

ミノドロロン酸水和物
リカルボン錠1 mg／ボノテオ錠1 mg

2.4 非臨床試験の概括評価

小野薬品工業株式会社／アステラス製薬株式会社

目次

2.4 非臨床試験の概括評価	1
2.4.1 非臨床試験計画概略	2
2.4.2 薬理試験	4
2.4.3 薬物動態試験	10
2.4.4 毒性試験	13
2.4.5 総括及び結論	18
2.4.6 参考文献一覧	22

2.4 非臨床試験の概括評価

本項で使用した用語及び略号を表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1 用語及び略号一覧

用語及び略号	内容
ALP	アルカリホスファターゼ
AUC	血漿中濃度-時間曲線下面積
BA	絶対バイオアベイラビリティ
BUN	尿素窒素
CK	クレアチンキナーゼ
Cmax	最高血漿中濃度
CTX	I型コラーゲン架橋 C-テロペプチド
CYP	チトクロム P450
FPP	ファルネシルピロリン酸
GOT	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)
GPT	アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)
GTP	グアノシン三リン酸
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HPLC-FL	蛍光検出高速液体クロマトグラフィー
IC ₅₀	50%抑制濃度
IgE	免疫グロブリン E
LDH	乳酸脱水素酵素
μCT 像	マイクロフォーカス X 線コンピュータ断層像
MTX	メトトレキサート (Methotrexate)
t _{1/2}	消失半減期
t _{1/2(1)}	血漿中濃度推移が 2 相性を示した際の初期消失相の半減期 (モデルにあてはめず最小二乗法により算出)
t _{1/2(2)}	血漿中濃度推移が 2 相性を示した際の最終消失相の半減期 (モデルにあてはめず最小二乗法により算出)
t _{1/2α}	骨内濃度推移を 2-コンパートメントモデルにあてはめて算出したα相の半減期
t _{1/2β}	骨内濃度推移を 2-コンパートメントモデルにあてはめて算出したβ相の半減期
TK	トキシコキネティクス

2.4.1 非臨床試験計画概略

ミノドロン酸水和物 (図 2.4-1) はビスホスホン酸骨格 (P-C-P 結合) の側鎖にイミダゾピリジン基を有するビスホスホネートであり, 破骨細胞の機能を抑制することにより骨吸収抑制作用を示す。

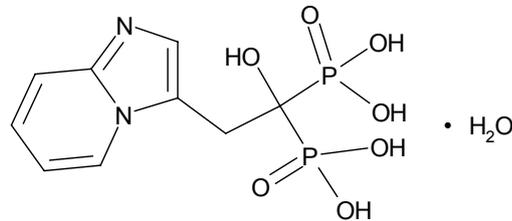


図 2.4-1 ミノドロン酸水和物の構造式

ビスホスホネートは無機ピロリン酸の構造類縁体であり, ピロリン酸が有する P-O-P 結合を生体内でより安定な P-C-P 結合に置換した基本構造を有する。この基本構造の炭素原子に結合する側鎖を修飾した化合物の中には強力な骨吸収抑制能を有するものが見出されており, これまでに様々なビスホスホネートが合成されている¹⁾。

ビスホスホネートは化学構造的に骨組織の構成成分であるヒドロキシアパタイトに高い親和性を示し¹⁾, 全身性に投与されたビスホスホネートは骨に集積することが知られている^{1,2)}。そのため, 破骨細胞が骨を溶解すると, ビスホスホネートが骨から遊離して破骨細胞に取り込まれ^{1,3)}, その骨吸収能を抑制するものと考えられている。ビスホスホネートは側鎖に窒素原子を有するか否かにより大別されるが^{1,4)}, 窒素原子を有するビスホスホネートの骨吸収抑制作用は破骨細胞内でのメバロン酸代謝経路におけるファルネシルピロリン酸 (FPP) 合成酵素の阻害作用に起因することが最近の研究により明らかになってきた^{1,4-6)}。すなわち, 窒素原子含有ビスホスホネートが FPP 合成酵素を阻害すると, 破骨細胞内において FPP から生合成されるゲラニルゲラニルピロリン酸量が低下することにより低分子量グアノシン三リン酸 (GTP) 結合タンパク質の機能が抑制される。低分子量 GTP 結合タンパク質は破骨細胞の機能発現に必須であるため, 本酵素の阻害は破骨細胞に機能抑制や細胞死を誘導し, 結果として骨吸収が抑制されると考えられている^{1,4-7)}。

骨粗鬆症は骨量が低下するとともに骨質が劣化し骨折を生じやすくなった病態であり, 閉経後骨粗鬆症や老人性骨粗鬆症などの原発性骨粗鬆症とステロイド性骨粗鬆症などの続発性骨粗鬆症に分類されている⁸⁻¹¹⁾。いずれの型の骨粗鬆症においても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結果として, 骨量が低下し, 骨強度は低下する。ビスホスホネートは骨吸収を抑制することで骨吸収と骨形成のバランスを改善し, 骨量や骨強度の増加をもたらす¹²⁻¹⁴⁾。このような背景から, 一部のビスホスホネートが骨粗鬆症の治療薬として既に臨床において使用されている。

ミノドロン酸水和物は骨粗鬆症治療薬として本邦で開発された化合物である。今回、本邦申請にあたり、本薬の薬理的、薬物動態学的及び毒性学的特徴を明らかにする目的で各種試験を実施した。

ミノドロン酸水和物の骨吸収抑制作用に関して、*in vitro* においてはウサギ破骨細胞培養系を用いて、*in vivo* においてはラット、サル及びイヌの各種骨粗鬆症モデルを用いて検討した。本薬の作用機序に関しては、メバロン酸代謝経路の酵素に対する作用及び破骨細胞に対する作用を種々の試験系を用いて検討した。本薬の作用部位に関しては、*in vitro* における骨との結合及びラットを用いた骨組織内の局在について検討した。類薬との薬理作用の比較に関しては、前述したメバロン酸代謝経路の酵素に対する作用並びにウサギ破骨細胞培養系及びラット骨粗鬆症モデルにおける骨吸収抑制作用を検討した試験の中で実施した。更に、本薬の骨石灰化に及ぼす影響に関して正常ラット及びラット骨折モデルを用いて、また前述した各種骨粗鬆症モデルの骨形態面から検討した。なお、各種骨粗鬆症モデル及びラット骨折モデルを用いた試験は平成 11 年 4 月 15 日付医薬審第 742 号「骨粗鬆症用薬の臨床評価方法に関するガイドラインについて」に準拠して実施した。

本薬の安全性に関しては、従来の一般薬理試験に追加して、安全性薬理試験ガイドラインに準拠して、ラットの中樞神経系に対する作用、ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャネルを介するカリウム電流に対する作用、モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対する作用及び無麻酔イヌの心血管系及び呼吸器系に対する作用を検討した。更に、ビスホスホネートで懸念される胃粘膜障害、消化管機能及び泌尿器系に対する本薬の作用を検討し、錠剤の食道通過能も検討した。これらのほかに、副次的薬理作用として骨髄腫及び乳癌細胞を移植したマウスを用いて本薬の骨吸収抑制作用を検討した。また、薬力学的薬物相互作用に関しては、本薬を他の骨粗鬆症治療薬と併用した場合の骨吸収抑制作用あるいは骨密度低下抑制作用について検討した。

ミノドロン酸水和物の薬物動態に関しては、放射性標識体及び非標識体を使用して、種々の *in vitro* 及び *in vivo* 試験により評価した。*In vitro* 試験では、主としてラット、イヌ及びヒト由来の試料を用いて、血球移行率、血漿蛋白結合率及び薬物代謝能を検討した。*In vivo* 試験では、ラット及びイヌにミノドロン酸水和物又は ^{14}C -ミノドロン酸水和物を経口及び静脈内投与したときの生体試料中の放射能及び未変化体濃度を検討した。ラット及びイヌは薬理試験及び毒性試験で主として使用された動物種である。投与経路は薬理及び毒性試験と同様に臨床での投与経路である経口投与を主体とした。なお、本薬の絶対バイオアベイラビリティ (BA) は 1%弱と低く、個体差も大きいため、経口投与による検討のみでは本薬の薬物動態を正確に評価することが困難と考えられた。そこで、本薬が体内に 100%吸収されたときの薬物動態を明らかにする目的で静脈内投与を実施した。

ミノドロン酸水和物の毒性に関しては、ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験、ラット、イヌ及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験、細菌、ほ乳類培養細胞及びマウスを用いた遺伝毒性試験、マウス及びラットを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、ウサギを用いた局所刺激性試験、マウス及びモルモットを用いた抗原性試験により評価した。本薬にはヒトに特異的な代謝物は確認されていないことから、これらの動物種にお

いて本薬投与による安全性が評価できていると考えられた。単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，がん原性試験及び生殖発生毒性試験は厚生労働省ガイドラインあるいはICH ガイドラインに準拠して実施し，局所刺激性試験及び抗原性試験は日本国内で一般的に汎用されている方法に従って実施した。投与経路は，臨床適用経路である経口投与とし，更に単回投与毒性試験，ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験，生殖発生毒性試験では，静脈内投与した際の毒性についても検討した。

2.4.2 薬理試験

骨吸収抑制作用

ミノドロン酸水和物の骨吸収抑制作用について，*in vitro* のウサギ破骨細胞培養系及び各種動物を用いた骨粗鬆症モデルにおいて評価した。閉経後骨粗鬆症モデルとしては，卵巣を摘出したラット及びカニクイザル並びに卵巣及び子宮を摘出するとともにカルシウム制限食を給餌したイヌを用いた。また，それ以外の骨粗鬆症モデルとして，神経切除により不動化したラット及びステロイドを投与したラットを用いた。

ウサギ骨組織由来の破骨細胞をウシ骨スライス上で培養する破骨細胞培養系において，ミノドロン酸水和物の骨吸収に対する作用を検討した。本薬は破骨細胞の培養時に添加した場合においても，本薬で骨スライスを前処置した後に破骨細胞を培養した場合のいずれにおいても，骨吸収の指標である培養液中 I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド (CTX) 濃度を低下させ，骨吸収を抑制することが明らかとなった。その 50%抑制濃度 (IC₅₀) 値はそれぞれ 0.066 及び 0.11 µM であり，リセドロネートの IC₅₀ 値 (いずれも 0.35 µM) 及びアレンドロネートの IC₅₀ 値 (それぞれ 1.7 及び 0.89 µM) と比較して低値であった。

