

原著 HILIC-MS/MS を用いたヒト血漿中カルバペネム系 抗菌薬の高感度分析法

¹⁾ 昭和大学医学部法医学講座

²⁾ 昭和大学医学部外科学講座 (消化器一般外科学部門)

³⁾ 国立保健医療科学院

加藤 礼^{1,2)} 李 曉鵬*¹⁾ 熊澤 武志¹⁾
藤城 雅也¹⁾ 佐藤 淳一¹⁾ 澤口 聡子³⁾
丸茂 昭美¹⁾ 上島実佳子¹⁾ 青木 武士²⁾
村上 雅彦²⁾ 佐々木陽平¹⁾ 古谷 卓郎¹⁾
佐藤 啓造¹⁾

抄録：カルバペネム系抗菌薬は殺菌性に優れ、かつ幅広い抗菌スペクトルを有し、敗血症等の重症難治性感染症の治療薬として広く使用されている。さらに、カルバペネム系抗菌薬は時間依存的な抗菌効果を示す。薬物動態 (pharmacokinetics: PK) と薬力学 (pharmacodynamics: PD) 理論の分類においては、薬物濃度が最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) 以上になるべく長い維持時間 (Time above MIC: % T > MIC) を要するタイプに属する。カルバペネム系抗菌薬について人体試料から迅速かつ確実に同定・定量ならびに薬物血中濃度のモニタリング (therapeutic drug monitoring: TDM) することは、救急救命ならびに効果的な抗菌薬の投与設定において極めて重要である。本研究では、5種類のカルバペネム系抗菌薬について、順相カラムを用いた親水性相互作用液体クロマトグラフィー (Hydrophilic interaction liquid chromatography: HILIC)-タンデム質量分析 (MS/MS) による簡便かつ高感度な分析法を確立した。ヒト血漿 20 μ l に薬物を添加したのち、10 mM 酢酸アンモニウム溶液 80 μ l, アセトニトリル 400 μ l を加えて液-液抽出を行い、遠心分離した上清 10 μ l をダイレクトに分析システムに注入した。分離カラムには Imtakt 社製の順相カラム UK-Amino (長さ 50 mm, 内径 3 mm, 粒径 3 μ m) を使用した。ポジティブエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用いた多重反応モニタリング (MRM) により 5種類のカルバペネム系抗菌薬は、血漿から 3.5 分以内に感度良く検出され、回収率は 24 ~ 85% であった。内部標準法を用いて作成した検量線は、2.5 ~ 100 μ g/ml の濃度範囲で相関係数が 0.9998 以上の良好な直線性が得られ、検出限界は 1.25 μ g/ml であった。再現性 (CV 値) は日内変動および日間変動がそれぞれ 1.6 ~ 5.3% と 2.7 ~ 6.2% で良好であった。さらに、昭和大学医学部医の倫理委員会の承認 (No.1250) を得て、メロペネムおよびドリペネム 2種類の抗菌薬 1g を 2群 2名計 4名の健常成人男性ボランティアにそれぞれ投与した。得られた実際例のサンプルについて、確立した本法を用い、メロペネムおよびドリペネムの TDM を行った。メロペネムは 2名とも投与後 0.5 時間で最高血中濃度に到達し、最高血漿中濃度は 52.9 および 67.8 μ g/ml であった。一方、ドリペネムの最高血中濃度到達時間は 0.25 および 0.5 時間で、最高血漿中濃度がそれぞれ 62.1 および 98.6 μ g/ml であった。本法は、20 μ l という微量の血漿試料を少量の溶媒を用いて希釈・遠心を行ったのち、上清をそのまま HILIC-MS/MS に注入するだけの簡便な分析法であり、従来の報告に比べても迅速かつ高感度なカルバペネム系抗菌薬の分析が可能であった。しかも、定量性および再現性も良好で、実際例のサンプルを用いた高感度分析ができることが明らかとなった。本研究はヒト体液中カルバペネム系抗菌薬のハイスループット分析だけでなく、他の薬毒物への応用も期待され、臨床および法医学中毒学領域において有用であると考えられる。

*責任著者

キーワード：カルバペネム系抗菌薬，血漿，親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC)，UK-Amino カラム，タンデム質量分析 (MS/MS)

近年，高齢者や基礎疾患を有する免疫不全状態の患者が増加している。同時に，各種薬剤耐性菌が次々と出現し，難治化・重症化傾向を示す細菌感染症が増加している¹⁻³。それら難治性の重症細菌感染症の救命率を向上させるには適正な抗菌薬の使用が必須であり，臨床現場においては重要な課題となっている。現在，抗菌薬をより効果的かつ安全に使用するため，薬物動態 (pharmacokinetics: PK) と薬力学 (pharmacodynamics: PD) 理論に基づいた抗菌薬の適正使用が提唱されている⁴⁻⁷。PK-PD 理論を用いた抗菌薬の適正使用は有効性の向上，安全性の向上ならびに耐性菌の出現抑制などの臨床成果が報告されている^{8,9}。

カルバペネム系抗菌薬はβ-ラクタム系抗菌薬に通常存在する硫黄が炭素に置換された骨格をもつ抗菌薬で，細胞壁構築阻害作用があり殺菌的に働くこととされている¹⁰⁻¹⁴。その特徴は，殺菌性に優れ，かつ幅広い抗菌スペクトルを有し，敗血症等の重症あるいは難治性感染症の治療薬として広く使用されている¹⁰⁻¹⁴。さらに，カルバペネム系抗菌薬は時間依存的な抗菌効果を示す。PK-PD 理論の分類においては，薬物濃度が最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) 以上になるべく長い維持時間 (Time above MIC: % T > MIC) を要するタイプに属する¹²⁻¹⁵。そのため，抗菌性を高めるには頻回投与あるいは投与時間の延長による % T > MIC の延長が必要とされている。一方，副作用として投与によるアナフィラキシーショックや腎毒性などが問題となっている¹⁰⁻¹⁴。このような背景の中，カルバペネム系抗菌薬について人体試料から迅速かつ確実に同定・定量ならびに薬物血中濃度モニタリング (therapeutic drug monitoring: TDM) をすることは，救急救命ならびに効果的な抗菌薬の投与設定において極めて重要である¹⁴⁻¹⁶。

従来，ヒト体液中カルバペネム系抗菌薬の抽出では液-液抽出法あるいは固相抽出が用いられてきたが，複雑な操作ならびに多量の有機溶媒が必要であった。また，分析法としては逆相 (reversed phase: RP) カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー

(high-performance liquid chromatography: HPLC) が一般的であった。RP-HPLC では分離時間が長く (約 10 ~ 25 分以上)，また，UV 検出器による同定力および感度の低さも問題点として指摘されている¹⁷⁻¹⁹。

