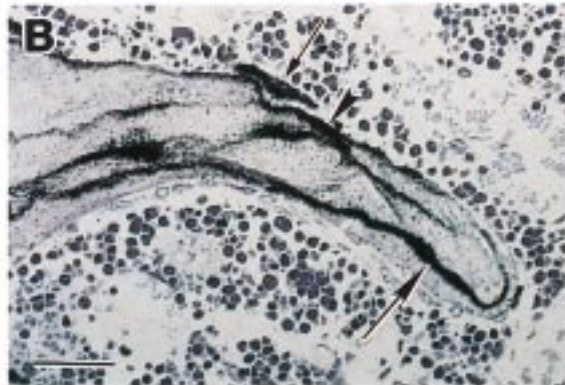
方法：成熟マウス（8～10週齢）に ^3H -アレンドロネート $0.12\text{ }\mu\text{mol/kg}$ （ 0.03mg/kg ）を皮下投与し、その49日後に、骨形態計測とマイクロオートラジオグラフィにより大腿骨遠位部の海綿骨における本薬の分布を検討した。また、類薬の ^3H -エチドロネート $55\text{ }\mu\text{mol/kg}$ （エチドロネート換算で 11mg/kg ）と $1.3\text{ }\mu\text{mol/kg}$ （ 0.3mg/kg ）についても同様に実験し、結果を比較した。

結果：両薬とも、骨端成長板より $250\sim 500\text{ }\mu\text{m}$ の間には高密度の放射能は認められなかった。骨端成長板より $500\sim 2500\text{ }\mu\text{m}$ における高密度の放射能は骨面及び骨基質中に認められた（図ホ - 6）。 ^3H -アレンドロネートでは約14%の骨面に放射能が認められた。これに対し、 1.3 及び $55\text{ }\mu\text{mol/kg}$ の ^3H -エチドロネートでは、わずかに高い割合の骨面に放射能が認められたが（約19%）、統計学的有意差は認められなかった。 ^3H -アレンドロネートあるいは ^3H -エチドロネートの上に骨が形成されており、この骨に取り込まれた放射能から骨面までの距離は、アレンドロネートでは $12.7\pm 1.4\text{ }\mu\text{m}$ （平均値 $\pm$ 標準偏差、 $n=3$ 、各個体より4切片）、エチドロネートでは $1.3\text{ }\mu\text{mol/kg}$ と $55\text{ }\mu\text{mol/kg}$ でそれぞれ 8.7 ± 0.6 と $9.2\pm 0.4\text{ }\mu\text{m}$ であり、両薬物とも無処置対照（ $10.6\pm 3.0\text{ }\mu\text{m}$ ）の骨単位壁幅（セメント線から骨面までの距離）とほぼ同様であった。

結論：投与された ^3H -アレンドロネートは、投与49日後で骨端成長板の近辺にはみられなかったことから、骨の長軸方向の成長はアレンドロネートにより抑制されていないことが示唆された。骨面に分布した ^3H -アレンドロネートの上に骨が形成されていることが明らかとなった。標識部位から骨面までの距離が無処置対照群での骨単位壁幅とほぼ同様であったことから、骨に分布したアレンドロネートは、新生骨の形成に直接影響を与えないことが示唆された。



^3H -アレンドロネート
0.12 $\mu\text{mol/kg}$ 投与



^3H -アレンドロネート
0.12 $\mu\text{mol/kg}$ 投与



^3H -エチドロネート
55 $\mu\text{mol/kg}$ 投与

図水 - 6 ^3H -アレンドロネートまたは ^3H -エチドロネート投与49日後のマウス大腿骨遠位部海綿骨のマイクロオートラジオグラフ

高密度の放射能が、骨基質の中に認められ（図A、図B、図C：矢印）、一部が骨面に認められる（図A、図B、図C：矢頭）。図Bでは、破骨細胞内に放射能が認められた（小矢印）。図中横棒は、50 μm を示す。

4) 骨髄除去ラットにおける骨髄腔での骨形成と骨吸収に対する作用

方法：ラット脛骨の骨髄を除去すると、一過性に海綿骨が形成された後、海綿骨は吸収され骨髄腔が再生する。本モデルを用いて、骨形成と骨吸収に対するアレンドロネートの作用を評価した。SD系雄ラット（250～350g）の右脛骨骨髄を機械的に取り除き、その後、アレンドロネートとして1、2、8及び40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （アレンドロン酸換算で0.8、1.5、6.1、30.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を6日間連続皮下投与した。ラットを経時的に屠殺し、右脛骨骨髄腔内に生成した海綿骨量を組織形態計測により計測した。

結果：溶媒対照群では、脛骨の骨髄を除去後7日目までに骨髄腔が海綿骨で一時的に満たされた後、徐々に海綿骨は消失し、除去後20～30日目で骨髄腔が再生した（図ホ-7）。骨髄除去後7日目において、アレンドロネートはいずれの用量においても骨髄除去により新生した海綿骨量に影響を与えなかった。その後、この新生海綿骨はいずれの投与群でも徐々に吸収されたが、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上のアレンドロネートは海綿骨の吸収を有意に抑制した。

結論：骨髄除去ラットにおいて、アレンドロネートは新生骨形成に影響を与えず、骨吸収を抑制することが明らかとなった。本結果から、アレンドロネートは骨吸収を抑制する用量においても、骨形成に直接影響を与えないことが示唆された。

図ホ-7 骨髄除去ラットにおける骨形成と骨吸収に対するアレンドロネートの作用

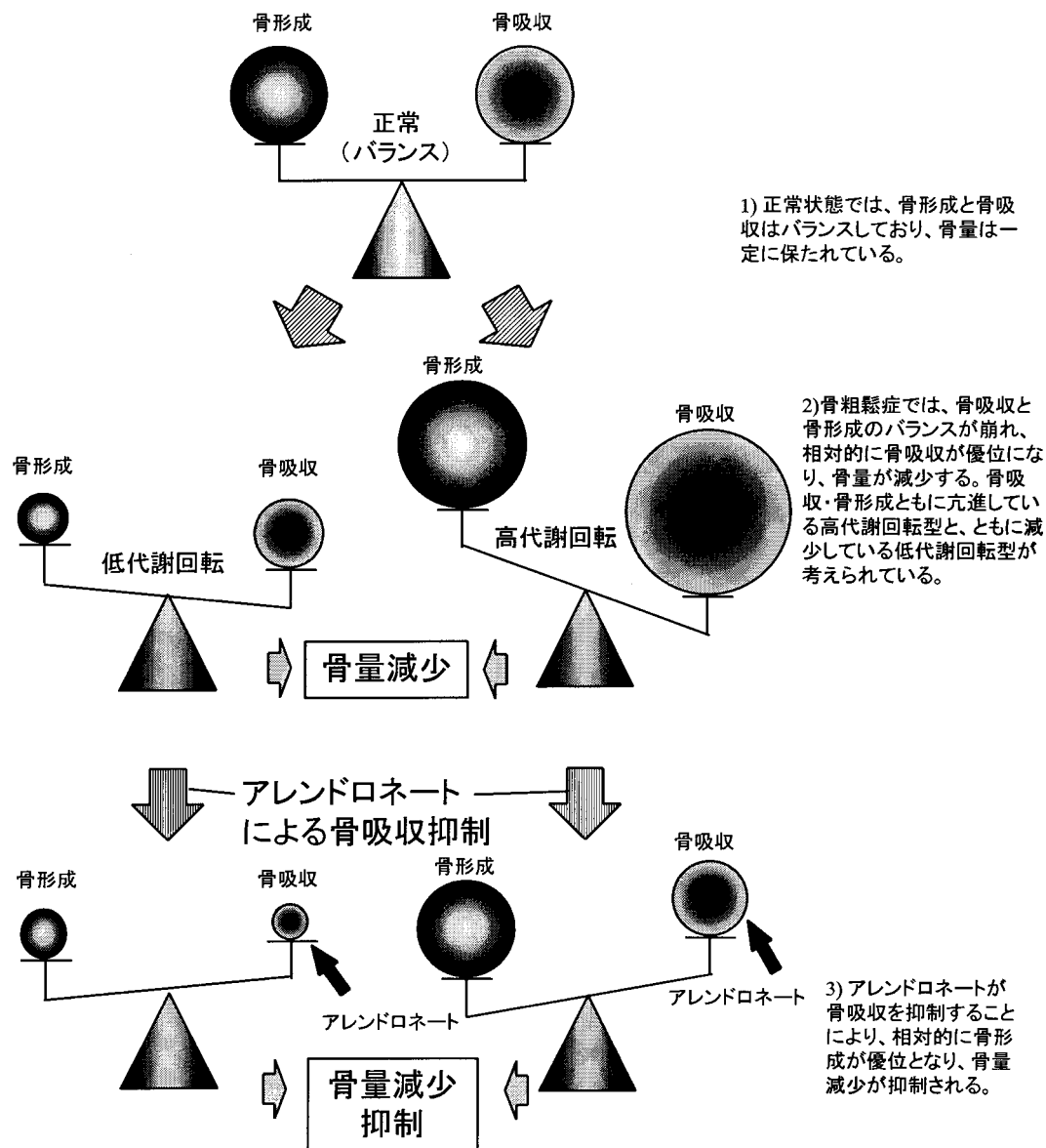
（平均値±標準誤差、n=4～6）

- ：溶媒対照群、■：1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群、□：2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群、▲：8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群、○：40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群
- *：溶媒対照群、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群及び2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群との間に有意差あり（ $p < 0.05$ 、Fisher PLSD test）
- **：溶媒対照群及び1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群とその他の投与群との間に有意差あり（ $p < 0.05$ 、Fisher PLSD test）

(2) 骨量減少及び骨強度に対する作用

卵巣摘出ラットにおいて、アレンドロネートは骨吸収抑制作用に基づき、卵巣摘出により減少した骨量及び骨強度を骨石灰化に影響を与えることなく増加させた。これに対して、エチドロネートでは、骨吸収抑制を示す用量において、骨石灰化障害を示唆する骨石灰化速度の減少が認められた。また、卵巣摘出ヒヒにおいて、アレンドロネートは骨石灰化に影響を及ぼさずに骨吸収を抑制することにより、卵巣摘出により減少した海綿骨量と強度を増加させるとともに、皮質骨粗鬆性増加も抑制した。

不動化ラット及び甲状腺ホルモン投与ラットにおける骨量あるいは骨灰分重量の減少に対して、アレンドロネートは骨石灰化に影響を与えず、骨吸収を抑制することにより骨量減少を抑制した。また、卵巣摘出ラットにおける骨量増加作用は、低い投与量で総投与量が同じ場合には、頻回の投与において、より強い骨量増加作用が認められた。骨代謝回転（骨リモデリング）に及ぼすアレンドロネートの作用を図水 - 8 に示す。



図水 - 8 骨代謝回転（骨リモデリング）に及ぼすアレンドロネートの作用

1) 卵巣摘出ラット

2 ヶ月間経口投与試験

方法：SD系雌ラット（6週齢）の両側卵巣を摘出し、その翌日よりアレンドロネート（0.04、0.2、1.0及び5.0mg/kg）を1日1回2ヶ月間経口投与した。大腿骨の骨塩密度及び脛骨の組織形態計測を行った。エチドロネート（5.0、25.0及び125.0mg/kg）についても同様に検討した。