ラット卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおいてミノドロン酸水和物 (0.0016, 0.008 及び 0.04 mg/kg/day)，リセドロネート (0.04, 0.2 及び 1 mg/kg/day) 及びアレンドロネート (0.04, 0.2 及び 1 mg/kg/day) を卵巣摘出の翌日から 1 日 1 回 12 週間反復経口投与し，骨密度に対する作用を検討した結果，腰椎においてはそれぞれ 0.008, 0.04 及び 0.2 mg/kg/day 以上の用量，大腿骨においてはそれぞれ 0.008, 0.2 及び 0.2 mg/kg/day 以上の用量で骨密度の低下を抑制し，ミノドロン酸水和物は最も低用量から作用した。また，ミノドロン酸水和物を 0.04 mg/kg/day の用量で投与した動物におけるこれらの部位の骨密度は偽手術動物と同程度であった。更に，ミノドロン酸水和物，リセドロネート及びアレンドロネートはそれぞれ 0.04, 0.2 及び 0.2 mg/kg/day 以上の用量で骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン濃度の上昇を抑制し，骨吸収マーカーに対してもミノドロン酸水和物が最も低用量から作用した。また，脛骨近位骨幹端部の海綿骨領域での骨形態計測においても，ミノドロン酸水和物は最も低用量から吸収面，破骨細胞面及び破骨細胞数を減少させ，骨量及び骨梁数の減少を抑制した。ミノドロン酸水和物，リセドロネート及びアレンドロネートは骨形成速度を低下させ，骨石灰化の指標である骨石灰化速度を低下させたが，類骨幅も減少させた。

同モデルにおいてミノドロン酸水和物 (0.006, 0.03 及び 0.15 mg/kg/day) を卵巣摘出の翌日から前述の試験より長期の 12 カ月間 1 日 1 回反復経口投与し，骨密度，骨強度，骨代謝マーカー

及び骨形態に対する作用を検討したところ、本薬はいずれの用量においても腰椎及び大腿骨骨密度の低下を抑制し、0.03 mg/kg/dayにおける腰椎骨密度は偽手術動物と同程度であった。また、本薬はいずれの用量においても腰椎椎体圧迫強度及び大腿骨骨幹部3点折り曲げ強度の低下を抑制し、骨密度と骨強度には正の相関がみられた。本薬はいずれの用量においても骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン濃度及び骨形成マーカーである血清中オステオカルシン濃度の上昇を抑制し、卵巣摘出により亢進した骨代謝回転を低下させた。一方、腰椎椎体海綿骨領域における骨形態計測の結果、本薬は0.03 mg/kg/day以上の用量で骨量、骨梁幅及び骨梁数の減少を抑制した。また、本薬はいずれの用量においても破骨細胞面及び破骨細胞数の増加を抑制した。更に、本薬は未石灰化骨基質層の厚さである類骨幅を減少させた。

同モデルにおいてミノドロン酸水和物（0.006, 0.03 及び 0.15 mg/kg/day）を卵巣摘出後12週から治療的に1日1回12カ月間反復経口投与した試験においても、本薬はいずれの用量においても腰椎及び大腿骨骨密度の低下を抑制した。また、本薬はいずれの用量においても大腿骨骨幹部3点折り曲げ強度の低下を抑制するとともに、0.15 mg/kg/dayの用量で腰椎椎体圧迫強度の低下を抑制し、いずれの部位においても骨密度と骨強度には正の相関がみられた。更に、本薬は0.006あるいは0.03 mg/kg/day以上の用量において尿中デオキシピリジノリン濃度の上昇を抑制し、0.03 mg/kg/day以上の用量で血清中オステオカルシン濃度を低下させた。一方、腰椎椎体海綿骨領域における骨形態計測の結果、本薬はいずれの用量においても骨量及び骨梁数の減少を抑制するとともに、0.03 mg/kg/day以上の用量で骨梁幅の減少を抑制した。また、本薬はいずれの用量においても破骨細胞面及び破骨細胞数の増加を抑制し、骨形成の指標である骨形成速度を低下させた。更に、本薬はいずれの用量においても骨石灰化速度を低下させたが、0.03 mg/kg/day以上の用量で類骨幅を減少させた。

カニクイザル卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおいてミノドロン酸水和物（0.015 及び 0.15 mg/kg/day）及びアレンドロネート（0.5 mg/kg/day）を卵巣摘出の翌日から1日1回17カ月間反復経口投与し、骨密度、骨強度、骨代謝マーカー及び骨形態に対する作用を検討したところ、ミノドロン酸水和物はいずれの用量でも骨吸収抑制作用を示し、腰椎骨密度の低下を抑制するとともに、0.15 mg/kg/dayの用量で腰椎椎体及び大腿骨頸部における骨強度の低下を抑制した。アレンドロネートも腰椎骨密度の低下を抑制するとともに腰椎椎体における骨強度の低下を抑制した。これらのいずれの薬物においても腰椎及び大腿骨骨幹部で骨密度と骨強度には正の相関がみられた。一方、腰椎椎体海綿骨領域における骨形態計測の結果、ミノドロン酸水和物はいずれの用量においても吸収面の増加を抑制し、0.15 mg/kg/dayの用量で破骨細胞面及び破骨細胞数を減少させた。また、ミノドロン酸水和物はいずれの用量においても骨形成速度を低下させた。骨石灰化の指標に関しては、本薬は骨石灰化速度を低下させたが、類骨幅の増加を抑制した。脛骨近位骨幹部海綿骨領域における骨形態計測の結果、ミノドロン酸水和物は吸収面の増加を抑制しなかったが、いずれの用量においても骨形成速度の増加を抑制した。骨石灰化の指標に関しては、本薬は骨石灰化速度の増加を抑制したが、類骨幅に影響を与えなかった。更に、脛骨骨幹部のオステオンにおける骨形態計測の結果、ミノドロン酸水和物は0.15 mg/kg/dayの用量で骨形成速度の増加を抑制した。アレンドロネートも骨吸収及び骨形成指

標を低下させた。

イヌ卵巣子宮摘出及びカルシウム制限食給餌骨粗鬆症モデルにおいてミノドロン酸水和物 (0.02, 0.1 及び 0.5 mg/kg/day) を卵巣子宮摘出後 1 カ月から 1 日 1 回 12 カ月間反復経口投与し、骨密度、骨強度及び骨形態に対する作用を検討したところ、本薬は骨吸収抑制作用を示し、いずれの用量でも腰椎及び大腿骨骨密度の低下を抑制するとともに、腰椎椎体における骨強度の低下を抑制した。腰椎椎体海綿骨領域における骨形態計測の結果、本薬はいずれの用量においても骨量及び骨梁数の減少を抑制し、骨梁幅を増加させた。また、本薬はいずれの用量においても破骨細胞数の増加を抑制し、破骨細胞面を減少させた。更に、本薬は 0.5 mg/kg/day の用量で骨石灰化速度の増加を抑制したが、0.1 mg/kg/day 以上の用量で類骨幅の増加を抑制した。

ラット不動性骨粗鬆症モデル (坐骨神経切除) においてミノドロン酸水和物 (0.006, 0.03 及び 0.15 mg/kg/day)、リセドロネート (1 mg/kg/day) 及びアレンドロネート (1 mg/kg/day) を神経切除の翌日から 1 日 1 回 4 週間反復経口投与した結果、ミノドロン酸水和物は 0.03 mg/kg/day 以上の用量で脛骨近位骨幹端部の骨密度低下を抑制し、0.03 mg/kg/day における骨密度は偽手術動物と同程度であった。リセドロネート及びアレンドロネートも脛骨近位骨幹端部の骨密度低下を抑制した。また、ラット不動性骨粗鬆症モデル (上腕神経切除) においてミノドロン酸及びリセドロネートを神経切除の翌日から 1 日 1 回 2 週間反復経口投与した結果、ミノドロン酸 (0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg/day) 及びリセドロネート (10, 30 及び 100 mg/kg/day) はそれぞれ 1 及び 10 mg/kg/day 以上の用量で上腕骨の乾燥重量の低下を抑制した。

ラットステロイド性骨粗鬆症モデルにおいてミノドロン酸水和物 (0.006, 0.03 及び 0.15 mg/kg/day)、リセドロネート (1 mg/kg/day) 及びアレンドロネート (1 mg/kg/day) をコハク酸プレドニゾロンナトリウムの投与開始日から 1 日 1 回 12 週間反復経口投与した結果、ミノドロン酸水和物はいずれの用量においても腰椎及び大腿骨骨密度の低下を抑制し、0.03 mg/kg/day における骨密度は正常動物と同程度であった。リセドロネート及びアレンドロネートもこれらの部位における骨密度の低下を抑制した。また、ミノドロン酸水和物は 0.15 mg/kg/day の用量で腰椎椎体における骨強度の低下を抑制した。更に、リセドロネートに関する腰椎での一部の解析を除き、いずれの薬物においても腰椎及び大腿骨骨幹部で骨密度と骨強度には正の相関がみられた。

以上の結果から、ミノドロン酸水和物は *in vitro* のウサギ破骨細胞培養系において骨吸収抑制作用を示すこと、また各種骨粗鬆症モデルにおいても経口投与により骨吸収抑制作用を示し、腰椎、大腿骨及び脛骨骨密度の低下を抑制するとともに骨強度の低下を抑制し、更に骨強度は骨密度と相関することが明らかとなった。

作用機序

ミノドロン酸水和物の骨吸収抑制作用について作用機序を検討した。本薬のメバロン酸代謝経路への関与としては、FPP 合成酵素に対する阻害作用及び *in vitro* での本薬の骨吸収抑制作用に及ぼすメバロン酸代謝経路関連物質の影響を検討した。また、破骨細胞に対する作用として、*in vitro* におけるクレアチンキナーゼ (CK) 遊離作用及び *in vivo* における破骨細胞の形態に及