本研究では，ヒト血漿 (20 μl) から，簡便な液-液抽出法および高感度親水性相互作用液体クロマトグラフィー (Hydrophilic interaction liquid chromatography: HILIC)-タンデム質量分析 (MS/MS) 法を用いて，ビアペネム (biapenem)，パニペネム (panipenem)，イミペネム (imipenem)，ドリペネム (doripenem) およびメロペネム (meropenem) 5 種類のカルバペネム系抗菌薬について，分離時間 3.5 分の迅速・簡便かつ高感度なハイスルーブット HILIC-MS/MS 分析システムを構築したので報告する。

研究方法

1. 試薬

ビアペネムは Meiji Seika ファルマ (東京)，パニペネムは第一三共 (東京)，メロペネムは大日本住友製薬 (大阪)，ドリペネムは塩野義製薬 (大阪) および内部標準物質 (Internal Standard; IS) のピペラシリン (piperacillin) は大正富山 Pharmaceutical (東京) からそれぞれ供与された。イミペネムは Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。アセトニトリル，超純水およびその他の試薬は LC-MS 用または試薬特級に相当するものを使用した。

2. 標準液および品質管理 (QC) 試料の作製

5 種類のカルバペネム系抗菌薬および IS の各標準液は，いずれかの薬物を精密秤量したのち，超純水で溶解し，保存用標準液 (1 mg/ml) とした。さらに，この保存用標準液を超純水で希釈し，5 ~ 4,000 ng/10 μl の標準液を作製し，4℃で保管して 1 日以内に使用した。ドラッグフリーヒト血漿は薬物を服用していない健康成人 5 名から採取した血漿をプールして作製した。また，検量線用の薬物添加試料はドラッグフリーヒト血漿 20 μl 当たり 50 ~ 2,000 ng の濃度範囲で前記標準液を添加して調製

Table 1 Optimized MS/MS parameters

| Compound | MRM transitions (<i>m/z</i>) | DP (V) | EP (V) | CE (eV) | CXP (V) |
|-------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| Biapenem | 351 → 110 | 36 | 7.5 | 22 | 6 |
| Panipenem | 340 → 210 | 41 | 9 | 27 | 6 |
| Imipenem | 300 → 126 | 26 | 4.5 | 25 | 4 |
| Doripenem | 421 → 274 | 31 | 7.5 | 23 | 6 |
| Meropenem | 384 → 141 | 36 | 6.5 | 23 | 4 |
| Piperacillin (IS) | 518 → 143 | 56 | 9 | 20 | 4 |

DP: Declustering Potential, EP: Entrance Potential, CE: Collision Energy, CXP: Collision Exit Potential.

した。なお、検量線 (2.5 ~ 100 µg/ml) はピペラシリンを IS として使用し、内部標準法によって作成した。品質管理 (quality control: QC) 試料は検量線用の薬物添加試料と同様の方法で、ドラッグフリーヒト血漿 20 µl 中 50 ~ 2,000 ng の薬物濃度範囲で調製し、-80°C で保管して3か月以内に使用した。

3. 分析システムにアプライするサンプルの作製
薬物添加試験は、ドラッグフリーヒト血漿 20 µl に前記のように5種類のカルバペネム系抗菌薬および IS を添加したのち、10 mM 酢酸アンモニウム溶液 80 µl、アセトニトリル 400 µl を混和したうえで 19,600 × g で3分間遠心分離を行い、上清 10 µl を HILIC-MS/MS 分析システムにアプライした。

4. 分析装置および条件

本分析システムには Agilent 1100 HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, USA) と API2000 トリプル四重極型 MS/MS 装置 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) を on line で接続させたものを用いた。

HPLC 分析条件は、以下の設定で行った。分析カラム: Imtakt 社製の順相カラム UK-Amino (長さ 50 mm, 内径 3 mm, 粒径 3 µm), カラム温度: 40°C, 移動相: A が 10 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 6.8), B がアセトニトリル, リニアグラジエント (B%): 65% (0 min) → 65% (1 min) → 5% (2 min) → 5% (5.9 min) → 65% (6 min), カラム流量: 0.5 ml/min, 試料注入量: 10 µl。

質量分析はエレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization, ESI) 法の正イオンモード (positive ion mode) で行った。MS インターフェース各種設定はイオンソース電圧: 5200 V, イオンソース温度: 500°C, ネブライザーガス圧 (高純度空

気): 85 psi, ヒーターガス圧 (高純度空気): 30 psi, カーテンガス圧 (高純度窒素): 30 psi, フルスキャンモードにおける質量範囲: *m/z* 50-550, データ取り込み時間: 150 ms, peak 半値幅: 0.6-0.75, コリジョンガスは窒素ガスを使用した。多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring, MRM) トランジションは各薬物に対応した MS/MS パラメーターの最適値を設定 (Table 1) し、データ解析は Analyst 14.2 ソフトウェア (AB Sciex) を用いて行った。

5. 検量線の作成

内部標準法を用いた検量線の直線性は検量線用標準液 (2.5, 5.0, 10, 20, 50, 100 µg/ml) および IS (50 µg/ml) をドラッグフリーヒト血漿に添加して前処理を行い、上清を HILIC-MS/MS にて MRM 測定して検討した。既知濃度 (x) に対し、各薬物 / IS のピーク面積比 (y) を最小 2 乗法による直線回帰分析 (重み付け weight = 1) で算出し、検量線とした。検出限界はシグナル / ベースラインノイズ比 (S/N 比) 3 を検出限界 (limit of detection: LOD) とした。定量下限濃度 (lower limit of quantitation: LLOQ) および定量上限濃度 (upper limit of quantitation: ULOQ) は FDA の生体試料分析に関するガイドライン²⁰⁾ に従って、精度が 15% を超えず、真度が 80 ~ 120% の範囲内にある濃度とした。本研究では、ULOQ はメロペネムが 50 µg/ml, その他 4 薬物が 100 µg/ml をそれぞれ設定した。

6. 精度と真度

本分析法の日内変動・日間変動は、5種類のカルバペネム系抗菌薬について、それぞれ3種類の濃度の QC 試料を MRM 測定し、精度・真度により評価

した。日内変動は同一日に3種類の濃度のQC試料を6回測定し、日間変動は6日間にわたって1回ずつ測定して精度と真度を算出した。精度は相対標準偏差 (relative standard deviation: RSD) を用いて評価し、真度はドラッグフリーヒト血漿サンプル濃度 (理論値) に対する測定濃度の相対誤差 (relative error: RE %) が±15%以内を許容基準とした²⁰⁾。

