

A Simple and Rapid Determination of Voriconazole in Human Plasma by HPLC with Fluorescence Detection and Its Application to a Patient

Kentaro OGATA¹⁾, Aiko NAGASE²⁾, Taichi MATSUMOTO²⁾,
Shuuji HARA²⁾, Masanobu UCHIYAMA³⁾, Shiro JIMI⁴⁾,
Yasushi TAKAMATSU⁵⁾

¹⁾ *Department of Faculty of Practical Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University*

²⁾ *Department of Faculty of Drug Informatics, Fukuoka University*

³⁾ *Department of Pharmacy, Fukuoka University Hospital*

⁴⁾ *Central Laboratory for Pathology and Morphology, Faculty of Medicine, Fukuoka University*

⁵⁾ *Department of Division of Medical Oncology, Hematology and Infectious Disease Faculty of Medicine, Fukuoka University*

Abstract

Voriconazole has been approved for treatment of invasive fungal diseases, especially aspergillosis. Plasma voriconazole level is considerably variable in patients. In a previous study, monitoring of the plasma voriconazole level is important for assessments of efficacy and adverse drug reactions such as liver dysfunction. A simple and highly sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection was developed for the determination of voriconazole in human plasma. Voriconazole and naproxen as an internal standard were extracted from plasma with ethyl acetate. They were separated by Capcell Pak C18 MG column with a mixture of acetonitrile-25mM phosphate buffer (pH 3.5) (42: 58, v/v) as a mobile phase, and were then detected with a spectrofluorometrically at 372 nm with excitation at 254 nm. This method was used to determine the plasma voriconazole concentration in a patient on voriconazole therapy.

Key words: Voriconazole, High performance liquid chromatography, Fluorencence detection, Plasma concentration

HPLC・蛍光検出による簡便かつ迅速なボリコナゾール 血中濃度測定法とその患者適用

緒方憲太郎¹⁾ 永瀬 愛子²⁾ 松本 太一²⁾
原 周司²⁾ 内山 将伸³⁾ 自見 至郎⁴⁾
高松 泰⁵⁾

- ¹⁾ 福岡大学薬学部実務薬剤学
²⁾ 福岡大学薬学部医薬品情報学
³⁾ 福岡大学病院薬剤部
⁴⁾ 福岡大学医学部病態構造系総研
⁵⁾ 福岡大学医学部腫瘍・血液・感染症内科学

要旨：ボリコナゾールは侵襲性アスペルギルス症など難治性真菌感染症の治療薬として使用されているが、重篤な副作用として肝障害を引き起こす。よって、ボリコナゾールを有効かつ安全に使用するために薬物血中濃度測定モニタリング (therapeutic drug monitoring ;TDM) を行うことが推奨されている。今回、我々は簡便で迅速な血漿中ボリコナゾールの測定法を開発し、検証したので報告する。ボリコナゾールおよびナプロキセン (internal standard substance ; IS) は血漿中より酢酸エチルのみで抽出可能であり、カラムはCapcell Pak C18 MG column, 移動層はアセトニトリル：25mM リン酸塩緩衝液 (pH 3.5) = 42 : 58 (v/v) を用いた。日内および日間変動は変動係数それぞれ 10.5%, 11.0% 以下であった。本測定法は簡便で迅速に血漿中ボリコナゾール濃度の測定が可能であり、日常分析法として極めて有用であると考えられる。

キーワード：ボリコナゾール, HPLC, 蛍光検出, 血漿中濃度

はじめに

ボリコナゾール {(2R, 3S)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(5-fluoropyrimidin-4-yl)-1-(1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol; VRCZ, 図 1 (A)} は真菌細胞において、膜成分のエルゴステロール生合成を阻害することにより、抗真菌作用を示す。本邦では 2005 年 4 月に承認され、侵襲性アスペルギルス症など重症又は難治性真菌感染症の治療薬として使用されている。VRCZ は主に肝臓の CYP2C19 及び CYP2C9 で代謝されるが、CYP2C19 は白色人種に比べ、アジア人に poor metabolizer が多い¹⁾。特に、幼児においては患者間の血漿中濃度の変動が大きい²⁾。また、成人では非線形を呈するので²⁾、VRCZ 療法を効果的に施行するには血中濃度モニタリング (TDM) が必要である³⁾。

