

#### 2.6.2.2.5 アレンドロネートの破骨細胞メバロン酸経路に対する *in vivo* における作用 [4.2.1.1.5]

*In vitro* の実験では、アレンドロネート、リセドロネートのような窒素原子含有ビスホスホネートは破骨細胞の MVA 経路の FPP シンターゼを阻害することにより骨吸収を抑制することが示唆された。そこで、窒素原子含有ビスホスホネートが *in vivo* においても破骨細胞の MVA 経路を抑制する可能性について確認することを目的として実験を行った。

HMG-CoA 還元酵素の発現は、より下流の代謝物によるフィードバック抑制により制御されていることが知られていることから、破骨細胞における HMG-CoA 還元酵素の *in vivo* での発現をビスホスホネートが投与された動物で検討した。アレンドロネート、イバンドロネート又はリセドロネートを皮下投与したラットにおいて、脛骨の破骨細胞における HMG-CoA 還元酵素の発現は 85%まで抑制されたが、FPP シンターゼを阻害しないビスホスホネートであるエチドロネートやクロドロネートでは影響は認められなかった (図 2.6.2.2.5 #1、表 2.6.2.2.5 #2)。

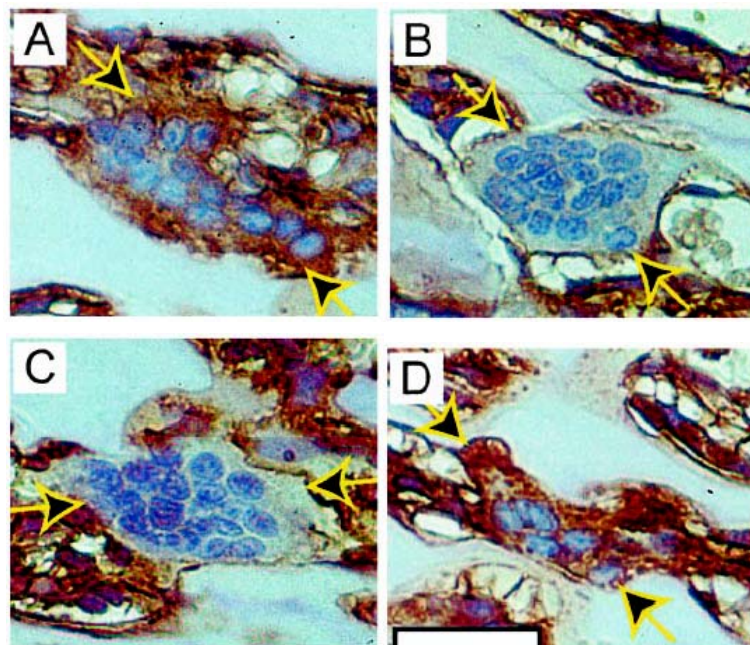


図 2.6.2.2.5 #1 窒素原子含有ビスホスホネートによる、*in vivo* における HMG-CoA 還元酵素の発現減少 [4.2.1.1.5]

A: 溶媒、B: アレンドロネート、C: リセドロネート、D: エチドロネートを投与したラットの近位脛骨を抗 HMG-CoA 還元酵素抗体とヘマトキシリンにより染色した。破骨細胞は、矢印の間に存在している。横棒は 50 $\mu$ m を示す。

表 2.6.2.2.5 #2 ビスホスホネートの破骨細胞における HMG-CoA 還元酵素の発現と破骨細胞数に対する影響 [4.2.1.1.5]

処置 (例数)	HMG-CoA 還元酵素陽性破骨細胞 (%) (平均値±標準誤差)	破骨細胞数 (個/mm <sup>2</sup> ) (平均値±標準誤差)
溶媒 (18)	82 ± 4	23.2 ± 1.4
アレンドロネート (20)	20 ± 4 <sup>a</sup>	32.8 ± 1.7 <sup>a</sup>
リセドロネート (7)	23 ± 9 <sup>a</sup>	27.3 ± 1.4 <sup>c</sup>
イバンドロネート (4)	27 ± 3 <sup>a</sup>	34.2 ± 5.1 <sup>b</sup>
クロドロネート (4)	85 ± 10	18.7 ± 1.0
エチドロネート (4)	96 ± 3	21.5 ± 1.0

a: 溶媒群、エチドロネート群、クロドロネート群に比較して統計学的に有意 ( $p<0.0001$ )。

b: 溶媒群、エチドロネート群、クロドロネート群に比較して統計学的に有意 ( $p<0.01$ )。

c: いずれの群とも統計学的に有意差なし。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤のシンバスタチン処置は、アレンドロネートによる HMG-CoA 還元酵素発現の減少作用に拮抗したことから、MVA と FPP の間にある中間体により HMG-CoA 還元酵素の発現は制御されていることが示唆された (図 2.6.2.2.5 #3)。

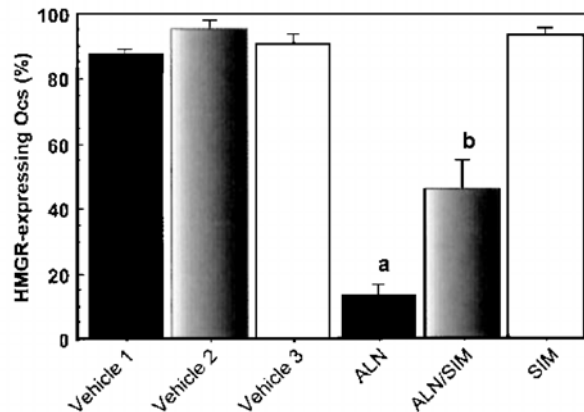


図 2.6.2.2.5 #3 *In vivo*の破骨細胞における HMG-CoA 還元酵素発現に対するアレンドロネートによる阻害作用とシンバスタチンによる拮抗作用 [4.2.1.1.5]

ラットにアレンドロネート、シンバスタチンあるいは両薬剤を投与し、近位脛骨の HMG-CoA 還元酵素 (HMGR) を発現した破骨細胞数をブラインドの条件で計数した。溶媒投与 (Vehicle)、アレンドロネート投与 (ALN)、シンバスタチン投与 (SIM) 及びアレンドロネートとシンバスタチン併用投与 (ALN/SIM) の結果を示した。

a: アレンドロネート及びシンバスタチン併用投与群 ( $p=0.0002$ )、その他すべての群 ( $p<0.0001$ ) との比較において統計学的に有意。

b: アレンドロネート投与群を除いた群と比較して統計学的に有意 ( $p<0.0001$ )。

これらの結果は *in vivo* において窒素原子含有ビスホスホネートが破骨細胞の MVA 経路に対し作用することを示したものであり、窒素原子含有ビスホスホネートが本機序を介して骨吸収を抑制していることを示唆するものである。