ばす影響を検討した。

本薬は FPP 合成酵素を阻害し、その IC₅₀ 値は 0.0081 μM であった。既存のビスホスホネートであるゾレドロン酸水和物及びパミドロネートも同様に FPP 合成酵素を阻害し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 0.013 及び 0.061 μM であった。

ウサギ破骨細胞培養系におけるミノドロン酸水和物 (0.3 μM) の骨吸収抑制作用はファルネソール及びスクアレンの添加では影響を受けなかったが、ゲラニルゲラニオールの添加により減弱した。

本薬の CK 遊離作用をウサギ破骨細胞培養系において検討した。本薬 (0.3, 1 及び 3 μM) を前処置した骨スライス上で破骨細胞を培養したところ、本薬はいずれの濃度においても骨吸収マーカーである培養液中の CTX 濃度を低下させるとともに培養液中の CK 活性を上昇させ、1 μM 以上で破骨細胞数を減少させた。一方、バフィロマイシンを処置し破骨細胞内への本薬の取り込みを阻害すると、本薬単独で認められた培養液中の CK 活性上昇及び破骨細胞数の減少は抑制された。

正常ラットに本薬 (10 mg/kg) を単回経口投与し、経時的に大腿骨の電子顕微鏡観察を行った。本薬の投与により、破骨細胞が骨と接着する部位である明帯の構造及び破骨細胞が明帯の内側に作る特殊な細胞膜である波状縁が不明瞭となり、破骨細胞に形態変化が誘導された。また、一部の破骨細胞にアポトーシスが誘導されている像が観察された。これらのことから、本薬は破骨細胞の細胞骨格系に作用し、破骨細胞に機能抑制や細胞死を誘導することにより、骨吸収能を低下させると考えられた。

以上の結果から、ミノドロン酸水和物は FPP 合成酵素を阻害し、破骨細胞に機能抑制や細胞死を誘導することが明らかとなった。

作用部位

ミノドロン酸水和物の作用部位を明らかにする目的で、*in vitro* における骨との結合及び解離に関する性質並びに *in vivo* における骨組織内の局在を検討した。

In vitro において、¹⁴C-ミノドロン酸 (1 μM) はウシ骨スライスに結合し、pH2.5 以下の緩衝液で処理すると、骨スライスに結合した ¹⁴C-ミノドロン酸量は減少した。

In vivo において、ヒト悪性黒色腫細胞 A375 を左心室より移植したラットに ¹⁴C-ミノドロン酸水和物を 1 mg/kg 単回静脈内投与し、大腿骨における局在をマイクロオートラジオグラフィーにより解析した。その結果、非転移部においては、投与後 2 時間では、海綿骨及び皮質骨の表面に放射能が検出され、その局在は吸収面、形成面及び休止面のいずれにおいても認められ、更に多くの破骨細胞に放射能が検出された。投与後 1 及び 3 日では、ほぼすべての破骨細胞に放射能が検出された。一方、骨芽細胞、骨髄細胞及び骨細胞には投与後 7 日まで放射能は検出されなかった。転移部における結果も非転移部と同様であった。

以上の結果から、ミノドロン酸水和物は骨に集積し、酸性条件下で遊離し、破骨細胞に選択的に取り込まれることが明らかとなった。

骨石灰化に及ぼす影響

ミノドロン酸水和物の骨石灰化に及ぼす影響を正常ラット及びラット腓骨骨折モデルにおいて検討した。

正常ラットに本薬を 1 日 1 回 2 週間反復経口投与し、脛骨のマイクロフォーカス X 線コンピュータ断層像 (μ CT 像) を観察した結果、ミノドロン酸水和物 (0.01, 0.1, 1 及び 10 mg/kg/day) は 0.1 mg/kg/day 以上の用量で海綿骨量を増加させたのに対して、骨石灰化障害の指標として測定した骨端軟骨板の幅に関してはいずれの用量においても影響を及ぼさなかった。一方、エチドロネート (30, 100, 300 及び 1000 mg/kg/day) は骨量増加作用と骨石灰化障害作用の発現用量に乖離が認められなかった。

ラット腓骨骨折モデルにおいて、ミノドロン酸水和物を骨折前 4 週から骨折後 8 週まで 1 日 1 回 12 週間反復経口投与した結果、本薬 (0.03 及び 0.3 mg/kg/day) は 0.3 mg/kg/day の用量で骨折修復過程において仮骨の吸収遅延により仮骨量を増加させる傾向を示したが、骨折部位の骨強度を増加させた。

また、同モデルにおいて、ミノドロン酸水和物及びアレンドロネートを骨折前 4 週から骨折後 8 週まで 1 日 1 回 12 週間反復経口投与した結果、ミノドロン酸水和物 (0.03 及び 0.3 mg/kg/day) は本試験ではいずれの用量においても仮骨及び軟骨の吸収遅延により仮骨量を増加させる傾向を示したが、骨強度には影響を与えなかった。一方、アレンドロネート (1 及び 10 mg/kg/day) はいずれの用量においても仮骨及び軟骨の吸収遅延により仮骨量を増加させる傾向を示し、骨折部位の骨強度を増加させた。

以上の結果から、ミノドロン酸水和物は骨石灰化を障害しないと考えられた。

副次的薬理作用

ヒト骨髄腫細胞 ARH-77 あるいはヒト乳癌細胞 MDA-231 を左心室より移植したマウスにおいてミノドロン酸水和物の骨吸収抑制作用を検討した。ARH-77 移植マウスにおいて、本薬を 1 日 1 回 2 週間反復経口投与した結果、本薬 (0.03, 0.3 及び 3 mg/kg/day) は 0.3 mg/kg/day 以上の用量で腰椎骨密度の低下を抑制した。また、MDA-231 移植マウスにおいては、本薬を 1 日 1 回 1 週間反復経口投与した結果、本薬 (0.03, 0.3 及び 3 mg/kg/day) は 0.3 mg/kg/day 以上の用量で大腿骨骨転移部位における単位骨面当りの破骨細胞数及び破骨細胞接触面の増加を抑制した。

以上の結果から、癌の骨病変モデルにおいて本薬の骨吸収抑制作用が示された。

安全性薬理試験

ミノドロン酸水和物は hERG チャネルを介するカリウム電流を 30 μ M (約 10200 ng/mL) で 15.8%抑制したが、この濃度は臨床試験で得られた最高血漿中濃度 (Cmax) である 0.6512 ng/mL (2.7.2.2-2.3.2 臨床薬理試験 (性差及び加齢の影響) [CL-029]: 健常高齢女性 10 例の平均値) の 15000 倍以上であった。また、モルモット摘出乳頭筋の活動電位に対しては 30 μ M で影響を及ぼさず、無麻酔イヌの心電図に対しても 30 mg/kg の経口投与 (Cmax : 28.38~261.90 ng/mL)

で影響を及ぼさなかったことから、本薬が臨床で使用された際に心電図 QT 間隔を延長する可能性は低いと考えられた。

臨床において既存のビスホスホネートは胃腸障害を起こすことが知られていることから^{15,16}、正常ラットの胃粘膜に対するミノドロン酸水和物の作用を検討した。本薬（3, 10, 30, 100 及び 300 mg/kg）は 300 mg/kg の単回経口投与において、投与後 3 日にラットの胃粘膜障害スコアを有意に増加させた。また、本薬経口投与後 4 時間における胃粘膜障害作用を検討したところ、本薬（30 及び 100 mg/kg）は 100 mg/kg の単回投与により出血性損傷面積を有意に増加させた。次に、胃粘膜障害モデルにおける作用を検討したところ、本薬（1, 3 及び 10 mg/kg）は 1 日 1 回 1 週間の反復経口投与により 3 mg/kg/day 以上で酢酸胃潰瘍の治癒を有意に遅延させた。更に、詳細に検討するため *ex vivo* 試験を実施したところ、チャンバーで固定した胃内に本薬（10, 30 及び 100 mg/kg）を投与すると、30 mg/kg 以上で胃粘膜電位差が有意に低下するとともに胃管腔内からの酸の消失（酸の逆拡散）が有意に亢進し、100 mg/kg 投与後 90 分に出血性損傷面積が有意に増加した。消化管機能として腸管水分量及び胃排泄能に対する作用を検討したところ、本薬（20, 50 及び 100 mg/kg）は 100 mg/kg の単回経口投与において、有意な腸管水分量増加作用及び胃排泄抑制作用を示した。アレンドロネート（20, 50 及び 100 mg/kg）は 20 mg/kg 以上の単回経口投与において、腸管水分量を有意に増加させ、100 mg/kg の単回経口投与では、投与液量（1, 5 及び 10 mL/kg）の減量により作用が増強する有意な胃排泄抑制作用を示した。ラット骨粗鬆症モデルにおける骨吸収抑制作用の発現用量は反復経口投与で 0.006~0.03 mg/kg/day であり、0.03 mg/kg/day では偽手術群とほぼ同程度にまで骨密度の低下を抑制したことから、ミノドロン酸水和物がラットの胃粘膜及び消化管機能に影響を及ぼす用量はラットでの薬効用量と比較して 100 倍以上高いと考えられた。

ミノドロン酸水和物の臨床試験使用製剤（1 mg 錠）のイヌにおける食道通過能を検討した。覚醒イヌに本薬錠剤を投与し、5 分後に飲水（0, 5 及び 10 mL）させることによる胃への到達度を内視鏡にて確認した結果、本薬錠剤は飲水量の増加に伴い胃への到達度が上昇し、5 mL では 10 例中 7 例が到達した。一方、アレンドロネート製剤（XXXXXXXXXX, 5 mg 錠）も飲水量の増加に伴い胃への到達度が上昇したが、5 mL では 10 例中 1 例の到達であった。

ミノドロン酸水和物（1, 10 及び 30 mg/kg）を単回経口投与し、ラットの尿量、尿中電解質排泄量及び尿 pH に及ぼす影響を検討したところ、本薬の作用と考えられる変化は認められなかった。一方、一般薬理試験において、ミノドロン酸水和物をラットへ単回経口投与（1, 10 及び 30 mg/kg）したところ、10 mg/kg 以上の用量で尿 pH の上昇又は低下、尿中カリウム排泄量の増加又は減少、尿量、尿中ナトリウム排泄量及び尿中クロライド排泄量の低下が認められ、同試験の単回静脈内投与（0.01, 0.1 及び 1 mg/kg）においては、0.1 mg/kg で尿 pH の低下、1 mg/kg で尿中クロライド排泄量の減少が認められた。しかし、これらの作用は用量依存性が認められないか、あるいは用量依存性が認められた場合でも一過性的な変化であったことから、臨床問題となる可能性は低いと考えられた。