VRCZ の測定法として、HPLC-UV⁴⁻⁷⁾ 及び HPLC-MS/MS 法⁸⁻¹⁰⁾ 等が開発されている。HPLC-MS/MS 法は高感度で選択性に優れているが、装置が高価な上に維持費も必要なので日常分析法には適さない。HPLC-UV 法は感度及び選択性に乏しく、多量の試料や固相抽出等の特別な前処理を必要とする。HPLC-蛍光検出法¹¹⁾は、

これらの点で優れている。しかし、Michael 等の方法は、使用している内部標準物質が市販されておらず、一般に利用することができない。そこで、市販されている内部標準物質 (ナプロキセン) を用いた血中 VRCZ の簡便な蛍光検出・HPLC 法を開発し、患者の血中 VRCZ 濃度測定を行った。

方 法

1. 試薬

VRCZ および (S) - (-) ナプロキセン (図 1 (A) (B)) は和光純薬工業 (株) より購入した。アセトニトリル、酢酸エチルおよび精製水は HPLC 用を用いた。その他の試薬は市販特級品を使用した。

2. 標準溶液および内部標準物質の調製

VRCZ 標準溶液は VRCZ 8.00mg をアセトニトリルに溶解して 10mL とした。同様に内部標準物質 (IS) として (S) - (-) ナプロキセン 7.62mg をアセトニトリルに溶解して 10mL とした。これらの溶液はそれぞれ 4℃ で保存し少なくとも 2 カ月間は安定であった。

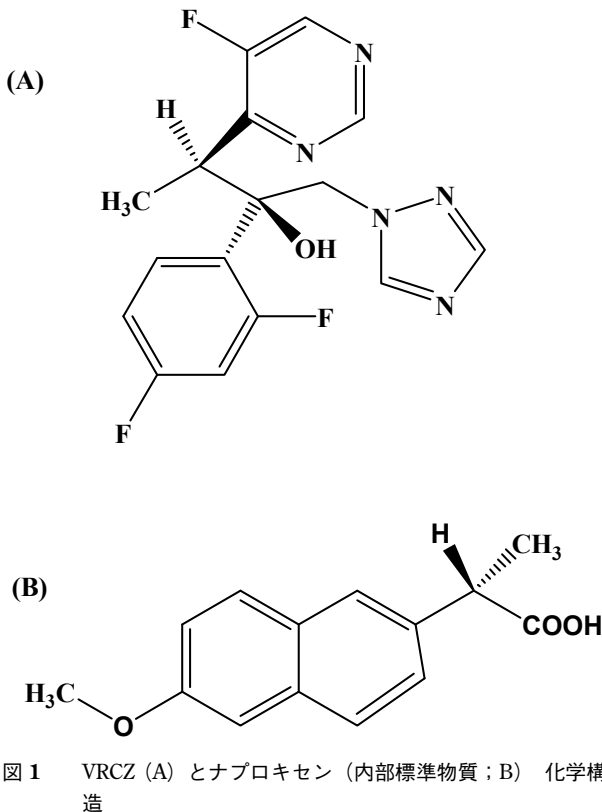


図1 VRCZ (A) とナプロキセン (内部標準物質; B) 化学構造

3. 検量線用スタンダードの調製

検量線用スタンダードは VRCZ 標準溶液 (800 μ g/mL) をアセトニトリルで希釈し、ボランティア健常人の血漿中濃度で 0.05, 0.20, 0.80, 3.00, 7.00 μ g/mL となるよう調製した。

