

研究報告書  
一般課題：B  
(平成28年度)

平成30年 1月 13日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 国立がん研究センター東病院

住 所 千葉県柏市柏の葉6-5-1

研究者氏名 森田智子



(研究課題)

甲状腺癌患者を対象としたレンバチニブ簡易懸濁時の生物学的同等性試験

---

平成29年 4月 1日付助成金交付のあった標記一般課題：Bについて研究の経過をご報告いたします。

## 1. 目的

本研究では、簡易懸濁法がレンバチニブの薬物動態に与える影響を評価するため、レンバチニブで治療する切除不能および<sup>131</sup>I難治性の甲状腺がん患者を対象に、カプセル剤を服用する群と簡易懸濁法を利用し服用する群の薬物動態および安全性を比較する。

レンバチニブは、放射性ヨウ素治療抵抗性の分化型甲状腺がん(DTC)患者を対象とした臨床第III相試験において、主要評価項目である無増悪生存期間が、レンバチニブ投与群で中央値：18.3ヶ月、プラセボ投与群で中央値：3.6ヶ月と統計学的に有意な延長を示した(ハザード比0.21(99%信頼区間=0.14-0.31、p<0.0001))。本邦では、DTCだけでなく、甲状腺髓様癌及び甲状腺未分化癌にレンバチニブは適応があり、甲状腺がん患者にとって非常に重要な薬剤である。しかし、レンバチニブの対象となる甲状腺癌の患者は、病勢の進行や度重なる手術により嚥下困難を伴う症例もあり、レンバチニブのカプセル服用が困難な場合がある。このような嚥下困難を伴う症例が内服薬を服用する場合、臨床では簡易懸濁法を利用する。簡易懸濁法とは、薬剤をあらかじめ入れたシリング内に20mLの55°C微温湯を吸い、シリング内で懸濁させ、経口、経管より投与する方法である。嚥下困難な症例に対し内服薬を投与可能とし、薬剤を粉碎・開封しないため、薬剤量のロスが少なく、医療従事者の曝露が少ないというメリットがある。しかし、多くの薬剤において、55°Cの微温湯に対する主薬の安定性および経管チューブに対する吸着性また通過性、懸濁液を投与した場合の体内動態が不明である。レンバチニブに関しては、微温湯に対する安定性、PEGチューブに対する吸着性、通過性は確認されているものの、簡易懸濁法を利用した場合の体内動態および安全性は確認されていない。以上より、本試験の対象を切除不能および<sup>131</sup>I難治性の甲状腺がん患者とし、簡易懸濁法がレンバチニブの薬物動態および安全性に与える影響を評価する。

## 2. 方法

平成29年度は、血液中のレンバチニブ測定系の確立および臨床試験のプロトコール作成を実施した。

### ①血液中レンバチニブ測定系の確立

高速液体クロマトグラフィー質量分析器(LC-MS/MS)を用い、血液中のレンバチニブの測定法を確立した。移動相やカラムの条件を検討するだけでなく、血液由来の共雑物質を除去する前処理方法についても検討した。加えて、測定系のバリデーションを実施した。測定系のバリデーションには、「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に関するガイドライン」に従い、選択性、定量下限、検量線、真度及び精度、マトリックス効果、回収率、キャリーオーバー、希釈の妥当性、安定性をフルバリデーションを実施した。

### ②臨床試験のプロトコール作成

当院の臨床試験支援チームと生物統計コンサルテーションチームと協力し、薬物動態試験のプロトコールを作成している。29年度中には、倫理審査員会へ提出予定である。

## 3. 結果

### ①血液中レンバチニブ測定系の確立

#### 1) 測定条件

##### 分析機器

液体クロマトグラフィー: Prominence LC-20AB/SPD-20A (Shimadzu Co.; Kyoto, Japan)  
質量分析器: API3200 (AB Sciex, Ltd., Framingham, MA, USA)

カラム: 50 mm × 2.1 mm I.D. Xterra MS C18 column (Waters Co.; Milford, MA, USA)

##### 液体クロマトグラフィー条件

移動相: 0.1% formic acid (solution A)、acetonitrile and 0.1% formic acid (solution B)  
流速: 0.2 mL/min

グラジェント条件: 0% acetonitrile at 0 min, 95% acetonitrile at 10–11 min, 5% aceto nitrile at 12 min, and a re-equilibration step to the initial solvent from 12 to 15 min

### 質量分析器条件

パラメータ : curtain gas (CUR): 10, collision gas (CAD): 8, ionspray voltage (IS): 55

00, temperature (TEM): 700, ion source gas 1 (GS1): 50, ion source gas 2 (GS2): 80