ミノドロン酸水和物（0.01, 0.1 及び 1 mg/kg）を単回静脈内投与した結果、0.1 mg/kg でマウスの体温を一過性に低下させたが、軽度の変動であり用量依存性も認められなかったことから、

臨床上問題となる作用ではないと考えられた。また、ミノドロン酸水和物（0.01, 0.1, 1, 10 及び 100 μM ）はアセチルコリン及び塩化バリウムによるモルモット摘出回腸収縮をそれぞれ 1 μM 以上及び 0.1 μM で増強したが、いずれも軽度の変化であり用量依存性も認められなかったことから、これらについても問題となる作用ではないと考えられた。その他の中枢神経系、呼吸循環器系、自律神経系及び血液凝固系に対してミノドロン酸水和物は影響を及ぼさなかった。したがって、胃粘膜障害の懸念は否定できないものの、その他の副作用発現の可能性は低いと考えられた。

骨粗鬆症治療薬との併用作用

臨床において併用される可能性がある他の骨粗鬆症治療薬であるメナテトレノン及びアルファカルシドールとミノドロン酸水和物の併用作用を検討した。 *In vitro* のウサギ破骨細胞培養系において、ミノドロン酸水和物（0.05 μM ）及びメナテトレノン（3 及び 10 μM ）はそれぞれ単独で培養液中 CTX 濃度を低下させ、ミノドロン酸水和物と 10 μM のメナテトレノン両薬を培地に添加したところ、それぞれの単独処理に比べて培養液中 CTX 濃度を更に低下させた。

また、ラット卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおいて、ミノドロン酸水和物及びアルファカルシドールを卵巣摘出の翌日から 1 日 1 回 12 週間反復経口投与した結果、ミノドロン酸水和物（0.03 mg/kg/day）及びアルファカルシドール（0.02 及び 0.04 $\mu\text{g/kg/day}$ ）は単独で腰椎骨密度の低下を抑制し、それらを併用したところ、それぞれの単独投与時に比べて腰椎骨密度の低下を更に抑制した。

以上の結果から、本薬はメナテトレノン及びアルファカルシドールの作用を打ち消すことなく、相加的に作用することが明らかとなった。

2.4.3 薬物動態試験

分析法

血漿中ミノドロン酸水和物濃度は、血漿試料を除蛋白処理後、カルシウム沈殿法により抽出、濃縮し、蛍光検出高速液体クロマトグラフィー（HPLC-FL）により測定した（概要表 2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験）。また、骨内ミノドロン酸水和物濃度は、骨試料を濃塩酸で溶解後、固相抽出法及びカルシウム沈殿法を組み合わせることで抽出、濃縮し、HPLC-FL により測定した。これらの定量法の定量下限は、血漿で 0.2 ng/mL、骨で 5 ng/g であった。一方、放射性標識体を投与したときの生体試料中の放射能濃度は、試料に直接、あるいは試料を可溶化又は燃焼処理した後、液体シンチレーターを加えて液体シンチレーションカウンターにより測定した。

吸収

雄ラットに ^{14}C -ミノドロン酸水和物を静脈内投与したときの血漿中放射能濃度の推移は 0.01 ~ 0.3 mg/kg の用量範囲でほぼ線形であった。また、0.3 mg/kg において性差はみられなかった。ラットにミノドロン酸水和物を水溶液として 1, 3 及び 10 mg/kg 経口投与したときの血漿中未変化体濃度は投与後 0.17 時間に最高値（Cmax）に達し、その後 0.87~1.26 時間の半減期（ $t_{1/2}$ ）

で減少した。C_{max} 及び血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は投与量にほぼ比例して増大した。BA はそれぞれ 0.60%、0.52%及び 0.64%であり、この用量範囲での薬物動態はほぼ線形と考えられた。一方、イヌにミノドロン酸水和物を原薬カプセルとして 0.3、1 及び 3 mg/kg 経口投与したときの血漿中未変化体濃度は投与後 0.81~2.06 時間に C_{max} に達し、1.04~1.25 時間の初期消失相半減期 (t_{1/2(1)}) で減少した。また、1 及び 3 mg/kg では更に遅い消失相が認められ、半減期 (t_{1/2(2)}) は 3.32~5.62 時間であった。BA はそれぞれ 0.77%、0.65%及び 0.26%であり、最高用量では BA が低下した。この BA 低下の原因は明らかでないが、本薬が水に極めて溶けにくい (2.3.S 原薬) に高用量で原薬の溶解性が低下したこと、主たる吸収部位が小腸上部であること、及び細胞間隙を介した吸収経路の寄与等の要因が複合した結果であろうと推察される。なお、ヒト (健常成人) における本薬の BA は 1.21% (95%信頼区間: 0.71%~2.07%) と推定されている (2.7.2.3-2.1 絶対 BA [J101]-[J105])。

イヌにミノドロン酸水和物を 15 日間反復経口投与した際、投与 8 及び 15 日目の C_{max} 及び AUC は 1 日目のそれらの約 2 倍を示したが、8 日目と 15 日目との間には差はみられなかった。

本薬はラット消化管において十二指腸で最も良く吸収され、胃及び回腸では吸収されにくかった。本薬の吸収は食餌により著しく低下し、その主たる原因として、本薬が食物中のカルシウムなどの多価陽イオンと難溶性又は難吸収性のキレートを形成する機構が考えられた。ヒトにおいても本薬の吸収は食事により低下することが認められている (2.7.2.3-4.1 食事の影響 [J104], [AKi1], [CL-030])。

ファモチジンの筋肉内投与により胃酸分泌を抑制したラットに ¹⁴C-ミノドロン酸水和物を経口投与したときの骨内放射能濃度は、無処理ラットと比べ有意な低下を示したが、その差は平均値で 20%と比較的軽度であった。一方、健常成人におけるミノドロン酸水和物の C_{max} 及び AUC は、ファモチジンの併用によりいずれも空腹時の約 1.6 倍に増加し (2.7.2.2-2.2.2 臨床薬理試験 (胃酸度及び食事の影響) [AKi1])、ラットとは逆の結果を示した。この原因の一つとして、両試験での投与形態の違いが考えられる。すなわち、ラットにおける併用試験では ¹⁴C-ミノドロン酸水和物は水溶液として経口投与された。この場合、胃酸分泌の抑制により消化管内 pH が上昇し、消化管内に存在するカルシウム等とのキレート形成が促進された結果、本薬の吸収率が低下したと推察される。一方、健常成人における併用試験ではミノドロン酸水和物が錠剤として投与された。この場合、胃内 pH の上昇に伴い本薬の溶解度が上昇し、その結果吸収が増加したものと考えられる (2.7.2.3-5.1 加齢の影響 [CL-029], [AKi2])。

分布

ラットに ¹⁴C-ミノドロン酸水和物を静脈内投与したときの放射能は、標的器官である骨に速やかにかつ高濃度に移行し、長期間骨内に滞留した。また、大部分の組織が最高値を示す投与後 5 分においては、肋骨、上腕骨及び腎臓の濃度が血漿中濃度の 1.2~1.6 倍を、血液が 0.59 倍を示したが、その他の組織の濃度はいずれも血漿中濃度の 0.28 倍以下であった。骨以外の組織では、脾臓及び骨髄からの放射能の消失が緩徐であった。これらの分布パターンに性差は認められなかった。

ラットに ^{14}C -ミノドロン酸水和物を経口投与したときの放射能は、静脈内投与時と同様に骨内に長期間滞留した。また、組織内放射能濃度は、小腸、胃、骨、次いでリンパ節、腎臓、大腸及び肝臓で高かった。骨以外の組織内放射能の消失は、肝臓、腎臓、脾臓、骨髄及び胃では緩やかであったが、他の組織では比較的速やかであった。

ラットにミノドロン酸水和物を静脈内投与したときの骨内未変化体濃度は 2 相性を示して減少し、2-コンパートメントモデルにあてはめて算出した $t_{1/2\alpha}$ は 16.4 日、 $t_{1/2\beta}$ は 471 日であった。ラットにミノドロン酸水和物を 1, 3 及び 10 mg/kg 経口投与したときの投与後 24 時間における骨内未変化体濃度は投与量に依存して増加した。また、ラットにミノドロン酸水和物を 28 日間反復静脈内投与したときの骨内濃度は、投与回数に依存して増加した。

妊娠ラットに ^{14}C -ミノドロン酸水和物を静脈内投与したときの胎児内放射能濃度は、投与後 1 時間において母体血漿中濃度の 1% を示し、投与後 4 時間以降は検出限界未満に低下した。

授乳中のラットに ^{14}C -ミノドロン酸水和物を静脈内投与したときの乳汁中放射能濃度は投与後 1~8 時間で血漿中濃度の 25%~49% を示したが、投与後 24 時間で検出限界未満に低下した。

^{14}C -ミノドロン酸水和物をラット血液の中でインキュベートしたときの血球移行率は時間依存的に増加し、8 時間後の移行率は 19.5%~57.4% を示した。イヌでも軽度ながら同様の傾向がみられ、8 時間後の移行率は 9.0%~17.3% であった。一方、ヒトにおける血球移行率は時間依存的な増加をほとんど示さず、15 分~8 時間にかけて 2.3%~15.4% の値を示した。

ラット、イヌ及びヒトにおける ^{14}C -ミノドロン酸水和物の *in vitro* 血漿蛋白結合率は、それぞれ 71.9%~76.3%、52.9%~55.9% 及び 61.2%~61.9% であった。

