

セマグルチド測定系の構築について

分担研究者 前川京子 (同志社女子大学薬学部)
研究協力者 徳川宗成 (同志社女子大学薬学部)
高橋知里 (同志社女子大学薬学部)
北尾美結 (同志社女子大学薬学部)

研究要旨

【目的】

ヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 類縁体であるセマグルチドは、2型糖尿病、または肥満症を効能又は効果として本邦で承認されている。一方で、糖尿病治療薬が個人輸入や医療機関などで痩せ薬として適応外使用されている実態がある。個人輸入によって入手された医薬品には、偽造医薬品をはじめ、低品質医薬品等の混在や不適正使用を加速する等、保健衛生上の危険性がある。セマグルチドの偽造品や品質不良品が個人輸入される可能性があることから、本研究では、インターネット上に流通するセマグルチド製剤を試買し、品質を調査することを目的とした。まずはセマグルチド分析法の構築に着手した。

【方法】

セマグルチド、及び内部標準として使用するリラグルチドの標品をメタノールに溶解し、精密質量が測定可能なフーリエ変換型質量分析計 (MS) により MS スペクトルの確認を行った。逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (LC) と組み合わせ、セマグルチド、及びリラグルチドの MS クロマトグラムを解析し、LC/MS 測定 の条件検討を行った。

【結果】

セマグルチド標品の MS スペクトルを確認したところ、 m/z 1029.2901 が主要なイオンであり、 $[M+4H]^{4+}$ イオンとして検出された。逆相カラムを用い、0.1%ギ酸を含有する水-アセトニトリル系の移動相によりセマグルチド及びリラグルチドの分離分析が可能であった。

【考察】

今後は、セマグルチド定量法を構築すると共に、錠剤からのサンプル調製法を検討する。試買した製剤の分析を行い、インターネットを介して国際流通する GLP-1 受容体作動薬の実態を明らかにする。

A. 研究目的

セマグルチドは、遺伝子組換えヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 類縁体であり、31 個のアミノ酸残基からなる修飾ペプチドである[1]。GLP-1 は小腸の L 細胞から分泌されるインクレチンホルモンの 1 種であり、グルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進し、血糖降下作用を示す。セマグルチドは、ヒト GLP-1 と 94%の構造的な相同性を有し、化学構造に重要な修飾を加えたことで安定性を高め、2 型糖尿病治療薬として開発された。本邦では、セマグルチドを有効成分とする週 1 回皮下投与製剤が 2018 年 3 月に、1 日 1 回の経口投与製剤であるリベルサス[®]錠が 2020 年 6 月に、「2 型糖尿病」を効能又は効果として承認されている。リベルサス[®]錠は、米国、カナダ、欧州諸国を始め、世界各国で発売されている[2]。また、セマグルチドは、GLP-1 受容体を介して中枢における摂食抑制作用を有することから 2023 年 3 月に「肥満症」を効能又は効果とした皮下投与製剤が本邦で承認されている[3]。セマグルチドの副作用として、胃腸障害が多く報告されている。

糖尿病治療薬が個人輸入や医療機関などで美容・痩身・ダイエット等を目的として適応外使用されている。GLP-1 受容体作動薬に関しては、「GLP-1 ダイエット」と称して広告を出し、自由診療として使用している事例が報告されている[4]。インターネットを介した医薬品の個人輸入は、日本における偽造医薬品の主な侵入ルートであり、個人輸入医薬品には保健衛生問題が伴う。本研究では、インターネット上に流通するセマグルチド製剤を試

買し、品質を調査することを目的とした。まずは、文献報告[5]を基に、液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC/MS) を用いてセマグルチドの測定系の構築に着手した。

B. 研究方法

B-1 試料

Selleck Biotech 社 (Kanagawa, Japan) より Semaglutide Sodium 1 mg (#S9697, Batch, 01)を、Adipogen Life Sciences 社 (San Diego, USA) より Liraglutide 1 mg (#AG-CP3-0034, Lot A01720)を購入し、標品として利用した。