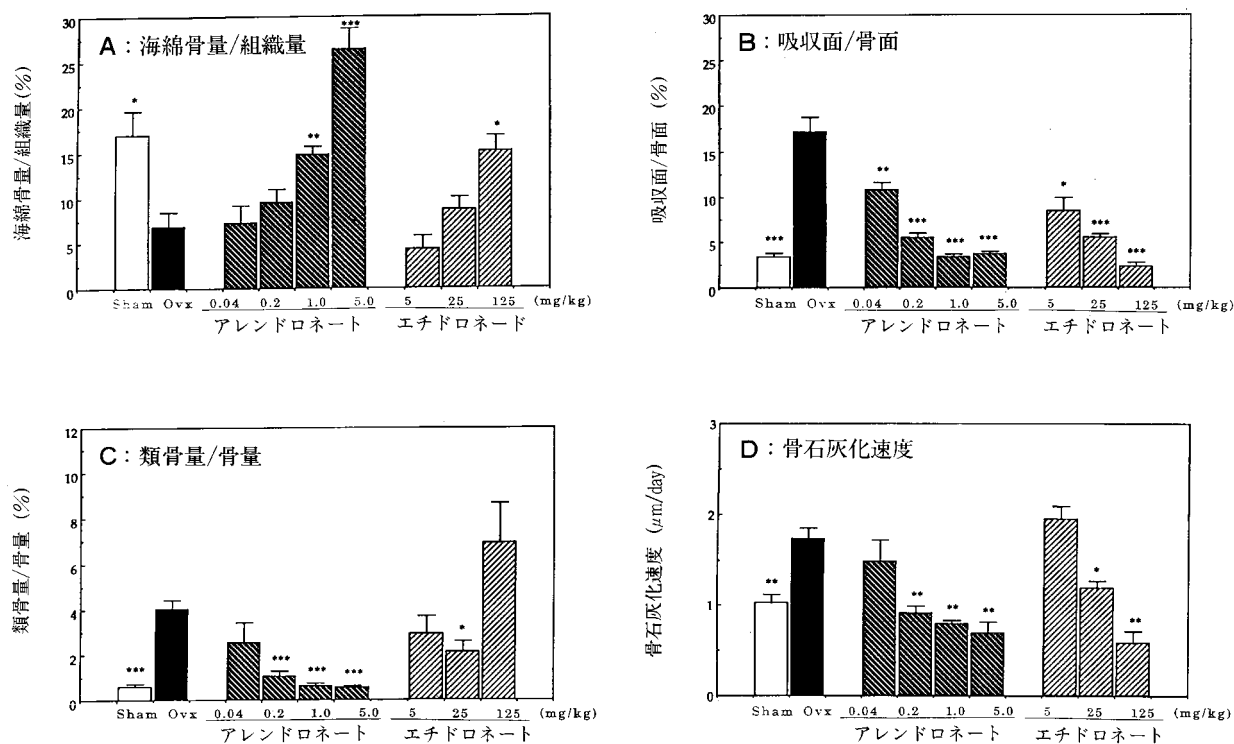
結果：アレンドロネートは、卵巣摘出により引き起こされた大腿骨遠位部の骨塩密度減少を1.0mg/kg以上の投与量で有意に抑制したが、エチドロネートでは、125.0mg/kgでもその作用は明確ではなかった（図ホ - 9）。脛骨における組織形態計測において、アレンドロネートは卵巣摘出による海綿骨量の減少を1.0mg/kg以上で抑制した（図ホ - 10：A）。更に、吸収面の増加を0.04mg/kg以上で、類骨量の増加を0.2mg/kg以上で、骨石灰化速度の増加を0.2mg/kg以上で、ほぼ卵巣非摘出群のレベルまで抑制した（図ホ - 10：それぞれB、C、D）。これに対して、エチドロネートでは、海綿骨量の減少抑制作用は125.0mg/kgにおいてみられたが、同時に、類骨量の増加傾向を伴う骨石灰化速度の減少が認められた。

結論：アレンドロネートは、ラットにおける卵巣摘出による骨量（大腿骨骨塩密度、海綿骨量）の減少を1.0mg/kg以上の投与量で抑制した。骨吸収面の減少から、この骨量減少抑制作用はアレンドロネートの骨吸収抑制作用に基づくものと考えられた。更に、卵巣摘出による類骨量と骨石灰化速度の増加を抑制したが、その程度は卵巣非摘出群のレベルまでであり、骨石灰化障害を惹起することはなかった。これに対して、エチドロネートでは、125.0mg/kgでも卵巣摘出による骨塩密度の減少への作用は明確ではなく海綿骨量の増加がみられたのみであり、また、骨石灰化障害を示唆する類骨量の増加傾向を伴う骨石灰化速度の減少が認められた。

図水 - 9 卵巣摘出ラットの大腿骨遠位部の骨塩密度に対するアレンドロネート及びエチドロネート 2 ヶ月間経口投与の影響 (平均値 ± 標準偏差, n = 7 ~ 12)

Sham : 卵巣非摘出群、OVX : 卵巣摘出溶媒投与群

* : 卵巣摘出溶媒投与群との間に有意差あり ($p < 0.05$, Dunnett test)



図水 - 10 卵巣摘出ラットの脛骨における骨組織形態学的解析結果 (平均値 ± 標準誤差, n = 3)

Sham : 卵巣非摘出群、OVX : 卵巣摘出溶媒投与群

*、**、*** : 卵巣摘出溶媒投与群との間に有意差あり

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Dunnett test)

1 年間経口投与試験

方法：SD系雌ラット（18週齢）の両側卵巢を摘出し、その翌日より0.1または0.5mg/kgのアレンドロネートを1日1回1年間経口投与した。投与終了後、第6腰椎の骨形態計測と、第3腰椎の骨塩密度、骨灰分重量及び圧縮骨強度測定、大腿骨の骨塩密度と曲げ骨強度測定を実施した。

結果：卵巢摘出により、第6腰椎において海綿骨量、骨梁数、骨梁幅の減少及び骨梁間隙の増加が認められた（表ホ - 4）。アレンドロネート0.5mg/kgの1年間経口投与は、骨梁幅を除き、これらの卵巢摘出による影響を抑制した。卵巢摘出は、骨吸収活性を示す破骨細胞面と骨形成活性を示す類骨面の増加で示されるように骨代謝回転を増加させた。この卵巢摘出により増加した破骨細胞面及び類骨面は、ともに0.1mg/kg以上で抑制されたが、骨石灰化速度に及ぼす影響は認められなかった。卵巢摘出によって、第3腰椎の骨塩密度と骨灰分重量の減少、圧縮最大荷重と弾性率の低下がみられた。0.5mg/kg投与により、これらは卵巢非摘出群のレベルまで増加した。更に、骨塩密度と骨灰分重量の間（ $r^2 =$ ）または骨塩密度と圧縮最大荷重の間（ $r^2 =$ ）に有意な正の相関が認められた。大腿骨においては、卵巢摘出により近位及び遠位部の骨塩密度の減少がみられたが、骨幹部の曲げ最大荷重や弾性率には変化はみられなかった。これに対しアレンドロネートは、最大荷重と弾性率に影響を与えず、近位部の骨塩密度減少を抑制した（表ホ - 5）。

結論：アレンドロネートは、卵巢摘出による破骨細胞面及び類骨面の増加をともに抑制したことから、この卵巢摘出による骨量減少のアレンドロネートによる抑制は、その骨吸収抑制作用に基づくものと考えられた。また骨塩密度と骨強度の正の相関から、アレンドロネート投与により増加した骨は、骨強度の増加に反映されていることが示された。アレンドロネートは、1年間の長期経口投与により、ラットにおける卵巢摘出による腰椎の骨量（骨塩密度、海綿骨量）と骨強度（最大荷重）の減少を骨石灰化に影響を与えず抑制した。

表ホ - 4 卵巣摘出ラット第 6 及び第 3 腰椎に対するアレンドロネート 1 年間経口投与の影響

検査項目		卵巣非摘出群	卵巣摘出群		
			溶媒投与群	0.1mg/kg投与群	0.5mg/kg投与群
第 6 腰椎	海綿骨量/組織量 (%)	±	a) ±	a) ±	a, b) ±
	骨梁数 (/mm)	±	a) ±	±	c) ±
	骨梁間隙 (μ m)	±	a) ±	±	c) ±
	骨梁幅 (μ m)	±	a) ±	a) ±	a) ±
	破骨細胞面/骨面 (%)	±	a) ±	a, b) ±	c) ±
	類骨面/骨面 (%)	±	a) ±	b) ±	b) ±
	骨石灰化速度 (μ m/day)	±	±	±	±
第 3 腰椎	骨塩密度 (g/cm ²)	±	a) ±	a) ±	c) ±
	骨灰分重量 (g)	±	a) ±	a) ±	c) ±
	最大荷重 (N)	±	a) ±	a) ±	±
	弾性率 (N/mm)	±	a) ±	b) ±	b) ±

a) : 卵巣非摘出群との間に有意差あり (p < 0.05. Fisher PLSD test) (平均値 ± 標準誤差、n = 10 ~ 12)

b) : 溶媒投与群との間に有意差あり (p < 0.05. Fisher PLSD test)

c) : 溶媒投与群及び0.1mg/kg投与群との間に有意差あり (p < 0.05. Fisher PLSD test)

表ホ - 5 卵巣摘出ラット大腿骨に対するアレンドロネート 1 年間経口投与の影響

検査項目	卵巣非摘出群	卵巣摘出群		
		溶媒投与群	0.1mg/kg投与群	0.5mg/kg投与群
近位部骨塩密度 (g/cm ²)	±	a) ±	a) ±	a, b) ±
遠位部骨塩密度 (g/cm ²)	±	a) ±	a) ±	a) ±
骨幹部骨塩密度 (g/cm ²)	±	±	±	±
大腿骨総骨塩密度 (g/cm ²)	±	a) ±	a) ±	a) ±
最大荷重 (N)	±	±	±	±
弾性率 (N/mm)	±	±	±	±

a) : 卵巣非摘出群との間に有意差あり (p < 0.05. Fisher PLSD test) (平均値 ± 標準誤差、n = 11 ~ 12)

b) : 溶媒投与群及び0.1mg/kg投与群との間に有意差あり (p < 0.05. Fisher PLSD test)

1 年間皮下投与治療試験

方法：SD系雌ラット（6.5～7ヵ月齢）の両側卵巢を摘出し、その6ヵ月後よりアレンドロネートを1年間、週に2回皮下投与（アレンドロネートとして1.8及び18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ：アレンドロン酸換算で1.4及び14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）し、第5腰椎の圧縮骨強度と骨灰分重量及び大腿骨の骨塩密度と曲げ骨強度を測定するとともに、第3腰椎の骨組織形態計測を実施した。椎骨を選択した理由は、エストロゲン欠乏によりラットの椎骨が、ヒトの椎骨と同様に海綿骨容積、海綿骨数、海綿骨厚、海綿骨結合性及び皮質骨厚の減少といった影響を受けるからである。骨組織形態計測と骨力学的及び骨灰分重量測定は侵襲的試験であり、これらの測定を同一の椎骨で実施することは不可能である。したがって、同一動物の隣接した椎骨を用いて、これら2つの評価を実施した。

結果：卵巢摘出により低下した第5腰椎の圧縮最大荷重は、18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与により有意に増加した（**図ホ**-11：A）。また、卵巢摘出により減少した骨灰分重量は、アレンドロネート1.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与により増加が認められた（**図ホ**-11：B）。この最大荷重と骨灰分重量には、有意な正の相関が認められた（ $r^2 =$ ）（**図ホ**-11：C）。アレンドロネート投与群では、海綿骨量（**図ホ**-12：A）及び皮質骨量（**図ホ**-12：B）がともに溶媒投与群より高値を示し、卵巢摘出により増加した類骨面（**図ホ**-12：C）と破骨細胞面（**図ホ**-12：D）は減少していた。補正骨石灰化速度には、アレンドロネートの影響はみられなかった（**図ホ**-12：E）。更に、腰椎の最大荷重は、骨梁間隙（**図ホ**-13：A）とは負の、また皮質骨量（**図ホ**-13：B）とは正の相関を示した。大腿骨の曲げ骨強度には、卵巢摘出の影響は認められなかったが（**図ホ**-14：A）、骨塩密度には減少が認められた（**図ホ**-14：B）。アレンドロネートの18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与は曲げ骨強度に影響を与えず、骨塩密度を卵巢非摘出群とほぼ同等のレベルまで増加させた。

結論：アレンドロネートは卵巢摘出により増加した破骨細胞面と類骨面をともに抑制したことから、卵巢摘出による骨量減少のアレンドロネートによる抑制は、骨吸収抑制作用に基づくものと考えられた。また、アレンドロネートは補正骨石灰化速度には影響を与えず、骨石灰化障害は認められなかった。腰椎における骨強度と骨灰分重量、骨梁間隙、皮質骨量の有意な相関関係から、アレンドロネートにより増加した骨量が、骨強度の増加に反映されていたことが示された。アレンドロネートは、ラットの卵巢摘出により減少した骨量及び骨強度を卵巢非摘出群と同レベルまで回復させた。

以上、ラット卵巢摘出モデルにおいて、アレンドロネートは、骨吸収抑制作用に基づき、卵巢摘出により減少した骨量ないし骨強度を骨石灰化に影響を与えることなく増加させることが明らかとなった。