代謝

^{14}C -ミノドロン酸水和物をラット、イヌ及びヒトの肝並びに小腸マイクロソーム中でインキュベートした際、いずれの場合も代謝物の生成は認められなかった。

ラット及びイヌに ^{14}C -ミノドロン酸水和物を静脈内投与したときの尿中には未変化体のみが検出され、本薬は体内でほとんど代謝を受けないと考えられた。一方、 ^{14}C -ミノドロン酸水和物経口投与後の尿中には未変化体以外に未知ピークが複数認められたが、これらは未変化体よりも経口吸収性が高い ^{14}C -ミノドロン酸水和物原体中の放射化学的不純物に由来すると推察された。なお、この不純物のピークは非標識ミノドロン酸水和物の原薬中には検出されなかった。

ラットに ^{14}C -ミノドロン酸水和物を経口投与したときの骨内放射能濃度は、非標識ミノドロン酸水和物を経口投与したときの骨内未変化体濃度とほぼ等しい値を示し、骨に移行する放射能のほとんどは未変化体であると考えられた。

ラットにミノドロン酸水和物を 1 及び 3 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回 7 日間反復経口投与した際、肝薬物代謝酵素系への影響は認められなかった。また、本薬はヒトの CYP 主要分子種 (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 及び 3A4) に対してほとんど阻害作用を示さなかった (2.7.2.2-1.4 CYP 阻害)。したがって、本薬が代謝阻害により併用薬剤との薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。

排泄

¹⁴C-ミノドロン酸水和物を静脈内投与後 168 時間までの尿及び糞中への放射能の排泄率は、ラットでそれぞれ 50.9%及び 0.3%、イヌで 53.3%及び 1.9%であり、主排泄経路は腎排泄であった。また、投与後 48 時間までのラットの胆汁中には 0.1%の放射能が排泄された。

¹⁴C-ミノドロン酸水和物を経口投与後 168 時間までの尿及び糞中への放射能の排泄率は、ラットでそれぞれ 1.2%及び 97.6%、イヌで 1.8%及び 98.2%であり、大部分は未吸収のまま糞中に排泄された。一方、ラットに経口投与後の胆汁中には放射能の排泄は認められなかった。

ヒト（健常成人）における尿中未変化体排泄率は、静脈内投与で 46.03%～55.89%、経口投与で 0.20%～0.69%であり（2.7.2.2-2.1 健常成人における薬物動態）、動物とほぼ同様の成績が得られている。

薬物動態学的薬物相互作用

ミノドロン酸水和物と同様に腎排泄型薬剤である抗癌剤メトトレキサート（MTX）を用い、その薬物動態に及ぼすミノドロン酸水和物の影響を検討した。その結果、イヌに MTX 3 mg/kg をミノドロン酸水和物 0.15 mg/kg と同時に静脈内投与したときの血漿中 MTX 濃度には、MTX 単独投与時と比較しほとんど影響がみられなかった。

2.4.4 毒性試験

ミノドロン酸水和物をラット、イヌあるいはカニクイザルに対して単回あるいは反復投与した際には、骨端部に一次海綿骨領域の増幅が認められ、血漿中及び尿中のカルシウム、無機リン等の電解質の変化、CK の上昇及びアルカリホスファターゼ（ALP）の低下が認められた。これらはビスホスホネート化合物に共通する骨吸収抑制作用に関連した変化と考えられることから¹⁷⁻²⁰、以下のまとめからは除いて記載した。

単回投与毒性

ラットに単回経口投与した際の概略の致死量は、雄 200 mg/kg、雌 283 mg/kg であった。死亡例では腺胃粘膜の出血性壊死、遠位尿細管及び集合管上皮の壊死が認められた。

ラットに単回静脈内投与した際の概略の致死量は、雄 2.4 mg/kg、雌 1.7 mg/kg であった。経口投与と同様、死亡例では腺胃粘膜に出血性壊死、遠位尿細管及び集合管の上皮に壊死が認められた。

イヌに 2 週間以上の間隔で増量する方式で経口投与した際には、40 mg/kg で血漿アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（GOT）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（GPT）の上昇、80 mg/kg で嘔吐がみられたが、死亡例は認められなかった。80 mg/kg 投与後 2 週に実施された病理組織学的検査では、腎臓に乳頭管及び乳頭上皮の多層化が認められた。

イヌに単回静脈内投与した際には、0.1 mg/kg 以上で腎臓の集合管上皮に変性が認められた。1 mg/kg で摂餌量及び体重の減少、血漿 GOT、尿素窒素（BUN）及びクレアチニンの増加がみられ、2 例中 1 例が瀕死となった。病理組織学的検査では胃潰瘍、集合管、乳頭管及び乳頭上

皮の変性・壊死，膀胱に粘膜上皮の剥離，平滑筋の空胞変性が認められた。

反復投与毒性

ラットにおける13週間反復経口投与試験では、3.125 mg/kg/day以上でGOTの上昇がみられ、6.25 mg/kg/day以上では本薬の刺激性によると考えられる呼吸音の異常が散見され、血漿総蛋白の減少、腸間膜リンパ節にマクロファージの集簇がみられた。12.5 mg/kg/day以上では死亡がみられ、摂餌量の減少、ヘマトクリットの減少、GPT及びBUNの上昇、腺胃粘膜のびらん、潰瘍が認められた。25 mg/kg/dayでは体重増加の抑制、喉頭及び咽頭上皮のびらん、潰瘍が認められた。

ラットにおける26週間反復経口投与試験では、0.1 mg/kg/day以上で血小板数の減少、脾臓における髓外造血の亢進、1 mg/kg/day以上で赤血球数、ヘマトクリット、白血球数及び血漿総蛋白の減少が認められた。6.25 mg/kg/dayでは呼吸音の異常及び体重増加の抑制、GOTの上昇、腺胃粘膜のびらん、腸間膜リンパ節にマクロファージの集簇が観察された。血球系の減少及び髓外造血の亢進は、ミノドロン酸水和物の骨吸収抑制作用によって一次海綿骨梁が増幅し、骨幹骨髓腔内に進展した結果、骨髓腔が減少したことによる2次的な変化及びその代償性の変化と考えられた。

ラットに13及び26週間反復経口投与した際の無毒性量は、それぞれ1及び0.01 mg/kg/dayであった。無毒性量におけるミノドロン酸水和物のCmaxは、臨床用量におけるCmax（健常高齢女性が本薬を1 mg/dayの用量で服用した際のCmax）と比較すると、13週間反復投与試験では雄で2倍、雌で4倍であった（ラットにおけるトキシコキネティクス（TK）は、モニタリングによって評価したことから曝露量の比較にはCmaxを用いた）。一方、26週間反復投与試験において1 mg/kg/day以下の投与量で発現した血球系の減少及び髓外造血の亢進は、ラットでは性成熟に達しても骨端軟骨の成長板が開いており、骨吸収抑制作用に対して感受性が高いため発現した変化と考えられた。

ラットにおける4週間反復静脈内投与試験では、0.005 mg/kg/day以上でGOTの上昇、0.04 mg/kg/day以上で尿細管上皮の好塩基性化及び膀胱平滑筋の空胞変性、0.08 mg/kg/day以上で消化管の空胞変性、0.16 mg/kg/dayで尿蛋白、精囊平滑筋の空胞変性、0.32 mg/kg/dayで体重及び摂餌量の減少、BUN及びクレアチニンの増加、尿細管上皮の壊死、気管及び舌動脈壁平滑筋の変性・壊死、精細管の萎縮、精巣上体の精子肉芽腫、甲状腺濾胞の大型化が認められた。無毒性量は0.001 mg/kg/dayであると判断された。4週間反復静脈内投与した後、13週間休薬した追加試験の成績から、平滑筋の変化は、休薬により消失する可逆性の変化であることが確認された。

イヌにおける13週間反復経口投与試験では、10 mg/kg/day以上で血液を含む吐物や軟便が認められ、摂餌量及び体重の減少が顕著であったため、10 mg/kg/dayの雌全例を投与6～8週から休薬し、20 mg/kg/dayでは雌雄全例を投与3～7週に途中解剖した。これらの投与量では、血小板数の減少及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長、GOT、GPT及び乳酸脱水素酵素（LDH）の上昇、血漿総蛋白の減少、胃粘膜上皮の変性・壊死、腎近位尿細管の腫脹、腎髓質の

集合管介在細胞の腫脹と好酸性化，脾臓皮膜下の赤脾髄に線維化が認められた。更に，10 mg/kg/day では小脳白質（髄質）を中心とした空胞形成，20 mg/kg/day では白血球数，ビリルビンの増加，尿細管上皮の変性・壊死，肝細胞の壊死，胃及び腸管粘膜の壊死，胃及び膀胱に平滑筋の変性が認められた。小脳を中心にみられた白質の空胞形成は，超微形態の観察から神経線維髄鞘（ミエリン鞘）の解離によって形成された空胞であり，神経細胞及び軸索には異常がみられないことが確認された。また，この空胞形成は，本薬を 10 mg/kg/day の投与量で 13 週投与後 1 年間休薬した動物には認められず，休薬によって消失する可逆性の変化であることが確認された。

イヌにおける 52 週間反復経口投与試験では，3 mg/kg/day において小脳白質の空胞形成が認められた。

イヌに反復経口投与した際の無毒性量は，13 週間投与では 3 mg/kg/day，52 週間投与では 1 mg/kg/day であった。52 週間投与での無毒性量におけるミノドロン酸水和物の AUC_{0-24h} は，臨床用量における AUC_{0-∞}（健常高齢女性が本薬を 1 mg/day の用量で服用した際の AUC_{0-∞}）と比較すると，雄で 7 倍，雌で 11 倍であった。

イヌにおける 5 週間反復静脈内投与試験では，0.1 mg/kg/day 以上で GOT の上昇，胃粘膜の出血，変性・壊死，尿細管上皮の変性・壊死が認められた。0.3 mg/kg/day では半数例が死亡し，無毒性量は 0.03 mg/kg/day と判断された。

カニクイザルにおける 13 及び 52 週間反復経口投与試験では，ミノドロン酸水和物を 3 mg/kg/day の投与量で 13 週間，0.3 及び 1 mg/kg/day の投与量で 52 週間反復投与した。13 及び 52 週間投与ともに毒性所見は認められなかったことから，13 週間投与の無毒性量は 3 mg/kg/day，52 週間投与の無毒性量は 1 mg/kg/day と判断された。無毒性量におけるミノドロン酸水和物の AUC_{0-24h} は，臨床用量における AUC_{0-∞}と比較すると，13 週間投与では雄で 8 倍，雌で 39 倍，52 週間投与では雄で 3 倍，雌で 8 倍であった。