内標準物質 (IS: internal standard) : プロプロラノロール (Propranolol)

イオン(プリカーサーイオン>プロダクトイオン) : レンバチニブ 427.602>371.000、プロプロラノロール 260.064>116.005 (Figure 1)

### 2) 前処理

250 $\mu$ L のプラズマサンプルに、100ng/mL プロプロラノロール (IS) を 30 $\mu$ L 添加し、さらに 500 $\mu$ L のアセトニトリル (CH<sub>3</sub>CN) を添加した。タンパク凝集処理したサンプルを 1250rpm で 10 分間振盪させたあと、20000g で 5 分間遠心し、上清を窒素ガス (40°C) にて乾固させた。乾固したサンプルに 1% ギ酸を含む 75% CH<sub>3</sub>CN を 50 $\mu$ L 加え溶解し、再び 20000g で 5 分間遠心し上清を LC-MS/MS にて測定した。

### 3) 選択性および定量下限

レンバチニブの保持時間は 6.8 分であり、プロプロラノロール (IS) の保持時間は 7.1 分であった (Figure 2)。この保持時間付近のプラズマ (プランク) 由来のピーク (分析対象物質の 20% 以上及び内標準物質の 5% 以上) は確認できなかった。以上より、本測定系は選択性の高い系であることが示された。

加えて、検出限界は 0.96 ng/mL であり、定量限界は 9.6 ng/mL であった。

### 4) 検量線

以下の濃度を使用し、6 濃度を 6 回繰り返し測定し検量線を作成した。

#### 濃度

検量線 (CS: calibration standard) 濃度 : 6 濃度 (200 ng/mL, 145 ng/mL, 96 ng/mL, 48.3 ng/mL, 19.3 ng/mL and 9.6 ng/mL)

QC (quality control) 濃度 : 4 濃度 (QC-LLOQ (lower limit of quantification) : 9.6 ng/mL, QC-low: 19.3 ng/mL, QC-mid: 96 ng/mL, and QC-high: 150 ng/mL)

内標準物質 (IS) 濃度 : 9.6 ng/mL

その結果、薬物動態のターゲット濃度となる 9.6 ng/mL から 200 ng/mL で直線性が確認され、すべての濃度の真度は理論値の ±15% 以内であった ( $y = 0.15x - 0.0103$ ,  $R^2 = 0.997$ )。以上より、検量線の妥当性が示された。

### 5) 希釈の妥当性

検体の希釈を想定し、希釈の妥当性についても検討した。プランクマトリックスを用いて試料を 5 倍および 20 倍希釈した後、検体濃度を較正範囲内にし希釈し 5 回反復測定して希釈完全性を評価した。その結果、精度および真度 (RE%) は、それぞれ 4.1~15% および ±1.9% の範囲であった。各濃度における平均真度は、理論値の ±15% 以内であり、精度はすべて 15% 以下であった。以上より、希釈の妥当性が示された。

### 6) 真度および精度

測定系の真度および精度を、検量線試料 6 濃度 (200 ng/mL, 145 ng/mL, 96 ng/mL, 48.3 ng/mL, 19.3 ng/mL and 9.6 ng/mL) および QC 試料 4 濃度 (QC-LLOQ (lower limit of quantification) : 9.6 ng/mL, QC-low: 19.3 ng/mL, QC-mid: 96 ng/mL, and QC-high: 150 ng/mL) を用いて確認した。3 日間にわたり、検量線試料は 6 回繰り返し測定し、QC 試料は 5 回繰り返し測定を実施した。その結果、日内変動の精度 (CV%) および真度 (RE%) は、4.97~6.73% および ±3.4% であった。日間変動の精度 (CV%) および真度 (RE%) はそれぞれ 2.38~6.73% および ±8.3% であった。すべての濃度レベルで、精度と真度は ±15% 以内であった。

### 7)マトリックス効果および回収率

QC試料3濃度(QC-low: 19.3 ng/mL, QC-mid: 96 ng/mL, and QC-high: 150 ng/mL)を3回繰り返し測定しマトリックス効果と回収率を確認した。回収率は、QC-low 70.4±1.8%、QC-mid 74.1±1.9%、QC-high 68.9±1.3%であった。マトリックス効果は、+ 12.9~+ 15.8%の範囲であり、±15%以内であった。

### 8)キャリーオーバー

最高濃度の検量線用標準試料(200 ng/ml)を測定した後に、ブランク試料を測定することによって評価した。最高濃度の検量線用標準試料を測定した後のブランク試料のレスポンスは分析対象物質20%以下かつ内標準物質の5%以下であった。