A：最大荷重

B：骨灰分重量

C：最大荷重と骨灰分重量との相関

図表 - 11 卵巣摘出ラットの第5腰椎圧縮最大荷重と骨灰分重量に対するアレンドロネート1年間皮下投与の影響（平均値±標準偏差、n = 5～10）

OVX + VEH：卵巣摘出溶媒投与群、OVX + ALN 1.8：卵巣摘出1.8 µg/kg投与群、

OVX + ALN18：卵巣摘出18 µg/kg投与群、NON-OVX：卵巣非摘出群

*：卵巣摘出溶媒投与群との間に有意差あり（ $p < 0.05$, Student Newman Keuls test）

A：海綿骨量/組織量

B：皮質骨量/組織量

C：類骨面/骨面

D：破骨細胞面/骨面

E：補正石灰化速度

図表 - 12 卵巣摘出ラットの第3腰椎の骨形態計測値に対するアレンドロネート1年間皮下投与の影響（平均値±標準偏差、n = 5～10）

OVX + VEH：卵巣摘出溶媒投与群、OVX + ALN 1.8：卵巣摘出1.8 µg/kg投与群、

OVX + ALN18：卵巣摘出18 µg/kg投与群、NON-OVX：卵巣非摘出群

*：卵巣摘出溶媒投与群との間に有意差あり（ $p < 0.05$, Fisher PLSD test）

**：卵巣摘出溶媒投与群及び卵巣非摘出群との間に有意差あり（ $p < 0.05$, Fisher PLSD test）

***：他のすべての群との間に有意差あり（ $p < 0.05$, Fisher PLSD test）

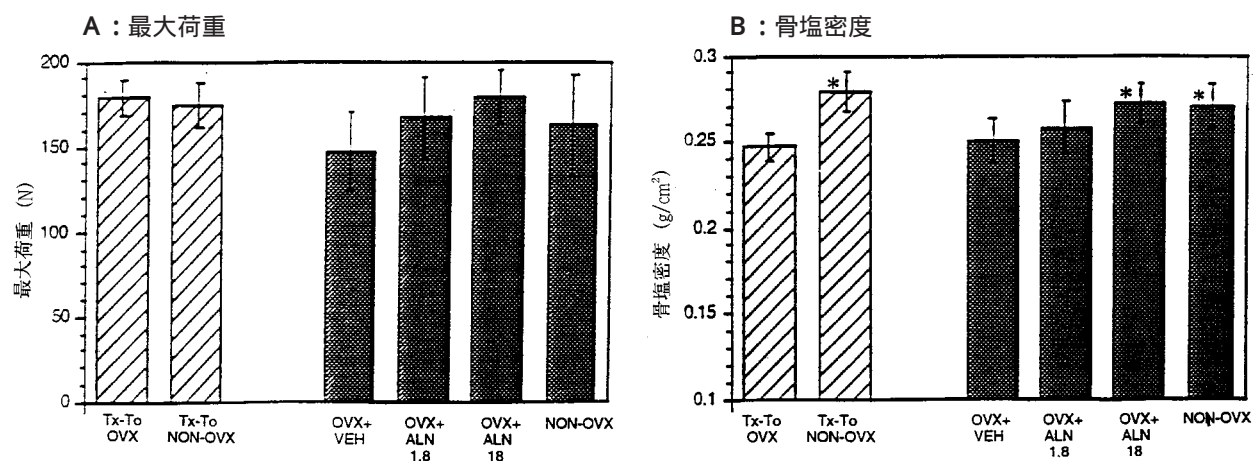
図水 - 13 骨梁間隙及び皮質骨量と、最大荷重との相関

A：第5腰椎の圧縮最大荷重と第3腰椎の骨梁間隙との相関

B：第5腰椎の圧縮最大荷重と第3腰椎の皮質骨量との相関

■：卵巢非摘出群、▲：卵巢摘出溶媒投与群、

●：卵巢摘出1.8 $\mu\text{g/kg}$ 投与群、○：卵巢摘出18 $\mu\text{g/kg}$ 投与群



図水 - 14 卵巢摘出ラットの大腿骨の最大荷重と骨塩密度に対するアレンドロネート1年間

皮下投与の影響（平均値 ± 標準偏差、n = 5 ~ 10）

Tx-To OVX：卵巢摘出群（投与前） Tx-To NON-OVX：卵巢非摘出群（投与前）

OVX + VEH：卵巢摘出溶媒投与群、OVX + ALN1.8：卵巢摘出1.8 $\mu\text{g/kg}$ 投与群、

OVX + ALN18：卵巢摘出18 $\mu\text{g/kg}$ 投与群、NON-OVX：卵巢非摘出群

*：投与前の卵巢摘出群及び投与終了後の卵巢摘出溶媒投与群との間に有意差あり

（ $p < 0.05$, Student Newman Keuls test）

2) 卵巣摘出ヒヒ

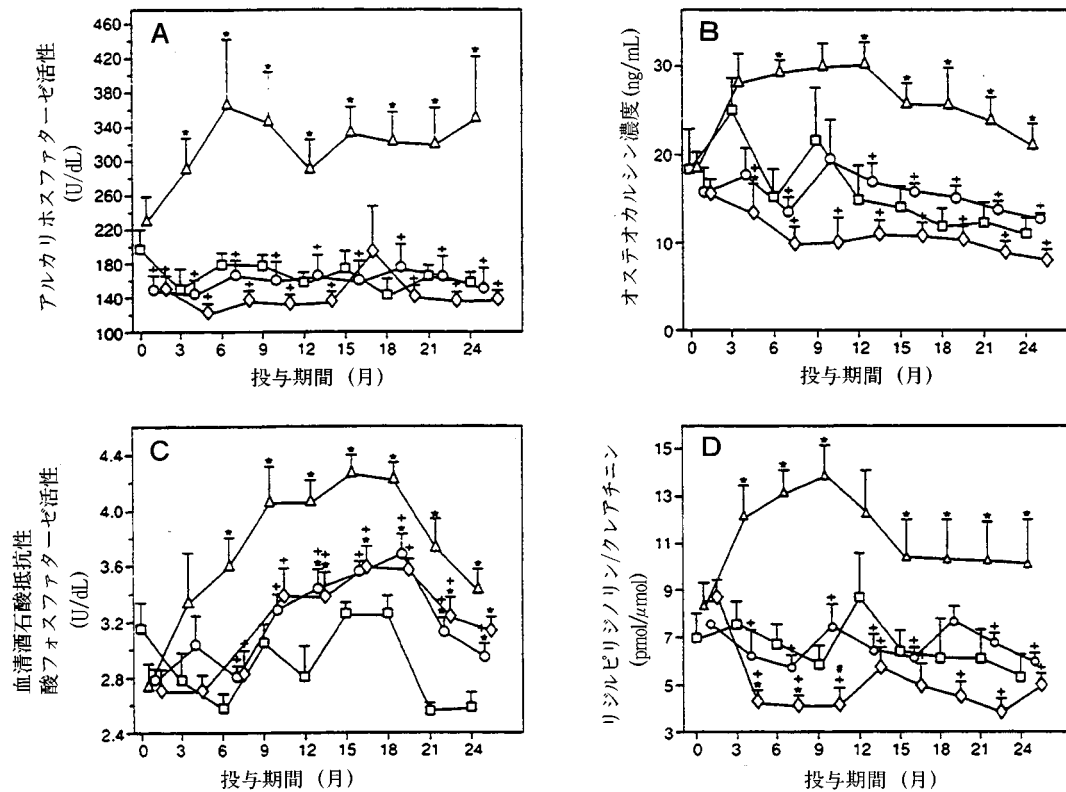
成熟ヒヒの両側卵巣を摘出し、アレンドロネートとして0.05及び0.25mg/kg（アレンドロネート酸換算で0.04及び0.19mg/kg）を2週に1回、2年間静脈内投与し、骨代謝マーカーの測定と腸骨陵骨生検による海綿骨形態計測を経時的に行うとともに、投与終了後に海綿骨及び皮質骨の骨形態計測と、骨強度測定を行い、本薬の霊長類における卵巣摘出に対する効果を検討した。

骨代謝マーカーに対する作用

方法：骨形成マーカーの血清アルカリフォスファターゼ（ALP）活性と血清オステオカルシン（BGP）濃度及び骨吸収マーカーの血清酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（TRAP）活性と尿中リジルピリジノリン（Lys）濃度を経時的に測定した。更に、腰椎（L1～4）の骨塩密度測定と腸骨陵生検による海綿骨形態計測を経時的に実施した。

結果：骨吸収マーカーのTRAP活性とLys濃度は、卵巣摘出3～6ヵ月後より卵巣摘出溶媒投与群で上昇が認められ、2年間にわたり卵巣非摘出群より高値を維持した。骨形成マーカーのALP活性及びBGP濃度も同様に上昇し高値を維持した。これに対し、アレンドロネート0.05及び0.25mg/kgを投与した卵巣摘出群では、これら骨形成及び骨吸収マーカーは、試験期間を通して溶媒投与群より有意な低値を示し、ほぼ卵巣非摘出群と同様の値で推移した（図水 - 15）。腸骨陵における、類骨面と吸収面は、卵巣摘出溶媒投与群において12ヵ月まで他の群に比較して高値を示したが、アレンドロネート投与により、骨代謝マーカーの動きと同様に卵巣非摘出群とほぼ同等のレベルで推移した（図水 - 16：B、C）。卵巣摘出により減少した腸骨陵の海綿骨量（図水 - 16：A）及び腰椎の骨塩密度（図水 - 16：D）も、アレンドロネート投与により卵巣非摘出群のレベルに維持された。また24ヵ月目に採取した腸骨陵海綿骨類骨面とBGP濃度の間には正の相関が、腰椎骨塩密度とは負の相関が認められた（図水 - 17）。

結論：骨吸収及び骨形成のマーカーの上昇は、卵巣摘出が成熟したヒヒの骨代謝回転を増加させることを示している。類骨面及び吸収面にも同様な増加が認められ、更に、骨代謝の生化学的マーカー（BGP）と組織形態計測パラメータ（類骨面）には正の相関が認められた。アレンドロネートは、この卵巣摘出による骨代謝回転の増加、海綿骨量と骨塩密度の減少を抑制した。骨代謝回転（類骨面）と骨量（骨塩密度）には負の相関が示された。これらの結果から、アレンドロネートは卵巣摘出によって増加する骨代謝回転を抑制し、この作用により骨量が維持されることが示唆された。更に、これらのマーカーは、2年間にわたり、ほぼ卵巣非摘出群のレベルで維持されたことから、アレンドロネートは骨吸収抑制作用により骨代謝回転を抑制するが、その抑制作用には蓄積性がないことが示唆された。



図ホ - 15 卵巣摘出ヒビにおける骨代謝マーカに対するアレンドロネート2年間静脈内投与の影響 (平均値 ± 標準誤差、n = 6 ~ 7)

A : 血清アルカリホスファターゼ活性、B : 血清オステオカルシン濃度

C : 血清酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ活性、D : 尿中リジルピリジノリン濃度 (クレアチニン濃度で補正)

□ : 卵巣非摘出群、△ : 卵巣摘出溶媒投与群、○ : 卵巣摘出0.05mg/kg投与群、◇ : 卵巣摘出0.25 mg/kg投与群

* : 卵巣非摘出群との間に有意差あり (p < 0.05, Fisher PLSD test)

+ : 卵巣摘出溶媒投与群との間に有意差あり (p < 0.05, Fisher PLSD test)

: 卵巣摘出0.05mg/kg投与群との間に有意差あり (p < 0.05, Fisher PLSD test)

