

肝細胞癌患者におけるレンバチニブの治療効果ならびに副作用発現に対する薬物血中濃度モニタリングの有用性に関する研究

秦, 晃二郎

<https://hdl.handle.net/2324/4475054>

出版情報 : Kyushu University, 2020, 博士 (臨床薬学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

肝細胞癌患者におけるレンバチニブの治療効果ならびに
副作用発現に対する薬物血中濃度モニタリングの
有用性に関する研究

2021 年

九州大学大学院薬学府

臨床薬学専攻 臨床薬物治療学分野

秦 晃二郎

目次

| | |
|--|----|
| 序論..... | 1 |
| 論文目録..... | 9 |
| 第1章 LC-MS を用いた血中レンバチニブ濃度の分析法の構築 | |
| 1 緒言..... | 10 |
| 2 方法 | |
| 2-1 測定試薬..... | 13 |
| 2-2 LC-MS の分析条件..... | 13 |
| 2-3 標準溶液、検量線標準用試料およびQC 試料の調製..... | 13 |
| 2-4 サンプルの前処理方法..... | 14 |
| 2-5 分析バリデーション評価項目..... | 14 |
| 3 結果 | |
| 3-1 検量線..... | 16 |
| 3-2 精度および真度..... | 17 |
| 3-3 選択性およびキャリーオーバー..... | 19 |
| 3-4 回収率..... | 23 |
| 3-5 マトリックス効果..... | 24 |
| 3-6 安定性..... | 25 |
| 3-6-1 凍結融解..... | 26 |

| | | |
|---|-----------------------------|----|
| 3-6-2 | 短期保存..... | 27 |
| 3-6-3 | 長期保存..... | 28 |
| 3-6-4 | オートサンプラー内の安定性..... | 29 |
| 4 | 考察..... | 30 |
| 5 | 小括..... | 31 |
| | | |
| 第 2 章 肝細胞癌患者におけるレンバチニブの治療効果ならびに副作用発現と薬物血中濃度の関連 | | |
| 1 | 緒言..... | 33 |
| 2 | 方法 | |
| 2-1 | 対象患者..... | 35 |
| 2-2 | レンバチニブの治療プロトコル..... | 35 |
| 2-3 | 診療情報の収集..... | 35 |
| 2-4 | 治療効果と有害事象の評価..... | 36 |
| 2-5 | サンプル回収および血中レンバチニブ濃度の測定..... | 36 |
| 2-6 | 統計解析..... | 37 |
| 3 | 結果 | |
| 3-1 | 患者背景..... | 38 |
| 3-2 | 奏効率に及ぼす血中レンバチニブ濃度の影響..... | 40 |

| | | |
|-----|-------------------------|----|
| 3-3 | 血中レンバチニブ濃度と患者背景の関係..... | 43 |
| 3-4 | 血中レンバチニブ濃度と有害事象の関係..... | 45 |
| 3-5 | 奏効率に影響を及ぼす因子..... | 47 |
| 4 | 考察..... | 48 |
| 5 | 小括..... | 52 |
| | 総括..... | 53 |
| | 参考文献..... | 56 |
| | 謝辞..... | 68 |

略語一覽

| | |
|-------|--|
| ALT | alanine transaminase |
| APCI | atmospheric pressure chemical ionization |
| AST | aspartate aminotransferase |
| AUC | area under the curve |
| BMV | bioanalytical method validation |
| CR | complete response |
| CTCAE | common terminology criteria for adverse events |
| DMSO | dimethyl sulfoxide |
| ESI | electrospray ionization |
| FDA | food and drug administration |
| FGFR | fibroblast growth factor receptor |
| HBV | hepatitis B virus |
| HCC | hepatocellular carcinoma |
| HCV | hepatitis C virus |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| IS | internal standard |

| | |
|----------|---|
| LC-MS | liquid chromatography mass spectrometer |
| LC-MS/MS | liquid chromatograph-tandem mass spectrometer |
| mRECIST | modified response evaluation criteria in solid tumors |
| NBNC | non-HBV non-HCV |
| OS | overall survival |
| ORR | objective response rate |
| PD | progressive disease |
| PDGFR | platelet-derived growth factor receptor |
| PFS | progression free survival |
| PK | pharmacokinetics |
| PR | partial response |
| QC | quality control |
| RDI | relative dose intensity |
| ROC | receiver operating characteristic |
| SD | stable disease |
| SIM | selective ion monitoring |
| T.bil | total bilirubin |
| TDM | therapeutic drug monitoring |

UV

ultraviolet and visible spectrophotometer

VEGFR

vascular endothelial growth factor receptor

序論

本邦において 1981 年以降 30 年以上にわたり、悪性新生物による死亡が死因の第 1 位となっている。厚生労働省から発出されている最新の人口動態統計資料では、2019 年の年間総死亡数約 138 万人のうち悪性新生物は 27.3%であった。2018 年の国立がん研究センターの報告では部位別悪性新生物による死亡順位において肝癌は、肺癌、大腸癌、胃癌、膵癌に続いて癌死の第 5 位を占めており、年間死亡者数は約 2 万 6 千人を超えている。また、2017 年の部位別悪性新生物による罹患順位において肝癌は、大腸癌、胃癌、肺癌、乳癌、前立腺癌に続いて第 6 位を占めており、年間罹患患者数は約 4 万人である。肝癌は、主に慢性肝炎や肝硬変等の障害肝から発生し、肝機能の低下により *quality of life* を低下させる。

肝癌の分類は、肝臓から発生する原発性肝癌と他臓器の癌からの転移である転移性肝癌の 2 種類に大別される。原発性肝癌のうち 90%以上を肝細胞癌 (*hepatocellular carcinoma, HCC*) が占め、残り 10%のほとんどが胆管細胞癌である。HCC に対する治療は主に外科切除、焼灼療法 (ラジオ波焼灼等)、塞栓療法 (肝動脈化学塞栓療法等)、化学療法および肝移植等の中から病態の進行度に応じて選択される。HCC の局所治療 (外科切除、焼灼、塞栓) を行っても治療後の癌再発率は他の癌と比較して高率であり、5 年間で約 70-80%に再発する。再発を繰り返すことによって最終的には多発肝内転移や肝外転移等の出現により治療継続が困難になる。

進行した切除不能な HCC に対する治療は、分子標的治療薬が推奨されている。ソラフェニブは、血管内皮増殖因子受容体 (*vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR*) 1-3、血小板由来増殖因子受容体 (*platelet-derived growth factor receptor, PDGFR*) β 、線維芽細胞増殖因子受容体 (*fibroblast growth factor receptor,*

FGFR) 1、および Raf-1 と B-Raf のセリン-スレオニンキナーゼ[1,2]の受容体チロシンキナーゼ活性を阻害することによって抗腫瘍効果を発揮する分子的治療薬である。また、ソラフェニブは 2 つの第Ⅲ相試験によりプラセボに対する有意な全生存率 (overall survival, OS)の改善が示された結果、未治療の切除不能な HCC に対する標準治療となった[1,2]。ソラフェニブが 2009 年に承認されて以降、未治療の切除不能な HCC に対するスニチニブ、ブリバニブ、およびリニファニブ等の薬物に関する臨床試験では、十分な治療効果を示す結果が得られていない[3-5]。

また、ソラフェニブによる治療後に病勢進行を示した切除不能な HCC に対する 2 次治療としてプラセボを対象とした臨床試験でブリバニブ、エベロリムス、チバチニブ、S-1 を比較する臨床試験が行われたが、いずれも OS の改善を認めなかった[6-9]。レゴラフェニブは、VEGFR1-3、PDGFR β 、FGFR 等の受容体チロシンキナーゼを阻害することで腫瘍細胞の増殖や血管新生を抑制し、間質の細胞内シグナル伝達を阻害して腫瘍微小環境に影響を及ぼすことにより、抗腫瘍効果を示す分子標的治療薬である[10,11]。レゴラフェニブは、ソラフェニブによる治療後に病勢進行を示した切除不能な HCC に対する 2 次治療としてプラセボを対象とした臨床試験において OS の改善を認め、2017 年に本邦において適応追加となった[12]。Table 1 にこれまでに実施された切除不能な HCC に対する経口抗がん薬の臨床試験の一覧を示す。

Table 1 Summary of phase III trial of oral anticancer agents for unresectable HCC

| treatment line | study design* | year | primary endpoint | positive or negative | reference |
|----------------|--------------------------|------|------------------|----------------------|-----------|
| First line | placebo vs. sorafenib | 2008 | OS | positive | 1 |
| | placebo vs. sorafenib | 2009 | OS | positive | 2 |
| | Sorafenib vs. sunitinib | 2013 | OS | negative | 3 |
| | Sorafenib vs. brivanib | 2013 | OS | negative | 4 |
| | Sorafenib vs. linifanib | 2015 | OS | negative | 5 |
| | Sorafenib vs. lenvatinib | 2018 | OS | positive | 13 |
| Second line | placebo vs. brivanib | 2013 | OS | negative | 6 |
| | placebo vs. everolimus | 2014 | OS | negative | 7 |
| | placebo vs. S-1 | 2017 | OS | negative | 8 |
| | placebo vs. regorafenib | 2017 | OS | positive | 12 |
| | placebo vs. tivantinib | 2018 | OS | negative | 9 |

*Standard treatment vs. protocol treatment

OS, Overall survival

レンバチニブは、VEGFR 1-3、FGFR 1-4、幹細胞因子受容体、PDGFR α 、rearranged during transfection がん原遺伝子等の受容体チロシンキナーゼを選択的に阻害する分子標的治療薬である。2018年にレンバチニブは国際第Ⅲ相試験で

切除不能な HCC 患者に対する 1 次治療として、ソラフェニブに対し主要評価項目である OS の非劣勢を証明した[13]。この試験結果より、肝癌診療ガイドラインでは切除不能な HCC 患者に対する 1 次治療としてソラフェニブに加えて、レンバチニブによる治療が強く推奨されている。

レンバチニブは臨床試験において、高血圧、下痢、手足症候群、食欲不振、蛋白尿、疲労等の副作用が認められており、使用に際して十分な注意を払う必要がある。また、副作用の発現により、レンバチニブの減量または休薬に至った患者は、それぞれ 38.7%および 52.1%であった[13]。さらに、国際第Ⅲ相試験の日本人におけるサブ解析の結果では、副作用の発現によるレンバチニブの減量は 61.7%、休薬は 59.8%と全体集団と比較して高頻度であった[14]。したがって、レンバチニブの用量を適切に調節することは、重篤な副作用の発現を回避し、その治療効果を最大化するために重要である。

個々の患者に適した薬物投与設計を行い、適正な薬物療法を行う手法として治療薬物モニタリング (therapeutic drug monitoring, TDM) が挙げられる。抗がん薬の多くは、薬物血中濃度の治療域と毒性域の間隔が非常に狭く、一部の薬剤においては、投与量の調整により治療効果を高め、副作用の発現を回避できることが報告されている[15,16]。分子標的治療薬においても、血中濃度と治療効果または有害事象との関連についてイマチニブやゲフィチニブ等様々な薬剤で検討された[17-19]。また、甲状腺癌患者においてレンバチニブの血漿中トラフ濃度が 88 ng/mL を超えると肝機能障害および血小板減少症の発現率が上昇することが報告されている[20]。HCC 患者においてレンバチニブの血中トラフ濃度が 62.4 ng/mL を超えると、レンバチニブの減量または休薬につながるような有害事象の発現頻度が増加することや、レンバチニブの曲線下面積 (area under the curve, AUC) が $2430 \text{ ng} \times \text{h/mL}$ を超えると重篤な有害事象が発現することが報告

[21,22]されているが、血中レンバチニブ濃度と治療効果に関連する報告はない。経口分子標的治療薬であるイマチニブおよびスニチニブは TDM の有用性が証明されており、本邦において特定薬剤治療管理料 1 が保険収載されている。TDM に基づいた薬物治療は、重篤な副作用の発現を回避しながら治療効果を高めるためにレンバチニブの用量を調整する際にも同様に有用となりうる。

しかしながら、臨床において薬物血中濃度の測定が行われている抗がん薬の種類は極めて少ない。その理由として、ほとんどの抗がん薬の薬物血中濃度測定は特定薬剤治療管理料 1 の対象外であり薬物血中濃度を測定するためのエビデンスが不足していることが考えられる。薬物動態に基づく適正な抗がん薬治療を実現するためには、多くの施設で導入しやすい汎用性の高い薬物血中濃度の測定法および臨床におけるエビデンスの構築が必要である。

薬物血中濃度の測定には主に免疫学的測定法や分離分析法が用いられる。免疫学的測定法を用いた血中濃度測定は、薬物に対して特異的に結合する抗体を利用して薬物を定量する方法であり、ラテックス免疫凝集阻害法や均一酵素免疫測定法等を利用したキットが、体外診断用医薬品として販売されている。また、分離操作が不要で多数の検体を迅速に処理することができるが、間接定量法であるため、分離分析法より感度が劣り、生体内に存在する内因性物質や薬物の代謝物に注意を払う必要がある。市販キットを用いる免疫学的測定法は、簡便で迅速かつ効率的に測定できる方法であるが、レンバチニブのような新薬を新たに測定する場合は、一般的に高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC)を使用した分離分析法や、液体クロマトグラフィー質量分析装置 (liquid chromatography mass spectrometer, LC-MS)、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (liquid chromatograph-tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)等の装置を使用した分離分析法に質量分析計を組み合わせた方法が

用いられる。薬物血中濃度の測定において HPLC は、紫外可視 (ultraviolet and visible spectrophotometer, UV) 分光光度計を組み合わせ用いられる。HPLC-UV を用いた薬物血中濃度の測定は、LC により分離された物質に対して波長ごとに分けた光を測定試料に照射し、光がどの程度吸収されたかを検出することで薬物血中濃度を測定することができる。しかしながら、HPLC-UV による検出感度は $\mu\text{g/mL}$ オーダーであり、複数の薬物が投与されている患者では分析対象によっては十分な感度で測定できず、TDM への適用が困難な場合がある。LC-MS は、LC により分離された物質をエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) や大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) によりイオン化され、MS により分子構造に基づく質量電荷比を測定することで薬物血中濃度を高感度に測定することができる。LC-MS/MS は LC-MS と同様に LC によって分析対象物質を分離したのち、ESI や APCI によりイオン化され、1つ目の MS によってプリカーサーイオンのみを透過し、衝突室内でイオンはガスと衝突し化学結合の弱い部分が開裂し、生成したプロダクトイオンは2つ目の MS で特定のプロダクトイオンのみを透過させる。このため、複数の薬物や血液、生体内組織に含まれる様々な物質を一斉に高感度かつ高選択的に検出することが可能である。これまでに報告されている血中レンバチニブ濃度測定法は、LC-MS/MS [23-26] や HPLC-UV [27] を用いた方法であるが、LC-MS を使用して血中レンバチニブ濃度を測定した報告はない。Table 2 に分離分析装置の特徴について一覧に示す。

Table 2 Summary of features of the separation analysis device

| | 液体クロマトグラフ-紫外可視分光法 HPLC-UV | 液体クロマトグラフ-質量分析法 LC-MS | 液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析法 LC-MS/MS |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 測定原理 | 液体クロマトグラフで分離した成分を紫外可視分光光度計で化合物の吸光度を測定 | 液体クロマトグラフで分離した成分を質量分析装置で化合物の質量電荷比を測定 | 液体クロマトグラフで分離した成分を質量分析装置で化合物の質量電荷比を測定 |
| 検出器 | 紫外可視分光光度計 | 質量分析装置 | タンデム型質量分析装置 |
| 夾雑物による影響 | 受けやすい | 中程度 | 受けにくい |
| 導入コスト | 低い | 中程度 | 高い |
| 血中レンバチニブ濃度の測定に関する報告 | 27 | — | 23,24,25,26 |

HPLC-UV, high performance liquid chromatography- ultraviolet and visible spectrophotometer; *LC-MS*, liquid chromatography mass spectrometer; *LC-MS/MS*, liquid chromatograph-tandem mass spectrometer

薬物血中濃度の測定値を用いて適切に評価するためには、解析に用いる測定結果に高い正確性、再現性および信頼性が求められる。近年、生体試料中における薬物濃度分析に関して、food and drug administration (FDA)、欧州医薬品庁および厚生労働省医薬食品局より、「医薬品開発における生体試料中薬物濃度測定法

のバリデーションガイドライン」が発出された[28-30]。バリデーションガイドラインは生体試料中薬物濃度を分析する一連の過程を通して妥当性が適切に確認され、分析法の堅牢性を保証するためのものであり、LC-MS を用いた血中レンバチニブ濃度の測定法を構築する際にもガイドラインに準拠する必要がある。

以上の背景から、第 1 章では、LC-MS を用いた血中レンバチニブ濃度の分析法の構築を行った。第 2 章では、治療効果判定までの期間の血中レンバチニブ濃度に着目し、肝細胞癌患者における治療効果ならびに副作用発現と薬物血中濃度との関連について検討を行った。

論文目録

Association of lenvatinib plasma concentration with clinical efficacy and adverse events in patients with hepatocellular carcinoma.

