

PIXEによるビスフォスフォネート投与ラット 肝臓、骨および尿中リンとカルシウム分析

太田顕成、ト桂蘭^{*1}、曾根由美子^{*2}、中山茂信^{*3}、早川和重、趙継紅^{*4}
世良耕一郎^{*5}、二ツ川章二^{*6}、斉藤義弘^{*6}、畠山智^{*6}

北里大学医学部放射線科学、生化学^{*2}、実験動物学^{*3}
〒 228-8555 神奈川県相模原市北里 1-15-1

^{*1} 中国深川市・人民医院腫瘍放射線治療科

^{*4} 中国長春市・吉林大学中日友好病院放射線科

^{*5} 岩手医科大学サイクロトンセンター
〒 020-0173 岩手県岩手郡滝沢村留が森 348-58

^{*6} 日本アイソトープ協会滝沢研究所仁科記念サイクロトンセンター
〒 020-0173 岩手県岩手郡滝沢村留が森 348-58

1 はじめに

ピロリン酸の類似体であるビスフォスフェート化合物は、骨吸収と骨量減少を引き起こす疾患に対する治療薬として広く用いられている。二つのC-P結合が同じ炭素原子上にあるP-C-Pビスフォスフォネートだけが骨に対して活性を示す。

P-C-P結合は炭素原子に付加する二つの側鎖の種類、またリン酸基のエステル化によって多くの誘導体を作ることが可能であり、インカドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、パミドロネート、ゾレドロネートなどが得られている。

現在、市場に医薬品として出回っているビスフォスフォネート化合物は、アレンドロネート、リセドロネート、エチドロネート（エチドロロン酸二ナトリウム）、イバンドロネート、リセドロネート、チルドロネートなどである^{1, 2)}。

本稿では、エチドロロン酸二ナトリウム（Disodium 1-Hydroxyethylidene-bis-phosphonate ; $C_2H_6Na_2O_7P_2=249.99$; Disodium Etidronate）をFischerラットに腹腔投与した後、肝臓、骨および尿を採取し、PIXE法によりリンおよびカルシウムを分析した実験結果が報告される。

2 方法と材料

2.1 薬品

エチドロロン酸二ナトリウム（エチドロネート）は和光純薬工業社から購入された。他に、和光純薬工業社の硝酸（ HNO_3 、有害金属測定用）と関東化学（株）の銀標準液（1,000ppm、原子吸光分析用）が使用された。

2.2 動物と実験

雌性Fischerは7週齢で納入され、実験は12週齢（250g体重）に達してから開始された。ラットの飼育飼料は固形CE-2（CLEA、東京）が使用された。飼料と水は自由に与えられた。

エチドロネートは生理食塩溶液によって溶解希釈され、ラット当たりリン量として5mgまたは10mg量のエチドロロン酸二ナトリウム溶液1mlが腹腔内に注射された。投与後5分および10分後に頸静脈から採血され、また肝臓左葉の一部、大腿骨皮質、および膀胱内から尿が採取された。

2.3 分析試料の調製とPIXE分析

大腿骨皮質、肝臓および尿が分析試料として用いられた。分析試料の前処理およびPIXE測定はNMCCの定法に従って行われた³⁾。

3 実験結果

3. 1 PIXE 法によるリン測定の見量線

PIXEによるリン測定の見量線は、エチドロネートを生理食塩溶液で希釈して作成した。結果をFig. 1に示す。リン量 (μg) と計数值 (カウント) との間に直線関係が成り立った。