B-2 LC/MS による測定系の構築

Semaglutide sodium 及び Liraglutide をメタノールで溶解し、1 mg/mL のストック溶液を調製した。ストック溶液をさらにメタノールで希釈し、それぞれ 1.0 µM の標準溶液を調製した。標準溶液を、ダイレクトインフュージョン (10 µL/min) 法による直接導入、もしくは液体クロマトグラフィー (UltiMate 3000 HPLC システム, Thermo Scientific[™], Massachusetts, USA) による分離を行った後、Q Exactive システム (Thermo Scientific[™]) の Full MS モードで測定した。LC の分離条件、及び MS 測定条件は下記の通りとした。

<LC 条件>

移動相 : (溶媒 A) 0.1% ギ酸溶液 (溶媒 B) 0.1% ギ酸含有アセトニトリル
カラム : Xselect Premier CSH C18 3.5 µm
2.1 x 150 mm (Waters, Tokyo, Japan)
注入量 : 2 µL

流量 : 0.3 mL/min
タイムプログラム : 0-7 min: 30%-90%
B, 7-12 min: 90% B, 14-14.10 min: 95-
30% B, 12.01-18 min: 30% B
カラムオーブン : 50°C

<MS 条件>

イオン化法 : 加熱エレクトロスプレー
イオン化 (H-ESI) 法

測定モード : ポジティブイオンモード

シースガス : 窒素

シースガス流量 : 50 arb unit

AUX ガス : 窒素

AUX ガス流量 : 10 arb unit

スプレー電圧 : +3.5 kV

ペーポライザ温度 : 300 °C

キャピラリー温度 : 250 °C

Qual Browser (Thermo Scientific™) によ
り解析を行った。

C. 研究結果

C-1 ダイレクトインフュージョン法を用
いた MS スペクトルの確認

セマグルチド ($C_{187}H_{291}N_{45}O_{59}$) の構造を
図 1 に示す。セマグルチドは、31 個のア
ミノ酸残基からなる修飾ペプチドであり、
分子量は 4113.58、モノアイソトピック質
量は 4111.1153770 である。Lee TS らは、
LC-MS/MS を用いてセマグルチド投与ラ
ットの血漿中濃度を定量しており、
[M+4H]⁴⁺のイオン (m/z 1029.3) が主要な
イオンであると報告している[5]。ダイレ
クトインフュージョン測定により、セマ
グルチド標準品のマススペクトルを確認

したところ、 m/z 1029.2901 が主要なイオ
ンであり、文献報告との一致を認めた (図
2)。

さらに、 $C_{187}H_{291}N_{45}O_{59}$ の組成式で、
[M+4H]⁴⁺のアイソトープパターンをシミ
ュレーションし、実測のスペクトルとシ
ミュレーション結果を比較した。実測値
(m/z 1029.2901) と理論値 (m/z 1029.2876)
の質量誤差は 2.42 ppm であり、許容範囲
であった (図 3)。

C-2 LC/MS 測定の条件検討

逆相カラムを用いて、LC/MS 測定の条
件検討を行った。最終的に設定した LC 条
件におけるセマグルチド標品 1 μ M 及び
内部標準として使用予定のリラグルチド
標品 1 μ M の MS クロマトグラム、及び
MS スペクトルを図 4 に示す。セマグルチ
ドは保持時間 3.94 分に、リラグルチドは
保持時間 4.42 分に対称性のよいピーク形
状で検出され、両者を分離可能であった。

D. 考 察

精密質量が測定可能なフーリエ変換型
質量分析計を用いて、セマグルチドの測
定系を構築した。フーリエ変換型質量分
析計は、三連四重極型質量分析計と異な
り、フラグメントイオンの探索やコリジ
ョンエネルギーの最適化が不要であり、
メソッドの構築が容易であった。用いた
逆相カラムは、ペプチド分析用ではない
ものの金属吸着を防ぐ特殊処理を施した
クロマト管に充填されており、0.1%ギ酸
を含有する水-アセトニトリル系の移動
相を用いてセマグルチドを優れたピーク
形状で検出することが可能であった。さ