Kojiro Hata, Kimitaka Suetsugu, Nobuaki Egashira, Yoko Makihara, Shinji Itoh, Tomoharu Yoshizumi, Masatake Tanaka, Motoyuki Kohjima, Hiroyuki Watanabe, Satoshi Masuda, and Ichiro Ieiri.

Cancer Chemother Pharmacol. 2020;86(6):803-813.

第 1 章 LC-MS を用いた血中レンバチニブ濃度の分析法の構築

1. 緒言

レンバチニブは、VEGFR 1-3、FGFR 1-4、幹細胞因子受容体、PDGFR α 等の受容体チロシンキナーゼを選択的に阻害することで、甲状腺癌やHCCに対する治療効果を発揮する[31-35]。高い奏効率 (objective response rate, ORR) と無増悪生存期間 (progression free survival, PFS) の有意な改善の反面、多くの症例で高血圧、蛋白尿、倦怠感および手足症候群等の副作用のためにレンバチニブを減量または休薬を余儀なくされる[34]。また、腫瘍縮小および副作用の重症度は、レンバチニブの薬物曝露量と相関しており、血中濃度の個体間変動が大きいことが報告されている[36,37]。本邦においてイマチニブ、スニチニブ等の経口チロシンキナーゼ阻害薬はTDMの有用性から血中濃度の測定が保険適応されており[17,38]、TDMに基づいた薬物治療は、重度の副作用を回避しながら治療効果を高めるためにレンバチニブの用量を調整する際にも同様に有用となりうる。

薬物血中濃度の測定に広く用いられている免疫学的測定法の市販キットは、簡便・迅速かつ効率的に測定できる方法であるが、生体内に存在する内因性物質や薬物の代謝物の存在により、実際の薬物濃度より高値または低値を示すことがあるため注意が必要である[39]。また、レンバチニブのような新薬を新たに測定する場合は、市販キットがなく、一般的にHPLCにUVを組み合わせた分離分析法や、LC-MS、LC-MS/MS等の装置を使用した分離分析法に質量分析計を組み合わせた方法が用いられる。分離分析法は前処理操作が煩雑であり、免疫学的測定法に比べて測定時間を要するが、薬物血中濃度の測定値に対して代謝物や併用薬等の影響を受けない。

これまでに報告されている血中レンバチニブ濃度測定法は、LC-MS/MS

[23,24,26] やHPLC-UV [27]を用いた方法である。LC-MS/MSによる測定はLCによって分析対象物質を分離したのち、エレクトロスプレーイオン化法や大気圧化学イオン化法によりイオン化され、1つ目のMSによってプリカーサーイオンのみを透過し、衝突室内でイオンはガスと衝突し化学結合の弱い部分が開裂し、生成したプロダクトイオンは2つ目のMSで特定のプロダクトイオンのみを透過させる。このため、複数の薬物や血液、生体内組織に含まれる様々な物質を一斉に高感度かつ高選択的に検出する。LC-MSはLC-MS/MSと比較すると分析対象物質を検出する感度や選択性は劣るが、分析対象物質が既知の物質である場合は、選択イオンモニタリング(selective ion monitoring, SIM)モードで感度を上げて測定することが可能である。しかしながら、これまでにLC-MSを使用して血中レンバチニブ濃度を測定した報告はない。

また、既報では内部標準物質 (internal standard, IS) としてエーザイ株式会社により合成されたレンバチニブの安定同位体であるER-227326 (IUPAC:4-{3-chloro-4-[(propylcarbamoyl)amino]phenoxy}-7-methoxyquinoline-6-carboxamide monomethanesulfonate) を使用しており、市販されていない状況から測定系の再現は難しい[23,24,26]。一般的に、ISの条件は試料中に含まれていない成分で、マトリックス成分のピークと分離することができ、目的成分に近い位置で溶出し、化学的に安定な成分であることが必要である。エルロチニブは安定同位体を合成することに比べて試薬の調達が簡便でコストが低く、レンバチニブへのイオンサプレッションやイオンエンハンスの影響が少ない[27]。

薬物血中濃度の測定値を用いて適切に評価するためには、解析に用いる測定結果に高い正確性、再現性および信頼性が求められる。生体試料中における薬物濃度分析に関してFDAより、「Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (バリデーションガイドライン)」が発出された[28]。バリデーションガイドラ

インは生体試料中薬物濃度を分析する一連の過程を通して妥当性が適切に確認され、分析法の堅牢性を保証するためのものであり、LC-MSを用いた血中レンバチニブ濃度の測定法を構築する際にもガイドラインに準拠する必要がある。

本章では、ISとしてエルロチニブを使用しLC-MSを用いて血中レンバチニブ濃度の分析法をFDAのバリデーションガイドラインに準拠して検討を行った。

2. 方法

2-1 測定試薬

血中濃度測定用のレンバチニブは、エーザイ株式会社 (Tokyo, Japan) から試薬の提供を受けた。ISであるエルロチニブは、LC Laboratories Co. (Woburn, MA, USA) から購入した。ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO)、ギ酸 (特級)、メタノール (特級) および酢酸アンモニウム (特級) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。超純水は、Elga LaboWater PURELAB flex system (High Wycombe, UK) で精製したものをを用いた。

2-2 LC-MS の分析条件

レンバチニブの分析は、Waters Acquity multiperformance liquid chromatography (UPLC) system (Waters Corp., Milford, MA, USA) を用いて行った。移動相には、A液 (10mM 酢酸アンモニウムと 0.1%ギ酸) と B液 (100%メタノール) を用いた。分析カラムには、Acquity UPLC BEH C18 column, 2.1 × 50 mm, 1.7 μm (Waters Corp., Milford, MA, USA) と Acquity UPLC BEH C18 column, VanGuard Pre-Column 2.1 × 5 mm, 1.7 μm (Waters Corp., Milford, MA, USA) を用いて、カラム温度は 50°C、オートサンプラー内の温度は 10°C、流速は 0.4mL/分に設定した。質量分析装置は、Acquity QDa mass detector (Waters Corp., Milford, MA, USA) を用いた。

2-3 標準溶液、検量線標準用試料および QC 試料の調製

レンバチニブの標準原液は、DMSO に溶解して 5 mg/mL に調製した。5 mg/mL の標準原液をさらに DMSO で希釈して 500 μg/mL の標準溶液を調製した。エルロチニブの標準溶液は 100%メタノールに溶解して、500 ng/mL に調製した。レ

レンバチニブの検量線標準用試料は、ブランク血漿に終濃度を 5、25、100、250、500 および 1000 ng/mL となるように標準溶液を調製した。Quality control (QC) 試料は、薬物を含まない血漿にレンバチニブの標準溶液を加え、終濃度が 5、15、375、750、1000 ng/mL となるように調製した。作成した標準溶液、検量線標準用試料および QC 試料は-20°Cで保管した。血中レンバチニブ濃度の測定範囲はトランプ濃度を想定し、5-1000 ng/mL とした。

2-4 サンプルの前処理方法

血漿試料 90 μ L に、検量線標準用試料 10 μ L を添加した。さらに、500 ng/mL エルロチニブ溶液 270 μ L (ブランク試料には 100%メタノールを 270 μ L)、0.5M 硫酸亜鉛水溶液 30 μ L を加えて、10 分間攪拌し、除蛋白処理した。除蛋白処理後、試料を 15,871 \times g で 5 分間遠心分離した後、上清を LC-MS で分析した。

2-5 分析バリデーション評価項目

バイオアナリシスにおけるバリデーション (Bioanalytical method validation, BMV) は医薬品の承認申請に用いられる。LC-MS による血漿中レンバチニブの濃度測定法の妥当性を評価することを目的とし、分析法のバリデーションを実施した。バリデーションの手順は、FDA の発出する「Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (バリデーションガイドライン)」に則って実施した[28]。バリデーション項目は、検量線の直線性、精度および真度 (日内再現性ならびに日間再現性)、選択性およびキャリーオーバー、回収率およびマトリックス効果の確認を行った。また、採血から測定までの検体の安定性を確認するため、凍結融解、短期保存、長期保存、オートサンプラー内の安定性について評価した。精度は、変動係数 (coefficient of variation, CV%) 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。バリデーションの許容基準は、FDA のバリデーションガイドラインに則り、CV は 15.0%以下 (5 ng/mL は 20.0%以下) 、RE は±15.0%以下 (5 ng/mL は±20.0%以下) とした。

3. 結果

3-1 検量線

検量線は検量線標準用試料を測定したピーク面積比を用いて、最小二乗法により一次回帰直線式から検量線を作成した。検量線の直線性は、検量線標準用試料の実測濃度を検量線に当てはめて測定値を算出した。血漿中濃度範囲 5-1000 ng/mL において 1 日 1 回 3 日間検量線を作成した。検量線は重み付け 1/X および 1/X² について RE は 5 ng/mL で±20%以内、15、375、750、1000 ng/mL で±15%以内であった。CV は 5 ng/mL で 20%以内、15、375、750、1000 ng/mL で 15%以内を示した。いずれの項目においても FDA のバリデーションガイドラインの判定基準を満たしていた。レンバチニブの検量線は、5-1000 ng/mL の範囲において良好な直線性 ($R^2=0.9995$) を示した。重み付は RE が最も小さかった 1/X² を採用した (Table 3)。

Table 3 Comparison of CV and RE in calibration curve of lenvatinib at various weighting

| Analyte | Weighting | n = 3 | | |
|------------|------------------|-----------------------------------|---------------|----------------|
| | | Correlation coefficient (Mean±SD) | CV (%) | Mean of RE (%) |
| Lenvatinib | 1 | 0.9952±0.006125 | 1.92 - 1867.2 | -93.2 - 4.23 |
| | 1/X | 0.9964±0.004362 | 1.44 - 7.21 | -2.1 - 3.45 |
| | 1/X ² | 0.9975±0.002182 | 0.20 - 6.71 | -2.1 - 3.38 |

SD, Standard deviation; CV, Coefficient of variation; RE, Relative error

$CV (\%) = SD / \text{Mean} \times 100$

$RE (\%) = (\text{Mean of measured value} - \text{theoretical value}) / \text{theoretical value} \times 100$

3-2 精度および真度

日内変動は 5、15、375、750 ng/mL の 4 つの濃度の試料を各 5 検体準備し、3 回繰り返し分析した。QC 試料の実測濃度の平均値の CV および RE を算出して日内変動を評価した。日内変動の結果を Table 4 に示す。RE は 5 ng/mL で±20%以内、15、375、750 ng/mL で±15%以内であった。CV は 5 ng/mL で 20%以内、15、375、750 ng/mL で 15%以内を示した。いずれの項目においても FDA のバリデーションガイドラインの判定基準を満たし、日内再現性が確認された。

Table 4 Intra-assay precision and accuracy for lenvatinib in plasma sample

| Analyte | Nominal Concentration (ng/mL) | n = 5 | | |
|------------|-------------------------------------|---|-----------|-------------------|
| | | Measured Concentration (Mean±SD, ng/mL) | CV (%) | Mean of RE (%) |
| Lenvatinib | 5 | 4.387±0.277 | 6.3 | -12.3 |
| | 15 | 13.36±0.423 | 3.2 | -10.9 |
| | 375 | 369.7±6.015 | 1.6 | -1.4 |
| | 750 | 732.4±7.681 | 1.0 | -2.4 |

SD, Standard deviation; *CV*, Coefficient of variation; *RE*, Relative error

$CV (\%) = SD / \text{Mean} \times 100$

$RE (\%) = (\text{Mean of measured value} - \text{theoretical value}) / \text{theoretical value} \times 100$

日間変動は 5、15、375、750 ng/mL の 4 つの濃度の試料を測定日の異なる 3 日間で分析した。QC 試料の実測濃度の平均値の精度および真度を算出して日間再現性を評価した。日間変動の結果を Table 5 に示す。RE は 5 ng/mL で±20%以内、15、375、750 ng/mL で±15%以内であった。CV は 5 ng/mL で 20%以内、15、375、750 ng/mL で 15%以内を示した。いずれの項目においても FDA のバリデーションガイドラインの判定基準を満たし、日間再現性が確認された。

Table 5 Inter-assay precision and accuracy for lenvatinib in plasma sample

| Assay Batch No. | Sample No. | Concentration (ng/mL) | | | |
|-----------------|---------------|-----------------------|-------|-------|-------|
| | | 5 | 15 | 375 | 750 |
| 1 | 1 | 4.889 | 13.14 | 368.4 | 719.2 |
| | 2 | 4.305 | 12.76 | 364.6 | 741.2 |
| | 3 | 4.263 | 13.23 | 362.1 | 736.1 |
| | 4 | 4.059 | 13.77 | 377.3 | 736.5 |
| | 5 | 4.418 | 13.90 | 375.9 | 728.9 |
| 2 | 1 | 4.108 | 12.74 | 378.9 | 802.6 |
| | 2 | 4.372 | 12.29 | 382.0 | 773.3 |
| | 3 | 4.347 | 16.94 | 383.1 | 771.0 |
| | 4 | 5.515 | 12.36 | 398.0 | 783.7 |
| | 5 | 5.346 | 14.47 | 393.4 | 778.2 |
| 3 | 1 | 4.030 | 13.11 | 370.3 | 727.3 |
| | 2 | 4.443 | 12.17 | 369.5 | 721.5 |
| | 3 | 3.879 | 13.95 | 371.8 | 753.9 |
| | 4 | 4.519 | 13.56 | 369.6 | 743.2 |
| | 5 | 3.870 | 13.04 | 361.0 | 733.2 |
| Total | Mean (n = 15) | 4.424 | 13.43 | 375.1 | 750.0 |
| | SD | 0.470 | 1.14 | 10.36 | 24.76 |
| | CV (%) | 10.6 | 8.5 | 2.8 | 3.3 |
| | RE (%) | -11.5 | -10.5 | 0.0 | 0.0 |