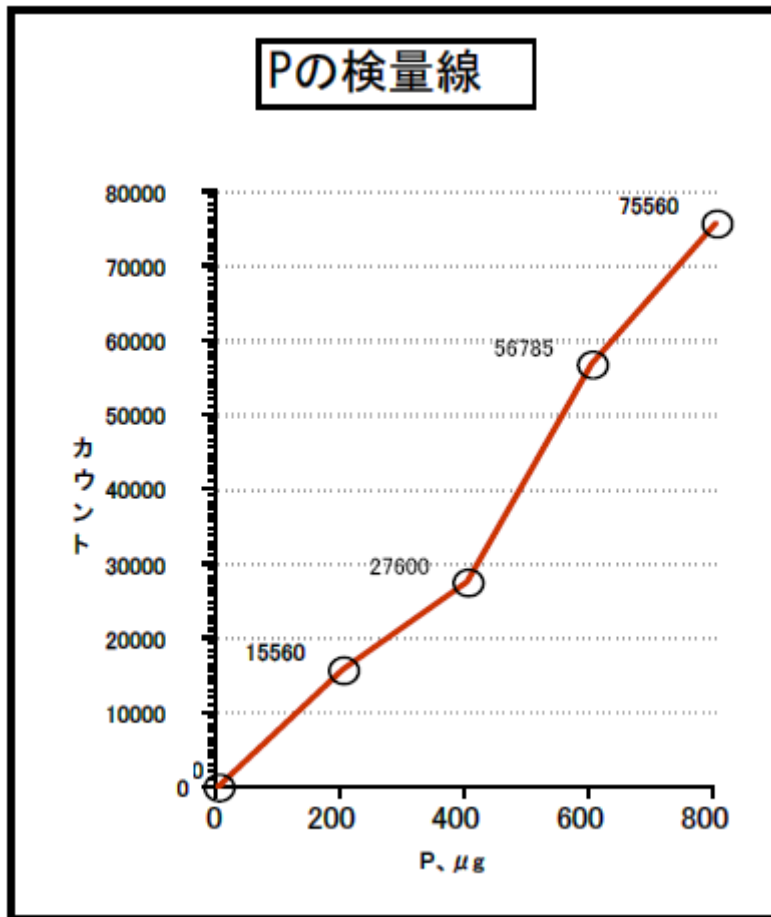


Fig.1 Relations between corrected counts rate and phosphorus contents

3. 2 エチドロネート投与ラット肝臓中のリンとカルシウム

Fig. 2 はエチドロネート投与後のラット肝臓中のリンとカルシウムの含量を示す。正常ラット肝臓に比べてエチドロネート投与ラット肝臓中のリンは急激にまた非常に減少していることが分る。また、エチドロネート投与ラット肝臓ではカルシウム量も著しく減少していた。

3. 3 エチドロネート投与ラット大腿骨中のリンとカルシウム

Fig. 3 はエチドロネート投与後のラット大腿骨中のリンとカルシウムの含量を示す。正常ラット骨に比べてエチドロネート投与ラット骨中のリンは急激にまた非常に増加していることが分る。また、エチドロネート投与ラット肝臓ではカルシウム量も著しく減少していた。ここで、リン、カルシウム共にエチドロネートを少量与えたラットよりも多量に与えたラットの方が増加量が低く出たのは、投与されたエチドロネート量が過剰に過ぎたことによる薬物代謝機構の低下によるものと考えられる。

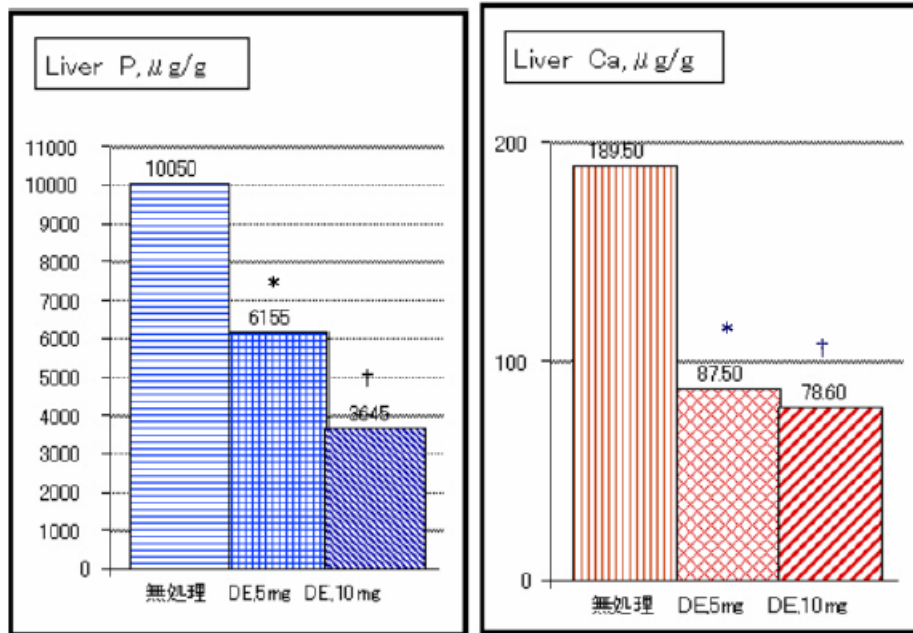


Fig.2 Effects of disodium Etidronate on phosphorus and calcium contents in liver.