7. 回収率およびマトリックス効果

回収率は、3種類の濃度のQC試料を抽出後、各6回分析し、そのMRMクロマトグラムのピーク面積 (A) と初期移動相に標準液を添加し、直接分析システムに注入して得られたピーク面積 (B) を比較して計算した ($A/B \times 100$)。マトリックス効果は上記Bとドラッグフリーヒト血漿を前処理 (希釈・遠心) したのち、それぞれ同じ濃度の標準液を添加して得られたピーク面積 (C) とを比較して算出した [($C/B - 1$) $\times 100$]。また、抽出効率を上記AとCを用いて算出した ($A/C \times 100$)。

8. 試料保存による安定性

5種類のカルバペネム系抗菌薬について、3種類の濃度のQC試料を調製後、それぞれ4℃下48時間、-80℃下4週間ならびに12週間保存後、MRM測定し、ヒト血漿中薬物安定性 (Stability) を評価した。

9. 投与試験

本研究で構築した分析システムを用い、実際に薬物を投与されたボランティアから採血した血漿サンプルについて薬物血中濃度のモニタリング (therapeutic drug monitoring: TDM) を行い、臨床応用の可能性を検討した。本投与試験は、昭和大学医学部医の倫理委員会の承認 (No.1250) を得たのちに実施した。抗菌薬などによるアレルギー歴がないことを確認した健康成人男性ボランティアに対し、試験の目的および危険性について書面を用いて十分説明し、自由意志による同意を得た。投与によるショック等に対する救急処置の準備も行ったうえで薬物投与試験を実施した。ドリペネム (Volunteer A: 30歳, 体重65kg; Volunteer B: 33歳, 体重68kg) またはメロペネム (Volunteer C: 36歳, 体重60kg; Volunteer D: 48歳, 体重72kg) について、それぞれ1gを生理食塩水100mlにて溶解し、2群各2名計4名のボランティアに30分間でそれぞれ点滴静注した。いずれのボランティ

アに対しても投与前にそれぞれメロペネムまたはドリペネムの皮内反応を実施し、陰性であることを確認したうえで各薬物の単回投与を行った。採血は投与前 (0), 投与後0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8時間に行った。採取した全血試料 (EDTA添加) は室温30分放置の後、1,800gで10分、遠心分離して得た血漿を分析まで-80℃で凍結保存した。

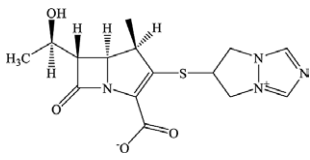
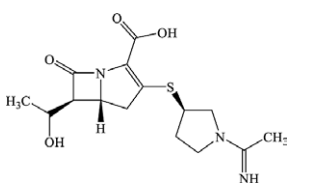
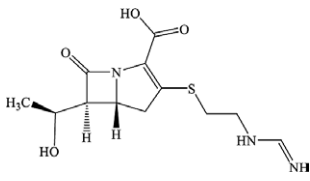
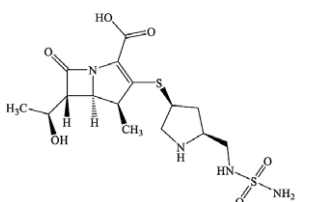
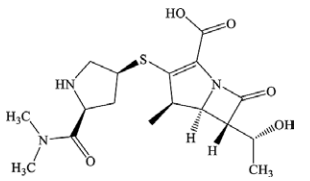
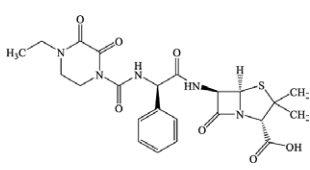
結 果

1. マススペクトルおよびMRMクロマトグラム
ポジティブESI法を用いたMS測定では、5種類の抗菌薬およびISはいずれの薬剤においてもプロトン化分子 $[M + H]^+$ である m/z 351 (ピアペネム), m/z 340 (パニペネム), m/z 300 (イミペネム), m/z 421 (ドリペネム), m/z 384 (メロペネム) および m/z 518 (IS) が感度良く検出された (Table 2)。また、MSスキャンで得られた上記プロトン化分子をプリカーサーイオンとしてMS/MS分析を行ったところ、ピアペネムが351, 265, 170, 110 (ベースピーク), パニペネムが340, 296, 210 (ベースピーク), イミペネムが300, 170, 141, 126 (ベースピーク), ドリペネムが421, 342, 298, 274 (ベースピーク), メロペネムが384, 254, 141 (ベースピーク) およびISが518, 359, 143 (ベースピーク) において、それぞれプロダクトイオンが観察された (Table 2)。HILIC-MS/MS法を用いた血漿中に存在する5種類のカルバペネム系抗菌薬の同時定量分析におけるMRMトランジションはピアペネムが m/z 351 \rightarrow 110, パニペネムが m/z 340 \rightarrow 210, イミペネムが m/z 300 \rightarrow 126, ドリペネムが m/z 421 \rightarrow 274, メロペネムが m/z 384 \rightarrow 141, ISが m/z 518 \rightarrow 143 にそれぞれ設定した (Table 1)。ドラッグフリーヒト血漿を用いた添加試験で得られたMRMクロマトグラムをFig. 1に示す。いずれの薬物も3.5分以内に感度良く検出され、バックグラウンドノイズがほとんどない良好なクロマトグラムが得られた。各成分の保持時間はそれぞれ、ピアペネムが1.00分, パニペネムが1.17分, イミペネムが1.31分, ISが1.81分, ドリペネムが2.32分およびメロペネムが2.83分であった。