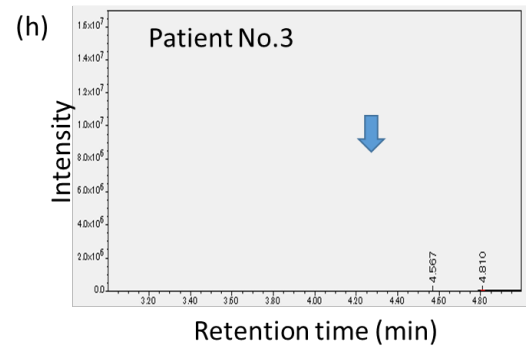
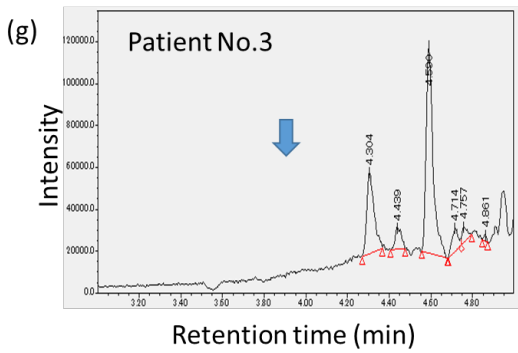
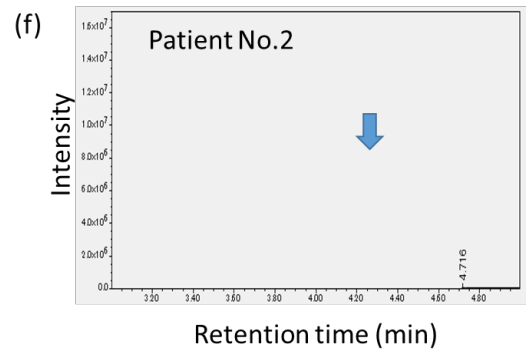
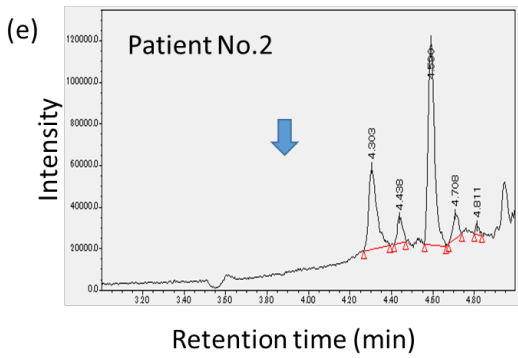
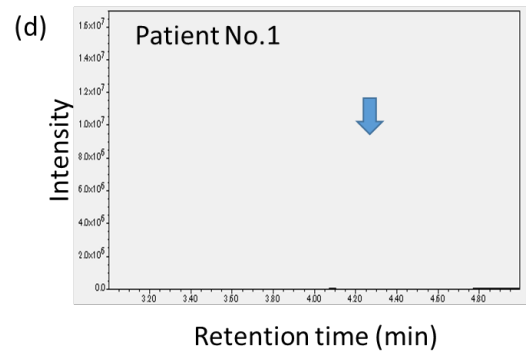
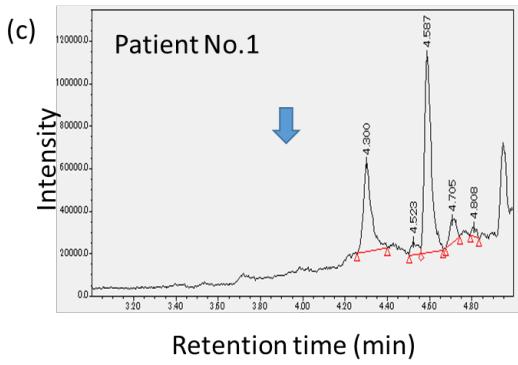
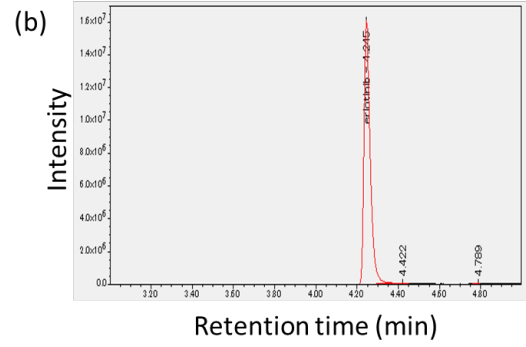
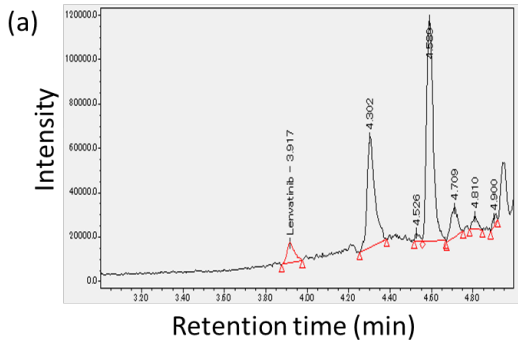
SD, Standard deviation; *CV*, Coefficient of variation; *RE*, Relative error

$CV (\%) = SD / \text{Mean} \times 100$

$RE (\%) = (\text{Mean of measured value} - \text{theoretical value}) / \text{theoretical value} \times 100$

3-3 選択性およびキャリーオーバー

選択性とは、試料中の他の成分の存在下で、レンバチニブおよび IS を区別して検出する能力のことである。異なる 6 人のブランク試料とバリデーション用試料 (5 ng/mL) における、レンバチニブのピーク面積および IS のピーク面積を比較して検討した。検討の結果、レンバチニブの保持時間は 3.9 分、IS の保持時間は 4.2 分であった。ブランク試料のクロマトグラム上にはレンバチニブおよび IS の保持時間付近に阻害ピークは認められないことを確認した (Fig. 1)。



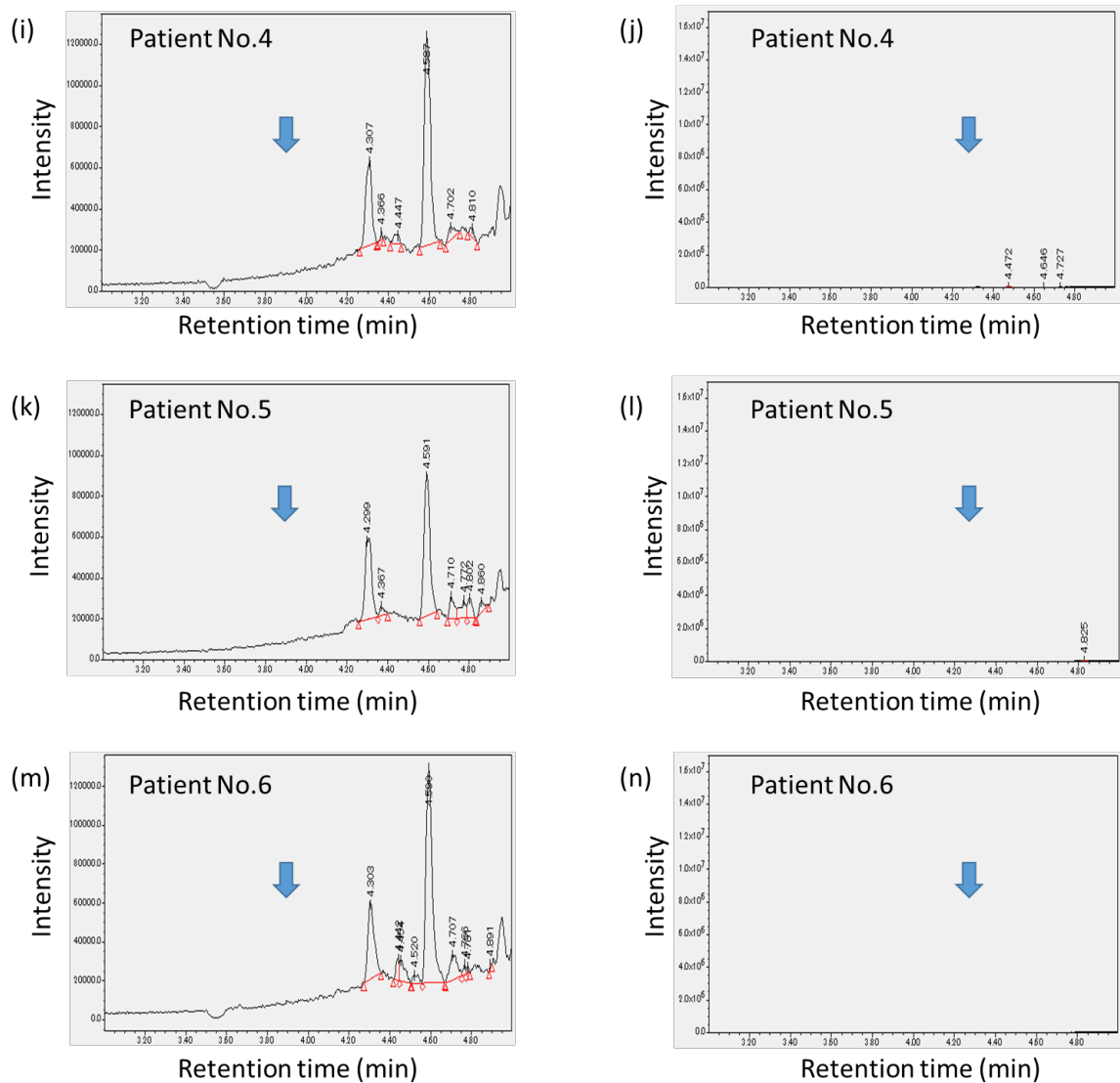


Fig. 1 Evaluation of selectivity for lenvatinib and erlotinib in plasma sample
 Representative chromatogram of lenvatinib (a) and erlotinib (b) from the quality control sample at 5 ng/mL in the plasma sample. Representative chromatogram of lenvatinib (c,e,g,i,k,m) and erlotinib (d,f,h,j,l,n) from the blank plasma samples in 6 patients. The horizontal line shows the retention time in the chromatogram. The vertical line shows the intensity in the chromatogram. Blue arrows show the retention time of lenvatinib (c,e,g,i,k,m) and erlotinib (d,f,h,j,l,n).

オートサンプラーで試料を連続的に注入したときに、分析機器に残留した分析対象物質が定量値に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、検量線の 1000 ng/mL を分析した後に、ブランク試料を注入することで、キャリーオーバーによるピークの有無を確認した。検討の結果、ブランク試料のクロマトグラム上にはレンバチニブおよび IS に相当するピークは認められず、本分析法ではキャリーオーバーが認められないことを確認した (Fig. 2)。

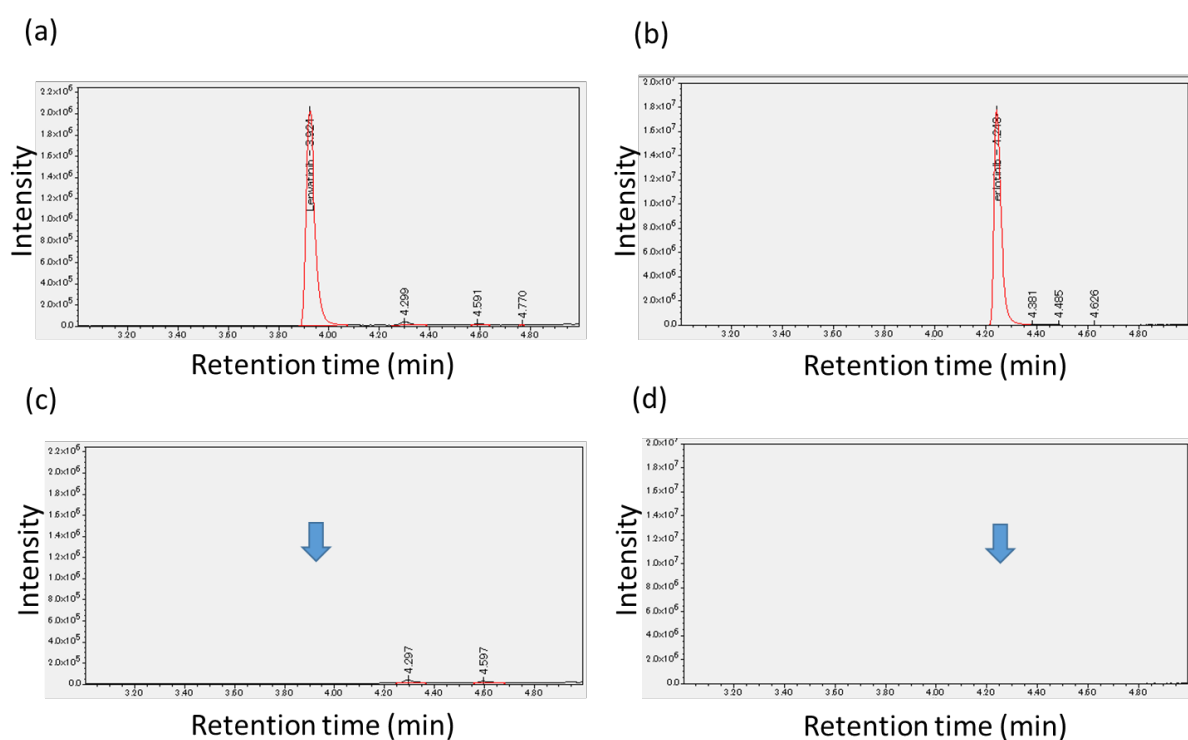


Fig. 2 Evaluation of carry-over for lenvatinib and erlotinib in plasma sample
 Representative chromatogram of lenvatinib (a) and erlotinib (b) from the quality control sample at 1000 ng/mL in the plasma sample. Representative chromatogram of lenvatinib (c) and erlotinib (d) from the blank sample in the plasma sample. The horizontal line shows the retention time in the chromatogram. The vertical line shows the intensity in the chromatogram. Blue arrows show the retention time of lenvatinib (c) and erlotinib (d).

3-4 回収率

回収率とは、試料の前処理過程における分析対象物質の回収効率である。回収率は、ブランク血漿にレンバチニブを添加した後に前処理したときのレスポンスとブランク血漿を前処理した後にレンバチニブを添加したときのレスポンスを比較した。15、375、750 ng/mL の濃度において3回繰り返し分析し、回収率を評価した。検討の結果、各濃度における回収率は、85.7-96.7%、CV は 1.6-6.1% であり再現性を確認した (Table 6)。

Table 6 Recovery assay for lenvatinib in plasma sample

| Analyte | Nominal Concentration (ng/mL) | n = 3 | | | |
|------------|-------------------------------------|---|-----------------|-----------|-------------------|
| | | Measured Concentration (Mean±SD, ng/mL) | Recovery (%) | CV (%) | Mean of RE (%) |
| Lenvatinib | 15 | 13.43±0.820 | 94.6 | 6.1 | -10.5 |
| | 375 | 367.8±5.835 | 85.7 | 1.6 | -1.9 |
| | 750 | 671.0±12.024 | 96.7 | 1.8 | -10.5 |

SD, Standard deviation; *CV*, Coefficient of variation; *RE*, Relative error

$$CV (\%) = SD / \text{Mean} \times 100$$

$$RE (\%) = (\text{Mean of measured value} - \text{theoretical value}) / \text{theoretical value} \times 100$$

$$\text{Recovery} (\%) = \frac{\text{Response after pre-treatment with analyte added to plasma sample}}{\text{response to addition of analyte after pre-treatment of blank plasma samples}} \times 100$$

3-5 マトリックス効果

血漿中由来の成分によるレンバチニブのレスポンスへの影響について評価した。マトリックス効果は、マトリックスファクター (MF) の算出により評価した。ブランク血漿は 6 人の異なる試料を用いた。ブランク血漿またはエタノールにレンバチニブを 15、375、750 ng/mL の濃度になるように調製した (以下、血漿をバリデーション用試料、エタノール溶液を MF 用試料)。レンバチニブの MF はバリデーション用試料のピーク面積比と MF 用試料のピーク面積比を比較して算出した。本検討の結果、各濃度における MF は、90.8-97.7%と濃度依存性は認められず、CV は 15%以内であり FDA のバリデーションガイドラインの判定基準を満たし、血漿によるマトリックス効果に差がないことを確認した (Table 7)。

Table 7 Matrix factor assay for lenvatinib in plasma sample

| Analyte | Nominal Concentration (ng/mL) | n = 6 | |
|------------|-------------------------------------|-----------------|-----------|
| | | MF (Mean, %) | CV (%) |
| Lenvatinib | 15 | 90.8 | 6.3 |
| | 375 | 94.5 | 3.3 |
| | 750 | 97.7 | 1.6 |

SD, Standard deviation; *CV*, Coefficient of variation; *MF*, Matrix factor

$CV (\%) = SD / \text{Mean} \times 100$

$MF = \text{Peak area of sample for validation}^{*1} / \text{mean peak area of sample for MF}^{*2}$

*1 Validation samples were added to plasma with the standard solution.

*2 MF samples were added to ethanol with the standard solution.