Contents of phosphorus and calcium (mean \pm SD, n=3) from liver of rats at age 12 weeks showing decrease with dose of Disodium Etidronate(DE). Phosphrus($\mu\text{g/g}$): Cotrol; 10053 \pm 925, DE5mg; 6155 \pm 925, DE10mg; 3645 \pm 850. Asterisk indicates p<0.001, dagger p<0.001 vs control. Calcium($\mu\text{g/g}$): Cotrol; 189 \pm 40, DE5mg; 87 \pm 25, DE10mg; 78 \pm 17. Asterisk indicates p<0.001, dagger p<0.001 vs control.

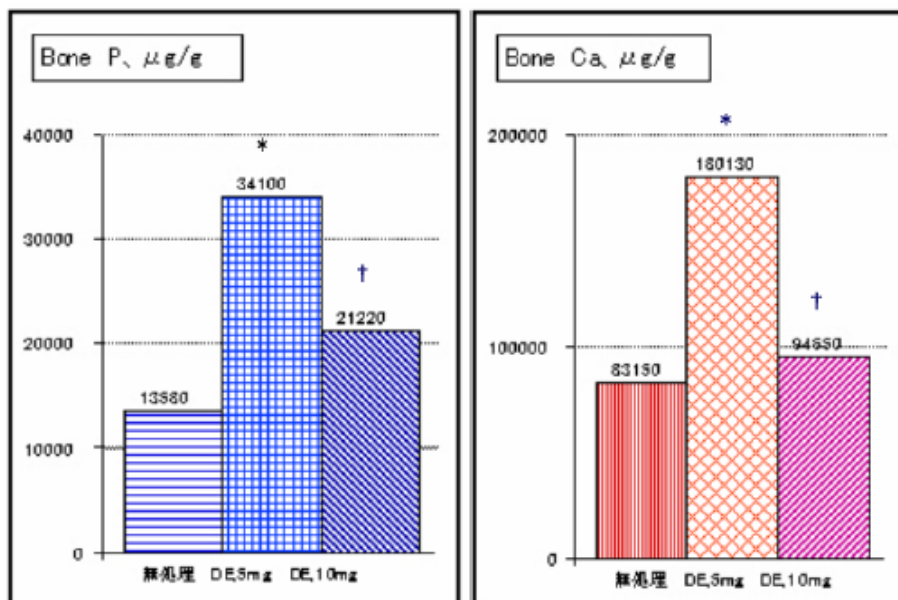


Fig. 3 Effects of disodium Etidronate on phosphorus and calcium contents in femur.

Contents of phosphorus and calcium (mean \pm SD, n=3) from femur of rats at age 12 weeks showing increase with dose of Disodium Etidronate(DE). Phosphrus($\mu\text{g/g}$): Cotrol; 13580 \pm 1420, DE5mg; 34100 \pm 850, DE10mg; 21220 \pm 970. Asterisk indicates p<0.001, dagger p<0.001 vs control. Calcium($\mu\text{g/g}$): Cotrol; 83150 \pm 5270, DE5mg; 180130 \pm 14590, DE10mg; 94650 \pm 990. Asterisk indicates p<0.001, dagger p<0.05 vs control.

3. 4 エチドロネート投与ラット尿中のリンとカルシウム

Fig. 4はエチドロネート投与後のラット尿中のリンとカルシウムの含量を示す。正常ラット尿に比べてエチドロネート投与ラット尿中のリンは急激にまた非常に減少していることが分る。また、エチドロネート投与ラット尿ではカルシウム量も著しく減少していた。