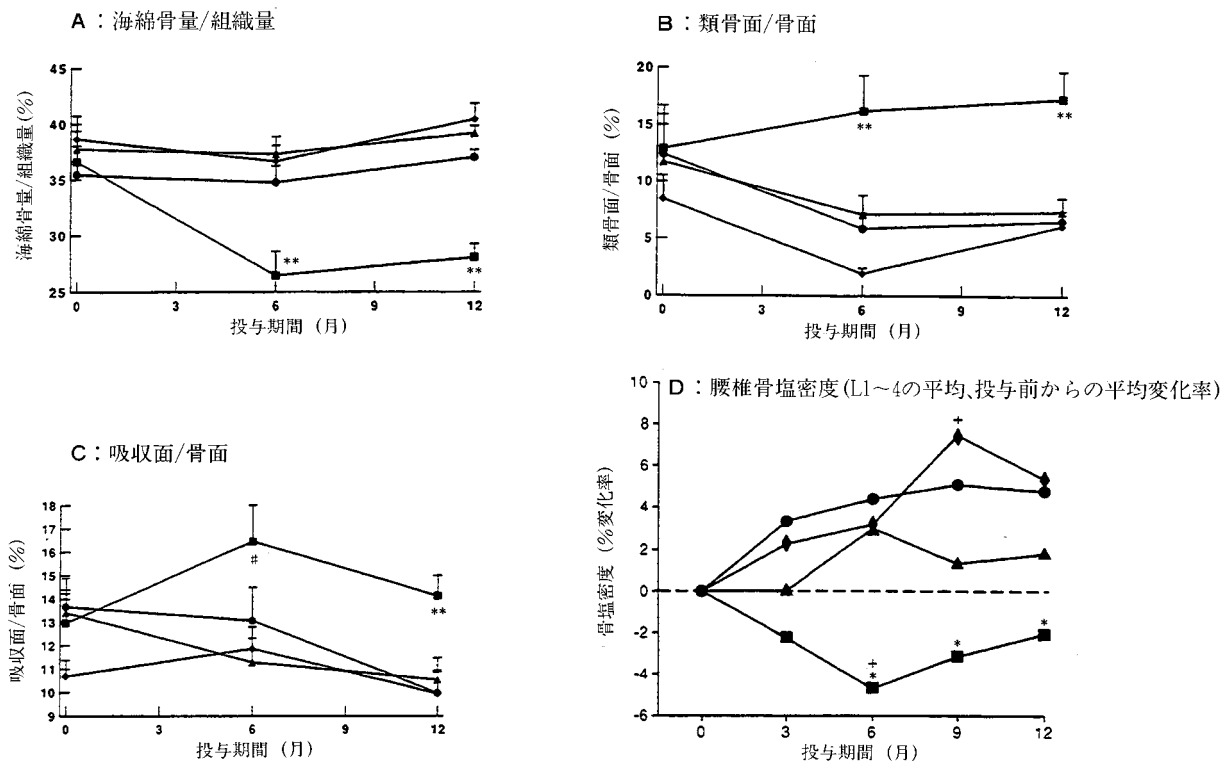
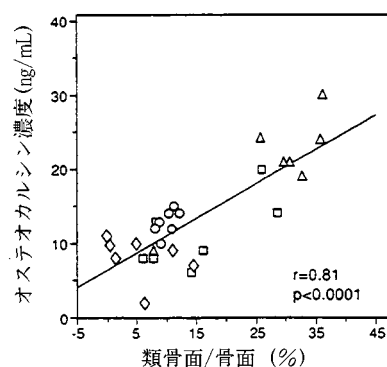


図16 - 16 卵巣摘出ヒビの腸骨稜の海綿骨量、類骨面、吸収面及び腰椎骨塩密度に対するアレンドロネート1年間静脈内投与の影響 (平均値±標準誤差、n = 6 ~ 7)

- : 卵巣非摘出群、■ : 卵巣摘出溶媒投与群、
- ▲ : 卵巣摘出0.05mg/kg投与群、△ : 卵巣摘出0.25mg/kg投与群
- * : 卵巣摘出0.25mg/kg投与群との間に有意差あり (p < 0.05、Fisher PLSD test)
- ** : 他のすべての群との間に有意差あり (p < 0.05、Fisher PLSD test)
- + : 投与前 (0時点) との間に有意差あり (p < 0.05、Fisher PLSD test)
- # : アレンドロネート投与群との間に有意差あり (p < 0.05、Fisher PLSD test)

A: オステオカルシン濃度と類骨面の関係



B: 腰椎骨塩密度 (L2~4の平均) と類骨面との関係

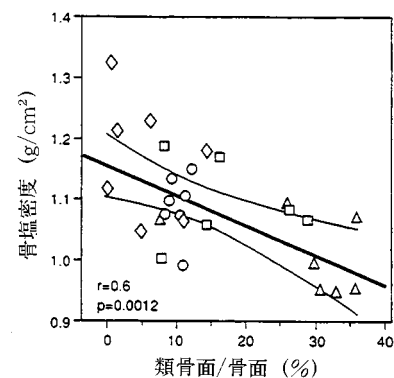


図17 - 17 オステオカルシン濃度と腸骨稜海綿骨類骨面の関係、及び腰椎骨塩密度と腸骨稜海綿骨類骨面との関係

- : 卵巣非摘出群、○ : 卵巣摘出溶媒投与群、
- : 卵巣摘出0.05mg/kg投与群、△ : 卵巣摘出0.25mg/kg投与群

海綿骨に対する作用

方法：投与終了後、第1～4腰椎の骨塩密度測定と第5腰椎の骨形態計測を実施した。

結果：卵巣摘出により腰椎の骨塩密度は減少したが、アレンドロネート0.25mg/kg投与により卵巣非摘出群のレベルに維持された（表ホ - 6）。また、アレンドロネート投与により海綿骨量は、卵巣摘出溶媒投与群と比べて明らかに高い値を示した（図ホ - 18：A）。骨梁数には、卵巣摘出及びアレンドロネート投与による影響は認められなかったが、骨梁幅についてはアレンドロネート投与群は卵巣摘出溶媒投与群に比較して、有意な高値を示した（図ホ - 18：B）。卵巣摘出により増加した類骨面は、アレンドロネート投与により、用量依存的に低下した（図ホ - 18：C）。骨石灰化速度は、アレンドロネート投与群と非卵巣摘出群との間に有意な差は認められなかった（図ホ - 18：D）。また、骨リモデリング1回あたりの骨収支（骨単位壁幅と骨吸収の深さの差）は、両アレンドロネート投与群で卵巣摘出溶媒投与群に比較して有意に高値を示した（図ホ - 18：E）。

結論：アレンドロネートは、卵巣摘出により減少したヒヒの腰椎海綿骨を、骨石灰化を障害することなく増加させることが示された。この骨量の増加は、主に骨梁幅の増加によるものであった。

表ホ - 6 卵巣摘出ヒヒ腰椎骨塩密度に対するアレンドロネート2年間静脈内投与の影響

測定部位	卵巣非摘出群	卵巣摘出群		
		溶媒投与群	0.05mg/kg投与群	0.25mg/kg投与群
第1腰椎骨塩密度	1.17 ± 0.19	1.03 ^{a)} ± 0.10	1.11 ± 0.04	1.18 ± 0.06
第2腰椎骨塩密度	1.16 ± 0.18	1.01 ^{a)} ± 0.06	1.10 ± 0.06	1.18 ± 0.08
第3腰椎骨塩密度	1.13 ± 0.13	1.02 ^{a)} ± 0.07	1.08 ± 0.06	1.17 ± 0.10
第4腰椎骨塩密度	1.14 ± 0.12	1.01 ^{a)} ± 0.06	1.09 ± 0.05	1.14 ± 0.12
第2～第4腰椎骨塩密度の平均値	1.14 ± 0.14	1.01 ^{a)} ± 0.06	1.09 ± 0.05	1.16 ± 0.10

（単位はg/cm²、平均値 ± 標準偏差、n = 7）

a）：卵巣非摘出群及び卵巣摘出0.25mg/kg投与群との間に有意差あり（p < 0.05、Fisher PLSD test）

A：海綿骨量/組織量

B：骨梁数と骨梁幅

C：類骨面/骨面

D：骨石灰化速度

E：骨収支

図表 - 18 卵巣摘出ヒヒの第5腰椎海綿骨に対するアレンドロネート2年間静脈内投与の影響

(平均値 ± 標準誤差、n = 6 ~ 7)

NON-OVX：卵巣非摘出群、OVX + VEH：卵巣摘出溶媒投与群、

OVX + ALN 0.05mg/kg IV：卵巣摘出0.05mg/kg投与群、

OVX + ALN 0.25mg/kg IV：卵巣摘出0.25mg/kg投与群

*：卵巣摘出溶媒投与群との間に有意差あり ($p < 0.05$, Fisher PLSD test)

**：卵巣非摘出群との間に有意差あり ($p < 0.05$, Fisher PLSD test)

皮質骨に対する作用

方法：投与終了後、橈骨皮質骨の骨組織形態計測を実施した。

結果：卵巣摘出は、橈骨の皮質骨の粗鬆性（ハバース管とフォルクマン管の総面積の皮質骨面積に対する割合）を約2倍に増加させた。アレンドロネートはこの粗鬆性の増加を用量に依存して抑制した（**図ホ - 19**）。リモデリング1回あたりに形成される骨量を示す骨単位壁幅には、卵巣摘出及びアレンドロネートによる影響はみられなかったが、骨吸収を示すハバース管直径と骨単位直径は卵巣摘出により有意に増加し、この増加はアレンドロネートにより抑制された（**表ホ - 7、図ホ - 20**）。骨代謝回転の指標である皮質骨形成速度は、卵巣摘出により約17倍に増加したが、アレンドロネート投与により抑制された（**図ホ - 21**）。また、アレンドロネート投与群において、層状構造を有する骨単位が認められた（**図ホ - 22**）。

結論：アレンドロネートは、卵巣摘出により増加したハバース管及び骨単位直径を減少させ、骨単位壁幅には影響を与えなかったことから、骨形成に直接影響を与えず骨吸収を抑制したものと考えられる。また、アレンドロネート投与により層状構造をもつ骨単位が認められたことから、アレンドロネートの骨吸収の抑制は皮質骨構造に影響を与えず、粗鬆性の増加を抑制するものと考えられた。

図ホ - 19 卵巣摘出ヒヒ橈骨皮質骨の粗鬆性に対するアレンドロネート2年間静脈内投与の影響

（平均値 ± 標準誤差、n = 7）

NON-OVX：卵巣非摘出群、OVX + VEH：卵巣摘出溶媒投与群、

OVX + ALN 0.05mg/kg I.V.：卵巣摘出0.05mg/kg投与群、

OVX + ALN 0.25mg/kg I.V.：卵巣摘出0.25mg/kg投与群

*：他のすべての群との間に有意差あり（ $p < 0.05$, Fisher PLSD test）

表水 - 7 卵巣摘出ヒヒの橈骨の骨単位構造と骨バランスに対するアレンドロネート 2 年間
静脈内投与の影響

検査項目	卵巣非摘出群	卵巣摘出群		
		溶媒投与群	0.05mg/kg投与群	0.25mg/kg投与群
骨単位壁幅 (μm)	±	±	±	±
ハバース管直径 (μm)	±	^{a)} ±	±	±
骨単位直径 (μm)	±	^{a)} ±	±	±

a) : 他のすべての群との間に有意差あり ($p < 0.05$, Fisher PLSD test) (平均値 ± 標準誤差、 $n = 6 \sim 7$)

A : 卵巣摘出溶媒投与群

B : 卵巣摘出0.25mg/kg投与群

図水 - 20 卵巣摘出ヒヒ橈骨皮質骨の顕微鏡写真
矢印は、ハバース管直径を示す。

図ホ - 21 卵巣摘出ヒヒ橈骨皮質骨の骨形成速度に対するアレンドロネート2年間静脈内投与の影響（平均値±標準誤差、n = 7）

NON-OVX：卵巣非摘出群、OVX + VEH：卵巣摘出溶媒投与群、
OVX + ALN 0.05mg/kg I.V.：卵巣摘出0.05mg/kg投与群、
OVX + ALN 0.25mg/kg I.V.：卵巣摘出0.25mg/kg投与群
*：他のすべての群との間に有意差あり（ $p < 0.0001$, Fisher PLSD test）

A：紫外線

B：透過偏光

図ホ - 22 アレンドロネート0.25mg/kgを2年間静脈内投与した卵巣摘出ヒヒの橈骨皮質骨単位像

骨強度に対する作用

方法：投与終了後、第4腰椎の椎体の海綿骨コアを用いて圧縮試験を行い、骨強度を測定した。また大腿骨骨幹と大腿骨頸部の骨強度を、それぞれ3点曲げ試験及び軸方向の圧縮試験で測定した。

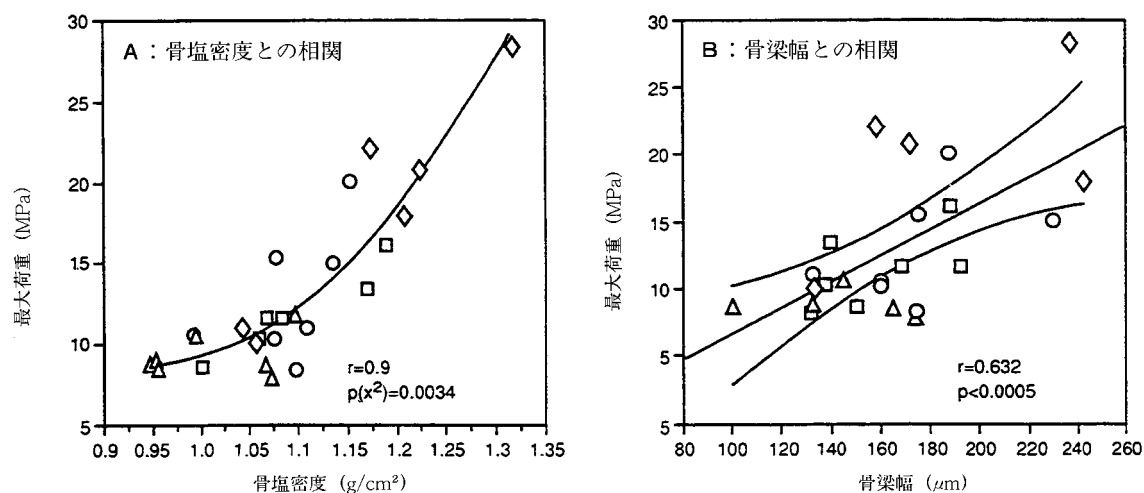
結果：海綿骨コアの骨強度は、卵巢摘出溶媒投与群では、卵巢非摘出群に比して減少傾向が認められ、0.25mg/kgのアレンドロネート投与により有意な増加が認められた(図ホ - 23)。また、この骨強度と第2 - 4腰椎の骨塩密度(表ホ - 6、p.181)及び第5腰椎の骨梁幅(図ホ - 18 : B、p.182)には強い正の相関がみられた(図ホ - 24)。皮質骨が主体の橈骨骨塩密度と大腿骨骨幹及び頸部の骨強度には、卵巢摘出あるいはアレンドロネート投与の影響は認められなかった(表ホ - 8)。