3-6 安定性

試料を採取してから分析するまでの過程においてレンバチニブの濃度に影響を及ぼさないことを確認するため安定性を評価した。安定性の評価は、凍結融解操作、短期保存安定性（室温、冷蔵庫）、長期保存安定性、前処理後のオートサンプラー内の安定性について評価した。各濃度における理論値の RE は $\pm 15\%$ 以内を満たすことを基準とした。

3-6-1 凍結融解

採取した試料は遠心分離後、-20°Cの冷凍庫に保存される。測定時に融解し、残試料は再測定に備えて再凍結されるため、凍結融解時のレンバチニブの安定性を確認した。ブランク血漿にレンバチニブを 15、750 ng/mL の濃度になるように調製したバリデーション用試料を-20°Cで凍結し、室温にて融解した。凍結融解の操作は 3 回行った。凍結融解を繰り返したバリデーション用試料と調製直後のバリデーション用試料の測定値を比較することで安定性 (残存率) を評価した。本検討の結果、レンバチニブの残存率は 98.1-101.5%、RE は±15%以内であり、FDA のバリデーションガイドラインの判定基準を満たし、凍結融解操作 3 回で安定していることを確認した (Table 8)。

Table 8 Summary of freez-thaw stability for lenvatinib in plasma sample

| Analyte | Nominal Concentration (ng/mL) | n = 3 | |
|------------|----------------------------------|------------------------|-------------------|
| | | Stability (Mean, %) | Mean of RE (%) |
| 3 cycles | | | |
| Lenvatinib | 15 | 101.5 | -10.5 |
| | 750 | 98.1 | -1.9 |

RE, Relative error

RE (%) = (Mean of measured value - theoretical value) / theoretical value × 100

3-6-2 短期保存

試料は LC-MS での測定前に融解し、前処理操作を行うまで室温または冷蔵庫に置かれる。短期保存として室温または冷蔵庫に放置した場合のレンバチニブの安定性を確認した。バリデーション用試料 (15、750 ng/mL) を室温または冷蔵庫内 (4°C) で 6 時間および 12 時間保存した。室温または冷蔵庫において 6 時間および 12 時間経過したバリデーション用試料と調製直後のバリデーション用試料の測定値を比較することで安定性 (残存率) を評価した。本検討の結果、レンバチニブの残存率は、室温で 97.4-107.3%、冷蔵庫で 97.6-107.4%、RE は±15%以内であり、FDA のバリデーションガイドラインの判定基準を満たし、室温または冷蔵庫内で、12 時間安定であることを確認した (Table 9)。

Table 9 Summary of stability for lenvatinib at room temperature or refrigerator in plasma sample

| | | n = 3 | | | |
|------------|--------------------------|---------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Nominal | | Stability (Mean, %) | | | |
| Analyte | Concentration (ng/mL) | Room temperature | | 4°C | |
| | | 6hour (RE, %) | 12hour (RE, %) | 6hour (RE, %) | 12hour (RE, %) |
| Lenvatinib | 15 | 98.0 | 97.4 | 97.6 | 97.8 |
| | | (-13.96) | (-14.47) | (-14.32) | (-14.13) |
| | 750 | 105.5 | 107.3 | 107.4 | 105.1 |
| | | (3.51) | (5.26) | (5.40) | (3.10) |

RE, Relative error

RE (%) = (Mean of measured value - theoretical value) / theoretical value × 100

3-6-3 長期保存

採取した試料は遠心分離後、-20°Cの冷凍庫に保存される。LC-MSで測定するまでの長期保存として-20°Cの冷凍庫に保存した場合のレンバチニブの安定性を確認した。バリデーション用試料 (15、750 ng/mL) を冷凍庫内で10週間保存した。冷凍庫内で10週間経過したバリデーション用試料と調製直後のバリデーション用試料の測定値を比較することで安定性 (残存率) を評価した。本検討の結果、レンバチニブの残存率は98.3-113.4%、REは±15%以内であり、FDAのバリデーションガイドラインの判定基準を満たし、-20°Cの冷凍庫内で10週間安定であることを確認した (Table 10)。

Table 10 Summary of stability for lenvatinib at freezer in plasma sample

| Analyte | Nominal Concentration (ng/mL) | n = 3 | |
|------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------|
| | | Stability (Mean, %) | Mean of RE (%) |
| | | 10weeks | |
| Lenvatinib | 15 | 113.4% | -0.44 |
| | 750 | 98.3% | -3.55 |

RE, Relative error

RE (%) = (Mean of measured value - theoretical value) / theoretical value × 100

3-6-4 オートサンプラー内の安定性

試料は前処理操作を行った後、LC-MS のオートサンプラー内で連続的に測定される。前処理後の試料中における安定性として、前処理操作後に 10°C のオートサンプラー内に保存した場合のレンバチニブの安定性を確認した。バリデーション用試料 (15、750 ng/mL) を前処理操作を行った後、10°C のオートサンプラー内で 24 時間保存した。オートサンプラー内で 24 時間経過したバリデーション用試料と前処理直後のバリデーション用試料の測定値を比較することで安定性 (残存率) を評価した。本検討の結果、レンバチニブの残存率は 99.7-104.3%、RE は ±15% 以内であり、FDA のバリデーションガイドラインの判定基準を満たし、前処理操作後のレンバチニブは、10°C のオートサンプラー内で 24 時間安定であることを確認した (Table 11)。

Table 11 Summary of stability for lenvatinib at autosampler in plasma sample

| Analyte | Nominal Concentration (ng/mL) | n = 3 | |
|------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------|
| | | Stability (Mean, %) | Mean of RE (%) |
| 24hour | | | |
| Lenvatinib | 15 | 99.7% | -12.44 |
| | 750 | 104.3% | 2.32 |

RE, Relative error

$$RE (\%) = (\text{Mean of measured value} - \text{theoretical value}) / \text{theoretical value} \times 100$$

4. 考察

本研究では、LC-MS を用いて血中レンバチニブ濃度の分析法を FDA の「Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation」に準拠して検討を行った。分析バリデーションは、FDA のバリデーションガイドラインの基準を満たす結果であった。

LC-MS/MS を用いた血中レンバチニブ濃度の定量下限は、0.08 ng/mL[26]であるが、レンバチニブの血中濃度は、24 mg を 1 日 1 回服用する場合、最高血中濃度で 518±209 ng/mL であり、8 mg を 1 日回服用する場合、血中トラフ濃度で 29.74±28.01 ng/mL と報告されている[40]。本分析法の定量範囲は、5.0-1000 ng/mL であるため、臨床におけるレンバチニブの血中トラフ濃度を測定するのに十分な性能を有していると考えられる。この濃度範囲における QC 試料を用いた CV は 1.0-10.6%、RE は±12.3% であり、既報[23-26]の LC-MS/MS の CV は 1.7-6.7%、RE は 0.2-10.5% と同等の測定が可能であることが示唆された。

LC-MS を用いた分析においては、安定同位体を IS に用いることが理想的であるが、本研究では、エルロチニブを用いた。エルロチニブは、非小細胞肺癌の治療に用いられる上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬であり、レンバチニブと同時に投与されることはなく、抽出溶液であるメタノールに溶解し、レンバチニブと同じ LC-MS の条件で同時測定が可能であった。さらに、一般的な ODS カラムを用いた LC-MS によって、エルロチニブをレンバチニブから分離することができた。これらのことより、エルロチニブは、本分析において IS として適切な物質であったと考えられる。

血漿または血清中レンバチニブはこれまでに報告されている LC-MS/MS を用いた測定法では 200-250 µL が必要であった[23,24]。本分析法では、血漿 100 µL の少量で血中レンバチニブ濃度を測定することが可能であることから、患者へ

の侵襲性を低下させる利点を有していることが示唆された。

本分析法における回収率の CV は 6.1%以内であり、LC-MS/MS を用いた CV 1.9%以内[25]と同程度の再現性が確認された。前処理操作は、IS を含むメタノール溶液と硫酸亜鉛水溶液による除蛋白のみで、簡便に血中レンバチニブ濃度を測定することができた。そのうえ、1 検体にかかる分析時間は 7 分間であり、既報の分析時間 12–21 分[23-26]と比較しても、迅速な臨床測定が可能になったと考えられる。また、安定性試験により、バリデーション用試料を 12 時間室温で放置した後、前処理操作を行って測定してもレンバチニブの残存率が高いことが確認された。長期保存の安定性についても、バリデーション用試料を -20°C で 10 週間にわたって凍結保存した後に前処理操作を行って測定してもレンバチニブを安定に測定できることも判明した。

本分析法は、少量の血漿しか必要とせず、IS を含むメタノール溶液と硫酸亜鉛水溶液による除蛋白のみで、簡便に血中濃度を測定することができ、測定時間を短縮することができた。これらのことから、本章で構築した LC-MS を用いた血中レンバチニブ濃度測定法は臨床で応用可能であると考えられた。

5. 小括

LC-MS を用いて血中レンバチニブ濃度の分析法を「Guidance for Industry, Bioanalytical method validation」に準拠して検討を行った。血中レンバチニブ濃度は 5-1000 ng/mL の範囲で測定可能であった。本分析法は、少量の血漿 100 µL を使用して IS を含むメタノール溶液と硫酸亜鉛水溶液による除蛋白のみで回収率の低下は認められず、1 検体あたりの分析時間は 7 分間であり分析時間を短縮できた。血漿中のレンバチニブは、室温で 12 時間、-20°C で 10 週間、繰り返しの凍結融解操作において高い安定性を確認した。いずれの項目においても FDA の

バリデーションガイドラインを満たしていることを確認した。以上より、本分析法は血中レンバチニブトラフ濃度測定に適用できる性能を有していることが示された。

第 2 章 肝細胞癌患者におけるレンバチニブの治療効果ならびに副作用発現と薬物血中濃度の関連

1. 緒言

HCC は発達した血管網を有する多血性腫瘍である。腫瘍組織等から分泌される VEGF や FGF 等の増殖因子は、HCC における血管網の形成に関与している [41]。ソラフェニブは、2009 年に未治療の切除不能な HCC に対する最初の分子標的療法として承認され、VEGFR 1-3、PDGFR β 、FGFR 1、および Raf-1 と B-Raf のセリン-スレオニンキナーゼ [1,2] の受容体チロシンキナーゼ活性を阻害することによって抗腫瘍効果を発揮する。ソラフェニブの承認以来、未治療の切除不能な HCC に対するスニチニブ、ブリバニブ、およびリニファニブ等の薬物に関する臨床試験では、十分な治療効果を示す結果が得られなかった [3-5]。そのため、ソラフェニブは長年にわたり HCC に対する第 1 選択治療として唯一の分子標的治療薬であった。さらに、2017 年には、ソラフェニブ治療後に病勢進行を示した切除不能な HCC 患者に対する 2 次治療としてレゴラフェニブが承認された [12]。

レンバチニブは、VEGFR 1-3、FGFR 1-4、幹細胞因子受容体、rearranged during transfection がん原遺伝子、PDGFR α [33,35] 等の受容体チロシンキナーゼを選択的に阻害することで、HCC に対する治療効果を発揮する。レンバチニブは国際第 III 相試験で切除不能な HCC 患者に対する 1 次治療として、ソラフェニブに対し主要評価項目である OS の非劣勢を証明した [13]。レンバチニブに関連する発現頻度の高い有害事象は、高血圧、下痢、食欲不振、疲労である。これらの有害事象により、レンバチニブの減量又は休薬に至った患者は、それぞれ 38.7% およ

び 52.1%であった。したがって、レンバチニブの用量を適切に調節することは、重篤な有害事象を回避し、その治療効果を最大化するために重要である。

経口分子標的治療薬は患者の体重によらず固定用量で投与されるため、個体内および個体間の pharmacokinetics (PK) は治療タイミングに影響されることが知られている[42]。このため、経口分子標的治療薬の PK と治療効果または有害事象との関連について様々な薬剤で検討された。腎細胞癌患者において、スニチニブ、パゾパニブ、アキシチニブ等の経口マルチキナーゼ阻害薬は、血漿中濃度と治療効果[43-45]または有害事象[46-48]との関連性が報告されている。レンバチニブの場合、甲状腺癌患者において血漿中トラフ濃度が 88 ng/mL を超えると肝機能障害および血小板減少症の発現率が上昇することが報告されている[20]。

HCC 患者において、レンバチニブによる有害事象は、薬物曝露と関連することが報告されている。HCC 患者を対象としたレンバチニブの第Ⅱ相試験の追加解析では、血漿中レンバチニブトラフ濃度および AUC が有害事象の発現と関連し、レンバチニブの早期減量または早期中止につながることを示された[21,22]。しかしながら、血中レンバチニブ濃度と治療効果に関連する報告はない。したがって、レンバチニブによる治療効果を最大化するとともに安全に実施するためには、レンバチニブの血中濃度と治療効果および有害事象との関連を解明することが重要である。

本研究では、HCC 患者における血中レンバチニブトラフ濃度と ORR および有害事象との関連について検討した。

2. 方法

2-1 対象患者

2018年12月から2020年3月までに九州大学病院でレンバチニブを投与されたHCCの日本人患者を対象とした。本研究に参加した患者には、書面によるインフォームドコンセントを行い、同意を取得した。このうち、治療効果を評価する前に治療を中止した患者は除外した。なお、本研究は九州大学大学院医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号765-01）。

2-2 レンバチニブの治療プロトコル

Child-Pugh Aに分類されたHCC患者では、体重が60kg以上の場合は12mg/日、体重が60kg未満の場合は8mg/日の用量で治療開始された。Child-Pugh Bに分類されたHCC患者では、8mg/日または4mg/日の用量で治療開始された。レンバチニブは、病勢進行または忍容性のない毒性が確認されるまで投与された。レンバチニブの治療開始時減量は、患者の全身状態に応じて各医師の判断で実施された。投与開始後にGrade3又は忍容性のないGrade2の有害事象が発現した場合には、レンバチニブを減量又は休薬した[49]。

2-3 診療情報の収集

全てのデータは電子カルテシステムより抽出した。治療開始前の患者背景として、年齢、性別、体重、レンバチニブの治療開始用量、Child-Pugh分類、modified albumin-bilirubin (mALBI) grade、臨床検査値 (T-bil、AST、ALT)、レンバチニブの治療開始以前の全身療法の有無、肝外転移の有無、病因およびレンバチニブの減量または休薬までの期間についてデータを抽出した。

2-4 治療効果と有害事象の評価

治療の ORR は、modified response evaluation criteria in solid tumors (mRECIST) に従って判定した。ORR は、CT または MRI による評価に基づき、完全奏効 (complete response, CR) または部分奏効 (partial response, PR) と定義した。治療効果の評価時期は、各医師に委ねられた。初回治療効果判定は、レンバチニブの治療開始から約 8-12 週間後に実施された。血液サンプルは、レンバチニブが定常状態に達した 8 日目以降に採取した[20]。本研究では、既報[50]を基に治療効果の評価に血中レンバチニブトラフ濃度の中央値 ($C_{\text{trough median}}$) を用いた。 $C_{\text{trough median}}$ は、レンバチニブの治療開始後 8 日目 (定常状態推定到達日) から初回治療効果判定までの期間に各患者から複数サンプルを採取して算出した。また、血中レンバチニブの初回トラフ濃度 ($C_{\text{trough 1st}}$) は、レンバチニブの治療開始後 8 日目 (定常状態推定到達日) から 28 日目までの期間に各患者から 1 サンプルを採取して算出した。相対治療強度 (relative dose intensity, RDI) は、初回治療効果判定までの期間における実際のレンバチニブの累積投与量を同期間における理想のレンバチニブの累積投与量で割ることにより算出した。有害事象は、common terminology criteria for adverse events (CTCAE) ver.5.0 に基づき重症度 (Grade) を評価した。有害事象の重症度は、観察期間中の各有害事象の最悪の grade を用いた。本研究の主要評価項目は、HCC 患者における $C_{\text{trough median}}$ と ORR との関連を明らかにすることであり、副次的評価項目として $C_{\text{trough median}}$ と有害事象との関連を評価した。また、 $C_{\text{trough 1st}}$ が、ORR を予測するために使用できるかどうかを判断するために、 $C_{\text{trough 1st}}$ と ORR との関連についても評価した。

