

神戸学院大学大学院薬学研究科学位論文

液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計を用いた
抗がん剤の生体中濃度測定法の構築と
臨床薬物動態学的研究

2019 年 1 月

入江 慶

目 次

目 次	1
略語一覧	7
序 論	9
本 論	11
第一章 抗がん剤投与中におけるイリノテカン及び活性代謝物 SN-38 の汗中 分泌による職業暴露のリスク評価	11
1-1. 緒言	11
1-2. 方法	12
1-2-1. CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度測定の対象患者	12
1-2-2. 汗試料の採取	12
1-2-3. CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度測定法	12
1-3. 結果	13
1-3-1. CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度測定の対象患者背景	13
1-3-2. CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度測定法	14
1-3-3. CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度	15
1-4. 考察	16
1-5. 結論	17
第二章 非小細胞肺癌患者における Dried blood spot(DBS)法を用いた EGFR-TKI の血中濃度測定法の構築	18
2-1. 諸言	18
2-2. 方法	20
2-2-1. DBS 法による EGFR-TKI の測定試薬	20
2-2-2. EGFR-TKI 測定の LC-MS/MS の条件	20
2-2-3. ゲフィチニブの標準溶液	20

2-2-4.	ゲフィチニブの検量線試料及び QC 試料の調製	20
2-2-5.	DBS 法によるゲフィチニブ測定の分析バリデーション	21
2-2-5-1.	ゲフィチニブの検量線	21
2-2-5-2.	DBS 法によるゲフィチニブ測定の精度及び真度	21
2-2-5-3.	ゲフィチニブ測定における選択性及びキャリーオーバー	21
2-2-5-4.	DBS 法によるゲフィチニブ測定における回収率及びマトリックス効果	22
2-2-5-5.	DBS 中におけるゲフィチニブの安定性	22
2-2-5-6.	ろ紙へ滴下する血液量の影響	22
2-2-7.	DBS 法による NSCLC 患者の血中ゲフィチニブ濃度の測定	22
2-2-8.	DBS 中濃度と血漿中濃度の比較	23
2-2-9.	エルロチニブ及びアファチニブへの DBS 法の応用	23
2-3.	結果	24
2-3-1.	ゲフィチニブ測定の LC-MS/MS 条件	24
2-3-2.	DBS 法によるゲフィチニブ測定の分析バリデーション	25
2-3-2-1.	ゲフィチニブ測定における選択性及びキャリーオーバー	25
2-3-2-2.	ゲフィチニブの検量線	25
2-3-2-3.	DBS 法によるゲフィチニブ測定の精度及び真度	25
2-3-2-4.	DBS 法によるゲフィチニブ測定の回収率及びマトリックス効果	25
2-3-2-5.	DBS 中におけるゲフィチニブの安定性	25
2-3-2-6.	ろ紙へ滴下する血液量の影響	27
2-3-3.	ゲフィチニブの血漿中濃度測定法のバリデーション	27
2-3-4.	DBS 法による NSCLC 患者の全血中ゲフィチニブ濃度と血漿中濃度の関連	28
2-3-5.	エルロチニブ及びアファチニブへの DBS 法の応用	31
2-3-5-1.	エルロチニブ及びアファチニブ測定の分析バリデーション	31
2-3-5-2.	DBS 法による NSCLC 患者における血中エルロチニブ及びアファチニブ濃度測定	31

2-4. 考察	37
2-5. 結論	38
第三章 非小細胞肺癌患者におけるニボルマブ血中濃度測定法の構築.....	39
3-1. 諸言	39
3-2. 方法	42
3-2-1. ニボルマブ測定 of LC-MS/MS の条件	42
3-2-2. In Silico トリプシン消化シミュレーション	42
3-2-3. ニボルマブ測定 of 標準溶液	42
3-2-4. 血漿中の IgG 精製	43
3-2-5. トリプシン消化及び固相抽出	43
3-2-6. ニボルマブ測定 of 分析バリデーション	43
3-2-6-1. ニボルマブ of 検量線	43
3-2-6-2. ニボルマブ測定 of 精度及び真度	43
3-2-6-3. ニボルマブ測定 of 選択性及びキャリーオーバー	44
3-2-6-4. ニボルマブ測定 of 回収率及びマトリックス効果	44
3-2-6-5. ニボルマブ of 安定性	44
3-2-7. NSCLC 患者 of 血中ニボルマブ濃度 of 測定	44
3-2-8. NSCLC 患者 of ニボルマブ of 薬物動態解析	45
3-2-9. 最小必要採血ポイント数 of 検討	45
3-2-10. ニボルマブ投与後にアファチニブを投与した患者 of ニボルマブ薬物動態 of 検討	45
3-2-11. 胸水、腹水を有する NSCLC 患者 of ニボルマブ薬物動態 of 検討	46
3-2-12. 間質性肺炎を発現した患者 of ニボルマブ薬物動態 of 検討	46
3-2-13. ニボルマブ長期奏効患者 of ニボルマブ薬物動態 of 検討	46
3-2-14. 別の免疫チェックポイント阻害薬ペンブロリズマブ of 血中濃度測定への応用	46
3-3. 結果	47

3-3-1. ニボルマブのサロゲートペプチド	47
3-3-2. ニボルマブ測定 of LC-MS/MS の条件	48
3-3-3. ニボルマブの分析バリデーション	50
3-3-3-1. ニボルマブ測定 of 選択性とキャリーオーバー	50
3-3-3-2. ニボルマブ of 検量線	50
3-3-3-3. ニボルマブ測定 of 精度及び真度	50
3-3-3-4. ニボルマブ測定 of 回収率とマトリックス効果	50
3-3-3-5. ニボルマブ of 安定性	50
3-3-4. NSCLC 患者 of 血中ニボルマブ濃度測定	52
3-3-5. ニボルマブ of 薬物動態解析	52
3-3-6. 最小必要採血ポイント数 of 検討	55
3-3-7. ニボルマブ投与後にアファチニブを投与した患者 of 検 ニボルマブ薬物動態 of 検討	57
3-3-8. 胸水、腹水を有する NSCLC 患者 of ニボルマブ薬物動態 of 検討	58
3-3-9. 間質性肺炎を発現した患者 of ニボルマブ薬物動態 of 検討 ..	58
3-3-10. ニボルマブ長期奏効患者 of ニボルマブ薬物動態 of 検討 ...	60
3-3-11. 別の免疫チェックポイント阻害薬ペンブロリズマブ of 血中濃度 測定への応用	62
3-4. 考察	64
3-5. 結論	66

第四章 がん性髄膜炎患者 of ニボルマブ髄液中濃度測定法 of 構築 67

4-1. 諸言	67
4-2. 方法	68
4-2-1. ニボルマブ測定 of 試薬	68
4-2-2. ニボルマブ測定 of LC-MS/MS の条件	68
4-2-3. ニボルマブ of 標準溶液	68

4-2-4.	オシメルチニブの検量線試料	68
4-2-5.	オシメルチニブの QC 試料	69
4-2-6.	オシメルチニブ測定における試料の調製	69
4-2-7.	オシメルチニブ測定の分析バリデーション	69
4-2-7-1.	オシメルチニブの検量線	69
4-2-7-2.	オシメルチニブ測定の精度及び真度	69
4-2-7-3.	オシメルチニブ測定における選択性及びキャリーオーバー ..	69
4-2-7-4.	オシメルチニブ測定における回収率及びマトリックス効果 ..	70
4-2-7-5.	オシメルチニブの安定性	70
4-2-7-6.	オシメルチニブ測定における代替試料の検討	70
4-2-8	オシメルチニブの保管容器への吸着の検討	70
4-2-9.	NSCLC 患者における血漿中及び CSF 中オシメルチニブ濃度の測定	71
4-2-10.	既存検体を用いたオシメルチニブ髄液中濃度の予備的検討	71
4-3.	結果	71
4-3-1.	オシメルチニブ測定の LC-MS/MS 条件	71
4-3-2.	オシメルチニブ測定の分析バリデーション	73
4-3-2-1.	オシメルチニブ測定における選択性及びキャリーオーバー ..	73
4-3-2-2.	オシメルチニブの検量線	73
4-3-2-3.	オシメルチニブ測定における精度及び真度	73
4-3-2-4.	オシメルチニブの回収率及びマトリックス効果	73
4-3-2-5.	オシメルチニブの安定性	73
4-3-2-6.	オシメルチニブ測定における代替試料の妥当性	73
4-3-3.	オシメルチニブの保管容器への吸着の検討	73
4-3-4.	NSCLC 患者における血漿中及び CSF 中オシメルチニブ濃度の測定	76
4-3-5.	既存検体を用いた CSF 中オシメルチニブ濃度の予備的検討	76
4-4.	考察	78
4-5.	結論	79

総 括	80
主論文	82
参考論文	83
謝 辞	84
引用文献	85

略語一覧

AEs-DC/D	: Adverse events leading to discontinuation or death、治療の中止または死亡に関連する有害事象
AUC	: Area under the curve、濃度曲線下面積
AUC _{day0-14}	: Area under the curve from 0-14 days、第0日目から14日目の濃度曲線下面積
BCR-ABL	: Breakpoint cluster region-Abelson
BMV	: Bioanalytical method validation、生体試料中薬物濃度分析法のバリデーション
BSA	: Bovine serum albumin、ウシ血清アルブミン
CL	: Clearance、クリアランス
CNS	: Central nervous system、中枢神経系
CPT-11	: Irinotecan、イリノテカン
CSF	: Cerebrospinal fluid、脳脊髄液
C _{ss}	: Mean concentration at steady state、定常状態の平均血中濃度
CWRES	: Conditional weighted residual、条件付き重みつき残差
DBS	: Dried blood spot、乾燥血液ろ紙
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid、エチレンジアミン四酢酸
EGFR	: Epidermal growth factor receptor、上皮成長因子受容体
eGFR	: Estimate glomerular filtration rate、推定糸球体濾過量
EGFR-TKI	: EGFR tyrosine kinase inhibitor、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬
ELISA	: Enzyme-linked immuno sorbent assay、酵素結合免疫測定法
HPLC	: High performance liquid chromatography、高速液体クロマトグラフィー
Ht	: Hematocrit、ヘマトクリット
ILD	: Interstitial lung disease、間質性肺疾患
IS	: Internal standard、内標準物質
LBAs	: Ligand binding assays、リガンド結合法
LC-MS/MS	: Liquid chromatography tandem mass spectrometry、液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計
LLOD	: Lower limit of detection、検出限界
LLoQ	: lower limit of quantification、定量下限
LM	: Leptomeningeal metastasis、がん性髄膜炎

MAPE	: Mean absolute percentage error、平均絶対パーセント誤差
MRM	: Multiple reaction monitoring、多重反応モニタリング
ND	: Not determined、未検
NIOSH	: National Institute of Occupational Safety and Health、米国国立労働安全衛生研究所
NSCLC	: Non-small cell lung cancer、非小細胞肺癌
nSMOL	: Nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis
PD-1	: Programmed death-1
PD-L1	: Programmed death-ligand 1
PK	: Pharmacokinetics、薬物動態
PPE	: Personal protective equipment、個人防護具
PPK	: population pharmacokinetics、母集団薬物動態
PS	: Performance status、パフォーマンスステータス
QC	: Quality control、品質管理
RE	: Relative error、相対誤差
RSD	: Relative standard deviation、相対標準偏差
SD	: Standard deviation、標準偏差
TDM	: Therapeutic drug monitoring、治療薬物モニタリング
TMB	: Total mutation burden、遺伝子変異量
UGT1A1	: Uridine diphosphate-glucuronyl transferase 1A1、ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素アイソフォーム 1A1
V1	: Distribution volume of central compartment、中央コンパートメントの分布容積

序 論

悪性腫瘍は、1980 年以降のわが国における死因の第一位である。2017 年のがん予測統計では、年間約 100 万人が新たにがん罹患し、37 万人ががんによって死亡すると推計されている¹⁾。今後、高齢化によりさらに患者数は増加するものと考えられ、がん医療の社会的役割は増々大きくなっていくと考えられる。

悪性腫瘍の治療は、手術、放射線治療、化学療法が大きな三本柱であり、これらを組み合わせた集学的治療が行われる。抗がん剤を用いた化学療法は、遠隔転移を有する手術不能な悪性腫瘍では、治療の中心である。さらに手術の前後に行う術前または術後補助化学療法や、化学療法と放射線療法を同時に行う化学放射線治療、造血幹細胞移植前に行われる前処置など、悪性腫瘍の治療において化学療法の役割は非常に大きい。

1940 年代にナイトロジェンマスタードが白血病に治療効果を示して以来、悪性腫瘍の化学療法は、長らく細胞障害性を有する抗がん剤が中心であった。アルキル化剤や代謝拮抗薬、白金製剤など数多くの殺細胞性抗がん剤がこれまで開発されており、多くの悪性腫瘍では現在でも第一選択薬として使用されている。2000 年代になると、がんの発生と特定の遺伝子の関連が明らかになり、これらの分子を標的とした分子標的療法が開発された。フィラデルフィア染色体異常を有する慢性白血病において異常発現する BCR-ABL (Breakpoint cluster region-Abelson) を標的としたイマチニブがその例である²⁾。

さらに近年では、がん抗原特異的な T 細胞の活性化を賦活するニボルマブなどの免疫チェックポイント阻害薬が開発されている³⁾。このように現在の悪性腫瘍の化学療法は非常に複雑化しており、様々な種類の薬剤を単独あるいは組み合わせて治療が行われる。しかしながら、その治療効果には、個人間でばらつきが大きく、未だに化学療法のみにより悪性腫瘍を治癒することは困難である。また、いずれの種類の抗がん剤においても Quality of life (QOL、生活の質) を大きく低下させる副作用や致死的あるいは重篤な有害事象のリスクを伴う。そのため、より治療効果を高め、副作用のリスクを低減させる方法の開発が望まれる。この課題を克服するため、治療効果のより高い患者を選択するプレジジョンメディシン (精密医療) が試みられ、実用化されようとしている。

一方、殺細胞性の抗がん剤の多くでは、血中薬物濃度の治療域と毒性域の間隔が非常に狭く、その一部においては、治療域に投与量を調整することにより、より効果を高め、副作用を回避できることが報告されている⁴⁻⁵⁾。また、分子標的薬においても、血中濃度と治療効果や副作用との相関が数多く報告されている⁶⁻⁸⁾。免疫チェックポイント阻害薬については、現在そのような報告は少ないが、副作用のモニタリングや高額な薬価の医薬品をどのように使用していくかを考

えるために、薬物動態を含む検討が必要であると考えられる。

このように血中濃度モニタリングに基づく抗がん剤治療は、治療効果を高め、副作用のリスクを低減させる手段の 1 つになり得ると考えられる。しかしながら、現在、臨床現場で血中薬物濃度の測定が行われる抗がん剤の種類は極めて少ない。その理由として、抗がん剤の血中薬物濃度の測定が多くの施設で困難であること、血中薬物濃度を測定することのエビデンスが乏しいことが挙げられる。そのため血中薬物動態に基づく抗がん剤治療の最適化の実現のためには、多くの施設で治療に取り入れることのできるような、より汎用性の高い血中薬物濃度の測定法の構築や、その血中薬物濃度測定の有用性を示す臨床研究の実施が必要である。

この目的を実現するために、分子をイオン化し、その質量電荷比を測定する質量分析計は、非常に有用な装置である。特に液体クロマトグラフィーと組み合わせた液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) は、液体クロマトグラフィーにより試料を分離し、タンデム型質量分析計により、分子構造に基づくフラグメントイオンを検出することでより高い選択性と感度を有し、複雑性の高い生体内試料中においても薬物濃度を高感度に測定することができる。LC-MS/MS は汎用性が高く、多くの種類の薬物の測定が可能であり、低分子化合物の測定に加えて、タンパク質や脂質、核酸などの測定にも応用されている⁹⁻¹⁰⁾。このような利点を持つ LC-MS/MS を駆使し、生体中の抗がん剤の濃度を評価することで、より安全で有効性の高いがん化学療法を実現できる可能性がある。

そこで、本研究では、LC-MS/MS を用いた抗がん剤の生体中薬物濃度測定法を構築し、さらに臨床薬物動態学的検討を行った。第一章では、患者の汗を介した抗がん剤の職業暴露の危険性を確かめることを目的として、殺細胞性の抗がん剤であるイリノテカン及びその代謝活性物である SN-38 の汗中濃度の測定を行った。第二章では、薬物濃度をより簡便かつ侵襲性が低い方法で評価することを目的として、Dried blood spot (DBS) 法を用いた 3 種類の分子標的薬 (ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ) の血中濃度測定法の構築を行い、これらの薬剤を服用中の患者を対象として DBS 法を用いた血中濃度測定の検討を行った。さらに第三章では、抗体医薬品の汎用性の高い測定法の構築を目的として、免疫チェックポイント阻害薬であるニボルマブの質量分析計を用いた測定法を構築し、母集団薬物動態解析に基づくニボルマブの血中濃度推移の予測精度について検討を行った。最後に第四章では、がん性髄膜炎患者における分子標的薬であるオシメルチニブの脳脊髄液 (CSF) への移行性を明らかにすることを目的として、その CSF 中濃度測定法の構築し、がん性髄膜炎患者におけるオシメルチニブの CSF 移行性について検討を行った。

本 論

第一章 抗がん剤投与中におけるイリノテカン及び活性代謝物

SN-38 の汗中分泌による職業暴露のリスク評価

1-1. 緒言

イリノテカン (CPT-11) は、細胞障害性を有するキノリンアルカロイドであり、加水分解を受け、活性代謝物である SN-38 に変換され、DNA 合成に関与する酵素である I 型 DNA トポイソメラーゼを阻害することにより抗腫瘍効果を発揮する。分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬などの新しい抗がん剤の開発が進む現在においても、大腸がんの代表的な治療レジメンである FOLFIRI (フルオロウラシル・ホリナート・CPT-11) 療法に含まれているように、多くのがんの化学療法において重要な役割を果たす薬剤である¹¹⁾。

CPT-11 は、コリン作動性を有し、投与中に腹痛や下痢の副作用が出現することが知られている¹²⁾。また、発汗も CPT-11 のコリン作動性作用によって引き起こされる副作用の 1 つであり¹³⁾、患者によっては CPT-11 投与中に多量の発汗が生じることが知られている。開発時の文献によると、CPT-11 は汗中へ分泌されることが報告されており¹⁴⁾、汗を介した暴露のリスクがあることが予想されるが、これまで CPT-11 の汗中濃度を報告した文献はなく、どの程度の量の CPT-11 が汗中に分泌されるかは明らかではない。また、細胞増殖抑制活性が約 100~200 倍強い代謝活性物である SN-38 が汗中に分泌されるかどうかは明らかではない。

一方で、近年、医療機関においてがん化学療法のケアを行う医療従事者の抗がん剤暴露を防ぐことは重要な課題である。個人防護具 (personal protective equipment、PPE) やクラス II の安全キャビネット、閉鎖式システムを用いた調製器具や投与器具が抗がん剤による職業暴露を防ぐために臨床現場で標準的に用いられている。また、政府機関や関連学会から抗がん剤暴露対策に関するガイドラインが発出されている。ガイドライン中には、抗がん剤投与後の体液の取り扱いにも注意するように記載されているが¹⁵⁻¹⁶⁾、汗を介した抗がん剤暴露の危険性についてのエビデンスは極めて限られている。

そこで、本研究では、CPT-11 を含むがん化学療法を施行中に発汗が認められた患者を対象に、汗中における CPT-11 とその活性代謝物である SN-38 の濃度を LC-MS/MS を用いて測定し、汗を介した CPT-11 及び SN-38 の暴露のリスクについて評価を行った。

1-2. 方法

1-2-1. CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度測定の対象患者

本研究は 2013 年 10 月から 2015 年 5 月までの期間に、先端医療センターで実施した。CPT-11 を含むがん化学療法を施行し、投与中に肉眼でスポイドを用いて採取できる程度の汗滴を伴う発汗が認められた患者を対象とした。診療録から年齢、性別、がんの種類、体重、身長、体表面積、CPT-11 の投与量、投与時間、化学療法レジメンの種類に加えて、CPT-11 及び SN-38 の主な代謝酵素であるウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素アイソフォーム 1A1 (UGT1A1) の遺伝子多型に関する情報を収集した。本研究は、先端医療センターの臨床研究審査委員会の承認（承認番号：13-12）を得た上で実施し、すべての対象患者からは、試料の採取前に書面でインフォームドコンセントを取得した。

1-2-2. 汗試料の採取

患者の汗の採取は、CPT-11 の点滴中に行った。CPT-11 の投与開始から投与終了時までの約 1 時間半～2 時間の間に生じた汗滴を、滅菌されたスポイドを用いて任意の量で採取した。

1-2-3. CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度測定法

CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度は、既報の LC-MS/MS 法¹⁷⁾に若干の改変を加えて、次の通り行った。試料中のタンパク質を除くため、試料 20 μ L に対して 2 倍量のアセトニトリルを加えてボルテックスミキサーを用いて攪拌した後に遠心分離（4℃、15,460 \times g、15 分）し、上清 10 μ L を LC-MS/MS に注入し、分析を行った。液体クロマトグラフィーは、2690 Separation Module (Waters Co., MA, USA) を用いて、質量分析計は Micromass Quattro Ultima Pt Mass Spectrometer (Waters Co.) を用いた。移動相は、0.1 %ギ酸：アセトニトリル（1：7、v/v）を用いて、分析カラムは Quicksorb ODS（2.1mm id、150 mm、5 mm size、Chemco、Osaka, Japan）を使用した。CPT-11 及び SN-38 は、多重反応モニタリング (Multiple reaction monitoring, MRM) モードを用いて検出し、それぞれの MRM トランジションは、m/z（質量電荷比）：587.2 \rightarrow 124.2 及び m/z：393.0 \rightarrow 349.2 を用いた。それぞれの試料中濃度は、絶対検量線法を用いて算出した。

1-3. 結果

1-3-1. CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度測定 of 患者背景

本研究には、4 人の患者が登録された。患者背景を Table 1 に示す。がん種は、大腸がん（1 例）、小細胞肺癌（1 例）、膵臓がん（2 例）であった。大腸がん（1 例）の患者の化学療法レジメンは、カペシタビン・CPT-11・ベバシズマブ併用療法（XELIRI+Bev）であり、UGT1A1 の遺伝子多型は、*6 ホモ型であった。小細胞肺癌（1 例）の患者の化学療法レジメンは、CPT-11 単剤療法（1 例）であり、UGT1A1 の遺伝子多型は、*6 ホモ型であった。膵臓がん（2 例）の患者の化学療法レジメンは、いずれもオキサリプラチン・CPT-11・レボホリキサート・フルオロウラシル併用療法（FOLFIRINOX）であり、UGT1A1 の遺伝子多型は、いずれも野生型であった。CPT-11 の平均投与量（±標準偏差）は、292.3（±75.5）mg/body であった。

Table 1 Characteristics of patients in the present study

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Age (years)	29	46	60	49
Gender	Male	Male	Female	Male
Cancer type	Colon cancer	Small cell lung cancer	Pancreatic cancer	Pancreatic cancer
Weight (kg)	70.0	73.1	60.7	68.1
Height (cm)	180.0	177.1	157.2	171.0
BSA (m ²)	1.886	1.899	1.609	1.796
UGT1A1 *6	-/*6	*6/*6	-/-	-/-
UGT1A1 *28	-/-	-/-	-/-	-/-
Regimen	XELIRI +Bevacizumab	CPT-11 monotherapy	FOLFIRINOX	FOLFIRINOX
Regimen interval	3 weeks	4 weeks	2 weeks	2 weeks
CPT-11 dosage (mg/BSA)	200 mg/m ²	100 mg/m ²	180 mg/m ²	180 mg/m ²
CPT-11 dosage (mg/body)	369 mg	190 mg	290 mg	320 mg
Administration time	1.5 h	1.5 h	2 h	2 h

BSA: body surface area,

UGT1A1: uridinediphosphate-glucuronosyltransferase 1A1,

CPT-11: irinotecan.

1-3-2. CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度測定法

CPT-11 及び SN-38 は、それぞれ 2.02 分及び 2.29 分で溶出した。MRM クロマトグラムを Figure 1 に示す。検出限界 (lower limit of detection、LLOD) は S/N 比が 3 以上であることを基準として 10 ng/mL に設定した。

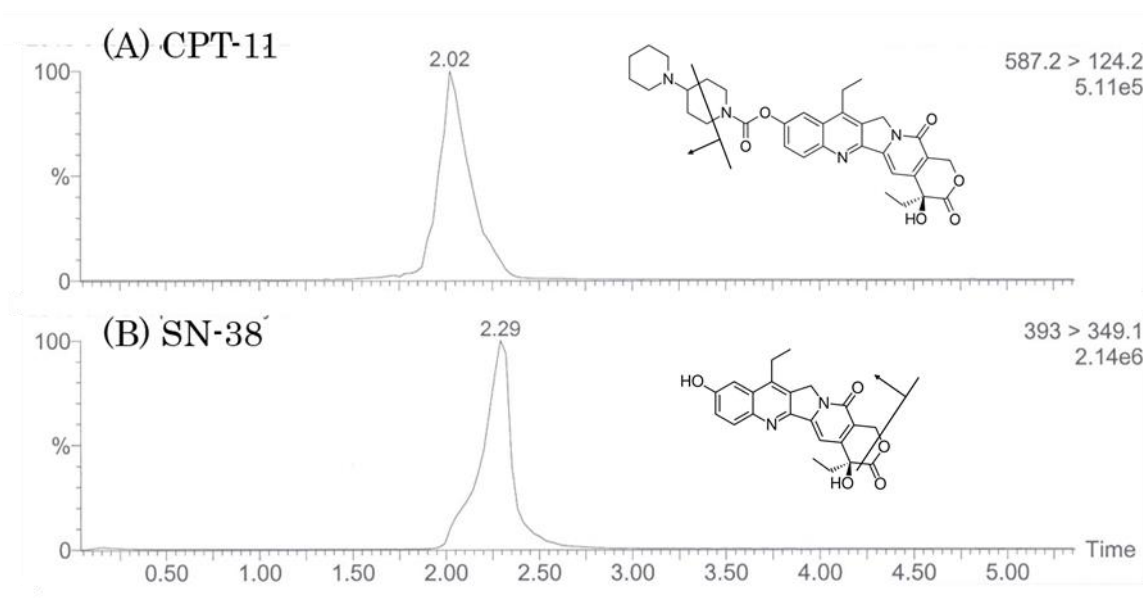


Figure 1 Typical Chromatogram of CPT-11 (A) and SN-38 (B) at a concentration of 1,000 ng/mL.

