LC-MS/MSを用いた血漿中カルバペネム系抗菌薬測定系の最適化に関する研究

長瀬 泉^{1,†}, 村井晴香^{1,†}, 脇田瑠璃^{1,†}, 土井光則^{1,2}, 曾田 翠¹, 臼井茂之¹, 北市清幸^{1,*}
岐阜薬科大学 薬物動態学研究室¹, 和歌山県立医科大学附属病院 薬剤部²

The Optimization to Measure Carbapenem Antibiotics in Human Plasma Using LC-MS/MS

Izumi Nagase^{1,†}, Haruka Mural^{1,†}, Ruri Wakida^{1,†}, Mitsunori Doi^{1,2},
Midori Soda¹, Shigeyuki Usui¹ and Kiyoyuki Kitaichi^{1,*}

Laboratory of Pharmaceutics, Department of Biomedical Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical University¹,
Department of Pharmacy, Wakayama Medical University Hospital²

〔 Received May 17, 2018
Accepted November 13, 2018 〕

Several cases have reported that the plasma concentration of carbapenem antibiotics became lower than expected in patients with critical illness and/or transfusion. Therefore, in order to adjust the doses of carbapenem antibiotics, we developed and optimized the method to measure meropenem (MEPM) and doripenem (DRPM) in human plasma by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). A C18 column and mobile phase consisting of 10 mM ammonium formate containing 0.1% formic acid in 70% methanol were used for chromatographic separation. DRPM for MEPM determination and vice versa were used as internal standards. Both MEPM and DRPM could be detected within 5 minutes. Regarding the stock solution, MEPM stock solution should be used within 2 weeks of preparation when stored at -30°C . The solid phase extraction Oasis[®] HLB was used to extract carbapenem antibiotics. Thirty mg cartridges were suitable for extraction from 100 μL plasma samples. Importantly, it should be noted that the rate of reduction of MEPM and DRPM in plasma exceeded 20% two months after freezing at -30°C . Our established method could measure MEPM and DRPM in plasma (1.0–40 $\mu\text{g/mL}$) that would be useful to adjust their dosages in clinical practice.

Key words — meropenem, doripenem, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, therapeutic drug monitoring

緒 言

メロペネム (meropenem: MEPM) およびドリペネム (doripenem: DRPM) は, グラム陽性細菌, グラム陰性細菌および嫌気性細菌に対して強力かつ広範囲のスペクトル活性を有するカルバペネム系抗生物質である.¹⁾ これらの薬剤は集中治療室 (intensive care unit: ICU) における肺炎や敗血症などの重症感染症の治療に一般的に用いられる.^{2,3)} MEPM や DRPM は時間依存性の抗生物質であり,

最適な殺菌活性のために必要とされる time above MIC (%T > MIC) は 40% であると報告されている.^{4,6)} また, 重症患者には最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) より 4–5 倍高い濃度が最大殺菌活性と関連しているという報告もあり, より高い標的濃度の設定が必要であることが示唆されている.^{7,8)}

一方で, 重症患者や輸液負荷患者においては, 抗生物質, 特に β -ラクタム系などの親水性腎排泄型の抗生物質の血漿中濃度が想定よりも低下

[†] 本論文作成に同等に貢献した.

* 〒501-1196 岐阜市大学西1-25-4

し、標的濃度に到達しない事例が複数報告されている。⁹⁻¹¹⁾ これらの血漿中濃度の低下を招く要因の1つとして augmented renal clearance (ARC) であることはよく知られている。ARC は強い炎症反応や大量の輸液による血管拡張や心拍出量増大によって腎クリアランスが増大するために起こる現象であり、このような患者では、実測クレアチニンクリアランスによる腎機能の正確な把握¹²⁾ あるいは治療薬物濃度モニタリング (therapeutic drug monitoring: TDM) の実施による投与量の最適化が個々の患者の治療に資すると考えられる。しかしながら、TDM 対象薬剤であるバンコマイシンなどとは異なり、TDM 対象薬剤ではない MEPM や DRPM 等の抗生物質についてはその現場で測定系を確立する必要がある。これまでに高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) を用いた測定系が複数報告されている^{13,14)} が、多剤併用による夾雑ピークの影響は排除できない。また、UV 検出器の感度の問題から、定量に必要な血漿量が多くなることも課題である。一方、liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いた測定法^{15,16)} では、HPLC よりも高感度であり、必要な血漿量は少なく、測定薬物固有の質量分析条件を用いることにより、多剤併用等の影響を排除できると考えられる。そこで本研究では、LC-MS/MS を用いたカルバペネム系抗生物質の測定系を確立すると共に、測定プロトコルおよび各種条件の最適化を試みた。