2-5 サンプル回収および血中レンバチニブ濃度の測定

血液サンプルは、レンバチニブが定常状態に達した 8 日目以降に採取した[20]。

血液サンプルは、レンバチニブの治療が中止されるまで約 24 週間毎に採取した。トラフ血液サンプルは、レンバチニブ服用後 24 ± 4 時間後に採取した。血漿は採取した血液サンプルを $1,378 \times g$ で 10 分間室温で遠心分離し、LC-MS で分析するまで -20°C で保存した。なお、血中レンバチニブ濃度は第 1 章で構築した LC-MS を使用して測定した。

2-6 統計解析

カテゴリー変数はカイ二乗検定または Fisher's exact test、連続変数は Mann-Whitney U 検定を用いた。統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。3 群間の比較については、Dunn の事後検定による Kruskal-Wallis 検定を実施した。Dunn の検定による adjusted p 値は、各対比較群の p 値に 3 を乗じて、adjusted $p < 0.05$ の場合を統計的有意とした。受信者動作特性 (receiver-operating characteristic, ROC) 曲線は、ORR に対する血中レンバチニブトラフ濃度の予測能を示すために描かれた。単変量および多変量ロジスティック回帰分析は、ORR に影響を与える因子を同定するために実施した。単変量解析で $p < 0.2$ の因子について、多変量ロジスティック回帰分析を実施した。多変量解析において $p < 0.05$ の場合を統計的有意とした。データの統計は、JMP 14.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) および GraphPad PRISM, version 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて解析した。

3. 結果

3-1 患者背景

対象期間中にレンバチニブによる治療を受けた HCC 患者は、26 名であった。このうち、忍容性のない有害事象のため 28 日以内に治療が中止された 3 名ならびに治療効果判定前に転院した 2 名を除外した。有害事象のために治療を中止した 3 名の患者は、 $C_{\text{trough 1st}}$ が 90ng/mL を超えていた。3 名の患者は、肝機能障害、腎機能障害、虚血性腸炎のために 28 日以内に治療を中止された。これら 5 名は、ORR が評価できなかつたため解析対象から除外した。最終的に 21 名を解析対象とした。治療開始時の患者背景を Table 12 に示す。年齢（中央値）は 78 歳、体重（中央値）は 63.8kg であった。Child-Pugh A は 18 名、Child-Pugh B は 3 名であった。mALBI grade 1 は 8 名、grade 2 a は 8 名ならびに grade 2 b は 5 名であった。レンバチニブの治療開始以前に全身療法（ソラフェニブ）を受けた患者は、2 名であった。RDI（中央値）は 66.7% であった。

Table 12 Baseline characteristics of patients

| | n = 21 | |
|----------------------------|--------|-------------|
| Age (years, range) | 78 | (64-87) |
| Sex | | |
| Male | 18 | |
| Female | 3 | |
| Body weight (kg, range) | 63.8 | (41.0-96.3) |
| Initial dose of lenvatinib | | |
| 12 mg | 12 | |
| 8 mg | 8 | |
| 4 mg | 1 | |
| Initial dose reduction | | |
| Yes | 5 | |
| No | 16 | |
| Child-Pugh class | | |
| A | 18 | |
| B | 3 | |
| mALBI grade | | |
| 1 | 8 | |
| 2a | 8 | |
| 2b | 5 | |
| T.bil (mg/dL, range) | 0.7 | (0.3-1.8) |
| AST (IU/L, range) | 28.0 | (15-60) |
| ALT (IU/L, range) | 20.0 | (9-61) |
| Systemic therapy | | |
| naïve | 19 | |
| experienced | 2 | |
| metastasis | 3 | |
| Etiology | | |
| HBV | 8 | |
| HCV | 6 | |
| NBNC | 7 | |
| RDI (% , range) | 66.7 | (36.1-100) |

Continuous variables are presented as the median. *T.bil*, total bilirubin; *AST*, aspartate aminotransferase; *ALT*, alanine transaminase; *mALBI*, modified albumin-bilirubin; *HBV*, hepatitis B virus; *HCV*, hepatitis C virus; *NBNC*, non-HBV non-HCV; *RDI*, relative dose intensity until the initial assessment of efficacy

3-2 奏効率に及ぼす血中レンバチニブ濃度の影響

CR は 2 名、PR は 8 名、stable disease (SD) は 8 名、progressive disease (PD) は 3 名であった。ORR は 47.6%であった。初回治療効果判定までに 21 名から 101 サンプルを採取した。各患者から採取した血液サンプル数 (中央値 (範囲)) は 4 (2-11)であった。C_{trough median} (中央値 (範囲)) は、42.74 ng/mL (12.3-164.7 ng/mL)であった。CR/PR 群の C_{trough median} は 59.1 ng/mL (12.3-164.7 ng/mL)、SD 群の C_{trough median} は 40.4 ng/mL (14.8-121.9 ng/mL)および PD 群の C_{trough median} は 27.5 ng/mL (12.8-56.4 ng/mL)であった (Fig. 3a)。CR/PR 群の C_{trough median} は SD 群 (adjusted $p = 0.0453$)および PD 群 (adjusted $p < 0.001$)の C_{trough median} よりも有意に高かった。さらに、SD 群の C_{trough median} は PD 群の C_{trough median} より有意に高かった (adjusted $p = 0.0465$)。ROC 解析は、ORR の達成に対する C_{trough median} の予測能を示した (Fig. 3b)。ROC 下面積は、0.8000 (confidence interval (CI), 0.58–1.00; $p = 0.0201$)であり、C_{trough median} のカットオフ値が、42.68 ng/mL の場合に最も良好な感度 (80.0%) と特異度 (81.8%) を示した。ORR は、low-C_{trough median} 群よりも high-C_{trough median} 群で有意に高かった (80.0% vs. 18.2%; $p = 0.0089$) (Fig. 3c)。

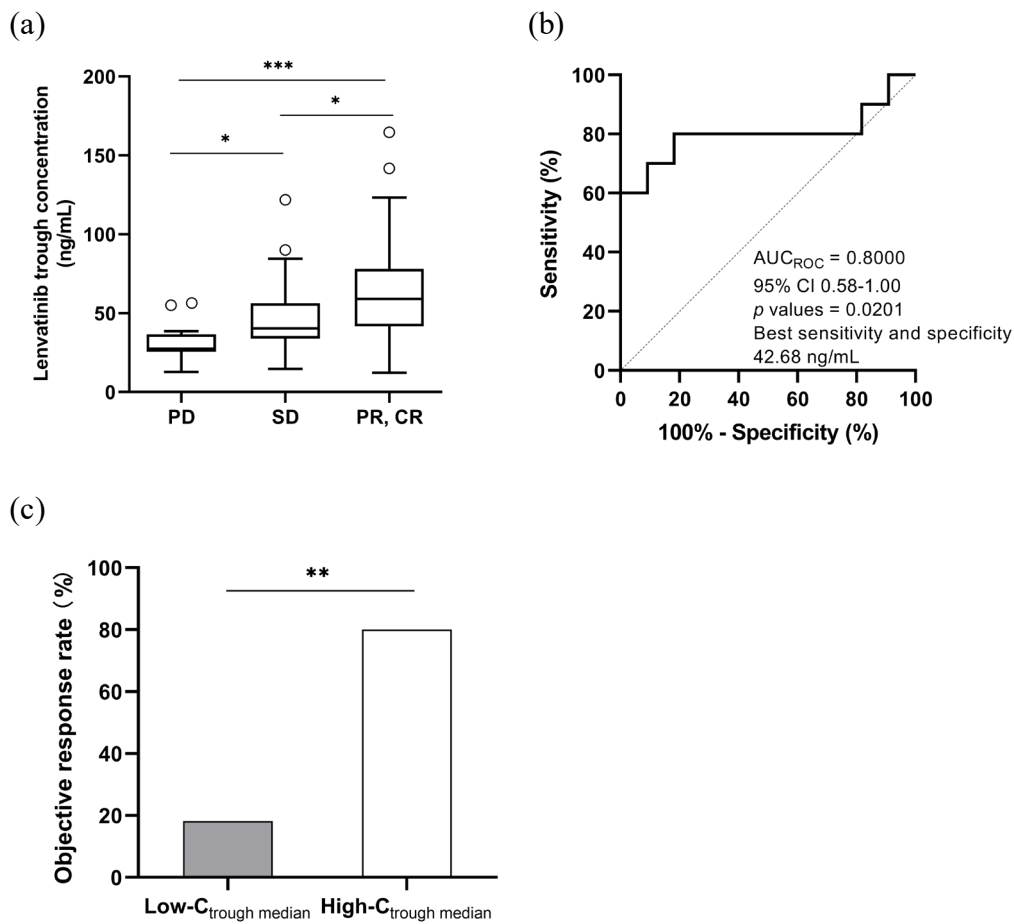


Fig. 3 Association between the median trough concentration of plasma lenvatinib and objective response rate.

a) The median trough concentration of plasma lenvatinib in patients with progressive disease (PD) (number of samples 13, $n = 3$), in patients with stable disease (SD) (number of samples 45, $n = 8$), and in patients with complete response (CR) or partial response (PR) (number of samples 43, $n = 10$) (using the modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). The horizontal line in the center of each box shows the median of each group. The top and bottom bars of the boxes show the 75% percentile and 25% percentile. The open plots show an outlier in each group. The adjusted p values subjected by Dunn's test multiplied the p values of each paired comparison groups by 3. * adjusted $p < 0.05$, *** adjusted $p < 0.001$

b) The median trough concentration of plasma lenvatinib threshold for an objective response rate (ORR). Receiver operating characteristic (ROC) curves for prediction of the ORR. AUC_{ROC} , area under the receiver operating characteristic curve; CI , confidence interval.

c) Comparison of the ORR between patients with a median trough concentration of plasma lenvatinib ≥ 42.68 ng/mL (high-C_{trough median}, $n = 10$) and < 42.68 ng/mL (low-C_{trough median}, $n = 11$). ** $p < 0.01$

$C_{\text{trough 1st}}$ (中央値 (範囲)) は、60.56 ng/mL (25.8-164.7 ng/mL)であった。CR/PR群の $C_{\text{trough 1st}}$ は 79.5 ng/mL (46.6-164.7 ng/mL)、SD 群の $C_{\text{trough 1st}}$ は 39.4 ng/mL (25.8-90.0 ng/mL)および PD 群の $C_{\text{trough 1st}}$ は 27.5 ng/mL (26.4-56.4 ng/mL)であった (Fig. 4a)。CR/PR 群の $C_{\text{trough 1st}}$ は PD 群より有意に高かった (adjusted $p = 0.0451$)。ROC 下面積は 0.8273 (95% CI, 0.64-1.00; $p = 0.0112$)であり、 $C_{\text{trough 1st}}$ のカットオフ値が、57.85 ng/mL の場合に最も良好な感度 (90.0%)と特異度 (72.7%)を示した (Fig. 4b)。

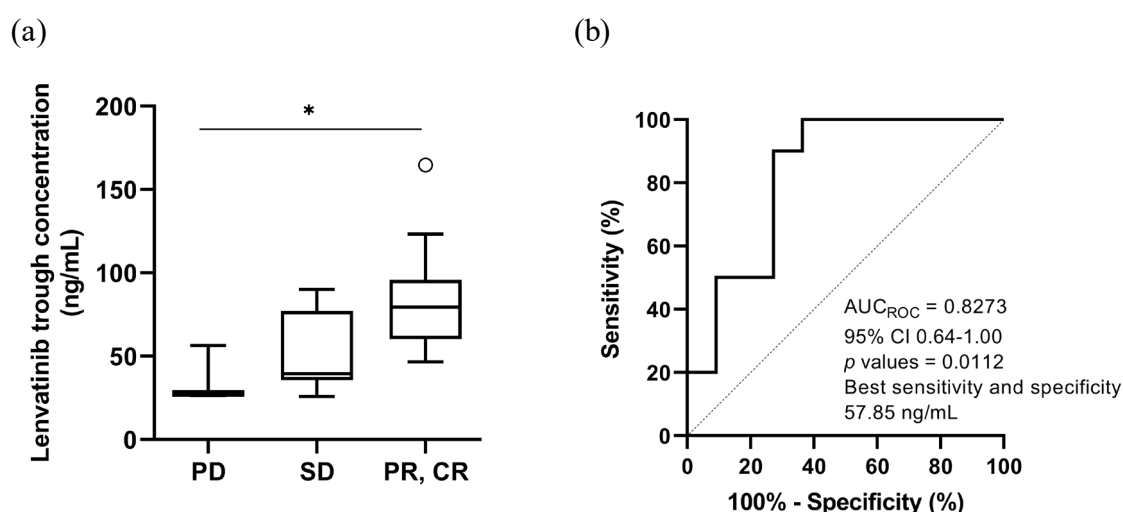


Fig. 4 Association between the first trough concentration of plasma lenvatinib and objective response rate. a) Plasma lenvatinib trough concentration from steady-state achievement to the 28th day in patients with progressive disease (PD) ($n = 3$), patients with stable disease (SD) ($n = 8$), and in patients with complete response (CR) or partial response (PR) ($n = 10$) (using the modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). One plasma sample was used per patient. The horizontal line in the center of each box shows the median of each group. The top and bottom bars of the boxes indicate the 75% percentile and 25% percentile, respectively. The adjusted p values subjected by Dunn's test multiplied the p values of each paired comparison group by 3. * adjusted $p < 0.05$

b) Plasma lenvatinib trough concentration from steady-state achievement to the 28th day threshold for objective response rate (ORR). Receiver operating characteristic (ROC) curves for prediction of the ORR. AUC_{ROC} , area under the receiver operating characteristic curve; CI, confidence interval

3-3 血中レンバチニブ濃度と患者背景の関係

high- $C_{\text{trough median}}$ 群とlow- $C_{\text{trough median}}$ 群の患者背景の比較をTable 13に示す。 $C_{\text{trough median}}$ は、low- $C_{\text{trough median}}$ 群に比べてhigh- $C_{\text{trough median}}$ 群で有意に高かった (64.4 ng/mL vs. 31.8 ng/mL; $p < 0.001$)。high- $C_{\text{trough median}}$ 群とlow- $C_{\text{trough median}}$ 群において、レンバチニブの治療開始用量 ($p = 0.0075$)と治療開始時減量 ($p = 0.0351$)の項目で有意な差が認められた。low- $C_{\text{trough median}}$ 群におけるレンバチニブの治療開始時減量の理由は、80歳以上の高齢 (2名)、Child-Pugh B (1名)、患者希望 (2名) であった。RDI (中央値) は、high- $C_{\text{trough median}}$ 群とlow- $C_{\text{trough median}}$ 群において有意な差は認められなかった (79.4% vs. 62.7%; $p = 0.5183$)。レンバチニブの減量は、high- $C_{\text{trough median}}$ 群とlow- $C_{\text{trough median}}$ 群において有意な差は認められなかった (76.1% vs. 63.6%; $p = 0.3108$)。また、レンバチニブの休薬についても、high- $C_{\text{trough median}}$ 群とlow- $C_{\text{trough median}}$ 群において有意な差は認められなかった (100.0% vs. 63.6%; $p = 0.0902$)。

