

ラットにおけるアレンドロネート経口投与時のミネラルウォーターによる  
吸収率への影響

赤木祐貴,\* 阪上倫行, 米山栄司, 青山隆夫

## Influence of Mineral Water on Absorption of Oral Alendronate in Rats

Yuuki AKAGI,\* Tomoyuki SAKAUE, Eiji YONEYAMA, and Takao AOYAMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda 278-8510, Japan

(Received April 28, 2010; Accepted February 3, 2011; Published online February 8, 2011)

Alendronate, an oral bisphosphonate (e.g., Fosamax®), is effective in the treatment of osteoporosis, and the Fosamax® package insert advises that the bioavailability is reduced when taken with mineral water containing high levels of metal cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , etc.). However, standards regarding the water used when taking alendronate are unclear. In this study, the influence of mineral water on the absorption of oral alendronate was investigated based on urinary excretion of its unchanged form in rats. Alendronate was diluted in each water sample and administered orally (0.7 mg/kg) to male Wistar rats after 24-hour fast. Urine samples were collected until 24 h after dosing. Urine samples were alkalized, and alendronate in urine was precipitated as a calcium salt, followed by loading on an anion exchange cartridge. Eluted alendronate was derivatized with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chloride and determined by HPLC with fluorescent detection. Cumulative urinary excretion recoveries of alendronate were calculated from the amounts of urinary excretion. Alendronate was rapidly excreted in the first 6 h, and similar elimination rate constants were seen (from 0.28 to 0.45  $\text{h}^{-1/2}$ ) among the water samples. Cumulative urinary excretion recoveries with tap water, evian®, and 100% deep ocean water were  $0.98 \pm 0.17\%$ ,  $0.80 \pm 0.18\%$  and  $1.01 \pm 0.16\%$  (mean  $\pm$  S.E.,  $n=4$ ). Those with Contrex® ( $0.33 \pm 0.07\%$ ) were significantly lower when compared with ultrapure water ( $1.56 \pm 0.35\%$ ,  $p < 0.01$ ). These findings suggest that the absorption of alendronate decreases based on the calcium concentration of mineral water. In conclusion, mineral water containing high levels of calcium is not recommended when alendronate is taken.

**Key words**—alendronate; mineral water; drug interaction; urinary excretion; rat; absorption

## 緒 言

骨粗鬆症の治療薬の1つであるビスホスホネート製剤は、P-C-P骨格を有するピロリン酸塩の誘導体である。<sup>1)</sup> 骨のハイドロキシアパタイトに特異的親和性を持ち、骨吸収を抑制し、リモデリングを是正する。第二世代のビスホスホネートであるアレンドロネートナトリウム(以下、アレンドロネートと記す)は、有効性、安全性に関するエビデンスが豊富であり、さらに非椎体骨折や大腿骨頸部骨折に対する予防効果が立証されている。<sup>2-4)</sup> 近年、アレンドロネートにおける連日投与と間欠多量投与との同等性が確認されたことから、<sup>5)</sup> 週1回内服製剤(35 mg錠)が処方可能となっている。

アレンドロネートは、消化管からの吸収率が1-2

%と極めて低い。<sup>6)</sup> さらに吸収時に腸管に食物等が存在するとさらに吸収率が低下してほとんど吸収されないことが報告されているため、医薬品添付文書には、「起床時に内服し、内服後30分間は飲食(水を除く)並びに他の薬剤の経口摂取も避けること」と記載されている。また、速やかに胃内へと到達させて食道及び局所への副作用を低下させるために、コップ1杯の水で服用することが推奨されている。一方、アレンドロネートを始めとするビスホスホネート製剤は二価金属イオンとコンプレックスを形成するという特徴を有しており、<sup>7)</sup>  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  などの金属カチオンの含量の高いミネラルウォーターと一緒に服用すると、キレート形成により吸収率が低下する恐れがある。しかしながら、ミネラルウォーターの銘柄間における硬度の違いがビスホスホネート製剤の腸管からの吸収にどのような影響を及ぼすかについてはいまだ検討されておらず、飲料水につ