### 9)安定性

凍結融解安定性、短期保存安定性(室温)、長期保存安定性、前処理後試料中安定性を評価した。最高濃度(200 ng/mL)及び最低濃度(9.6 ng/mL)の溶液を用いて、各濃度あたり少なくとも3回繰り返し実験した。結果を表1に示す。

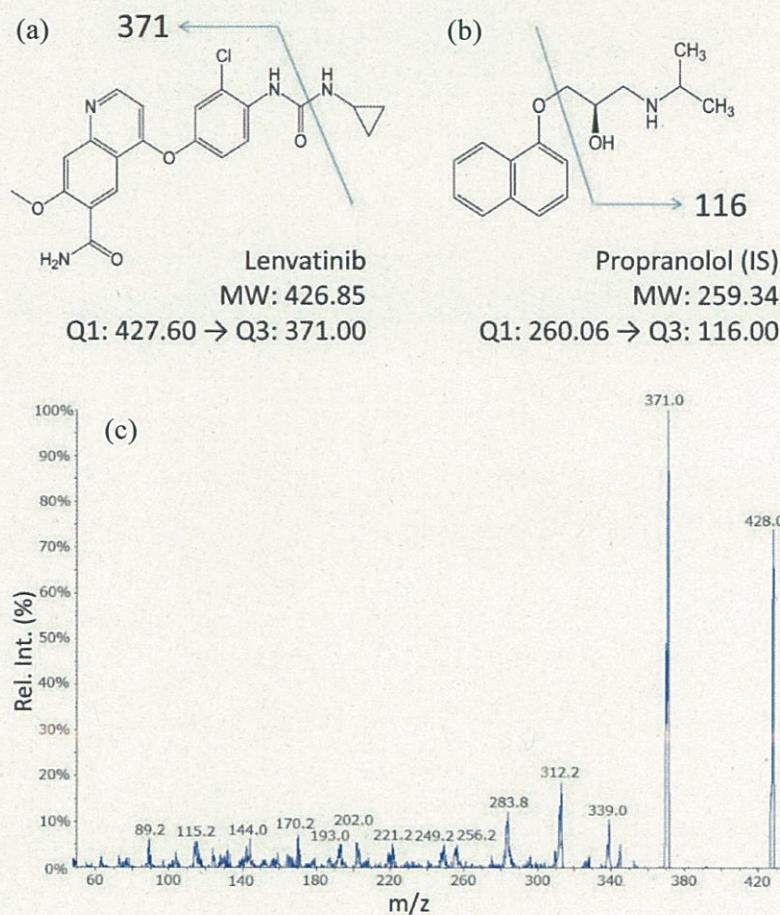
## 4. 考察

内標準物質としてプロプラノロールを用いたレンバチニブの測定系をかし開発し、「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法 のバリデーションに関するガイドライン」に適合することが示された。

本測定系を利用し、嚥下困難を伴う甲状腺癌患者に対するレンバチニブの薬物動態試験を実施予定である。現在、嚥下困難を伴う甲状腺癌患者に対するレンバチニブの薬物動態試験のプロトコールを作成し、倫理審査委員会に提出予定である。

## 5. 論文

1. Tomoko Ogawa-Morita, Yoshiyuki Sano, Tomoka Okano, Hirofumi Fujii, Makoto Tahara, Masakazu Yamaguchi, and Hironobu Minami, Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Assay for Quantitative Analysis of Lenvatinib in Human Plasma. International Journal of Analytical Chemistry, Volume 2017 (2017), Article ID 2341876, 6 pages



**Figure 1** レンバチニブとプロプラノロールの化学構造

(a)レンバチニブの化学構造とプロダクトイオン、(b)プロプラノロールの化学構造とプロダクトイオン、(c)レンバチニブのプリカーサーイオン( $m/z$  427.60)およびプロダクトイオン( $m/z$  371.00)