遺伝毒性

細菌を用いた復帰突然変異試験，ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験，マウスにおける小核試験のいずれにおいてもミノドロン酸水和物は遺伝毒性を示さなかった。

がん原性

マウスにおけるがん原性試験では，6 mg/kg/day 以上で本薬の刺激性に起因すると考えられる異常呼吸音等の症状がみられ，体重増加の抑制が認められた。12 mg/kg/day では生存率も低下した。病理組織学的検査の結果，いずれの投与量においても本薬による腫瘍発生率の増加は認められなかった。

ラットにおけるがん原性試験では，0.2 mg/kg/day 以上の雄，0.6 mg/kg/day 以上の雌で体重増加の抑制が認められた。2 mg/kg/day 以上で刺激性に起因すると考えられる異常呼吸音等の症状が認められた。6 mg/kg/day では，生存率が投与 33 週の時点で雄 40%，雌 30.9%と低下したため，生存例をすべて剖検した。死亡の原因は，刺激性による呼吸障害と推定され，特定の腫瘍

によるものではなかった。病理組織学的検査の結果、いずれの投与量においても腫瘍発生率の増加は認められなかった。

生殖発生毒性

雄及び雌のラットに経口投与した際の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（ICH-I 試験）では、3.55 mg/kg/day 以上で本薬の刺激性によると考えられる呼吸障害を伴う一般症状の悪化がみられ、死亡あるいは瀕死となる例が認められた。いずれの投与量でも、交尾率、受胎率及び胎児死亡率に変化はみられず、雄の精子検査にも異常は認められなかった。雌雄の生殖能及び胚の初期発生に対する無毒性量はいずれも 3.55 mg/kg/day と判断された。

雄ラットに静脈内投与した際の妊娠前及び妊娠初期投与能試験（Seg I 試験）では、0.08 mg/kg/day 以上で死亡がみられ、0.16 mg/kg/day で一般症状の悪化に関連したと考えられる交尾率及び受胎率の低下が認められた。0.08 mg/kg/day 以上で全胚吸収母体が各 1 例認められ、着床数及び生存胎児数の減少傾向が認められた。雄の生殖能及び胚の初期発生に対する無毒性量はいずれも 0.02 mg/kg/day と判断された。

雌ラットに静脈内投与した際の妊娠前及び妊娠初期投与試験（Seg I 試験）では、0.02 mg/kg/day 以上で母動物の瀕死あるいは死亡が認められたが、いずれの投与量でも交尾率、受胎率及び胚の初期発生に影響はみられなかった。雌の生殖能に対する無毒性量は 0.08 mg/kg/day、胚の初期発生に対する無毒性量は 0.32 mg/kg/day と判断された。

ラットに経口投与した際の胚・胎児発生に関する試験（ICH-III 試験、投与量：12.5, 25, 50 mg/kg/day）では、50 mg/kg/day で母動物に体重増加の抑制、摂餌量の減少がみられ、胎児体重の減少傾向、骨化の遅延傾向がみられたが、催奇形性は認められなかった。母動物の生殖能に対する無毒性量は 50 mg/kg/day、胚・胎児発生に対する無毒性量は 25 mg/kg/day と判断された。

ラットに静脈内投与した際の器官形成期投与試験（Seg II 試験）では、妊娠 20 日に帝王切開する動物に加え、自然分娩させる動物を設定した。いずれの投与量においても催奇形性は認められなかったが、自然分娩群では、0.02 mg/kg/day 以上で血中カルシウムの低下によると考えられる妊娠末期の母体死亡が多発し、出生児数が減少した。母動物の生殖能に対する無毒性量は 0.002 mg/kg/day、胎児に対する無毒性量は 0.32 mg/kg/day、出生児に対する無毒性量は 0.002 mg/kg/day と判断された。

ウサギに経口投与した際の胚・胎児発生に関する試験（ICH-III 試験）では、10 mg/kg/day で流産がみられたが、催奇形性は認められなかった。母動物の生殖能に対する無毒性量は 3 mg/kg/day、胚・胎児発生に対する無毒性量は 10 mg/kg/day と判断された。

ウサギに静脈内投与した際の器官形成期投与試験（Seg II 試験）では、0.025 mg/kg/day 以上で流産がみられたが、催奇形性は認められなかった。母動物の生殖能に対する無毒性量は 0.008 mg/kg/day、胚・胎児に対する無毒性量は 0.075 mg/kg/day と判断された。

ラットに経口投与した際の出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（ICH-II 試験）では、1 mg/kg/day 以上で妊娠末期に血中カルシウムの顕著な低下、振戦及び死亡がみら

れ、出生率は低下したが、出生児に対する影響は認められなかった。母動物の生殖能及び出生前の発生に関する無毒性量は 0.1 mg/kg/day、出生後の成長、発達、行動、生殖能に関する無毒性量は 6.25 mg/kg/day と判断された。

ラットに静脈内投与した際の周産期及び授乳期投与試験（SegIII試験）では、0.001 mg/kg/day で妊娠末期の母体死亡がみられ、次世代児については死産児数の増加及びオープンフィールドにおける区画移動数の増加が認められた。母動物の生殖能、出生前の発生、出生後の成長・発達、行動及び生殖能に関する無毒性量はいずれも 0.00015 mg/kg/day と判断された。

局所刺激性

ミノドロン酸水和物の原薬は、ウサギの眼粘膜に対して強い刺激性を示した。刺激性は、曝露後直ちに原薬が見られなくなるまで洗眼することによって軽減した。

その他の毒性

抗原性試験、イヌでみられた脳における空胞形成の発現機序に関する試験、ラットでみられた妊娠末期における母体死亡の発現機序に関する試験を実施した。依存性試験については、一般毒性試験、コアバッテリー試験及び一般薬理試験において中枢神経系の作用が認められないことから、依存形成能を有する可能性は低いと考え、試験は実施しなかった。原薬中の類縁物質の安全性に関しては、原薬中に 0.1%以上含まれることが規定されている類縁物質は存在しないことから、不純物についての毒性試験は実施しなかった。

抗原性試験として、モルモットにおける能動全身性アナフィラキシー試験及びマウス IgE 抗体産生試験を実施したが、いずれの試験においてもミノドロン酸水和物の抗原性を示唆する結果は得られなかった。

イヌで発現した脳における空胞形成の発現機序を明らかにするため、ミノドロン酸水和物のミエリン鞘に対する直接作用を検討する試験及びカルシウムの低下作用との関連性を検討する試験を実施した。ミエリン鞘に対する直接作用を検討する試験では、培養マウス小脳組織片にミエリン鞘を形成させた後、培地に本薬を添加して形態変化を観察した。細胞毒性がみられる濃度（0.01～1 µg/mL）まで曝露してもミエリン層板の解離はみられず、本薬による直接作用は認められなかった。イヌに本薬を 10 mg/kg/day の投与量で 13 週間反復経口投与し、血中カルシウムの低下が確認された後、カルシウムの持続静脈内投与を開始し、脳の空胞形成に対するカルシウム補給の効果を調べた。本薬の単独投与では 10 例中 6 例に空胞形成がみられたが、本薬投与に加えてカルシウムを補給された動物では 6 例中 1 例に空胞形成が軽度に認められたのみであり、脳における空胞形成の発現はカルシウム低下作用によるものである可能性が示された。

ラットにおける生殖・発生毒性試験でみられた妊娠末期における母体死亡の発現機序を明らかにするため、ミノドロン酸水和物を器官形成期に静脈内投与し、母体死亡に関するカルシウムの補給効果について検討した。本薬の単独投与では、母動物の 14 例中 9 例が妊娠末期あるいは分娩中に死亡した。カルシウムを補給された動物では、母動物の死亡はみられず、本薬による妊娠末期の母体死亡は、カルシウムを補給することにより阻止され、正常な分娩に至ること

が示された。したがって、母動物の死亡は、妊娠末期に起こる血中カルシウムの低下が本薬の骨吸収抑制作用により増強されたために発現したものと考えられた。

2.4.5 総括及び結論

ミノドロン酸水和物の *in vitro* での骨吸収に対する作用を検討した結果、本薬はウサギ破骨細胞による骨スライスからの CTX 遊離を低下させたことから、本薬が *in vitro* で骨吸収を抑制することが明らかとなった。 *In vivo* での骨吸収に対する作用について各種骨粗鬆症モデルにおいて検討した結果、本薬は臨床投与経路である経口投与により骨吸収の亢進を抑制し、骨密度の低下を抑制するとともに骨強度の低下を抑制することが明らかとなった。また、本薬は腫瘍細胞を用いた骨病変モデルにおいても骨吸収抑制作用を示した。

本薬は各種骨粗鬆症モデルにおいて 1 日 1 回の反復経口投与で 0.006~0.03 mg/kg/day の用量から骨吸収抑制作用を示した。ミノドロン酸水和物の臨床用量は 1 mg/man/day（体重 50 kg 当たりに換算して 0.02 mg/kg/day）であり、本薬は各種骨粗鬆症モデルにおいて臨床用量に近い用量で骨吸収を抑制することが示された。また、本薬のラットにおける薬効用量は骨粗鬆症モデルで正常動物と同程度の骨密度を示した 0.03 mg/kg/day であると考えられた。

骨強度は骨密度と骨質により決定されると考えられているため、ミノドロン酸水和物の骨質に対する影響を各種骨粗鬆症モデルで検討した。本薬は、骨質の劣化につながると考えられる骨代謝回転の亢進や骨梁構造の破綻を抑制することが明らかとなった。また、本薬を投与した動物において、骨質の指標として骨密度と骨強度の相関を検討した結果、両者の間には正の相関関係がみられたことから、本薬は骨質を劣化させないと考えられた。これらの結果から、本薬は骨質を劣化させることなく骨密度の低下を抑制し、結果として骨強度の低下を抑制したと考えられた。

