

インターネットを介して個人輸入される医薬品の実態調査 (4) 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 (glucagon-like peptide-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、セマグルチド定量法の構築を継続した。

【方法】

逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (LC) に、精密質量が測定可能なフーリエ変換型質量分析計 (MS) を組み合わせた LC/MS 法により、セマグルチド標品の段階希釈溶液について、容器への吸着や検出限界を評価した。絶対検量線法、もしくはリラグルチドを内部標準物質とした内標準法により検量線を作成し、直線性を確認した。錠剤からのセマグルチド抽出時に用いる抽出溶媒の違いが抽出効率に与える影響を検討した後、内標準法による検量線を用いてリベルサス®錠に含まれるセマグルチドを定量した。

【結果】

セマグルチド標品のメタノール (MeOH) による段階希釈溶液をプロピレンバイアルで LC/MS 測定を行ったところ 0.3 nM から検出可能であり、3,000 nM まで直線性が認められた。一方、同じ溶液をガラスバイアルで測定すると 300 nM からセマグルチドのピークが検出されたものの、直線性は認められず、セマグルチドがガラスバイアルに吸着されたことが示唆された。リベルサス®錠から蒸留水を用いてセマグルチドを抽出した

試料溶液では、MeOH で抽出した試料溶液と比較して、検出されたセマグルチドのピーク面積が大きく、溶媒により抽出効率に差が生じることが示唆された。リラグルチドを内部標準物質とする内標準法による検量線を用いてリベルサス®錠に含まれるセマグルチドを定量したところ、試料溶液の希釈倍率により定量値が変動し、理論値の 81.7 – 123.1%の範囲にあった。

【考察】

多くのペプチド試料と同様に、セマグルチド定量法の構築にあたり吸着への対策が必要であることが示された。試料溶液の希釈倍率により錠剤中に含まれるセマグルチドの定量値が理論値に対して変動した原因は不明であるが、セマグルチド、及び内標準物質として用いたリラグルチドのイオン化効率が検量線溶液と試料溶液で異なっていた可能性が示唆される。今後、LC での分離条件を含め、定量法のさらなる改変が必要である。

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。リベルサス®錠は 2 型糖尿病の治療において利便性を高めるため、セマグルチドを経口投与可能とした製剤である。本剤は、吸収促進剤であるサルカプロザートナトリウム (salcaprozate sodium, SNAC) を 1 錠当たり 300 mg 含有することで経口投与を可能としている。吸収促進剤である SNAC は、胃上皮で多量体を形成したセマグルチドを単量体へと変化させるとともに pH を局所的に上昇させ、タンパク質分解酵素による分解からセマグルチドを保護

し、吸収を促進する。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。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[1]。

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[2]。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[3]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定量法の構築を継続した。

B. 研究方法

B-1 試料

Selleck Biotechnology 社 (Kanagawa, Japan) より Semaglutide sodium 1 mg (#S9697, Batch, 01) を、AdipoGen Life Sciences 社 (San Diego, USA) より Semaglutide acetate 1 mg (AG-CP3-0032, Lot AQ1634)、及び Liraglutide 1 mg (#AG-CP3-0034, Lot A01720) を購入し、標品として利用した。リベルサス®錠は、3MG 製剤 (製造番号 MJG6999) を購入し、定量系の構築のための positive control として用いた。

B-2 LC/MS による測定系の構築

B-2-1 セマグルチド標品の吸着と定量下限の確認

Semaglutide sodium をメタノール (MeOH) 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 MeOH で希釈し、それぞれ 10.0 μ M の標準溶液を調製した。標準溶液を MeOH で段階希釈し、3000, 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0.3 nM の 9 点からなる希釈系列を作成した。希釈溶液は、ガラスバイアル、またはポリプロピレンバイアルに移し、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 Single ion monitoring (SIM) 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 μ m

2.1 x 150 mm (Waters, Tokyo, Japan)

注入量: 2 μ L

流量: 0.3 mL/min

Needle Wash: 80% MeOH

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: Target Single ion monitoring (Target SIM) または Full scan

Target ion: セマグルチド ($C_{187}H_{291}N_{45}O_{59}$)
[M+ 4H]⁴⁺, m/z 1029.2876 (Positive)