いての基準は明確ではない。

本研究では、アレンドロネートをミネラルウォーターで服用した場合の吸収に及ぼす影響を、ラットを用いて検討した。なお、アレンドロネートは生体内に吸収されたのちに大部分が速やかに骨に分布後、長時間滞留し骨吸収抑制作用を示すために、アレンドロネートの血漿中濃度は急速に低下し、大半は定量限界 (11.5 ng/ml) 未満である。<sup>8)</sup> 一方、残余のアレンドロネートは体内で代謝を受けずにすべて未変化体として速やかに尿中に排泄されるため、<sup>9)</sup> 投与後の全尿を 24 時間まで採取し、その濃度を測定して累積尿中排泄率を求めることで吸収を評価した。また、シグマイナスプロット法によりアレンドロネートの消失速度定数を求め、消失速度への影響を検討した。

## 方 法

**1. 試薬** Alendronate sodium trihydrate (Lot. No. 018K4719) と pamidronate disodium (内標準物質, Lot. No. 017K47132) は SIGMA 社製を用いた。アセトニトリル (特級), メタノール (特級) は関東化学社製, クエン酸 (特級) とピロリン酸ナトリウム (特級) は和光純薬社製, アレンドロネートの誘導体化剤としての Fmoc chloride (>99%, Lot. No. 1346480 42208026) は Fluka 社製を用いた。その他の試薬はすべて特級を使用した。固相抽出法には OASIS®WAX カートリッジ (Waters 社製) を用いた。

**2. 被験飲料水** 実験に用いたミネラルウォーターは、evian® (伊藤園・伊藤忠ミネラルウォーターズ), 100% 深層水 (サントリーフーズ), Contrex® (サントリーフーズ) の 3 種類とし、その他に水道水での検討も行った (Table 1)。対照として、精製水 (硬度 0 mg/l) を用いた。

**3. 実験動物** 実験開始の 24 時間前から絶食させた 8-9 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、エーテル麻酔下で膀胱にカニューレ (ポリエチレンチューブ, SP136, 夏目製作所) を挿入した。ラットは各飲料水群に無作為に分け、各群について 4 匹ずつ用いた。なお、本研究は、東京理科大学の動物実験委員会にて承認されたプロトコールに基づき行われた。

**4. 薬物投与** ラットへのアレンドロネートの

Table 1. Hardness, Ca and Mg Concentration of Water

Water	Hardness (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)
Tap water	65	14.0	7.5
evian®	304	80.0	26.0
100% deep ocean water	700	22.0	160.2
Contrex®	1468	468.0	74.5

The hardness, Ca and Mg concentration of tap water are measured by EDTA chelate method. Data of evian® are from "Itoen Itochu Mineral Waters Co., Ltd." and data of Contrex® and 100% deep ocean water are from "Suntoryfoods Co., Ltd."

投与量は、ヒトにおける週 1 回内服製剤 (35 mg 錠) の成人 1 回服用量をヒト体重 50 kg で除し、0.7 mg/kg とした。アレンドロネートの原末を 0.2 M クエン酸ナトリウムで溶解した溶液を、各飲料水で 20 倍に希釈して 0.2 mg/ml アレンドロネート溶液を調製した。この濃度は、週 1 回内服製剤 (35 mg 錠) を約 180 ml の飲料水で服用した場合を想定した。膀胱カニューレを挿入した後、麻酔から完全に覚醒して尿量を確認してから (約 2 時間後)、アレンドロネート溶液をゾンデを用いて経口投与した (液量 3.5 ml/kg)。

## 5. 採尿及び測定試料の調製

**5-1. 採尿** カニューレより尿を経時的に採取して尿量を測定した後、測定までの間 -30°C で保存した。採尿間隔は 0-3, 3-6, 6-9, 9-12, 12-24 時間後とした。

**5-2. 前処理試料の調製** 尿試料を室温で解凍し、400 µg/ml パミドロネート溶液 (内標準物質) 10 µl, 0.1 M リン酸二水素カリウム 100 µl と 0.1 M 塩化カルシウム 100 µl を添加して混和した。さらに、1 M 水酸化ナトリウム 200 µl を加えてアルカリ条件下でアレンドロネート及びパミドロネートをリン酸カルシウムと共沈させたのち、遠心分離 (2000 g, 5 分) した。得られた沈殿を 0.2 M 酢酸 500 µl で溶解し、精製水 5 ml で希釈した。同様の共沈操作を 2 回繰り返す。最終的に清浄化された沈殿を 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 1 ml で溶解したのち、精製水 2 ml で希釈して前処理試料とした。<sup>10,11)</sup>