1-3-3. CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度

CPT-11 及び SN-38 の汗中濃度を Table 2 に示す。4 人すべての患者において、汗中に CPT-11 が検出された。SN-38 は、FOLFIRINOX 治療を受けた UGT1A1 の遺伝子多型が野生型の 1 人の対象患者からのみ検出された。他の 3 人の対象患者の SN-38 の汗中濃度は LLOD (10 ng/mL) 以下であった。

Table 2 Concentrations of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite, SN-38, in patient sweat.

	CPT-11 (ng/mL)	SN-38 (ng/mL)
Case 1	669	LLOD>
Case 2	188	LLOD>
Case 3	90.9	74.4
Case 4	62.8	LLOD>
Mean	252.64	74.4
%CV	111.93	-

LLOD: lower limit of detection.

1-4. 考察

CPT-11 は、現在でも多くのがんの治療に広く使用される殺細胞性の抗がん剤である。CPT-11 は、職業暴露という観点からは、米国国立労働安全衛生研究所 (National Institute of Occupational Safety and Health、NIOSH) の発出する Hazardous drug list¹⁸⁾に含まれ、医療スタッフはこれらの薬剤を扱うときは、その剤型によらず PPE などを常に使用するべきであるとされている。

本研究では、CPT-11 とその活性代謝物である SN-38 が、CPT-11 を含む化学療法を受けた患者の汗中から検出された。最も高かった CPT-11 の汗中濃度 (669.135 ng/ml、1140 nM) は、*in vitro* で評価された CPT-11 の IC₅₀ (350~3000 nM) に匹敵した¹⁹⁾。また、SN-38 は 1 人の患者で汗中に検出されたが、その濃度 (74.37 ng/ml、189.5 nM) は、*in vitro* で評価された SN-38 の IC₅₀ (0.08~11 nM) を大きく上回った¹⁹⁾。したがって、汗中に含まれる CPT-11 及び SN-38 によって、健康被害や妊娠中の医療スタッフにおいてはその胎児に影響を与える可能性が十分にあると考えられる。

これまで抗がん剤による職業暴露について数多くの報告がある。特に抗がん剤を取り扱う医療従事者の急性症状や生殖毒性について多くの調査が行われており、Valanis らは、抗がん剤を取り扱う看護師や薬剤師に、脱毛や下痢、めまい、皮疹などの急性症状が対照群に比べて有意に高いことを報告している²⁰⁻²¹⁾。また、Dranitsaris らは、抗がん剤の暴露と自然流産、先天奇形、死産などとの関連を調査した 7 つの研究のメタアナリシスを行い、先天奇形と死産との関連は認められなかったが、自然流産のリスクが上昇することを報告している²²⁾。

これらの研究に基づき専門機関や各国の政府機関は、医療従事者の抗がん剤による職業暴露によって生じる健康被害を防ぐため、ガイドラインを作成している。これらのガイドラインでは、安全キャビネットや PPE、閉鎖式システムなどが、医療従事者の職業暴露を防ぐために推奨されている¹⁵⁻¹⁶⁾。また、抗がん剤が含まれる可能性のある患者の排泄物についても、注意が必要であると記されている。

今回の我々のデータから、CPT-11 を含む化学療法を受けた患者においては、汗中に無視できない濃度の CPT-11 および SN-38 が含まれることが明らかとなり、医療スタッフは、その取り扱いを特に慎重に行う必要があることが示された。CPT-11 には、コリン作動性作用があり、投与中に発汗が生じることがあることから、汗を介した抗がん剤の暴露のリスクは、他の抗がん剤より高いと考えられる。

しかしながら、本研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究の症例数は少なく、汗中濃度と投与量の関係、個体間変動について十分に検討できていない。また、CPT-11 と SN-38 の濃度には相関は見られず、SN-38 の検出された患者の

CPT-11 濃度は 4 人の中で最も低かった。加えて、UGT1A1*6 または UGT1A1*28 のいずれかをホモ接合体または複合ヘテロ接合体の患者では、UGT1A1 のグルクロン酸抱合能が低下し、SN-38 の代謝が遅延することが知られている。本研究で SN-38 が汗中に検出された患者の UGT1A1 遺伝子多型は野生型であり、*6 のホモ接合体の患者では、検出されなかった。しかしながら症例数が少ないことに加えて、本研究の対象患者には*6 と*28 の複合ヘテロ型や*28 ホモ型を持つ患者は含まれていないことから、これら SN-38 の代謝が遅延する患者群において、SN-38 が汗中に検出される割合が高いかどうかはさらなる検証が必要である。

第二に、本研究では、汗を経時的に採取しておらず、汗中における最大濃度や汗中に分泌される総量は明らかではない。加えて、SN-38 が検出されなかった 3 人において、汗中に SN-38 がその後も検出されないかは不明である。特に汗中に分泌される総量は、特定の時点における濃度よりも、職業暴露のリスクを考える上で重要であると考えられる。今後、CPT-11 を含む化学療法を受けた患者における、汗を介した CPT-11 と SN-38 の暴露に関するさらなる研究が望まれる。

1-5. 結論

本研究では、CPT-11 及びその代謝活性物である SN-38 の、汗を介した職業暴露の危険性を確かめることを目的として、CPT-11 を含む化学療法を受けた患者における汗中の CPT-11 及び SN-38 の濃度を測定し、CPT-11 及び SN-38 が汗中に検出されることを明らかにした。この結果から、汗滴や汗を吸収した衣類への接触は、CPT-11 や SN-38 の職業暴露のリスクがあると考えられる。本研究の成果は、CPT-11 及び SN-38 の暴露対策において有益な情報であると考えられる。

第二章 非小細胞肺癌患者における Dried blood spot(DBS)

法を用いた EGFR-TKI の血中濃度測定法の構築

2-1. 諸言

Dried blood spot (DBS) 法は、臨床検査試料として微量の血液をろ紙に滴下し乾燥させ、試料を保管、運搬する方法であり、海外では、血液の運搬が困難な遠隔地に住む患者や、新生児の血液検査などに有効利用されている。近年、分析技術の進歩により、DBS 中の微量な乾燥血液から薬物濃度を測定することが可能になり、治療薬物モニタリング (Therapeutic drug monitoring、TDM) への応用が注目されている。DBS 法を用いた薬物濃度の測定の概略を Figure 2 に示す。免疫抑制剤²³⁻²⁴⁾や抗菌薬²⁵⁻²⁶⁾、抗がん剤²⁷⁻²⁸⁾など多くの薬物の DBS 法による測定法が報告されている。薬物動態研究では、正確なタイムスケジュールでマルチポイントの採血が必要な場合が多く、手技が簡便で、静脈採血に比べて侵襲の少ない DBS 法は、薬物動態研究に有用であると考えられる²⁹⁾。また薬物によっては、乾燥させることによって保管中の安定性が高まり、試料を介した感染のリスクを低減できる利点もある³⁰⁻³¹⁾。

ゲフィチニブは、上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor、EGFR) の遺伝子変異が陽性の手術不能または再発の非小細胞肺癌 (Non-small cell lung cancer、NSCLC) の治療に使用される、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR tyrosine kinase inhibitors、EGFR-TKI) である。ゲフィチニブは 1 日 1 回連日経口投与する薬剤であるが、血中濃度が治療効果と副作用に関係することがいくつか報告されている。Mizoguchi らは、ゲフィチニブの投与 3 日目と 8 日目のトラフ濃度の比が高いほど、無増悪生存期間が延長することを報告している⁷⁾。Kobayashi らは、ゲフィチニブで下痢または肝機能障害が生じた患者では、生じなかった患者と比べて血中濃度曲線下面積 (Area under the curve、AUC) が大きく、トラフ濃度も高いことを報告している³²⁾。しかしながら、いずれの研究も症例数が少なく (n<40)、臨床現場において TDM を行うエビデンスを構築するためには、さらなる研究が必要である。

高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography、HPLC)³³⁾や LC-MS/MS を用いたゲフィチニブの血漿中³⁴⁾や血清中、全血中の濃度測定法³⁵⁾は報告されているが、DBS 法による測定法はこれまで報告されていない。DBS 法によるゲフィチニブを含む EGFR-TKI の測定が可能になれば、より簡便かつ低侵襲に EGFR-TKI の血中濃度を評価することができ、さらなるエビデンスの構築に役立つと考えられる。

そこで本研究では、これまで血中濃度と治療効果及び副作用の関係が報告されているゲフィチニブの血中濃度を、簡便かつ低侵襲に評価することを目的として、ゲフィチニブの DBS 中濃度の測定法を構築し、ガイドラインに基づくバリデーションを行った。また、ゲフィチニブ服用中の患者を対象に、DBS 中濃度と血漿中濃度を測定し、両者の濃度を比較した。さらに、血中薬物濃度と効果や副作用が関連することが報告⁴⁶⁻⁴⁸⁾されている EGFR-TKI である、エルロチニブ及びアファチニブについても同様に検討を行った。

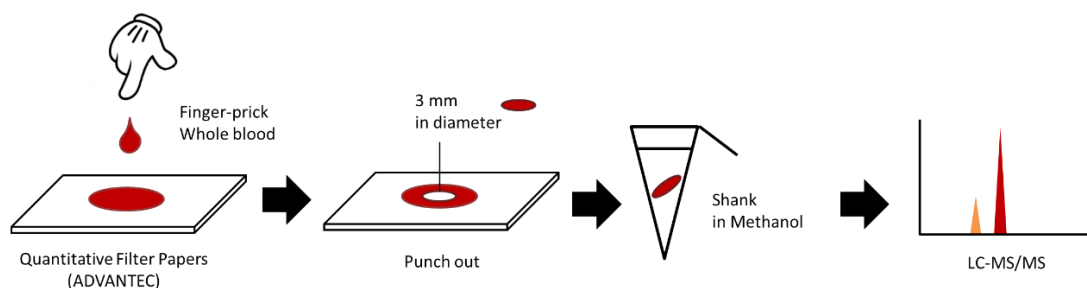


Figure 2 Quantification method of drug in DBS using LC-MS/MS

2-2. 方法

2-2-1. DBS 法による EGFR-TKI の測定試薬

ゲフィチニブ、エルロチニブ及びアファチニブ（それぞれ純度 99%以上）は、Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。ろ紙は、Qualitative filter paper No. 2、125 g/m² (Advantec, Tokyo, Japan) を用いた。アセトニトリル（高速液体クロマトグラフィー用）、メタノール（特級）及び酢酸アンモニウム（特級）はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した。DBS 試料は SK11 Leather Punch Punch Hole Diameter 2.0 ~ 4.5mm (Fujiwara Sangyo co. ltd, Hyogo, Japan) を用いてパンチアウトした。

2-2-2. EGFR-TKI 測定の LC-MS/MS の条件

すべての分析は、四重極型質量分析計である QTRAP4500 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) を用いて行った。オペレーションソフトウェアは、Analyst 1.6.2 (AB Sciex) を用いて行った。試料は、陽イオンエレクトロスプレーを用いてイオン化し、MRM モードにより検出した。また液体クロマトグラフィーは、1260 LC system (Agilent, Waldbronn, Germany) を用いた。移動相には、10 mM 酢酸アンモニウム：アセトニトリル (50 : 50, v/v) を用いた。インジェクションサイクルは 3 分間とした。分析カラムには、InertSustainSwift C18 analytical column (3 µm, 2.1 × 50 mm, GL Sciences, Tokyo, Japan) を用いて、カラム温度は 40℃、流量は 0.2 mL/min に設定した。

2-2-3. ゲフィチニブの標準溶液

ゲフィチニブ及びエルロチニブ（内標準物質、Internal standard、IS）のストック溶液は、メタノール中で 1 mg/mL の濃度になるよう調製した。分析に用いるゲフィチニブの標準溶液は、ストック溶液を 0.375~24 µg/mL の範囲でアセトニトリルを用いて希釈し調製した。DBS からゲフィチニブを抽出するための DBS 抽出溶液には、IS としてエルロチニブを 1 ng/mL で含むメタノールを使用した。血漿中のタンパク質を除去し、ゲフィチニブを抽出するための血漿抽出溶液には、IS としてエルロチニブを 1 ng/mL で含むアセトニトリルを使用した。すべてのストック溶液、標準溶液、抽出溶液は、-20℃で保管した。

2-2-4. ゲフィチニブの検量線試料及び QC 試料の調製

DBS 法の検量線試料は、薬物を含まない全血にゲフィチニブ標準溶液を加え、全血中濃度が 2,400、1,200、600、300、150、75、37.5 ng/mL となるように調製した。同様に DBS 法の Quality control (品質管理、QC) 試料は、薬物を含まない全血にゲフィチニブ標準溶液を加え、全血中濃度が 2,000 ng/mL（高濃度）、200

ng/mL（中濃度）、80 ng/mL（低濃度）、40 ng/mL（定量下限、lower limit of quantification、LLoQ）となるように調製した。血漿濃度測定のための検量線は、DBS 法と同じ濃度設定で、薬物を含まない血漿にゲフィチニブの標準溶液を加えることで調製した。検量線及び QC 試料の DBS は、10 μ L の全血をろ紙に滴下して調製し、2 時間以上室温で乾燥させた後に直径 3 mm の DBS をパンチアウトし、500 μ L の DBS 抽出溶液を加えて 30 分間室温で振とうした。その上清 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、分析を行った。血漿中濃度測定の試料は、20 μ L の血漿に対して、40 μ L の血漿抽出溶液を加えた後にボルテックスミキサーで攪拌し、10,000 \times g で 10 分間遠心分離し、タンパク質を沈殿させ、その上清 1 μ L を LC-MS/MS に注入し、分析を行った。

2-2-5. DBS 法によるゲフィチニブ測定の分析バリデーション

本研究で構築した測定法の正確性や再現性を評価することを目的として、分析バリデーションを行った。バリデーションの手順は、厚生労働省の発出する医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーション（Bioanalytical Method Validation、BMV）に関するガイドラインに、DBS に特有な項目を追加して行った³⁶⁾。

2-2-5-1. ゲフィチニブの検量線

検量線試料は、バリデーション実施ごとに作成した。ゲフィチニブのピーク面積に対する内標準物質のピーク面積の比を濃度計算に用いた。検量線式は、最小二乗法（1/x 重み付け）を用いた。

2-2-5-2. DBS 法によるゲフィチニブ測定の精度及び真度

精度及び真度の日内変動は、高濃度、中濃度、低濃度、定量下限の 4 つの濃度の試料を各 5 検体測定することで評価した。精度の日間変動は、3 日間の異なる日に測定を行って評価した。精度は、相対標準偏差（Relative standard deviation、RSD%）として、真度は理論値に対する相対誤差（Relative error、RE%）として、算出した。精度及び真度は BMV ガイドラインで必要とされる $\pm 15\%$ 以内を許容可能とした。

2-2-5-3. ゲフィチニブ測定における選択性及びキャリーオーバー

薬物を含まないブランク試料では阻害ピークが検出されず、対象とする EGFR-TKI のみが選択的に検出されるかを検討した。選択性は、異なる 6 人のブランク DBS 試料を測定し、ゲフィチニブ及び内標準物質と同一保持時間における阻害ピークの有無を評価した。キャリーオーバーは、検量線の最高濃度を測定後に、ブランク試料を測定し、阻害ピークの有無を評価した。選択性及びキャリ

一オーバーの評価において阻害ピーク面積は、BMV ガイドラインで必要とされる定量下限の 20% 以下及び IS の 5% 以下を許容可能とした。

2-2-5-4. DBS 法によるゲフィチニブ測定における回収率及びマトリックス効果

ゲフィチニブの DBS からの回収率を評価するため、10 μ L の全血が含まれる DBS から抽出した試料のピーク面積比と、同一濃度になるように DBS 抽出溶液に標準溶液を添加した試料のピーク面積比を比較した。また、LC-MS/MS の測定においては、試料に含まれる夾雑成分（マトリックス成分）によって目的分子のイオン化が促進または阻害されることがある（マトリックス効果）。このマトリックス効果を評価するために、6 人の異なるブランク DBS 試料から抽出したマトリックス成分を用いて、標準溶液にマトリックス成分を含む場合と含まない場合のピーク面積を比較した。回収率及びマトリックス効果の評価は、高濃度、中濃度、低濃度の QC 試料をそれぞれ 3 つ作成（N=3）し行った。

2-2-5-5. DBS 中におけるゲフィチニブの安定性

DBS 中におけるゲフィチニブの安定性は、室温及び -20°C において、高濃度、中濃度、低濃度の 3 つの QC 試料の濃度（N=3）で 24 時間、1 カ月、5 カ月経過後の測定値を調製直後の測定値と比較することで評価した。また、DBS 試料の輸送時における温度上昇を想定し、 40°C で 24 時間の安定性も同様に評価した。各濃度における QC 試料の平均真度は、BMV ガイドラインで必要とされる $\pm 15\%$ 以内を許容可能とした。

2-2-5-6. ろ紙へ滴下する血液量の影響

ろ紙に滴下する血液量の測定値への影響は、40 μ L の全血を用いて調製した QC 試料を測定し、その平均真度を、10 μ L の全血を用いて調製した検量線より求めることで評価した。ろ紙へ滴下する血液量の影響の評価は、高濃度、中濃度、低濃度の 3 つの QC 試料の濃度（N=3）で行った。

2-2-7. DBS 法による NSCLC 患者の血中ゲフィチニブ濃度の測定

ゲフィチニブを連日または隔日で服用している 10 人の NSCLC 患者において、DBS 法による血中濃度の測定を実施した。DBS 検体は、患者自ら指先を、BD Microtainer® contact-activated lancet（BD Biosciences、San Jose、CA、USA）を用いて穿刺することによって採取した。採取部位をアルコール綿で清拭した後に、十分乾燥させ、穿刺し、滲出液の混入を防ぐため、軽く圧迫し指先に血液滴を作り、ろ紙へ血液を直接滴下した。採血ポイントは、ゲフィチニブ服用直前として、トラフ濃度を測定した。全身循環血の血漿中濃度と末梢の指先から採取した DBS 中濃度（全血中濃度）の関連を評価するため、DBS 試料を採取後 10 分以内

に抗凝固剤としてヘパリンを含む採血管（Terumo Venoject II、TERUMO Corp.、Tokyo, Japan）を用いて静脈血採血を行った。3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、血漿を得た。DBS 試料及び血漿は、 -20°C で測定まで保管した。本臨床研究は、先端医療センターの倫理委員会の承認（承認番号：15-27）を得て行った。また、検体の採取の前までに、すべての患者から文書によりインフォームドコンセントを得た。

2-2-8. DBS 中濃度と血漿中濃度の比較

DBS 濃度と血漿中濃度の比較は、Passing-Bablok 回帰及び Bland-Altman 分析を XLSTAT software（version 2018.1.50011）を用いて行った。Passing-Bablok 回帰は 2 つの分析法の相関関係を、Bland-Altman 分析は 2 つの分析法のバイアスを評価する分析法である。

2-2-9. エルロチニブ及びアファチニブへの DBS 法の応用

エルロチニブ及びアファチニブについても、ゲフィチニブと同様に DBS 法による血中濃度測定法の検討を行った。エルロチニブ及びアファチニブは、ゲフィチニブと同じく EGFR 遺伝子変異陽性の NSCLC の治療に用いられる EGFR-TKI である。エルロチニブの検量線範囲は、78.125 ～ 5,000 ng/mL とし、アファチニブの検量線範囲には、1.953125 ～ 1,000 ng/mL とした。エルロチニブ及びアファチニブの測定においては、内標準物質は、ゲフィチニブ（10 ng/mL）を用いた。さらに、エルロチニブを服用中の 7 人の患者及びアファチニブを服用中の 5 人の患者を対象に、ゲフィチニブと同様の方法で血漿中濃度と DBS 中濃度（全血中濃度）の関連を評価した。

2-3. 結果

2-3-1. ゲフィチニブ測定のための LC-MS/MS 条件

イオンソースのパラメーターは、Curtain Gas=50、Collision Gas=8、IonSpray Voltage=5500、Temperature=500、Ion Source Gas1=70、Ion Source Gas2=70 であり、MS/MS の条件はゲフィチニブでは Declustering potential=136.0 volts、Entrance potential=10.0 volts、collision energy=33.0 volts、collision cell exit potential=36.0 volts、エルロチニブ (IS) では Declustering potential=136.0 volts、Entrance potential=10.0 volts、collision energy=45.0 volts、collision cell exit potential=24.0 volts であった。ゲフィチニブ及びエルロチニブ (IS) の MRM トランジションは、それぞれ 447.1→127.9、394.1 → 277.8 であった。ゲフィチニブ及びエルロチニブ (IS) は、それぞれ 1.76 分及び 1.68 分で溶出した。それぞれの MRM クロマトグラムを Figure 3 に示す。

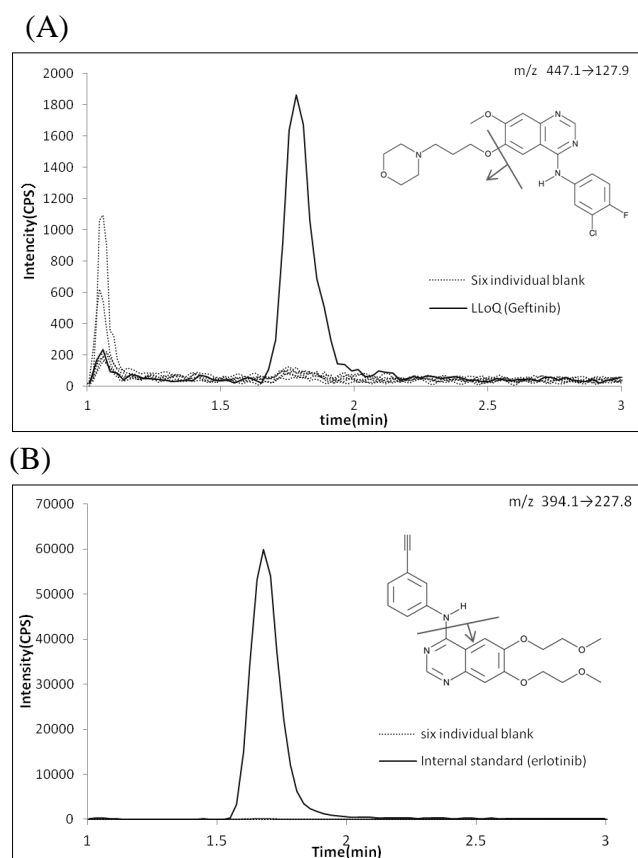


Figure 3 Chromatograms of (A) gefitinib at lower limit of quantification (LLoQ) and six individual dried blood spot (DBS) blanks and (B) internal standard (IS、erlotinib、1 ng/mL) and six individual DBS blanks

2-3-2. DBS 法によるゲフィチニブ測定の分析バリデーション

2-3-2-1. ゲフィチニブ測定における選択性及びキャリーオーバー

異なる 6 人のブランク試料の MRM クロマトグラムを Figure 3A に示す。ゲフィチニブの定量下限のピーク、及び 1 ng/mL の濃度の IS のピークに対する阻害ピークは認められなかった。同様に検量線の最高濃度を分析した後にブランク試料を測定した場合にも、キャリーオーバーは認められなかった。

2-3-2-2. ゲフィチニブの検量線

ゲフィチニブの検量線は、37.5~2,400 ng/mL の範囲において良好な直線性(相関係数 $[R^2]=0.999$)を示した。すべての検量線検体の濃度は、BMV ガイドラインで必要とされる理論値の $\pm 15\%$ 以内であった。

2-3-2-3. DBS 法によるゲフィチニブ測定の精度及び真度

精度の日内変動、日間変動、及び真度の日内変動は、すべての QC 試料において、BMV ガイドラインで必要とされる $\pm 15\%$ 以内であった (Table 3)。定量下限は、20 ng/mL では、BMV ガイドラインで必要とされる $\pm 20\%$ 以内を満たさず、40 ng/mL を定量下限と設定した。

2-3-2-4. DBS 法によるゲフィチニブ測定の回収率及びマトリックス効果

回収率及びマトリックス効果を Table 3 に示す。ゲフィチニブは、ほとんど完全に DBS から抽出された。また、異なる 6 人のブランク DBS から抽出したマトリックス成分を用いた検討において、ゲフィチニブ及び IS に対するマトリックス効果は認められなかった。

2-3-2-5. DBS 中におけるゲフィチニブの安定性

ゲフィチニブは、室温及び -20°C で少なくとも 5 か月間安定であった。また、 40°C において 24 時間安定であることが確認された (Table 3)。各濃度における QC 試料の平均真度は、BMV ガイドラインで必要とされる $\pm 15\%$ 以内であった。

Table 3 Summary of method validation results of dried blood spot (Gefitinib)

QC level		High (%)	Medium (%)	Low (%)	LLoQ (%)
Concentration (ng/mL)		2,000	200	80	40
Intra-day precision (N=5)		4.8	7.1	5.5	10.1
Inter-day precision (N=3)		8.1	7.9	4.7	5.8
Accuracy (N=5)		96.2	89.8	89.3	89.1
Recovery (N=3, Mean \pm SD)		95.7 \pm 3.3	96.3 \pm 4.7	104.9 \pm 2.0	
Matrix effect (N=3, Mean \pm SD)		90.4 \pm 1.9	88.8 \pm 2.5	98.7 \pm 6.6	
Room temperature stability (N=3, Mean \pm SD)	24 h	104.7 \pm 4.8	109.7 \pm 7.9	99.1 \pm 3.4	
	1 month	98.0 \pm 5.1	99.4 \pm 2.9	99.7 \pm 1.0	
	5 months	99.7 \pm 1.4	93.4 \pm 2.7	98.8 \pm 5.4	
−20°C stability (N=3, Mean \pm SD)	24 h	102.6 \pm 5.7	95.7 \pm 8.2	91.9 \pm 6.9	
	1 month	93.0 \pm 6.5	92.9 \pm 9.3	90.1 \pm 5.0	
	5 months	104.6 \pm 7.6	102.5 \pm 5.6	100.9 \pm 5.4	
40°C stability (N=3, Mean \pm SD)	24 h	109.6 \pm 2.0	98.8 \pm 8.8	95.0 \pm 0.8	