Table 13 Comparison between patients with a median trough concentration of plasma lenvatinib ≥ 42.68 ng/mL (high- $C_{\text{trough median}}$) and < 42.68 ng/mL (low- $C_{\text{trough median}}$)

| | Low- $C_{\text{trough median}}$ n = 11 | | High- $C_{\text{trough median}}$ n = 10 | | <i>p</i> values |
|---|---|--------------|--|----------------|-----------------|
| Age (years, range) | 77 | (64-87) | 79 | (67-85) | 0.6659 |
| Sex | | | | | 1.0000 |
| Male | 9 | | 9 | | |
| Female | 2 | | 1 | | |
| Body weight (kg, range) | 65.5 | (44.3-96.3) | 63.4 | (41.0-74.4) | 0.9725 |
| Initial dose of lenvatinib | | | | | 0.0075 |
| 12 mg | 3 | | 9 | | |
| ≤ 8 mg* | 8 | | 1 | | |
| Initial dose reduction | | | | | 0.0351 |
| Yes | 5 | | 0 | | |
| No | 6 | | 10 | | |
| Child-Pugh class | | | | | 0.2143 |
| A | 8 | | 10 | | |
| B | 3 | | 0 | | |
| mALBI grade | | | | | 0.8088 |
| 1 | 4 | | 4 | | |
| 2a | 5 | | 3 | | |
| 2b | 2 | | 3 | | |
| T.bil (mg/dL, range) | 0.7 | (0.4-1.3) | 0.7 | (0.3-1.8) | 0.6887 |
| AST (IU/L, range) | 28.0 | (15-60) | 29.0 | (20-37) | 0.9310 |
| ALT (IU/L, range) | 19.0 | (10-61) | 21.0 | (9-41) | 0.9589 |
| Systemic therapy | | | | | |
| naïve | 11 | | 8 | | 0.2143 |
| experienced | 0 | | 2 | | |
| metastasis | 2 | | 0 | | 0.4762 |
| Etiology | | | | | 0.1998 |
| HBV | 6 | | 2 | | |
| HCV | 2 | | 4 | | |
| NBNC | 3 | | 4 | | |
| RDI (% range) | 62.7 | (36.1-100.0) | 79.4 | (47.6-100.0) | 0.5183 |
| Dose reduction (%) | 7 | (63.6) | 9 | (76.1) | 0.3108 |
| Duration until dose reduction (days, range) | 69.0 | (22.0-168.0) | 41.0 | (15.0-140.0) | 0.3655 |
| Interruption (%) | 7 | (63.6) | 10 | (100.0) | 0.0902 |
| Duration until interruption (days, range) | 42.0 | (37.0-127.0) | 47.0 | (18.0-112.0) | 0.5513 |

* In one patient in the low- $C_{\text{trough median}}$ group, treatment with lenvatinib was started at a dose of 4 mg. Continuous variables are presented as the median. *T.bil*, total bilirubin; *AST*, aspartate aminotransferase; *ALT*, alanine transaminase; *mALBI*, modified albumin-bilirubin; *HBV*, hepatitis B virus; *HCV*, hepatitis C virus; *NBNC*, non-HBV non-HCV; *RDI*, relative dose intensity until the initial assessment of efficacy

3-4 血中レンバチニブ濃度と有害事象の関係

high-C_{trough median}群と low-C_{trough median}群の全患者にレンバチニブによる有害事象が認められた (Table 14)。high-C_{trough median}群と low-C_{trough median}群においてほとんどの有害事象の発現頻度に差は認められなかったが、any grade の食欲不振 (100.0% vs. 45.5%; $p = 0.0124$) および grade 3 の重篤な高血圧 (70.0% vs. 18.2%; $p = 0.0300$) の発現頻度は、low-C_{trough median}群よりも high-C_{trough median}群で有意に高かった。

Table 14 Comparison of adverse events in patients with median trough concentration of plasma lenvatinib ≥ 42.68 ng/mL (high- $C_{\text{trough median}}$) and < 42.68 ng/mL (low- $C_{\text{trough median}}$)

| | | Low- $C_{\text{trough median}}$ | | High- $C_{\text{trough median}}$ | | <i>p</i> values |
|----------------------|---------------|---------------------------------|---------|----------------------------------|---------|-----------------|
| | | n = 11 (%) | | n = 10 (%) | | |
| Hypertension | Any grade | 11 | (100.0) | 10 | (100.0) | 1.0000 |
| | \geq Grade3 | 2 | (18.2) | 7 | (70.0) | 0.0300 |
| Proteinuria | Any grade | 9 | (81.8) | 6 | (60.0) | 0.3615 |
| | \geq Grade3 | 2 | (18.2) | 2 | (20.0) | 1.0000 |
| Thrombocytopenia | Any grade | 10 | (90.9) | 9 | (90.0) | 1.0000 |
| | \geq Grade3 | 1 | (9.1) | 0 | (0.0) | 1.0000 |
| Anorexia | Any grade | 5 | (45.5) | 10 | (100.0) | 0.0124 |
| | \geq Grade3 | 0 | (0.0) | 0 | (0.0) | 1.0000 |
| Fatigue | Any grade | 8 | (72.7) | 10 | (100.0) | 0.2143 |
| | \geq Grade3 | 0 | (0.0) | 1 | (10.0) | 0.4762 |
| Hypothyroidism | Any grade | 10 | (90.9) | 9 | (90.0) | 1.0000 |
| | \geq Grade3 | 0 | (0.0) | 0 | (0.0) | 1.0000 |
| Diarrhea | Any grade | 4 | (36.4) | 6 | (60.0) | 0.6699 |
| | \geq Grade3 | 0 | (0.0) | 2 | (20.0) | 0.2143 |
| Mucosal inflammation | Any grade | 3 | (27.3) | 2 | (20.0) | 1.0000 |
| | \geq Grade3 | 1 | (9.1) | 0 | (0.0) | 1.0000 |
| Hand foot syndrome | Any grade | 8 | (72.7) | 9 | (90.0) | 0.5865 |
| | \geq Grade3 | 0 | (0.0) | 1 | (10.0) | 0.4762 |
| Increased AST | Any grade | 5 | (45.5) | 5 | (50.0) | 1.0000 |
| | \geq Grade3 | 0 | (0.0) | 2 | (20.0) | 0.2143 |
| Increased ALT | Any grade | 4 | (36.4) | 4 | (40.0) | 1.0000 |
| | \geq Grade3 | 0 | (0.0) | 2 | (20.0) | 0.2143 |
| Increased T.bil | Any grade | 4 | (36.4) | 2 | (20.0) | 0.6351 |
| | \geq Grade3 | 0 | (0.0) | 0 | (0.0) | 1.0000 |

AST, aspartate aminotransferase; *ALT*, alanine transaminase; *T.bil*, total bilirubin

3-5 奏効率に影響を及ぼす因子

ORRに影響を及ぼす因子についての単変量および多変量ロジスティック回帰分析の結果をTable 15に示す。単変量解析の結果、 $C_{\text{trough median}} \geq 42.68\text{ng/mL}$ ($p = 0.0089$)と $\text{RDI} \geq 70.0\%$ ($p = 0.1984$)が $p < 0.2$ であった。これら因子について多変量解析を行った結果、 $C_{\text{trough median}} \geq 42.68\text{ng/mL}$ がORR達成の独立した因子として抽出された (odds ratio, 15.00; 95% CI 1.63–138.16; $p = 0.0168$)。

Table 15 Univariate and multivariate analyses of potential factors associated with objective response rate

| | No. of Case | Univariate Analysis | | Multivariate Analysis | |
|----------------------------|-------------|---------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| | | ORs (95% CI) | <i>p</i> values | ORs (95% CI) | <i>p</i> values |
| Sex | | 2.00 | 1.0000 | | |
| Male | 18 | (0.20-31.81) | | | |
| Female | 3 | | | | |
| Body weight | | 1.50 | 1.0000 | | |
| $\geq 60\text{kg}$ | 16 | (0.24-10.04) | | | |
| $< 60\text{kg}$ | 5 | | | | |
| Initial dose reduction | | 0.19 | 0.3108 | | |
| Yes | 5 | (0.01-1.90) | | | |
| No | 16 | | | | |
| mALBI grade | | 0.52 | 0.6351 | | |
| grade1, 2a | 16 | (0.08-3.23) | | | |
| grade2b | 5 | | | | |
| $C_{\text{trough median}}$ | | 18.00 | 0.0089 | 15.00 | 0.0168 |
| $\geq 42.68\text{ng/mL}$ | 10 | (2.04-159.09) | | (1.63-138.16) | |
| $< 42.68\text{ng/mL}$ | 11 | | | | |
| RDI | | 4.00 | 0.1984 | 2.40 | 0.4443 |
| $\geq 70.0\%$ | 9 | (0.64-25.01) | | (0.25-22.61) | |
| $< 70.0\%$ | 12 | | | | |

For the univariate analysis between Child Pugh (A vs. B) and the objective response rate (ORR), the odds ratio could not be calculated statistically because there were 0 patients of Child Pugh B in the ORR group ($p = 0.2286$). ORs, odds ratios; CI, confidence interval; mALBI, modified albumin-bilirubin; $C_{\text{trough median}}$, median trough concentration of plasma lenvatinib until the initial assessment of efficacy; RDI, relative dose intensity until the initial assessment of efficacy

4. 考察

本研究は、HCC 患者における血中レンバチニブトラフ濃度と治療効果および有害事象との関連について検討した最初の報告である。21 名の HCC 患者を $C_{\text{trough median}}$ のカットオフ値である 42.68 ng/mL を境に、high- $C_{\text{trough median}}$ 群 (≥ 42.68 ng/mL) と low- $C_{\text{trough median}}$ 群 (< 42.68 ng/mL) の 2 群に分けて解析した。本研究の結果では、ORR が low- $C_{\text{trough median}}$ 群よりも high- $C_{\text{trough median}}$ 群で有意に高いことを示した。high- $C_{\text{trough median}}$ 群で any grade の食欲不振および grade3 の重篤な高血圧の発生頻度が有意に高かったが、ほとんどの有害事象は 2 群間で有意な差は認められなかった。また、2 群間においてレンバチニブの減量ならびに休薬の頻度に有意な差は認められなかった。

HCC 患者を対象としたレンバチニブの国際第Ⅲ相試験の探索的データに基づく、レンバチニブの用量に関係なく、血中レンバチニブの平均トラフ濃度は約 30-40 ng/mL であった[49]。しかしながら、血中レンバチニブトラフ濃度と治療効果との関連について検討した報告はなかった。まず、 $C_{\text{trough median}}$ と治療効果との関連を検討した結果 (Fig. 3)、CR/PR 群の $C_{\text{trough median}}$ は SD、PD 群よりも高く、high- $C_{\text{trough median}}$ 群では 10 名中 8 名に CR または PR が得られたことから、HCC 患者においてレンバチニブによる十分な奏効を示すためには、 $C_{\text{trough media}}$ を 42.68 ng/mL 以上に維持することが推奨される。また、レンバチニブの治療開始早期の血中トラフ濃度で治療効果を予測できるか、ORR と $C_{\text{trough 1st}}$ との関連についても検討した (Fig. 4)。 $C_{\text{trough 1st}}$ は CR/PR 群で PD 群より有意に高く、ROC 解析の結果より ORR を達成するための $C_{\text{trough 1st}}$ のカットオフ値は、57.85 ng/mL 以上であった。 $C_{\text{trough median}}$ のカットオフ値 (42.68 ng/mL) は、 $C_{\text{trough 1st}}$ のカットオフ値 (57.85 ng/mL) より低かった。この血中トラフ濃度の差は、 $C_{\text{trough 1st}}$ はレンバチニブが減

量される前の血中濃度であったことが影響しているものと考えられる。レンバチニブは、治療期間中に 21 名中 16 名 (76.1%) で減量された (Table 13)。また、レンバチニブの血中トラフ濃度の個体内変動は、15.3-32.8%[51]と報告されているため、レンバチニブの治療開始後 28 日以内の血中トラフ濃度を 1 点だけ用いた $C_{trough\ 1st}$ では ORR を予測することは臨床において困難であると考えられる。したがって、治療期間中にレンバチニブが減量された際の血中トラフ濃度を含む $C_{trough\ median}$ を 42.68 ng/mL 以上に維持することが、ORR との関連を評価するのに適していることが示唆された。

ORR を達成するための $C_{trough\ median}$ のカットオフ値 (42.68 ng/mL) に基づいて 21 名の患者を **high- $C_{trough\ median}$** 群と **low- $C_{trough\ median}$** 群に分けて患者背景を比較した (Table 13)。2 群間におけるレンバチニブの治療開始用量の有意差は、**low- $C_{trough\ median}$** 群と比較して **high- $C_{trough\ median}$** 群でのレンバチニブの治療開始時減量の割合が有意に低かったことに起因したと考えられる。以上より、ORR を達成するための血中トラフ濃度を維持するためには、体重を考慮して設定された標準用量でレンバチニブの治療を開始することが重要であることが示唆された。

本研究では、食欲不振の発現頻度は **low- $C_{trough\ median}$** 群よりも **high- $C_{trough\ median}$** 群で有意に高かった (Table 14)。国際第Ⅲ相試験の母集団薬物動態解析の結果では、レンバチニブの AUC が高いと食欲不振をもたらす可能性が高いことが示されており [49]、本研究の結果と一致していた。加えて、**grade 3** 以上の重篤な高血圧の発現頻度は、**low- $C_{trough\ median}$** 群よりも **high- $C_{trough\ median}$** 群で有意に高いことを観察した。甲状腺癌患者においてレンバチニブの AUC が高いと、**grade 3** 以上の高血圧の発現頻度が増加したとの報告がある [52]。しかしながら、**grade 3** 以上の高血圧を発現した患者のほとんどは、降圧薬を用いて血圧を適切にコントロールすることができた。本研究では、 $C_{trough\ median}$ は **low- $C_{trough\ median}$** 群よりも **high- $C_{trough\ median}$**

群で有意に高かった (64.4 ng/mL vs. 31.8 ng/mL; $p < 0.001$) が、high- $C_{\text{trough median}}$ 群と low- $C_{\text{trough median}}$ 群の間でレンバチニブの減量または休薬の頻度に差はなかった (Table 13)。第 II 相試験において、レンバチニブの血中トラフ濃度が62.4 ng/mLを超えると、レンバチニブの減量または休薬につながるような有害事象の発現頻度が増加することが示されている[21]。Tamaiらは、レンバチニブのAUCが2430 ng×h/mLを超えると重篤な有害事象が発現したと報告している[22]。本研究では、high- $C_{\text{trough median}}$ 群と low- $C_{\text{trough median}}$ 群の間でレンバチニブの休薬に至る頻度の差は、約36.4%であり統計学的な差は認められなかったが、この差は臨床においては重要である。high- $C_{\text{trough median}}$ 群の $C_{\text{trough median}}$ は64.4 ng/mLであり、この数値は、第 II 相試験において重篤な有害事象の発現によりレンバチニブの減量または休薬に至った血中トラフ濃度 (62.4 ng/mL)と同程度であった[21]。したがって、レンバチニブの血中トラフ濃度が高い場合には、重篤な有害事象の発現を慎重に観察することが重要であると考えられる。腎細胞癌患者における重篤な有害事象の発現頻度と血中濃度との関連性は、スニチニブまたはパゾパニブ[43,46,48]において確立されている。したがって、レンバチニブによる重篤な有害事象の発現を回避し、有効な治療を達成するためには、HCC患者における重篤な有害事象の発現に関連する血中トラフ濃度のカットオフ値を明らかにすることが重要である。

多変量ロジスティック回帰分析は、 $C_{\text{trough median}} \geq 42.68$ ng/mL が独立した因子であることを示した (Table 15)。レンバチニブの治療開始時の mALBI grade 1 または 2a[53]、レンバチニブの治療開始後 8 週間の RDI が 67%以上[54]が HCC 患者における予後因子として報告されている。mALBI grade は HCC 患者の肝予備能の評価に用いられている[55]。Fuchigami らの報告によれば、治療開始時の mALBI grade に関係なく、レンバチニブの治療開始後 8 週間以内の ORR に差は

認められなかった[56]。本研究においても治療開始時の mALBI grade 1 または 2a は、ORR 達成の独立した因子ではなかったため、本知見はこれらの結果により支持される。RDI は、がん薬物療法における薬物暴露の臨床指標として有用であることが報告されている[57]。HCC に対するレゴラフェニブの標準用量は、体重に関係なく 160 mg/日の経口投与である[12]。レゴラフェニブによる治療開始後 1 ヶ月の時点で RDI が高い患者は、RDI が低い患者よりも OS および PFS が有意に長いことが示されている[58]。しかしながら、レンバチニブの標準用量は PK 解析に基づき体重別に設定された。したがって、RDI による実際の薬物曝露量の反映は困難であると考えられる。これは、Eso らが指摘しているように、レンバチニブでは RDI が実際の治療強度を正確に反映していない可能性があるためである。Eso らは、体重に応じてレンバチニブを投与した HCC 患者では、RDI が治療強度を正確に反映していない可能性があることを報告している[59]。加えて、以前の研究では、予後因子として血中レンバチニブトラフ濃度が含まれていなかったため、本研究ではこの濃度を予後因子として使用した。多変量ロジスティック回帰分析は、血中レンバチニブトラフ濃度が独立した予後因子であることを明らかにした。したがって、ORR を達成するためには、 $C_{\text{trough median}}$ を 42.68 ng/mL 以上に維持することが重要であることが示された。