4. 測定機器および測定条件

HPLC 分析装置には日立 L-7120 ポンプおよび日立 L-7485 蛍光検出器を用いた。分析カラムには、ガードカートリッジ (KJO-4282, Phenomenex) を装着した Capcell Pak C18 MG column (5 μ m, 4.6mm \times 150mm, Shiseido) を室温 (15-20 $^{\circ}$ C) で使用した。移動相はアセトニトリル: 25mM リン酸塩緩衝液 (pH 3.5) = 42:58 (v/v) を 0.6mL/min で送液して分析を行った。HPLC 注入量は 15 μ L で、372 nm (励起波長: 254nm) で検出した。VRCZ 濃度は IS に対するピーク面積 (C-R 6 A Chromatopac Integrator, Shimadzu) 比から求めた。

5. 試料調製

2mL のアシストチューブに、血漿試料 200 μ L を分取し、50 μ L の IS 溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液 200 μ L および 600 μ L の酢酸エチルを順次添加し、Vortex-mixer で約 1 分間攪拌する。遠心分離 (5000 \times g, 10 分) 後、酢酸エチル層を 1.5mL の遠心用チューブに分取し、50 $^{\circ}$ C で

減圧乾固する。残渣をアセトニトリル 100 μ L に再溶解し、15 μ L を HPLC に注入した。

健常人血漿は当研究室員からボランティアとして提供を受けた。

6. 精度および真度

日内再現性は 0.05, 0.8 および 7 μ g/mL になるように調製した VRCZ の血漿試料について、各濃度につき 5 回繰り返し定量することによって評価した。また、同様の濃度で 5 日間に渡り定量することで日間再現性を評価し、真度は (定量値/理論値) \times 100% として評価した。

7. 患者背景

74 歳, 男性, 身長 159.5cm, 体重 54.6kg.

約 10 年前に 2 型糖尿病を指摘され、3 年前に糖尿病性腎症により透析を導入されている。同時期より高血圧、甲状腺機能低下症を指摘され、内服加療を行っていた。2 年前には慢性閉塞性動脈硬化症と診断され、左大腿動脈にステントを挿入し、症状は軽快していた。1 年前より膀胱上皮内癌を認め、同時に汎血球減少を指摘され、骨髄異形性症候群と診断された。血尿が持続し、赤血球輸血を行うも貧血は改善しなかった。今回、アザシチジン療法導入目的にて入院となった。入院後、真菌性肺炎を認め、VRCZ による治療を開始した。

患者はアロプリノール及びアルファカルシドール、レボチロキシナトリウム、カルベジロール、ニフェジピン、ランソプラゾール、沈降炭酸カルシウム、ゾルピデム、ナルフラフィン、葉酸、デフェラシロクス、テルミサルタン、トラネキサム酸、レボフロキサシン、プレドニゾロンを服用中であった。

8. 患者血漿試料

VRCZ を 600mg/day (1 日目), 400mg/day (2 ~ 10 日), 300mg/day (11 ~ 34 日目) にて服用し、6, 16 日目にヘパリン処理採血管にて採血を行った。トラフ値にて採血を行い、速やかに遠心分離し、得られた血漿を測定まで -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。対象患者へは担当医師よりヘルシキ宣言に基づき十分に説明し、書面にて同意を得て、血中濃度測定を行った。

本研究は福岡大学病院臨床研究審査委員会の審査および承認を受けている。(承認番号: 第 12- 2-08 号)

結 果

1. クロマトグラム

健常人血漿 (A), VRCZ および IS を健常人血漿に添加した試料 (B) および VRCZ 服用患者 (C) より得られたクロマトグラムを図 2 に示す。VRCZ のピークが約