らに、構造が類似した GLP-1 受容体作動薬のリラグルチドが内部標準物質として使用できる可能性が示された。今後は、セマグルチド定量法を構築するため、リラグルチドを内部標準として用いて定量系を構築し、検量線の直線性、定量範囲、真度、精度、キャリーオーバー、安定性、マトリックス効果等を確認する予定である。また、錠剤からのサンプル調製法（抽出法）を検討する。

E. 結論

糖尿病治療薬が個人輸入や医療機関などで痩せ薬として適応外使用されている。本研究では、GLP-1 受容体作動薬セマグルチドを対象に、インターネット上に流通する製剤を試買して、その品質を調査するため、液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC/MS) によりセマグルチド測定系の構築に着手した。精密質量が測定可能なフーリエ変換型質量分析計を用いて、セマグルチドの主要な検出イオンを確認し、逆相カラムを用いた LC/MS により分離分析できることを確認した。今後、試買した製剤の品質を評価し、インターネットを介して国際流通する実態を明らかにするとともに、消費者の啓発や対策強化につなげたい。

F. 引用文献

1. LS. Hall, D. Isaacs, J.N. Clements, Pharmacokinetics and Clinical Implications of Semaglutide: A New Glucagon-Like Peptide (GLP)-1 Receptor Agonist, Clin. Pharmacokinet. 57 (2018) 1529–1538.

2. 医薬品インタビューフォーム. 2 型糖尿病治療剤 経口 GLP-1 受容体作動薬セマグルチド（遺伝子組換え）リベルサス[®] 錠.

<https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuSearch/>

3. 医薬品インタビューフォーム. 肥満症治療剤 持続型 GLP-1 受容体作動薬セマグルチド（遺伝子組換え）ウゴービ[®]皮下注.

<https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuSearch/>

4. 独立行政法人国民生活センター報道発表資料「自宅で完結？手軽に痩せられる？痩身をうたうオンライン美容医療にご注意！ー糖尿病治療薬を痩身目的で消費者に自己注射させるケースがみられますー」

https://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20200903_1.pdf

5. TS. Lee, EJ. Park, M. Choi, HS. Oh, Y. An, T. Kim, TH. Kim, BS. Shin, S. Shin, Novel LC-MS/MS analysis of the GLP-1 analog semaglutide with its application to pharmacokinetics and brain distribution studies in rats, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 1221 (2023) 123688.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