結論：卵巢摘出したヒビの海綿骨の骨強度はアレンドロネート投与により増加し、増加した骨は骨強度の増加に反映されることが示された。また、アレンドロネートの2年間投与によっても、長管骨の骨強度に影響を与えることはなかった。

以上、卵巢摘出ヒビにおいて、アレンドロネートは、骨石灰化に影響を及ぼさずに骨吸収を抑制し、卵巢摘出により減少した海綿骨量と強度を増加させるとともに、皮質骨粗鬆性増加も抑制した。

図ホ - 23 卵巢摘出ヒビの腰椎海綿骨圧縮強度に対するアレンドロネート2年間静脈内投与の影響(平均値±標準誤差、n = 7)

NON-OVX : 卵巢非摘出群、OVX + VEH : 卵巢摘出溶媒投与群、
OVX + ALN 0.05mg/kg IV : 卵巢摘出0.05mg/kg投与群、
OVX + ALN 0.25mg/kg IV : 卵巢摘出0.25mg/kg投与群
* : 他のすべての群との間に有意差あり (p < 0.05, Fisher PLSD test)



図水 - 24 海綿骨強度と、骨塩密度及び骨梁幅との関係

□ : 卵巣非摘出群、△ : 卵巣摘出溶媒投与群、
○ : 卵巣摘出0.05mg/kg投与群、◇ : 卵巣摘出0.25mg/kg投与群

表水 - 8 卵巣摘出ヒヒの橈骨骨塩密度と大腿骨曲げ骨強度に対するアレンドロネート2年間
静脈内投与の影響

検査項目	卵巣非摘出群	卵巣摘出群		
		溶媒投与群	0.05mg/kg投与群	0.25mg/kg投与群
橈骨骨塩密度 (g/cm ²)	0.49 ± 0.05	0.52 ± 0.05	0.52 ± 0.04	0.53 ± 0.06
大腿骨骨幹最大荷重 (N)	2391.6 ± 219.9	2144.6 ± 509.0	2352.2 ± 303.7	2353.1 ± 282.6
大腿骨頸部最大荷重 (N)	135.6 ± 35.9	186.6 ± 110.2	173.4 ± 78.0	166.8 ± 62.8
大腿骨骨幹弾性率 (N/mm)	1531.7 ± 150.2	1374.0 ± 254.4	1429.5 ± 185.7	1388.4 ± 170.3

(平均値 ± 標準偏差、n = 7)

3) 不動化ラット

方法：SD系雄ラット（250～280g）の一方の坐骨神経を切除することにより片側の後肢を不動化した。不動化手術前にアレンドロネート（含有するリンの量換算で0.01、0.1及び1 mgP/kg：アレンドロン酸換算で0.04、0.4及び4 mg/kg）を2日間皮下投与した。不動化手術後、24時間後、10日及び20日後に、大腿骨の長軸長と骨灰分重量を測定し、脛骨近位骨幹端の骨形態計測を実施した。

結果：溶媒投与群では、正常側の大腿骨骨灰分重量に対し不動化側大腿骨骨灰分重量は、不動化10日後では8.3%、不動化20日目では11.5%減少した（表ホ - 9）。0.01mgP/kg以上のアレンドロネート投与群は、不動化側の骨灰分重量の減少を、不動化20日後には溶媒投与群と比較して有意に抑制し、正常側と不動化側との骨灰分重量の差は0.1mgP/kg以上で減少した。溶媒投与群の不動化側では、不動化10日後以降、正常側に比べて海綿骨量は減少し、これは吸収面の増加（10日後）と類骨面の減少（10及び20日後）を伴っていた（表ホ - 10、11）。更に、骨石灰化速度も不動化20日後に減少していた。これに対し、0.01mgP/kg以上のアレンドロネート投与は、投与量に依存して海綿骨量の減少を有意に抑制した。不動化側の吸収面は0.1mgP/kg以上のアレンドロネート投与群で、類骨面は0.1mgP/kg以上のアレンドロネート投与群で、溶媒投与群と比較して減少したが、骨石灰化速度には影響を及ぼさなかった。

結論：不動化による骨量あるいは骨灰分重量の減少は、骨吸収の増加（吸収面の増加）と骨形成の低下（類骨面の減少及び骨石灰化速度の減少）によるものと考えられた。アレンドロネートは、骨石灰化に影響を与えず、吸収面の減少から示唆されるように、骨吸収を抑制することにより不動化による骨量減少を抑制した。

表ホ - 9 不動化ラットにおける大腿骨骨灰分重量（骨長比）に対するアレンドロネートの作用

投与群		正常側大腿骨 (mg/mm)	不動化側大腿骨 (mg/mm)	骨灰分重量変化率 (%)
24時間後	溶媒投与群	0.81 ± 0.04	0.83 ± 0.03	+ 2.5
	0.1mgP/kg投与群	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.03	0.0
10日後	溶媒投与群	0.84 ± 0.03	0.77 ^{a)} ± 0.03	- 8.3
	0.1mgP/kg投与群	0.94 ^{b)} ± 0.04	0.92 ^{b)} ± 0.05	- 2.1
20日後	溶媒投与群	0.87 ± 0.01	0.77 ^{a)} ± 0.01	- 11.5
	0.01mgP/kg投与群	0.97 ^{b)} ± 0.02	0.85 ^{ab)} ± 0.02	- 12.4
	0.1mgP/kg投与群	1.00 ^{b)} ± 0.02	0.93 ^{ab)} ± 0.01	- 7.0
	1 mgP/kg投与群	1.05 ^{b)} ± 0.01	1.00 ^{ab)} ± 0.01	- 4.8

a)：正常側大腿骨との間に有意差あり（ $p < 0.05$, Student's t-test）（平均値 ± 標準誤差、 $n = 5 \sim 6$ ）

b)：溶媒投与群との間に有意差あり（ $p < 0.05$, Student's t-testまたはFisher PLSD test）

表水 - 10 不動化ラットにおける近位脛骨骨幹端海綿骨量と吸収面に対するアレンドロネートの作用

投与群		海綿骨量 / 組織量 (%)		吸収面 / 骨面 (%)	
		正常側脛骨	不動化側脛骨	正常側脛骨	不動化側脛骨
24時間後	溶媒投与群	18.6 ± 2.3	16.7 ± 1.2	20.7 ± 1.4	16.9 ^{a)} ± 1.0
	0.1mgP/kg投与群	15.5 ± 0.6	15.6 ± 1.5	14.3 ^{b)} ± 1.1	15.8 ± 1.2
10日後	溶媒投与群	17.9 ± 1.9	7.9 ^{a)} ± 2.0	18.2 ± 2.6	22.5 ^{a)} ± 1.6
	0.1mgP/kg投与群	52.1 ^{b)} ± 2.6	41.0 ^{a,b)} ± 3.2	22.0 ± 0.8	22.6 ± 1.9
20日後	溶媒投与群	16.4 ± 2.1	7.1 ^{a)} ± 1.9	19.2 ± 2.0	21.5 ± 1.6
	0.01mgP/kg投与群	22.9 ^{b)} ± 2.7	15.5 ^{a,b)} ± 4.0	12.1 ^{b)} ± 1.5	12.3 ^{b)} ± 2.8
	0.1mgP/kg投与群	37.6 ^{b)} ± 2.1	35.4 ^{b)} ± 3.3	17.5 ± 2.1	17.7 ^{b)} ± 1.9
	1 mgP/kg投与群	71.6 ^{b)} ± 2.0	68.1 ^{b)} ± 3.2	16.1 ± 2.3	15.8 ^{b)} ± 2.1

a) : 正常側大腿骨との間に有意差あり (p < 0.05, Student's t-test) (平均値 ± 標準誤差、n = 5 ~ 6)

b) : 溶媒投与群との間に有意差あり (p < 0.05, Student's t-test)

表水 - 11 不動化ラットにおける近位脛骨骨幹端類骨面と石灰化速度に対するアレンドロネートの作用

投与群		類骨面 / 骨面 (%)		石灰化速度 (μ m/day)	
		正常側脛骨	不動化側脛骨	正常側脛骨	不動化側脛骨
24時間後	溶媒投与群	5.0 ± 1.5	4.2 ± 1.2	-	-
	0.1mgP/kg投与群	7.1 ± 2.9	6.0 ± 1.9	-	-
10日後	溶媒投与群	6.0 ± 1.2	2.4 ^{a)} ± 1.3	-	-
	0.1mgP/kg投与群	0.4 ^{b)} ± 0.2	0.1 ^{a,b)} ± 0.1	-	-
20日後	溶媒投与群	3.2 ± 0.6	1.3 ^{a)} ± 1.0	0.97 ± 0.05	0.68 ^{a)} ± 0.07
	0.01mgP/kg投与群	1.3 ^{b)} ± 0.4	1.9 ± 0.9	0.93 ± 0.06	0.66 ^{a)} ± 0.03
	0.1mgP/kg投与群	0.2 ^{b)} ± 0.1	0.3 ^{b)} ± 0.2	0.82 ^{b)} ± 0.03	0.68 ^{a)} ± 0.02
	1 mgP/kg投与群	0.2 ^{b)} ± 0.1	0.1 ^{b)} ± 0.1	0.83 ^{b)} ± 0.04	0.66 ^{a)} ± 0.04

- : 検討せず

(平均値 ± 標準誤差、n = 5 ~ 6)

a) : 正常側大腿骨との間に有意差あり (p < 0.05, Student's t-test)

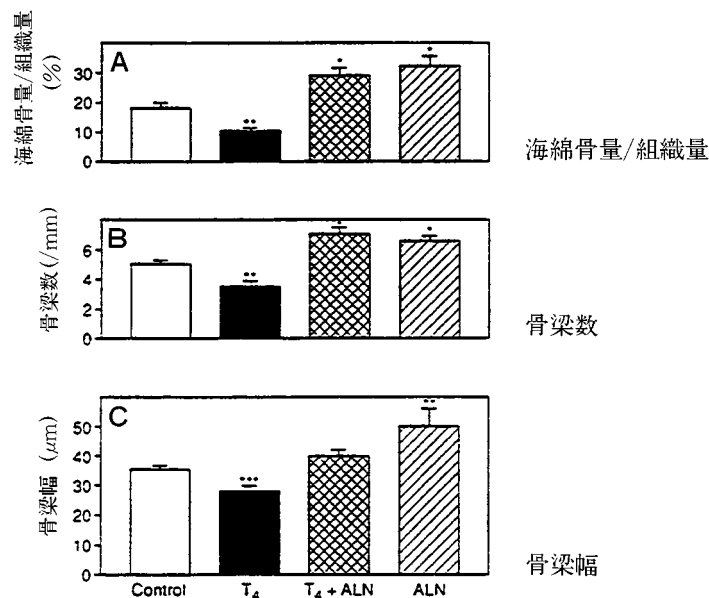
b) : 溶媒投与群との間に有意差あり (p < 0.05, Student's t-test)

4) 甲状腺ホルモン誘発ラットモデル

方法：SD系雄ラット（約230g）を4群にわけ、2群にはサイロキシン（T₄）を250 μg/kg、他の2群には溶媒を週6回皮下投与した。同時に、それぞれの処置群の各1群にアレンドロネートとして1.75mg/kg（アレンドロン酸換算で1.34mg/kg）を、残りの群には溶媒を、週に2回経口投与した。投与開始から3週間後に脛骨を摘出し、その骨組織形態計測を実施した。