2. 分析法バリデーション

内部標準法を用いた検量線は、ピアペネム, パニペネム, イミペネムおよびドリペネムの4薬物が

Table 2 Structures of analyte derivatives and their characteristic product ions

| Structure | Compound | MW* | MS | | MS/MS | | |
|---|-------------------|-----|------------------------------------|--------------------|--------------------------|--|--|
| | | | <i>m/z</i> (relative intensity, %) | Assignment | Precursor ion <i>m/z</i> | Product ion <i>m/z</i> (relative intensity, %) | Assignment |
|  | Biapenem | 350 | 351 (100) | [M+H] ⁺ | 351 | 351 (29) 265 (78) 170 (71) 110 (100) | [M+H] ⁺ [M-C ₄ H ₆ O ₂ +H] ⁺ [C ₇ H ₇ NO ₄ +H] ⁺ [C ₅ H ₇ N ₃ +H] ⁺ |
|  | Panipenem | 339 | 340 (100) | [M+H] ⁺ | 340 | 340 (64) 296 (40) 210 (100) 112 (34) | [M+H] ⁺ [M-C ₂ H ₅ O+2H] ⁺ [C ₉ H ₈ NO ₃ S] ⁺ [C ₆ H ₁₁ N ₂ +H] ⁺ |
|  | Imipenem | 299 | 300 (100) | [M+H] ⁺ | 300 | 300 (5) 170 (71) 141 (61) 126 (100) | [M+H] ⁺ [C ₇ H ₉ NO ₂ S-H] ⁺ [C ₇ H ₁₀ NO ₂ +H] ⁺ [C ₆ H ₇ NO ₂ +H] ⁺ |
|  | Doripenem | 420 | 421 (100) | [M+H] ⁺ | 421 | 421 (25) 342 (56) 298 (43) 274 (100) | [M+H] ⁺ [M-H ₂ NO ₂ S+2H] ⁺ [M-C ₂ H ₆ N ₂ O ₂ S] ⁺ [C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₂ S ₂ -H] ⁺ |
|  | Meropenem | 383 | 384 (100) | [M+H] ⁺ | 384 | 384 (20) 254 (70) 141 (100) | [M+H] ⁺ [M-C ₆ H ₁₂ N ₂ O-H] ⁺ [C ₇ H ₁₃ N ₂ O] ⁺ |
|  | Piperacillin (IS) | 517 | 518 (100) | [M+H] ⁺ | 518 | 518 (6) 160 (21) 143 (100) | [M+H] ⁺ [C ₆ H ₉ NO ₂ S+H] ⁺ [C ₆ H ₈ NOS+H] ⁺ |

* MW: molecular weight.

2.5 ~ 100 µg/ml, メロペネムが 2.5 ~ 50 µg/ml の範囲で、いずれも相関係数 0.9998 以上の良好な直線性を示した (Table 3). 検出限界は 1.25 µg/ml

で、定量下限濃度および高値定量限界値はそれぞれ 2.5 ~ 5.0 µg/ml および 100 µg/ml であった。

Table 4 は日内変動および日間変動の再現性を

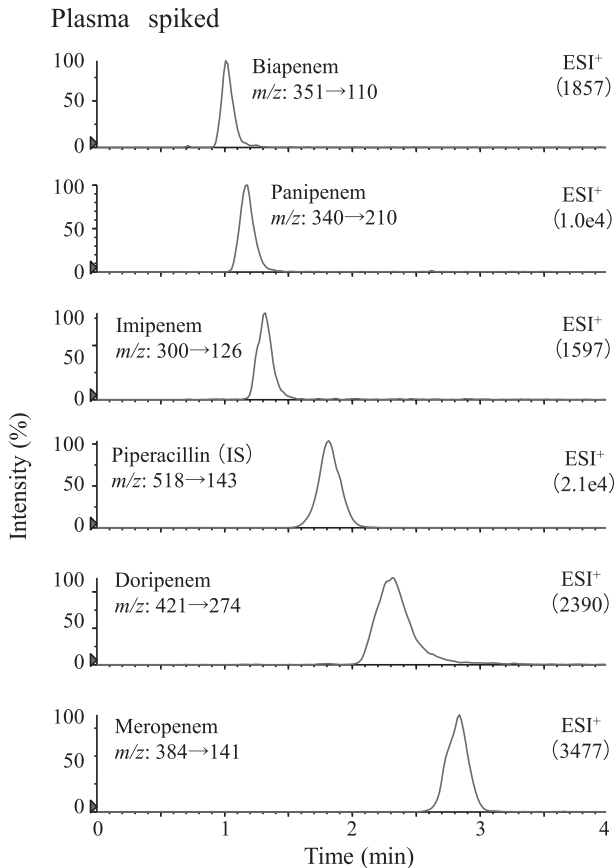


Fig. 1 MRM chromatograms for five carbapenems and IS in human plasma by HILIC-MS/MS. Drug-free plasma (20 μ l) were spiked with LLOQ concentrations of each drug and 1 μ g of IS, respectively.

示す。5種類のカルバペネム系抗菌薬の日内変動については精度が1.6～4.8%で、真度が92～106%であった。また、日間変動はそれぞれ精度が2.7～6.3%で、真度が88～104%であった。いずれも良好な再現性を示した。

本分析システムにおけるマトリックス効果、回収率および抽出効率を Table 5 に示す。回収率は24～85%で、抽出効率が72～98%であった。また、5種類のカルバペネム系抗菌薬いずれもイオンサプレッションの影響を受け感度の低下が見られ、マトリックス効果は-5～-65%であった。

ドラッグフリーヒト血漿サンプルにおける保存安定性は5種類のカルバペネム系抗菌薬は4°C下48時間保存が84～112%、-80°C下4週間および12週間保存がそれぞれ89～108%、91～114%であった (Table 6)。ドリペネムについて添加量5.0 μ g/mlの安定性が84%であった以外、いずれも \pm 15%以内と良好な再現性を示した。

3. 投与実験

今回確立した分析法を用いて、ドリペネムまたはメロペネム1gを20歳代から40歳代の健常成人男性ボランティア4名(2群2名)に点滴静注投与で得られた血漿サンプルについて、HILIC-MS/MS分析 (Fig. 2) および同分析によるTDMを行った (Fig. 3)。ドリペネム投与群(2名)は、単回投与後、それぞれ0.25時間(ボランティアA)または0.5時間(ボランティアB)で最高血中濃度に達し、血漿中薬物濃度が62.1 μ g/ml(ボランティアA)および98.6 μ g/ml(ボランティアB)であった。ボラン

Table 3 Regression equations, LODs, LLOQs and ULOQs

| Compound | $y = ax + b^*$ | | Correlation coefficient (γ) | Concentration range (μ g/ml) | LOD (μ g/ml) | LLOQ (μ g/ml) | ULOQ (μ g/ml) |
|-----------|----------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | $a \pm$ SD | $b \pm$ SD | | | | | |
| Biapenem | 0.0010 \pm 0.00002 | 0.0036 \pm 0.00523 | 0.9998 | 2.5 - 100 | 1.25 | 2.5 | 100 |
| Panipenem | 0.0036 \pm 0.00011 | -0.0553 \pm 0.00835 | 0.9999 | 5.0 - 100 | 1.25 | 5.0 | 100 |
| Imipenem | 0.0011 \pm 0.00012 | -0.0028 \pm 0.00600 | 1.0000 | 2.5 - 100 | 1.25 | 2.5 | 100 |
| Doripenem | 0.0017 \pm 0.00012 | 0.0183 \pm 0.01344 | 0.9998 | 5.0 - 100 | 1.25 | 5.0 | 100 |
| Meropenem | 0.0031 \pm 0.00022 | 0.0104 \pm 0.01937 | 0.9998 | 2.5 - 50 | 1.25 | 2.5 | 50 |

* Slope (a) and intercept (b) are expressed as mean values \pm SD with six different calibrators (2.5, 5.0, 10, 20, 50 and 100 μ g/ml), in duplicate, on 6 consecutive days. Calibration curves were constructed by plotting peak area ratios of a test compound to an internal standard against drug concentrations.

