

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 論文題名<br>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   |                       |
| 氏 名 入江 慶   | 学 籍 番 号 9 4 1 4 1 0 1 |
| 主 論 文  |                       |
| <p>1) <b>Irie K.</b>, 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. <i>Journal of Oncology Pharmacy Practice</i>. (in Press, Available online, 13 Apr 2018)</p> <p>2) <b>Irie K.</b>, 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. <i>J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci</i>. 1087–1088 (2018) 1–5.</p> <p>3) <b>Irie K.</b>, 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. <i>Therapeutic Drug Monitoring</i>. 40 (2018) 716–724.</p> |                       |
| 要 旨  |                       |
| <p>近年のがん化学療法は、殺細胞性の抗がん剤に加え、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬などの登場により大きく変化を遂げている。複雑化するがん治療の中で、それぞれの薬剤を適切に使用し、有効かつ安全な治療を提供することが重要な課題である。抗がん剤の薬物動態に関するデータは、これらの薬剤の適正使用のための一助になり得ると考える。本研究では、様々な視点から液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用いた抗がん剤の生体中濃度測定法の構築を行い、その臨床応用について検討を行った。</p> <p>第1章では、殺細胞性の抗がん剤であるイリノテカンの汗中濃度を測定し、汗を介した職業暴露の危険性について検討を行った。イリノテカンとは、現在でも多くのがんの治療において重要な薬剤である。本研究では、イリノテカンを含む化学療法を施行中に発汗が認められた患者を対象に、投与中に生じた汗を採取し、イリノテカンおよびその活性代謝物である SN-38 の汗中濃度を LC-MS/MS を用いて測定した。4 人の患者から汗を採取した。イリノテカンの平均投与量（±標準偏差）は、292.3（±75.5）mg であった。4 人中いずれの患者でもイリノテカンが汗中に検出され、その平均濃度（±標準偏差）は、252.6（±111.9）ng/mL であった。また、4 人中 1 人で SN-38 が検出され、その濃度は、74.37 ng/mL であった。以上の結果から、イリノテカンおよび SN-38 は汗中に分泌されることが示され、汗や汗のしみ込んだ衣類などを介したイリノテカンおよび SN-38 の暴露の危険性があることを明らかにした。イリノテカンにはコリン作用があり、投与中にしばしば発汗を伴うことから、他の抗がん剤に比べ、汗を介した暴露の可能性が高いと考えられる。</p>   |                       |

第2章では、分子標的薬であるゲフィチニブの Dried blood spot (DBS) 法を用いた血中濃度測定法の構築を行い、微量採血による薬物動態研究の可能性について検討した。ゲフィチニブは EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺がんの治療に使用される EGFR-TKI であり、血中濃度と副作用の関連が報告されている。DBS 法は、微量の血液をろ紙に滴下・乾燥させて保管運搬する採血法であり、DBS 法により血液 1 滴からでも薬物の血中濃度を測定できることが報告されている。本研究では、より簡便な薬物血中濃度のモニタリング法の構築を目的として DBS 法を用いたゲフィチニブの測定方法の構築を行った。DBS からゲフィチニブを有機溶媒(メタノール)を用いて抽出し、上清を LC-MS/MS に注入し分析した。分析バリデーションとして、選択性、真度、精度、回収率、マトリックス効果、安定性を評価した。また、臨床研究としてゲフィチニブを服用中の 10 人の患者を対象に、血漿中濃度と DBS 中濃度の比較を行った。分析バリデーションの結果、DBS 法を用いてゲフィチニブを選択的に検出することができ、検量線は臨床的濃度を含む範囲で良好な直線性を示した。精度および真度は±15%の範囲内であった。さらにゲフィチニブを服用中の患者における血漿中濃度と DBS 中濃度には、良好な相関が認められた。加えて同様の方法でゲフィチニブと同じ EGFR-TKI であるエルロチニブおよびアファチニブの DBS 法を用いた測定法の検討を行った結果、いずれの薬剤においても DBS 法を用いて血中濃度を測定することが可能であった。以上、本研究では、DBS 法と LC-MS/MS を用いた EGFR-TKI の血中濃度測定法を構築し、これらの薬剤の血中濃度を簡便かつ低侵襲に測定できることを実証した。