QC: quality control, LLoQ: lower limit of quantification, SD: standard deviation

2-3-2-6. ろ紙へ滴下する血液量の影響

40 μ L の血液を用いて調製した QC 試料の平均真度を Table 4 に示す。各 QC 濃度における平均真度は、 $\pm 15\%$ 以内であり、ろ紙に滴下する血液量が 40 μ L に増加しても、血液量が 10 μ L である場合と比較して顕著な違いは認められなかった。

Table 4 Effect of blood spotting volume to DBS

QC level	High (%)	Medium (%)	Low (%)
Concentration (ng/mL)	2,000	200	80
Accuracy			
Blood volume 40ul (N=3, Mean \pm SD)	106.3 \pm 5.1	106.3 \pm 5.1	106.2 \pm 7.4

QC, quality control; SD, standard deviation

2-3-3. ゲフィチニブの血漿中濃度測定法のバリデーション

DBS 法と同じ検量線範囲において、ゲフィチニブの血漿中濃度測定法の日内、日間精度及び真度は、 $\pm 15\%$ 以内であった。またゲフィチニブの血漿中からの回収率は、ほぼ 100%であり、マトリックス効果は認められなかった (Table 5)。

Table 5 Summary of validation on the plasma method

QC level	High (%)	Medium (%)	Low (%)	LLoQ (%)
Concentration (ng/mL)	2,000	200	80	40
Intra-day precision (N=5)	4.2	5.2	3.5	5.6
Inter-day precision (N=3)	2.8	8.3	5.6	7.9
Accuracy (N=5, Mean \pm SD)	102.6	108.4	104.6	104.2
Recovery (N=3, Mean \pm SD)	101.7 \pm 2.9	99.7 \pm 4.6	96.8 \pm 4.3	
Matrix effect (N=3, Mean \pm SD)	92.9 \pm 3.5	97.2 \pm 6.1	90.9 \pm 1.5	

QC: quality control, LLoQ: lower limit of quantification, SD: standard deviation

2-3-4. DBS 法による NSCLC 患者の全血中ゲフィチニブ濃度と血漿中濃度の 関連

10 人の NSCLC 患者が本研究に登録された。すべての患者から直径 3 mm 以上の DBS 検体を得ることができた。患者背景及び測定結果を Table 6 に示す。Passing-Bablok 回帰及び Bland-Altman 分析の結果を Figure 4 に示す。良好な直線性が DBS 中濃度と血漿中濃度の間に認められた。回帰直線の傾きは、0.932 (95% 信頼区間、0.860～1.048) であった。Bland-Altman 分析において、DBS 中濃度に対する血漿中濃度のバイアスは、6.33% (95% 信頼区間、1.69 % ～ -10.96 %) であった。

Table 6 Summary of clinical validation in 10 patients

Age (years)	Sex	EGFR mutation	Dose of gefitinib	Duration of treatment (days)	Ht (%)	DBS concentration (ng/mL)	Plasma concentration (ng/mL)
73	M	L858R	250 mg every day	419	36.8	159.8	183.3
66	F	19del	250 mg every day	48	41.0	277.3	317.1
90	F	19del	250 mg every other day	750	40.0	74.6	81.3
59	F	L858R	250 mg every day	62	39.3	175.4	187.3
55	M	19del	250 mg every day	1,280	41.8	371.6	390.5
75	M	L858R	250 mg every other day	268	38.0	52.2	59.7
61	F	19del	250 mg every day	1,070	31.9	206.9	202.9
72	F	19del	250 mg every day	826	34.9	386.7	421.5
66	M	L858R	250 mg every day	1,509	42.4	76.8	74.3
60	F	L858R	250 mg every day	314	42.4	214.0	212.5

EGFR: epidermal growth factor receptor, DBS: dried blood spot, Ht: hematocrit

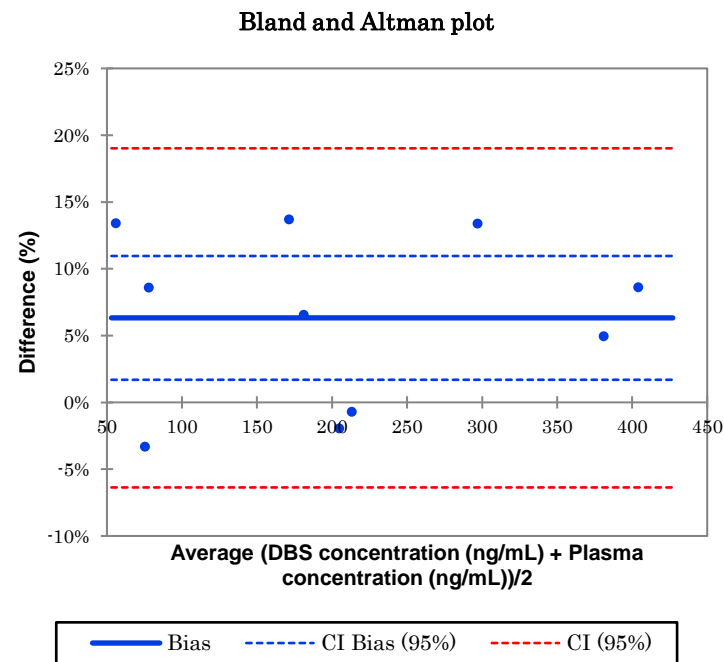
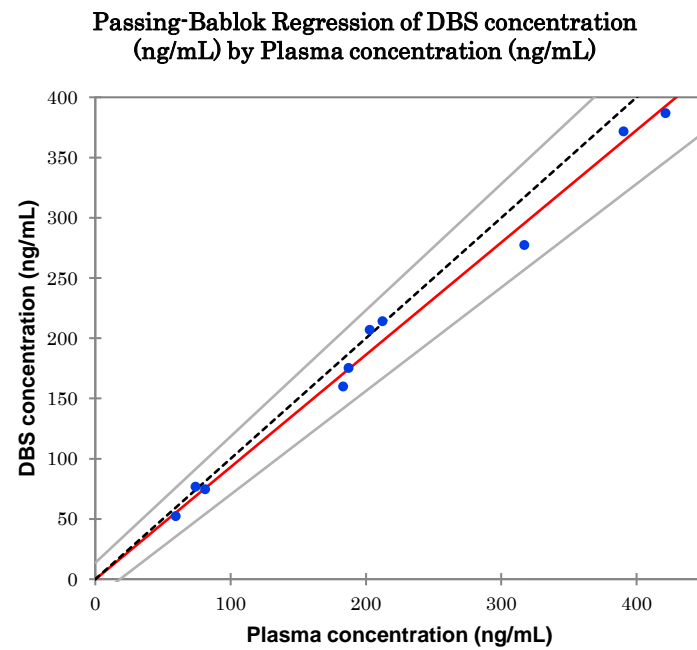


Figure 4 Passing-Bablok regression and Bland-Altman analysis between gefitinib dried blood spot (DBS) concentrations and plasma concentrations for 10 patient samples

2-3-5. エルロチニブ及びアフアチニブへの DBS 法の応用

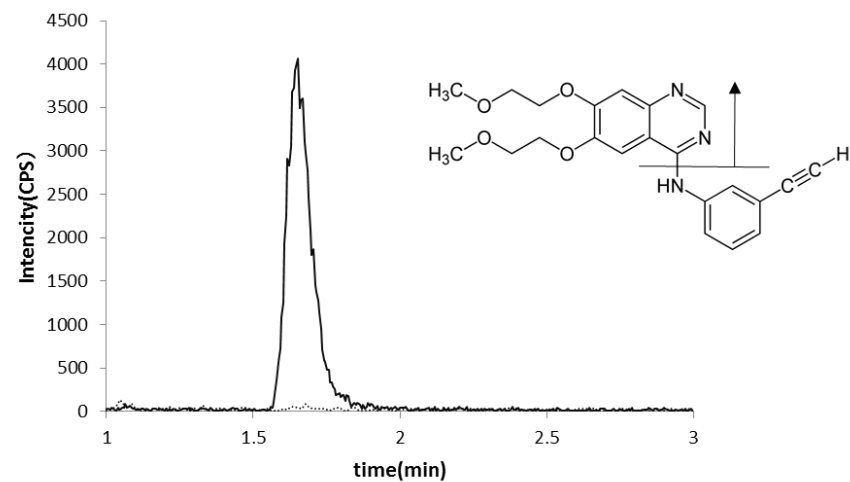
2-3-5-1. エルロチニブ及びアフアチニブ測定の分析バリデーション

イオンソースのパラメーターは、Curtain Gas=50、Collision Gas=8、IonSpray Voltage=5500、Temperature=500、Ion Source Gas1=70、Ion Source Gas2=70 であり、MS/MS の条件はエルロチニブでは Declustering potential=136.0 volts、Entrance potential=10.0 volts、collision energy=45.0 volts、collision cell exit potential=24.0 volts、アフアチニブでは Declustering potential=96.0 volts、Entrance potential=10.0 volts、collision energy=41.0 volts、collision cell exit potential=14.0 volts であった。エルロチニブ及びアフアチニブの MRM トランジションは、 m/z : 394.1→277.8 及び m/z : 485.7→370.8 を用いた。それぞれの LLOQ 及びブランク DBS の MRM クロマトグラムを Figure 5 に示す。エルロチニブ及びアフアチニブは、DBS 中において、選択的に検出された。また、分析バリデーションの結果を、Table 7 及び Table 8 に示す。エルロチニブ及びアフアチニブの精度及び真度は、±15%以内であった。回収率は、エルロチニブは、ほぼ 100%であったが、アフアチニブは、70~80%とやや回収率が低いものの、濃度に依存せず一定であった。いずれの薬物もマトリックス効果は認められなかった。一方で、エルロチニブは、DBS 中において 1 か月間室温で安定であったのに対して、アフアチニブは、室温において安定性の低下が認められた。-20℃で保管した場合は、両薬剤とも安定であった。

2-3-5-2. DBS 法による NSCLC 患者における血中エルロチニブ及びアフアチニブ濃度測定

エルロチニブを服用中の 7 人の患者及びアフアチニブを服用中の 5 人の患者を対象に、DBS 中濃度と血漿中濃度の測定を行った結果、両薬剤とも DBS 中濃度と血漿中濃度の間に、良好な直線性が認められた。Passing-Bablok 回帰及び Bland-Altman 分析の結果を Figure 6 及び Figure 7 に示す。回帰直線の傾きは、エルロチニブにおいて 0.764 (95%信頼区間、0.673~0.917)、アフアチニブにおいて 1.087 (95%信頼区間、-0.440~1.306) であった。Bland-Altman 分析において、DBS 中濃度に対する血漿中濃度のバイアスは、エルロチニブにおいて、27.93% (95%信頼区間、20.81%~35.05%) であり、アフアチニブにおいて -0.56% (95%信頼区間、-4.06%~2.94%) であった。エルロチニブでは、血漿中濃度に比べて、DBS 中濃度がやや低い傾向が認められた。

Erlotinib (m/z: 394.1 → 277.8)



Afatinib (m/z: 485.7 → 370.8)

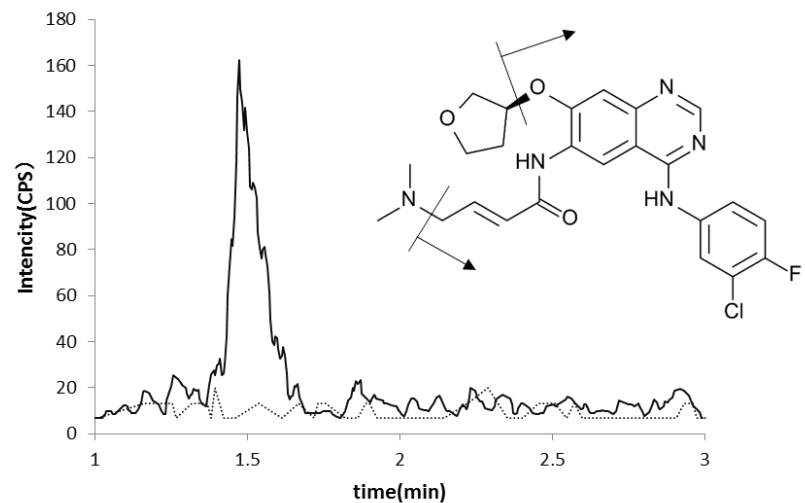


Figure 5 MRM chromatograms of erlotinib and afatinib at lower limit of quantification (100 ng/mL and 2 ng/mL, LLoQ) and dried blood spot (DBS) blanks

Table 7 Summary of method validation results of dried blood spot (Erlotinib)

QC level		High (%)	Medium (%)	Low (%)
Concentration (ng/mL)		4,000	1000	200
Intra-day precision (N=5)		8.7	5.9	5.0
Inter-day precision (N=3)		1.5	3.4	4.5
Accuracy (N=5)		92.3	92.7	88.9
Recovery (N=3)		91.8 ± 1.5	91.4 ± 1.9	97.3 ± 7.4
Matrix effect (N=3)		104.4 ± 2.8	101.9 ± 1.4	101.8 ± 3.1
Room temperature stability (N=3)	24 h	104.7 ± 11	114.2 ± 2	101.5 ± 1.7
	1 month	109.3 ± 10.8	104 ± 4.6	107.5 ± 3.2
−20°C stability (N=3)	24 h	109.2 ± 2.3	105.7 ± 12.7	109.4 ± 8.6
	1 month	101.8 ± 3.7	97.7 ± 5.6	111.3 ± 0.5

QC: quality control, LLoQ: lower limit of quantification

Table 8 Summary of method validation results of dried blood spot (Afatinib)

QC level		High (%)	Medium (%)	Low (%)
Concentration (ng/mL)		800	200	4
Intra-day precision (N=5)		5.2	8.0	3.8
Inter-day precision (N=3)		6.8	1.8	1.4
Accuracy (N=5)		96.3	87.5	89.0
Recovery (N=3)		77.1 \pm 2.3	84.9 \pm 2.1	76.7 \pm 6.7
Matrix effect (N=3)		72.5 \pm 6.2	70.4 \pm 5.2	77.9 \pm 6.4
Room temperature stability (N=3)	24 h	95.9 \pm 1.8	98.3 \pm 11.2	110.0 \pm 13.2
	1 month	68.1 \pm 2	56.5 \pm 3.4	61.7 \pm 2.9
–20°C stability (N=3)	24 h	105.4 \pm 3.6	90.8 \pm 9.4	108.3 \pm 12.6
	1 month	96.9 \pm 6.2	90.8 \pm 6.7	110.0 \pm 5.0

QC: quality control, LLoQ: lower limit of quantification

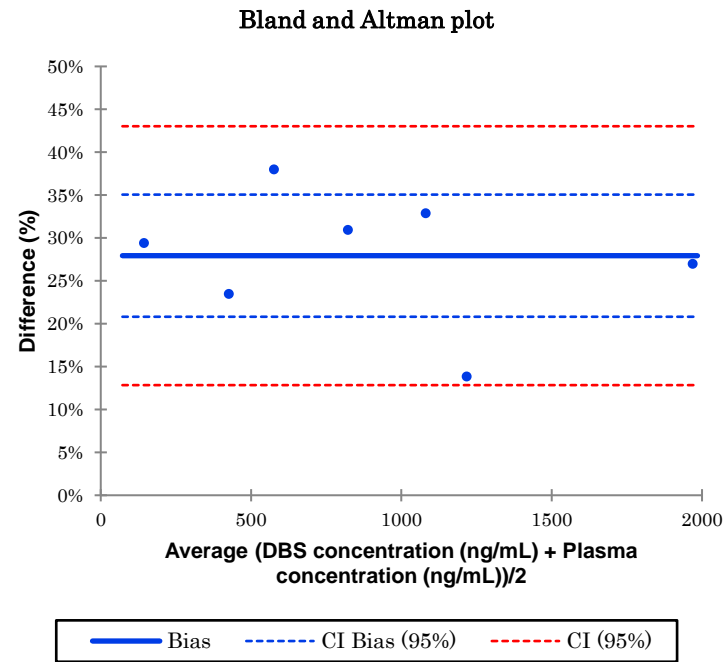
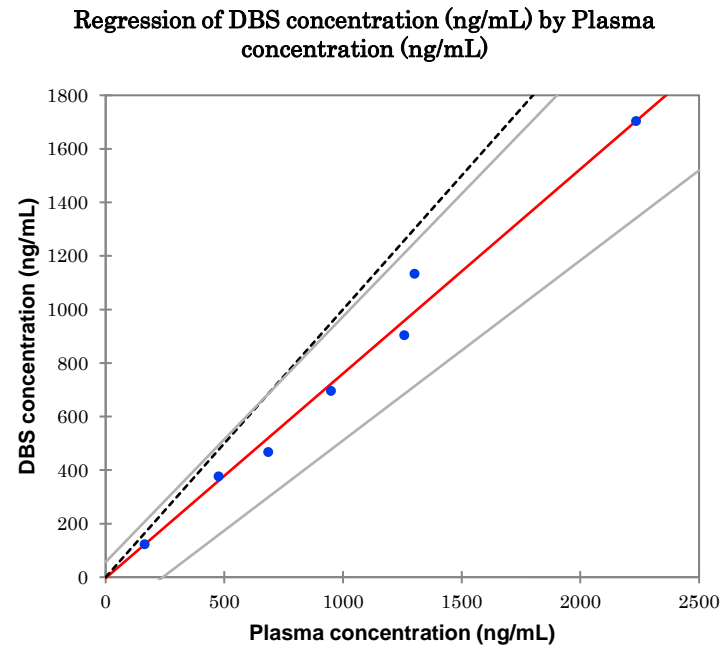


Figure 6 Passing-Bablok regression and Bland-Altman analysis between erlotinib dried blood spot (DBS) concentrations and plasma concentrations for 7 patient samples

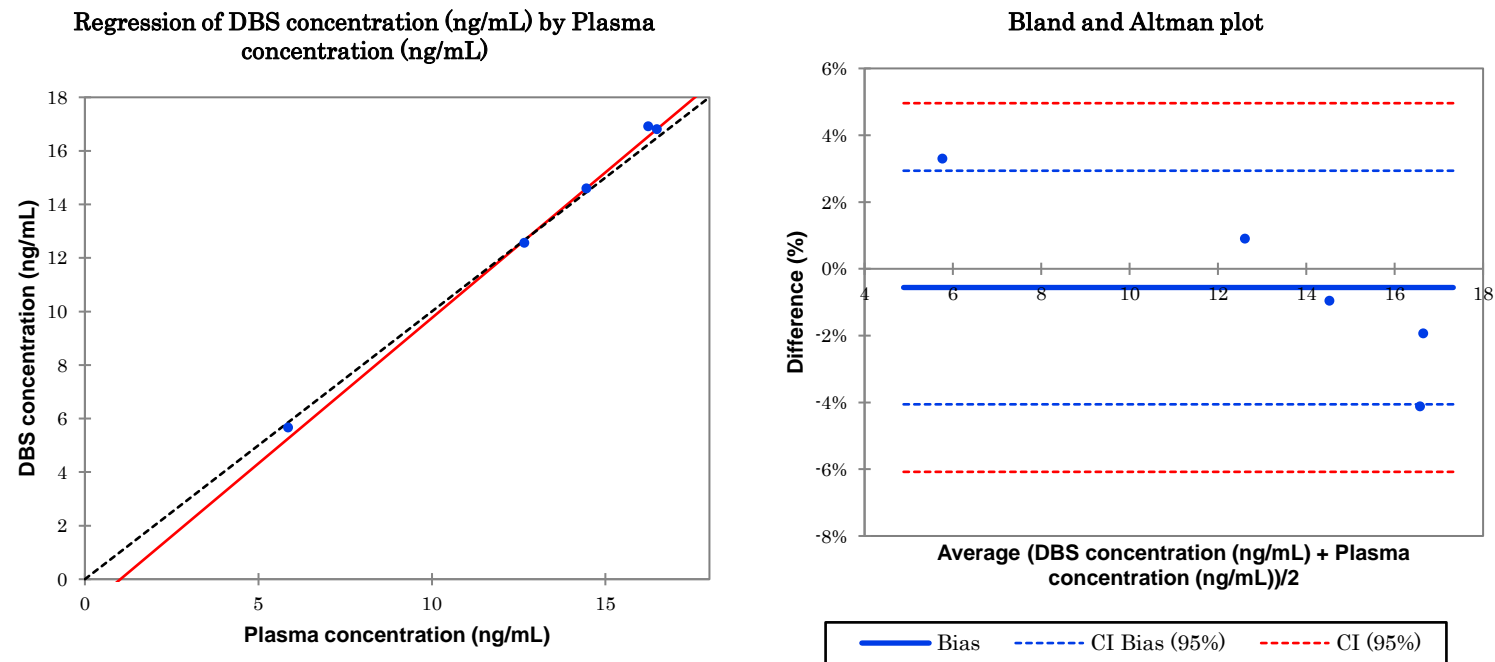


Figure 7 Passing-Bablok regression and Bland-Altman analysis between afatinib dried blood spot (DBS) concentrations and plasma concentrations for 5 patient samples

2-4. 考察

ゲフィチニブの薬物動態に関する臨床研究では血漿中濃度が用いられ³⁷⁻³⁹⁾、HPLC-UV³³⁾や LC-MS/MS³⁴⁾を用いて測定されている。しかし、静脈血採血は、病院や診療所などの医療機関において、医師や看護師など特別な資格を持った医療スタッフが行う必要があり、採血のタイミングも限られる。本研究では、LC-MS/MS を用いた DBS 中濃度の測定法を構築し、NSCLC 患者において指先採血で得た DBS 中ゲフィチニブ濃度が、血漿中濃度とよく相関することを実証した。DBS 法を用いることで、低侵襲性・簡便な手技でゲフィチニブの血中濃度を評価することができる。

分析バリデーションの結果は、BMV ガイドライン³⁶⁾の基準を満たす結果であった。最適化した MRM トランジションは、ゲフィチニブ及びエルロチニブ (IS) の過去の LC-MS/MS を用いた測定法の報告^{34,40)}と一致した。ゲフィチニブの承認用量である 250mg を連日内服したときのトラフ濃度 (平均 200 ng/mL⁴¹⁾) を含む範囲で、検量線は良好な直線性を示し、この濃度範囲の QC 試料を用いた精度及び真度の評価は良好であった。LC-MS/MS を用いた分析においては、安定同位体標識された内標準物質を用いることが理想的であるが、本研究では、エルロチニブを内標準物質として用いた。エルロチニブは、ゲフィチニブと同じ EGFR-TKI であり、ゲフィチニブと同時に投与されることはなく、DBS 抽出溶液であるメタノールに溶解し、ゲフィチニブと同じ LC-MS/MS の条件で同時測定が可能であることから内標準物質として選択した。同様に、エルロチニブ、アファチニブの測定においては、ゲフィチニブを内標準物質として用いることが可能であった。

安定性の評価では、ゲフィチニブは DBS 中で少なくとも 5 か月間室温で安定であった。採取した検体を室温で保管できることは、保管や運搬に保冷を必要とせず、臨床研究におけるコストを削減することができる。また、患者自ら採取した検体を測定機関に郵送すれば、自宅や薬局においても DBS の試料を得ることができ、LC-MS/MS の備えていない施設やこれまで評価が困難であったタイミングでも、血中濃度を評価することが可能であると考えられる。これらのことは、薬物動態を評価する臨床研究を行う上で障害となる研究の煩雑性や制限を解決でき、臨床薬物動態学的研究における DBS 法の重要な利点であると考えられる。

一方で、医薬品の開発時における薬物動態の評価や臨床現場における TDM には、血清中・血漿中濃度が一般に用いられる。本研究では、ゲフィチニブを服用中の NSCLC 患者の指先採血によって得た DBS 中ゲフィチニブ濃度と血漿中濃度との間には、良好な直線性が認められた (Figure 4)。Bland-Altman 分析では、DBS 中濃度に対して血漿中濃度の 6.33%の偏りが認められ、この結果に基づくと血漿/全血 (DBS) 比は、1.063/1 である。この比を用いて、DBS 中濃度から逆

算した血漿中ゲフィチニブ濃度の平均は、212.1 ng/mL であり、実際の血漿中濃度（平均 214.0 ng/mL）との乖離は、わずか-0.4%（範囲：-7.3 %~9.9%）であった。この値は、ゲフィチニブの固体間変動の大きさに比べて十分小さく、DBS 法の利点を考慮すると、血中濃度と治療効果や副作用を比較するために用いることができると考えられる。

しかしながら、DBS 法では、滴下する血液量やヘマトクリット値、DBS の不均一性など、測定値に対するいくつかの潜在的な影響因子があることが報告されている⁴²⁾。特に、ヘマトクリットの影響はよく知られており⁴³⁻⁴⁴⁾、本研究では、ヘマトクリット値が正常範囲か、やや低い患者しか含まれておらず、ゲフィチニブの DBS 中濃度に対するヘマトクリット値の影響については、さらなる検討が必要である。

DBS 法を用いたエルロチニブの測定に関しては、BMV ガイドラインの基準を満たす結果であった。アフアチニブでは、やや DBS 中からの抽出効率が悪い傾向があったが、回収率は濃度によらず一定であり、測定全体における真度は、±15%以内であったことから許容可能であると判断した。しかしながら、DBS 中におけるアフアチニブの室温における安定性は、1 か月間で低下したため、アフアチニブの測定においては、採取から 24 時間以内に-20℃で保管する必要性が示唆された。

エルロチニブ及びアフアチニブにおいても、DBS 中濃度と血漿中濃度と間に、良好な直線性が認められた。エルロチニブにおいては、血漿中濃度比べ DBS 中濃度が低い傾向が認められたが、Bland-Altman 分析より得られたバイアスに基づき、DBS 中濃度から血漿中濃度を逆算することが可能であると考えられる。しかしながら、症例数が少なく、ゲフィチニブと同様にヘマトクリット値の影響などは十分に検討できていないことから、さらなる検討が必要であると考えられる。