サルカプロザートナトリウム ($C_{15}H_{21}NO_4$): [M+ H]⁺ m/z 280.1543 (Positive)

分解能: 70000

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

ベーパーライズ温度: 300 °C

キャピラリー温度: 250 °C

S-Lens level: 50

In-source CID: 0.0 eV

AGC target: 5e⁴

Maximum IT: 200 ms

Qual Browser (Thermo Scientific™) または Quan Browser (Thermo Scientific™) により解析を行った。

B-2-2 検量線の作成

1 mg/mL の濃度で MeOH に溶解した Semaglutide sodium、及び 0.66 mg/mL の濃度で MeOH : water = 2:1 に溶解した Semaglutide acetate の 1 次ストック溶液を、MeOH を用いて 10 µM に希釈した。直ちに、0.1% ギ酸含有 50%アセトニトリル溶液を希釈溶媒として、32, 16, 8, 4, 2, 1 nM まで段階希釈し、絶対検量線溶液とした。また、Semaglutide sodium 10 µM を 2 次ストック溶液として、-30℃に数日保管した後、0.1% ギ酸含有 50%アセトニトリル溶液を希釈溶媒として、32, 16, 8, 4, 2, 1 nM まで段階希釈して絶対検量線溶液とした。

内標準法による検量線の作成では、Semaglutide sodium の 1 次ストック溶液 (1 mg/mL in MeOH) と 50 nM リラグルチド溶液を混合し、1 µM セマグルチド、5 nM リラグルチド混液を調製した。直ちに 5 nM リラグルチドを含む 0.1% ギ酸含有 50%アセトニトリル溶液により段階希釈を行い、1, 2, 4, 8, 16, 32 nM セマグルチドに調製した。なお、LC の分離条件は下記の通りとし、MS 測定条件は方法 B-2-1 と同様にした。

<LC 条件>

移動相 : (溶媒 A) 0.1% ギ酸 : 0.1% ギ酸アセトニトリル = 8 : 2

(溶媒 B) 0.01% ギ酸アセトニトリル : 2-プロパノール = 9 : 1

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

Needle Wash : 50% アセトニトリル

タイムプログラム 1 (絶対検量線法) :

0-7 min: 0-60% B, 7-7.01 min: 60-90%

B, 7.01- 12 min: 90% B, 12-12.01 min:

90-0% B, 12.01-18 min: 0% B

タイムプログラム 2 (内標準法) : 0-7

min: 20-60% B, 7-7.01 min: 60-90% B,

7.01- 12 min: 90% B, 12-12.01 min:

90-20% B, 12.01-18 min: 20% B

カラムオープン : 50℃

B-3 錠剤からのセマグルチド抽出法の検討

リベルサス®錠 3 mg を 1 個とり、その質量を精密に量り、ポリプロピレンの 5 mL チューブに加えた。5 mL チューブに抽出溶媒を 3 mL 加えて、約 1 日冷蔵庫で溶解させた (1.0 mg セマグルチド/mL, 243.1 µM)。抽出溶媒として、蒸留水、MeOH、0.1% Triton X-100 の 3 種を検討した。翌日、超音波を用いて粒子を小さく分散させた後、遠心分離し (4,300 rpm、4℃、30 min)、上清を新しい 1.5 mL チューブ 2 本に回収した。2 本を遠心分離し (12,000 rpm、4℃、15 min)、上清を 1 つの新しい 5 mL チューブに回収した。この液に溶媒を加えて 24.3 倍希釈し (10 µM)、さらに溶媒を加えて 10 倍希釈した (1 µM)。0.2 µm のナイロンフィルターで濾過した (12,000 rpm、4℃、2 min)。0.1% ギ酸含有 50%アセトニトリル溶液を加えて 9 nM まで希釈し、測定に供した。LC 条件、及び MS 条件は B-2-1 と同様とした。