第3章では、免疫チェックポイント阻害薬である抗体医薬ニボルマブの LC-MS/MS を用いた血漿中濃度測定法の構築を行い、さらに薬物動態の予測について検討した。ニボルマブは、PD-1 を標的とする IgG4 モノクローナル抗体であり、がん抗原特異的な免疫細胞の活性化と増殖を促進し抗腫瘍効果を発揮する。ニボルマブの血中濃度を測定するために、血漿中から rProtein A ゲルを用いて IgG を精製し、トリプシン消化を行った。ニボルマブのサロゲートペプチドとして ASGITFSNSGMHWVR の配列(MRM トランジション: m/z 550.6→661.4)を選択し、LC-MS/MS を用いて検出した。分析バリデーションとして、選択性、真度、精度、回収率、マトリックス効果、安定性などを評価した。さらにニボルマブによる治療を行っている 14 人の非小細胞肺がん患者において、合計 126 ポイントの血漿中濃度を測定し、ニボルマブの薬物動態を、過去に報告されているニボルマブの母集団薬物動態モデルに基づき、ソフトウェア Phoenix NLME を用いて解析した。分析バリデーションの結果、ニボルマブは血漿中において選択的に検出され、臨床的な濃度を含む範囲で良好な直線性を示し、精度および真度は±15%以内であった。LC-MS/MS を用いて測定したニボルマブの薬物動態は、過去に報告されている母集団薬物動態モデルと一致した。ニボルマブの薬物動態パラメーターは、1 ポイントのトラフ値からベイズ推定を用いることで予測可能であった。以上、LC-MS/MS を用いたニボルマブの血中濃度測定法を構築し、また母集団動態解析と組み合わせることで、臨床におけるニボルマブの薬物動態を予測可能であり、将来的にニボルマブの治療薬物濃度モニタリングに有用であると考えられる。

第4章では、分子標的薬であるオシメルチニブの髄液中濃度測定法の構築を行い、ヒトにおけるオシメルチニブの髄液移行率の検討を行った。オシメルチニブは、第3世代の EGFR-TKI であり、従来の EGFR-TKI に耐性を示す T790M 遺伝子変異を有する非小細胞肺がん患者の治療薬である。オシメルチニブが脳脊髄液に移行するかどうかは、非小細胞肺がんの重要な合併症の1つである癌性髄膜炎の治療の選択肢となり得るかを考えるときに重要である。血漿中および髄液中のオシメルチニブはアセトニトリルを用いて除タンパクし、上清を LC-MS/MS に注入し分析した。分析バリデーションとして、選択性、真度、精度、回収率、マトリックス効果、安定性などを評価した。オシメルチニブは、血漿中および髄液中において選択的に検出され、臨床的な濃度範囲において良好な直線性を示し、精度および真度は±15%以内であった。しかし、髄液中においてオシメルチニブは著しくポリプロピレン製の保管容器に吸着し、in vitro における吸着実験では、吸着による濃度の減少は、45.5%であった。一方で、吸着抑制剤として BSA を添加することで、この吸着は減少

させることが可能であった。2 人の非小細胞肺癌患者における血漿中および髄液中濃度を測定した結果でも、著しい吸着の影響が認められたが、BSA を添加することで吸着は改善された。血漿中濃度、髄液中濃度、移行率（濃度比）は、それぞれの患者で、32.1 nM、26.3 nM、4.9%、および 870.8 nM、9.5 nM、1.1%であった。また、13 人の患者では、BSA の添加なしに髄液中濃度を測定したが、吸着率から濃度を逆算し、血漿中濃度と比較した結果、相関係数 0.427、 $p=0.0422$  で有意な相関を示した。以上、オシメルチニブの血漿中濃度および髄液中濃度測定法の構築を行い、非小細胞肺癌患者における血漿中および髄液中濃度を測定した結果、血漿中濃度に依存して髄液中に移行したが、ばらつきも大きいことが明らかになった。

以上の一連の研究から、近年進歩を遂げるがん化学療法に、LC-MS/MS を用いた薬物濃度測定法を組み入れることで、薬物動態学的な視点を加えた抗がん剤治療が可能になることが示唆された。第一章および第四章で得られた結果は、これまでに報告がなく、臨床現場には重要なデータである。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髄液中濃度は、癌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うえで重要である。一方で、第二章の Dried blood spot 法や、第三章の LC-MS/MS を用いた抗体医薬品の測定法などの、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と考えられる。Dried blood spot 法などの微量採血法は、臨床現場において薬物動態を評価するための優れたツールであり、地域の薬局や小児の薬物動態学的研究にも応用可能と考えられる。また、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、今後もさらに種類が増加していくと考えられる抗体医薬品に対して有用な測定法と考えられる。しかしながら、本研究で得られたエビデンスは限られたものであり、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ことが必要であると考えられる。