2-5. 結論

本研究では、LC-MS/MS を用いたゲフィチニブの DBS 中濃度測定法を構築した。10 人の NSCLC 患者を対象とした臨床研究において、DBS 中濃度と血漿中濃度との間には良好な直線性が認められ、本法を用いてゲフィチニブの血中濃度を低侵襲かつ簡便に評価することが可能であると考えられる。また、エルロチニブ及びアフアチニブの測定における DBS 法の使用も可能であることが示された。

第三章 非小細胞肺癌患者におけるニボルマブ血中濃度測定法の構築

3-1. 諸言

ニボルマブは、programmed death-1 (PD-1) を標的とする完全ヒト化 IgG4 モノクローナル抗体であり、PD-1 を介したシグナル伝達を阻害することで、がん細胞に不応答となっていた抗原特異的 T 細胞を回復・活性化させ、抗腫瘍免疫応答を誘導する。ニボルマブは、悪性黒色腫、NSCLC、ホジキンリンパ腫、腎細胞がん、胃がん、頭頸部がんなどの治療薬として承認されている。一部の患者では高い治療効果が見られ、Durable responses と呼ばれる持続的な抗腫瘍効果により、長期生存が得られる場合がある。しかし、医療経済的な問題や、間質性肺炎、I 型糖尿病、内分泌障害などの免疫関連有害事象のリスクから、ニボルマブの最適使用のためには適切な患者選択が必要である。腫瘍細胞上の Programmed death-ligand 1 (PD-L1) の発現が、治療効果を予測するための潜在的なバイオマーカーとして、NSCLC において報告されている⁴⁹⁻⁵⁰⁾。DNA ミスマッチ修復欠損や高度のマイクロサテライト不安定性⁵¹⁾、腫瘍組織中の遺伝子変異量 (total mutation burden, TMB)⁵²⁾が、患者選択の基準として使用されはじめている。

一方で、NSCLC におけるニボルマブの用量とレスポンスを評価した臨床試験では、ニボルマブの用量 (1~10 mg/kg、2 週毎投与) と、全生存期間や治療の中止または死亡に関連する有害事象 (adverse events leading to discontinuation or death, AEs-DC/D) との間には、関連は認められなかった⁵³⁾。また、悪性黒色腫においても同様に、ニボルマブの用量 (0.1~10mg/kg、2 週毎投与) と全生存期間や AEs-DC/D との間には、関連は認められなかった⁵⁴⁾。これらを受けて現在、体重換算を行わない固定用量 (240 mg/body、2 週毎投与) の投与レジメンが使用され始め、体重換算で投与量を決めるレジメンと同等の効果があることが報告されている⁵⁵⁾。

しかしながら、ニボルマブのクリアランスは、パフォーマンスステータス (PS) や推定糸球体濾過量 (eGFR)、性別、人種、体重など多くの影響を受けることが知られている⁵⁶⁾。現時点においては、ニボルマブの用量と治療効果に関連はないため、ニボルマブの TDM は臨床現場で行われていないが、ニボルマブが有効性を示す最小の濃度が明らかにし、血中濃度に基づいた合理的な投与法を確立することができれば、過量投与や投与回数を減らすことができ、薬剤費用の抑制も可能であると期待される。

一方、ニボルマブの血中濃度を測定できる医療施設は、非常に限られている。

従来、酵素結合免疫測定法（Enzyme-linked immuno sorbent assay、ELISA）などのリガンド結合法（Ligand binding assays、LBAs）が抗体医薬品の定量に用いられている⁵⁷⁾。しかしながら、LBAsは、交差反応性を回避することが難しく、ダイナミックレンジの狭さや汎用性の低さなどの問題がある。近年、抗体医薬品をトリプシン消化し、特異的なペプチドをLC-MS/MSを用いて検出する定量法が報告されており、LBAsに比べて選択性が高く、ダイナミックレンジが広く、汎用性の高い方法として注目されている⁵⁸⁻⁵⁹⁾。セツキシマブ⁶⁰⁾やインフリキシマブ⁶¹⁾、リツキシマブ⁶²⁾などいくつかの抗体医薬品のLC-MS/MSを用いた測定法が報告されている。Iwamotoらは、抗体医薬品の可変部位を選択的にトリプシン消化分解するnSMOL法（nano-surface and molecular-orientation limited proteolysis）を用い、ニボルマブのLC-MS/MSを用いた測定法を報告し⁶³⁾、ChiuらはProtein GによるIgG精製と組み合わせたニボルマブを含む抗体医薬品の測定法を報告している⁶⁴⁾。しかしながら、LC-MS/MSを用いた患者検体中のニボルマブの測定は、ほとんど行われていない。

本研究では、LC-MS/MSを用いたニボルマブの血漿中濃度測定法の構築を行った。LC-MS/MSを用いた抗体医薬品の測定の概略をFigure 8に示す。本研究においては、血漿中からProtein Aを用いてIgGを精製し、ニボルマブに特異的なペプチドをLC-MS/MSで検出した。標的としたペプチドはin silicoシミュレーションにより特定した。ニボルマブのトリプシン消化によって生じるペプチドをシミュレーションし、その中から、血漿タンパク質のトリプシン消化においても、選択的に検出できる質量のペプチドをニボルマブのサロゲートペプチドとして選択した。

またニボルマブの合理的な投与設計を行うためには、少ない採血ポイントから患者の血中濃度を予測し、投与設計を行うことが必要である。そこで、構築した血中濃度測定法を用いて、ニボルマブによる治療を受けているNSCLC患者のニボルマブ血漿中濃度の測定を行い、母集団薬物動態学的解析に基づく血中濃度の予測を行い、血中濃度の予測に必要なサンプル数の検討を行った。

さらに、ニボルマブ投与後にEGFR-TKIを使用した患者、胸水及び腹水を有する患者、ニボルマブによる間質性肺炎を発症した患者、ニボルマブ長期奏効患者における薬物動態について探索的に検討を行った。ニボルマブ投与後にEGFR-TKIを使用した患者において、間質性肺疾患の発症が死亡例も含め報告されている⁶⁵⁾。また、胸水や腹水は、NSCLCの一般的な合併症であるが、日本で行われた臨床試験においては、胸水及び腹水を有する患者は除外されており、これらの患者でのニボルマブの薬物動態は明らかではない。さらに間質性肺炎は、ニボルマブの重篤な有害事象の1つであり、ニボルマブを投与された患者の約5%で発症し、1%の患者で致死的となる⁶⁶⁾。また、ニボルマブの治療では、一部の患者でDurable responseと呼ばれる長期間の奏効が得られ、腫瘍の縮小が長く

維持される。しかしながら、その場合、どこまでニボルマブの投与間隔をあけることが可能かは明らかではない。NSCLC の承認用量は、3 mg/kg を 2 週間ごとの投与であるが、頻回の投与は患者にとって負担であり、医療経済的にも望ましくない。本研究では以上の特徴を有する患者の、薬物動態と臨床経過を後方視的に検討した。

最後に、現在、臨床現場においては、多くの抗体医薬品が使用されており、一部の抗体医薬品においては、その血中濃度と効果や副作用の関連が示唆されている。今後、抗体医薬品の血中濃度測定的需求が高まる可能性があり、本研究で構築したニボルマブの測定法は、ニボルマブに限らず抗体医薬品全般に応用ができる方法であると考えられる。そこで、ニボルマブと同じ PD-1 抗体を標的とする免疫チェックポイント阻害薬であるペンブロリズマブの血中濃度が、本測定法と同様のワークフローで測定できるか検討を行った。免疫学的な測定方法では、抗原を同じとする抗体医薬品を同時に測定することは困難であるが、質量分析法では、それぞれの質量が異なるため、同じ抗原を標的とした抗体医薬品でも選択的に検出することができる。

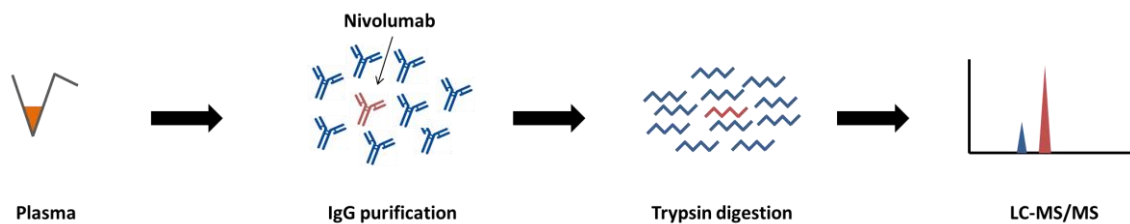


Figure 8 Quantification method of nivolumab using LC-MS/MS

3-2. 方法

ニボルマブ（オプジーボ点滴静注®、10 mg/mL）は、Ono Pharmaceutical Co., Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。アセトニトリル、ギ酸、グリシン、塩酸、tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) は、ナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した。rProtein A Sepharose Fast Flow は、BD Biosciences (San Jose, CA, USA) から入手した。ProteinWorks eXpress Digest Kits 及び ProteinWorks uElution SPE Clean-up Kit は、Waters Corporation (Milford, MA, USA) から購入した。

3-2-1. ニボルマブ測定のための LC-MS/MS の条件

すべての分析は、四重極型質量分析計である QTRAP4500 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) を用いて行った。オペレーションソフトウェアは、Analyst 1.6.2 (AB Sciex) を用いて行った。試料は、陽イオンエレクトロスプレーを用いてイオン化し、MRM モードにより標的化合物を検出した。また液体クロマトグラフィーは、1260 LC system (Agilent, Waldbronn, Germany) を用いた。移動相には、0.1% ギ酸水溶液 (A) と 0.1% ギ酸を含むアセトニトリル (B) のグラジエント溶出を用いた。分析カラムは、まず A : 90%、B : 10% に平衡化し、試料を注入後、13 分間で直線的に A : 90→10%、B : 10→90% に変化させた。その後、再び 7 分間 A : 90%、B : 10% に平衡化した。インジェクションサイクルは 20 分間とした。分析カラムには、InertSustainSwift C18 analytical column Inertsil® Peptides C18 analytical column (4 µm, 2.1 × 150 mm; GL Sciences, Tokyo, Japan) を用いて、カラム温度は 40°C、流量は 0.3 mL/min で行った。

3-2-2. In Silico トリプシン消化シミュレーション

In Silico トリプシン消化シミュレーションは、Skyline software (version 3.5, MacCoss Lab Software, University of Washington, WA, USA) を用いて行った。ニボルマブのサロゲートペプチドは、次の設定を用いて選択した。消化酵素はトリプシン、切断部位は KR|P、最小ペプチド残鎖は 5、除外ペプチドはシステインを含むペプチド、バックグラウンドプロテオームは Peptide Atlas から得た血漿タンパクデータ (HumanPlasma_2012-08, <http://www.peptideatlas.org/specplib/>) を用いた。

3-2-3. ニボルマブ測定の標準溶液

分析に用いたニボルマブの標準溶液は、50~2,000 µg/mL の濃度となるようにニボルマブ (10 mg/mL) を精製水で希釈して調製した。検量線試料は、標準溶液を 200、100、50、25、12.5、6.25 及び 5 µg/mL の濃度になるように血漿に添加

(1/10 容量) して調製した。同様に QC サンプルは、160 µg/mL (高濃度)、80 µg/mL (中濃度)、10 µg/mL (低濃度)、5 µg/mL (LLOQ) になるように標準溶液を血漿に添加 (1/10 容量) して調製した。

3-2-4. 血漿中の IgG 精製

IgG 結合緩衝液、IgG 溶出緩衝液、中和緩衝液として、それぞれ Tris 緩衝液 (50 mM、pH=9.0)、グリシン HCl 緩衝液 (1 M、pH=2.0)、Tris 緩衝液 (1 M、pH=9.0) を用いた。1.5 mL のマイクロチューブ (WATSON Co., Ltd., Tokyo, Japan) 中で rProtein A Sepharose Fast Flow 50 µL を IgG 結合緩衝液 1 mL に加え、そこに 50 µL の血漿を加えた。10 分間室温で転倒混和しながら血漿中 IgG を結合させた後、1 mL の IgG 結合緩衝液で 1 回洗浄した。スピンドウンして rProtein A Sepharose Fast Flow を沈殿させた後、IgG 結合緩衝液を除き、IgG 溶出緩衝液 200 µL を加えて IgG を溶出し、新しいマイクロチューブへ移し、中和緩衝液 50 µL を加えて中和した。

3-2-5. トリプシン消化及び固相抽出

トリプシン消化及び固相抽出は、proteinWorks eXpress Digest Kits 及び ProteinWorks uElution SPE Clean-up Kits を用いて、各製品のマニュアルに従い次のとおりに行った。rProtein A を用いて精製した IgG に変性剤を加え、80°C で熱変性させた後にアルキル化剤及び還元剤を加えてアルキル化及び還元を行った。その後 45°C で一晩トリプシン消化を行った。トリプシン消化したペプチド溶液は、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。最終溶液は 100 µL となり、このうち 10 µL を LC-MS/MS に注入して分析を行った。

3-2-6. ニボルマブ測定の分析バリデーション

バリデーションの手順は、BMV ガイドライン ³⁶⁾ 及び Recommendations for Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics を参考にを行った ⁵⁸⁾。

3-2-6-1. ニボルマブの検量線

検量線試料は、バリデーション実施ごとに作成した。ニボルマブのピーク面積を濃度計算に用いた。検量線式は、最小二乗法 (1/x 重み付け) を用いた。

3-2-6-2. ニボルマブ測定における精度及び真度

精度及び真度の日内変動は、標準溶液の高濃度、中濃度、低濃度、定量下限の 4 つの濃度の試料を各 5 検体測定することで評価した。精度の日間変動は、3 日間の異なる日に測定を行い評価した。精度は、RSD% として、真度は理論値に対

する RE%として算出した。精度及び真度は BMV ガイドラインで必要とされる $\pm 15\%$ 以内を許容可能とした。

3-2-6-3. ニボルマブ測定における選択性及びキャリーオーバー

選択性は、異なる 6 人のブランク血漿試料を測定し、ニボルマブと同一保持時間における阻害ピークの有無を評価した。キャリーオーバーは、検量線濃度系列の最高濃度の試料を測定後に、ブランク試料を測定し、阻害ピークの有無を評価した。選択性及びキャリーオーバーの評価において、阻害ピークの面積は、BMV ガイドラインで必要とされる定量下限の 20% 以下及び IS の 5% 以下を許容可能とした。

3-2-6-4. ニボルマブ測定における回収率及びマトリックス効果

ニボルマブからの回収率を評価するため、血漿中ニボルマブのピーク面積と、同一濃度になるように標準溶液を添加した試料のピーク面積を比較した。マトリックス効果の評価は、ブランク試料に、標準溶液を添加したマトリックス(血漿 IgG のトリプシン消化溶液)を含む試料のピーク面積と、マトリックスを含まない同一濃度の標準溶液のピーク面積を比較した。回収率及びマトリックス効果の評価は、高濃度、中濃度、低濃度の 3 つの QC 試料の濃度 (N=3) で評価を行った。

3-2-6-5. ニボルマブの安定性

血漿中におけるニボルマブの安定性は、血漿を -60°C で 3 カ月保管し評価した。また、オートサンプラー (15°C) 中における安定性は、12 時間後に検量線及び QC サンプルを再測定して評価した。安定性の評価は、高濃度、中濃度、低濃度の 3 つの QC 試料の濃度 (N=3) で行った。各濃度における QC 試料の平均真度は、BMV ガイドラインで必要とされる $\pm 15\%$ 以内を許容可能とした。

3-2-7. NSCLC 患者の血中ニボルマブ濃度の測定

ニボルマブの投与 (3 mg/kg、2 週毎投与) を受けている NSCLC 患者を対象として、ニボルマブの血中濃度の測定を行った。血液検体は、ニボルマブの初回投与から最終投与の 3 か月後までの期間に行った。エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid、EDTA) を含む採血管 (Terumo Venoject II、TERUMO Corp.、Tokyo、Japan) を用いて静脈血採血を行い、 $4,300 \times g$ で 10 分間遠心分離することで血漿を得た。血漿試料は、 -60°C で保管した。患者情報として、診療録から性別、人種、投与開始時における eGFR、PS、体重、ニボルマブ投与量を収集した。本臨床研究は、先端医療センターの倫理委員会の承認 (承認番号: 16-17) を得て行った。検体採取の前までに、すべての患者から文書に

よりインフォームドコンセントを得た。

3-2-8. NSCLC 患者におけるニボルマブの薬物動態解析

ニボルマブの薬物動態 (Pharmacokinetics、PK) は、過去に報告されている Bajaj らの母集団薬物動態 (population pharmacokinetics、PPK) モデル⁵⁶⁾に基づき解析を行い、ベイズ法を用いて個々の PK パラメーターを推定した。Bajaj らの PPK モデルは 2 コンパートメントモデルであり、クリアランス (Clearance、CL) の共変量として体重、eGFR、PS、人種、性別が含まれ、中央コンパートメントの分布容積 (distribution volume of central compartment、V1) の共変量として体重及び性別が含まれる。コンパートメント間クリアランスの変動効果を 0 に固定した PK パラメーターを用いて、個々の PK プロファイルのシミュレーションを行った。すべての PK 解析は、非線形混合効果モデルプログラミングである Phoenix NLME version 7.0 (Certara、St. Louis、MO、USA) を用いて行った。

3-2-9. 最小必要採血ポイント数の検討

本研究では、14 人の患者から 4～15 ポイントのニボルマブ血中濃度が得られた。このデータを用いてニボルマブの血中濃度、CL、V1 を推定するために必要な最小必要採血ポイント数の検討を行った。各患者の最初の 1 ポイントまたは 4 ポイントの採血ポイントを用いて、推定精度の評価を行った。1 ポイント及び 4 ポイントはすべての対象患者から得られており、比較可能な最小と最大の採血ポイント数である。推定した定常状態の血中濃度 (C_{ss})、投与 0～14 日目の濃度曲線下面積 (AUC_{day0-14})、CL 及び V1 を、すべての採血ポイント (4～15 ポイント) から得られる推定値と比較した。予測の精度は、下記の計算式で求めた平均絶対パーセント誤差 (mean absolute percentage error、MAPE) を用いて評価した。

$$\text{MAPE} = \sum_{i=1}^N \left| \frac{X_{\text{all},i} - X_{\text{limited},i}}{X_{\text{all},i}} \right| \times 100$$

N は、患者数であり、X_{all,i} 及び X_{limited,i} は、それぞれ全採血ポイント及び限られた採血ポイントから予測した CL、V1、AUC_{day0-14}、および C_{ss} の値を示す。

3-2-10. ニボルマブ投与後にアファチニブを投与した患者におけるニボルマブ薬物動態の検討

本研究の Patient 2 は、EGFR 遺伝子変異陽性の NSCLC 患者であり、5 次治療としてニボルマブを開始したが、3 コース施行後に増悪しはじめ、ニボルマブ最終投与から 2 週後に EGFR-TKI であるアファチニブ (経口投与、40 mg/日) が開

始となった。このときのニボルマブの薬物動態の推移を記述的に評価した。

3-2-11. 胸水、腹水を有する NSCLC 患者におけるニボルマブ薬物動態の検討

本研究の Patient 2 は、コントロール不良な胸水を合併しており、ニボルマブ治療中に 3 回の胸水ドレナージを行った。また、Patient 10 は、コントロール不良な腹水を合併しており、治療中に 3 回の腹水ドレナージを行った。このときのニボルマブの薬物動態パラメーターを胸水、腹水を認めない患者のパラメーターと比較した。

3-2-12. 間質性肺炎を発現した患者におけるニボルマブ薬物動態の検討

本研究において、Patient 5 及び Patient 7 は、ニボルマブが原因であると考えられる間質性肺炎を発症しており、このときのニボルマブの薬物動態の推移を記述的に評価した。

3-2-13. ニボルマブ長期奏効患者におけるニボルマブ薬物動態の検討

本研究に参加した Patient 11 から Patient 14 の 4 人は、6 カ月以上ニボルマブの効果が持続した患者であり、医師の判断により、3 mg/kg を 4 週間ごとの投与方法に変更された。このときのニボルマブの薬物動態の推移を記述的に評価した。

3-2-14. 別の免疫チェックポイント阻害薬ペンブロリズマブの血中濃度測定への応用

ニボルマブと同様のワークフローで、血漿中から Protein A を用いて IgG を精製し、in silico シミュレーションにより特定したペンブロリズマブに特異的なペプチドを LC-MS/MS で検出した。ペンブロリズマブに特異的なペプチドの、血漿中及びニボルマブ存在下での選択性を検討した

3-3. 結果

3-3-1. ニボルマブのサロゲートペプチド

in silico シミュレーションにより、ニボルマブをトリプシン消化した配列のうち、血漿タンパク質消化物中でも特異的な 3 つのペプチド (ASGITFSNSGMHWVR、GLEWVAVIWYDGSK、NTLFLQMNSLR) を特定した (Figure 9)。それぞれのペプチドのモノアイソトピック分子量は、1648.7780、1621.8140、1335.6969 である。

Heavy Chain Sequence

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCK**ASGITFSNSGMHWVR**QAPGK**GLEWVAVIWYDGSK**R
YADSVKGRFTISRDN**SKNTLFLQMNSLR**AEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVHLQD
WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKLSLSLGK

Light Chain Sequence

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG
SGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQSSNWPRFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figure 9 Nivolumab amino acid sequence of heavy chain and light chain: The gray shading indicates unique to nivolumab in human plasma protein digests in the in silico simulation and bolded indicates nivolumab surrogate peptide used in this study

3-3-2. ニボルマブ測定 of LC-MS/MS の条件

in silico シミュレーションで特定した 3 つのペプチドのうち、ASGITFSNSGMHWVR の配列のペプチドが最も強い強度で質量分析計で検出された。MS survey scan 及び MRM 分析の結果を、Figure 10 に示す。イオンソースのパラメーターは、Curtain Gas=50、Collision Gas=8、IonSpray Voltage=5500、Temperature=500、Ion Source Gas1=40、Ion Source Gas2=70 であり、MS/MS の条件は Declustering potential=101.0 volts、Entrance potential=10.0 volts、collision energy=21.0 volts、collision cell exit potential=22.0 volts であった。3 電荷を帯びた ASGITFSNSGMHWVR のピークが、 m/z : 550.6 に観察され、MRM 分析では、ASGITFSNSGMHWVR の配列と一致するフラグメントイオンが観察された。

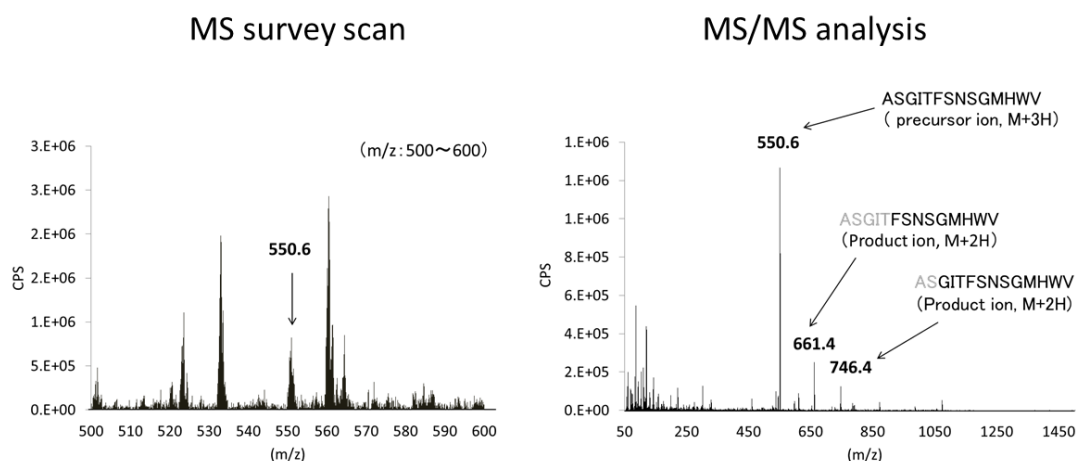
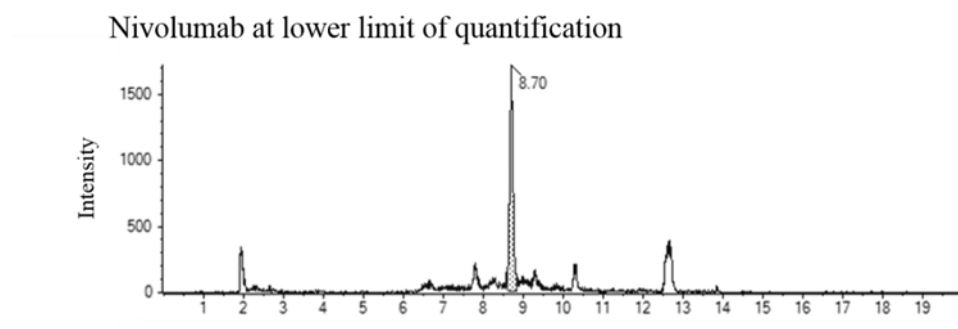


Figure 10 MS survey scan and MRM analysis of nivolumab digest: A peak of ASGITFSNSGMHWVR with 3 charges at m/z 550.6 and a fragmentation consistent with the sequence, ASGITFSNSGMHWVR

最適化した ASGITFSNSGMHWVR の MRM トランジションは、 m/z : 550.6→661.4 であった。LLoQ (5 $\mu\text{g/mL}$) における MRM クロマトグラムを Figure 11A に示す。標的ペプチドは 8.70 分で溶出した。

(A)



(B)

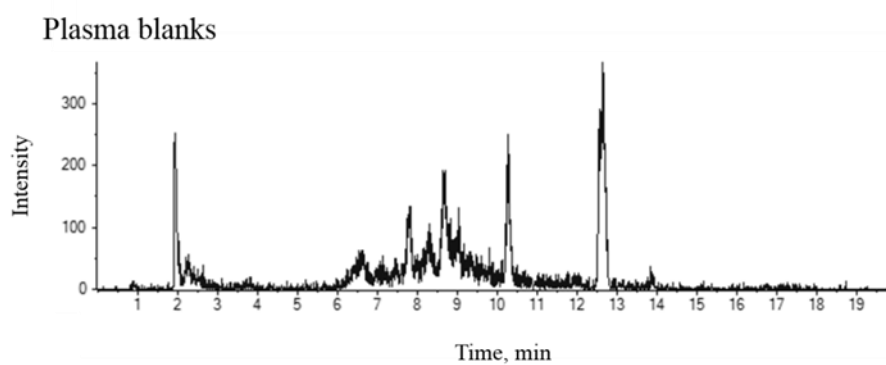


Figure 11 MRM chromatograms of (A) nivolumab at lower limit of quantification (5.0 $\mu\text{g/mL}$) in human plasma and (B) plasma blanks