#### 2.6.2.2.6 アレンドロネートの卵巣摘出ラットにおける骨量減少に対する作用 [4.3.10]

哺乳動物では、エストロゲン欠乏により骨代謝回転が亢進し、骨量減少を生じることが知られている。そこでラットを用いて、卵巣摘出後の骨量減少に対するアレンドロネートの抑制作用を検討した。アレンドロネートが含有するリン量換算で、1 ヶ月あたり 0.00、0.056、0.28、1.40 及び 7.00mg P/kg の用量を、月 8 回 (週 2 回)、4 回 (週 1 回) 又は 2 回 (2 週に 1 回) に分割して、両側卵巣を摘出した雌性ラット (250~280g) (1 群あたり 6 匹) に皮下投与した。卵巣摘出の 12 週間後に大腿骨及び脛骨を摘出し、大腿骨の骨塩量と脛骨の骨組織形態計測を行った。

溶媒投与ラットにおける、骨長で補正した大腿骨骨塩量は、卵巣摘出の 12 週間後に卵巣非摘出対照群と比較して 12%減少した。アレンドロネート投与群の大腿骨骨塩量は、卵巣摘出対照群及び卵巣非摘出対照群と比較して有意かつ用量依存的に増加した (図 2.6.2.2.6 #1)。脛骨の組織形態計測においても、海綿骨量の有意な増加が認められた (図 2.6.2.2.6 #2)。海綿骨量への最大効果が認められない用量における脛骨海綿骨量に与える増加効果は、週 2 回分割投与の方が 2 週に 1 回の投与に比して優れていたが、より高用量域においては同程度であり、また、大腿骨骨塩量の増加についても同様であった。

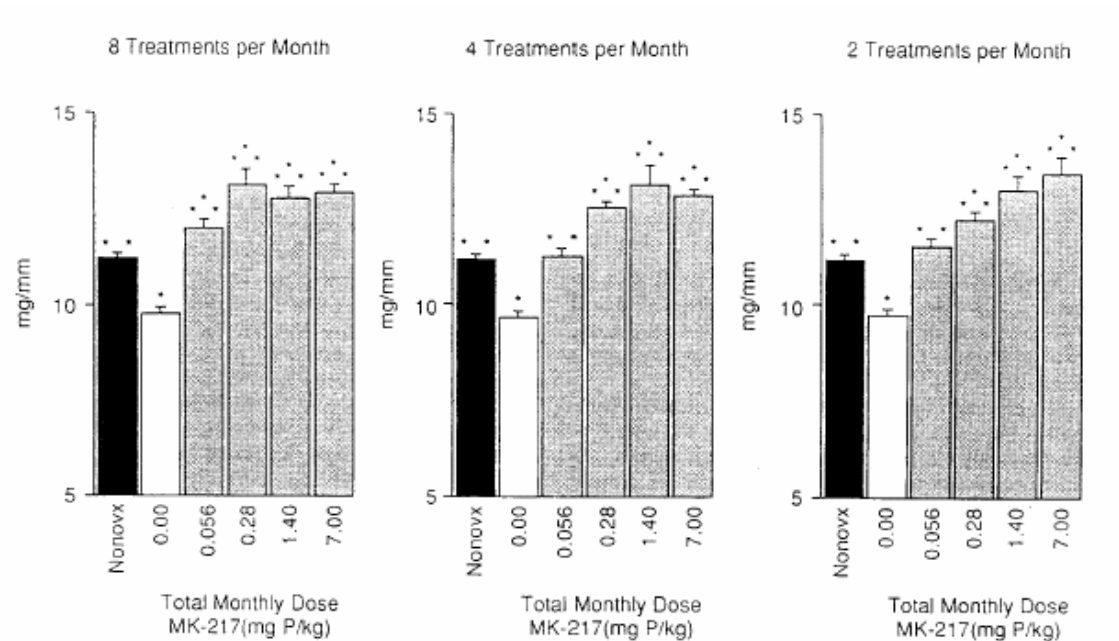


図 2.6.2.2.6 #1 卵巣摘出ラットにおける大腿骨骨塩量に対するアレンドロネートの作用 [4.3.10]

卵巣摘出ラットにアレンドロネート (MK-217) を、含有するリン量換算で 1 ヶ月あたり 0.00、0.056、0.28、1.40 及び 7.00mg P/kg の用量で、月 8 回、4 回又は 2 回に分割して投与した。12 週間後に大腿骨の骨塩量を測定し骨長で補正した。データ (mg/mm) は平均値 ± 標準誤差で示した。

\*: 卵巣非摘出対照群 (Nonovx) と比較して統計学的に有意 ( $p < 0.05$ )。

\*\* : 卵巣摘出溶媒投与対照群 (0.00mg P/kg) と比較して統計学的に有意 ( $p < 0.05$ )。

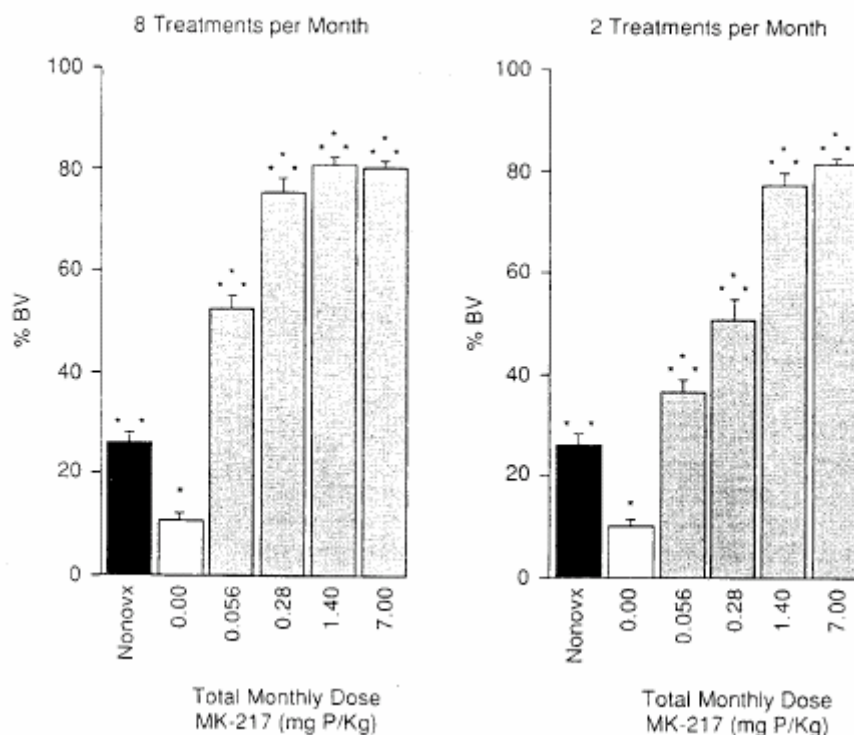


図 2.6.2.2.6 #2 卵巣摘出ラットにおける脛骨海綿骨量に対するアレンドロネートの作用 [4.3.10]