結果：T₄処置溶媒投与群では、脛骨の海綿骨量、骨梁数及び骨梁幅は、溶媒処置溶媒投与群に比較して有意な減少がみられた。しかし、T₄処置アレンドロネート投与群ではそれらの減少は認められず、海綿骨量と骨梁数の増加が認められた（図ホ - 25）。また、T₄処置により増加した骨吸収活性を示す破骨細胞面、骨形成活性を示す類骨面及び骨芽細胞面は、アレンドロネートにより抑制された（表ホ - 12）。増加した骨石灰化速度も、アレンドロネートにより、溶媒処置溶媒投与群のレベルにまで抑制された。

結論：アレンドロネートは、骨吸収を抑制することにより骨石灰化に障害を与えることなく、甲状腺ホルモンによる骨代謝回転増加を介した骨量減少を抑制した。



図ホ - 25 サイロキシン誘発の骨減少に対するアレンドロネートの作用

（平均値 ± 標準誤差、n = 8）

Control：溶媒処置溶媒投与、T₄：T₄処置溶媒投与群、

T₄ + ALN：T₄処置アレンドロネート投与群、ALN：溶媒処置アレンドロネート投与群

*：溶媒処置溶媒投与群との間に有意差あり（p < 0.05、Fisher PLSD test）

**：他のすべての群との間に有意差あり（p < 0.05、Fisher PLSD test）

***：T₄処置アレンドロネート投与群との間に有意差あり（p < 0.05、Fisher PLSD test）

表ホ - 12 サイロキシンを投与したラット脛骨の骨組織形態計測パラメータに対するアレンドロネートの作用

検査項目	溶媒処置 溶媒投与群	T 4 処置 溶媒投与群	T 4 処置 アレンドロネート投与群	溶媒処置 アレンドロネート投与群
類骨面 / 骨面 (%)	1.32 ± 0.63	4.67 ^{a)} ± 2.49	0.79 ± 0.52	0.22 ± 0.14
類骨幅 (μ m)	3.14 ± 0.53	3.18 ± 0.50	2.54 ^{b)} ± 0.48	2.08 ^{b)} ± 0.68
骨芽細胞面 / 骨面 (%)	4.49 ± 2.56	9.48 ^{a)} ± 3.30	0.80 ^{b)} ± 0.44	0.27 ^{b)} ± 0.27
破骨細胞面 / 骨面 (%)	3.05 ± 0.99	8.41 ^{a)} ± 3.20	3.30 ± 0.99	1.31 ^{c)} ± 0.33
骨石灰化速度 (μ m/day)	1.37 ± 0.23	1.69 ^{a)} ± 0.33	1.17 ± 0.07	1.37 ± 0.26

a) : 他のすべての群との間に有意差あり (p < 0.05, Fisher PLSD test) (平均値 ± 標準偏差、n = 8)

b) : 溶媒処置溶媒投与群及びT 4 処置溶媒投与群との間に有意差あり (p < 0.05, Fisher PLSD test)

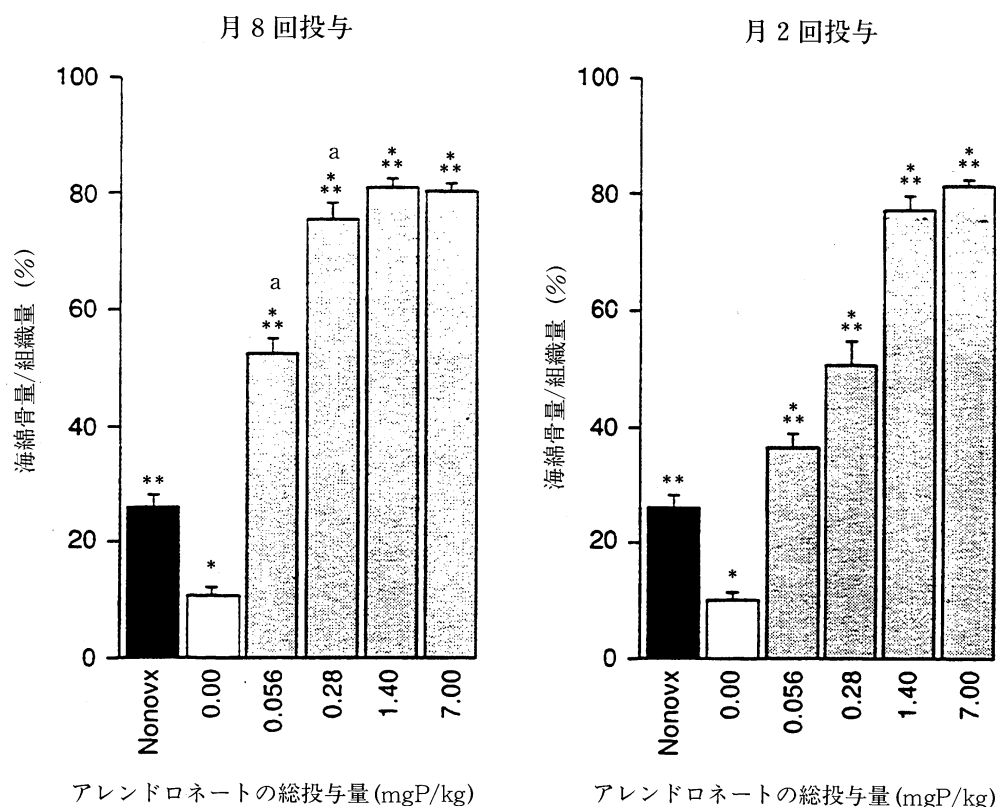
c) : T 4 処置アレンドロネート投与群との間に有意差あり (p < 0.05, Fisher PLSD test)

5) 卵巣摘出ラットにおける投与頻度による作用の比較

方法：SD系雌ラット（約220g）の両側卵巣を摘出した。アレンドロネートを1ヵ月あたりの総投与量が含有するリンの量として0.056、0.28、1.40及び7.00mgP/kg（アレンドロン酸換算で0.224、1.12、5.6及び28.0mg/kg）となるように、3ヵ月間、月に2または8回の頻度で皮下投与した後、脛骨近位部位の組織形態計測により海綿骨量を測定した。

結果：卵巣摘出により減少した近位脛骨の海綿骨量は、アレンドロネートの総投与量に依存して最低投与量（0.056mgP/kg）から増加した（図ホ - 26）。骨量の最大値は、月2回投与と月8回投与の間に違いはなかったが、低投与量（0.056及び0.28mgP/kg）では、月8回投与の方がより高い骨量増加効果が認められた。

結論：アレンドロネートによる卵巣摘出ラットにおける近位脛骨の海綿骨量増加作用は、低い投与量で総投与量が同じ場合には、頻回の投与（月2回より月8回）において、より強くみられた。



図ホ - 26 卵巣摘出ラットの近位脛骨海綿骨量に対する、アレンドロネートの月8回投与と月2回投与の影響の比較（平均値±標準誤差、n=3~6）

Nonovx：卵巣非摘出群

*：卵巣非摘出群との間に有意差あり（ $p < 0.05$, Fisher PLSD test）

**：卵巣摘出溶媒投与群との間に有意差あり（ $p < 0.05$, Fisher PLSD test）

a：同用量を投与した月2回投与群との間に有意差あり（ $p < 0.05$, Student's t-test）

(3) 正常動物の骨に対する影響

予定臨床使用量の約10倍のアレンドロネートを3年間、正常イヌに経口投与した試験では、微小骨折及び骨軟化症を疑わせる結果は得られなかった。

1) 正常イヌにおける3年間経口投与試験

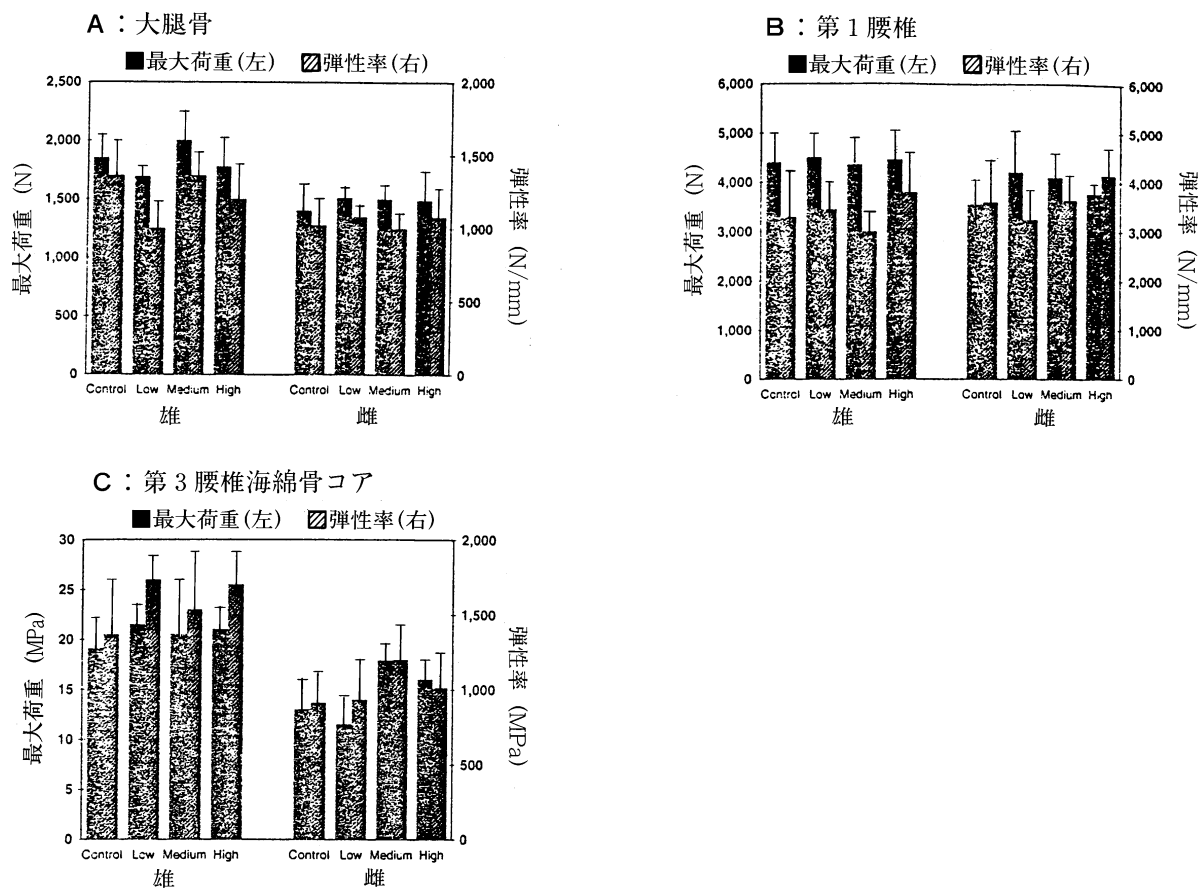
1群雌雄各4頭の成熟ビーグル犬(83~86週齢)に、アレンドロネート(0.25、0.5及び1.0mg/kg/day)を、1日1回、3年間経口投与した。

骨強度に対する影響

方法：3年間の投与終了後、右大腿骨、第1腰椎、第3腰椎を摘出した。右大腿骨については3点曲げ試験により、第1腰椎については頭尾軸方向の圧縮試験により、また第3腰椎については椎体より海綿骨からなるコアを切り出し、その圧縮強度を測定するとともに、左大腿骨骨幹と第3腰椎の海綿骨コアの見かけ上の密度(水和骨重量/骨体積)と骨灰分含量(骨灰分重量/乾燥骨重量)を測定した。更に、骨についての病理組織学的検討を行った。

結果：アレンドロネート(0.25~1.0mg/kg/day)の3年間経口投与は、大腿骨(図ホ-27:A)、第1腰椎(図ホ-27:B)、第3腰椎の海綿骨コア(図ホ-27:C)の最大荷重及び弾性率には影響を与えなかった。また、見かけ上の密度と骨灰分含量に対しても影響は認められず、病理組織学的に、骨梁の微小骨折や皮質骨の異常所見はみられなかった。

結論：予定臨床使用量(5mg/man/day:約0.1mg/kg/day)の約10倍量のアレンドロネートの3年間経口投与により、正常イヌの骨強度、骨の見かけ上の密度、骨灰分重量に影響は認められず、微小骨折や皮質骨の異常所見もみられなかった。



図ホ - 27 正常イヌの骨強度に対するアレンドロネート3年間経口投与の影響

(平均値 ± 標準偏差、n = 2 ~ 4)