3-3-3. ニボルマブの分析バリデーション

3-3-3-1. ニボルマブ測定の実選性とキャリーオーバー

ブランク血漿の MRM クロマトグラムを Figure 11B に示す。ヒト血漿 IgG に由来する阻害ピークは認められなかった。検量線濃度系列の最高濃度の試料を分析後に、測定したブランク試料においても、キャリーオーバーに起因する阻害ピークは認められなかった。

3-3-3-2. ニボルマブの検量線

検量線は、5～200 µg/mL の範囲において良好な直線性 (相関係数 $[R^2]=0.99$) を示した。すべての検量線検体の濃度は、BMV ガイドラインで必要とされる理論値の±15%以内であった。

3-3-3-3. ニボルマブ測定における精度及び真度

精度の日内変動、日間変動及び真度の日内変動は、すべての QC 試料において、BMV ガイドラインで必要とされる±15%以内であった (Table 9)。

3-3-3-4. ニボルマブ測定における回収率とマトリックス効果

回収率及びマトリックス効果を Table 9 に示す。回収率は、30～40 %とやや低かったが、濃度によらず一定であった。また、血漿 IgG 由来成分によるマトリックス効果は認められなかった。

3-3-3-5. ニボルマブの安定性

ニボルマブは、-60℃で少なくとも3か月間安定であり、前処理後の試料は、オートサンプラー内において、15℃で12時間安定であった (Table 9)。各濃度における QC 試料の平均真度は、BMV ガイドラインで必要とされる±15%以内であった。

Table 9 Summary of method validation results

QC level	LLoQ (%)	Low (%)	Medium (%)	High (%)
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	5.0	10.0	80.0	160.0
Intraday imprecision (N = 5)	6.6	11.1	9.4	13.5
Interday imprecision (N = 3)	11.8	6.9	11.3	5.0
Accuracy (N = 5)	111.7	105.6	90.8	110.2
Matrix effect (N = 3, mean \pm SD)	ND	97.6 \pm 3.8	94.9 \pm 2.0	98.1 \pm 3.0
Recovery (N = 3, mean \pm SD)	ND	37.3 \pm 3.7	34.6 \pm 4.3	36.2 \pm 6.5
Stability (N = 3, mean \pm SD) 3 months, -60°C	ND	90.1 \pm 13.7	98.7 \pm 7.7	97.3 \pm 4.8
Processed sample stability (N = 3, mean \pm SD) 12 hours, 15°C	ND	89.6 \pm 11.9	106.4 \pm 2.2	103.9 \pm 10.7

QC: quality control, LLoQ: lower limit of quantification, SD: standard deviation, ND: not determined

3-3-4. NSCLC 患者における血中ニボルマブ濃度測定

日本人の NSCLC 患者 14 人が本研究に参加した。患者背景を Table 10 にまとめる。各患者は 1～31 サイクルのニボルマブの投与を受け、採血はニボルマブの初回投与後 12 日目から 550 日目の期間に実施した。採血ポイントは、各患者 5～15 ポイント、合計 123 ポイントで実施した。それぞれの患者の採血スケジュールを Table 10 に示す。ニボルマブ投与日は投与直前に採血を行った。採血の回数は同意取得した時期や来院頻度により異なる。このうち 7 ポイントの検体は、LLoQ (5 µg/mL) 以下であり、解析から除外した。

3-3-5. ニボルマブの薬物動態解析

全患者のニボルマブ血中濃度の実測値及び予測値を Figure 12 に示す。これらのデータを用いたニボルマブの PK パラメーターの平均値±SD は、CL = 7.9 ± 3.6 (mL/h)、V1 = $3,262 \pm 1,038$ (mL)、半減期 = 25.7 ± 9.5 (days) であった。Diagnostic plots を Figure 13A に示す。個々の予測値に対する観測値のプロットは、Y = X の直線に対して対称的に分布した (Figure 13B)。条件付き重みつき残差 (conditional weighted residual, CWRES) において、それぞれの測定値は、CWRES = 0 の周りに偏りなく均等に分布しており (Figure 13C、D)、良好な予測性を示している。

Table 10 Patient characteristics

Pt	Age	Sex	Histology	PD-L1 Expression	PS	Body weight (kg)	Dose (mg)	eGFR (mL/min/1.73 m ²)	Number of doses	Sampling time (day)
1	61	male	Squamous	< 1%	1	67.5	200	43	7	14, 28, 42, 56, 69, 83, 97, 104, 111, 118, 132, 139, 146, 160, 167
2	48	male	Adenocarcinoma	unknown	0	54.4	167	82	3	14, 28, 42, 49, 69, 98, 119
3	47	female	Adenocarcinoma	unknown	0	76.0	220	63	3	14, 27, 42, 49, 70, 91, 103, 111
4	64	male	Squamous	unknown	2	53.9	160	91	3	14, 28, 56, 70
5	64	male	Squamous	< 1%	1	55.3	160	83	4	14, 28, 42, 56, 70, 84, 91, (105*), (113*), (120*), (126*)
6	59	male	LCNEC	unknown	1	77.3	220	40	1	13, 28, 38, 56, (76*)
7	64	male	Adenocarcinoma	unknown	0	78.0	234	62	4	14, 28, 42, 56, 63, 70, 84, 98, 105, 118, 126
8	77	male	Adenocarcinoma	1-25%	0	43.6	135	86	12	14, 28, 35, 49, 63, 77, 91, 105, 126, 140, 155, 168, 182, 195, 208, 224, 238, 259, 280
9	76	male	Squamous	unknown	2	51.7	150	64	4	18, 32, 37, 45, (60*), 74, 80, 91
10	56	female	Adenocarcinoma	unknown	1	50.1	145	40	3	12, 22, 29, 36, 44, 56, 75, 89, 96, 110
11	69	male	Adenocarcinoma	unknown	0	74.0	220	42	22	245, 252, 260, 315, 322, 329, 336, 343
12	77	male	Adenocarcinoma	unknown	0	78.7	235	75	31	522, 530, 536, 543, 550
13	80	male	Adenosquamous	unknown	0	52.1	153	34	21	378, 406, 413, 419, 426, 434
14	79	male	Adenocarcinoma	unknown	0	66.0	200	59	23	253, 302, 330, 344, 351, 358

eGFR: estimated glomerular filtration rate, LCNEC: large cell neuroendocrine carcinoma, PD-L1: programmed death-ligand 1, PS: performance status, *: lower than LLoQ.

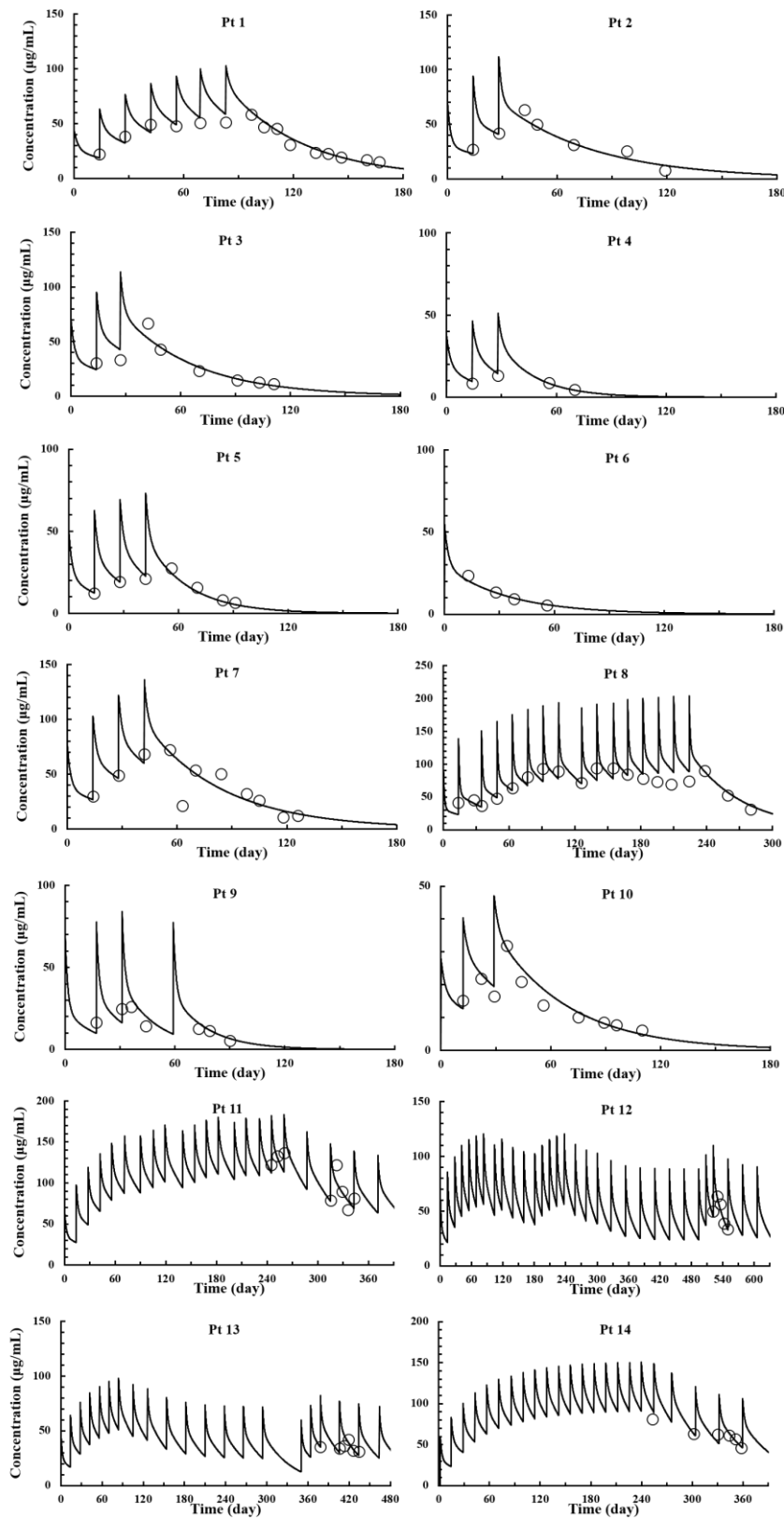


Figure 12 Individual Bayesian estimated profiles and observed nivolumab concentration.

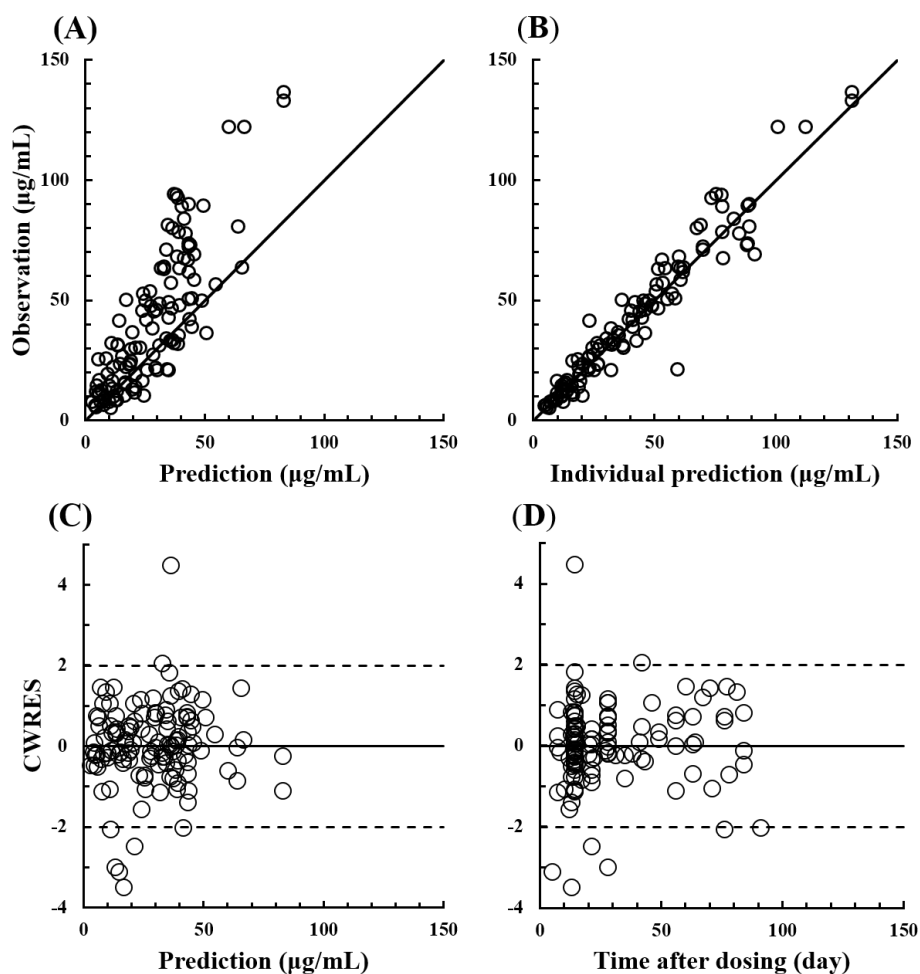


Figure 13 Diagnostic plots for population pharmacokinetic model of nivolumab: (A) observed versus population predictions, (B) observation versus individual predictions, (C) conditional weighted residuals (CWRES) versus population predictions, and (D) CWRES versus time after dosing. Solid lines (A, B) represent $Y = X$ and (C, D) zero conditional residuals. Dashed lines (C, D) represent ± 2 standard deviation.

3-3-6. 最小必要採血ポイント数の検討

投与開始後の1ポイント、4ポイント、または全採血ポイントの測定値をもとに推定したCL、V1、C_{ss}、AUC_{day0-14}をTable 11に示す。全採血ポイントを用いた場合と比較したMAPEは、4ポイントを用いた場合、CL、V1、C_{ss}、AUC_{day0-14}が、それぞれ5.8%、12.0%、6.7%及び6.7%であり、1ポイントを用いた場合では、11.4%、12.7%、12.0%及び12.0%であった。

Table 11 Evaluating the limited sampling strategy of nivolumab

Pt.	CL (mL/h)			V1 (mL)			AUC _{day0-14} (µg·h/mL)			C _{ss} (µg/mL)		
	All data	4 points	1 point	All data	4 points	1 point	All data	4 points	1 point	All data	4 points	1 point
1	7.3	7.3	7.9	4410	3239	3382	22652	22694	20592	67.4	67.5	61.3
2	4.2	4.5	5.5	2301	2237	2401	30058	28344	24535	89.5	84.4	73.0
3	6.3	6.3	6.2	3044	2852	2778	28311	28215	28792	84.3	84.0	85.7
4	15.7	15.7	15.9	4260	4260	3779	8418	8418	8711	25.1	25.1	25.9
5	11.7	11.9	11.6	3110	3639	3595	11670	11262	11776	34.7	33.5	35.0
6	8.9	8.9	8.5	3654	3654	3679	20499	20499	21298	61.0	61.0	63.4
7	5.9	6.1	7.1	3011	3058	3235	32611	30673	27337	97.1	91.3	81.4
8	3.6	3.0	2.6	1113	1317	1267	28326	34080	36543	84.3	101.4	108.8
9	12.0	9.3	7.7	2138	3047	2776	10186	13580	16579	30.3	40.4	49.3
10	8.5	10.2	8.0	5165	3065	2936	14314	12053	14996	42.6	35.9	44.6
11	4.5	4.6	4.7	3089	3075	3098	37656	37430	36016	112.1	111.4	107.2
12	8.8	8.7	8.3	3571	3609	3637	22612	22504	23446	67.3	67.0	69.8
13	6.2	6.3	6.3	3178	3114	2941	20112	20101	19903	59.9	59.8	59.2
14	5.4	5.4	6.2	3281	3298	3155	29648	29302	25815	88.2	87.2	76.8
Mean	7.8	7.7	7.6	3260	3105	3047	22705	22812	22596	67.6	67.9	67.2
SD	3.4	3.4	3.2	1019	694	650	8982	8998	8167	26.7	26.8	24.3

CL: clearance, AUC_{day0-14}: area under the curve from 0–14 days, C_{ss}: mean concentration at steady state, V1: distribution volume of central compartment

3-3-7. ニボルマブ投与後にアファチニブを投与した患者におけるニボルマブ薬物動態の検討

Patient 2 におけるニボルマブの血中濃度測定値と予測濃度推移及びアファチニブの開始時期を Figure 14 に示す。ニボルマブの血中濃度は、1 回目投与の 14 日後に $26.9 \mu\text{g/mL}$ 、2 回目投与の 14 日後に $41.8 \mu\text{g/mL}$ 、3 回目投与の 14 日後に $63.3 \mu\text{g/mL}$ に達した。その後ニボルマブの投与は中止となったが、アファチニブ開始後においてもその血中濃度は持続し、3 カ月以上にわたり体内に残存していた。本症例では、間質性肺疾患は認められなかった。

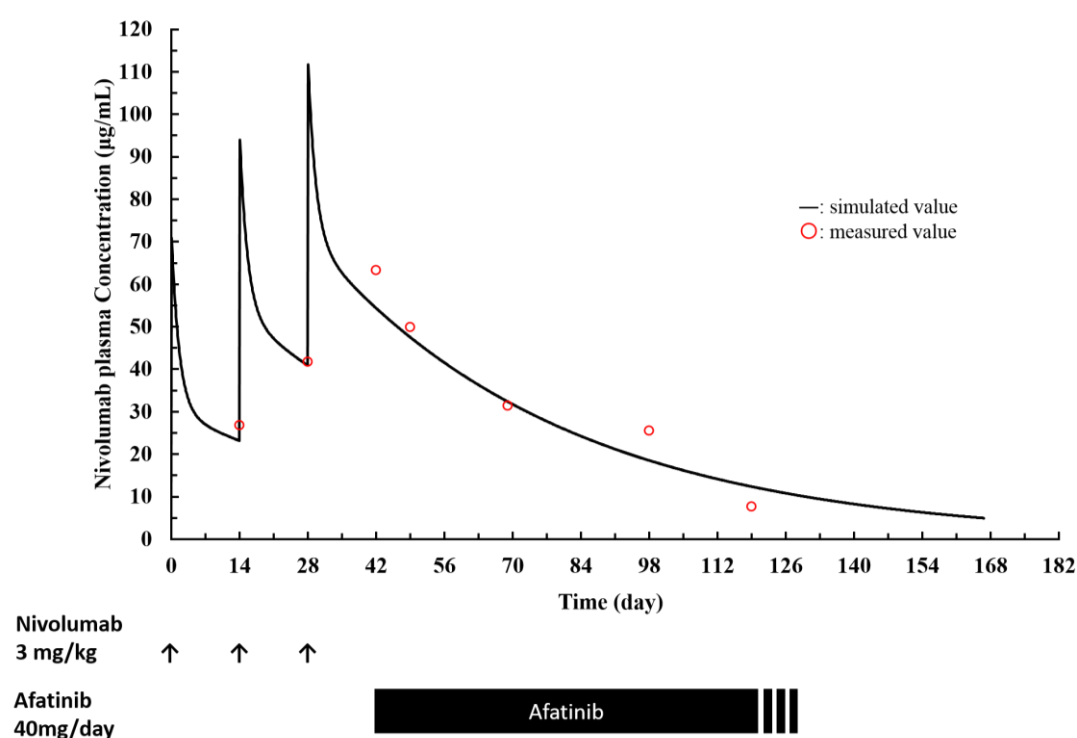


Figure 14 Nivolumab plasma concentration of the patient who subsequently administrated EGFR-TKI, afatinib.

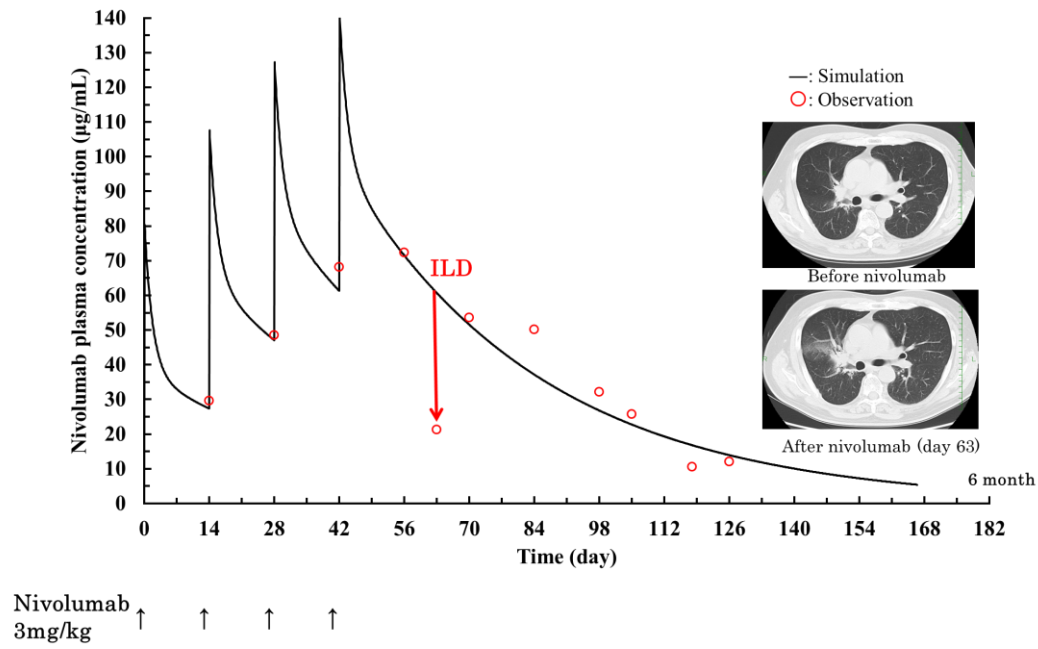
3-3-8. 胸水、腹水を有する NSCLC 患者におけるニボルマブ薬物動態の検討

Paitnet 2 においては、ニボルマブの投与を 3 回受ける間に胸水の貯留を認め、第 15 日目、第 29 日目、第 43 日目に胸水ドレナージを行い、各 1 L の胸水の排出を行った。この患者の PK パラメーターは、CL が 4.2 mL/h、V1 が 2,301 mL、 $AUC_{day0-14}$ が 30,058 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ (Table 10) であり、母平均 (CL : 7.8 \pm 3.4 mL/h、V1 : 3,260 \pm 1,019 mL、 $AUC_{day0-14}$: 22,705 \pm 8,982 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$) に比べて顕著な違いは認められなかった。また、Patinet 10 においては、ニボルマブの投与を 3 回受ける間に腹水の貯留を認め、第 3 日目、第 16 日目、第 28 日目に腹水ドレナージを行い、それぞれ 2 L、2 L、4.4 L の腹水を排出している。この患者の PK パラメーターは、CL が 8.5 mL/h、V1 が 5,165 mL、 $AUC_{day0-14}$ が 14,314 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ (Table 11) であり、母平均に比べて顕著な違いは認められなかった。

3-3-9. 間質性肺炎を発現した患者におけるニボルマブ薬物動態の検討

Patient 7 及び Patient 9 での間質性肺炎発症前後の肺の CT スキャンの画像と、ニボルマブの血中濃度測定値及び予測濃度推移を Figure 15 に示す。両患者ともに肺野にニボルマブ投与前には認められなかった陰影が出現し、ニボルマブによる間質性肺炎と診断された。このときのニボルマブの血中濃度の実測値は、血中濃度の予測と大きく隔離し、低下していた。また、Patient 7 においては、その後ニボルマブの投与を行っていないにも関わらず、再び血中濃度の上昇が認められた。他の症例では、このような予測値と実測値の大きな隔離は認められなかった (Figure 12)。

Patient 7



Patient 9

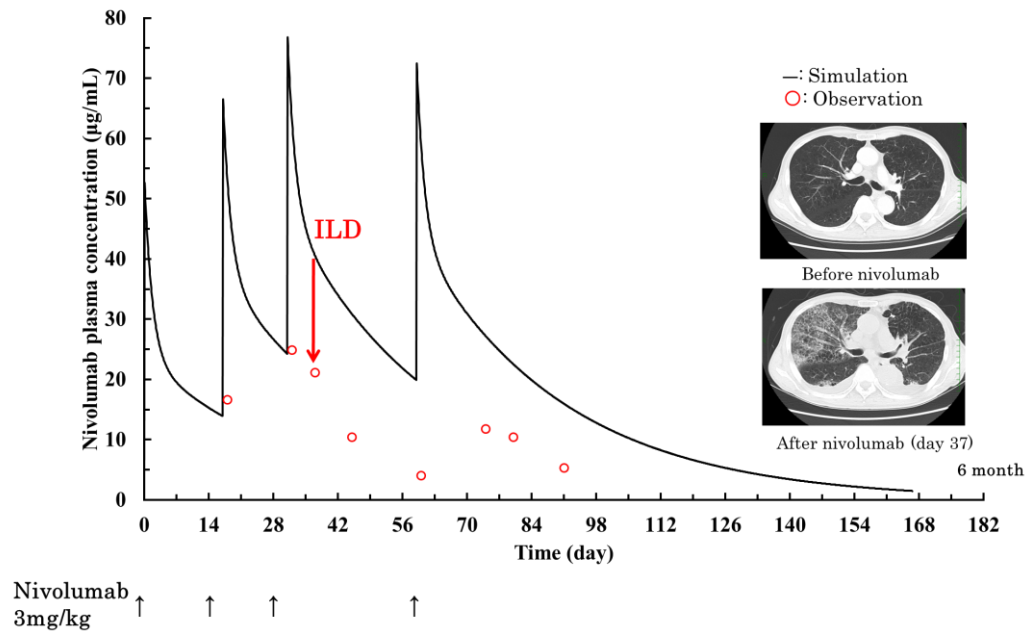


Figure 15 Computed tomography scan and nivolumab plasma concentration of patients who developed nivolumab induced interstitial lung disease (ILD).