方 法

1. 実験材料

標準物質として MEPM はメロペン点滴用バイアル 0.5 g (大日本住友製薬(株), 大阪) を、DRPM はフィニバックス点滴静注用 0.5 g (塩野義(株), 大阪) を使用した。両薬剤の希釈・溶解には生理食塩水 (大塚製薬(株), 東京) および注射用水 (光製薬(株), 東京) を使用した。移動相に用いたメタノール、ギ酸およびギ酸アンモニウムはシグマアルドリッチジャパン合同(株)(東京)より購入した。検量線作製およびバリデーション

に使用したヒト標準血漿 (クエン酸 Na 処理 Pooled Human plasma) はコスモ・バイオ(株)(東京)から購入した。血漿サンプルの固相抽出 (solid phase extraction: SPE) には、Oasis® HLB (Waters, Milford, Massachusetts) を、フィルター処理には Millex®-LG filters (0.20 μ m, Merck, Darmstadt) を使用した。

2. 分析条件

測定機器には LC-MS/MS システム (Waters 2695 Separations Module/Waters Quattro Micro Mass Spectrometer, 日本ウォーターズ(株), 東京) を用い、分析用カラムは Unison UK-C18 (100 $\times$ 2 mm, 粒子径 3 μ m, インタクト(株), 京都) を使用した。移動相は 0.1% ギ酸を含む 70% メタノール含有 10 mM ギ酸アンモニウムとし、アイソクラティックで行った。流速 0.15 mL/min, カラム温度は 30°C とした。LC-MS/MS システムのパラメーターは以下の通りに設定した; Capillary, 2.5 kV; Cone, 20 kV; Collision energy, 20 kV; Source temperature, 120°C; Desolvation temperature, 350°C; Desolvation gas (Nitrogen gas), 600 L/h; Cone gas (Nitrogen gas), 50 L/h。イオン化にはエレクトロスプレーイオン化法のポジティブモードを選択し、MEPM (m/z 384.0 $\rightarrow$ 68.2) および DRPM (m/z 420.9 $\rightarrow$ 274.2) を検出した。また、データ取得は Masslynks system (日本ウォーターズ(株)) を使用した。なお、LC-MS/MS へのサンプルの注入量は 15 μ L とした。

3. ストック溶液および quality control (QC) 血漿の作成

MEPM および DRPM はそれぞれ生理食塩水に溶解して 10 mg/mL に調製し、ストック溶液として使用まで -30°C で保存した。標準希釈液はストック溶液を注射用水で用時希釈して作成した。

分析法バリデーションおよび血漿中の薬物安定性の検討に用いる QC 血漿は、血漿中薬物濃度として 1.0, 2.5, 20 および 40 μ g/mL の濃度になるように MEPM および DRPM の標準希釈液 (各 $n=3$) をヒト標準血漿に添加・混和して作成した。

4. 血漿サンプルの調製

ヒト血漿中濃度として 1.0–40 µg/mL となるように MEPM および DRPM のストック溶液を希釈した。1.5 mL チューブに、ヒト標準血漿 100 µL、MEPM または DRPM 100 µL を入れ、内部標準物質 (internal standard: IS) としてそれぞれ DRPM : 80 µg/mL または MEPM : 40 µg/mL を 100 µL 加え、さらに全量が 500 µL となるように注射用水を 200 µL 加えて十分に攪拌して試料溶液を調製した。また、QC 血漿中の薬物濃度の測定時には、QC 血漿 100 µL に IS (MEPM または DRPM) 100 µL と注射用水 300 µL を加えて十分に攪拌して試料溶液を調製した。その後、メタノール 1 mL と注射用水 1 mL でプレコンディショニングした Oasis® HLB カートリッジに試料溶液を付し、10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 500 µL で 1 回洗浄後、20% メタノール含有 2.5 mM ギ酸アンモニウム水溶液を MEPM 測定の場合は 1 mL、DRPM 測定の場合は 500 µL を SPE に付して、両薬剤の溶出を行った。得られた溶出液をシリンジフィルターに通した後、LC-MS/MS による測定に供した。

5. ストック溶液の使用期限の検討

ストック溶液の使用期限を検討するために、MEPM および DRPM のストック溶液をそれぞれ注射用水で 40 µg/mL になるように調製した標準希釈液 100 µL、IS を 10 µL、メタノールを 50 µL 加え、十分に攪拌して測定に供した。測定はストック溶液調製から 1 週間ごとに実施し、希釈は測定のたびに行った。米国食品医薬品局 (FDA; Draft guidance for industry: bioanalytical method validation, 2013 Sep, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>, 平成 30 年 6 月 15 日) およびバイオアナリシスフォーラム¹⁷⁾ のバリデーションガイドラインを参考に、含有量が 85% 以上で推移している期間であり、かつ、保存開始時と比較して有意な含有量の低下が見られない期間をストック溶液の使用期限とした。