B-4 錠剤に含まれるセマグルチドの定量と SNAC の検出

リベルサス®錠からのセマグルチドの定量では B-3 で検討した結果より、蒸留

水を用いて抽出した。具体的にはセマグルチド 3 mg 錠を 1 個とり、その質量を精密に量り、ポリプロピレンの 5 mL チューブに加えた。5 mL チューブに蒸留水を 3 mL 加えて、約 1 日冷蔵庫で溶解させた (1.0 mg セマグルチド/mL, 243.1 μ M)。B-3 と同様に処理し、理論上 10 μ M のセマグルチドを含む溶液を調製した。この溶液を 50 nM リラグルチド溶液と混合し、1 μ M セマグルチド、5 nM リラグルチド混液を調製した。直ちに 5 nM リラグルチドを含む 0.1% ギ酸含有 50%アセトニトリル溶液により段階希釈を行い、理論上 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 nM セマグルチドを含む溶液とした。B-2-2 に示す内標準法により作成した検量線を用いて、リベルサス®錠に含まれるセマグルチドを定量した。なお、LC の分離条件、及び MS 測定条件は方法 B-2-2 と同様にした。

錠剤からの抽出溶液に含まれる SNAC は質量分析計の full scan モードにより測定した。

C. 研究結果

C-1-1 セマグルチド標品の吸着と定量下限に関する確認

ペプチド試料を LC/MS で検出する場合に問題となるのが容器へのペプチド試料の吸着である[4]。セマグルチドがどの程度吸着するのかを確認するため、低濃度域までの標品の希釈系列を作成し、ガラスバイアルと、ポリプロピレンバイアルで測定して結果を比較した。0.3–3,000 nM 範囲で作成したセマグルチドの検量線を図 1 に示す。ガラスバイアルで測定した検量線溶液では、300 nM からセマグルチ

ドのピークが検出されたものの、直線性が認められなかった (図 1a)。一方、ポリプロピレンバイアルで測定すると、0.3 nM から s/n 比 62 でピークが検出され (図 1c)、3,000 nM まで検量線の直線性 (R^2 値 = 1.0000) が認められた (図 1b)。

C-1-2 検量線の作成

セマグルチド標品は、Selleck 社からナトリウム塩として Semaglutide sodium が、AdipoGen 社から酢酸塩として Semaglutide acetate が購入可能であった。両者の標品を用いて 1.0–32.0 nM の範囲で検量線を作成し、検量線の傾きを比較した。Semaglutide acetate 標品で作成した検量線の傾きは、Semaglutide sodium 標品で作成した検量線の傾きの約 1.2 倍となった (図 2)。

一方、同じ Semaglutide sodium 標品を用いた場合でも、1 次ストック溶液 (1.0 mg/mL) から希釈した場合に比べ、2 次ストック溶液 (10 μ M) から希釈した場合は、検量線の傾きは約 1/2 に低下した (図 3)。2 次ストック溶液に含まれるセマグルチドが、保存中に容器へ吸着したことが予想された。

リラグルチドを内部標準物質として用いた内標準法では、絶対検量線法と同様に 1.0–32.0 nM の範囲で検量線に良好な直線性が認められた (図 4)。

C-2 錠剤からのセマグルチド抽出法の検討

図 5 にリベルサス®錠から抽出されたセマグルチドのクロマトグラム、MS スペクトルを示す。いずれの抽出溶媒を用いた

場合も終濃度として 9.0 nM のセマグルチドを含む希釈条件で測定したが、蒸留水を抽出溶媒に用いた際のピーク面積が最も大きく、続いて、0.1% Triton X-100、MeOH の順に検出されるピーク面積は減少した。抽出溶媒以外の抽出条件は同じであること、抽出後は、LC/MS 測定に供する 9.0 nM までの希釈に同じ希釈溶液を用いたことから、容器への吸着や MS のイオンサプレッションの程度は同等と考えられた。よって抽出溶媒によりセマグルチドの抽出効率が異なることが示唆された。

C-3 錠剤に含まれるセマグルチドの定量

内標準法による検量線を用いたリベルサス®錠の定量結果を図 6 に示す。理論上 4 nM, 8 nM のセマグルチドを含む抽出溶液は、それぞれ 3.27 nM、9.84 nM と定量され、理論値に対する定量値の割合 (%) は、それぞれ 81.7%, 123.1%であった。