**5-3. 固相抽出** 精製水 1 ml で前洗浄した OASIS®WAX カートリッジに、前処理試料をロードした。精製水 1 ml で洗浄したのち、保持されているアレンドロネートを 0.2 M クエン酸ナトリウム

1 ml で抽出し、試料溶液とした。ロードの流速は 1.0 ml/min とした。

**5-4. 測定試料の調製** 抽出した試料溶液 270  $\mu$ l に、1 M 炭酸塩緩衝液 (pH 11.9) 100  $\mu$ l を添加後、Fmoc chloride 溶液 100  $\mu$ l (1 mg/アセトニトリル 4 ml) によってアレンドロネートを蛍光誘導体化した。Fmoc chloride 溶液を添加してから正確に 3 分後に、1 M クエン酸 100  $\mu$ l を加えて pH を調整することで誘導体化反応を停止し、その 20  $\mu$ l を HPLC に注入した。

**6. HPLC 分析** アレンドロネートの尿中濃度の測定は Ptáček らの手法<sup>10)</sup>に準じた。分析に用いた HPLC 装置は、脱気装置 (SSC-3215, センシユー科学), 送液ポンプ (SSC-3461, センシユー科学), ピークデータ処理装置 (Chromatocorder 21, システムインスツルメンツ), カラム恒温槽 (SSC-2120, センシユー科学) によって構成され、ODS カラム (C18, 4.6 $\phi$ ×250 mm, PEGASIL ODS SP100) を用いて分離した。移動相はアセトニトリル:メタノール:25 mM クエン酸, 25 mM ピロリン酸ナトリウム水溶液 (23:16:61, v/v) の混合溶液を用い、カラム温度 40°C, 流速 0.8 ml/min で送液した。アレンドロネートとパミドロネートのピークが検出された後、移動相をアセトニトリル:メタノール:水 (13:57:30, v/v) の混合溶液に交換して約 20 min 送液して尿中夾雑物を除去し、その後、再び最初の移動相に交換することにより、測定時間を短縮した。検出には、蛍光検出器 (S-3370, 相馬光学) を用い、励起波長, 蛍光波長はそれぞれ 260 nm, 310 nm に設定した。

## 7. データ解析

**7-1. 尿中への排泄** 各時間におけるアレンドロネート尿中排泄量を投与量で除して尿中排泄率 (%) を算出し、経時的に累積尿中排泄率 (%) を求めた。また、1 時間当たりの尿中排泄率から尿中排泄速度 (%/h) を求めた。

**7-2. 消失速度定数の算出** X 軸に時間 (h), Y 軸に尿中排泄された累積尿中排泄量 (未変化体総量) と各時間までに排泄された累積排泄量 (未変化体累積量) との差の対数をプロットした (シグママイナスプロット法)。このグラフの傾き ( $-k_e$ ) から消失速度定数 ( $k_e$ ) を求めた。

**7-3. 統計処理** 精製水, 水道水, 及び各種ミ

ネラルウォーターの群間比較には Bonferroni 検定を用い、 $p < 0.05$  のとき有意差ありとした。精製水を対照としたときの水道水群又は各種ミネラルウォーター群 (計 3 群), 及び水道水を対照としたときの各種ミネラルウォーター群 (計 3 群) の, 計 7 回の比較を行った。

## 結 果

各飲料水においてアレンドロネートは投与後 6 時間までに急速に尿中に排泄され、12-24 時間後の尿中排泄速度はほぼ 0%/h となった (Fig. 1)。特に 0-3 時間までの尿中排泄速度は、精製水や水道水と比較して、evian®や Contrex®では低下する傾向がみられた。

アレンドロネートを各飲料水を用いて投与したときの累積尿中排泄率の経時的推移を Fig. 2 に示した。精製水で投与したときの平均の 24 時間アレンドロネート累積尿中排泄率は投与量の  $1.56 \pm 0.35\%$  ( $n=4$ , mean  $\pm$  S.E.) であった。水道水, evian®, 100% 深層水及び Contrex®の平均累積尿中排泄率は精製水と比較して低下傾向を示したが、Contrex®においてのみ有意差がみられた (Table 2,  $p < 0.01$ )。水道水と比較した場合、evian®及び Contrex®の平均累積尿中排泄率は低値を示したが、有意な差は認められなかった。また、各飲料水における Ca 濃度と平均の 24 時間累積尿中排泄率との間には負の相関性が認められた [ $r = -0.831$ , Fig. 3(A)] が、Mg 濃度との間には相関性はみられなかった [ $r = -0.311$ , Fig. 3(B)]。