6. 固相抽出法 (SPE) で用いる固相量の検討

Oasis® HLB のシリンジ型カートリッジの固相

量の影響を検討するため、10 mg、30 mg および 60 mg の 3 種類のカートリッジで検討を行った。血漿中濃度として 1.0–40 µg/mL の濃度になるように MEPM および DRPM の標準希釈液をヒト血漿に添加して混和した後、Oasis® HLB カートリッジの 10 mg、30 mg および 60 mg の 3 種類を用いてサンプル調製を行った。得られた溶出液を測定に供し、後述の方法で回収率を算出した。

7. 検量線

検量線の作成には、血漿中濃度換算として 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 および 40 µg/mL の 7 点を用い、MEPM または DRPM の既知濃度 (x) に対し、IS のピーク面積に対する MEPM または DRPM のピーク面積比 (y) から最小二乗法による直線回帰分析で算出した。各相関係数が 0.99 以上であった場合を検量線の直線性ありと判定した。この回帰式を用いて、各濃度の検量線用試料のピーク面積比から推定血漿中濃度を求めた。

8. 分析法バリデーション

FDA およびバイオアナリシスフォーラム¹⁷⁾ のバリデーションガイドラインに基づき、選択性、直線性、回収率、安定性および再現性についての検討を行った。再現性および安定性の検証においては、血漿中薬物濃度として 1.0, 2.5, 20 および 40 µg/mL の濃度になるように調製した QC 血漿を用いた。定量下限は、分析対象物質のレスポンスがブランク試料のレスポンスの 5 倍以上である濃度で、かつ、真度が ±20.0% 以内、精度が 20.0% 以下を満たす濃度とした。なお、バリデーションの結果は次の式から算出した真度および精度によって評価した。

真度 (相対誤差: RE)

$$RE (\%) = \frac{\text{測定値} - \text{理論値}}{\text{理論値}} \times 100$$

精度 (相対標準偏差: RSD)

$$RSD (\%) = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均値}} \times 100$$

バリデーションの許容基準は、FDA ガイドラ

インに合わせて以下の値で設定した。

真度 (%) : $\pm 15.0\%$ 以内

(ただし、定量下限は $\pm 20.0\%$ 以内)

精度 (%) : 15.0% 以下

(ただし、定量下限は 20.0% 以下)

(1) 選択性

血漿由来成分の影響を受けずに目的物質の検出が可能かを確かめるため、選択性の検討を行った。40 $\mu\text{g/mL}$ の MEPM および 40 $\mu\text{g/mL}$ の DRPM を添加したヒト標準血漿と、ブランク血漿を前述の血漿サンプルの調製の方法に従い処理した後に、測定を行った。

(2) 再現性

① 日内再現性

同一試料を同日内で繰り返し測定した時の真度と精度を算出した。QC 血漿から上述 4 の方法に従って血漿サンプルを調製し、これら試料中の MEPM および DRPM の濃度を同日内に 5 回測定した。得られた定量値の真度および精度を前述の 8 の式に従って算出した。

② 日間再現性

日内再現性と同様に、QC 血漿から上述 4 の方法に従って血漿サンプルを調製し、これら試料中の MEPM および DRPM の濃度を 1 日 1 回測定する操作を 5 日間実施した。5 回の測定結果について真度および精度を求め、日間再現性を評価した。

③ 回収率

分析対象物質を生体試料に添加して前処理した時のピーク面積と、ブランクの生体試料を前処理した後に分析対象物質を添加した時のピーク面積を比較することによって、回収率を以下の式により算出した。

回収率 (%)

$$= \frac{\text{分析対象物質を生体試料に添加して前処理した時のピーク面積}}{\text{ブランクの生体試料を前処理した後に分析対象物質を添加した時のピーク面積}} \times 100$$

④ 安定性

④-1 長期安定性

患者検体の保存を想定して、QC 血漿を -30°C で 1 カ月保存した時の含有量を検量線から求めた理論値と比較した。さらに、患者検体の長期保存

の使用期限を定めるため、MEPM は 3 カ月まで、DRPM は 2 カ月まで 30 日ごとに測定を行い、含有量を経時的に算出した。

④-2 短期安定性

QC 血漿を常温 (21°C) で 4 時間保存した時の含有量を検量線から求めた理論値と比較した。また、検体採取から測定開始までの常温保存あるいは冷所保存時の安定性を検討するため、QC 血漿 (2.5 $\mu\text{g/mL}$) を常温あるいは冷所で 24 時間まで保存し、その含有量を経時的に測定した。なお、後者の検討では、2018 年の臨床・検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) のブレイクポイント (M100) (CLSI M100-ED28: 2018 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition, [http://em100.edaptivedocs.info/GetDoc.aspx?doc=CLSI M100 ED28:2018&sbssok=CLSI M100 ED28:2018 TABLE 2B 1&format=HTML](http://em100.edaptivedocs.info/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED28:2018&sbssok=CLSI%20M100%20ED28:2018%20TABLE%20B%201&format=HTML), 平成 30 年 9 月 30 日) で提唱されているカルバペネム系の緑膿菌の感受性 $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/mL}$ を示す濃度に近く、臨床で目標トラフ値として考えられる濃度であり、かつ、検量線作成に用いられている濃度 2.5 $\mu\text{g/mL}$ を用いた。