11分、ISのピークが約17分に検出され、患者血漿より得られたクロマトグラムにおいて、内因性物質および他の治療薬による妨害ピークは検出されなかった。

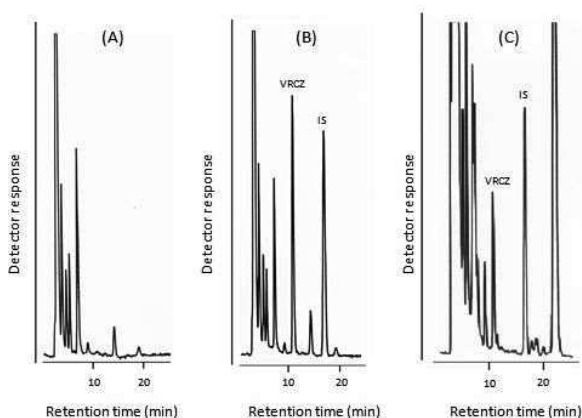


図2 本法の操作により得られたクロマトグラム
(A) 健常人血漿
(B) VRC (800 ng/mL) と内部標準物質 (57.3 ng/mL) を添加した健常人血漿
(C) VRCZ 内服 16 日目の服用前患者血漿

2. 直線性

検量線は VRCZ の添加血漿濃度に対する、IS のピーク面積と VRCZ のピーク面積比より求めた。検量線は VRCZ 濃度として 0.05 ~ 7 µg/mL の濃度範囲において良好な直線性を有し、回帰直線は、 $y=1.49x+0.181$ であり、相関係数 (r^2) は 1.000 であった。

3. 回収率

酢酸エチルによる回収率を表1に示す。いずれの濃度においても定量的に回収されていた。

表1 血漿からの VRCZ 回収率

VRCZ added (µg/mL)	Recovery (n=5)	
	% (mean±SD)	
0.05	110±11.3	
VRCZ 0.8	101±6.10	
7.0	101±6.90	

4. 精度および真度

日内および日間再現性について評価した結果を表2に示す。精度は変動係数 (CV) として評価し、日内再現性は 3.7 ~ 10.5%, 日間再現性は 4.0 ~ 11.0% であった。真度は (定量値/理論値) × 100% として評価し、日内再現性は 86.0-103.1%, 日間再現性は 80.0-102.5% であった。

5. 患者血漿中濃度

300mg/ 日服用中の 16 日目の服用直前および 31 日目の服用直前と服用 1.5 時間後に患者 VRCZ 血漿中濃度を測定した。その結果を表3に示す。

表3 患者の VRCZ 血漿中濃度

Day	blood Collecting Time	Concentration (µg/mL)
16	Right before dose	0.43
31	Right before dose	0.41
	1.5h after dose	1.35

考 察

VRCZ は重症又は難治性真菌感染症の治療薬の他、造血幹細胞移植など免疫不全患者に対する予防薬としても使用されているが重篤な副作用として肝障害が報告されている。しかし、VRCZ 血中濃度は患者間の変動が大きく、しかも非線形を呈するため TDM が推奨されている。すなわち、有効性の至適濃度は複雑な患者因子、対象真菌の感受性などから明らかになっておらず、TDM の意義は安全性に応じたものとなっている。国内第 I 相試験において、肝機能検査異常が発現した症例の血中濃度トラフ値はすべて 4.5µg/mL を越えており、これが臨床において一つの目安となる。経口剤の生体内利用率はほぼ 100% であり、内服開始 2, 3 日で定常状態となるため、それ以降での血中濃度トラフ値測定と肝機能検査が安全性の担保に有用である。しかしながら、測定を外部委託する場合は測定結果が返ってくるまでに時間を要する。

今回開発した測定法は 200µL の血漿を酢酸エチルによる 1 回の抽出のみで 0.05 ~ 7µg/mL まで精度よく高感度測定が可能であった。したがって、各医療施設における日常分析や体内動態研究などに使用可能である。

表2 本 HPLC 法の日内・日間変動および精度

VRCZ added (µg/mL)	Within-day (n=5)		between-day (n=5)	
	Found (µg/mL)	CV ¹⁾ (%)	Found (µg/mL)	CV ¹⁾ (%)
0.05	0.043	10.5	0.040	11.0
VRCZ 0.8	0.80	3.7	0.82	4.0
7.0	7.22	6.2	7.05	6.5