各飲料水における、シグママイナスプロットによる直線の傾きから、アレンドロネートの消失速度定数 ( $k_e$ ) を求めたところ、すべての飲料水において平均  $0.28-0.45 \text{ h}^{-1/2}$  となり、ほぼ同様な値を示した (Fig. 4)。

## 考 察

アレンドロネートを服用する際に水以外の飲み物、食物及び他の薬剤と一緒に服用すると、吸収を抑制する恐れがあることはよく知られており、コップ 1 杯の水で起床時に服用することが勧められている。服用時に用いる水についても、Ca, Mg などの含量の特に高いミネラルウォーターを用いると、キレート形成などにより吸収が低下することが示唆

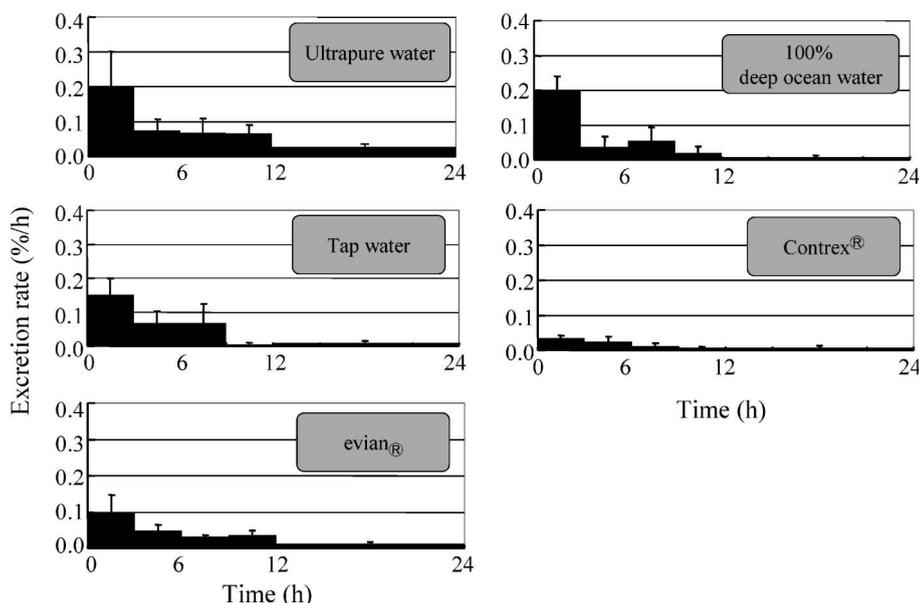


Fig. 1. Mean Urinary Alendronate Excretion Rate over Each Collection Interval for 24 h after Oral Administration of Alendronate  $n=4$ , mean  $\pm$  S.E.

Table 2. Effect of Mineral Waters on the Oral Absorption of Alendronate in Rats

Waters	Elimination rate constant $k_e$ ( $h^{-1/2}$ )	Cumulative urinary excretion recovery (%)
Ultrapure water	$0.33 \pm 0.10$	$1.56 \pm 0.35$
Tap water	$0.42 \pm 0.11$	$0.98 \pm 0.17$
evian®	$0.28 \pm 0.04$	$0.80 \pm 0.18$
100% deep ocean water	$0.45 \pm 0.11$	$1.01 \pm 0.16$
Contrex®	$0.30 \pm 0.03$	$0.33 \pm 0.07$

$n=4$ , mean  $\pm$  S.E.; \*  $p < 0.01$ ; N.S., Not Significant.