④-3 凍結融解安定性

-30°C で保存した QC 血漿を、常温にて完全に融解させた後、再度 -30°C で凍結させた。この凍結と融解の作業を 3 回繰り返した後の血漿サンプル中濃度を測定し、含有量を検量線から求めた理論値と比較した。

④-4 調製後安定性

QC 血漿から 4 に従って血漿サンプルより抽出した測定用試料をオートサンプラー内 (4°C) で 4 時間放置した時の含有量を検量線から求めた理論値と比較した。

④-5 ストック溶液安定性

MEPM および DRPM を 1.0–40 $\mu\text{g/mL}$ の濃度となるように調製した標準希釈液を、常温 (21°C) で 4 時間放置した時の含有量を検量線から求めた理論値と比較した。

⑤ マトリックス効果

バイオアナリシスフォーラム¹⁷⁾のバリデーションガイドラインを参考に、マトリックスファクター (MF) を以下の計算式で算出した。

IS normalized MF

$$= \frac{\text{マトリックス存在下での分析対象物質と IS のレスポンス比}}{\text{マトリックス非存在下での分析対象物質と IS のレスポンス比}}$$

異なる 6 ロットから得られたマトリックスを用いて調製した QC 試料を分析し、定量値の精度に関して個体間差が 15.0% 以下であることを許容基準とした。なお、マトリックスの影響が出やすい低濃度における MF が 1 に近い場合には低濃度のみで、MF が 1 より外れている場合には低濃度に加えて高濃度におけるマトリックス効果を検討した。¹⁷⁾

9. 統計解析

統計解析には SPSS II for Windows version 11.0.1 J (IBM Corp., Armonk, NY, USA) を用い、両薬剤のカートリッジ固相量による回収率、各保存条件下の安定性およびマトリックス効果は Mann-Whitney *U*-test を用いて解析した。すべての統計解析において、注釈がない限り、有意水準が 5% 未満の場合を有意差ありと判断した。

結 果

1. ストック溶液の使用期限の検討

MEPM および DRPM それぞれのストック溶液の含有量の経時的変化を図 1 に示す。保存開始時の含有量を 100% とした時の 1, 2, 3 および 4 週間後の両薬剤の含有量は、MEPM では 108.0, 96.8, 80.8 および 63.3%, DRPM では 89.9, 85.3, 85.7 および 88.3% となった。保存から 2 週間後以降の MEPM の含有量は、保存開始時と比較して有意に減少した。DRPM のストック溶液は、1 カ月の検討期間中に有意な含有量の減少は見られなかった。

2. 固相抽出 (SPE) で用いる固相量の検討

MEPM および DRPM のそれぞれについて、Oasis® HLB カートリッジ 10 mg, 30 mg, 60 mg を用いた時の回収率を図 2 に示す。固相量 10 mg を用いた時の MEPM の回収率は 1 および 2.5 $\mu\text{g/mL}$

図 1 MEPM および DRPM のストック溶液を凍結保存した時の含有量の 4 週間後までの経時的変化
ストック溶液における両薬剤の含有量を保存開始時の含有量を 100% とした時の比率で示した。● MEPM, □ DRPM. * $P < 0.05$ vs corresponding 0 week (Mann-Whitney *U*-test). MEPM: meropenem, DRPM: doripenem.

では 60% 程度であったが、20 および 40 $\mu\text{g/mL}$ では 80% 程度に上昇した (図 2A)。なお、図には示さないが、最も高濃度である MEPM 40 $\mu\text{g/mL}$ の回収率は、1 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ に比して有意に高値を示した (図 2A)。30 mg および 60 mg の固相量を用いた時の各濃度における MEPM の回収率はほぼ 90% 程度を示した。30 mg と 60 mg の固相量を用いた時の回収率は固相量 10 mg を用いた時の回収率に対していずれも有意に高値を示した (図 2A)。さらに、40 $\mu\text{g/mL}$ においては、固相量 30 mg を用いた時の回収率は固相量 60 mg を用いた時の回収率に比して有意に高値を示した (図 2A)。DRPM における固相量 10 mg, 30 mg および 60 mg の各濃度の回収率は、それぞれ 60% 程度, 85% 程度および 80% 程度であった (図 2B)。MEPM と同様に、30 mg と 60 mg の固相量を用いた時の回収率は固相量 10 mg を用いた時の DRPM の回収率と比較して有意に高値を示した (図 2B)。なお、20 $\mu\text{g/mL}$ における固相量 30 mg を用いた時の回収率は固相量 60 mg に比して有意に高値を示した (図 2B)。また、MEPM および DRPM について、すべての濃度における回収率を固相量 30 mg と 60 mg で比較したところ、固相量 30 mg の時の回収率は固相量 60 mg に比して有意に高値を示した (MEPM, $P = 0.013$; DRPM, $P = 0.001$, 図 2C)。以上のことから、本測定法で