3-3-10. ニボルマブ長期奏効患者におけるニボルマブ薬物動態の検討

ニボルマブ長期奏効患者 4 例の血中濃度推移及び 36 か月のシミュレーションの結果を Figure 16 に示す。投与レジメンを 2 週ごとから 4 週ごとに変更することで、定常状態の血中濃度は半分程度に減少するが、25～50 µg/mL 程度の血中濃度が維持された。4 人の患者は、それぞれ投与開始から 700 日目 (Patient 11)、937 日目 (Patient 12)、776 日目 (Patient 13)、554 日目 (Patient 14) の時点においてもニボルマブによる治療を継続中であり、明らかな疾患の進行は認められておらず、4 週間レジメンに変更しても有効性は維持されることが示唆された。しかしながら、Patient 11 では、投与レジメンを変更後の 427 日目に間質性肺炎が認められ、ニボルマブの治療を一時中止し、553 日目から再開したことから暴露量は予測よりさらに低い。また暴露量を減らしても間質性肺炎のリスクは継続する可能性が示唆された。

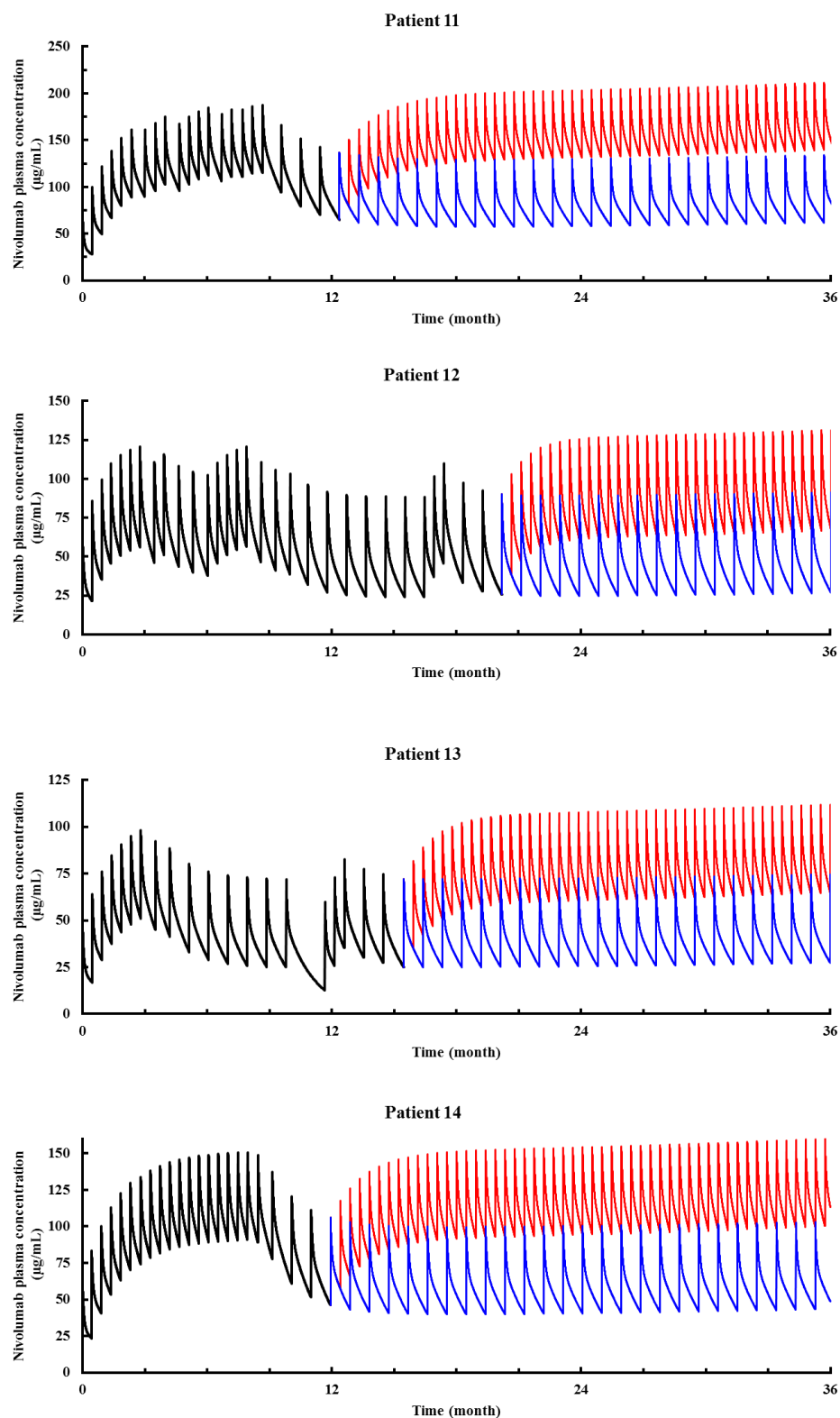


Figure 16 Simulation of nivolumab concentration profile of 2 weeks regimen (red) versus 4 weeks regimen (blue).

3-3-11. 別の免疫チェックポイント阻害薬ペンブロリズマブの血中濃度測定への応用

in silico シミュレーションにより、血漿中において LLIYLASYLESGVPAR (分子量: 1,764.9) がペンブロリズマブに特異的であり (Figure 17)、サロゲートペプチドとして選択した。プリカーサーイオンとして LLIYLASYLESGVPAR の 2 価のイオンが検出され、最適化した MRM トランジションは、 m/z : 883.2→343.1 であった。イオンソースのパラメーターは、Curtain Gas=50、Collision Gas=8、IonSpray Voltage=5500、Temperature=500、Ion Source Gas1=40、Ion Source Gas2=70 であり、MS/MS の条件は Declustering potential=116.0 volts、Entrance potential=10.0 volts、collision energy=29.0 volts、collision cell exit potential=12.0 volts であった。ニボルマブと同じ LC 条件を用いて、LLIYLASYLESGVPAR は、血漿中及びニボルマブ存在下において、選択的に検出された。わずかな夾雑ピークが認められたが、ペンブロリズマブのピークに比べると小さく測定への影響は少ないと考えられた (Figure 18)。また、LC 条件の最適化によって、分離できる可能性がある。

Heavy Chain Sequence

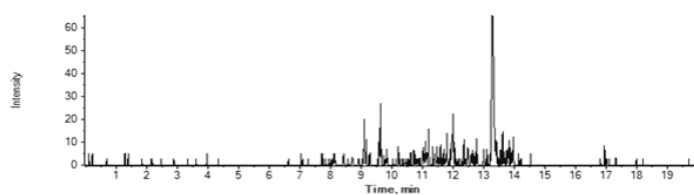
QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVR QAPGQGLEWMGGINPSNG
GTNFKNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEI
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

Light Chain Sequence

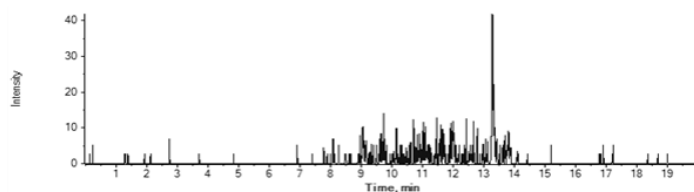
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPR **LLIYLASYLES**
GVPARFSGSGSGTDFLTITSLPEPDFAVYYCQHSDLPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figure 17 Pembrolizumab amino acid sequence of heavy chain and light chain: The gray shading indicates unique to pembrolizumab in human plasma protein digests in the in silico simulation and bolded indicates pembrolizumab surrogate peptide used in this study

(A) Plasma IgG only



(B) Plasma IgG including nivolumab (100 µg/mL)



(C) Plasma IgG including pembrolizumab (100 µg/mL)

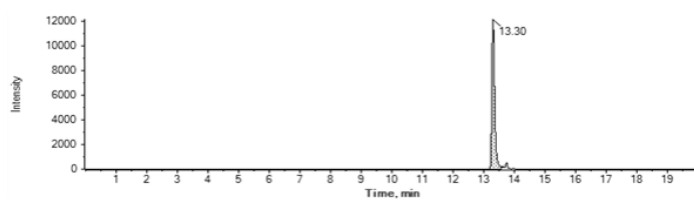


Figure 18 MRM chromatograms of pembrolizumab surrogate peptide (LLIYLA SYLESGV PAR, m/z: 883.2→343.1) in (A) plasma IgG only, (B) plasma IgG including nivolumab (100 µg/mL), and (C) plasma IgG including pembrolizumab (100 µg/mL)

3-4. 考察

本研究では、ニボルマブの絶対検量線法による血漿中濃度の測定法の構築を行った。分析バリデーションは、BMV ガイドラインの基準を満たす結果であった。ニボルマブの臨床的濃度は、3 mg/mL を 2 週間ごとに投与する場合、最小濃度が 17.2 µg/mL で最大濃度が 130 µg/mL と報告されている⁵⁵⁾。定量範囲は、5.0 ~ 200 µg/mL で良好な直線性があった。また、実際に測定した試料のうち、123 ポイント中 116 ポイントを測定することが可能であった。

14 人の NSCLC 患者における測定値は、既報のニボルマブの PPK モデルとよく一致し、実測値とベジアン法に基づく予測値は、高い相関を示した (Table 12B)。これまで、LC-MS/MS を用いたニボルマブの測定法で多くの臨床検体を測定し、既存の PPK モデルを用いて予測精度を検討した報告はない。

一方で、限られた採血ポイントから患者の薬物動態を予測する手法は、臨床現場でしばしば用いられる。本研究では、ニボルマブの個々の PK パラメーターを予測するための採血ポイントとして、1 ポイント及び 4 ポイントの検討を行った。4 ポイントを用いた場合のほうが、やや MAPE は小さかったが、ニボルマブの固体間変動の大きさを考慮すると、1 ポイントを用いた場合においても十分な予測精度であると考えられる (Table 11)。したがって、LC-MS/MS を用いたニボルマブの測定法と、既存の PPK モデルに基づく PK 予測により、1 ポイントの血中濃度を用い血中濃度の予測を行うことが可能であり、将来的に用量の調整や投与間隔の変更などの TDM に応用可能と考えられる。NSCLC において、ニボルマブは 2 週間に 1 回投与が必要であり、1 回の薬剤費用は、40~80 万である。ニボルマブの血中濃度に基づく投与は、この薬剤費用の抑制や投与頻度を減らすことに役立つと考えられる。

さらに、本研究に参加した患者における臨床的な特徴と薬物動態との関係について検討を行った。既治療の NSCLC におけるニボルマブの奏効率は約 20%⁶⁷⁾であり、多くの患者でニボルマブの治療は数回の投与で終了する。その後、腫瘍の増殖を抑制するため、後治療として別の抗がん剤治療を開始するが多い。今回の Patient 2 の患者では、EGFR-TKI としてアファチニブが選択され治療が開始された。わずか 3 回のニボルマブの治療後も、3 カ月以上にわたりニボルマブの血中濃度は持続し、アファチニブの治療に影響を与える可能性が否定できなかった。実際に、別の EGFR-TKI であるオシメルチニブの市販後調査⁶⁸⁾では、ニボルマブの前治療がある場合に、間質性肺炎のリスクが高いことが報告されている。また、ニボルマブには投与終了後に生じる遅発性の有害事象が報告されており⁶⁹⁾、このような血中濃度の持続を理解し、患者の観察や後治療の選択を行っていく必要性がある。

次に胸水や腹水を有する患者においては、ニボルマブの血中濃度は維持され

ており、胸水や腹水の貯留やドレナージによって、ニボルマブの暴露量が減少する可能性は低いと考えられた。しかしながら、胸水や腹水を認める患者におけるニボルマブの有効性は明らかではなく、さらなる研究が必要である。

ニボルマブによるものと疑われる間質性肺炎を発症した 2 例においては、発症時点でニボルマブの血中濃度が大きく低下した。一方で、アルブミン等の血液検査値の大きな変動はなく、炎症に伴う血管透過性の亢進では説明ができないと考えられた。ニボルマブの作用機序は、がん抗原特異的な T 細胞の増殖促進と活性化であり、増殖活性化した T 細胞にニボルマブが集積した結果、見た目の分布容積が増大し、血中濃度が低下した可能性がある。しかしながら、限られた 2 症例で認められた事象に過ぎず、さらに多くの患者において再現性を確認する必要がある。

加えて、ニボルマブによる治療効果が得られる患者では、Durable response と呼ばれる長期奏効が得られる場合があり、本研究に参加した Patient 11～14 はその例である。これらの患者において、どの程度ニボルマブを投与すればよいかを判断するデータはなく、4 例においては、4 週ごと 1 回投与の投与レジメンに変更して継続した。ニボルマブの血中濃度は、半分程度に減少したが、いずれの患者においてもその後約 1 年以上にわたり治療効果が持続しており、長期奏効患者における治療選択肢の 1 つになり得ると考えられたが、さらなる検証が必要である。

現在、免疫チェックポイント阻害薬であるペンブロリズマブ、イピリムマブ、アテゾリズマブ、アベルマブを含む数多くの抗体医薬品が臨床現場で用いられている³⁾。LBAs では、各薬剤の測定のために、それぞれに対応する抗原、抗体が必要である。LC-MS/MS 法は、ペプチドの質量に基づく測定法であり、様々な抗体医薬品に迅速に適応できると考えられる。抗体医薬品の中には、infiximab のように TDM の有用性のエビデンスが蓄積されつつある薬剤もある⁷⁰⁾。本研究で用いた方法は、ニボルマブに限らず、抗体医薬品全般に応用ができる方法であると考えられ、ニボルマブと同じ PD-1 を標的とするペンブロリズマブへの応用を検討した結果、同様のワークフローで LC-MS/MS を用いて選択的に検出できることを確認した。また、LBAs では困難な同じ標的を持つニボルマブの存在下においても選択的に検出することができた。

しかしながら、本研究には、いくつかの限界が存在する。第一に、本研究では従来標準的に用いられている ELISA などの免疫学的な測定法と直接的な比較実験は行っておらず、交差反応やダイナミックレンジなどの点において、どの程度優位性があるかは評価できていない。第二に、本研究で得られた日本人患者の測定値は、Bajaj らのモデルの母平均に比べやや高い値を示した。本研究では、偏った集団であった可能性があるが、PK パラメーターに影響を与える他の共変量がある可能性がある。特に本研究では、抗薬物抗体を測定しておらず、免疫原性

は、抗体医薬品の薬物動態に大きく影響を与える可能性がある⁷¹⁾。第三に、近年 LC-MS/MS を用いたタンパク質の測定に、安定度同位体標識されたペプチド⁷²⁻⁷³⁾やタンパク質⁷⁴⁻⁷⁵⁾などを内標準物質として用いた報告があり、内標準法を用いることで、測定精度が高まる可能性がある。最後に、ニボルマブの治療域や毒性域は現在明らかではない。ニボルマブの半減期は非常に長いが、このことは、遅発性の有害事象^{69,76)}や後治療の薬剤との相互作用に関連する可能性⁷⁷⁻⁷⁸⁾がある。ニボルマブの適正使用のためには、今後ターゲット濃度などの解析が必要であると考えられる。

3-5. 結論

本研究では、抗体医薬品であるニボルマブの汎用性が高い測定法の構築を目的として、LC-MS/MS を用いた血漿中濃度測定法を構築し、バリデーションを行った。さらに臨床検体を用いた検討において、既存の PPK モデルに基づく解析によりニボルマブの薬物動態推移の予測が可能であることを示した。本測定法は、ニボルマブの薬物動態の解析を行うために有用であると考えられる。

第四章 がん性髄膜炎患者におけるオシメルチニブの髄液中 濃度測定法の構築

4-1. 諸言

オシメルチニブは、エクソン 21 の L858R 点突然変異やエクソン 19 の欠損変異などの活性化変異を有する EGFR、及びエクソン 20 の T790M 耐性変異を有する EGFR に、選択的かつ不可逆的に結合する第 3 世代の EGFR-TKI である。既存の EGFR-TKI に抵抗性の T790M 耐性変異を有する NSCLC 患者において有効性が認められており⁷⁹⁻⁸⁰⁾、2018 年 8 月には、未治療の EGFR 遺伝子変異陽性の NSCLC 患者にも適応が追加された⁸¹⁾。

非臨床試験の結果から、オシメルチニブには、高い中枢神経系 (CNS) への移行性が認められ、例えばマウスのがん性髄膜炎 (leptomeningeal metastasis、LM) における有効性が報告されている⁸²⁻⁸³⁾。LM は NSCLC 患者において、QOL を大きく低下させる重要な合併症であるが、その治療の選択肢は極めて限られている。そのため、オシメルチニブの CNS への移行性は、オシメルチニブが LM 治療の選択肢となり得るかを判断するための重要な情報である。しかしながら、ヒトにおけるオシメルチニブの脳脊髄液 (Cerebrospinal fluid、CSF) への移行性に関する情報は、ほとんど報告がない。

そこで本研究では、LC-MS/MS を用いたオシメルチニブの血漿中及び CSF 中濃度測定法の構築及びバリデーションを行った。CSF など低タンパク質、低脂質の試料中における薬物濃度測定法の構築では、採取した検体を保管する際に薬物の非特異的な吸着がしばしば生じることから、本研究ではオシメルチニブの保管容器への吸着の検討も併せて行った。加えて CSF などの希少な試料は、測定やバリデーションを行う上で大量に得ることが困難であり、CSF に変わる代替試料を、測定やバリデーションに使用することの妥当性についても検討した。さらに本研究で構築した測定法を用いて、LM を有する NSCLC 患者において、オシメルチニブの CSF への移行性について検討を行った。

4-2. 方法

4-2-1. オシメルチニブ測定の実験試薬

オシメルチニブ及びゲフィチニブ-D6（それぞれ純度 99%以上）は、Cayman Chemicals Co.、（Ann Arbor, MI, USA）から購入した。アセトニトリル、メタノール及び酢酸アンモニウムは、Nacalai Tesque（Kyoto, Japan）から購入した。患者から採取した血漿及び CSF は、2.0 mL microtube（Watson Co., Ltd., Tokyo, Japan）中で保管した。ウシ血清アルブミン（Bovine serum albumin [BSA] solution 30%）は、Sigma-Aldrich（Missouri, USA）から入手した。

4-2-2. オシメルチニブ測定の LC-MS/MS の条件

すべての分析は、四重極型質量分析計である QTRAP4500（AB Sciex, Framingham, MA, USA）を用いて行った。オペレーションソフトウェアは、Analyst 1.6.2（AB Sciex）を用いて行った。試料は、陽イオンエレクトロスプレーを用いてイオン化し、MRM モードにより標的化合物を検出した。また液体クロマトグラフィーは、1260 LC system（Agilent, Waldbronn, Germany）を用いた。移動相には、10 mM 酢酸アンモニウムとアセトニトリル（50 : 50, v/v）を用いた。インジェクションサイクルは 4 分間とした。分析カラムには、InertSustainSwift C18 analytical column（3 μ m, 2.1 \times 50 mm, GL Sciences, Tokyo, Japan）を用いて、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、流量は 0.2 mL/min で行った。

4-2-3. オシメルチニブの標準溶液

オシメルチニブ及びゲフィチニブ-D6（IS）のストック溶液は、メタノール中で 1 mg/mL の濃度になるよう調製した。オシメルチニブの標準溶液は、ストック溶液を 7.8125～10,000 ng/mL の範囲でアセトニトリルを用いて希釈し調製した。抽出溶液は、IS としてゲフィチニブ-D6 を 100 ng/mL で含むメタノールを用いた。すべてのストック溶液、標準溶液、抽出溶液は、 -20° C で保管した。

4-2-4. オシメルチニブの検量線試料

血漿中濃度測定のための検量線試料は、オシメルチニブの標準溶液を精製水で 10 倍希釈し、1,000、500、250、125、62.5 及び 31.25 ng/mL の濃度で調製した。同様に CSF 中濃度測定のための検量線試料は、オシメルチニブの標準溶液を精製水で 10 倍希釈し、100、50、25.5、12.5、6.25、3.125、1.5625 及び 0.78125 nM の濃度で調製した。

4-2-5. オシメルチニブの QC 試料

QC 試料は、オシメルチニブの標準溶液を精製水、血漿または CSF を用いて希釈し、調製した。回収率、マトリックス効果、代替試料の検討、保管容器への吸着の検討及び安定性のバリデーションにおいては、対応する血漿または CSF を用いて調製した。精度、真度の日内及び日間変動の検討では、精製水を用いて調製した。血漿中濃度測定のための QC 試料は、800 nM（高濃度）、100 nM（中濃度）、80 nM（低濃度）、及び 40 nM（LLoQ）の濃度で調製した。CSF 中濃度測定のための QC 試料は、80 nM（高濃度）、20 nM（中濃度）、2 nM（低濃度）、及び 0.8 nM（LLoQ）の濃度で調製した。

4-2-6. オシメルチニブ測定における試料の調製

20 µL の血漿または CSF に対して、40 µL の抽出溶液を加えて、ボルテックスミキサーを用いて攪拌し、10,000 × g で 10 分間遠心分離した。その上清 2 µL を LC-MS/MS 注入し、分析を行った。

4-2-7. オシメルチニブ測定の分析バリデーション

バリデーションの手順は、BMV ガイドライン³⁶⁾に従った。

4-2-7-1. オシメルチニブの検量線

検量線試料はバリデーション実施ごとに作成した。オシメルチニブのピーク面積に対する内標準物質のピーク面積の比を濃度計算に用いた。検量線式は、最小二乗法（ $1/x^2$ 重み付け）を用いて導いた。

4-2-7-2. オシメルチニブ測定の精度及び真度

精度及び真度の日内変動は、高濃度、中濃度、低濃度、定量下限の 4 つの濃度の試料を各 5 検体測定することで評価した。精度の日間変動は、3 日間の異なる日の測定において評価を行った。精度は、RSD% として、真度は理論値に対する RE% として算出した。精度及び真度は BMV ガイドラインで必要とされる ±15% 以内を許容可能とした。

4-2-7-3. オシメルチニブ測定における選択性及びキャリーオーバー

選択性は、異なる 6 人のブランク血漿試料及び 1 人のブランク CSF 試料を測定し、オシメルチニブ及び内標準物質と同一保持時間における阻害ピークの有無を評価した。キャリーオーバーは、検量線の最高濃度を測定後に、ブランク試料を測定し、阻害ピークの有無を評価した。選択性及びキャリーオーバーの評価において阻害ピークの面積は、BMV ガイドラインで必要とされる定量下限の 20% 以下及び IS の 5% 以下を許容可能とした。

4-2-7-4. オシメルチニブ測定における回収率及びマトリックス効果

回収率を評価するため、抽出した試料のピーク面積比と、同一濃度になるように抽出溶液に標準溶液を添加した試料のピーク面積比を比較した。マトリックス効果の評価は、6人の異なるブランク血漿試料から抽出したマトリックス成分を用いて、標準溶液を添加したマトリックスを含む試料と、含まない試料のピーク面積を比較した。回収率及びマトリックス効果の評価は、それぞれ血漿及びCSFの高濃度、中濃度、低濃度の3つのQC試料の濃度(N=3)で評価を行った。

4-2-7-5. オシメルチニブの安定性

オシメルチニブの安定性は、凍結融解及び -60°C で3か月間保管した場合で評価した。安定性の評価は、血漿及びCSFの高濃度、中濃度、低濃度の3つのQC試料の濃度(N=3)で行った。CSFの検体には、後述のBSAが吸着抑制剤として含まれる。各濃度におけるQC試料の平均真度は、BMVガイドラインで必要とされる $\pm 15\%$ 以内を許容可能とした。

4-2-7-6. オシメルチニブ測定における代替試料の検討

代替試料として、血漿及びCSFの代わりに精製水を用いることの妥当性を検討した。それぞれ血漿及びCSFで調製したQC試料を、代替試料で調製した検量線を用いて計算した平均真度に基づき評価した。代替試料の評価は、血漿及びCSFの高濃度、中濃度、低濃度の3つのQC試料の濃度(N=3)で行った。代替試料で調製した検量線から求めた平均真度が $\pm 15\%$ 以内であれば代替試料の使用が許容可能とした。

4-2-8 オシメルチニブの保管容器への吸着の検討

血漿及びCSF中におけるオシメルチニブの保管容器(polypropylene製microtube, watoson)への吸着を検討した。血漿及びCSFのQC試料(高濃度、低濃度)を保管容器に加え、 -60°C で1回の凍結融解を行った。試料の濃度及び理論値より、吸着率 $=1 - \text{測定値}/\text{理論値}$ として算出した。非特異的な吸着を防ぐため、30% BSAを1:10(v/v)でCSF試料に加え、検討を行った。このBSAの濃度は、ヒトにおける血漿アルブミン濃度(30 mg/mL)を参考にした。また、BSAをCSFに添加した場合の選択性、キャリーオーバー、マトリックス効果、回収率への影響についても、同様に検討を行った。

4-2-9. NSCLC 患者における血漿中及び CSF 中オシメルチニブ濃度の測定

オシメルチニブを服用中の 2 人の NSCLC 患者の血漿中及び CSF 中濃度を測定した。血漿及び CSF 試料は、オシメルチニブ服用後 6 ± 2 時間に同時に採取した。CSF 試料は、BSA を加えて保管したが、一部比較のため BSA を加えずに保管した。患者の試料は、測定まで -60°C で保管した。本臨床研究の実施については、先端医療センターの倫理委員会の承認（承認番号：16-01）を得た。検体採取の前までに、すべての患者から文書によりインフォームドコンセントを得た上で実施した。