ミノドロン酸水和物の作用機序を検討した結果、他の窒素原子含有ビスホスホネートと同様、本薬も FPP 合成酵素を阻害することが明らかとなった。また、本薬のウサギ破骨細胞培養系における骨吸収抑制作用はメバロン酸代謝物経路の関連物質の 1 つであるゲラニルゲラニオールの添加により減弱した。一方、同培養系において、本薬は破骨細胞数を減少させ、それと関連して培養液中の CK 活性を上昇させた。本薬を経口投与したラット大腿骨においては、破骨細胞の波状縁が不明瞭となり、破骨細胞に形態変化を誘導するとともに、一部の破骨細胞にアポトーシスが誘導された。以上の結果から、本薬は FPP 合成酵素を阻害し、破骨細胞内において FPP から生合成されるゲラニルゲラニルピロリン酸量を低下させることによって、破骨細胞に機能抑制や細胞死をもたらした結果として、骨吸収抑制作用を示すと推察された。

ミノドロン酸水和物の作用部位を検討した結果、*in vitro* において ^{14}C -ミノドロン酸はウシ骨スライスに結合し、骨スライスに結合した ^{14}C -ミノドロン酸は酸性条件下で骨スライスから遊離した。また、 ^{14}C -ミノドロン酸水和物を静脈内投与した A375 骨転移ラット大腿骨のマイクロオートラジオグラムにおいて、放射能が石灰化骨基質に沈着し、その一部が選択的に破骨細胞内に取り込まれている像が観察された。更に、ミノドロン酸水和物で前処置した骨スライス上で破骨細胞を培養した場合においても、本薬は骨スライスからの CTX 遊離を低下させ、骨吸収が抑

制された。以上の結果から、ミノドロン酸は骨に集積し、骨吸収の過程で酸により遊離し、破骨細胞に取り込まれることで骨吸収抑制作用を示すことが示唆された。一方、マイクロオートラジオグラムにおいて、骨芽細胞に放射能は検出されず、更に骨吸収と骨形成はカップリングしていることから、*in vivo* で見られた本薬の骨形成抑制作用は骨吸収抑制作用に起因した二次的な作用であると考えられた。

ミノドロン酸水和物の薬理作用について既存のビスホスホネートと比較した。ミノドロン酸水和物はカニクイザル FPP 合成酵素を阻害し、本薬の IC₅₀ 値は骨吸収抑制作用が最も強いと報告されているゾレドロン酸水和物¹⁾とほぼ同程度でありパミドロネートの 1/7.5 であった。また、本薬はウサギ破骨細胞培養系において骨スライスからの CTX 遊離を低下させ、骨吸収抑制作用を示したが、本薬の IC₅₀ 値はリセドロネート及びアレンドロネートの IC₅₀ 値と比較して、より低値であった。更に、ラット卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおいて本薬はリセドロネート及びアレンドロネートと比較して、より低用量から骨密度の低下を抑制した。以上の結果から本薬は、経口剤として本邦で承認されているリセドロネート及びアレンドロネートより活性が強い薬物であると考えられた。

ビスホスホネートで懸念される骨石灰化障害作用を成長期ラットにおいて検討した結果、ミノドロン酸水和物はエチドロネートと比較して低用量から骨量を増加させ、骨量増加の発現用量の 100 倍の用量においても、エチドロネートで観察された骨石灰化障害作用を示さなかった。また、各種骨粗鬆症モデルにおいても本薬は未石灰化骨基質層の厚さである類骨幅を増大させなかった。更に、ラットにおいて骨折治癒に及ぼす影響を検討した結果、ミノドロン酸水和物は薬効用量の 0.03 mg/kg/day 以上の用量で骨折修復過程において仮骨及び軟骨の吸収遅延により仮骨量を増加させる傾向を示したが、骨折部位の骨強度を低下させることはなく、むしろ増加させるか影響を与えなかった。一方、アレンドロネートも薬効用量の 1 mg/kg/day 以上の用量で仮骨及び軟骨の吸収遅延により仮骨量を増加させる傾向を示し、骨折部位の骨強度を増加させた。これらのことから、ミノドロン酸水和物は骨石灰化障害に基づく副作用を起こす可能性は低いものと考えられた。

他のビスホスホネートでも報告されているように²⁾、本薬は 100 mg/kg 以上の用量でラットの胃粘膜障害を惹起し、1 週間の反復経口投与により 3 mg/kg/day 以上の用量で胃潰瘍の治癒を遅延させた。また、本薬は 100 mg/kg 以上の用量でラット腸管水分量増加作用及び胃排泄抑制作用を示したが、その程度はアレンドロネートに比べ弱かった。一方、ラットにおける薬効用量は 0.03 mg/kg/day であることから、本薬が胃粘膜に影響を及ぼす用量は薬効用量と比較して高いと考えられた。アレンドロネートのラット胃排泄抑制作用は投与液量を減量すると作用が増強するのに対し、本薬では増強がみられなかったこと、イヌを用いた食道通過能検討では、本薬製剤を胃へ到達させるのに必要な飲水量がアレンドロネート製剤に比べ少なかったことから、本薬を服用する際にはアレンドロネートに比べ飲水量を減量できる可能性が示唆された。その他、安全性薬理試験及び一般薬理試験では、大きな問題となる作用は認められなかった。

臨床において併用される可能性がある他の骨粗鬆症治療薬とミノドロン酸水和物の併用作用を検討した。本薬は *in vitro* のウサギ破骨細胞培養系において、メナテトレノンの骨吸収抑制作

用に相加的に作用した。また、本薬はラット卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおいて、アルファカルシドールの骨密度低下抑制作用に相加的に作用した。したがって、本薬が骨粗鬆症患者でビタミン K₂ 製剤あるいはビタミン D₃ 製剤と併用された場合、本薬はこれら併用薬の作用を打ち消すことなく、相加的に作用することが期待された。

以上の結果から、ミノドロン酸水和物はビスホスホネートとして強い骨吸収抑制活性を有し、経口投与において骨密度の増加に基づいた骨強度改善作用を有することから、新規骨粗鬆症治療薬として有用であると考えられる。

ビスホスホネート系薬剤の動物及びヒトにおける薬物動態に共通した性質としては、1) 経口投与した際の BA 若しくは吸収率が低く²²⁻²⁹⁾、かつ食餌（食事）により吸収が低下する²⁷⁻³²⁾、2) 標的組織である骨へ高濃度に移行し、かつ骨内に長期滞留する^{25,27,32-35)}、3) 体内でほとんど代謝を受けない^{25-27,32,36-38)}、4) 主に尿中に排泄される^{23-27,32,33,38)}、等が挙げられる。ミノドロン酸水和物の薬物動態も、基本的に他のビスホスホネートと同様の挙動を示した。

ミノドロン酸水和物をラット、イヌ及びヒトに経口投与したときの BA はいずれも 1%前後であり、顕著な種差はないものと考えられた。本薬はラット及びイヌに静脈内投与した際にほとんど代謝を受けず、ラット、イヌ及びヒトの肝並びに小腸マイクロソーム中でも代謝物の生成は認められなかった。したがって、本薬の BA が低い原因は、初回通過代謝ではなく消化管からの吸収性の低さに由来すると考えられる。

ラットに ¹⁴C-ミノドロン酸水和物を静脈内及び経口投与したときの放射能は、標的器官である骨に速やかにかつ高濃度に移行し、かつ長期間滞留した。¹⁴C-ミノドロン酸水和物をラット及びイヌに静脈内投与後の尿中放射能排泄率は 50.9～53.3%であり、主排泄経路は腎排泄であった。未排泄の放射能の多くは骨に移行していると考えられた。一方、経口投与後の尿中排泄率は 1.2～1.8%と低く、大部分は未吸収のまま糞中に排泄された。また、ヒトにおける尿中未変化体排泄率は、静脈内投与で 46.03%～55.89%、経口投与で 0.20%～0.69%であり（**2.7.2.2-2.1 健常成人における薬物動態**）、動物とほぼ同様であった。

以上、本薬を経口投与したときの BA は 1%前後と低いが、吸収された薬剤はほとんど代謝されずにその約 50%が尿中に排泄され、残りの多くは骨に移行し、長期間滞留すると考えられた。また、ラット及びイヌにおけるミノドロン酸水和物の薬物動態はヒトのそれに類似しており、これらの動物種は本薬の有効性及び安全性を評価するのに適切な動物種であると考えられた。

毒性試験において得られた所見は、いずれもビスホスホネート系薬剤に共通して認められる変化であった。ミノドロン酸水和物の反復経口投与試験で確認された無毒性量における曝露量と臨床用量における曝露量を比較することにより安全域を算出すると、イヌでは 7～11 倍、カニクイザルでは 3～8 倍の安全域が得られた（表 2.4-2、いずれも 52 週試験の成績、AUC_{0-24h} による比較）。一方、ラットでの 13 週間反復経口投与試験の無毒性量における曝露量は、臨床用量における曝露量と比較すると 2～4 倍であったが（表 2.4-2、ラットにおける TK は、モニタリングによって評価したことから曝露量の比較には C_{max} を用いた）、26 週間反復経口投与試験

の無毒性量における曝露量は、臨床用量における曝露量に満たなかった。しかし、1 mg/kg/day以下の投与量で発現した血球系の減少及び髄外造血の亢進は、本薬の骨吸収抑制作用によって一次海綿骨が進展した結果、骨髓腔が減少したことによる2次的な変化と考えられた。また、ラットでは性成熟に達しても骨端軟骨の成長板が開いており、骨吸収抑制作用に対して感受性が高いと考えられるが、感受性の高いラットにおいても血球系の減少は軽度であったことから、ヒトへのリスクを示唆する変化ではないものと推測された。ラットの反復経口投与試験でみられた本薬による主要な毒性変化は、呼吸音の異常及び胃粘膜障害であった。これらの所見については、本薬の直接の刺激性による変化と考えられることから、投与量を基準に比較すると、これら変化がみられなかった最高投与量（1 mg/kg/day、26週間反復経口投与試験）と臨床用量には約50倍の乖離が認められた。