本研究にはいくつかの限界がある。第 1 に、AUC は各患者における薬物暴露指標であるが、本研究では、血中レンバチニブ濃度の AUC を評価できなかった。しかしながら、イマチニブ、スニチニブ、パゾパニブ等の分子標的治療薬については、血漿中トラフ濃度に基づく治療薬モニタリングが推奨されている[43,60,61]ことから、本研究ではトラフ濃度を指標として用いた。第 2 に、本研究は少数の HCC 患者を対象とした単一施設の後方視的研究である。第 3 に、 $C_{\text{trough median}}$ のカットオフ値と PFS または OS との関連を評価できなかった。

以上より、HCC に対するレンバチニブの血中濃度と治療効果との関係を明らかにしたのは本研究が初めてであり、レンバチニブによる治療期間中は減量や休薬が必要となることが多いが、HCC における ORR の達成には $C_{\text{trough median}}$ を 42.68 ng/mL 以上に維持することが重要であると考えられた。

5. 小括

HCC 患者におけるレンバチニブの血中トラフ濃度と治療効果ならびに有害事象発現との関連について検討を行った。その結果、CR/PR 群の $C_{\text{trough median}}$ は SD、PD 群よりも有意に高かった。ORR を達成するための $C_{\text{trough median}}$ のカットオフ値 (42.68 ng/mL) に基づいて患者を high- $C_{\text{trough median}}$ 群と low- $C_{\text{trough median}}$ 群に分けた結果、high- $C_{\text{trough median}}$ 群は low- $C_{\text{trough median}}$ 群に比して ORR が有意に高かった。副作用の発現は、high- $C_{\text{trough median}}$ 群において any grade の食欲不振と grade 3 の高血圧の発現頻度は low- $C_{\text{trough median}}$ 群より高かったが、ほとんどの副作用において発現頻度に差は認められなかった。以上より、HCC における ORR の達成には $C_{\text{trough median}}$ を 42.68 ng/mL 以上に維持することが重要であることが示された。

総括

本研究では、HCC 患者におけるレンバチニブの治療効果ならびに副作用発現に対する薬物血中濃度の関連について検討を行い、以下の結論を得た。

第 1 章 LC-MS を用いた血中レンバチニブ濃度の分析法の構築

レンバチニブは、VEGFR 1-3、FGFR 1-4、幹細胞因子受容体、PDGFR α 等の受容体チロシンキナーゼを選択的に阻害することで、甲状腺癌やHCCに対する治療効果を発揮する。その高い治療効果の反面、多くの症例で高血圧、蛋白尿、倦怠感および手足症候群等の副作用のためにレンバチニブを減量または休薬を余儀なくされる。これまでに報告されている血中レンバチニブ濃度測定法の多くは、レンバチニブの安定同位体をISとして用いたLC-MS/MSによる分析法であり、測定法の再現が困難であった。そこで、本研究では市販されているエルロチニブをISとしLC-MSを用いてFDAの「Guidance for Industry, Bioanalytical method validation」に準拠して検討を行った。その結果、本分析法の定量範囲5.0-1000 ng/mLにおいて日内変動ならびに日間変動は、バリデーションガイドラインに規定されているCVは15.0%以下 (5 ng/mLは20.0%以下) 、REは \pm 15.0%以下 (5 ng/mLは \pm 20.0%以下) を満たしていた。このことから、臨床におけるレンバチニブの血中トラフ濃度を測定するのに十分な性能を有していると考えられた。また、一般的なODSカラムを用いたLC-MSによって、エルロチニブをレンバチニブから分離することができたことから、エルロチニブは、本分析においてISとして適切な物質であったと考えられた。さらに、本分析法における回収率は、バリデーションガイドラインに規定されているCVが15.0%以下をみたしており、前処理は、ISを含むメタノール溶液と硫酸亜鉛水溶液による除蛋白のみで、1検体にかかる分析時間は7分間であることから、迅速な臨床測定が可能になったと考え

られた。安定性試験の結果より、バリデーション用試料は短期保存として室温で12時間まで、長期保存として-20°Cの冷凍庫で10週間までの期間においてレンバチニブの残存率が高いことが確認された。このことから、臨床で採血して遠心分離後に得られた血漿を長期間凍結保存することができるため、レンバチニブ濃度は一定数の血漿をとりまとめてLC-MSで測定可能であることが示唆された。

これらのことから、本分析法は血中レンバチニブトラフ濃度測定に適用できる性能を有していることが示された。

第2章 肝細胞癌患者におけるレンバチニブの治療効果ならびに副作用発現と薬物血中濃度の関連

切除不能なHCCに対する第1選択薬であるレンバチニブはPKに基づいて体重に応じた用量設定がされたが、治療効果ならびに副作用発現と薬物血中濃度との関連についての報告はない。そこで、九州大学病院においてレンバチニブを服用しているHCC患者のうち、書面による同意が得られた患者を対象に、レンバチニブの血中トラフ濃度をLC-MSを用いて測定し、治療効果指標のORRと副作用発現との関連について検討した。

その結果、CR/PR群の $C_{\text{trough median}}$ はSD、PD群よりも有意に高かった。ROC解析よりORRを達成するための $C_{\text{trough median}}$ のカットオフ値(42.68 ng/mL)に基づいて患者をhigh- $C_{\text{trough median}}$ 群とlow- $C_{\text{trough median}}$ 群に分けた結果、high- $C_{\text{trough median}}$ 群はlow- $C_{\text{trough median}}$ 群に比してORRが有意に高かった。このことから、レンバチニブによる十分な奏効を得るためには、 $C_{\text{trough media}}$ を42.68 ng/mL以上に維持することの重要性が示された。また、2群間におけるレンバチニブの治療開始用量に有意な差が認められた要因としてlow- $C_{\text{trough median}}$ 群と比較してhigh- $C_{\text{trough median}}$ 群でのレンバチニブの治療開始時減量の割合が有意に低かったことが考え

られる。このことから、ORR を達成するための血中トラフ濃度を維持するためには、レンバチニブの治療を標準用量で開始することが重要であることが示唆された。

さらに、**high-C_{trough median}** 群で **any grade** の食欲不振と **grade 3** の高血圧の発現頻度が有意に高かったが、2群間においてほとんどの副作用発現に有意な差は認められなかった。また、**high-C_{trough median}** 群と **low-C_{trough median}** 群の間でレンバチニブの減量または休薬の頻度に統計学的な差はなかったが、**C_{trough median}** は **low-C_{trough median}** 群よりも **high-C_{trough median}** 群で有意に高かったことから、レンバチニブの血中トラフ濃度が高い場合には、重篤な副作用の発現を慎重に観察することが重要であると考えられた。ORR に影響する因子について多変量ロジスティック回帰分析を行った結果、**C_{trough median} ≥ 42.68 ng/mL** が独立した因子であることを示した。

以上より、HCC における ORR の達成には **C_{trough median}** を **42.68 ng/mL** 以上に維持することが推奨される (Fig. 5)。

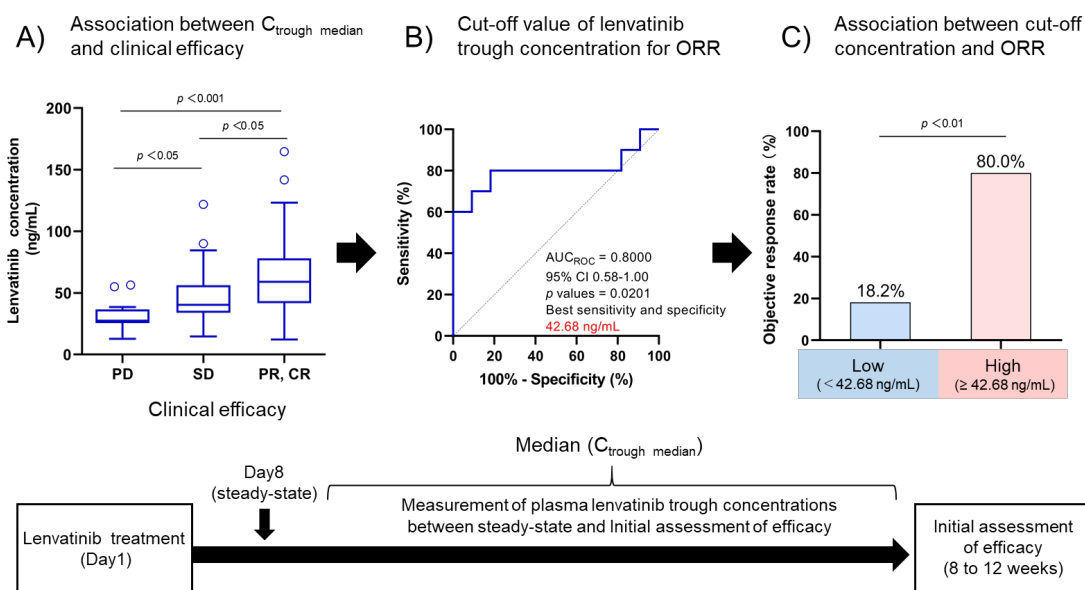


Fig. 5 Association between the median trough concentration of plasma lenvatinib and objective response rate (ORR)

参考文献

1. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359 (4):378-390. doi:10.1056/NEJMoa0708857
2. Cheng A-L, Kang Y-K, Chen Z, Tsao C-J, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang T-S, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z (2009) Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology* 10 (1):25-34. doi:10.1016/s1470-2045(08)70285-7
3. Cheng A-L, Kang Y-K, Lin D-Y, Park J-W, Kudo M, Qin S, Chung H-C, Song X, Xu J, Poggi G, Omata M, Pitman Lowenthal S, Lanzalone S, Yang L, Lechuga MJ, Raymond E (2013) Sunitinib Versus Sorafenib in Advanced Hepatocellular Cancer: Results of a Randomized Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology* 31 (32):4067-4075. doi:10.1200/jco.2012.45.8372
4. Johnson PJ, Qin S, Park J-W, Poon RTP, Raoul J-L, Philip PA, Hsu C-H, Hu T-H, Heo J, Xu J, Lu L, Chao Y, Boucher E, Han K-H, Paik S-W, Robles-Aviña J, Kudo M, Yan L, Sobhonslidsuk A, Komov D, Decaens T, Tak W-Y, Jeng L-B, Liu D, Ezzeddine R, Walters I, Cheng A-L (2013) Brivanib Versus Sorafenib As First-Line Therapy in Patients With Unresectable, Advanced Hepatocellular Carcinoma: Results From the Randomized Phase III BRISK-FL Study. *Journal of Clinical Oncology* 31 (28):3517-3524. doi:10.1200/jco.2012.48.4410

5. Cainap C, Qin S, Huang W-T, Chung IJ, Pan H, Cheng Y, Kudo M, Kang Y-K, Chen P-J, Toh H-C, Gorbunova V, Eskens FALM, Qian J, McKee MD, Ricker JL, Carlson DM, El-Nowiem S (2015) Linifanib Versus Sorafenib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology* 33 (2):172-179. doi:10.1200/jco.2013.54.3298
6. Llovet JM, Decaens T, Raoul JL, Boucher E, Kudo M, Chang C, Kang YK, Assenat E, Lim HY, Boige V, Mathurin P, Fartoux L, Lin DY, Bruix J, Poon RT, Sherman M, Blanc JF, Finn RS, Tak WY, Chao Y, Ezzeddine R, Liu D, Walters I, Park JW (2013) Brivanib in patients with advanced hepatocellular carcinoma who were intolerant to sorafenib or for whom sorafenib failed: results from the randomized phase III BRISK-PS study. *J Clin Oncol* 31 (28):3509-3516. doi:10.1200/jco.2012.47.3009
7. Zhu AX, Kudo M, Assenat E, Cattani S, Kang YK, Lim HY, Poon RT, Blanc JF, Vogel A, Chen CL, Dorval E, Peck-Radosavljevic M, Santoro A, Daniele B, Furuse J, Jappe A, Perraud K, Anak O, Sellami DB, Chen LT (2014) Effect of everolimus on survival in advanced hepatocellular carcinoma after failure of sorafenib: the EVOLVE-1 randomized clinical trial. *Jama* 312 (1):57-67. doi:10.1001/jama.2014.7189
8. Kudo M, Moriguchi M, Numata K, Hidaka H, Tanaka H, Ikeda M, Kawazoe S, Ohkawa S, Sato Y, Kaneko S, Furuse J, Takeuchi M, Fang X, Date Y, Takeuchi M, Okusaka T (2017) S-1 versus placebo in patients with sorafenib-refractory advanced hepatocellular carcinoma (S-CUBE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2 (6):407-417. doi:10.1016/s2468-1253(17)30072-9
9. Rimassa L, Assenat E, Peck-Radosavljevic M, Pracht M, Zagonel V, Mathurin P,

- Rota Caremoli E, Porta C, Daniele B, Bolondi L, Mazzaferro V, Harris W, Damjanov N, Pastorelli D, Reig M, Knox J, Negri F, Trojan J, López López C, Personeni N, Decaens T, Dupuy M, Sieghart W, Abbadessa G, Schwartz B, Lamar M, Goldberg T, Shuster D, Santoro A, Bruix J (2018) Tivantinib for second-line treatment of MET-high, advanced hepatocellular carcinoma (METIV-HCC): a final analysis of a phase 3, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Oncol* 19 (5):682-693. doi:10.1016/s1470-2045(18)30146-3
10. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schütz G, Thierauch KH, Zopf D (2011) Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer* 129 (1):245-255. doi:10.1002/ijc.25864
11. Abou-Elkacem L, Arns S, Brix G, Gremse F, Zopf D, Kiessling F, Lederle W (2013) Regorafenib inhibits growth, angiogenesis, and metastasis in a highly aggressive, orthotopic colon cancer model. *Mol Cancer Ther* 12 (7):1322-1331. doi:10.1158/1535-7163.Mct-12-1162
12. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V, Gerolami R, Masi G, Ross PJ, Song T, Bronowicki JP, Ollivier-Hourmand I, Kudo M, Cheng AL, Llovet JM, Finn RS, LeBerre MA, Baumhauer A, Meinhardt G, Han G (2017) Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 389 (10064):56-66. doi:10.1016/s0140-6736(16)32453-9
13. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han K-H, Ikeda K, Piscaglia F, Baron A, Park J-W, Han G, Jassem J, Blanc JF, Vogel A, Komov D, Evans TRJ, Lopez C, Dutcus C, Guo M,

- Saito K, Kraljevic S, Tamai T, Ren M, Cheng A-L (2018) Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet* 391 (10126):1163-1173. doi:10.1016/s0140-6736(18)30207-1
14. Yamashita T, Kudo M, Ikeda K, Izumi N, Tateishi R, Ikeda M, Aikata H, Kawaguchi Y, Wada Y, Numata K, Inaba Y, Kuromatsu R, Kobayashi M, Okusaka T, Tamai T, Kitamura C, Saito K, Haruna K, Okita K, Kumada H (2020) REFLECT-a phase 3 trial comparing efficacy and safety of lenvatinib to sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: an analysis of Japanese subset. *J Gastroenterol* 55 (1):113-122. doi:10.1007/s00535-019-01642-1
15. Bornhauser M, Storer B, Slattery JT, Appelbaum FR, Deeg HJ, Hansen J, Martin PJ, McDonald GB, Nichols WG, Radich J, Woolfrey A, Jenke A, Schleyer E, Thiede C, Ehninger G, Anasetti C (2003) Conditioning with fludarabine and targeted busulfan for transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells. *Blood* 102 (3):820-826. doi:10.1182/blood-2002-11-3567
16. Paci A, Veal G, Bardin C, Levêque D, Widmer N, Beijnen J, Astier A, Chatelut E (2014) Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1-- cytotoxics. *Eur J Cancer* 50 (12):2010-2019. doi:10.1016/j.ejca.2014.04.014
17. Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard MA, Lassalle R, Marit G, Reiffers J, Begaud B, Moore N, Molimard M, Mahon FX (2007) Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 109 (8):3496-3499. doi:10.1182/blood-2006-07-036012
18. Widmer N, Bardin C, Chatelut E, Paci A, Beijnen J, Levêque D, Veal G, Astier A