卵巣摘出ラットにアレンドロネート (MK-217) を、含有するリン量換算で 1 ヶ月あたり 0.00、0.056、0.28、1.40 及び 7.00mg P/kg の用量で、月 8 回又は 2 回に分割して投与した。12 週間後に脛骨の骨組織形態計測を行い、海綿骨量 (%BV) を求めた。データは平均値 ± 標準誤差で示した。

\*: 卵巣非摘出対照群 (Nonovx) と比較して統計学的に有意 ( $p < 0.05$ )。

\*\* : 卵巣摘出溶媒投与対照群 (0.00mg P/kg) と比較して統計学的に有意 ( $p < 0.05$ )。

以上の結果は、エストロゲン欠乏ラットの骨量減少に対するアレンドロネートの抑制効果を示す。卵巣摘出ラットでは、総投与量が同じであれば月 8 回 (週 2 回) から月 2 回 (2 週に 1 回) までの投与頻度で、アレンドロネートによる有意な骨吸収抑制が示された。

Masarachia らにより報告されたラット及びマウスを用いた試験結果において、放射標識したアレンドロネートとエチドロネートの破骨細胞面と骨芽細胞面への分布の解析により、これらビスホスホネートは、低用量投与では骨吸収が行われている破骨細胞面に、より選択的に分布するが、高用量投与では、骨面全体に広がって分布することが明らかになっている [4.3.4]。これらの結果から、本試験における 0.056 及び 0.28mg P/kg のような低用量投与では、アレンドロネートは骨芽細胞面に対して約 4~8 倍の濃度で破骨細胞面に分布することが示唆され、一方、高用量投与 (1.40 及び 7.00mg P/kg) では、より全体の骨面に分布すると考えられ、骨吸収面にすでに存在する破骨細胞を抑制するだけでなく、異なった場所で新たに骨吸収を行う破骨細胞もまた抑制する効果が予想される。低用量のアレンドロネートは骨吸収期の破骨細胞面により選択的に分布し、活性化している破骨細胞を抑制することから、各投与の間に発生する新たな骨吸収部位に

結合することができないと考えられ、それゆえ、投与頻度は効果を発現する上で重要な因子であり、骨吸収期間より投与間隔が短ければ、低用量投与においても効果的な骨吸収抑制を得ることができる。

本試験で用いた卵巣摘出ラットでは、閉経期のヒトに比べてより急速な骨量の減少が起こることから、その骨代謝回転はヒトに比べてより速く、骨吸収期間も短いと考えられる。また、各リモデリング部位における骨吸収は全身の骨に同時に起こらず、基本的には無作為かつ連続的に起こるため、低用量では頻回に投与することが必要である。最後にアレンドロネートを投与した後に発生した新たな骨吸収面では十分なアレンドロネートは結合しておらず、それらの部位における骨吸収は、再度アレンドロネートが投与されない限り抑制されないことから、低用量のアレンドロネート投与でより効果的に骨吸収を抑制するためには、骨吸収期間よりも短い投与間隔で投与を行うことが必要となる。高用量では、骨吸収面に対する選択性を失い、新たに骨吸収が起こる骨面全体にまで広がって分布するため、本試験の結果に反映されているように、2週に1回と週2回の投与頻度の間で差は認められなくなる。

総括すると、低用量では骨吸収が起こっている部位により選択的に分布すること、ラットにおいて骨代謝回転がヒトよりも速いこと、また、全身の骨において無作為に骨吸収が発生することの3つの因子により、低用量においては低頻度投与（2週に1回投与）で高頻度投与（週2回投与）より有効性が低くなったと考えられる。ただし、骨吸収期間より長い投与間隔での低頻度投与でも骨面全体に分布するような十分量を投与した場合には、高頻度投与時と同程度の骨吸収抑制作用が認められるものと考えられる。

ヒトにおいて各リモデリング部位における骨吸収期間は約2～4週間と推定されている。アレンドロネートのヒトにおける週1回の投与間隔は、この骨吸収期間よりも短いことから、1日1回量の7倍量で、1日1回投与と同様の骨吸収抑制作用が認められたものと考えられる。

12週間投与を行った本試験での最小有効量は、いずれの投与頻度においても最低投与量である月あたり0.056mg P/kg（アレンドロネートとして0.224mg/kg）であった。この最小有効量をアレンドロネートのラットにおける生物学的利用率（0.95%）を用いて、1日あたりの経口投与量に換算すると、0.84mg/kgとなる。一方、卵巣摘出ラットに1日1回アレンドロネートを0.04、0.2、1.0及び5.0mg/kgの用量で2ヵ月間経口投与した場合の大腿骨における骨量減少抑制の最小有効量は、1mg/kg/dayであった[4.3.11]。このように、投与期間が類似しているラット卵巣摘出モデルを用いた2試験を比較すると、1日1回並びに2週に1回までの投与頻度における1日あたりの経口投与量として換算した最小有効量が1並びに0.84mg/kg/dayと近似していたことは、アレンドロネートとして同じ総量をこれらの期間で分割投与しても、言い換えれば、1日あたりの有効量を投与間隔の日数分まとめて投与しても、卵巣摘出ラットの骨量減少に対して同様に有効であることを示唆している。

#### 2.6.2.2.7 アレンドロネートの卵巣摘出ヒヒにおける骨量減少に対する作用 [4.3.12]

卵巣摘出後のヒヒ（1群あたり7匹）におけるエストロゲン欠乏による骨量減少と骨強度に対するアレンドロネートの2年間投与（0.05又は0.25mg/kg、2週に1回静脈内投与）の影響を検



討した。骨代謝回転の生化学的指標は、卵巣摘出群では上昇したが、アレンドロネート投与により、0.05mg/kg 投与群では非卵巣摘出群のレベルに、0.25mg/kg 投与群ではそれ以下のレベルに維持された。2年間の投与によっても、骨代謝回転の生化学指標に蓄積的な変動は認められなかった (図 2.6.2.2.7 #1)。