図2 MEPM および DRPM の回収率に及ぼすカートリッジ固相量と薬剤濃度の影響

固相量の違いが回収率に与える影響を種々の濃度の MEPM (A) および DRPM (B) を含む QC 血漿を用いて比較した ($n = 4$). □ 固相量 10 mg, ■ 固相量 30 mg, ▨ 固相量 60 mg. * $P < 0.05$ vs 各濃度における固相量 10 mg, † $P < 0.05$ vs 各濃度における固相量 30 mg (Mann-Whitney U -test). (C) 固相量の違いが回収率に与える影響を固相量 30 mg および 60 mg の全データで比較した ($n = 16$). □ MEPM, ▨ DRPM. ‡ $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs 各薬剤の固相量 30 mg (Mann-Whitney U -test). MEPM: meropenem, DRPM: doripenem.

図3 MEPM および DRPM のクロマトグラムおよび検量線

(A) MEPM および DRPM を添加した血漿のクロマトグラム. 図中の実線および点線はそれぞれ MEPM および DRPM のクロマトグラムを示している. (B) ブランク血漿のクロマトグラム, (C) MEPM の検量線, (D) DRPM の検量線. MEPM: meropenem, DRPM: doripenem.

使用するカートリッジ固相量は 30 mg とし, 以下で分析法のバリデーションを行った.

3. 選択性

本測定法で得られた MEPM および DRPM 含有血漿サンプルおよびブランク血漿サンプルのクロマトグラムを図 3A および 3B に示す. 保持時間 2.5 分で MEPM および DRPM のピークが確認され, 互いに干渉することなく測定できることが確認された.

4. 検量線

MEPM, DRPM 共に血漿中濃度換算 0.5–40 µg/mL の濃度範囲において, 良好な直線性を示し, 相関係数はいずれも 0.99 以上の良好な相関を示した (図 3C, D). なお, 本測定の定量下限はヒト血漿中濃度換算で MEPM, DRPM 共に 0.2 µg/mL であった.

5. 回収率および再現性

血漿中濃度として 1, 2.5, 20 および 40 $\mu\text{g/mL}$ の時の回収率を算出したところ, MEPM ではそれぞれ 95.0, 93.5, 98.2 および 99.5% であった. 一方, DRPM ではそれぞれ 87.7, 89.7, 86.4 および 88.7% であった. また, MEPM および DRPM の日内再現性および日間再現性を検討した結果, 検討したすべての濃度において, FDA ガイドラインの基準を満たしており, 本測定法の再現性が確認された (表 1).

6. 安定性

QC 血漿の長期安定性, 短期安定性, 凍結融解安定性, 調製後安定性, およびストック溶液の短期安定性の 5 項目について MEPM および DRPM についてそれぞれ検討した. それぞれの条件において, MEPM および DRPM の安定性が確認され

(表 1), これらの条件は測定に影響を与えないことが明らかとなった.

検体を測定するまでの保存条件および使用期限等を定めるため, QC 血漿を常温または冷所 (4°C) に保存した時の 24 時間までの安定性についても検討を行った. 常温放置では, MEPM, DRPM は, 共に 4 時間を超えると 15% 以上の含有量の低下を示し, 8 時間以降からは保存開始時に比して時間依存的な有意な低下が観察された (図 4). 一方, 冷所では, MEPM, DRPM 共に, 24 時間後のサンプルにおいても含有量に 15% 以上の有意な低下は見られなかった (図 4).

長期安定性の検討では, 3 カ月後まで凍結保存した時の含有量の経時的変化を観察した. その結果, MEPM, DRPM の含有量は保存開始から 2 カ月後に含有量が 80% 程度まで有意に低下した (図 5).