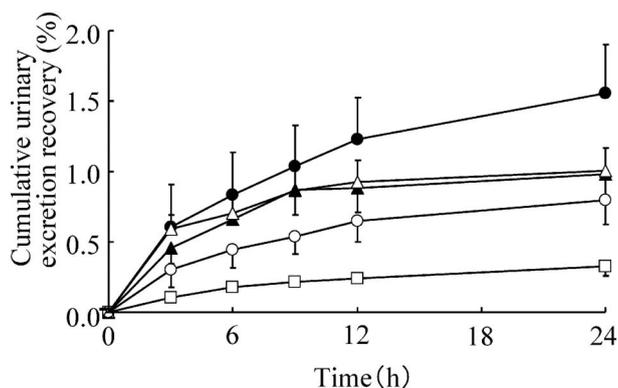


Fig. 2. Cumulative Urinary Excretion Recovery of Alendronate

Alendronate was administered with ultrapure water (●), tap water (▲), evian® (○), 100% deep ocean water (△) and Contrex® (□) in rats.  $n=4$ , mean  $\pm$  S.E.

されているが、<sup>12)</sup> 吸収率への具体的な影響は不明であった。これらのことより、本研究では Ca, Mg などの成分含量の異なる 3 種類のミネラルウォーターである evian®, 100% 深層水, Contrex® 及び水道水を用いて、ラットへの投与試験を行った。なお、アレンドロネートは腎排泄型の薬剤であり、そのほとんどが 24 時間以内に未変化体として尿中に排泄される。<sup>9)</sup> また、シグマイナスプロット法を用いて消失速度定数 ( $k_e$ ) を求めたところ、飲料水間ではほぼ等しい値となり (Fig. 4 and Table 2), 吸収されたアレンドロネートの消失速度は各飲料水間でほとんど変わらないことが示唆された。このことから、アレンドロネートの経口投与において、平均の 24 時間累積尿中排泄率は吸収の指標として用いることが可能であると考えられた。また、ヒトにおけるア

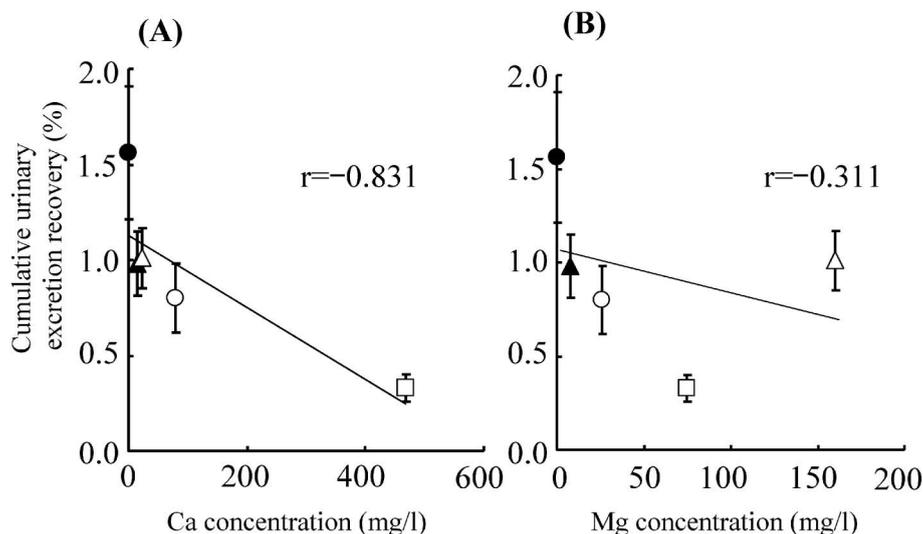


Fig. 3. Relationship of Ca (A) or Mg (B) Concentration of Water on Urinary Excretion

Alendronate was orally administered with ultrapure water (●), tap water (▲), evian®, 100% deep ocean water (△), and Contrex® (□) in rats.  $n=4$ , mean  $\pm$  S.E.

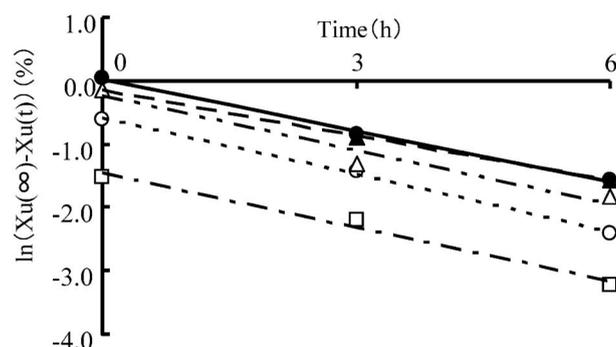


Fig. 4. Sigma Minus Plots of Alendronate

Alendronate was administered with ultrapure water (●, —), tap water (▲, - - -), evian® (○, ····), 100% deep ocean water (△, — · —), and Contrex® (□, - - - -) in rats.  $n=4$ .