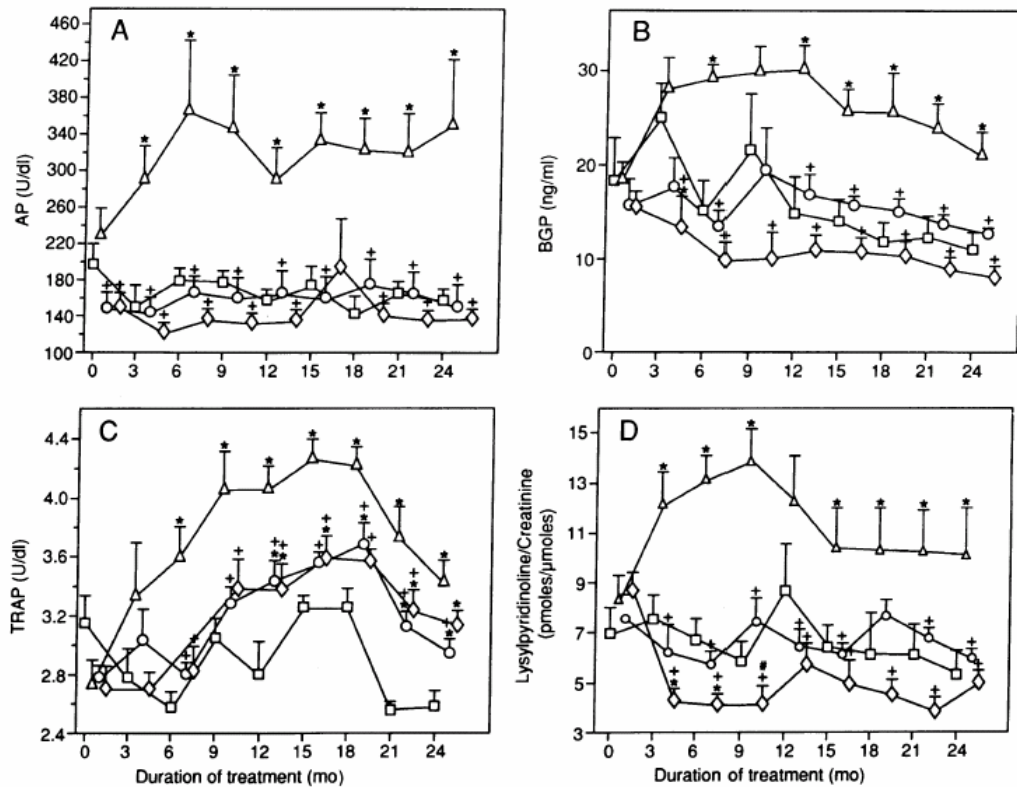


図 2.6.2.2.7 #1 卵巣摘出ヒヒにおける骨代謝回転生化学指標に対するアレンドロネート 2 年間静脈内投与の影響 [4.3.12]

卵巣摘出ヒヒ (n=7) にアレンドロネートを、0.05 又は 0.25mg/kg の用量で 2 週に 1 回静脈内投与した。データは平均値±標準誤差 (n=6-7) で示した。

A: 血清アルカリホスファターゼ活性 (AP: U/dL)、B: 血清オステオカルシン濃度 (BGP: ng/mL)、C: 血清酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ活性 (TRAP: U/dL)、D: 尿中リジリピリジノリン濃度 (クレアチニン濃度で補正: pmoles/μmoles)。

□: 卵巣非摘出対照群、△: 卵巣摘出溶媒投与対照群、○: 卵巣摘出 0.05mg/kg 投与群、◇: 卵巣摘出 0.25mg/kg 投与群。

\*: 卵巣非摘出対照群との間に有意差あり ( $p<0.05$ )。

+: 卵巣摘出溶媒投与対照群との間に有意差あり ( $p<0.05$ )。

#: 卵巣摘出 0.05mg/kg 投与群との間に有意差あり ( $p<0.05$ )。

第 5 腰椎の骨組織形態計測では、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対照群に比べて高値を示し、骨梁幅の増加も認められた。卵巣摘出溶媒投与対照群では、海綿骨の類骨面や骨単位活性化率等で示される骨リモデリングが亢進していたが、アレンドロネート 0.05mg/kg 投与群では卵巣非摘出対照群のレベルまで、0.25mg/kg 投与群ではそれ以下のレベルまで低下した。アレンドロネートは、骨の石灰化の指標 (類骨幅・骨石灰化速度等) には影響を

与えなかった (表 2.6.2.2.7 #2)。

表 2.6.2.2.7 #2 卵巣摘出ヒヒの骨組織形態計測指標に対するアレンドロネート 2 年間静脈内投与の影響 [4.3.12]

	卵巣	卵巣摘出	卵巣摘出	卵巣摘出
	非摘出対照群	溶媒投与対照群 <sup>a</sup>	0.05mg/kg 投与群	0.25mg/kg 投与群
海綿骨量/組織量 (%)	28.4±5.20	23.1±4.18	31.3±7.24 <sup>b</sup>	33.8±8.25 <sup>b</sup>
骨梁幅 (μm)	158.4±24.8	141.1±26.2	178.7±24.8 <sup>b</sup>	182.9±45.6 <sup>b</sup>
骨梁数 (/mm)	1.80±0.28	1.68±0.39	1.78±0.48	1.85±0.22
類骨面/骨面 (%)	9.01±2.93	13.51±7.96	4.83±2.84 <sup>b</sup>	2.24±3.28 <sup>c</sup>
類骨幅 (μm)	5.68±1.10	6.70±0.50	6.51±1.34	5.60±2.47
骨石灰化速度 (μm/日)	0.70±0.13	0.92±0.15	0.71±0.22	0.64±0.36
骨単位活性化率 (/年)	0.48±0.40	0.86±0.67	0.35±0.23 <sup>b</sup>	0.086±0.14 <sup>b</sup>

データは平均値±標準偏差 (n=7) で示した。

a: n=6 ; 1 例が単発性骨形成異常であった。

b: 卵巣摘出溶媒投与対照群に比較して統計学的に有意 ( $p<0.05$ )。

c: 卵巣非摘出対照群と卵巣摘出溶媒投与対照群に比較して統計学的に有意 ( $p<0.05$ )。



アレンドロネートは腰椎の骨密度を卵巣摘出溶媒投与群と比較して増加させ、第2～第4腰椎の平均骨量でみた場合、卵巣摘出溶媒投与群より約15%増加させた（表2.6.2.2.7 #3）。

表 2.6.2.2.7 #3 卵巣摘出ヒヒの骨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  
[4.3.12]

	卵巣非摘出 対照群	卵巣摘出 溶媒投与対照群	卵巣摘出 0.05mg/kg 投与群	卵巣摘出 0.25mg/kg 投与群
第1腰椎骨密度 (g/cm <sup>2</sup> )	1.17±0.19	1.03±0.10 <sup>a</sup>	1.11±0.04	1.18±0.06 <sup>b</sup>
第2腰椎骨密度 (g/cm <sup>2</sup> )	1.16±0.18	1.01±0.06 <sup>a</sup>	1.10±0.06	1.18±0.08 <sup>b</sup>
第3腰椎骨密度 (g/cm <sup>2</sup> )	1.13±0.13	1.02±0.07 <sup>a</sup>	1.08±0.06	1.17±0.10 <sup>b</sup>
第4腰椎骨密度 (g/cm <sup>2</sup> )	1.14±0.12	1.01±0.08 <sup>a</sup>	1.09±0.05	1.14±0.12 <sup>b</sup>
第2～第4腰椎骨密度の平均値 (g/cm <sup>2</sup> )	1.14±0.14	1.01±0.06 <sup>a</sup>	1.09±0.05	1.16±0.10 <sup>b</sup>
大腿骨頸部骨密度 (g/cm <sup>2</sup> )	0.69±0.06	0.73±0.04	0.69±0.07	0.77±0.05 <sup>a,c</sup>
橈骨骨密度 (g/cm <sup>2</sup> )	0.49±0.05	0.52±0.05	0.52±0.04	0.53±0.06
第4腰椎の見かけの密度 (mg/cm <sup>3</sup> )	436.8±83.2	365.2±57.1	427.8±111.6	592.1±204.4 <sup>d</sup>