1) CV: coefficient of variation

患者は高齢者でしかも透析を受けており、初日に 600mg/日、2日目より 400mg/日を内服し、6日目に VRCZ 血中濃度を外部検査会社にて測定を実施した。高値であったことから 11日目より 300mg/日に減量し、16日目に VRCZ 血中濃度測定と外部検査会社による測定を実施した。両者に差異はなく、治療域 (1~2 μ g/mL) 以下であった。さらに、31日目に VRCZ 血中濃度測定を行い、臨床症状の改善も乏しいことから 35日目より 400mg/日へ増量した。また、VRCZ 投与開始前から治療期間中、肝機能 (ALT, AST, γ -GPT) は施設基準値の正常範囲内であった。

本測定法は非常に簡便で迅速、しかも高感度に血漿中 VRCZ 濃度の測定が可能であり、日常分析法として極めて有用であると考えられる。

引用文献

- 1) Britzi M, Bialer M, Arcavi L, Shachbari A, Kapitulnik T, Soback S: Genetic Polymorphism of CYP2D6 and CYP2C19 Metabolism Determined by Phenotyping Israeli Ethnic Groups. *Ther Drug Monit* 22: 510-516, 2000.
- 2) Purkins L, Wood N, Ghahramami P, Greenhalgh K, Allen MJ, Kleinermans D: Pharmacokinetics and Safety of Voriconazole following Intravenous- to Oral-Dose Escalation Regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2546-2553, 2002.
- 3) Bartelink IH, Wolfs T, Jonker M, Waal M, Egberts TC, Ververs TT, Boelens JJ, Bierings M: Highly Variable Plasma Concentrations of Voriconazole in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients. *Antimicrob Agen Chemother* 57: 235-240, 2013.
- 4) Smith J, Andes D: Therapeutic Drug Monitoring of Antifungals: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations. *Ther Drug Monit* 30: 167-172, 2008.
- 5) Yamada T, Mino Y, Yagi T, Naito T, Kawakami J: Rapid Simultaneous Determination of Voriconazole and Its N-oxide in Human Plasma Using an Isocratic High-Performance Liquid Chromatography Method and Its Clinical Application. *Clin Biochem* 45: 134-138, 2012.
- 6) Sangsiri K, Chayakulkeeree M: Rapid High Performance Liquid Chromatographic Assay for Determination of Voriconazole Concentration in Human Plasma. *J Med Assoc Thai* 96: Suppl 2, S98-S103, 2013.
- 7) Pascual A, Nieth V, Calandra T, Bille J, Bolay S, Decosterd LA, Buclin T, Majcherzyk PA, Sangland D, Marchetti O: Variability of Voriconazole Plasma Levels Measured by New High-Performance Liquid Chromatography and Bioassay Method. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 137-143, 2007.
- 8) Jourdil JF, Tonini J, Stanke-Labesque F: Simultaneous Quantitation of Azole Antifungals, Antibiotics, Imatinib, and Raltegravir in Human Plasma by Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr B* 919-920: 1-9, 2013.
- 9) Pauwels S, Vermeersch P, Van Elder J, Desmet K: Fast and Simple LC-MS/MS Method for Quantifying Plasma Voriconazole: *Clin Chim Acta* 413: 740-743, 2012.
- 10) Lin D, Li G, Chen L: Determination of Voriconazole in Human Plasma by HPLC-ESI-MS and Application to Pharmacokinetic Study. *J Chromatogr Sci* 51, 485-489, 2013.
- 11) Michael C, Teichert J, Preiss R: Determination of Voriconazole in Human Plasma and Saliva Using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J Chromatogr B* 865: 74-80, 2008.
- 12) Bartelink IH, Wolfs T, Jonker M, de Waal M, Egberts TCG, Ververs TT, Boelens JJ, Bierings M: Highly variable plasma concentrations of voriconazole in pediatric hematopoietic stem cell transplantation patients. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 235-240, 2013.

(平成 27. 4. 10 受付, 平成 27. 5. 20 受理)

「本論文内容に関する開示すべき著者の利益相反状態：なし」