Table 4 Precision and accuracy for carbapenems in QC samples

| Compound | Concentration added (μg/ml) | Intraday (n = 6) | | | Interday (n = 6) | | |
|-----------|-----------------------------|--------------------------------|---------------|--------------|--------------------------------|---------------|--------------|
| | | Concentration detected (μg/ml) | Precision (%) | Accuracy (%) | Concentration detected (μg/ml) | Precision (%) | Accuracy (%) |
| Biapenem | 2.5 | 2.3 ± 0.11* | 4.8 | 92 | 2.4 ± 0.15* | 6.3 | 96 |
| | 50 | 52.9 ± 2.81 | 5.3 | 106 | 51.0 ± 1.61 | 3.2 | 102 |
| | 100 | 101.1 ± 1.92 | 1.9 | 101 | 102.3 ± 3.77 | 3.7 | 102 |
| Panipenem | 5.0 | 5.1 ± 0.09 | 1.8 | 102 | 5.2 ± 0.23 | 4.4 | 104 |
| | 50 | 49.1 ± 2.08 | 4.2 | 98 | 51.9 ± 3.21 | 6.2 | 104 |
| | 100 | 98.8 ± 1.62 | 1.6 | 99 | 101.6 ± 3.13 | 3.1 | 102 |
| Imipenem | 2.5 | 2.6 ± 0.10 | 3.8 | 104 | 2.4 ± 0.14 | 5.8 | 96 |
| | 50 | 49.7 ± 0.79 | 1.6 | 99 | 48.1 ± 1.60 | 3.3 | 96 |
| | 100 | 95.9 ± 2.31 | 2.4 | 96 | 94.5 ± 2.95 | 3.1 | 95 |
| Doripenem | 5.0 | 4.3 ± 0.12 | 2.8 | 86 | 4.4 ± 0.17 | 3.9 | 88 |
| | 50 | 48.4 ± 0.92 | 1.9 | 97 | 49.9 ± 1.46 | 2.9 | 100 |
| | 100 | 95.6 ± 1.70 | 1.8 | 96 | 98.7 ± 2.71 | 2.7 | 99 |
| Meropenem | 2.5 | 2.3 ± 0.07 | 3.0 | 92 | 2.3 ± 0.09 | 3.9 | 92 |
| | 5.0 | 4.7 ± 0.13 | 2.8 | 94 | 4.8 ± 0.15 | 3.1 | 96 |
| | 50 | 47.1 ± 2.30 | 4.9 | 94 | 48.9 ± 1.77 | 3.6 | 98 |

* The values are means ± SD.

Table 5 Matrix effect, recovery and extraction efficiency

| Compound | Spike (μg/ml) | Matrix effect (%) | Recovery (%) (mean ± SD) | Extraction efficiency (%) (mean ± SD) |
|-----------|---------------|-------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Biapenem | 2.5 | -64.6* | 25.5 ± 0.9 | 72.0 ± 2.6 |
| | 50 | -46.3 | 38.8 ± 0.7 | 72.4 ± 1.2 |
| | 100 | -43.1 | 24.0 ± 0.5 | 73.8 ± 0.9 |
| Panipenem | 5.0 | -54.9 | 44.4 ± 1.4 | 98.4 ± 3.2 |
| | 50 | -31.6 | 62.6 ± 1.6 | 91.5 ± 2.3 |
| | 100 | -27.8 | 68.2 ± 1.1 | 94.4 ± 1.6 |
| Imipenem | 2.5 | -48.8 | 38.0 ± 1.3 | 74.3 ± 2.6 |
| | 50 | -25.5 | 57.7 ± 1.3 | 77.4 ± 1.7 |
| | 100 | -21.2 | 62.6 ± 1.6 | 79.4 ± 2.0 |
| Doripenem | 5.0 | -20.9 | 63.3 ± 1.9 | 80.0 ± 2.4 |
| | 50 | -13.5 | 70.8 ± 0.8 | 81.8 ± 1.0 |
| | 100 | -15.5 | 71.8 ± 2.8 | 84.9 ± 0.9 |
| Meropenem | 2.5 | -10.6 | 76.4 ± 1.8 | 85.5 ± 2.0 |
| | 5.0 | -6.7 | 81.7 ± 2.2 | 87.6 ± 2.4 |
| | 50 | -4.9 | 84.8 ± 3.8 | 89.2 ± 4.0 |

* Each value represents the mean of 6 experiments. SD: standard deviation. Negative values account for signal suppression.

Table 6 Stability in QC samples at 4°C and -80°C

| Compound | Concentration added (µg/ml) | Stability (%)* | | |
|-----------|--------------------------------|----------------|--------------------|---------------------|
| | | 4°C (48 h) | -80°C (4 weeks) | -80°C (12 weeks) |
| Biapenem | 2.5 | 97 ± 14.4** | 99 ± 2.2 | 100 ± 2.6 |
| | 50 | 101 ± 5.7 | 106 ± 2.5 | 93 ± 1.0 |
| | 100 | 103 ± 3.5 | 102 ± 4.5 | 94 ± 6.7 |
| Panipenem | 5.0 | 112 ± 4.3 | 108 ± 3.3 | 105 ± 9.2 |
| | 50 | 89 ± 4.4 | 99 ± 3.2 | 102 ± 1.2 |
| | 100 | 95 ± 2.7 | 101 ± 1.4 | 92 ± 5.8 |
| Imipenem | 2.5 | 105 ± 7.5 | 98 ± 2.0 | 105 ± 2.4 |
| | 50 | 106 ± 4.0 | 106 ± 1.3 | 103 ± 2.0 |
| | 100 | 100 ± 3.0 | 99 ± 2.1 | 96 ± 3.4 |
| Doripenem | 5.0 | 84 ± 8.8 | 89 ± 9.2 | 91 ± 1.5 |
| | 50 | 99 ± 5.0 | 98 ± 2.2 | 114 ± 3.8 |
| | 100 | 103 ± 5.7 | 98 ± 3.6 | 112 ± 1.9 |
| Meropenem | 2.5 | 109 ± 8.0 | 99 ± 6.9 | 97 ± 3.1 |
| | 5.0 | 106 ± 7.9 | 100 ± 5.8 | 104 ± 2.0 |
| | 50 | 103 ± 2.5 | 103 ± 5.1 | 103 ± 5.6 |

* The values obtained from QC samples freshly prepared and analyzed immediately were set at 100%.