データは平均値±標準偏差 (n=7) で示した。

a: 卵巣非摘出対照群と比較して統計学的に有意 ( $p<0.05$ )。

b: 卵巣摘出溶媒投与対照群と比較して統計学的に有意 ( $p<0.05$ )。

c: 卵巣摘出0.05mg/kg投与群と比較して統計学的に有意 ( $p<0.05$ )。

d: 他の3群と比較して統計学的に有意 ( $p<0.05$ )。

第4腰椎椎体の海綿骨の平均強度は、卵巣摘出溶媒投与群に比して、0.05mg/kg では約41%、0.25mg/kg では約98%増加した。大腿骨骨幹部と頸部の強度及び骨幹部の弾性率にはアレンドロネートの影響は認められなかった（表2.6.2.2.7 #4）。更に、第4腰椎の骨強度には第2～第4腰椎骨密度及び第5腰椎の骨梁幅と正の相関が認められた（図2.6.2.2.7 #5）。

表 2.6.2.2.7 #4 卵巣摘出ヒヒの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  
[4.3.12]

	卵巣非摘出 対照群	卵巣摘出 溶媒投与対照群	卵巣摘出 0.05mg/kg 投与群	卵巣摘出 0.25mg/kg 投与群
第4腰椎強度 (MPa)	11.4±2.77	9.24±1.36	13.0±4.02	18.3±6.96 <sup>a</sup>
大腿骨骨幹部強度 (N)	2391.6±219.9	2144.6±509.0	2352.2±303.7	2353.1±282.6
大腿骨頸部強度 (N)	135.6±35.9	186.6±110.2	173.4±78.0	166.8±62.8
大腿骨骨幹部弾性率 (N/mm)	1531.7±150.2	1374.0±254.4	1429.5±185.7	1388.4±170.3

データは平均値±標準偏差 (n=7) で示した。

a: 他の3群と比較して統計学的に有意 ( $p<0.05$ )。

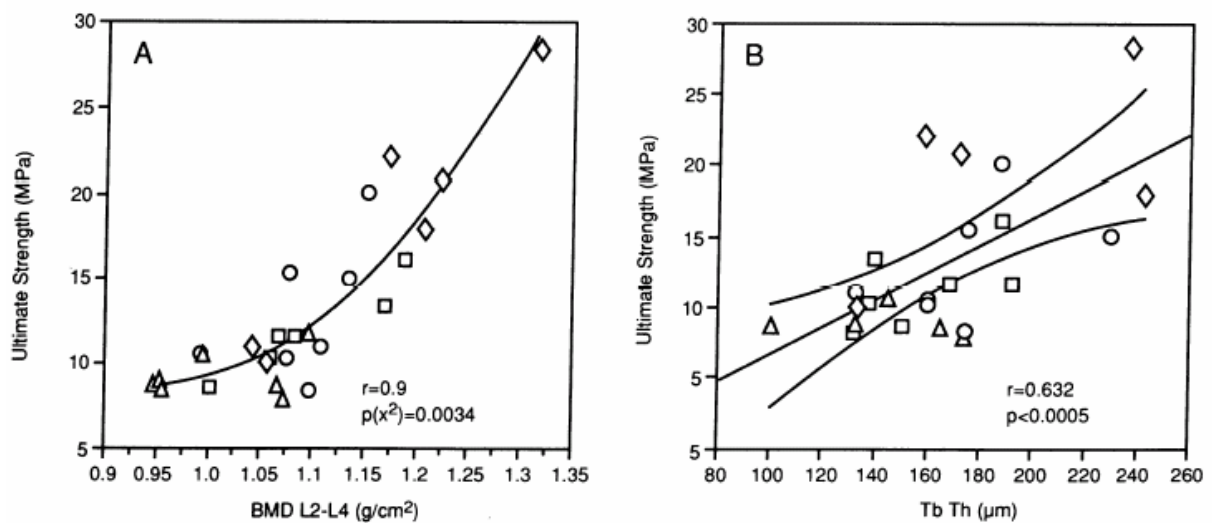


図 2.6.2.2.7 #5 骨強度と骨密度及び骨梁幅との関係 [4.3.12]

A: 第4腰椎の強度 (Ultimate Strength: MPa) と第2～第4腰椎の平均骨密度 (BMD L2-L4: g/cm<sup>2</sup>) の関係。

B: 第4腰椎の強度 (Ultimate Strength: MPa) と第5腰椎海綿骨骨梁幅 (Tb Th: µm) との関係。

□: 卵巣非摘出対照群、△: 卵巣摘出溶媒投与対照群、○: 卵巣摘出 0.05mg/kg 投与群、◇: 卵巣摘出 0.25mg/kg 投与群。

以上の結果より、アレンドロネートはヒヒにおいて、卵巣摘出が海綿骨の代謝回転に与える影響を回復し、骨量と骨強度を増加させ、ヒトのエストロゲン欠乏症の女性にみられるものと類似した骨量減少と骨構造の変化を、2週に1回の投与で十分防止できることが示された。

本実験において、アレンドロネートは静脈内投与により、2週に1回、0.05mg/kg 又は 0.25mg/kg の用量が2年間投与された。投与終了時の第2～第4腰椎の骨密度と第4腰椎の骨強度を以下に示した (表 2.6.2.2.7 #6)。

表 2.6.2.2.7 #6 卵巣摘出ヒヒの試験における第2～第4腰椎の骨密度と第4腰椎の骨強度に対するアレンドロネートの影響 [4.3.12]

	卵巣非摘出 対照群	卵巣摘出溶媒投与 対照群	卵巣摘出 0.05mg/kg 投与群	卵巣摘出 0.25mg/kg 投与群
第2～第4腰椎骨密度の 平均値 (g/cm <sup>2</sup> )	1.14±0.14	1.01±0.06 <sup>a</sup>	1.09±0.05	1.16±0.10 <sup>b</sup>
第4腰椎の骨強度 (MPa)	11.4±2.77	9.24±1.36	13.0±4.02	18.3±6.96 <sup>c</sup>