レンドロネートの累積尿中排泄率は1%前後との報告があり,<sup>13)</sup> 本検討でのラットにおける累積尿中排泄率と同程度であることから、ラットでの薬物動態はヒトの場合を反映すると推察された。

3種類ミネラルウォーターである evian®, 100% 深層水、Contrex®及び水道水を用いてラットにアレンドロネートを経口投与したところ、平均の24時間累積尿中排泄率はすべての飲料水において精製水と比較して低下傾向を示した (Fig. 2 and Table 2)。特に Contrex®においては有意な低下がみられ ( $p < 0.01$ )、影響が大きかった。水道水と比較した場合は、evian®及び Contrex®の平均の24時間累積尿中排泄率は低かったが、有意差は認められなかった。しかし、Contrex®で投与した際の累積尿中排

泄率は、全例とも水道水で投与した場合より低かったこと、及び临床上是用いられないと考えられる精製水を除外し、水道水を対照として3種類の各ミネラルウォーター群における平均の24時間累積尿中排泄率を比較したところ、Contrex®を用いた場合は有意に低値であったことから ( $p < 0.05$ )、Contrex®で服用するとアレンドロネートの吸収率は低下するものと考えられた。

ところで、水道水は採取する場所によってCa、Mg濃度の組成が大幅に異なる。本研究では千葉県内の住宅の蛇口から水道水を採取し、今回用いた水道水の硬度は65 mg/l、Ca濃度は14.0 mg/lであった (Table 1)。日本全国5367カ所における水道水質調査 (給水栓水) によると、298カ所 (5.6%) の水道水は硬度100 mg/l以上であり、<sup>14)</sup> 200 mg/l以上を示した箇所も散見されることから、水道水を一括りにすることは難しい。しかし、わが国の水道水の多くは硬度30–80 mg/lであること、<sup>14)</sup> Ca濃度は3–20 mg/l程度、Mg濃度は1–8 mg/l程度であると考えられていることから、<sup>15)</sup> 本検討では平均的な水道水を用いたと考えても差し支えないと思われる。

100%深層水で投与したときの累積尿中排泄率の経時的推移は、水道水とほぼ同様の挙動を示した (Fig. 2)。100%深層水の組成を水道水と比較すると、Ca濃度はほぼ同程度であるが、Mg濃度は160 mg/lであり非常に高い (Table 1)。さらに、各飲料水のCa濃度と平均の24時間累積尿中排泄率と

の間には負の相関性が認められたが、Mg 濃度においては相関性がみられなかった (Fig. 3)。したがって、主としてミネラルウォーター中の Ca がアレンドロネートの吸収に影響を及ぼし、Mg は少なくともミネラルウォーターに含まれる量ではあまり関与しないことが示唆された。類薬であるパミドロネート注射液 (15 mg/vial) の配合変化試験において、Ca 含有注射剤 (80 mg) と混合すると白濁するが、Mg 含有注射剤 (250 mg) と混合しても変化がみられないことが確認されており、<sup>16)</sup> ビスホスホネート製剤において、Ca は Mg よりもキレートを形成し易いと推察される。

アレンドロネートを服用する際に用いる飲料水の Ca, Mg 濃度に着目した研究は見当たらないが、ブラックコーヒーやオレンジジュースで服用したときに、水と比較して吸収が約 60% 低下したとの報告がある。<sup>17)</sup> この報告ではこれらの飲料の Ca 含有量には触れていないが、ブラックコーヒーの平均的な Ca 濃度は約 220 mg/l、オレンジジュースでは約 90 mg/l であり、<sup>18)</sup> Ca が吸収低下の大きな要因であった可能性が考えられる。