** Each value is mean ± SD (n = 6).

ティア Aの方が最高血中濃度が低く、早く血中濃度が減少していった。また、メロペネム投与群(2名)については、単回投与後いずれも0.5時間で最高血中濃度に達し、血漿中薬物濃度が52.9(ボランティアC)および67.8 µg/ml(ボランティアD)であった。2人のボランティアで最高血中濃度こそ若干異なるものの、血中濃度の推移は2人とも、ほぼ同様であった(Fig. 3)。

考 察

本研究は、HILIC-MS/MS法を用い、ヒト血漿中カルバペネム系抗菌薬の簡便かつ高感度定性・定量分析法の構築を行い、投与試験を実施した。さらに、血中抗菌薬のTDMにより、カルバペネム系抗菌薬のPK-PD解析への応用について検討を行った。PKとPDを組み合わせて、最適な用法・用量の設定に基づく投薬により、抗菌薬の臨床効果が最大限得られ、難治性重症感染症の救命率向上に寄与すると考えられる。

これまで、人体試料からのカルバペネム系抗菌薬

の分析法はHPLC法が主流であり、100～500 µlと多量の血漿が必要であった¹⁷⁻¹⁹⁾。カルバペネムと同様β-ラクタム環を有するセフェム系抗菌薬の一種セファクロル(cefaclor) 250 mg, 1錠を服用した患者2名の血漿からHPLC/MSによりSatoらが世界で初めてセファクロルを同定かつ半定量に成功したが、500 µlの血漿を使い、前処理に固相抽出を行っている²¹⁾。同じグループが同じHPLC/MSシステムを用い、セフェム系抗菌薬の1つセファゾリン(cefazolin) 1 gを注射された90分後にアナフィラキシーショックで死亡した死体血の血漿500 µlから世界で初めてセファゾリンを同定かつ半定量に成功し、セファゾリン血漿中濃度が70 µg/mlであったことを報告している²²⁾。本研究で使用した血漿は、わずか20 µlであり、HILIC-MS/MS法によるヒト血漿中カルバペネム系抗菌薬の高感度分析は本研究が最初の報告である。また、セファゾリン血漿中濃度70 µg/mlという数字²²⁾は本研究のドリベネムまたはメロペネムの最高血漿中濃度とよく一致しており、同じβ-ラクタム環を有する抗菌薬の

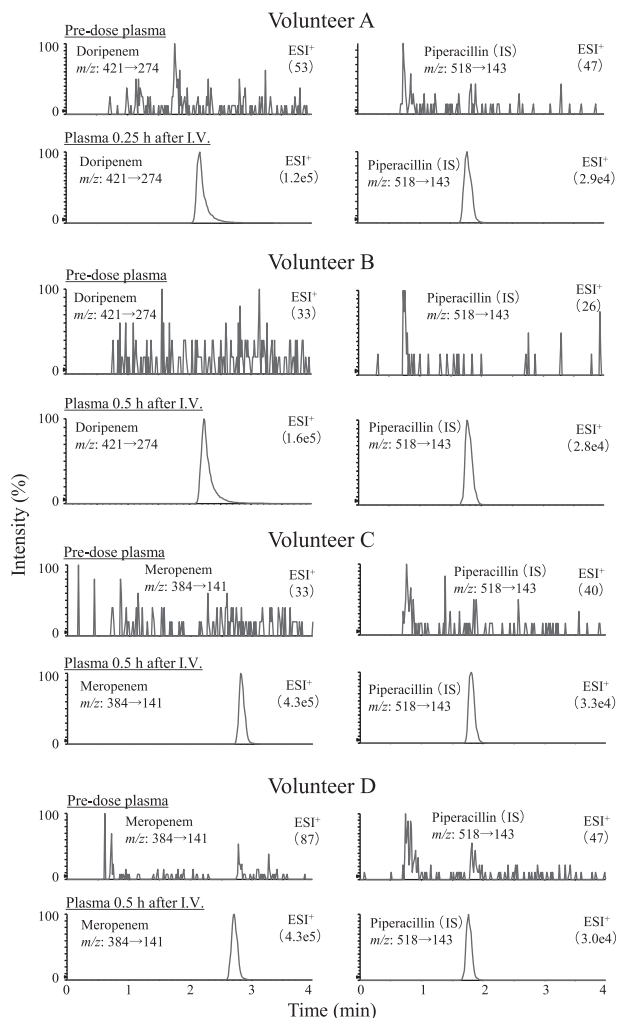


Fig. 2 MRM chromatograms obtained by the present method from the plasma of four healthy male volunteers 0.25 or 0.5 h after intravenous administration of a single 1-g dose of doripenem or meropenem. The amount of piperacillin (1 µg) was spiked as the IS.

最高血漿中濃度として本研究の結果は信頼度が高いといえる。

通常、人体試料からの薬物分析法の開発においては、事前に検討すべき分析法のプレスタディーバリデーションおよび実測定中に確認すべきインスタディーバリデーションという2種類の分析法バリデーション評価が要求される²³⁻²⁵⁾。特に、インスタディーバリデーションでは血漿などの実試料を用いての実測定における分析法についての性能検証が重要である。それは、ヒト血漿においてはマトリックス中に個体間変動の要因となる未知の成分が含まれ

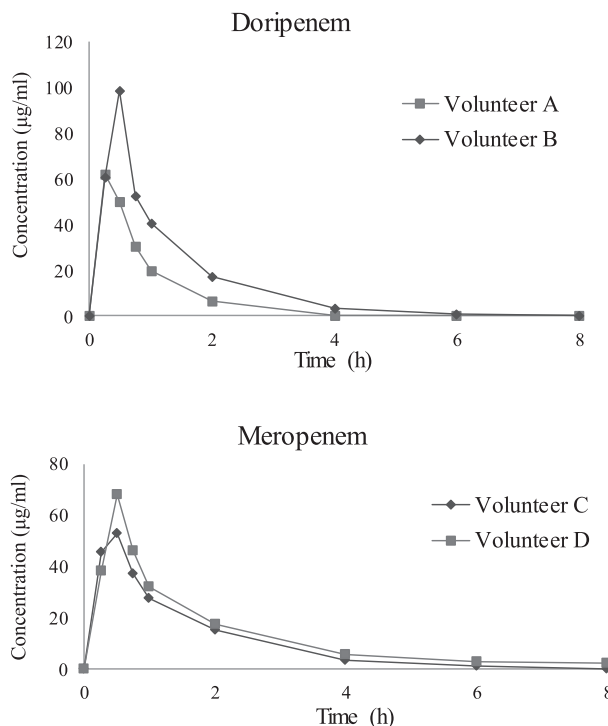


Fig. 3 Plasma concentrations of doripenem and meropenem versus time after intravenous administration of a single 1-g dose of doripenem or meropenem in four healthy male volunteers.