表 1 MEPM および DRPM の再現性・安定性

評価項目		血漿中 MEPM 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)				血漿中 DRPM 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)			
		40	20	2.5	1.0	40	20	2.5	1.0
再現性									
日内	RSD (% , n = 5)	3.4	3.8	4.0	6.9	4.0	13.9	13.7	8.1
	RE (% , n = 3)	-0.6	4.0	4.9	-8.0	2.3	-12.2	2.3	1.6
日間	RSD (% , n = 5)	3.8	7.8	10.9	3.8	11.9	8.9	13.7	9.9
	RE (% , n = 3)	-4.7	0.5	12.2	2.2	-6.9	-7.8	-1.9	7.9
安定性									
長期	RE (% , n = 3)	-5.8	-3.2	7.1	1.5	-6.0	-14.2	-6.6	-2.8
短期	RE (% , n = 3)	6.7	4.5	1.8	-6.6	-4.7	-0.3	-1.8	-12.2
凍結融解	RE (% , n = 3)	9.5	14.0	5.1	-4.0	2.7	6.9	8.7	1.4
調製後	RE (% , n = 3)	-2.2	7.6	1.2	7.3	-8.3	-6.8	-10.9	8.5
ストック溶液	RE (% , n = 3)	7.9	12.9	5.0	-11.4	8.3	9.0	8.9	2.9

MEPM: meropenem, DRPM: doripenem, RE: accuracy, RSD: precision.

図 4 MEPM (A) および DRPM (B) 含有血漿における常温および冷所保存時の含有量の 24 時間後までの経時的変化

両薬剤 2.5 $\mu\text{g/mL}$ を含む血漿における両薬剤の含有量を保存開始時の含有量を 100% とした時の比率で示した. ○冷所保存, ▲常温保存. * $P < 0.05$ vs corresponding 0 hr (Mann-Whitney U -test). MEPM: meropenem, DRPM: doripenem.

図5 MEPM および DRPM 含有血漿における凍結保存時の含有量の3ヵ月後までの経時的変化

両薬剤 1 $\mu\text{g/mL}$ を含む血漿における両薬剤の含有量を保存開始時の含有量を 100% とした時の比率で示した。● MEPM, □ DRPM. * $P < 0.05$ vs corresponding 0 month (Mann-Whitney U -test). MEPM: meropenem, DRPM: doripenem.

7. マトリックス効果

MEPM のマトリックス効果は、血漿中濃度 2.5 $\mu\text{g/mL}$ で MF 0.59, 精度は 5.24% であった。高濃度の 40 $\mu\text{g/mL}$ で MF 0.71, 精度は 7.05% であった。一方, DRPM では、血漿中濃度 2.5 $\mu\text{g/mL}$ で MF 1.08, 精度は 6.10% であった。

考 察

本研究では、LC-MS/MS を用いたヒト血漿サンプル中の MEPM (1.0–40 $\mu\text{g/mL}$) および DRPM (1.0–40 $\mu\text{g/mL}$) を選択的に定量できる測定法を確立した。1 サンプルの測定時間は 5 分であり、既報^{15, 16, 18, 19)} の 5–9 分よりも短い時間での測定が可能となった。臨床現場における TDM を想定すると、多数の検体測定が必要となるため測定時間が短縮された本測定法はより臨床現場のニーズに沿ったものと考えられる。また、本測定法での回収率は MEPM が 93.5–99.5%, DRPM が 86.4–89.7% であった。これまでに報告されている回収率は MEPM で 55.7–59.2%,¹⁶⁾ 63.7–76.6%,²⁰⁾ DRPM で 51.6–53.0%²⁰⁾ であり、本研究における回収率は既報と比較して高かった。回収率が向上した原因としては、SPE の抽出液に 100% メタノールではなく 20% メタノール含有 2.5 mM ギ酸アンモニウム水溶液を用いることで、水溶性である両薬剤の抽出率が向上したことが考えられる。本法における回収率の向上は、少量サンプルでの測定、試験実施者間の測定結果の

ばらつきの低減等の利点をもたらすと考えられる。

血漿サンプルの前処理方法には、酢酸エチルなどを用いた液–液抽出法と、固相抽出による方法がある。^{21–23)} 固相抽出は液–液抽出と比べて、有機溶媒の使用量が少なく、夾雑物質と目的成分とのクリーンアップ効果が高いという利点があるため、本測定法ではより多くの臨床現場で導入可能な固相抽出法を選択した。検討の結果、固相抽出法に用いるカートリッジの固相量によって回収率が異なることが明らかになった。この原因としては、固相量の不足によるサンプル付加時あるいはその後のカラム洗浄時における薬剤の流出、固相量の過剰による固相からの溶出時における固相への薬剤の残存等が考えられるので、最適な固相量を選択することは極めて重要であると考えられる。固相量による回収率の違いを統計解析した結果、最も回収率が低かった固相量 10 mg のカートリッジを用いた時の MEPM の回収率は濃度間で有意な差が見られたが、回収率の高かった 30 mg および 60 mg カートリッジでは濃度間の有意な差が見られないことが明らかになった。この結果より、固相量の増量は濃度間での回収率の差をなくすことにある程度寄与していることが示唆された。