4-2-10. 既存検体を用いたオシメルチニブ髄液中濃度の予備的検討

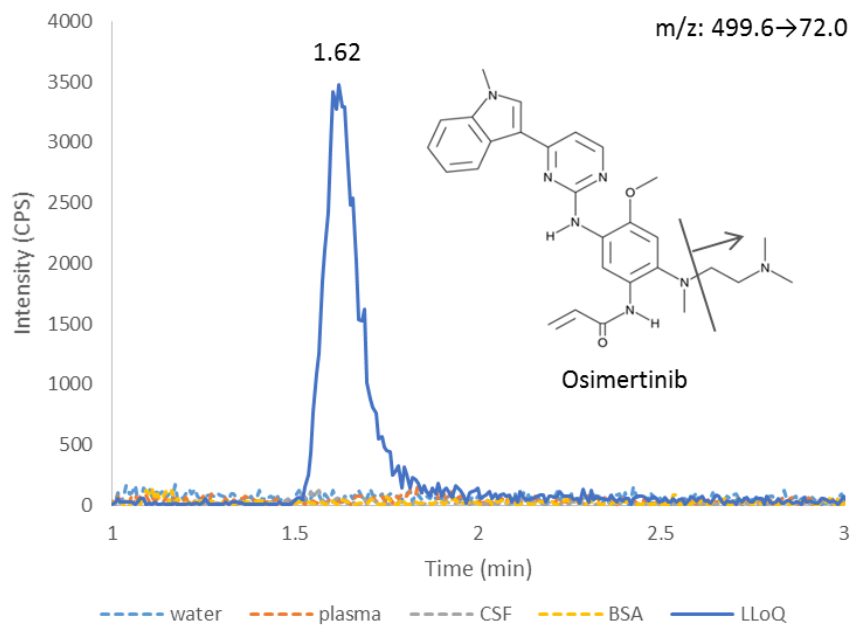
オシメルチニブを服用中の LM または LM 疑いの患者 13 人（29 検体）の血漿中及び CSF 中のオシメルチニブ濃度の測定を行った。この検体採取においては、CSF 中に吸着抑制剤として BSA を使用しなかったため、CSF 中濃度は *in vitro* で得られた吸着率を使って逆算した。また、血漿中濃度と CSF 中濃度の相関は、ピアソンの積率相関係数の検定を行った。

4-3. 結果

4-3-1. オシメルチニブ測定の LC-MS/MS 条件

イオンソースのパラメーターは、Curtain Gas=50、Collision Gas=8、IonSpray Voltage=5500、Temperature=500、Ion Source Gas1=70、Ion Source Gas2=70 であり、MS/MS の条件はオシメルチニブでは Declustering potential=21.0 volts、Entrance potential=10.0 volts、collision energy=1.0 volts、collision cell exit potential=18.0 volts、ゲフィチニブ-D6(IS)では Declustering potential=131.0 volts、Entrance potential=10.0 volts、collision energy=29.0 volts、collision cell exit potential=12.0 volts であった。オシメルチニブ及びゲフィチニブ-D6 (IS) の MRM トランジションは、それぞれ $499.9 \rightarrow 72.0$ 及び $452.8 \rightarrow 134.0$ であった。オシメルチニブ及びゲフィチニブ-D6 (IS) は、それぞれ 1.62 分及び 1.54 分で溶出した。それぞれの MRM クロマトグラムを Figure 19 に示す。

(A)



(B)

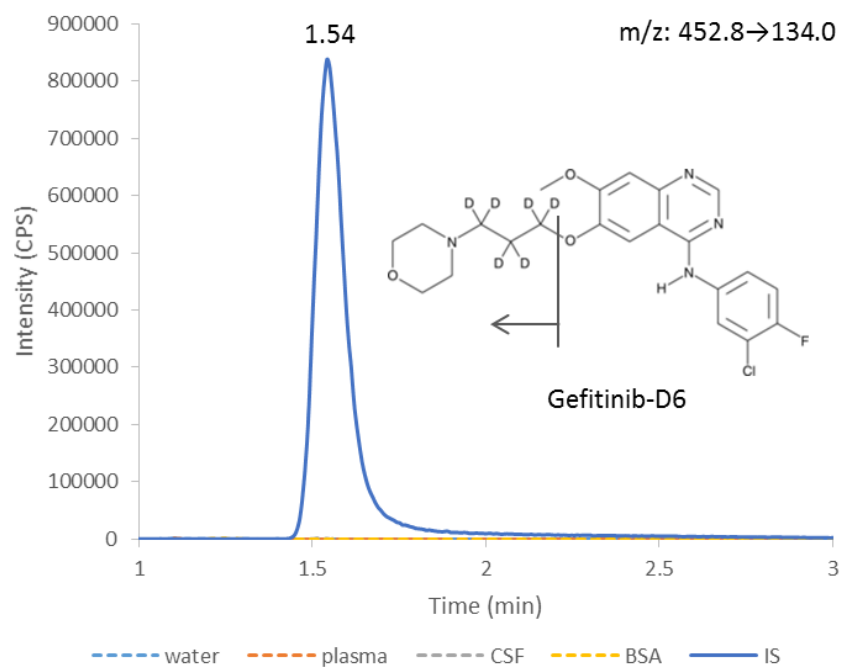


Figure 19 Chromatograms of (A) Osimertinib at LLoQ (0.8 nM) and blanks; (B) internal standard (Gefitinib-D6, 100 ng/mL) and blanks

4-3-2. オシメルチニブ測定の分析バリデーション

4-3-2-1. オシメルチニブ測定における選択性及びキャリーオーバー

ブランク試料の MRM クロマトグラムを Figure 19 に示す。オシメルチニブの定量下限及び 100 ng/mL の濃度の IS のピークに対する阻害ピークは認められなかった。同様に検量線の最高濃度を分析した後にブランク試料を測定した場合にもキャリーオーバーは認められなかった。

4-3-2-2. オシメルチニブの検量線

血漿中及び CSF 中濃度測定のための検量線は、それぞれの範囲において良好な直線性 (相関係数 $[R^2]=0.999$) を示した。すべての検量線検体の濃度は、BMV ガイドラインで必要とされる理論値の $\pm 15\%$ 以内であった。

4-3-2-3. オシメルチニブ測定における精度及び真度

精度の日内変動、日間変動及び真度の日内変動は、すべての QC 試料において、BMV ガイドラインで必要とされる $\pm 15\%$ 以内であった (Table 12)。CSF 中濃度 0.8 nM を定量下限と設定した。

4-3-2-4. オシメルチニブの回収率及びマトリックス効果

回収率及びマトリックス効果を Table 12 に示す。オシメルチニブは、ほとんど完全に血漿及び CSF から回収された。また、異なる 6 人の血漿マトリックス及び 1 人の CSF マトリックスにおいて、オシメルチニブ及び IS に対するマトリックス効果は認められなかった。

4-3-2-5. オシメルチニブの安定性

オシメルチニブは、血漿中及び BSA を添加した CSF 中において -60°C で少なくとも 3 か月間安定であった (Table 12)。各濃度における QC 試料の平均真度は、BMV ガイドラインで必要とされる $\pm 15\%$ 以内であった。

4-3-2-6. オシメルチニブ測定における代替試料の妥当性

代替試料として精製水で調製した検量線から求めた QC サンプルの平均真度を Table 12 に示す。血漿及び CSF の QC 試料の真度は、 $\pm 15\%$ 以内であり、対応する試料を用いた場合と比較して、大きな違いは認められなかった。

4-3-3. オシメルチニブの保管容器への吸着の検討

血漿においては、オシメルチニブの保管容器への吸着は認められなかった。しかしながら、CSF においてオシメルチニブは保管容器に著しく吸着し、吸着率は 2 nM において 48.6 %、80 nM において 53 %であった (Table 13)。一方、BSA を

吸着抑制剤として加えることで、吸着率は 2 nM において 2.7 %、80 nM において 8.9 %に減少した。さらに、BSA の添加は、選択性、キャリーオーバーに影響を与えず (Figure 19)、マトリックス効果、回収率は添加しなかった場合のバリデーションの結果と変わらないことを確認した (Table 12)。

Table 12 Summary of method validation

Matrix		Plasma (%)				CSF (%)			
QC levels		LLoQ	Low	Medium	High	LLoQ	Low	Medium	High
Concentration (nM)		40	80	200	800	0.8	2	20	80
Intra-day precision (N=5)		5.3	4.8	2.3	1.1	4.8	3.8	4.6	4.5
Inter-day precision (N=3)		8.2	5.1	6.4	4.3	1.7	13	4.8	7.3
Accuracy (N=5)		107.8	106	105.8	97.6	101.8	87.3	100.5	106.3
Recovery (N=3, mean \pm SD)		102.4 \pm 4.9 99 \pm 12.2 97.7 \pm 8.3				104.6 \pm 7.6 97.3 \pm 11 96.3 \pm 3.3 (94.9 \pm 2.9) (98.1 \pm 1.3) (94.5 \pm 2.5)			
Matrix Effect (N=3, mean \pm SD)		100.4 \pm 3.9 97.4 \pm 3.5 93.9 \pm 5.2				102.5 \pm 1.8 108 \pm 9 101.7 \pm 1.5 (103.8 \pm 8.3) (98.7 \pm 5.2) (98.4 \pm 3.4)			
Stability (N=3, mean \pm SD)	Freeze-thaw	104.3 \pm 4.1			98.1 \pm 4.8	109 \pm 7.3			101.5 \pm 7.2
	Long-term	99.4 \pm 8			88.1 \pm 7.9	(98.1 \pm 4.9)			(88.7 \pm 8.0)
Relevance of surrogate matrix (N=3)		9.9 14.2 8				2.5 8 1.7 (5.6) (9.3) (5.4)			

CSF: cerebrospinal fluid, QC: quality control, LLoQ: lower limit of quantification, SD: standard deviation

(): Samples spiked 30% bovine serum albumin (1:10[v/v])

Table 13 Adsorption of osimertinib to storage container

Matrix	Plasma (%)		CSF (%)		CSF+BSA (%)	
Concentration (nM)	2	80	2	80	2	80
Accuracy (N=3)	100 ± 1	96 ± 4	51 ± 8	47 ± 8	97 ± 5	91 ± 8
loss	0	-4.5	-48.6	-53	-2.7	-8.9

4-3-4. NSCLC 患者における血漿中及び CSF 中オシメルチニブ濃度の測定

オシメルチニブを服用中の 2 人の NSCLC 患者におけるオシメルチニブの血漿中濃度、CSF 中濃度、CSF への移行率は、それぞれ、32.1 nM 及び 870.8 nM、26.3 nM 及び 9.5 nM、4.9% 及び 1.1% であった。BSA を加えずに保管した CSF 中濃度は、それぞれ 14.2 nM (loss = 46.0%) 及び 4.5 nM (loss = 52.6%) であった。

4-3-5. 既存検体を用いた CSF 中オシメルチニブ濃度の予備的検討

オシメルチニブを服用中の 13 人の NSCLC 患者のオシメルチニブの血漿中濃度、CSF 中濃度、吸着率から逆算した CSF 中濃度、CSF への移行率を Table 14 に示す。血漿中濃度と CSF 中濃度には、相関（相関係数 = 0.427）が認められ、無相関検定において p 値 = 0.0422 であった（Figure 20）。

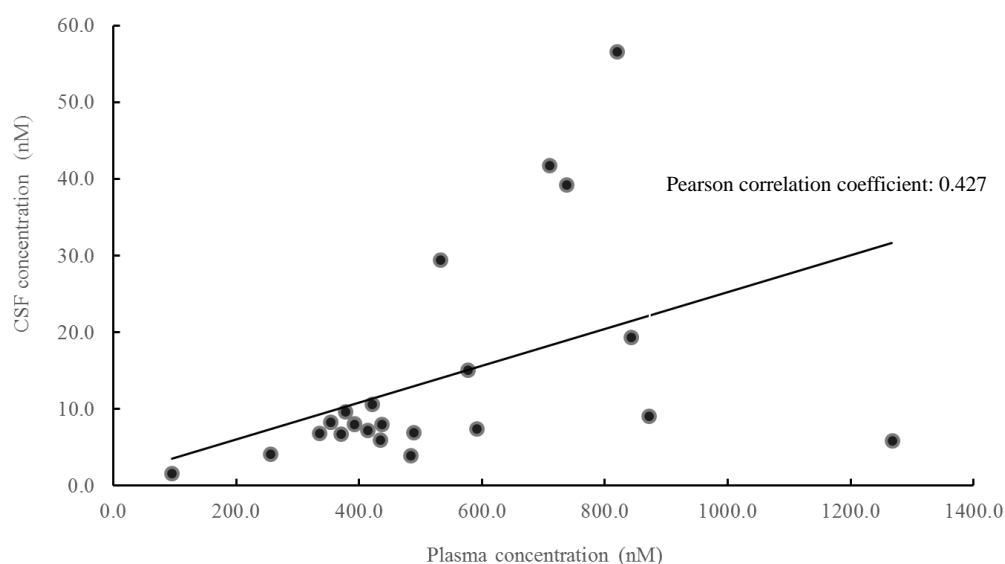


Figure 20 Correlation between plasma concentration and CSF concentration of osimertinib.

Table 13 Plasama and CSF concentration of osimertinib in patients with non-small lung cancer.

Patient	Plasma (nM)	CSF (nM)	Penetration rate
1	710.1	41.8	5.9 %
	576.9	15.1	2.6 %
	532.1	29.5	5.5 %
2	370.5	6.8	1.8 %
	488.2	7.0	1.4 %
	437.0	8.1	1.8 %
3	392.0	8.1	2.1 %
	391.5	8.1	2.1 %
	870.8	9.1	1.0 %
4	842.5	19.4	2.3 %
	819.7	56.6	6.9 %
5	737.3	39.3	5.3 %
	95.4	1.6	1.7 %
6	334.8	6.8	2.0 %
	1,267.0	5.9	0.5 %
7	591.6	7.4	1.3 %
	255.4	4.2	1.6 %
8	376.9	9.7	2.6 %
9	413.2	7.3	1.8 %
	353.4	8.3	2.3 %
10	434.1	6.0	1.4 %
11	421.2	10.7	2.5 %
12	483.3	3.9	0.8 %
13			
Average	530.2	13.9	2.5 %

CSF: cerebrospinal fluid

Absorption ratio was assumed 45.5%

4-4. 考察

LC-MS/MS を用いたオシメルチニブの血漿中濃度の測定法は、すでに報告がある⁸⁴⁾。しかしながら、CSF 中濃度の測定に関しては、これまで報告がなく、ヒトにおけるオシメルチニブの中枢神経系への移行に関するデータは、極めて限られている。本研究で用いた LC-MS/MS におけるオシメルチニブ及びゲフィチニブ-D6 (IS) の MRM トランジションは、過去の報告と一致した⁸⁴⁻⁸⁵⁾。

分析バリデーションの結果は、BMV ガイドラインの基準を満たす結果であった。オシメルチニブは、血漿中及び CSF 中で選択的に検出され、マトリックス効果は認められなかった。精度及び真度の日内及び日間変動は、BMV ガイドラインの基準である $\pm 15\%$ を満たした。本測定法ではオシメルチニブの平均血漿中濃度⁸⁶⁾の約 1~2%の濃度を検出することができ、我々の測定した CSF 検体⁸⁷⁾の濃度も十分に測定することが可能であった。

ヒトの CSF は希少な試料であり、十分な繰り返し測定が行えるほど大量に入手することは難しい。BMV ガイドラインにおいて、代替試料は妥当性を評価した上で、用いることが許容されている。本研究では、代替試料として精製水を用いて検量線を引いた場合においても、オシメルチニブの QC 試料の真度は、 $\pm 15\%$ 以内であり、血漿及び CSF の代替試料として、精製水を用いることができると結論付けた。

一方で、尿⁸⁸⁾や CSF⁸⁹⁾などの低タンパク質、低脂質の試料中においては、保管容器への薬物の非特異的な吸着が測定結果に重大な影響を与えることが報告されている。オシメルチニブは、透析膜に対する非特異的な吸着により、タンパク結合率が測定できないことが報告されており⁹⁰⁾、本研究における吸着試験においても polypropylene 製の保管容器に著しい吸着が認められ、オシメルチニブの CSF 中濃度は、約 50%になることが確認された。一方で、吸着抑制剤として BSA を添加することで、非特異的な吸着が抑制できることが確認できた。また、測定への BSA の阻害的な影響は認められなかった。そのため、オシメルチニブの CSF 中濃度の測定において、BSA の添加が推奨される。また、臨床検体においても、BSA を添加せず保管した場合、同程度の保管容器への吸着が認められ、本研究における吸着試験の結果が裏付けられた。

BSA を加えず保管した CSF を用いた予備的検討ではあるが、オシメルチニブの血漿中濃度と CSF 中濃度には相関が認められ、オシメルチニブの CSF の移行率の平均は 2.5%であった。オシメルチニブの CSF への移行率は、過去に報告されているゲフィチニブ (CSF 移行率: $1.13 \pm 0.36\%$) やエルロチニブ (CSF 移行率: $2.77 \pm 0.45\%$) など他の EGFR-TKI と同程度であった⁹¹⁾。しかしながら、オシメルチニブの LM への有効性が報告されており、CSF への移行性と LM への有効性との関連については、さらなる検証が必要である。

4-5. 結論

本研究では、LM 患者におけるオシメルチニブの CSF への移行性を明らかにすることを目的として、LC-MS/MS を用いたオシメルチニブの血漿中及び CSF 中濃度測定法の構築を行った。オシメルチニブの CSF 中濃度は、非特異的な吸着が大きな影響を与え、この吸着は吸着抑制剤として BSA を添加することで減少させることができた。測定法の分析バリデーションの結果は良好であり、本法を用いて血漿中及び CSF 中のオシメルチニブの濃度を精度よく測定できることが示された。患者検体を用いた検討では、オシメルチニブの CSF 移行率は高くはなく、LM 患者に対するオシメルチニブの有効性について、さらなる検証が必要であると考えられた。

総 括

本研究では LC-MS/MS を用いた抗がん剤の生体中薬物濃度の測定法の構築と臨床薬物動態学的検討を行った。

第一章では、抗がん剤における職業暴露という視点から、CPT-11 を含む化学療法を受けた患者において、CPT-11 及びその活性代謝物である SN-38 の汗中濃度の検討を行った。CPT-11 はコリン作動性作用を有し投与中に発汗が生じる。本研究では、投与中に生じた汗中に CPT-11 と SN-38 が検出されることを示し、汗滴や汗を吸収した衣類への接触は、CPT-11 や SN-38 の職業暴露のリスクがあることが明らかにした。

第二章では、微量採血による DBS 法の EGFR-TKI の血中濃度測定への応用という視点から、LC-MS/MS を用いたゲフィチニブの DBS 中濃度の定量法の構築を行った。ゲフィチニブ服用中の患者において、ゲフィチニブの DBS 中濃度と血漿中濃度は良好な直線性があり、DBS 中濃度から血漿中濃度を推定可能であることを示した。DBS 法による採血は、簡便で侵襲性の低い方法であり、本法を用いてゲフィチニブの血中濃度を、簡便・低侵襲に評価することが可能であった。さらにエルロチニブ及びアファチニブの測定にも DBS 法が使用可能であることが示された。

第三章では、抗体医薬品の測定への LC-MS/MS 法の応用という視点から、ニボルマブの LC-MS/MS を用いた血漿中濃度の測定法の構築を行った。LC-MS/MS 法を用いた測定により血漿中のニボルマブが定量可能であることを示し、さらに臨床検体を用いた検討において、既存の PPK モデルに基づきニボルマブの薬物動態を予測可能であることを示した。本測定法は、ニボルマブの薬物動態の解析を行うために有用であると考えられる。

第四章では、分子標的薬の局所移行性という視点から、LC-MS/MS を用いたオシメルチニブの血漿中及び CSF 中濃度測定法の構築を行った。その過程で CSF 中においては保管容器への吸着が問題となることが明らかになり、吸着抑制剤として BSA を加えることで、CSF 中のオシメルチニブの濃度を正確に測定できることを示した。さらに LM 患者におけるオシメルチニブの CSF 中濃度を明らかにした。

これら一連の研究において、臨床現場の問題について様々な視点から抗がん剤の薬物動態学的な検討を行った。簡便かつ迅速な薬物濃度測定法の構築は、臨床現場における薬物動態学的研究を加速させることができると考えられる。本研究の第二章で述べた Dried blood spot 法などの微量採血法は、血糖値のように自己採血により採取できることから血中濃度測定の対象を大幅に拡大できる可能性があり、簡便・低侵襲に薬物動態を評価することのできる優れた方法である。

さらに薬剤師による TDM 業務の拡大にも貢献できると考えられる。本研究では成人を対象に行ったが、小児の薬物動態学的研究にも大きな役割があると考えられる。また、第三章で述べた LC-MS/MS を用いた抗体医薬品の測定法は、汎用性が高く、迅速に測定法を構築できるメリットがあり、今後も大きく変遷していくと考えられる現在の医薬品市場において、理想的な測定系を提供するものであると考えられる。特に今後バイオ医薬品のバイオシミラーが数多く登場することが予測でき、バイオシミラーの血中濃度測定においても一定の役割を担うことができると考えられる。

一方で、現在、薬物濃度測定あるいは TDM が実施される抗がん剤の種類は多くなく、臨床現場では治験などで得られたデータに基づき、目の前の患者における挙動を推測せざるを得ない場面が多い。しかしながら、治験で得られる薬物動態データは限られており、臨床現場に必要なデータが必ずしも得られているとは限らない。その例として、本研究の第一章で述べた CPT-11 の汗中濃度は、がん診療に関わる医療従事者を職業暴露から守るために重要であり、第四章で述べたオシメルチニブの CSF 中濃度は、がん性髄膜炎患者に対してオシメルチニブが治療選択肢となり得るかどうかを考える上で重要である。このように、本研究で得られた結果は、臨床現場における薬物動態学的な検討の必要性を強く示唆するものである。

本研究結果は、一部の抗がん剤の適正使用に有用な情報を与えた。今後さらに、より良い治療法の開発や臨床的な判断を下すために有益な情報を提供する臨床薬物動態学的研究を展開していく必要があると考えられる。

主論文

本研究の一部は、以下の学術誌に掲載された。

- 1) **Irie K**, Okada A, Masuda A, Kokan C, Hata A, Kaji R, Fukushima K, Sugioka N, Okada Y, Katakami N, Fukushima S, Assessment of exposure risk of irinotecan and its active metabolite, SN-38, through perspiration during chemotherapy. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. (in Press, Available online, 13 Apr 2018)
- 2) **Irie K**, Shobu S, Hiratsuji S, Yamasaki Y, Nanjo S, Kokan C, Hata A, Kaji R, Masago K, Fujita S, Okada Y, Katakami N, Fukushima S, Development and validation of a method for gefitinib quantification in dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to finger-prick clinical blood samples of patients with non-small cell lung cancer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1087–1088 (2018) 1–5.
- 3) **Irie K**, Okada A, Yamasaki Y, Kokan C, Hata A, Kaji R, Fukushima K, Sugioka N, Okada Y, Katakami N, Fukushima S An LC-MS/MS method for absolute quantification of nivolumab in human plasma: application to clinical therapeutic drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*. 40 (2018) 716–724.

参考論文

- 1) Nanjo S, Hata A, Okuda C, Kaji R, Okada H, Tamura D, **Irie K**, Okada H, Fukushima S, Katakami N, Standard-dose osimertinib for refractory leptomeningeal metastases in T790M-positive EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*. 118 (2018) 32–37.
- 2) Okada A, Kariya M, **Irie K**, Okada Y, Hiramoto N, Hashimoto H, Kajioka R, Maruyama C, Kasai H, Hamori M, Nishimura A, Shibata N, Fukushima K, Sugioka N, Population Pharmacokinetics of Vancomycin in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Pharmacol*. 58 (2018) 1140–1114.
- 3) Masago K, **Irie K**, Fujita S, Imamichi F, Okada Y, Katakami N, Fukushima S, Yatabe Y, Relationship between Paronychia and Drug Concentrations of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *Oncology*. 95 (2018) 251–256.