Control : 溶媒投与群、Low : 0.25mg/kg投与群、
Medium : 0.5mg/kg投与群、High : 1.0mg/kg投与群

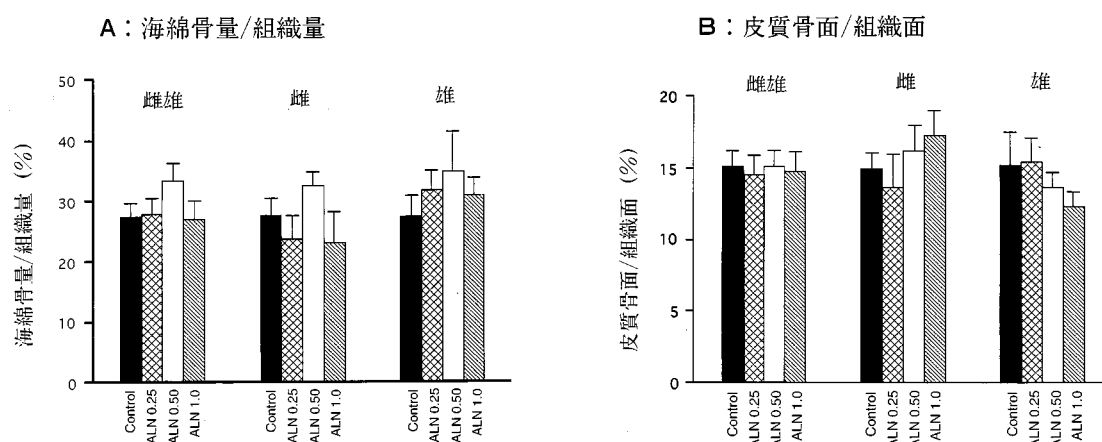
骨形態計測による検討

方法：3年間の投与終了後摘出した第5腰椎について、骨形態計測により骨リモデリングに対する影響を評価した。

結果：いずれの用量においても、第5腰椎の海綿骨量及び皮質骨面には影響は認められなかった（図ホ - 28）。また、骨梁数、骨梁幅、骨梁間隙にも投与に起因する影響は認められなかった。骨石灰化速度は、すべてのアレンドロネート投与群において減少した（図ホ - 29）。骨形成速度及び類骨面もすべてのアレンドロネート投与群で抑制された（表ホ - 13）。類骨成熟時間や類骨幅に影響は認められなかった。

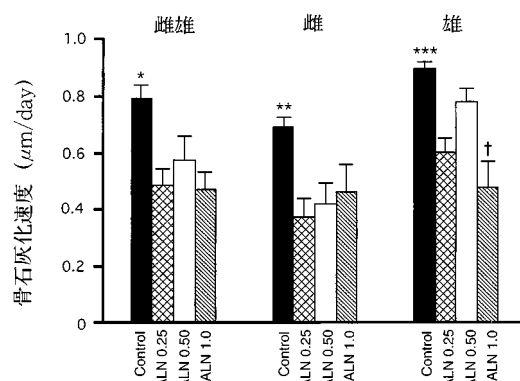
結論：予定臨床使用量（5 mg/man/day：約0.1mg/kg/day）の約10倍量にあたるアレンドロネート1.0mg/kg/dayの3年間投与により、骨量に影響は認められなかった。骨石灰化速度、骨形成速度及び類骨面の減少から、アレンドロネート投与により骨代謝回転は抑制されることが示されたが、類骨成熟時間や類骨幅には影響を及ぼさず、骨軟化症を疑わせる結果は得られなかった。

以上、正常イヌにおいて、予定臨床使用量（5 mg/man/day：約0.1mg/kg/day）の約10倍の投与量のアレンドロネートを3年間投与しても、骨強度に対する影響、微小骨折、骨軟化症は認められなかった



図ホ - 28 正常イヌの第5腰椎の海綿骨及び皮質骨に対するアレンドロネート3年間経口投与の影響（平均値±標準誤差、n = 3 ~ 4）

Control：溶媒投与群、ALN 0.25：0.25mg/kg投与群、
ALN 0.50：0.5mg/kg投与群、ALN 1.0：1.0mg/kg投与群



図水 - 29 正常イヌの骨石灰化速度に及ぼすアレンドロネート3年間経口投与の影響

(平均値±標準誤差、n = 3 ~ 4)

Control : 溶媒投与群、ALN 0.25 : 0.25mg/kg投与群、

ALN 0.50 : 0.5mg/kg投与群、ALN 1.0 : 1.0mg/kg投与群

*、** : 他の全ての群との間に有意差あり (p < 0.05、Fisher PLSD test)

*** : 0.25及び1.0mg/kg投与群との間に有意差あり (p < 0.05、Fisher PLSD test)

† : 0.5mg/kg投与群との間に有意差あり (p < 0.05、Fisher PLSD test)

表水 - 13 正常イヌの骨形成速度、類骨成熟時間、類骨面及び類骨幅に対するアレンドロネート3年間経口投与の影響

項目	性	溶媒投与群	アレンドロネート投与群		
			0.25mg/kg/day	0.5mg/kg/day	1.0mg/kg/day
骨形成速度 ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$)	雌雄	41.85 ^{a)} ± 10.84	10.87 ± 2.98	12.82 ± 4.96	3.69 ± 1.62
	雌	13.99 ± 3.77	4.93 ± 3.75	8.25 ± 4.23	1.63 ± 0.63
	雄	69.71 ^{a)} ± 4.11	16.81 ± 1.93	18.93 ± 10.20	5.75 ± 2.99
類骨成熟時間 (日)	雌雄	7.86 ± 0.78	14.06 ± 2.94	9.46 ± 1.63	10.02 ± 1.56
	雌	8.18 ± 1.53	16.99 ± 5.34	12.58 ± 1.30	10.62 ± 2.11
	雄	7.53 ± 0.63	11.14 ± 2.44	5.29 ± 0.31	9.41 ± 2.57
類骨面 / 骨面 (%)	雌雄	7.34 ^{a)} ± 1.59	2.08 ± 0.74	2.50 ± 0.74	1.31 ± 0.33
	雌	4.97 ± 1.51	0.89 ^{b)} ± 0.37	2.83 ± 1.07	1.19 ^{b)} ± 0.68
	雄	9.71 ^{a)} ± 2.40	3.27 ± 1.20	2.07 ± 1.18	1.43 ± 0.21
類骨幅 (μm)	雌雄	4.87 ± 0.47	4.87 ± 0.84	3.71 ± 0.43	3.21 ± 0.26
	雌	4.42 ± 0.79	4.51 ± 1.33	4.06 ± 0.70	3.43 ± 0.51
	雄	5.32 ± 0.52	5.23 ± 1.20	3.25 ± 0.35	2.99 ± 0.16

a) : 他のすべての群との間に有意差あり (p < 0.05, Fisher PLSD test)

(平均値±標準誤差、n = 3 ~ 4)

b) : 溶媒投与群との間に有意差あり (p < 0.05, Fisher PLSD test)

(4) 骨折修復に対する影響

予定臨床投与量の約20倍量のアレンドロネートをビーグル犬に骨折前9週間、骨折後16週間、あるいは骨折前9週間及び骨折後16週間にわたり経口投与した。その結果、骨折部位に残存する仮骨量が多い傾向がみられたものの、骨折部位の治癒の程度、強度、皮質骨の骨石灰化速度への影響は認められず、骨折治癒に影響を与えることはなかった。

1) 骨折イヌにおける25週間経口投与試験

方法：ビーグル犬（83～91週齢）を用い試験を実施した。9週間アレンドロネート投与後骨折させ、その後16週間溶媒を投与した群（ALN/溶媒群）9週間アレンドロネート投与後骨折させ、その後16週間アレンドロネートを投与した群（ALN/ALN群）9週間溶媒投与後骨折させ、その後16週間アレンドロネートを投与した群（溶媒/ALN投与群）9週間溶媒投与後骨折させ、その後16週間溶媒を投与した群（溶媒/溶媒群）に1群雌雄各5頭ずつ割り当てた。骨折は、麻酔下に橈骨に作製した。アレンドロネートは、2 mg/kg/dayの用量で1日1回経口投与した。骨折部位は、定期的にX線撮影を行った。投与終了後、橈骨を摘出し、骨折部位の強度（曲げモーメントと弾性率）を4点曲げ試験で評価した。また、皮質骨の骨単位における骨石灰化速度の測定も実施した。

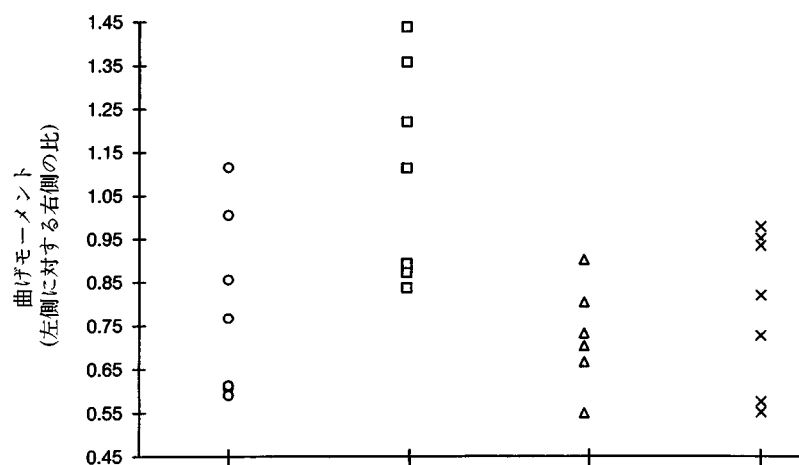
結果：骨折後16週目における骨折部位のX線撮影の結果から、骨折修復が進行している時期にアレンドロネートを投与した群（溶媒/ALN群とALN/ALN群）においてのみ、仮骨量が多い傾向が認められたが、骨折部位の治癒に遅延は認められなかった（表ホ - 14）。また、骨折部位の曲げモーメント（図ホ - 30）及び弾性（図ホ - 31）にも群間に差は認められなかった。骨単位における骨石灰化速度にも群間に差は認められなかった。

結論：予定臨床使用量（5 mg/man/day：約0.1mg/kg/day）の約20倍量のアレンドロネートを骨折治癒が進行している時期に投与することにより、骨折部位に残存する仮骨量は溶媒投与群に比較して多い傾向がみられたが、骨折部位の治癒の程度、強度、皮質骨の骨石灰化速度に影響は認められなかった。また、骨折前に投与した場合は、仮骨吸収に対する影響も認められなかった。これらの結果から、アレンドロネート処置は、骨折修復過程において、仮骨の吸収を抑制するが、造骨過程には影響せず、骨折治癒に対して影響を与えないことが示唆された。

表ホ - 14 骨折後16週目の橈骨骨折部位のX線診断結果

投与群	骨折治癒の程度		仮骨量			
	治癒後期相	治癒終了	なし	少量	中等量	多量
溶媒 / 溶媒群	1	9	6	3	0	1
ALN / 溶媒群	0	10	5	5	0	0
溶媒 / ALN群	1	9	0	6	4	0
ALN / ALN群	1	9	1	3	4	2

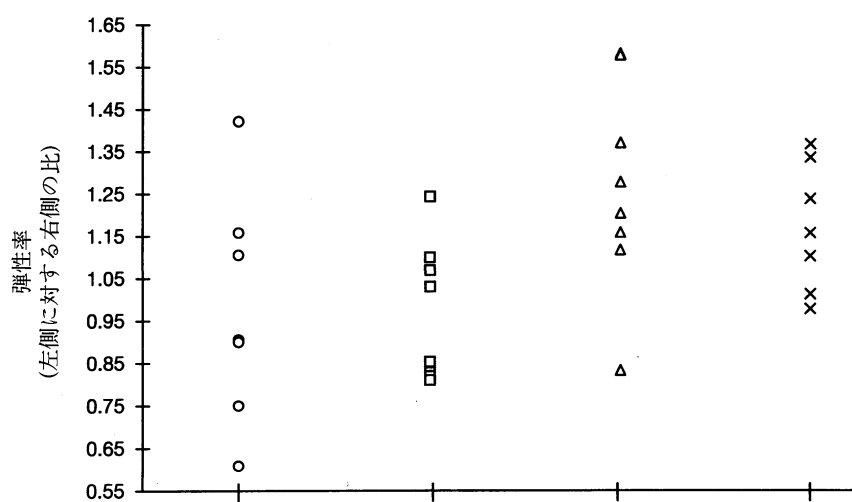
（個体数）



図水 - 30 骨折後17週目における、骨折修復橈骨の曲げモーメント

○：溶媒 / 溶媒群、□：ALN / 溶媒群、△：溶媒 / ALN群、×：ALN / ALN群

図中の値は、各個体の骨折作製側（右側）の橈骨の曲げモーメント（左側の健常橈骨の値に対する比）を示す。



図水 - 31 骨折後17週目における、骨折修復橈骨の弾性率

○：溶媒 / 溶媒群、□：ALN / 溶媒群、△：溶媒 / ALN群、×：ALN / ALN群

図中の値は、各個体の骨折作製側（右側）の橈骨の弾性率（左側の健常橈骨の値に対する比）を示す。

(5) 動物を用いた薬効薬理試験のまとめ

骨粗鬆症とは加齢とともに、骨吸収と骨形成のバランスが崩れ、相対的に骨吸収が優位となったために、骨量の減少が起こり、更に骨の微細構造の変化により骨の強度が低下し、骨折が起こりやすくなる病態である。骨量の減少、骨の微細構造の変化は、早期には主として海綿骨に顕著に現れるが、進行すれば皮質骨にも及ぶ。動物を用いた薬効試験から得られた海綿骨及び皮質骨における結果をパラメータごとに、表水 - 15にまとめた。