ることがあり、事前に複数の個体を用いて選択性を検討する必要がある。本研究では健康人ドラッグフリーヒト血漿5人分をプール血漿として調製し、添加実験に用いて分析法バリデーションの評価を行った。本研究で確立したHILIC-MS/MS分析法では微量容量であるヒト血漿20 µlにアセトニトリル20倍量(400 µl)で除タンパクを行い、遠心分離した上清を直接HILIC-MS/MSに注入する簡便かつ高感度な分析が可能であった。MRM分析においては、ピアペネムが最大65%、パニペネムが最大55%、イミペネムが最大49%のイオンサプレッションを受け、回収率も24~85%と必ずしも高くはなかった。しかし、日内変動および日間変動の再現性はいずれも良好で(Table 4)、2.5 µg/mlという低濃度まで直線性が確認されているので(Table 3)、HILIC-MS/MS測定に支障がなく、高感度なTDM分析が可能であった(Fig. 3)。

また、MS/MS定量分析に用いられるISについては、体内に存在せず、かつ安定同位体で標識された化合物は全体的な物理化学的特性がほぼ同一であ

るため、ISとしては理想的である^{26,27)}。しかし、カルバペネム系抗菌薬の安定同位体が入手困難のため、本研究では化学構造が類似しており、かつ同時投与しないピペラシリン (piperacillin) をISとして選択した。添加実験では良好な直線性ならびに低いLODおよび低いLLOQが得られ (Table 3)、さらに、投与実験で得られた実際例の血漿サンプルの定量分析も可能であった (Fig. 2)。また、ドリペネム投与試験によるTDMを行ったところ、抗菌薬投与後、最高血中濃度の到達時間は0.25 (ボランテアA) または0.5時間 (ボランテアB) で、ボランテアAの方が最高血中濃度が低く、早く血中濃度が減少していき個体差が認められた。PK-PD理論に照らして血中抗菌薬% T > MICを延長・維持するには、患者ごとに最適な用法・用量投薬設定が必要であることが示唆された。

カルバペネム系抗菌薬はカルバペネム骨格を有し、細胞壁構築阻害作用があり、殺菌的に働くと考えられている¹⁰⁻¹⁴⁾。従来、ヒト体液中カルバペネム系抗菌薬のHPLC分析法ではRPカラムが用いられている。液-液抽出や固相抽出などの煩雑な前処理が必要なうえ、保持時間も長く、迅速分析は困難であることが欠点として指摘されている¹⁷⁻¹⁹⁾。ちなみに、Satoらのセファクロル、セファゾリンのHPLC/MS分析ではRPカラムを使用しており、20~25分の分析時間が必要であった^{21,22)}。

順相クロマトグラフィーの一種であるHILICは、水とアセトニトリルなど有機溶媒の混合移動相、さらに高極性固定相 (シリカ) を併せた相互分配作用による分離モードである。古典的な順相クロマトグラフィーに必須な非水溶性有機溶媒を必要としない新しい分析方法として注目されている^{28,29)}。移動相はアセトニトリルのような水と混ざりうる溶媒による水系が使用され、高極性化合物の保持分離も優れている。さらに、HILICモードは有機溶媒比がリッチであるため、イオン効率も向上し、高感度質量分析が期待できる。本実験で用いたImtakt社製アミノ系シリカカラムであるUK-Aminoカラムは親水性の相互分配作用とイオン交換相互作用を両方有し、従来の順相カラムには不可能な水系移動相100%による洗浄が可能であるため、バックグラウンドノイズによる影響の少ない質量分析が可能なうえ、耐久性にも優れている³⁰⁾。本分析に用いたUK-

Aminoカラムは、アセトニトリル (移動相B%) によるリニアグラジエント (65→5%) を1分間行った後、10mM酢酸アンモニウム溶液 (移動相A) 95%で分離かつ洗浄を行った。その結果、バックグラウンドノイズがほとんどないきれいなMRMクロマトグラムが得られるとともに約300回分析可能なカラム寿命が得られた。それによって、再現性ならびに安定性が優れた迅速かつ高感度な質量分析が可能となった。

本法は20μlという微量の血漿サンプルを少量の溶媒を用いて希釈・遠心を行ったのち、上清をそのままHILIC-MS/MSにダイレクトに注入するだけの簡便な分析法であり、従来の報告に比べ、迅速かつ高感度なカルバペネム系抗菌薬についての定性かつ定量分析が可能であった。FDA指針²⁰⁾を参照した分析バリデーション検証において、良好な定量性および回収率、低いLODおよび低いLLOQと高い再現性が得られた。さらに、実際例の血漿試料の分析に応用したところ、簡便・迅速・高感度分析ができることが明らかとなった。今後、他のカルバペネム系抗菌薬についても、定量性、再現性を検討すると共に投与試験を行い、血漿中薬物の定性、定量ならびにTDMにより、カルバペネム系抗菌薬について最適な用法・用量設定に寄与して臨床重症感染症の救命率の向上に貢献していきたいと考えている。

本研究で確立した分析システムは、ヒト血漿中カルバペネム系抗菌薬のハイスループット分析だけでなく、他の薬毒物への応用も期待でき、臨床および法医学領域において有用であることが示唆された。

謝辞 本研究を行うに当たり、カルバペネム系抗菌薬またはピペラシリンの原末を提供していただいたMeiji Seikaファルマ株式会社、第一三共株式会社、大日本住友製薬株式会社、塩野義製薬株式会社、大正富山株式会社の各位に深謝いたします。

利益相反

本研究では上記のように抗菌薬の原末を供与されている以外、本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 石川浩平, 井上貫昭, 角 由佳, ほか, 電撃性紫斑病に対麻痺を合併した肺炎球菌感染症の1例. 日救急医学会誌, 2015;26:565-570.