謝 辞

本研究の実施にあたり適切な御教示を賜りました神戸学院大学 薬学部 臨床薬剤学研究室 教授 福島 昭二先生に深甚なる謝意を表します。

本論文を作成するにあたり、御校閲ならびに御助言を賜りました神戸学院大学 薬学部 臨床薬物動態研究室 教授 杉岡 信幸先生ならびに神戸学院大学 薬学部 循環器薬理学研究室 教授 屋山 勝俊先生に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言、御協力をいただいた元・先端医療センター病院 総合腫瘍科 部長 片上 信之先生ならびに元・先端医療センター病院 薬剤科 科長 岡田 裕先生に心よりお礼申し上げます。

本研究を実施するにあたり、多大なるご支援をいただいた元・先端医療センター病院 総合腫瘍科 秦 明登先生、加地 玲子先生、古閑 千幸先生、南條成輝先生、藤田 史郎先生、真砂 勝泰先生ならびに神戸学院大学 薬学部 臨床薬物動態研究室 助教 福島 恵造先生、岡田 章氏に心よりお礼申し上げます。

末筆ながら、本研究を実施するにあたり、終始便宜を図っていただいた神戸市立医療センター中央市民病院 薬剤部 部長 橋田 亨先生、部長代行 室井延之先生、副部長代行 池末 裕明 先生ならびに薬剤部の皆様方、元・先端医療センター病院 総合腫瘍科、薬剤科、臨床検査科ならびに看護部の皆様方、神戸学院大学 薬学部 臨床薬剤学研究室 准教授 岸本 修一先生、学生ならびに卒業生の皆様方に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) 厚生労働省, 人口動態統計, (2017).
- 2) S.G. O'Brien, F. Guilhot, R.A. Larson, I. Gathmann, M. Baccarani, F. Cervantes, J.J. Cornelissen, T. Fischer, A. Hochhaus, T. Hughes, K. Lechner, J.L. Nielsen, P. Rousselot, J. Reiffers, G. Saglio, J. Shepherd, B. Simonsson, A. Gratwohl, J.M. Goldman, H. Kantarjian, K. Taylor, G. Verhoef, A.E. Bolton, R. Capdeville, B.J. Druker, Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 994–1004.
- 3) H.O. Alsaab, S. Sau, R. Alzhrani, K. Tatiparti, K. Bhise, S.K. Kashaw, A.K. Iyer, PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 561.
- 4) M. Bornhäuser, B. Storer, J.T. Slattery, F.R. Appelbaum, H.J. Deeg, J. Hansen, P.J. Martin, G.B. McDonald, W.G. Nichols, J. Radich, A. Woolfrey, A. Jenke, E. Schleyer, C. Thiede, G. Ehninger, C. Anasetti, Conditioning with fludarabine and targeted busulfan for transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells, *Blood.* 102 (2003) 820–826.
- 5) A. Paci, G. Veal, C. Bardin, D. Levêque, N. Widmer, J. Beijnen, A. Astier, E. Chatelut, Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1 - Cytotoxics, *Eur. J. Cancer.* 50 (2014) 2010–2019.
- 6) S. Picard, K. Titier, G. Etienne, E. Teilhet, D. Ducint, M.A. Bernard, R. Lassalle, G. Marit, J. Reiffers, B. Begaud, N. Moore, M. Molimard, F.X. Mahon, Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia, *Blood.* 109 (2007) 3496–3499.
- 7) K. Mizoguchi, Y. Nakamura, K. Sano, S. Sato, Y. Ikegami, K. Motoshima, S. Takemoto, D. Ogawara, H. Senju, N. Sugasaki, T. Ikeda, H. Yamaguchi, K. Nakatomi, M. Fukuda, K. Izumikawa, H. Mukae, Pharmacokinetic parameters of gefitinib predict efficacy and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78 (2016) 377–382.
- 8) N. Widmer, C. Bardin, E. Chatelut, A. Paci, J. Beijnen, D. Levêque, G. Veal, A. Astier, Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two - Targeted therapies, *Eur. J. Cancer.* 50 (2014) 2020–2036.
- 9) J.M.W. Van den Ouweland, I.P. Kema, The role of liquid chromatography-tandem

- mass spectrometry in the clinical laboratory, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 30 (2012) 19–34.
- 10) J.E. Adaway, B.G. Keevil, L.J. Owen, Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory, *Ann. Clin. Biochem.* 52 (2015) 18–38.
 - 11) K. Fujita, Y. Kubota, H. Ishida, Y. Sasaki, Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer, *World J. Gastroenterol.* 21 (2015) 12234–12248.
 - 12) M. Fukuoka, H. Niitani, A. Suzuki, M. Motomiya, K. Hasegawa, Y. Nishiwaki, T. Kuriyama, Y. Ariyoshi, S. Negoro, N. Masuda, A phase II study of CPT-11, a new derivative of camptothecin, for previously untreated non-small-cell lung cancer., *J. Clin. Oncol.* 10 (1992) 16–20.
 - 13) Kawato Y, Inhibitory effect of CPT-11, a derivative of camptothecin, on acetylcholinesterase, and its binding ability to acetylcholine receptors., *Kiso to Rinsho (in Japanese)*. 24 (1990) 7407–7412.
 - 14) D. Abigeres, G.G. Chabot, J.P. Armand, P. H?rait, A. Gouyette, D. Gandia, Phase I and pharmacologic studies of the camptothecin analog irinotecan administered every 3 weeks in cancer patients., *J. Clin. Oncol.* 13 (1995) 210–221.
 - 15) National Institute for Occupational Safety and Healt, Preventing occupational exposures to antineoplastic and other hazardous drugs in health care settings., DHHS Publ No. 2004-165. (2011).
 - 16) American Society of Health-System Pharmacist, ASHP guidelines on handling hazardous drugs, *Am. J. Heal. Pharm.* 63 (2006) 1172–1193.
 - 17) X. Chen, C.J. Peer, R. Alfaro, T. Tian, S.D. Spencer, W.D. Figg, Quantification of irinotecan, SN38, and SN38G in human and porcine plasma by ultra high-performance liquid chromatography?tandem mass spectrometry and its application to hepatic chemoembolization, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 62 (2012) 140–148.
 - 18) National Institute for Occupational Safety and Healt, NIOSH List of Antineoplastic and Other Hazardous Drugs in Healthcare Settings 2016 (2016).
 - 19) J. van Ark-Otte, M.A. Kedde, W.J. van der Vijgh, A.M. Dingemans, W.J. Jansen, H.M. Pinedo, E. Boven, G. Giaccone, Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells., *Br. J. Cancer.* 77 (1998) 2171–6.
 - 20) B.G. Valanis, W.M. Vollmer, K.T. Labuhn, A.G. Glass, Association of antineoplastic drug handling with acute adverse effects in pharmacy personnel, *Am. J. Heal. Pharm.* 50 (1993) 455–462.
 - 21) B.G. Valanis, W.M. Vollmer, K.T. Labuhn, A.G. Glass, Acute symptoms associated with antineoplastic drug handling among nurses., *Cancer Nurs.* 16 (1993) 288–295.
 - 22) G. Dranitsaris, M. Johnston, S. Poirier, T. Schueller, D. Milliken, E. Green, B.

- Zanke, Are health care providers who work with cancer drugs at an increased risk for toxic events? A systematic review and meta-analysis of the literature, *J. Oncol. Pharm. Pract.* 11 (2005) 69–78.
- 23) K. Hoogtanders, J. van der Heijden, M. Christiaans, P. Edelbroek, J.P. van Hooff, L.M.L. Stolk, Therapeutic drug monitoring of tacrolimus with the dried blood spot method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 658–664.
 - 24) A.J. Wilhelm, J.C.G. den Burger, R.M. Vos, A. Chahbouni, A. Sinjewel, Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 1595–1598.
 - 25) R. Nageswara Rao, R.M. Vali, B. Ramachandra, P.K. Maurya, Rapid determination of rifaximin on dried blood spots by LC-ESI-MS, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 1201–1207.
 - 26) D.H. Vu, R.A. Koster, J.W.C. Alffenaar, J.R.B.J. Brouwers, D.R.A. Uges, Determination of moxifloxacin in dried blood spots using LC–MS/MS and the impact of the hematocrit and blood volume, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 1063–1070.
 - 27) M. Ansari, C.R.S. Uppugunduri, J. Déglon, Y. Théorêt, F. Versace, F. Gumy-Pause, H. Ozsahin, P. Dayer, J. Desmeules, Y. Daali, A simplified method for busulfan monitoring using dried blood spot in combination with liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 1437–1446.
 - 28) D. de Wit, J. den Hartigh, H. Gelderblom, Y. Qian, M. den Hollander, H. Verheul, H.-J. Guchelaar, N.P. van Erp, Dried blood spot analysis for therapeutic drug monitoring of pazopanib, *J. Clin. Pharmacol.* 55 (2015) 1344–1350.
 - 29) N. Spooner, R. Lad, M. Barfield, Dried Blood Spots as a Sample Collection Technique for the Determination of Pharmacokinetics in Clinical Studies: Considerations for the Validation of a Quantitative Bioanalytical Method, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1557–1563.
 - 30) A.J. Wilhelm, J.C.G. den Burger, E.L. Swart, Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions, *Clin. Pharmacokinet.* 53 (2014) 961–973.
 - 31) P.M. Edelbroek, J. van der Heijden, L.M. Stolk, Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls, *Ther Drug Monit.* 31 (2009) 327–336.
 - 32) H. Kobayashi, K. Sato, T. Niioka, H. Miura, H. Ito, M. Miura, Relationship among gefitinib exposure, polymorphisms of its metabolizing enzymes and transporters,

- and side effects in Japanese patients with non-small-cell lung cancer, *Clin. Lung Cancer*. 16 (2015) 274–281.
- 33) L. Faivre, C. Gomo, O. Mir, F. Taieb, A. Schoemann-Thomas, S. Ropert, M. Vidal, D. Dusser, A. Dauphin, F. Goldwasser, B. Blanchet, A simple HPLC-UV method for the simultaneous quantification of gefitinib and erlotinib in human plasma, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 2345–2350.
 - 34) M. Zhao, C. Hartke, A. Jimeno, J. Li, P. He, Y. Zabelina, M. Hidalgo, S.D. Baker, Specific method for determination of gefitinib in human plasma, mouse plasma and tissues using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 819 (2005) 73–80.
 - 35) R. Honeywell, K. Yarzadah, E. Giovannetti, N. Losekoot, E.F. Smit, M. Walraven, J.S.W. Lind, C. Tibaldi, H.M. Verheul, G.J. Peters, Simple and selective method for the determination of various tyrosine kinase inhibitors used in the clinical setting by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 1059–1068.
 - 36) J. Ministry of Health, Labour and Welfare, Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development, (2013).
 - 37) Y. Nakamura, K. Sano, H. Soda, H. Takatani, M. Fukuda, S. Nagashima, T. Hayashi, M. Oka, K. Tsukamoto, S. Kohno, Pharmacokinetics of Gefitinib Predicts Antitumor Activity for Advanced Non-small Cell Lung Cancer, *J. Thorac. Oncol.* 5 (2010) 1404–1409.
 - 38) Y.-Y. Zhao, S. Li, Y. Zhang, H.-Y. Zhao, H. Liao, Y. Guo, Y.-X. Shi, W. Jiang, C. Xue, L. Zhang, The relationship between drug exposure and clinical outcomes of non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib., *Med. Oncol.* 28 (2011) 697–702.
 - 39) T. Hirose, K. ichi Fujita, S. Kusumoto, Y. Oki, Y. Murata, T. Sugiyama, H. Ishida, T. Shirai, M. Nakashima, T. Yamaoka, K. Okuda, T. Ohmori, Y. Sasaki, Association of pharmacokinetics and pharmacogenomics with safety and efficacy of gefitinib in patients with EGFR mutation positive advanced non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*. 93 (2016) 69–76.
 - 40) T. Ishida, T. Naito, J. Kawakami, Simultaneous determination of erlotinib and its isomeric major metabolites in human plasma using isocratic liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its clinical application, *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015) 643–646.
 - 41) H. Swaisland, A. Laight, L. Stafford, H. Jones, C. Morris, A. Dane, R. Yates, Pharmacokinetics and Tolerability of the Orally Active Selective Epidermal

- Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 in Healthy Volunteers, *Clin. Pharmacokinet.* 40 (2001) 297–306.
- 42) N.G. Jager, H. Rosing, J.H. Schellens, J.H. Beijnen, Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: a review, *Bioanalysis.* 6 (2014) 2481–2514.
 - 43) P. Denniff, N. Spooner, The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs, *Bioanalysis.* 2 (2010) 1385–1395.
 - 44) M. O'Mara, B. Hudson-Curtis, K. Olson, Y. Yueh, J. Dunn, N. Spooner, The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples., *Bioanalysis.* 3 (2011) 2335–47.
 - 45) M. Fukudo, Y. Ikemi, Y. Togashi, K. Masago, Y.H. Kim, T. Mio, T. Terada, S. Teramukai, M. Mishima, K.I. Inui, T. Katsura, Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of erlotinib and pharmacogenomic analysis of plasma and cerebrospinal fluid drug concentrations in Japanese patients with non-small cell lung cancer, *Clin. Pharmacokinet.* 52 (2013) 593–609.
 - 46) C.M. Rudin, W. Liu, A. Desai, T. Karrison, X. Jiang, L. Janisch, S. Das, J. Ramirez, B. Poonkuzhali, E. Schuetz, D.L. Fackenthal, P. Chen, D.K. Armstrong, J.R. Brahmer, G.F. Fleming, E.E. Vokes, M.A. Carducci, M.J. Ratain, Pharmacogenomic and pharmacokinetic determinants of erlotinib toxicity, *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 1119–1127.
 - 47) S. Wind, M. Schmid, J. Erhardt, R.G. Goeldner, P. Stopfer, Pharmacokinetics of afatinib, a selective irreversible ErbB family blocker, in patients with advanced solid tumours, *Clin. Pharmacokinet.* 52 (2013) 1101–1109.
 - 48) S. Wind, D. Schnell, T. Ebner, M. Freiwald, P. Stopfer, Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Afatinib, *Clin. Pharmacokinet.* 56 (2017) 235–250.
 - 49) K. Takada, G. Toyokawa, F. Shoji, T. Okamoto, Y. Maehara, The Significance of the PD-L1 Expression in Non–Small-Cell Lung Cancer: Trenchant Double Swords as Predictive and Prognostic Markers, *Clin. Lung Cancer.* 19 (2018) e219–e226.
 - 50) M. Reck, D. Rodríguez-Abreu, A.G. Robinson, R. Hui, T. Csöszi, A. Fülöp, M. Gottfried, N. Peled, A. Tafreshi, S. Cuffe, M. O'Brien, S. Rao, K. Hotta, M.A. Leiby, G.M. Lubiniecki, Y. Shentu, R. Rangwala, J.R. Brahmer, Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 1823–1833.
 - 51) M.J. Overman, S. Lonardi, K.Y.M. Wong, H.J. Lenz, F. Gelsomino, M. Aglietta, M.A. Morse, E. Van Cutsem, R. McDermott, A. Hill, M.B. Sawyer, A. Hendlish, B. Neyns, M. Svrcek, R.A. Moss, J.M. Ledezne, Z.A. Cao, S. Kamble, S. Kopetz, T. André, Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA

- mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.* 36 (2018) 773–779.
- 52) K.R. Voong, J. Feliciano, D. Becker, B. Levy, Beyond PD-L1 testing-emerging biomarkers for immunotherapy in non-small cell lung cancer, *Ann. Transl. Med.* 5 (2017) 376–376.
 - 53) Y. Feng, X. Wang, G. Bajaj, S. Agrawal, A. Bello, B. Lestini, F.G. Finckenstein, J.S. Park, A. Roy, Nivolumab exposure–response analyses of efficacy and safety in previously treated squamous or nonsquamous non–small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 23 (2017) 5394–5405.
 - 54) G. Bajaj, M. Gupta, Y. Feng, P. Statkevich, A. Roy, Exposure–Response Analysis of Nivolumab in Patients With Previously Treated or Untreated Advanced Melanoma, *J. Clin. Pharmacol.* 57 (2017) 1527–1533.
 - 55) X. Zhao, S. Suryawanshi, M. Hruska, Y. Feng, X. Wang, J. Shen, H.E. Vezina, M.B. McHenry, I.M. Waxman, A. Achanta, A. Bello, A. Roy, S. Agrawal, Assessment of nivolumab benefit-risk profile of a 240-mg flat dose relative to a 3-mg/kg dosing regimen in patients with advanced tumors, *Ann. Oncol.* 28 (2017) 2002–2008.
 - 56) G. Bajaj, X. Wang, S. Agrawal, M. Gupta, A. Roy, Y. Feng, Model-Based Population Pharmacokinetic Analysis of Nivolumab in Patients With Solid Tumors, *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 6 (2017) 58–66.
 - 57) A. Puszkiel, G. Noé, P. Boudou-Rouquette, C.L. Cossec, J. Arrondeau, J.-S. Giraud, A. Thomas-Schoemann, J. Alexandre, M. Vidal, F. Goldwasser, B. Blanchet, Development and validation of an ELISA method for the quantification of nivolumab in plasma from non-small-cell lung cancer patients, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 139 (2017) 30–36.
 - 58) R. Jenkins, J.X. Duggan, A.-F. Aubry, J. Zeng, J.W. Lee, L. Cojocaru, D. Dufield, F. Garofolo, S. Kaur, G.A. Schultz, K. Xu, Z. Yang, J. Yu, Y.J. Zhang, F. Vazvaei, Recommendations for Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics, *AAPS J.* 17 (2015) 1–16.
 - 59) E.N. Fung, P. Bryan, A. Kozhich, Techniques for quantitative LC–MS/MS analysis of protein therapeutics: advances in enzyme digestion and immunocapture, *Bioanalysis.* 8 (2016) 847–856.
 - 60) K. Shibata, T. Naito, J. Okamura, S. Hosokawa, H. Mineta, J. Kawakami, Simple and rapid LC-MS/MS method for the absolute determination of cetuximab in human serum using an immobilized trypsin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 146 (2017) 266–272.
 - 61) A.J. Kleinnijenhuis, M. Ingola, J.H. Toersche, Quantitative bottom up analysis of

- infiximab in serum using protein A purification and integrated μ LC- electrospray chip IonKey MS / MS technology, *Bioanalysis*. 8 (2016) 891–904.
- 62) K. Mekhssian, J.-N. Mess, F. Garofolo, Application of high-resolution MS in the quantification of a therapeutic monoclonal antibody in human plasma, *Bioanalysis*. 6 (2014) 1767–1779.
 - 63) N. Iwamoto, T. Shimada, H. Terakado, A. Hamada, Validated LC-MS/MS analysis of immune checkpoint inhibitor Nivolumab in human plasma using a Fab peptide-selective quantitation method: Nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1023–1024 (2016) 9–16.
 - 64) H. Chiu, H. Liao, Y. Shao, Y. Lu, C. Lin, I. Tsai, C. Kuo, Analytica Chimica Acta Development of a general method for quantifying IgG-based therapeutic monoclonal antibodies in human plasma using protein G purification coupled with a two internal standard calibration strategy using LC-MS / MS, *Anal. Chim. Acta*. 1019 (2018) 93–102.
 - 65) N. Mamesaya, H. Kenmotsu, M. Katsumata, T. Nakajima, M. Endo, T. Takahashi, Osimertinib-induced interstitial lung disease after treatment with anti-PD1 antibody, *Invest. New Drugs*. 35 (2017) 105–107.
 - 66) T. Kato, N. Masuda, Y. Nakanishi, M. Takahashi, T. Hida, H. Sakai, S. Atagi, S. Fujita, H. Tanaka, K. Takeda, M. Satouchi, Y. Namba, T. Tamura, Nivolumab-induced interstitial lung disease analysis of two phase II studies patients with recurrent or advanced non-small-cell lung cancer, *Lung Cancer*. 104 (2017) 111–118.
 - 67) H. Borghaei, L. Paz-Ares, L. Horn, D.R. Spigel, M. Steins, N.E. Ready, L.Q. Chow, E.E. Vokes, E. Felip, E. Holgado, F. Barlesi, M. Kohlhäufel, O. Arrieta, M.A. Burgio, J. Fayette, H. Lena, E. Poddubskaya, D.E. Gerber, S.N. Gettinger, C.M. Rudin, N. Rizvi, L. Crinò, G.R. Blumenschein, S.J. Antonia, C. Dorange, C.T. Harbison, F. Graf Finckenstein, J.R. Brahmer, Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer., *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 1627–39.
 - 68) アストラゼネカ株式会社, タグリッソ錠 使用成績調査 中間報告 結果報告, (2018).
 - 69) P.T. Diamantopoulos, M. Gaggadi, E. Kassi, O. Benopoulou, A. Anastasopoulou, H. Gogas, Late-onset nivolumab-mediated pneumonitis in a patient with melanoma and multiple immune-related adverse events, *Melanoma Res.* 27 (2017) 391–395.
 - 70) C.P. Selinger, M. V. Lenti, T. Clark, H. Rafferty, D. Gracie, A.C. Ford, A.

- O'Connor, T. Ahmad, P.J. Hamlin, Infliximab Therapeutic Drug Monitoring Changes Clinical Decisions in a Virtual Biologics Clinic for Inflammatory Bowel Disease, *Inflamm. Bowel Dis.* 23 (2017) 2083–2088.
- 71) K. Bloem, B. Hernández-Breijo, A. Martínez-Feito, T. Rispens, Immunogenicity of Therapeutic Antibodies: Monitoring Antidrug Antibodies in a Clinical Context, *Ther. Drug Monit.* 39 (2017) 327–332.
 - 72) M. Faria, M.S. Halquist, M. Yuan, W. Mylott, R.G. Jenkins, H.T. Karnes, Comparison of a stable isotope labeled (SIL) peptide and an extended SIL peptide as internal standards to track digestion variability of an unstable signature peptide during quantification of a cancer biomarker, human osteopontin, from plasma using capill, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1001 (2015) 156–168.
 - 73) M. Faria, M.S. Halquist, M. Yuan, W. Mylott, R.G. Jenkins, H.T. Karnes, An extended stable isotope-labeled signature peptide internal standard for tracking immunocapture of human plasma osteopontin for LC-MS/MS quantification, *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015) 1780–1782.
 - 74) Z. Yang, M. Hayes, X. Fang, M.P. Daley, S. Effenberg, F.L.S. Tse, LC-MS/MS approach for quantification of therapeutic proteins in plasma using a protein internal standard and 2D-solid-phase extraction cleanup, *Anal. Chem.* 79 (2007) 9294–9301.
 - 75) W. Li, H. Lin, Y. Fu, J. Flarakos, LC–MS/MS determination of a human mAb drug candidate in rat serum using an isotopically labeled universal mAb internal standard, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1044–1045 (2017) 166–176.
 - 76) K. Otsubo, K. Nakatomi, R. Furukawa, K. Ashida, Y. Yoneshima, Y. Nakanishi, I. Okamoto, Two cases of late-onset secondary adrenal insufficiency after discontinuation of nivolumab, *Ann. Oncol.* 28 (2017) 3106–3107.
 - 77) O. Takakuwa, T. Oguri, T. Uemura, K. Sone, S. Fukuda, M. Okayama, Y. Kanemitsu, H. Ohkubo, M. Takemura, Y. Ito, K. Maeno, A. Niimi, Osimertinib-induced interstitial lung disease in a patient with non-small cell lung cancer pretreated with nivolumab: A case report, *Mol. Clin. Oncol.* 7 (2017) 383–385.
 - 78) T. Takenaka, K. Yamazaki, N. Miura, N. Harada, S. Takeo, Osimertinib reactivated immune-related colitis after treatment with anti-PD1 antibody for non-small cell lung cancer, *Invest. New Drugs.* 35 (2017) 848–850.
 - 79) G. Goss, C.-M. Tsai, F.A. Shepherd, L. Bazhenova, J.S. Lee, G.-C. Chang, L. Crino, M. Satouchi, Q. Chu, T. Hida, J.-Y. Han, O. Juan, F. Dunphy, M. Nishio,

- J.-H. Kang, M. Majem, H. Mann, M. Cantarini, S. Ghiorghiu, T. Mitsudomi, Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study, *Lancet Oncol.* 17 (2016) 1643–1652.
- 80) T.S. Mok, Y.-L. Wu, M.-J. Ahn, M.C. Garassino, H.R. Kim, S.S. Ramalingam, F.A. Shepherd, Y. He, H. Akamatsu, W.S.M.E. Theelen, C.K. Lee, M. Sebastian, A. Templeton, H. Mann, M. Marotti, S. Ghiorghiu, V.A. Papadimitrakopoulou, AURA3 Investigators, Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer., *N. Engl. J. Med.* 376 (2017) 629–640.
 - 81) J.-C. Soria, Y. Ohe, J. Vansteenkiste, T. Reungwetwattana, B. Chewaskulyong, K.H. Lee, A. Dechaphunkul, F. Imamura, N. Nogami, T. Kurata, I. Okamoto, C. Zhou, B.C. Cho, Y. Cheng, E.K. Cho, P.J. Voon, D. Planchard, W.-C. Su, J.E. Gray, S.-M. Lee, R. Hodge, M. Marotti, Y. Rukazenzov, S.S. Ramalingam, FLAURA Investigators, Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer., *N. Engl. J. Med.* 378 (2018) 113–125.
 - 82) P. Ballard, J.W.T. Yates, Z. Yang, D.-W. Kim, J.C.-H. Yang, M. Cantarini, K. Pickup, A. Jordan, M. Hickey, M. Grist, M. Box, P. Johnston, K. Varnas, J. Malmquist, K.S. Thress, P.A. Janne, D. Cross, Preclinical Comparison of Osimertinib with Other EGFR-TKIs in EGFR-Mutant NSCLC Brain Metastases Models, and Early Evidence of Clinical Brain Metastases Activity, *Clin. Cancer Res.* 22 (2016) 5130–5140.
 - 83) S. Nanjo, H. Ebi, S. Arai, S. Takeuchi, T. Yamada, S. Mochizuki, Y. Okada, M. Nakada, T. Murakami, S. Yano, High efficacy of third generation EGFR inhibitor AZD9291 in a leptomeningeal carcinomatosis model with EGFR-mutant lung cancer cells, *Oncotarget.* 7 (2016) 3847–3856.
 - 84) J.J.M. Rood, M.T.J. van Bussel, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, R.W. Sparidans, Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for the T790M mutant EGFR inhibitor osimertinib (AZD9291) in human plasma., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1031 (2016) 80–85.
 - 85) G. Guetens, H. Prenen, G. De Boeck, W. Van Dongen, E. Esmans, F. Lemièrè, A.T. van Oosterom, P. Schöffski, E.A. de Bruijn, Sensitive and specific quantification of the anticancer agent ZD1839 (Gefitinib) in plasma by on-column focusing capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1082 (2005) 2–5.
 - 86) P.A. Jänne, J.C.-H. Yang, D.-W. Kim, D. Planchard, Y. Ohe, S.S. Ramalingam, M.-J. Ahn, S.-W. Kim, W.-C. Su, L. Horn, D. Haggstrom, E. Felip, J.-H. Kim, P. Frewer, M. Cantarini, K.H. Brown, P.A. Dickinson, S. Ghiorghiu, M. Ranson,

- AZD9291 in EGFR Inhibitor–Resistant Non–Small–Cell Lung Cancer, *N. Engl. J. Med.* 372 (2015) 1689–1699.
- 87) S. Nanjo, A. Hata, C. Okuda, R. Kaji, H. Okada, D. Tamura, K. Irie, H. Okada, S. Fukushima, N. Katakami, Standard-dose osimertinib for refractory leptomeningeal metastases in T790M-positive EGFR-mutant non-small cell lung cancer, *Br. J. Cancer.* 118 (2018) 32–37.
 - 88) A.J. Ji, Z. Jiang, Y. Livson, J.A. Davis, J.X. Chu, N. Weng, Challenges in urine bioanalytical assays: overcoming nonspecific binding, *Bioanalysis.* 2 (2010) 1573–1586.
 - 89) A.M. Wagdy, J.C. Kim, G.E. Kim, H. Wu, T. El-Shourbagy, Effect of sample collection tubing type used in a clinical study on quantitation of pharmaceutical compounds in CSF by LC–MS/MS, *Bioanalysis.* 3 (2011) 167–179.
 - 90) P.A. Dickinson, M. V. Cantarini, J. Collier, P. Frewer, S. Martin, K. Pickup, P. Ballard, Metabolic Disposition of Osimertinib in Rats, Dogs, and Humans: Insights into a Drug Designed to Bind Covalently to a Cysteine Residue of Epidermal Growth Factor Receptor, *Drug Metab. Dispos.* 44 (2016) 1201–1212.
 - 91) Y. Togashi, K. Masago, S. Masuda, T. Mizuno, M. Fukudo, Y. Ikemi, Y. Sakamori, H. Nagai, Y.H. Kim, T. Katsura, M. Mishima, Cerebrospinal fluid concentration of gefitinib and erlotinib in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 70 (2012) 399–405.