データは平均値±標準偏差(n=7)で示した。

a: 卵巣非摘出対照群と比較して統計学的に有意 (p<0.05)。

b: 卵巣摘出溶媒投与対照群と比較して統計学的に有意 (p<0.05)。

c: 他の3群と比較して統計学的に有意 (p<0.05)。

第2～第4腰椎の骨密度は、卵巣摘出により有意に減少（約11%減少）したが、0.05mg/kg アレンドロネート投与群では卵巣非摘出対照群との間に有意な差は認められず、卵巣摘出溶媒投与対照群に比べて約8%の増加が認められた。0.25mg/kg 投与群では卵巣摘出溶媒投与対照群に比べて約15%の増加が認められ、これは卵巣摘出溶媒投与対照群と比較して有意に高値であった。また、第4腰椎の骨強度についても、卵巣摘出により約19%減少したが、0.05mg/kg アレンドロネート投与群では卵巣摘出溶媒投与対照群に比べて約41%、0.25mg/kg 投与群では約98%の増加が認められ、0.25mg/kg は他の群と比較して有意に高値であった。また、0.05mg/kg 及び0.25mg/kg アレンドロネート投与群では、卵巣摘出溶媒投与対照群に比べて、骨代謝回転生化学指標（血清アルカリホスファターゼ活性、血清オステオカルシン濃度、血清酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ活性、尿中リジルピリジノリン濃度）及び骨形態計測による骨リモデリング指標（類骨面/骨面、骨単位活性化率等）が抑制されており、一方、骨量（海綿骨量/組織量）に関しては増加が認められた。以上より、卵巣摘出ヒヒにおける2週に1回の静脈内投与による有効投与量は、0.05mg/kg と考えられた。

卵巣摘出ヒヒにおける試験で得られた有効投与量（0.05mg/kg）は、サルにおける生物学的利用率（1.72%）を用いて週当たりの経口投与量（アレンドロネート換算）に換算すると、1.1mg/kg/週の換算経口投与量となる。ヒトにおけるアレンドロネートの推定臨床用量35mg/週は、ヒトの体重を50kgとすると、0.7mg/kg/週の投与量である。このように、週当たりに換算した卵巣摘出ヒヒにおける有効投与量は、推定臨床用量を上回る量であったが、かけ離れた値ではなかった。本実験では、卵巣非摘出対照群と比較して卵巣摘出溶媒投与群における、第2～第4腰椎骨密度の平均は2年間で11%減少していた。一方、骨粗鬆症患者における1日1回投与の本邦臨床試験（前期第Ⅱ相パイロット試験）[5.4.1]では、プラセボ投与群の腰椎骨密度において、投与前値と比べて36週で-1.25%の変化しか認められなかった。このように、卵巣摘出ヒヒはヒトの病態と比較して骨量の減少が大きく、骨代謝回転もより速いことが示唆され、このことがヒトに比べて若干高い有効投与量となった一つの原因と考えられる。また、より高回転型の骨代謝回転を持つと考えられる卵巣摘出ヒヒにおいて、ヒト推定臨床投与量をわずかに超える投与量を2週に1回投与したことにより、その骨量減少を十分防止できたという結論は、週1回投与によるヒトでの臨床試験の結果を支持するものと考えられる。

#### 2.6.2.2.8 アレンドロネートの二次性副甲状腺機能亢進症ラットにおける骨量減少に対する作用 [4.3.13]

上述のように卵巣摘出によるエストロゲンの欠乏は、骨代謝回転を増加させ骨量を減少させる。二次性副甲状腺機能亢進症では過剰に分泌される副甲状腺ホルモンにより、エストロゲン欠乏と同様に、骨代謝回転が増加し骨量が減少する。アレンドロネートの作用機序は、骨の破骨細胞面に選択的に吸着したアレンドロネートが破骨細胞に取り込まれることにより破骨細胞活性を抑制することであり、骨代謝回転を増加させる原因が異なっても、アレンドロネートは骨量減少に対して同様の効果を示すと考えられる。そこでカルシウム欠乏食をラットに与えることにより

二次性副甲状腺機能亢進症を誘発し、アレンドロネートの投与頻度を変えた場合の骨量減少に対する影響について検討した。カルシウム欠乏食を与えた雄ラットに、アレンドロネートの 28 日分の総投与量（アレンドロネートが含有するリン量換算として 0.028、0.28、2.8mg P/kg）を 1 日 1 回、2 日に 1 回、週 2 回、週 1 回に分割し、あるいは単回 24 時間持続注入で、皮下投与した。28 日間の投与終了後、大腿骨の骨塩量を測定した。

28 日間のカルシウム欠乏食により、大腿骨の骨塩量の減少が認められた。アレンドロネートを 1 日 1 回、2 日に 1 回、週 2 回、週 1 回に分割して投与すると、二次性副甲状腺機能亢進による骨塩量減少は、総投与量 0.28mg P/kg 及び 2.8mg P/kg で抑制が認められた（表 2.6.2.2.8 #1）。0.028mg P/kg の総投与量では 1 日 1 回の投与でのみわずかな骨塩量減少の抑制が認められた。また 24 時間持続注入では、総投与量 2.8mg P/kg においてのみ明らかな骨塩量減少の抑制が認められた。

表 2.6.2.2.8 #1 二次性副甲状腺機能亢進症ラットの大腿骨骨塩量に対するアレンドロネートの作用 [4.3.13]

総投与量 <sup>a</sup> と投与頻度		大腿骨骨塩量/骨長 (mg/mm)
普通食対照	(n=4)	0.8310 ± 0.0148
カルシウム欠乏食対照	(n=9)	0.4674 ± 0.0272
2.8mg P/kg: 1 日 1 回投与	(n=6)	0.6197 ± 0.0460
2.8mg P/kg: 2 日に 1 回投与	(n=6)	0.6411 ± 0.0458
2.8mg P/kg: 週 2 回投与	(n=6)	0.6160 ± 0.0510
2.8mg P/kg: 週 1 回投与	(n=6)	0.6338 ± 0.0577
2.8mg P/kg: 24 時間持続投与	(n=4)	0.5693 ± 0.0339
0.28mg P/kg: 1 日 1 回投与	(n=6)	0.5246 ± 0.0156
0.28mg P/kg: 2 日に 1 回投与	(n=6)	0.5259 ± 0.0090
0.28mg P/kg: 週 2 回投与	(n=6)	0.5170 ± 0.0142
0.28mg P/kg: 週 1 回投与	(n=6)	0.5189 ± 0.0341
0.28mg P/kg: 24 時間持続投与	(n=4)	0.4904 ± 0.0217
0.028mg P/kg: 1 日 1 回投与	(n=6)	0.5047 ± 0.0139
0.028mg P/kg: 2 日に 1 回投与	(n=6)	0.4660 ± 0.0206
0.028mg P/kg: 週 2 回投与	(n=6)	0.4685 ± 0.0138
0.028mg P/kg: 週 1 回投与	(n=6)	0.4862 ± 0.0213
0.028mg P/kg: 24 時間持続投与	(n=4)	0.4863 ± 0.0246