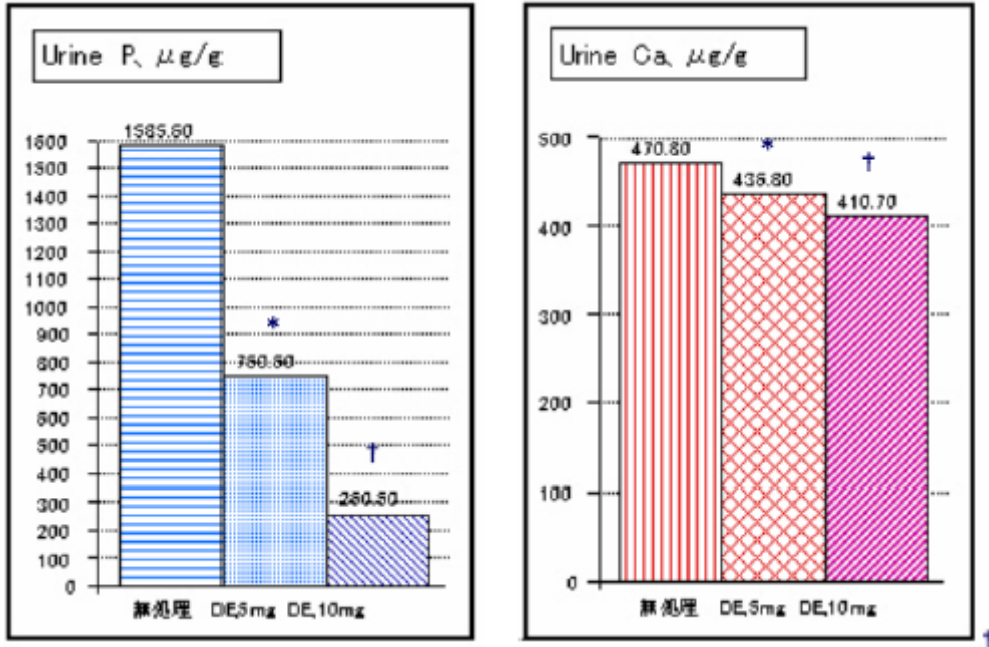


Fig. 4 Effects of disodium Etidronate on phosphorus and calcium contents in Urine.

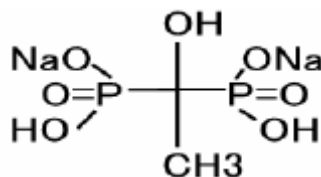
Contents of phosphorus and calcium (mean±SD, n=3) from urine of rats at age 12 weeks showing decrease with dose of Disodium Etidronate(DE). Phosphorus(μ g/g): Cotrol; 1585±320, DE5mg; 750 ±110, DE10mg; 260±96. Asterisk indicates p<0.001, dagger p<0.001 vs control. Calcium(μ g/g): Cotrol; 470±85, DE5mg; 436±60, DE10mg; 410±55. Asterisk indicates p<0.05, dagger p<0.01 vs control.

4 まとめ

骨形成には骨系細胞の骨芽細胞、ライニングセルおよび骨細胞と造血系細胞の破骨細胞とが関与している。破骨細胞は皮質骨や海面骨の表面にあり、また皮質骨の内部にも存在している。破骨細胞の役割は骨を吸収することである。破骨細胞による骨吸収は、細胞膜の波状縁から分泌される H⁺イオンと蛋白質分解酵素による骨ミネラルの溶解と骨基質の分解とによって起こる⁴⁾。

Fig. 5は Fischer344 ラット大腿骨の正常骨、ラット乳癌細胞移植骨の組織像とその X 線像を示す。破骨細胞による骨破壊が明瞭に現れている。

現在までに解明されているビスフォスフォネートの骨吸収抑制機構は次の通りである⁵⁾。エチドロン酸二ナトリウムは次の化学式をもつビスフォスフォネート化合物である。



ビスフォスフォネートは、ピロリン酸と同様に骨ミネラルの主成分であるカルシウムアパタイトに対して強い親和性を有し、選択的に骨に作用する。

ビスフォスフォネートは、ビスフォスフォネート沈着骨が破骨細胞に侵食溶解されたとき、またはビスフォスフォネートが破骨細胞と骨の接触部位に割り込んで沈着したときに破骨細胞に直接作用し骨吸収を抑制する。

本実験ではエチドロロン酸二ナトリウム（エチドロネート）をラットに腹腔投与し、肝臓、骨および尿中のリンとカルシウム量をPIXEにより分析した。得られた結果は、エチドロネート投与によって肝臓におけるリンとカルシウムの減少、リンとカルシウムの尿排泄の減少および骨におけるリンとカルシウムの増加が認められた。この現象は、エチドロネートが骨形成を促進し、このために肝臓からはリンとカルシウムが動員され、一方尿へのリンとカルシウムの排泄は抑えられた、という相互関係を示している。