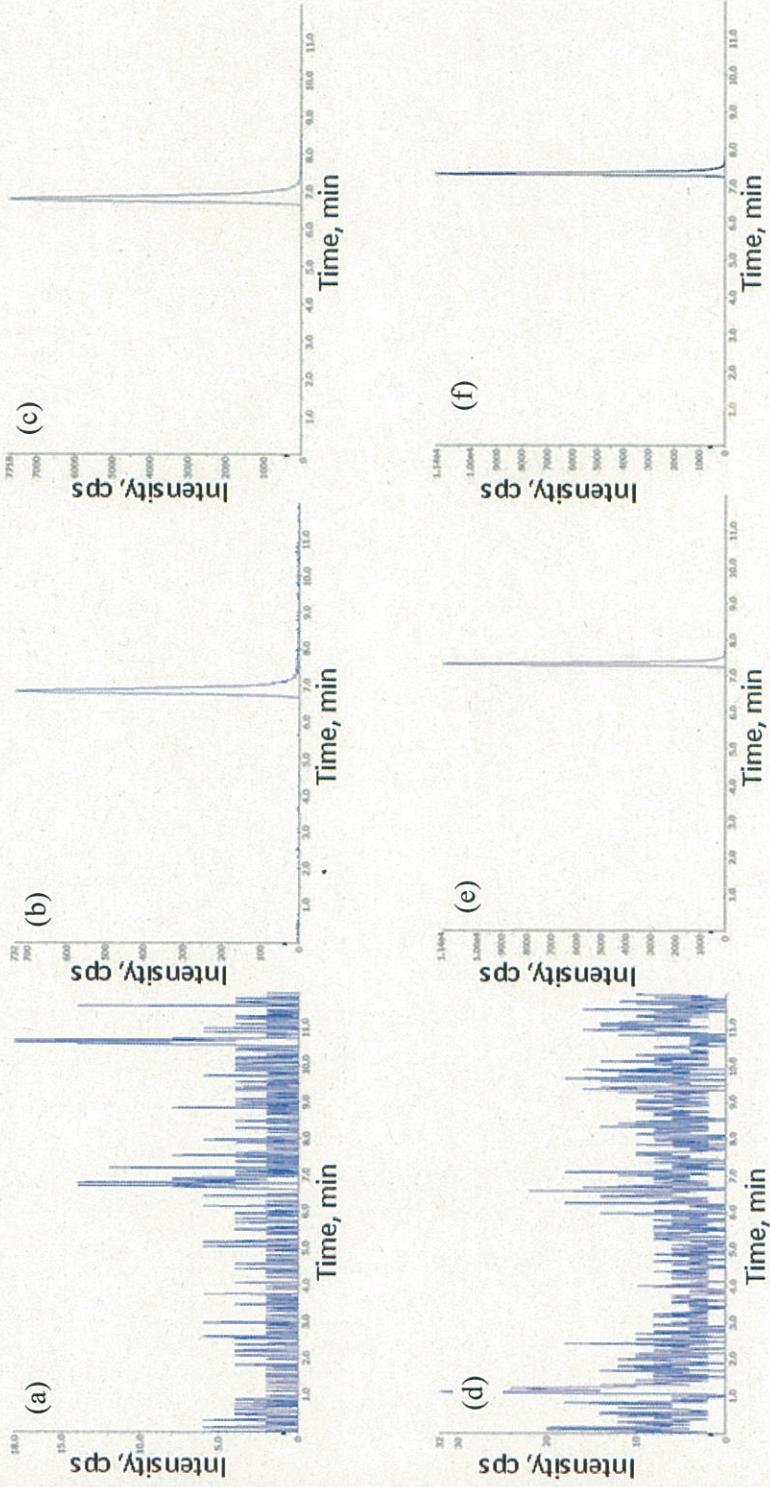


Figure 1 多重反応モニタリング

(a) ブラック(プラズマ)、(b) レンバチニブ(検出限界; 0.96 ng/mL)、(c) レンバチニブ(定量限界; 9.6 ng/mL)  
 (d) ブラック(プラズマ)、(e) ブラック(プラズマ)、(f) ブロブランコール(内標準物質; 9.6 ng/mL)、(f) ブロブランコール(ゼロプローラル; 9.6 ng/mL)

表1 プラズマ中のレンバチニブの安定性およびストック溶液の安定性

Condition	Matrix	Mean no minal conc.	Mean me asured conc.	Recovery	CV
-70mLc.d1 month	3.3 mM HCl/CH <sub>3</sub> O <sub>H</sub>	57800	55300	95.7	2.4
-2070HHC month	Plasma	9.6	9.2	95.8	1.6
-208aHHC month	Plasma	200.6	201.3	100.3	0.46
3 freeze and thaw cycles	Plasma	11.5	10.4	90.4	1.6
3 freeze and thaw cycles	Plasma	179.8	155.6	86.5	0.79
Room temperature for 24 hours	Plasma	11.5	11.3	98.2	2.6
Room temperature for 24 hours	Plasma	179.8	177.4	98.6	2.8
Auto-sampler	After treatment	10.1	9.3	92	7.3
Auto-sampler	After treatment	199.3	190.6	95.6	1.8