アレンドロネートの経口製剤は、骨粗鬆症に用いられるため、栄養指導の一環として十分量の Ca を補給するよう指導されることが多い。閉経後と老年期における骨量の減少を抑えるためには 800 mg/日以上 of Ca が必要である。<sup>19)</sup> そのために、Ca を多く含む食品を摂取したり、医薬品や栄養補助食品で補給したりすることが考えられ、Ca 濃度が高いミネラルウォーターを飲用することも想定される。<sup>20)</sup> したがって、アレンドロネート服用時の飲料水にも配慮する必要がある。吸収率が最も高かったのは精製水を用いた場合であった。しかし精製水は実験用の水であり、入手のし易さなども考慮すると精製水での服用は臨床上考え難く、実際には平均的な硬度、Ca 濃度の水道水で服用することになると思われる。しかし、Contrex<sup>®</sup>を用いたときの累積尿中排泄率は、精製水を用いたときよりも明らかに低かったことから、Ca 濃度が高い硬水系のミネラルウォーター (Contrex<sup>®</sup>など) での服用は避けた方が望ましいと推察される。

結論として、ビスホスホネート製剤であるアレンドロネート服用時にミネラルウォーターを用いると、Ca 濃度依存的に吸収が低下することが示唆され、

Ca を高濃度に含有する硬水系ミネラルウォーターでの服用は避けることが望ましいと考えられた。

## REFERENCES

- 1) Lin J. H., *Bone*, **18**, 75–85 (1996).
- 2) Bone H. G., Hosking D., Devogelaer J. P., Tucci J. R., Emkey R. D., Tonino R. P., Rodriguez-Portales J. A., Downs R. W., Gupta J., Santora A. C., Liberman U. A., *N. Engl. J. Med.*, **350**, 1189–1199 (2004).
- 3) Wehren L. E., Hosking D., Hochberg M. C., *Curr. Med. Res. Opin.*, **20**, 525–531 (2004).
- 4) Papapoulos S. E., Quandt S. A., Liberman U. A., Hochberg M. C., Thompson D. E., *Osteoporos. Int.*, **16**, 468–474 (2005).
- 5) Uchida S., Taniguchi T., Shimizu T., Kakikawa T., Okuyama K., Okaniwa M., Arizono H., Nagata K., Santora A. C., Shiraki M., Fukunaga M., Tomomitsu T., Ohashi Y., Nakamura T., *J. Bone Miner. Metab.*, **23**, 382–388 (2005).
- 6) Naruse S., Hisaka A., Watanabe H., Taniguchi T., Kato Y., Tani K., Arizono H., *Rinsho Iyaku*, **20**, 1227–1234 (2004).
- 7) Kontturi M., Peräniemi S., Vepsäläinen J. J., Ahlgrén M., *Polyhedron*, **24**, 305–309 (2005).
- 8) Nakashima M., Kanamaru M., Takenaga N., *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **26**, 475–489 (1995).
- 9) Lin J. H., Duggan D. E., Chen I. W., Ellsworth R. L., *Drug Metab. Dispos.*, **19**, 926–932 (1991).
- 10) Ptáček P., Klíma J., Macek J., *J. Chromatogr. B*, **767**, 111–116 (2002).
- 11) Kang H. S., Hwang S. J., Park J. S., Kim C. K., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **29**, 1589–1600 (2006).
- 12) Bonalon<sup>®</sup> Tablet 35 mg package insert, 5th ed., Teijin Pharma Limited., 2010.
- 13) Yun M. H., Woo J. S., Kwon K. I., *Arch. Pharm. Res.*, **29**, 328–332 (2006).
- 14) Database of Water Quality of Aqueduct: <http://www.jwwa.or.jp/mizu/list.html#NEN3>, cited 14 September, 2010.
- 15) Kohri K., Takada M., Katoh Y., Kurita T., *Report of the Environmental Science Research Institute, Kinki University*, **18**, 47–53 (1990).
- 16) Aredia<sup>®</sup> Interviewform, 2nd ed., Novartis

- Pharma K.K., 2004.
- 17) Gertz B. J., Holland S. D., Kline W. F., Matuszewski B. K., Freeman A., Quan H., Lassetter K. C., Mucklow J. C, Porras A. G., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **58**, 288–298 (1995).
  - 18) Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, “Standard Tables of Food Composition in Japan,” 5th Revised and Enlarged Ed., 2005.
  - 19) Kawamichi N., Takahashi K., *J. Jpn. Pharm. Assoc.*, **58**, 753–759 (2006).
  - 20) Morr S., Cuartas E., Alwattar B., Lane J. M., *HSS J.*, **2**, 130–135 (2006).