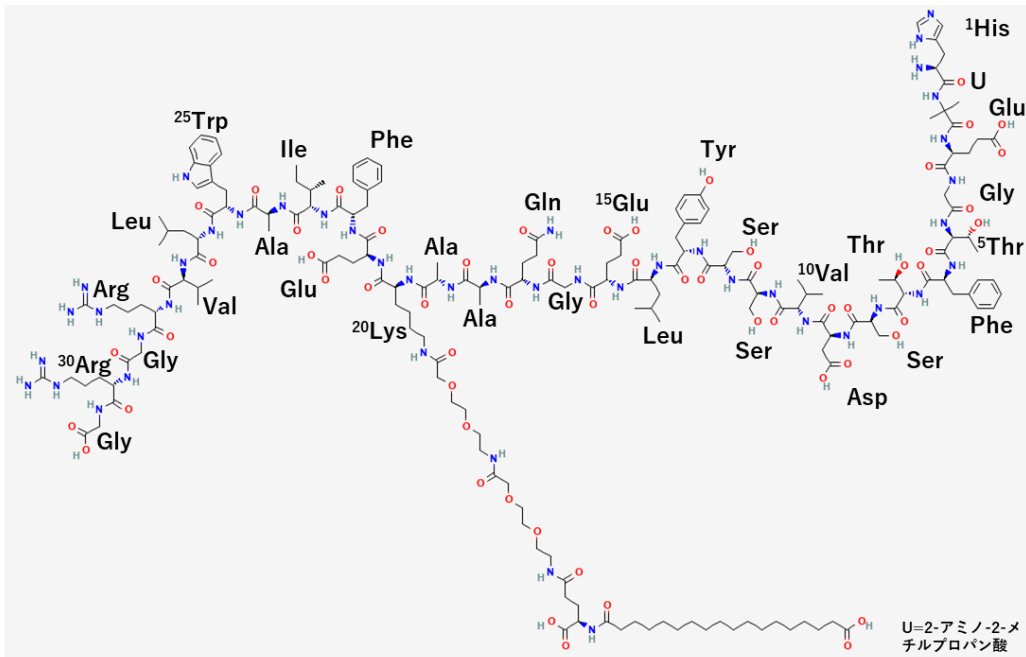


図1 セマグルチドの構造

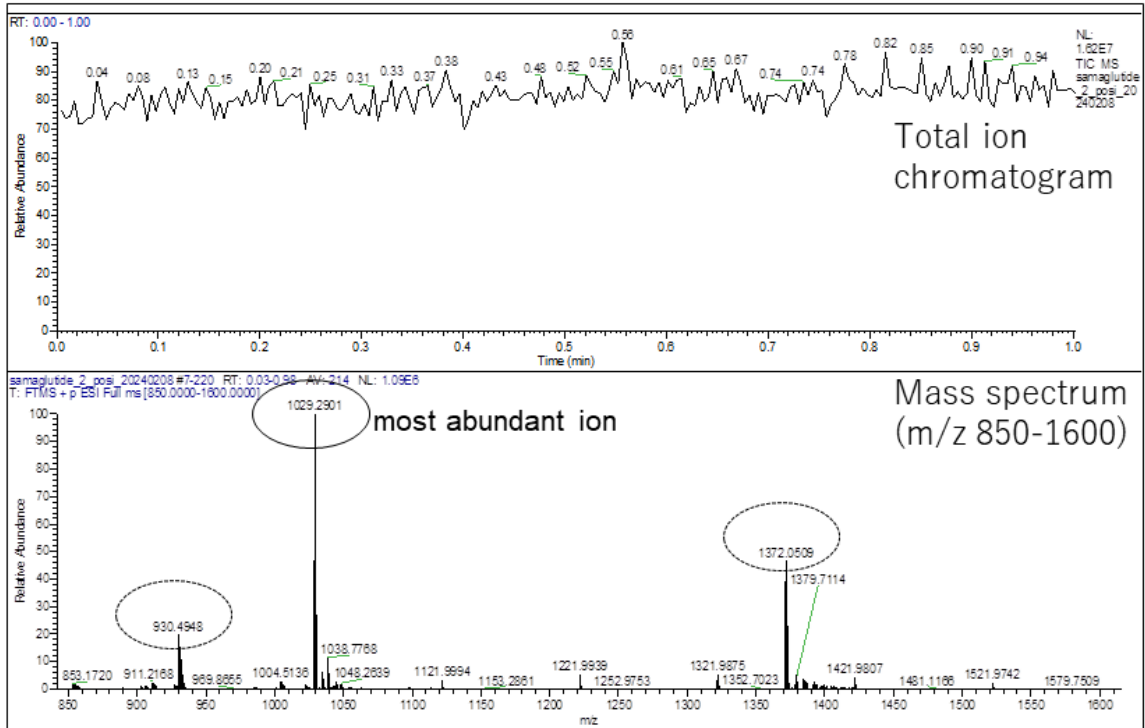
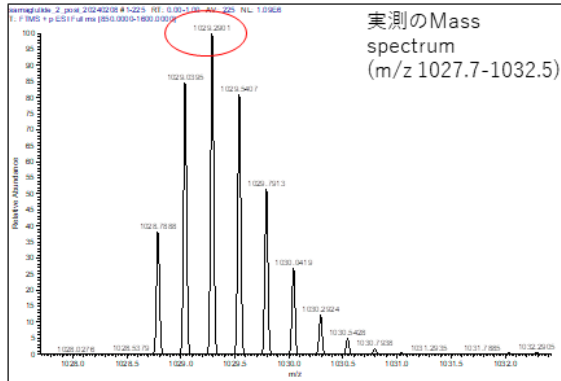