表 2.4-2 各毒性試験の無毒性量における曝露量及び臨床用量における曝露量との比較

試験		無毒性量 (mg/kg/day)	無毒性量に おける AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	臨床におけ る AUC _{0-∞} との比 ⁶⁾	無毒性量に おける Cmax (ng/mL)	臨床における Cmax との比
ラット 13 週試験 ¹⁾	雄	1	NE	-	1.23	2
	雌	1	NE	-	2.41	4
ラット 26 週試験 ²⁾	雄	0.01 (1) ⁷⁾	NE	-	ND	<1 (50) ⁷⁾
	雌	0.01 (1) ⁷⁾	NE	-	ND	<1 (50) ⁷⁾
イヌ 13 週試験 ³⁾	雄	3	74.6	24	10.6	16
	雌	3	50.4	17	4.89	8
イヌ 52 週試験 ⁴⁾	雄	1	21.0	7	3.33	5
	雌	1	34.9	11	4.97	8
サル 13 週試験 ⁵⁾	雄	3	23.9	8	6.84	11
	雌	3	118	39	40.9	63
サル 52 週試験 ⁵⁾	雄	1	10.2	3	3.03	5
	雌	1	23.1	8	7.58	12

NE : AUC_{0-24h}は未算出, ND : 定量限界未満, - : 未算出

1) : ラットにおける13週間反復経口投与毒性試験（投与13週のTK, 添付資料 4.2.3.2-2）

2) : ラットにおける26週間反復経口投与毒性試験の低投与量追加試験（投与13週のTK, 添付資料 4.2.3.2-4）

3) : イヌにおける13及び52週間反復経口投与毒性試験（投与13週のTK, 添付資料 4.2.3.2-10）

4) : イヌにおける52週間反復経口投与毒性試験（投与20週のTK, 添付資料 4.2.3.2-9）

5) : カニクイザルにおける13及び52週間反復投与毒性試験（投与13及び52週のTK, 添付資料 4.2.3.2-13）

6) : 健常高齢女性が1 mg服用した際のPK成績（2.7.2.2-2.3.2 臨床薬理試験（性差及び加齢の影響）[CL-029]の項参照）を基準（AUC_{0-∞} : 3.051 ng·h/mL, Cmax : 0.6512 ng/mL）とし、ラットではCmax, イヌ及びカニクイザルではCmax及びAUC_{0-24h}をもとに算出した。

7) : ()内には、消化管障害に対する無毒性量、及び投与量に基づく曝露量比を示した。

遺伝毒性試験, がん原性試験, 抗原性試験の成績はいずれも陰性であった。生殖発生毒性試験では、本薬をラットの器官形成期あるいは周産期に投与すると、周産期における母体死亡及び出生率の低下が認められた。また、本薬はラットにおいて胎児に移行することが示されており、胎児体重の減少傾向及び骨化の遅延傾向がみられていることから、妊婦あるいは妊娠している可能性のある女性に対して本薬を使用することは避けるべきと考えられた。更に、ラットにおいて乳汁中に移行することが示されていることから、授乳中の婦人に投与する場合には授乳を

避けるべきと考えられた。

以上、薬理的、薬物動態学的及び毒性学的検討により、ミノドロン酸水和物は経口吸収性は低いものの吸収された薬剤は骨に選択的に移行して長期間滞留し、また骨においては破骨細胞に選択的に取り込まれ破骨細胞の機能を抑制することにより骨吸収抑制作用を発現する薬物であることが示された。更に、その臨床用量においてヒトで重篤な副作用を発現する可能性は低いと考えられた。

2.4.6 参考文献一覧

- 1) Fleisch H. Bisphosphonates in bone disease. From the laboratory to the patient. 4th ed. San Diego (CA): Academic Press; 2000:27-66.
- 2) 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.
- 3) Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: From the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999;25:97-106.
- 4) Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000;88:2961-78.
- 5) Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Dale Poulter C, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:235-42.
- 6) van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, Papapoulos S. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:108-11.
- 7) Ito M, Amizuka N, Nakajima T, Ozawa H. Ultrastructural and cytochemical studies on cell death of osteoclasts induced by bisphosphonate treatment. *Bone* 1999;25:447-52.
- 8) Lane JM, Riley EH, Wirganowicz PZ. Osteoporosis: Diagnosis and treatment. *J Bone Joint Surg Am* 1996;78:618-32.
- 9) Riggs BL, Melton LJ III. Clinical heterogeneity of involutional osteoporosis: Implications for preventive therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1229-32.
- 10) Ettinger MP. Aging bone and osteoporosis: strategies for preventing fractures in the elderly. *Arch Intern Med* 2003;163:2237-46.
- 11) Reid IR. Glucocorticoid osteoporosis- mechanisms and management. *Eur J Endocrinol* 1997;137:209-17.
- 12) Cranney A, Wells G, Willan A, Griffith L, Zytaruk N, Robinson V, et al. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women. *Endocr Rev* 2002;23:508-16.
- 13) Cranney A, Tugwell P, Adachi J, Weaver B, Zytaruk N, Papaioannou A, et al. Meta-analysis of

- risedronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev* 2002;23:517-23.
- 14) Emkey R, Delmas PD, Goemaere S, Liberman UA, Poubelle PE, Daifotis AG, et al. Changes in bone mineral density following discontinuation or continuation of alendronate therapy in glucocorticoid-treated patients. *Arthritis Rheum* 2003;48:1102-8.
 - 15) de Groen PC, Lubbe DF, Hirsch LJ, Daifotis A, Stephenson W, Freedholm D, et al. Esophagitis associated with the use of alendronate. *N Engl J Med* 1996;335:1016-21.
 - 16) Lanza F, Schwartz H, Sahba B, Malaty HM, Musliner T, Reyes R, et al. An endoscopic comparison of the effects of alendronate and risedronate on upper gastrointestinal mucosae. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3112-7.
 - 17) 小松哲郎, 佐村恵治, 永見和之, 松本浩良. アレンドロネートのラットにおける 27 週中間解剖を含む 53 週間経口投与毒性試験. *薬理と臨床*. 1998;8:5-37.
 - 18) 永見和之, 久野博司, 松本浩良. アレンドロネートのイヌにおける 53 週間経口投与毒性試験. *薬理と臨床*. 1998;8:39-62.
 - 19) 金谷浩, 松澤景子, 伊澤義弘, 末武和己, 那須雄三, 神村英利 他. アレンドロネートの毒性研究 (第 2 報) -ラットにおける 13 週間反復投与毒性試験-. *基礎と臨床*. 1994;28:3244-3284.
 - 20) Reitsma PH, Bijvoet OLM, Verlinden-Ooms H, van der Wee-Pals LJA. Kinetic studies of bone and mineral metabolism during treatment with (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1, 1-bisphosphonate (APD) in rats. *Calcif Tissue Int* 1980;32:145-157.
 - 21) Elliott SN, Mcknight W, Davies NM, MacNaughton WK, Wallace JL. Alendronate induces gastric injury and delays ulcer healing in rodents. *Life Sci* 1998;62:77-91.
 - 22) Daley-Yates PT, Dodwell DJ, Pongchaidecha M, Coleman RE, Howell A. The clearance and bioavailability of pamidronate in patients with breast cancer and bone metastases. *Calcif Tissue Int* 1991;49:433-435.
 - 23) Mitchell DY, Barr WH, Eusebio RA, Pallone KA, Duke FP, Russell DA, et al. Risedronate pharmacokinetics and intra- and inter-subject variability upon single-dose intravenous and oral administration. *Pharm Res* 2001;18:166-170.
 - 24) Pentikäinen PJ, Elomaa I, Nurmi AK, Kärkkäinen S. Pharmacokinetics of clodronate in patients with metastatic breast cancer. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1989;27:222-228.
 - 25) Usui T, Watanabe T, Higuchi S. Pharmacokinetics of YM175, a new bisphosphonate, in rats and dogs. *Drug Metab Dispos* 1995;23:1214-1219.
 - 26) Wingen F, Schmähl D. Pharmacokinetics of the osteotropic diphosphonate 3-amino-1-hydroxypropane-1,1-diphosphonic acid in mammals. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1987;37:1037-1042.
 - 27) Lin JH, Duggan DE, Chen I-W, Ellsworth RL. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. *Drug Metab Dispos* 1991;19:926-932.
 - 28) Fogelman I, Smith L, Mazess R, Wilson MA, Bevan JA. Absorption of oral bisphosphonate in normal subjects. *Clin Endocrinol* 1986;24:57-62.

- 29) Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Freeman A, Quan H, Lasseter KC, Mucklow JC, Porras AG. Studies of the oral bioavailability of alendronate. *Clin Pharm Ther* 1995;58:288-298.
- 30) 碓井孝志, 渡辺隆, 樋口三朗, 中村英次, 其田卓也. ^{14}C -YM175 のラットにおける吸収. *薬理と臨床*. 1998;8:379-386.
- 31) Mitchell DY, Heise MA, Pallone KA, Clay ME, Nesbitt JD, Russell DA, et al. The effect of dosing regimen on the pharmacokinetics of risedronate. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:536-542.
- 32) Davi H, Tronquet C, Caix J, Simiand J, Briot C, Berger Y, et al. Disposition of tiludronate (Skelid[®]) in animals. *Xenobiotica* 1999;29:1017-1031.
- 33) 中村英次, 今崎一, 碓井孝志, 渡辺隆, 樋口三朗. YM175 の体内動態 - ^{14}C -YM175 静脈内投与時のラットにおける分布および排泄-. *薬物動態*. 1994;9:835-847.
- 34) 碓井孝志, 渡辺隆, 樋口三朗, 神村秀隆, John AJ, Bennett S, et al. ^{14}C -YM175 をラットに経口投与したときの体内分布および排泄. *薬理と臨床*. 1998;8:367-377.
- 35) Mönkkönen J, Koponen H-M, Ylitalo P. Comparison of the distribution of three bisphosphonates in mice. *Pharmacol Toxicol* 1989;65:294-298.
- 36) Canniggia A, Gennari C. Kinetics and intestinal absorption of ^{32}P -EHDP in man. *Calcif Tissue Res* 1977;22:428-429.
- 37) Michael WR, King WR, Wakim JM. Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphate (disodium etidronate) in the rat, rabbit, dog and monkey. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972;21:503-515.
- 38) Cocquyt V, Kline WF, Gertz BJ, Van Belle SJP, Holland SD, DeSmet M, et al. Pharmacokinetics of intravenous alendronate. *J Clin Pharmacol* 1999;39:385-393.