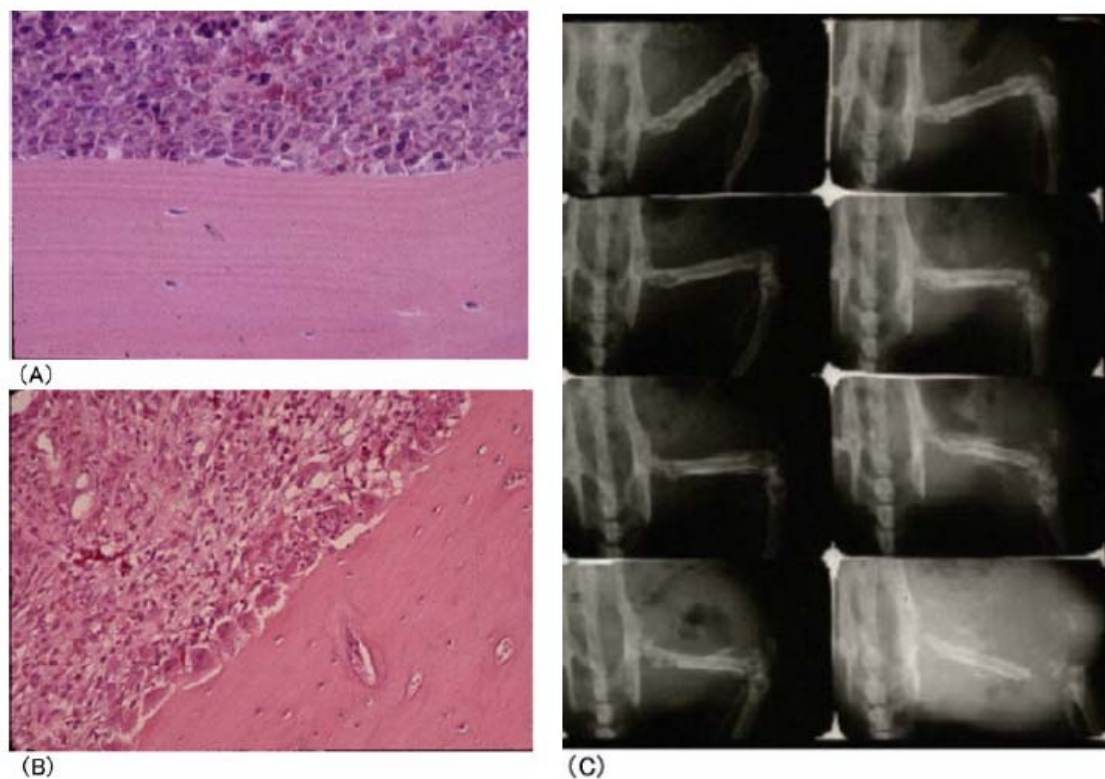


Fig. 5 (A): Rat femur normal bone with osteoblastic and osteoclastic activity.
 (B): Changes seen 1 week after the inoculation of a tumor cell suspension of mammary cancer into a rat's bone marrow. Osteoblast proliferation and new bone formation can be seen as well as osteoclast proliferation with bone destruction.
 (C): Anteroposterior roentgenogram of the femur of Fischer strain rats after the inoculation of a tumor cell suspension of mammary cancer into a rat's bone marrow.

謝辞

本実験を行うに当たり、日本アイソトープ協会の研究助成に感謝申し上げます。共同利用施設の使用に当たり、PIXE測定、サイクロトロンと実験装置の維持と管理および放射線管理において、日本アイソトープ協会滝沢研究所仁科記念サイクロトロンセンターの職員の方に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. T. Storm, G. Kollerup, G. Thamsborg, H. Genant, and O. H. Sorensen; Five Years of Clinical Experience with Intermittent Cyclical Etidronate for Postmenopausal Osteoporosis. *The J. Rheumatology*, 23, 1560-1564, 1996
2. P. D. Miller, N. B. Watt, A. A. Licata et al.; Cyclical Etidronate in the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis: Efficacy and Safety after Seven Years of Treatment. *The American J. of medicine*, 103, 468-476, 1997
3. ニツ川章二、畠山 智、斉藤義弘、世良耕一郎、「PIXE 試料調整法の検討」
NMCC 共同利用研究成果報文集 1、70-81、1993
4. 松本俊夫編著、新・分子骨代謝学と骨粗鬆症、93-102、株式会社メディカルビュー社、東京
2001年5月
5. 松本俊夫編著、新・分子骨代謝学と骨粗鬆症、145-160、株式会社メディカルビュー社、東京
2001年5月