図2 ダイレクトインフュージョン法を用いたMSスペクトルの確認

(a) セマグルチド標品



(b) アイントープシミュレーション

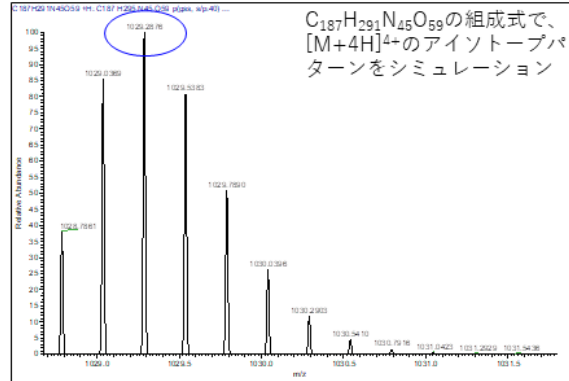
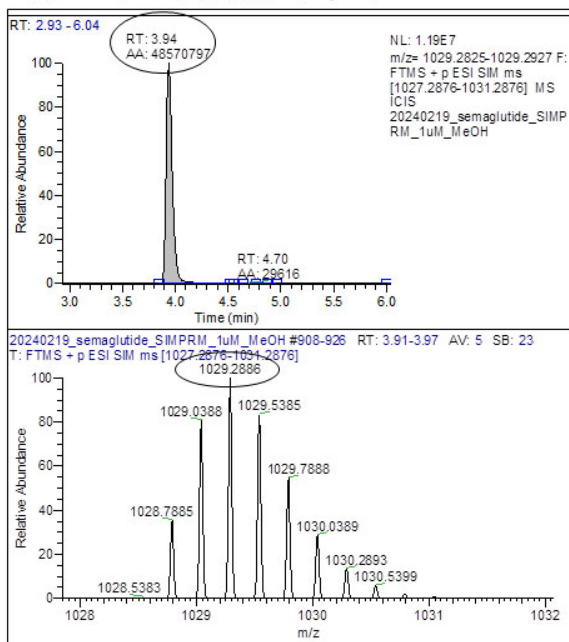


図3 MSスペクトルにおける実測値と理論値の比較

(a) セマグルチド標品 (1 μ M)



(b) リラグルチド標品 (1 μ M)

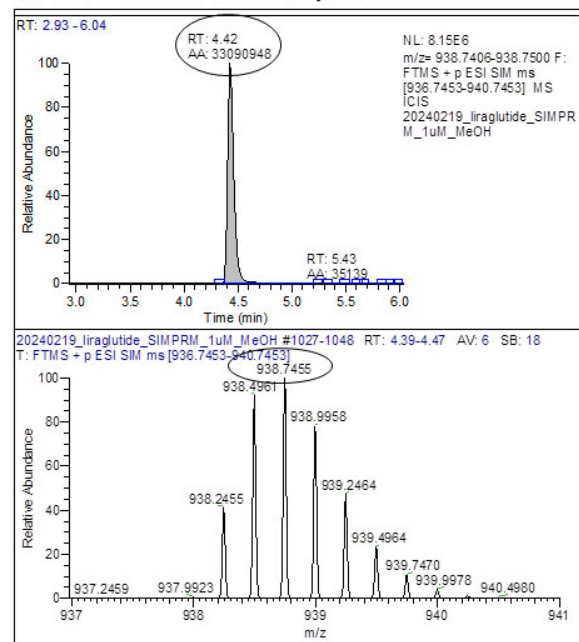


図4 LC/MS測定によるセマグルチド及びリラグルチドの検出