また、非臨床データを用いて安全性及び薬理学的見地からの骨への安全性についての考察を行った結果を表水 - 16に示す。

海綿骨：卵巣摘出、甲状腺ホルモン投与は、ラット（モデリング動物）において、骨代謝回転（骨吸収及び骨形成）を増加させ、海綿骨量、骨梁数または骨梁幅を低下させることが認められた。不動化を行った場合には、骨吸収の増加と骨形成の低下が認められた。またヒヒ（リモデリング動物）においては、卵巣摘出は、骨代謝回転を増加させ、海綿骨量及び椎骨海綿骨コアの骨強度も低下させた。アレンドロネートは、これらの動物において骨吸収を抑制し、結果として骨量を増加させた。ラットでは、骨梁数の増加が、ヒヒでは骨梁幅の増加が認められた。この骨量増加は海綿骨強度に反映されており、椎骨海綿骨コアの強度の明らかな増加がヒヒで認められた。ヒヒの実験においては、アレンドロネートは骨吸収とともに骨形成の指標も低下させたが、リモデリング1回あたりの、骨形成と骨吸収のバランスを正の方向に逆転させ、骨量を増加させた。ラット、ヒヒともに骨石灰化に対しては、影響を与えなかった。

以上の結果から、アレンドロネートは、卵巣摘出等によって骨吸収が骨形成を上回り、更に骨代謝回転の増加により減少した海綿骨量とそれに伴って低下した骨強度を、骨吸収を抑制することにより、増加させることが明らかとなった。

皮質骨：ラットにおいては、卵巣摘出により、皮質骨量や皮質骨が主体の大腿骨幹の骨塩密度や強度を明確に減少させるような結果は得られなかった。アレンドロネートは、卵巣摘出ラット大腿骨幹の骨強度には有意な影響を与えなかったが、骨塩密度を増加させた。また、腰椎皮質骨量を卵巣摘出溶媒投与群に比して増加させた。ヒヒの実験でも、大腿骨幹の強度には卵巣摘出の影響はみられず、アレンドロネートの作用も認められなかった。しかしながら、卵巣摘出により、橈骨皮質骨の粗鬆性、骨吸収を示すハバース管直径と骨単位直径、及び骨代謝回転の指標である皮質骨形成速度の増加が認められた。アレンドロネートは、これらの卵巣摘出後の皮質骨の粗鬆性、骨吸収及び骨代謝回転の増加を皮質骨構造には影響を与えず抑制した。

これらの結果は、本剤が皮質骨量の減少に対しても有効であることを示唆するものと考えられた。

骨への安全性：ビスホスホネート系薬剤は、骨粗鬆症に対する薬効の主体である骨吸収抑制作用に加えて、骨石灰化抑制作用を併せ持つことが知られている。

類薬であるエチドロネートの場合には、骨吸収抑制作用と骨石灰化抑制作用は、ほぼ同じ投与量でみられた。正常イヌにエチドロネートを1年間皮下投与すると、0.5mg/kg/day以上で用量に依存して、自然発生の骨折頻度が増加し、更に2 mg/kg/day以上で骨石灰化の完全な抑制による類骨幅の著しい増加が認められた¹⁹⁾。また、イヌに骨折作成前8週間とその後12週間皮下投与した場合、0.5mg/kg/day以上で骨折治癒部位の強度低下と骨折修復の遅延が認められている²⁰⁾。エチドロネートのイヌにおける生物学的利用率を約10%²¹⁾として経口投与量に換算すると、これらの非臨床試験で影響の認められた投与量は、約5 mg/kg/dayであり、ヒトの臨床投与量(200mg/man/day : 4 mg/kg/day; p.25)に近い用量である。実際、ヒトにおいてエチドロネートの連続服用による自然骨折症例が報告されている²²⁾。

アレンドロネートの場合には、骨吸収抑制作用がみられる用量の6000倍の用量で、骨石灰化抑制作用が認められている。卵巣摘出ラットにおける1年間の経口投与試験(最高用量0.5mg/kg/day(予定臨床投与量の約5倍) p.173)及び皮下投与試験(1日あたりの経口投与量に換算した場合の最高投与量: 約0.4mg/kg/day²³⁾(予定臨床投与量の約4倍) p.175)のいずれの試験においても、アレンドロネートは骨吸収抑制作用により骨量減少を抑制したが、骨石灰化を抑制する作用はみられなかった。卵巣摘出ヒトにおける2年間静脈内投与試験(1日あたりの経口投与量に換算した場合の最高投与量: 約0.8mg/kg/day²⁴⁾(予定臨床投与量の約8倍) p.178)においても、アレンドロネートは骨吸収を抑制することにより骨量減少を抑制したが、骨石灰化を抑制しなかった。また皮質骨では、正常な層状構造を有する骨単位が認められた。更に正常イヌを用いた3年間の長期経口投与試験(p.193)では、予定臨床投与量の約10倍の投与量(1 mg/kg/day)でも、骨強度を低下させなかった。また組織学的に検討しても、骨梁の微小骨折や皮質骨の異常所見は認められなかった。骨形態計測において、骨代謝回転を抑制したが、類骨幅には影響を与えず、骨軟化症を疑わせる所見は得られなかった。加えて、予定臨床使用量の約20倍の投与量(2 mg/kg/day)を、イヌに骨折作成前9週間と作成後16週間経口投与しても、骨折治癒部位の強度及び骨折治癒速度に影響を与えなかった(p.197)。

これらの非臨床試験結果から、アレンドロネートは骨吸収抑制作用と骨石灰化抑制作用とが乖離しており、骨石灰化抑制に基づく骨への有害作用を示す恐れが少ない薬剤と考えられた。

また、骨代謝回転は、自然発生する微細骨折を修復すると考えられており、過剰な骨代謝回転の抑制は骨に有害な影響を与える可能性が示唆されている²⁵⁾。この観点からみた場合も、卵巣摘

19) Flora, L. *et al.* : The long-term skeletal effects of EHDP in dogs, *Metab. Bone Dis. & Rel. Res.* 4 & 5 : 289-300, 1981

20) Lenehan, T.M. *et al.* : Effect of EHDP on fracture healing in dogs, *J. Orthop. Res.* 3 : 499-507, 1985

21) Michael, W. R. *et al.* : Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (disodium etidronate) in the rat, rabbit, dog and Monkey, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 21 : 503-515, 1972

22) Mautalen, C. *et al.* : Spontaneous fractures of uninvolved bones in patients with Paget's disease during unduly prolonged treatment with disodium etidronate (EHDP), *Clin. Orthop. Rel. Res.* 207 : 150-155, 1986

23) 生物学的利用率を0.95%として換算(p.212)

24) 生物学的利用率を1.72%として換算(p.212)

25) Johansen, A. *et al.* : Bisphosphonates and the treatment of bone disease in the elderly, *Drug & Aging* 8 : 113-126, 1996

出動物及び正常動物ともに、アレンドロネートは骨代謝回転を抑制したが、連続投与によっても骨代謝回転を完全に抑制することはなかった。また前述したように、アレンドロネートは、動物の骨の微細構造、力学的性質、骨折修復能等に有害な影響を与えなかった。加えて、正常ミニブタにアレンドロネートを1 mg/kg/dayで1年間経口投与を行った試験でも、骨代謝回転の抑制は認められたが、骨塩・膠原繊維複合構造や、骨強度に影響を与えなかった^{26、27)}。すなわち、アレンドロネート投与による骨代謝回転抑制に基づいた骨への有害な影響は、非臨床試験では認められていない。

アレンドロネートの非臨床試験の結果を以下にまとめた。

- 1) 本薬を高用量長期投与しても、ビスホスホネート系薬物が一般的に併せ持つ骨石灰化抑制作用に基づく骨石灰化障害は認められなかった。
- 2) 骨代謝回転抑制による骨への有害な作用も認められなかった。

以上のように、アレンドロネートは骨量減少モデルにおける海綿骨の骨量及び強度の増加と皮質骨の骨量増加をもたらした。これら動物実験で確認された海綿骨及び皮質骨に対するアレンドロネートの効果は、ヒトにおける効果を説明できるものと考えられる。更に、本薬の骨への安全性については十分に担保しているものと考えられた。

26) Lafage, M. *et al.* : Comparison of alendronate and sodium fluoride effects on cancellous and cortical bone in minipigs, *J. Clin. Invest.* 95 : 2127-2133, 1995

27) Fratzl, P. *et al.* : Effects of sodium fluoride and alendronate on the bone mineral in minipigs : A small-angle X-ray scattering and backscattered electron imaging study, *J. Bone Miner. Res.* 11 : 248-253, 1996

表水 - 15 動物を用いた薬効試験から得られた海綿骨及び皮質骨に対するアレンドネートの効果

動物	測定項目	海綿骨		皮質骨	
		腰椎、腸骨稜または脛骨骨幹端海綿骨		大腿骨幹、腰椎または橈骨皮質骨	
		正常動物と比較した時の病態動物の変化	病態動物のアレンドロネート投与による変化	正常動物と比較した時の病態動物の変化	病態動物のアレンドロネート投与による変化
モデリング動物 (ラット)	骨量	↓	↑	→	↑
	骨強度	↓	↑	→	→
	骨吸収指標	↑	↓	NT	NT
	骨形成指標	↑ (↓) ^a	↓	NT	NT
リモデリング動物 (ヒヒ)	骨量	↓	↑	↓ ^b	↑ ^c
	骨強度	↓	↑	→	→
	骨吸収指標	↑	↓	↑	↓
	骨形成指標	↑	↓	↑	↓

↑：増加、↓：減少、→：変化なし、NT：測定せず。

a：不動化ラットの場合。

b：骨粗鬆性の増加が認められたことから、骨量としては減少。

c：骨粗鬆性の低下が認められたことから、骨量としては増加。

表ホ - 16 非臨床試験におけるアレンドロネートの最高投与量と予定臨床使用量との比及び非臨床試験の結果

動物種	最高投与量			結果	
	投与量	投与期間 (投与経路)	ヒト臨床 投与量との 比 ^{a)}		
成長過程 ラット	24.1mg/kg	10日間 (sc)	2537倍	アレンドロネートの骨石灰化抑制作用量は骨吸収抑制作用量の6000倍高用量であった。	
卵巣摘出 ラット	0.5mg/kg	1年間 (po)	5倍	アレンドロネートは骨石灰化抑制及び骨強度減少を起こさなかった。	
	18 µg/kg	1年間 (sc)	4倍	アレンドロネートは骨石灰化抑制、骨強度減少を起こさなかった。	
卵巣摘出 ヒヒ	0.25mg/kg	2年間 (iv)	8倍	アレンドロネートは、骨石灰化抑制、骨強度減少を起こさず、皮質骨構造に影響しなかった。	
正常イヌ	1 mg/kg	3年間 (po)	10倍	アレンドロネートは、骨強度に影響を与えず、微小骨折、骨軟化症も起こさなかった。	
骨折イヌ	2 mg/kg	25週間 (po)	20倍	アレンドロネートは骨折治癒に影響を及ぼさなかった。	
正常ミニ ブタ	1 mg/kg	1年間 (po)	10倍	アレンドロネートは骨塩・膠原繊維複合構造や、骨強度に影響を及ぼさなかった。	

a) : 経口投与の場合 :

動物における最高投与量 / 予定臨床使用量 (0.1mg/kg/day)

皮下または静脈内投与の場合 :

動物における最高投与量 / 動物の生物学的利用率* / 予定臨床使用量 (0.1mg/kg/day)

* : ラット : 0.95%、イヌ : 1.76%、サル : 1.72%