データは平均値±標準偏差で示した。

a: 28 日間の総投与量（アレンドロネート含有リン換算）。

以上の結果から、アレンドロネートは二次性副甲状腺機能亢進症ラットにおいて、卵巣摘出ラットと同様に、骨代謝回転の増加による骨量減少を総投与量に依存して抑制し、わずかな骨量

減少の抑制しか示さない最低投与量を除いて、総投与量が同じ場合には1日1回から週1回の投与頻度で同程度の骨量減少の抑制作用を示した。

卵巣摘出ラットと二次性副甲状腺機能亢進症ラットの骨吸収期間の差異については報告がない。また、用いる動物の週齢により骨のモデリング・リモデリングの程度に違いがあるため、一般的な比較は困難である。卵巣摘出ラットと二次性副甲状腺機能亢進症ラットの対照群における大腿骨骨塩量/骨長の結果より、卵巣摘出ラットでの骨量減少の程度は、二次性副甲状腺機能亢進症ラットより小さい。すなわち、二次性副甲状腺機能亢進症ラットにおける骨代謝回転はより強くかつ速く、骨吸収期間もそれにとまって短くなるものとする。ゆえに骨吸収期間は、ヒト、卵巣摘出ラット、二次性副甲状腺機能亢進症ラットの順に短くなっていると考えられる。このように骨代謝回転が非常に亢進した二次性副甲状腺機能亢進症ラットにおいても、総投与量が同じ場合に1日1回から週1回の投与頻度で骨量減少を同程度抑制したことは、週1回投与によるヒトでの臨床試験の結果を支持するものと考えられる。

### 2.6.2.3 副次的薬理試験

該当資料なし。

### 2.6.2.4 安全性薬理試験

該当資料なし。

### 2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし。

### 2.6.2.6 考察及び結論

今回示したアレンドロネートの作用機序に関する *in vitro* 及び *in vivo* の薬理試験結果、並びに投与頻度が骨量の減少に及ぼす影響について以下にまとめる。

1. アレンドロネートは破骨細胞の MVA 経路を阻害することにより GGPP の生成を減少させ、細胞骨格機能や小胞細胞内輸送に重要な GTP 結合型蛋白のプレニル化を抑制することが示唆された。
2. *In vitro* における MVA 経路の中間体のプロファイルとヒト遺伝子組換え型 FPP シンターゼに対する阻害活性から、アレンドロネートが阻害する MVA 経路中の酵素は、FPP シンターゼであることが示された。
3. アレンドロネートはカスパーゼにより切断される Mst1 キナーゼを活性化し、アポトーシスを誘発することが示された。
4. しかしながら、アレンドロネートによる骨吸収機能の抑制作用は、アポトーシスを誘発する濃度より低い濃度で認められ、カスパーゼ阻害剤では拮抗されなかったことから、アレンドロネートによる骨吸収抑制作用には、アポトーシス誘発作用の関与は低いことが示唆された。

5. ラットを用いた *in vivo* の試験においても、アレンドロネートは MVA 経路を阻害していることが示され、生体内においても MVA 経路の酵素阻害がアレンドロネートの分子作用点である可能性が示された。
6. 卵巣摘出ラットにおいて、アレンドロネートの総投与量が同じであれば週 2 回から 2 週に 1 回までの投与頻度の範囲で有意な骨吸収抑制作用が示された。
7. 卵巣摘出ヒヒにおいて、2 週に 1 回のアレンドロネート投与でも、ヒトのエストロゲン欠乏症の女性にみられるものと類似した骨量減少と骨構造の変化を十分防止し、増加した骨量と骨強度の間には正の相関があることが示された。
8. カルシウム欠乏食による二次性副甲状腺機能亢進症ラットにおいて、総投与量が同じであれば 1 日 1 回から週 1 回までの投与頻度で、同程度の骨吸収抑制作用が示された。

以上、作用機序に関しては、アレンドロネートの最も有力な分子作用点は他の窒素原子含有ビスホスホネートと同様に、MVA 経路の FPP シンターゼと考えられた。本酵素の阻害は、GGPP の生成抑制を介し、細胞骨格の再構成や細胞内小胞移動を制御する Rho、Rac、Cdc42、Rab 等の GTP 結合蛋白のプレニル化を抑制し、アポトーシスに依存せず破骨細胞の骨吸収機能を抑制するものと考えられた。

一方、投与頻度に関しては、1 日 1 回投与と週 1 回投与におけるアレンドロネートの骨量減少に対する効果を、卵巣摘出動物モデルで直接比較した試験は行われていない。しかしながら、アレンドロネートは破骨細胞面に選択性を持って骨に結合し、骨リモデリング部位における骨吸収過程は約 2~4 週間続くことから、間隔をおいた周期的投与でも、より高頻度の投与で得られるものと同程度の効果が得られると考えられた。実際、卵巣摘出ラット及びヒヒの試験から、同一量のアレンドロネートを分割投与しても有意な骨吸収抑制作用が確認され、2 週に 1 回の投与頻度でも十分な効果がみられた。また、ラット卵巣摘出モデルを用いた異なる投与経路及び頻度による 2 試験において、1 日あたりの経口投与量として換算した最小有効量が近似していたことから、アレンドロネートの 1 日あたりの有効量を投与間隔の日数分まとめて周期的に投与しても、卵巣摘出によるラットの骨量減少に対して、1 日 1 回投与と同様に有効であると考えられた。また卵巣摘出ラットにおける 1 日 1 回の経口投与及び、卵巣摘出ヒヒにおける 2 週に 1 回の静脈内投与の両試験では、増加した骨量と骨強度に正の相関が認められた。更に、卵巣摘出モデルと同様に骨代謝回転が増加して骨が減少する二次性副甲状腺機能亢進症ラットを用いた、アレンドロネートの総投与量が同じ 1 日 1 回投与と週 1 回投与の比較では、同程度の骨量減少抑制作用がみられた。これらの非臨床試験結果から、1 日 1 回投与量の 7 倍量を週 1 回投与することが、ヒトにおいても 1 日 1 回投与と同様に有効である可能性が示唆された。