- 2) 高橋 学, 柴田繁啓, 菅 重典, ほか. 糖尿病を合併した重症熱傷患者に対して人工臓臓を用いて厳密な血糖管理を行った1例. 日集中医誌. 2015;22:540-543.
- 3) 堀内 篤, 長谷川廣文, 正岡 徹, ほか. 造血管疾患に伴う細菌感染症の実態 10年間の推移. 感染症誌. 1990;64:299-309.
- 4) 日本化学療法学会抗菌薬 TDM ガイドライン作成委員会, 日本 TDM 学会 TDM ガイドライン策定委員会抗菌薬領域. 抗菌薬 TDM ガイドライン. 日化療会誌. 2012;60:393-445.
- 5) 木村利美, 日本 TDM 学会 TDM ガイドライン策定委員会抗菌薬領域. 抗菌薬 TDM ガイドライン活用のポイント. 日病薬師会誌. 2013;49:621-626.
- 6) 梅木健二, 門田淳一. 呼吸器系の外来治療総論 抗菌薬 何をどう使うか. *Medicina*. 2015;52:1510-1513.
- 7) 小笠原康雄, 大野公一, 播野俊江, ほか. 病棟薬剤師による「抗菌薬 PK/PD チェックシート」を活用した抗菌薬適正使用への取り組み. 環境感染誌. 2008;23:117-123.
- 8) 松田公子, 宮本 篤, 伊藤善規, ほか. 医療の質向上のためのチーム医療への薬剤師の関与とその成果に関する論文実例集 TDM 領域. 日病薬師誌. 2011;47:1373-1383.
- 9) 寺本信嗣, 吉田和史. 高齢者の肺炎の実態と内科的治療. 総合リハ. 2015;43:95-98.
- 10) Petri WA Jr. Penicillins, cephalosporins, and other β -lactam antibiotics, Carbapenems. In *Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, eds. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed.* New York: Mcgraw-Hill; 2006. pp1150-1151.
- 11) 砂川 洵, 佐々木 章. カルバペネム化学の最近の進歩. 有機化学協会誌. 1996;54:761-771.
- 12) 土田正義, 熊崎 匠, 下田直威, ほか. 泌尿器科領域における panipenem/betamipron の臨床的検討. 日化療会誌. 1991;39(Suppl.3):762-764.
- 13) 遠藤 紘, 朝野 晃, 高橋克幸, ほか. 産婦人科感染症に対する biapenem の臨床的検討. 日化療会誌. 1994;42(Suppl.4):852-856.
- 14) 三嶋廣繁, 山岸由佳, 田中香お里, ほか. カルバペネム薬の目標 T > MIC 値に関する臨床的検討. *Jpn J Antibiot*. 2008;61:73-81.
- 15) 森田邦彦, 島田雅彦, 池谷 修, ほか. カルバペネム系抗生物質・メロペネムの血中濃度と臨床効果との関係解析. TMD 研究. 2003;20:189-190.
- 16) 谷川原祐介. 感染症および悪性腫瘍治療ガイドラインと臨床薬理学 抗菌薬の適正使用 PK/PD と TDM. 臨薬理. 2004;35:213-217.
- 17) Zhang J, Musson DG, Birk KL, *et al.* Direct-injection HPLC assay for the determination of a new carbapenem antibiotic in human plasma and urine. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;27:755-770.
- 18) Legrand T, Chhun S, Rey E, *et al.* Simultaneous determination of three carbapenem antibiotics in plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;875:551-556.
- 19) Denooz R, Charlier C. Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;864:161-167.
- 20) U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry, bioanalytical method validation. May 2001. (accessed 2016 Jan 23) <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
- 21) Sato K, Kobayashi K, Moor CM, *et al.* Semi-quantitative analysis of cefaclor in human serum by capillary high performance liquid chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry. *Forensic Sci Int*. 1993;59:71-77.
- 22) Kobayashi K, Sato K, Mizuno Y, *et al.* Capillary high-performance liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry of 24 cephem antibiotics. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;677:275-290.
- 23) Findlay JW, Smith WC, Lee JW, *et al.* Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;21:1249-1273.
- 24) DeSilva B, Smith W, Weiner R, *et al.* Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm Res*. 2003;20:1885-1900.
- 25) 富樫一天. 生体試料中薬物濃度分析 (バイオアナリシス) の歴史と国内情勢. *Chromatography*. 2012;33:107-112.
- 26) Thienpont LM, Van Uytfganghe K, Blincko S, *et al.* State-of-the-art of serum testosterone measurement by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2008;54:1290-1297.
- 27) Wang S, Cyronak M, Yang E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study

- on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43:701-707.
- 28) Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr.* 1990;499:177-196.
- 29) Nguyen HP, Schug KA. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: fundamentals and applications. *J Sep Sci.* 2008;31:1465-1480.
- 30) Nemoto T, Lee XP, Kumazawa T, *et al.* High-throughput determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by HILIC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;88:71-80.

HIGH THROUGHPUT ANALYSIS OF CARBAPENEMS IN HUMAN PLASMA BY HILIC-MS/MS

Rei KATO^{1,2)}, Xiao-Pen LEE¹⁾, Takeshi KUMAZAWA¹⁾,
Masaya FUJISHIRO¹⁾, Junichi SATO¹⁾, Toshiko SAWAGUCHI³⁾,
Akemi MARUMO¹⁾, Mikako UESHIMA¹⁾, Takeshi AOKI²⁾,
Masahiro MURAKAMI²⁾, Yohei SASAKI¹⁾, Takuro FURUYA¹⁾
and Keizo SATO¹⁾

¹⁾ Department of Legal Medicine, Showa University School of Medicine

²⁾ Department of Surgery, Division of General and Gastroenterological Surgery,
Showa University School of Medicine

³⁾ National Institute of Public Health

Abstract — Carbapenems are β -lactam antimicrobial agents with an exceptionally broad spectrum of activity, which inhibit bacterial cell wall synthesis by binding to penicillin binding proteins. The carbapenem drugs are time-dependent antibiotics, which implies that their activity is primarily related to the time during which their plasma concentration remains above the minimal inhibition concentration (MIC) for the offending organism. The regimen should be based on PK-PD theory and should be useful in clinical practice including against anaerobic infections. In the present study, a new, sensitive, specific, and rapid method was developed and established for the analysis of five carbapenems (biapenem, panipenem, imipenem, doripenem and meropenem) in human plasma samples by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-tandem mass spectrometry (MS/MS). A small volume of plasma (20 μ l) spiked with compounds was diluted with 80 μ l of 10-mM ammonium acetate followed by a simple protein precipitation with 400 μ l of acetonitrile. After centrifugation, the clear supernatant extract was directly injected into the HILIC-MS/MS, without any solvent evaporation or reconstitution steps. The chromatographic separation of the carbapenems was achieved on a Unison UK-Amino HILIC column (50 mm \times 3 mm i.d., particle size 3 μ m) with a linear gradient elution system composed of 10 mM ammonium acetate (pH 6.8) and acetonitrile at a flow rate of 0.5 ml/min. The mass spectra obtained by HILIC-MS showed base peak ions due to $[M + H]^+$ for biapenem, panipenem, imipenem, doripenem, meropenem and piperacillin (internal standard, IS). Recoveries of these five carbapenems in plasma were 24–85% and the lower limits of quantitation were 2.5–5.0 μ g/ml. The intra- and interday coefficients of variation for all drugs in plasma was less than 6.3%. Furthermore, the present study provided a short analysis time (3.5 min) and high sensitivity with lower LLOQ concentrations. The method was successfully applied to actual analyses of real plasma samples, derived after intravenous administration of doripenem or meropenem, which followed the present method.

Key words: carbapenem, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), UK-Amino column, tandem mass spectrometry (MS/MS), human plasma

〔受付：2月1日，受理：2月5日，2016〕