- (2014) Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two--targeted therapies. *Eur J Cancer* 50 (12):2020-2036. doi:10.1016/j.ejca.2014.04.015
19. Mizoguchi K, Nakamura Y, Sano K, Sato S, Ikegami Y, Motoshima K, Takemoto S, Ogawara D, Senju H, Sugasaki N, Ikeda T, Yamaguchi H, Nakatomi K, Fukuda M, Izumikawa K, Mukae H (2016) Pharmacokinetic parameters of gefitinib predict efficacy and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations. *Cancer Chemother Pharmacol* 78 (2):377-382. doi:10.1007/s00280-016-3097-4
20. Nagahama M, Ozeki T, Suzuki A, Sugino K, Niioka T, Ito K, Miura M (2019) Association of lenvatinib trough plasma concentrations with lenvatinib-induced toxicities in Japanese patients with thyroid cancer. *Med Oncol* 36 (5):39. doi:10.1007/s12032-019-1263-3
21. Ikeda K, Kudo M, Kawazoe S, Osaki Y, Ikeda M, Okusaka T, Tamai T, Suzuki T, Hisai T, Hayato S, Okita K, Kumada H (2017) Phase 2 study of lenvatinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 52 (4):512-519. doi:10.1007/s00535-016-1263-4
22. Tamai T, Hayato S, Hojo S, Suzuki T, Okusaka T, Ikeda K, Kumada H (2017) Dose Finding of Lenvatinib in Subjects With Advanced Hepatocellular Carcinoma Based on Population Pharmacokinetic and Exposure-Response Analyses. *J Clin Pharmacol* 57 (9):1138-1147. doi:10.1002/jcph.917
23. Dubbelman AC, Rosing H, Thijssen B, Gebretensae A, Lucas L, Chen H, Shumaker R, Schellens JH, Beijnen JH (2012) Development and validation of LC-MS/MS assays for the quantification of E7080 and metabolites in various human biological matrices. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 887-888:25-34.

- doi:10.1016/j.jchromb.2012.01.004
24. Mano Y, Kusano K (2015) A validated LC-MS/MS method of total and unbound lenvatinib quantification in human serum for protein binding studies by equilibrium dialysis. *J Pharm Biomed Anal* 114:82-87. doi:10.1016/j.jpba.2015.05.008
 25. Ogawa-Morita T, Sano Y, Okano T, Fujii H, Tahara M, Yamaguchi M, Minami H (2017) Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Assay for Quantitative Analysis of Lenvatinib in Human Plasma. *Int J Anal Chem* 2017:2341876. doi:10.1155/2017/2341876
 26. Mano Y (2018) Method validation studies and an inter-laboratory cross validation study of lenvatinib assay in human plasma using LC-MS/MS. *Pract Lab Med* 12:e00103. doi:10.1016/j.plabm.2018.e00103
 27. Watanabe Y, Doki K, Sekine I, Hara H, Homma M (2020) High-Performance Liquid Chromatography for Therapeutic Drug Monitoring of Serum Lenvatinib. *Ther Drug Monit* 42 (4):554-558. doi:10.1097/ftd.0000000000000770
 28. Food and Drug Administration (2001), Center for drug evaluation and research, Guidance for Industry Bioanalytical Method validation. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. Accessed 24 November 2020
 29. European medicines agency (2011), Guideline on bioanalytical method validation. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf. Accessed 24 November 2020
 30. 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知(2013), 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 http://www.nihs.go.jp/drug/BMV/250711_BMV-GL.pdf. Accessed 24 November

2020

31. Matsui J, Funahashi Y, Uenaka T, Watanabe T, Tsuruoka A, Asada M (2008) Multi-kinase inhibitor E7080 suppresses lymph node and lung metastases of human mammary breast tumor MDA-MB-231 via inhibition of vascular endothelial growth factor-receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 kinase. *Clin Cancer Res* 14 (17):5459-5465. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-07-5270
32. Matsui J, Yamamoto Y, Funahashi Y, Tsuruoka A, Watanabe T, Wakabayashi T, Uenaka T, Asada M (2008) E7080, a novel inhibitor that targets multiple kinases, has potent antitumor activities against stem cell factor producing human small cell lung cancer H146, based on angiogenesis inhibition. *Int J Cancer* 122 (3):664-671. doi:10.1002/ijc.23131
33. Tohyama O, Matsui J, Kodama K, Hata-Sugi N, Kimura T, Okamoto K, Minoshima Y, Iwata M, Funahashi Y (2014) Antitumor activity of lenvatinib (e7080): an angiogenesis inhibitor that targets multiple receptor tyrosine kinases in preclinical human thyroid cancer models. *J Thyroid Res* 2014:638747. doi:10.1155/2014/638747
34. Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, Robinson B, Brose MS, Elisei R, Habra MA, Newbold K, Shah MH, Hoff AO, Gianoukakis AG, Kiyota N, Taylor MH, Kim SB, Krzyzanowska MK, Dutcus CE, de las Heras B, Zhu J, Sherman SI (2015) Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med* 372 (7):621-630. doi:10.1056/NEJMoa1406470
35. Wilson LJ, Linley A, Hammond DE, Hood FE, Coulson JM, MacEwan DJ, Ross SJ, Slupsky JR, Smith PD, Eyers PA, Prior IA (2018) New Perspectives, Opportunities, and Challenges in Exploring the Human Protein Kinome. *Cancer Res* 78 (1):15-29.

doi:10.1158/0008-5472.Can-17-2291

36. Koyama N, Saito K, Nishioka Y, Yusa W, Yamamoto N, Yamada Y, Nokihara H, Koizumi F, Nishio K, Tamura T (2014) Pharmacodynamic change in plasma angiogenic proteins: a dose-escalation phase 1 study of the multi-kinase inhibitor lenvatinib. *BMC Cancer* 14:530. doi:10.1186/1471-2407-14-530
37. Gupta A, Jarzab B, Capdevila J, Shumaker R, Hussein Z (2016) Population pharmacokinetic analysis of lenvatinib in healthy subjects and patients with cancer. *Br J Clin Pharmacol* 81 (6):1124-1133. doi:10.1111/bcp.12907
38. Lankheet NA, Kloth JS, Gadellaa-van Hooijdonk CG, Cirkel GA, Mathijssen RH, Lolkema MP, Schellens JH, Voest EE, Sleijfer S, de Jonge MJ, Haanen JB, Beijnen JH, Huitema AD, Steeghs N (2014) Pharmacokinetically guided sunitinib dosing: a feasibility study in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 110 (10):2441-2449. doi:10.1038/bjc.2014.194
39. Gunther M, Saxinger L, Gray M, Legatt D (2013) Two suspected cases of immunoglobulin-mediated interference causing falsely low vancomycin concentrations with the Beckman PETINIA method. *Ann Pharmacother* 47 (4):e19. doi:10.1345/aph.1R566
40. レンビマ®カプセル 4mg[添付文書]. エーザイ株式会社
41. Morse MA, Sun W, Kim R, He AR, Abada PB, Mynderse M, Finn RS (2019) The Role of Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 25 (3):912-920. doi:10.1158/1078-0432.ccr-18-1254
42. Verheijen RB, Yu H, Schellens JHM, Beijnen JH, Steeghs N, Huitema ADR (2017) Practical Recommendations for Therapeutic Drug Monitoring of Kinase Inhibitors in Oncology. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 102 (5):765-776.

doi:10.1002/cpt.787

43. Suttle AB, Ball HA, Molimard M, Hutson TE, Carpenter C, Rajagopalan D, Lin Y, Swann S, Amado R, Pandite L (2014) Relationships between pazopanib exposure and clinical safety and efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 111 (10):1909-1916. doi:10.1038/bjc.2014.503
44. Yu H, Steeghs N, Kloth JSL, De Wit D, Van Hasselt JGC, Van Erp NP, Beijnen JH, Schellens JHM, Mathijssen RHJ, Huitema ADR (2015) Integrated semi-physiological pharmacokinetic model for both sunitinib and its active metabolite SU12662. *British Journal of Clinical Pharmacology* 79 (5):809-819. doi:10.1111/bcp.12550
45. Rini BI, Garrett M, Poland B, Dutcher JP, Rixe O, Wilding G, Stadler WM, Pithavala YK, Kim S, Tarazi J, Motzer RJ (2013) Axitinib in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis. *The Journal of Clinical Pharmacology* 53 (5):491-504. doi:10.1002/jcph.73
46. Noda S, Otsuji T, Baba M, Yoshida T, Kageyama S, Okamoto K, Okada Y, Kawauchi A, Onishi H, Hira D, Morita SY, Terada T (2015) Assessment of Sunitinib-Induced Toxicities and Clinical Outcomes Based on Therapeutic Drug Monitoring of Sunitinib for Patients With Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 13 (4):350-358. doi:10.1016/j.clgc.2015.01.007
47. Igarashi R, Inoue T, Fujiyama N, Tsuchiya N, Numakura K, Kagaya H, Saito M, Narita S, Satoh S, Niioka T, Miura M, Habuchi T (2018) Contribution of UGT1A1 genetic polymorphisms related to axitinib pharmacokinetics to safety and efficacy in patients with renal cell carcinoma. *Med Oncol* 35 (4):51. doi:10.1007/s12032-018-1113-8

48. Teo YL, Chue XP, Chau NM, Tan MH, Kanesvaran R, Wee HL, Ho HK, Chan A (2015) Association of drug exposure with toxicity and clinical response in metastatic renal cell carcinoma patients receiving an attenuated dosing regimen of sunitinib. *Target Oncol* 10 (3):429-437. doi:10.1007/s11523-014-0349-2
49. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (2018) Lenvima Review Reports. <https://www.pmda.go.jp/files/000233542.pdf>. Accessed 19 June 2020
50. Funck-Brentano E, Alvarez JC, Longvert C, Abe E, Beauchet A, Funck-Brentano C, Saiag P (2015) Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. *Ann Oncol* 26 (7):1470-1475. doi:10.1093/annonc/mdv189
51. Ozeki T, Nagahama M, Fujita K, Suzuki A, Sugino K, Ito K, Miura M (2019) Influence of CYP3A4/5 and ABC transporter polymorphisms on lenvatinib plasma trough concentrations in Japanese patients with thyroid cancer. *Scientific Reports* 9(1):5404. DOI: 10.1038/s41598-019-41820-y
52. Food and Drug Administration (2014) Center for Drug Evaluation and Research Lenvatinib Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/206947Orig1s000ClinPharmR.pdf. Accessed 19 June 2020
53. Hiraoka A, Kumada T, Atsukawa M, Hirooka M, Tsuji K, Ishikawa T, Takaguchi K, Kariyama K, Itobayashi E, Tajiri K, Shimada N, Shibata H, Ochi H, Tada T, Toyoda H, Nouse K, Tsutsui A, Nagano T, Itokawa N, Hayama K, Imai M, Joko K, Koizumi Y, Hiasa Y, Michitaka K, Kudo M, Real-life Practice Experts for Hcc Study Group HCCG (2019) Prognostic factor of lenvatinib for unresectable hepatocellular carcinoma in real-world conditions-Multicenter analysis. *Cancer Med* 8 (8):3719-

3728. doi:10.1002/cam4.2241

54. Sasaki R, Fukushima M, Haraguchi M, Miuma S, Miyaaki H, Hidaka M, Eguchi S, Matsuo S, Tajima K, Matsuzaki T, Hashimoto S, Ooba K, Kugiyama Y, Yatsushiro H, Motoyoshi Y, Shigeno M, Kinoshita N, Nakao K (2019) Response to Lenvatinib Is Associated with Optimal Relative Dose Intensity in Hepatocellular Carcinoma: Experience in Clinical Settings. *Cancers (Basel)* 11 (11). doi:10.3390/cancers11111769
55. Hiraoka A, Michitaka K, Kumada T, Izumi N, Kadoya M, Kokudo N, Kubo S, Matsuyama Y, Nakashima O, Sakamoto M, Takayama T, Kokudo T, Kashiwabara K, Kudo M (2017) Validation and Potential of Albumin-Bilirubin Grade and Prognostication in a Nationwide Survey of 46,681 Hepatocellular Carcinoma Patients in Japan: The Need for a More Detailed Evaluation of Hepatic Function. *Liver Cancer* 6 (4):325-336. doi:10.1159/000479984
56. Fuchigami A, Imai Y, Uchida Y, Uchiya H, Fujii Y, Nakazawa M, Ando S, Sugawara K, Nakayama N, Tomiya T, Mochida S (2020) Therapeutic efficacy of lenvatinib for patients with unresectable hepatocellular carcinoma based on the middle-term outcome. *PLoS One* 15 (4):e0231427. doi:10.1371/journal.pone.0231427
57. Havrilesky LJ, Reiner M, Morrow PK, Watson H, Crawford J (2015) A review of relative dose intensity and survival in patients with metastatic solid tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 93 (3):203-210. doi:10.1016/j.critrevonc.2014.10.006
58. Wang W, Tsuchiya K, Kurosaki M, Yasui Y, Inada K, Kirino S, Yamashita K, Sekiguchi S, Hayakawa Y, Osawa L, Okada M, Higuchi M, Takaura K, Maeyashiki C, Kaneko S, Tamaki N, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N (2019) Sorafenib-Regorafenib Sequential Therapy in Japanese Patients

with Unresectable Hepatocellular Carcinoma-Relative Dose Intensity and Post-Regorafenib Therapies in Real World Practice. *Cancers (Basel)* 11 (10).

doi:10.3390/cancers11101517

59. Eso Y, Nakano S, Mishima M, Arasawa S, Iguchi E, Nakamura F, Takeda H, Takai A, Takahashi K, Taura K, Seno H (2019) Dose Intensity/Body Surface Area Ratio is a Novel Marker Useful for Predicting Response to Lenvatinib against Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* 12 (1). doi:10.3390/cancers12010049

60. Houk BE, Bello CL, Poland B, Rosen LS, Demetri GD, Motzer RJ (2010) Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 66 (2):357-371. doi:10.1007/s00280-009-1170-y

61. Demetri GD, Wang Y, Wehrle E, Racine A, Nikolova Z, Blanke CD, Joensuu H, von Mehren M (2009) Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 27 (19):3141-3147. doi:10.1200/jco.2008.20.4818

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して、終始温かい御指導と激励を賜りました九州大学病院薬剤部 家入一郎教授に謹んで深甚なる感謝の意を表します。また、本論文をまとめるにあたり、種々の有益な御助言と御指導を賜りました九州大学大学院薬学研究院グローバルヘルスケア分野 小柳悟教授、九州大学病院薬剤部 江頭伸昭准教授、九州大学大学院薬学府薬物動態学教室 廣田豪准教授に謹んで感謝いたします。

また本研究の遂行にあたり、多くの御指導と御助力を賜りました九州大学病院薬剤部 末次王卓先生に厚く御礼申し上げます。本研究に対し温かい御支援、御協力、多くの御理解をいただきました九州大学病院薬剤部の先生方ならびに臨床薬物治療学教室の皆様にご心より感謝いたします。

また、臨床検体の提供ならびに臨床情報の提供等多くの御助力を賜りました九州大学大学院消化器・総合外科 吉住朋晴准教授、伊藤心二講師、九州大学大学院病態制御内科 国府島庸之准教授、九州大学生体防御医学研究所個体機能制御部門 田中正武助教に深甚なる謝意を表します。