### 2.6.2.7 図表

本文中に記載した。

## 参考文献

- 4.3.1 テイロック注／オンクラスト注射液 5mg、10mg（アレンドロン酸ナトリウム 水和物）資料概要
- 4.3.2 フォサマック錠 5／ボナロン錠 5mg（アレンドロン酸ナトリウム 水和物）資料概要
- 4.3.4 Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of <sup>3</sup>H-alendronate and <sup>3</sup>H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone* 1996; 19: 281-90.（フォサマック錠 5／ボナロン錠 5mg（アレンドロン酸ナトリウム 水和物）資料概要 添付資料）
- 4.3.5 Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991; 88: 2095-105.（テイロック注／オンクラスト注射液 5mg、10mg（アレンドロン酸ナトリウム 水和物）資料概要 添付資料）
- 4.3.9 Crick DC, Andres DA, Waechter CJ. Novel salvage pathway utilizing farnesol and geranylgeraniol for protein isoprenylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 483-7.
- 4.3.10 Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 339-46.（フォサマック錠 5／ボナロン錠 5mg（アレンドロン酸ナトリウム 水和物）資料概要 添付資料）
- 4.3.11 Azuma Y, Oue Y, Kanatani H, Ohta T, Kiyoki M, Komoriya K. Effects of continuous alendronate treatment on bone mass and mechanical properties in ovariectomized rats: comparison with pamidronate and etidronate in growing rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 128-35.（フォサマック錠 5／ボナロン錠 5mg（アレンドロン酸ナトリウム 水和物）資料概要 添付資料）
- 4.3.12 Balena R, Toolan BC, Shea M, Markatos A, Myers ER, Lee SC, et al. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J Clin Invest* 1993; 92: 2577-86.（フォサマック錠 5／ボナロン錠 5mg（アレンドロン酸ナトリウム 水和物）資料概要 添付資料）
- 4.3.13 Grasser WA, Iversen SD, Rodan GA, Sato M, Siegl PKS, Thompson DD. Pharmacology of L-670,452.（テイロック注／オンクラスト注射液 5mg、10mg（アレンドロン酸ナトリウム 水和物）資料概要 添付資料）
- 4.3.16 Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Russell RGG, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 581-9.
- 4.3.17 Crick DC, Andres DA, Waechter CJ. Farnesol is utilized for protein isoprenylation and the biosynthesis of cholesterol in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 590-9.



4. 3. 18 Ding VD-H, Sheares BT, Bergstrom JD, Ponpipom MM, Perez LB, Poulter CD. Purification and characterization of recombinant human farnesyl diphosphate synthase expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J* 1991; 275: 61-5.
4. 3. 19 Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1478-87.
4. 3. 20 Selander KS, Mönkkönen J, Karhukorpi E-K, Härkönen P, Hannuniemi R, Väänänen HK. Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 1127-38.
4. 3. 21 Frith JC, Mönkkönen J, Blackburn GM, Russell RGG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-( $\beta$ ,  $\gamma$ -dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1358-67.

## 2.6.3 薬理試験の概要表

表 2.6.3.1 薬理試験：一覧表（その1）

被験物質：alendronic acid

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
効力を裏付ける試験 破骨細胞におけるメバロン酸経路に対する作用 ( <i>in vitro</i> )	マウス破骨細胞 ウサギ破骨細胞	<i>In vitro</i>		NA	4.2.1.1.1
ファルネシル 2 リン酸シターゼに対する作用	ラット肝臓サイトゾル ヒト遺伝子組換え型ファルネシル 2 リン酸シターゼ マウス破骨細胞	<i>In vitro</i>		NA	4.2.1.1.2
破骨細胞のアポトーシスに対する作用	マウス破骨細胞	<i>In vitro</i>		NA	4.2.1.1.3
破骨細胞のアポトーシスと骨吸収抑制との関係	ウサギ破骨細胞 マウス破骨細胞	<i>In vitro</i>		NA	4.2.1.1.4
破骨細胞のメバロン酸経路に対する作用 ( <i>in vivo</i> )	ラット	皮下投与		NA	4.2.1.1.5

NA: Not Applicable

表 2.6.3.1 薬理試験：一覧表（その2）

被験物質：alendronic acid

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
副次的薬理試験 該当資料なし					
安全性薬理試験 該当資料なし					
薬力学的薬物相互作用試験 該当資料なし					

表 2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質 : alendronic acid

試験内容	動物種・系統/試料	試験方法	投与量/濃度	動物数/群	試験成績	GLP適用	記載箇所
破骨細胞のメバロン酸経路に対する作用 ( <i>in vitro</i> )	マウス破骨細胞 ウサギ破骨細胞	<i>In vitro</i> での破骨細胞形成と骨吸収活性の測定	10~60 µmol/L	NA	メバロン酸経路の中間代謝物であるゲラニルゲラニル 2 リン酸に細胞内で変換されるゲラニルゲラニオールは、アレンドロネートによる破骨細胞形成抑制及び骨吸収抑制に拮抗	No	4.2.1.1.1
ファルネシル 2 リン酸シンターゼに対する作用	ラット肝臓サイトゾル	<i>In vitro</i> でのメバロン酸代謝物の HPLC 分析	0.01~100 µg/mL (0.031~310 µmol/L)	NA	メバロン酸経路のイソペンテニル 2 リン酸イソメラーゼあるいはファルネシル 2 リン酸シンターゼをアレンドロネートは阻害	No	4.2.1.1.2
	ヒト遺伝子組換え型ファルネシル 2 リン酸シンターゼ	<i>In vitro</i> での酵素活性測定	0.01~30 µg/mL (0.031~92 µmol/L)	NA	アレンドロネートはファルネシル 2 リン酸シンターゼを濃度依存的に阻害	No	4.2.1.1.2
	マウス破骨細胞	<i>In vitro</i> での蛋白及び不飽和脂質へのメバロノラクトン結合	5~60 µmol/L	NA	アレンドロネートは蛋白プレニル化とステロール合成を抑制	No	4.2.1.1.2
破骨細胞のアポトーシスに対する作用	マウス破骨細胞	<i>In vitro</i> でのアポトーシス測定	30 µmol/L	NA	アレンドロネートは破骨細胞のアポトーシスを誘発し、キャスパーゼ阻害剤及びゲラニルゲラニオールはそれに拮抗	No	4.2.1.1.3
破骨細胞のアポトーシスと骨吸収抑制との関係	ウサギ破骨細胞 マウス破骨細胞	<i>In vitro</i> での破骨細胞数と骨吸収活性測定	0.06~6 nmol/slice	NA	アレンドロネートは破骨細胞数を減少させる濃度の 1/10 以下の濃度で骨吸収を抑制し、この骨吸収抑制作用はキャスパーゼ阻害剤で拮抗されない	No	4.2.1.1.4
破骨細胞のメバロン酸経路に対する作用 ( <i>in vivo</i> )	Sprague Dawley ラット	皮下投与後、脛骨破骨細胞の HMG-CoA 還元酵素を免疫染色	0.5mg/kg/day、皮下投与	4~20	アレンドロネートは HMG-CoA 還元酵素の発現量を抑制し、HMG-CoA 還元酵素阻害剤はこの抑制に拮抗	No	4.2.1.1.5

NA: Not Applicable

表 2.6.3.3 副次的薬理試験

該当資料なし

表 2.6.3.4 安全性薬理試験

該当資料なし

表 2.6.3.5 薬力学薬物相互作用試験

該当資料なし