さらなる比較の結果、固相量 30 mg カートリッジを用いた時の両薬剤の回収率は、固相量 60 mg と比較して有意に高いことが明らかになり、我々の抽出条件においては、固相量 30 mg カートリッジの使用が至適であることが考えられた。このように、SPE カートリッジの固相量と回収率の関係を検討し、最適な固相量を選択することは、薬剤の濃度にかかわらず安定した高い薬剤回収率を可能とし、研究者のスキルに依存しない形での正確な検量線の作成と患者検体の血中濃度測定において有用であると考えられる。

なお、LC-MS/MS での測定ではマトリックスがしばしば問題となるが、MEPM ではマトリックス効果が見られたものの、低濃度と高濃度におけるマトリックス効果に有意差がなく、DRPM は低濃度においてもマトリックス効果が見られないことから、マトリックスの存在は両薬剤の測定に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

臨床現場においては検体採取から測定開始まで

に時間を要する可能性があり、使用する薬物の安定性に基づいて保存条件を定めておく必要がある。今回の我々の結果は、MEPM, DRPM 共に、常温では4時間後まで、冷所では少なくとも24時間後までは含有量が低下せず、測定サンプルとしての使用が可能であることが明らかとなった。

TDMにおける薬剤の測定は即時測定が基本であるが、臨床現場で後ろ向き研究を行う場合や、何らかの理由で再測定が必要になった場合に、検体採取から測定までの患者検体の保存期間に関する情報があることは極めて重要である。そこで我々は、長期間凍結保存した時の血漿中の両薬剤の含有量の経時的変化を観察した。その結果、 -30°C で凍結保存の場合は両薬剤を含む血漿サンプルは2カ月以内に測定に供することが好ましいことを明らかにした。

なお、本研究では -30°C における血漿サンプルの凍結安定性を検討したが、施設によっては -20°C や -80°C の冷凍庫を利用することも考えられる。 -20°C 保存では -30°C よりも含有量が低下する薬物も多く、MEPMやDRPMでも、より短期間で含有量が低下する可能性が否定できない。この点についてはさらなる検討が必要である。

また、迅速な結果提供が求められるTDMでは、検量線作成において薬剤を用時溶解するよりも、凍結冷凍保存してあるストック溶液を用いることがより効率のดีと考えられる。ストック溶液の凍結保存安定性を検討した結果、我々は生理食塩水に溶解したMEPM, DRPMのストック溶液の使用期限をそれぞれ2週間、1カ月と決定した。

なお、両薬剤のストック溶液の使用期限には違いが見られた。両薬剤のインタビューフォーム（メロペン®点滴用バイアル0.25gほか、大日本住友製薬株式会社、2018年7月改訂第15版およびフィニバックス®点滴静注用0.25gほか、塩野義製薬株式会社、2013年4月改訂第13版）によると、両薬剤を生理食塩水に溶解した溶液を 5°C で24時間放置した場合の力価はほとんど低下しないが、MEPMの場合、 25°C で24時間放置した後の力価の低下は5 mg/mLでは92.4%、10 mg/mLでは87.9%と軽微であるのに対して、50 mg/mLでは69.1%に低下することが報告されている。一方、DRPMは 25°C で24時間放置しても力価はほとんど低下しないこと

が報告されている。以上を考え合わせると、両薬剤の使用期限の違いには生理食塩水溶解後の安定性の違いが一部関与しているものと考えられる。

本研究では、LC-MS/MSを用いて5分の測定時間でMEPMおよびDRPMの血漿中濃度を測定する測定系を確立することができた。また、臨床現場でのTDMに向けた測定法の均てん化に向けた、サンプル調製法、SPE固相量の選択、ストック溶液や血漿サンプルの凍結安定性等の有用な情報を提供することができた。従って、今回確立した測定法やプロトコルは、国内外の臨床現場におけるカルバペネム系抗生物質のTDMの実施とそれによる適正使用の推進に貢献することが大いに期待される。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Lu C, Zhang Y, Chen M, Zhong P, Chen Y, Yu J, Wu X, Wu J, Zhang J, Population Pharmacokinetics and Dosing Regimen Optimization of Meropenem in Cerebrospinal Fluid and Plasma in Patients with Meningitis after Neurosurgery, *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, **60**, 6619-6625.
- 2) Wiseman LR, Wagstaff AJ, Brogden RN, Bryson HM, Meropenem. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy, *Drugs*, 1995, **50**, 73-101.
- 3) Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, Jimenez-Jimenez FJ, Perez-Paredes C, Ortiz-Leyba C, Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis, *Crit Care Med*, 2003, **31**, 2742-2751.
- 4) Kim A, Banevicius MA, Nicolau DP, In vivo pharmacodynamic profiling of doripenem against *Pseudomonas aeruginosa* by simulating human exposures, *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, **52**, 2497-2502.
- 5) Roberts JA, Kruger P, Paterson DL, Lipman J, Antibiotic resistance-what's dosing got to do with it? *Crit Care Med*, 2008 **36**, 2433-2440.
- 6) Drusano GL, Antimicrobial pharmacodynamics:

- critical interactions of 'bug and drug', *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**, 289-300.
- 7) Li C, Du X, Kuti JL, Nicolau DP, Clinical pharmacodynamics of meropenem in patients with lower respiratory tract infections, *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, **51**, 1725-1730.
 - 8) Tam VH, McKinnon PS, Akins RL, Rybak MJ, Drusano GL, Pharmacodynamics of cefepime in patients with Gram-negative infections, *J Antimicrob Chemother*, 2002, **50**, 425-428.
 - 9) Troger U, Drust A, Martens-Lobenhoffer J, Tanev I, Braun-Dullaeus RC, Bode-Boger SM, Decreased meropenem levels in Intensive Care Unit patients with augmented renal clearance, benefit of therapeutic drug monitoring, *Int J Antimicrob Agents*, 2012, **40**, 370-372.
 - 10) Udy AA, Varghese JM, Altukroni M, Briscoe S, McWhinney BC, Ungerer JP, Lipman J, Roberts JA, Subtherapeutic initial beta-lactam concentrations in select critically ill patients: association between augmented renal clearance and low trough drug concentrations, *Chest*, 2012, **142**, 30-39.
 - 11) De Waele JJ, Carrette S, Carlier M, Stove V, Boelens J, Claeys G, Leroux-Roels I, Hoste E, Depuydt P, Decruyenaere J, Verstraete AG, Therapeutic drug monitoring-based dose optimisation of piperacillin and meropenem: a randomised controlled trial, *Intensive Care Med*, 2014, **40**, 380-387.
 - 12) Baptista JP, Udy AA, Sousa E, Pimentel J, Wang L, Roberts JA, Lipman J, A comparison of estimates of glomerular filtration in critically ill patients with augmented renal clearance, *Crit Care*, 2011, **15**, R139. doi: 10.1186/cc10262.
 - 13) Roth T, Fiedler S, Mihai S, Parsch H, Determination of meropenem levels in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Biomed Chromatogr*, 2017, **31**. doi: 10.1002/bmc.3880.
 - 14) Briscoe SE, McWhinney BC, Lipman J, Roberts JA, Ungerer JP, A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, **907**, 178-184.
 - 15) Lefeuvre S, Bois-Maublanc J, Hocqueloux L, Bret L, Francia T, Eleout-Da Violante C, Billaud EM, Barbier F, Got L, A simple ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of 15 antibiotics in plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, **1065-1066**, 50-58.
 - 16) Rigo-Bonnin R, Ribera A, Arbiol-Roca A, Cobo-Sacristan S, Padulles A, Murillo O, Shaw E, Granada R, Perez-Fernandez XL, Tubau F, Alia P, Development and validation of a measurement procedure based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous measurement of beta-lactam antibiotic concentration in human plasma, *Clin Chim Acta*, 2017, **468**, 215-224.
 - 17) バイオアナリシスフォーラム, “医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法バリデーションガイドライン解説 -LCガイドライン-”, じほう, 東京, 2015, pp17-68.
 - 18) Huang L, Haagensen J, Verotta D, Lizak P, Aweeka F, Yang K, Determination of meropenem in bacterial media by LC-MS/MS, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, **961**, 71-76.
 - 19) Burian B, Zeitlinger M, Donath O, Reznicek G, Sauermann R, Penetration of doripenem into skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in healthy volunteers, *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, **56**, 532-535.
 - 20) Ohmori T, Suzuki A, Niwa T, Ushikoshi H, Shirai K, Yoshida S, Ogura S, Itoh Y, Simultaneous determination of eight beta-lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, **879**, 1038-1042.
 - 21) Van Damme T, Lachova M, Lynen F, Szucs R, Sandra P, Solid-phase extraction based on hydrophilic interaction liquid chromatography with acetone as eluent for eliminating matrix effects in the analysis of biological fluids by LC-MS, *Anal Bioanal Chem*, 2014, **406**, 401-407.
 - 22) Skov K, Hadrup N, Smedsgaard J, Frandsen H, LC-MS analysis of the plasma metabolome – a novel sample preparation strategy, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, **978-979**, 83-88.
 - 23) Wahajuddin, Singh SP, Jain GK, Determination of lumefantrine in rat plasma by liquid-liquid extraction using LC-MS/MS with electrospray ionization: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, **877**, 1133-1139.