また、錠剤からの抽出溶液中に添加剤 SNAC が検出されることを確認した (図 7)。SNAC の保持時間は、内標準溶液であるリラグルチドと保持時間と近接しており、SNAC のピークが非常に大きいため、リラグルチドのイオン化に影響を与えている可能性が示唆された。

D. 考察

多くのペプチド試料で報告されているように、セマグルチド定量法の構築にあたり吸着への対策が必要であることが示された。標品を調製する容器が同じであれば、その表面積は一定で吸着される分子の量も一定と考えられるため、濃度が

高いときには分子全体に対する吸着した分子の量は小さく、低濃度になればなるほど吸着する分子の量の全体量に対する割合は大きいと考えられる。図 1 より 3,000 nM セマグルチドはガラスバイアルとポリプロピレンバイアルで、ほぼ同等のピーク面積を与えたが、30 nM セマグルチドはガラスバイアルでは検出できなかった。ポリプロピレンバイアルでは、0.3 nM セマグルチドが s/n 比>50 で検出され、フーリエ変換型質量分析計により、高感度で測定できることが示された。リベルサス®錠は多量の添加剤を含んでいることから、LC/MS の利点を活かして、できるだけ試料を低濃度で高感度に分析し MS への汚れの混入を低減することが望ましい。吸着への対策を行った結果、検量線は良好な直線性を示した。また、検量線の作成にあたり、標品のストック溶液の濃度をできるだけ高くして保管する、もしくは定量ごとに標品を溶解して検量線を作成する必要があることが明らかになった。

錠剤からの抽出では、抽出に用いる溶媒の違いによる影響が認められた。リベルサス®錠には、1 錠あたり 300 mg の添加剤 SNAC が含まれており、セマグルチドと複合体を形成することが知られている。SNAC の溶解度は、水に対して、約 33 mg/mL であり[5]、エタノールに対してはわずかに溶けることが報告されている。SNAC の MeOH に対する溶解度は報告されていないが、水よりは低いことが予想される。よって、いずれの抽出溶媒を用いても本抽出法の条件では SNAC は抽出溶液中で飽和し、一部不溶物として沈殿す

る。一方、セマグルチドの水への溶解性は 178 mg/mL を超えている[6]が、MeOH に対しては、1 mg/mL に溶解するという報告がある[3]。MeOH を抽出溶媒に用いた場合、セマグルチドが SNAC と共沈した可能性が考えられることから、抽出溶媒には蒸留水を用いることとした。

内標準法による錠剤中に含まれるセマグルチドの定量において、理論上 8 nM の希釈試料では、定量値が理論値より高く算出され、4 nM では、定量値が理論値より低く算出された。この原因は不明であるが、セマグルチドとリラグルチドのイオン化効率が検量線溶液と試料溶液で異なっていた可能性が示唆される。実際、SNAC の保持時間がリラグルチドと近接しており、リラグルチドのイオン化が錠剤に多量に含まれる SNAC により妨げられたと考えられた。今後、LC での分離条件を含め、定量法のさらなる改変が必要である。

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定量法の構築を進めている。標品を用いた検討により LC/MS によるセマグルチドの微量定量分析においては、吸着への対策が必要であることが明らかになった。今回得られた知見をもとに、定量法の改変を行う予定である。具体的には、リラグルチ

ドを内部標準物質とした内標準法により検量線が安定的に作成できるように検討すると共に、錠剤からの抽出に関して、最適な製剤の希釈法・希釈倍率を検討する。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、消費者への啓発や対策強化につなげたい。

F. 引用文献

1. 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/iyakuDetail/GeneralList/2499014>
2. 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
3. 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.
4. 山垣 亮、木村優佳、山崎堯嗣、LC-MS による高感度ペプチド定量分析の問題点と解決法：極微量ペプチド標品の吸着と検量線作成、J. Mass Spectrom. Soc.

Jpn. Vol. 69, No. 2, 2021.

5. ChemicalBook サルカプロザートナトリウム

https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_JP_CB62739113.htm

6. 医薬品インタビューフォーム. 2 型糖尿病治療剤 持続性 GLP-1 受容体作動薬セマグルチド (遺伝子組換え) オゼンピック®皮下注.

<https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/GeneralList/2499418>

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

G. 研究発表

1. 論文発表

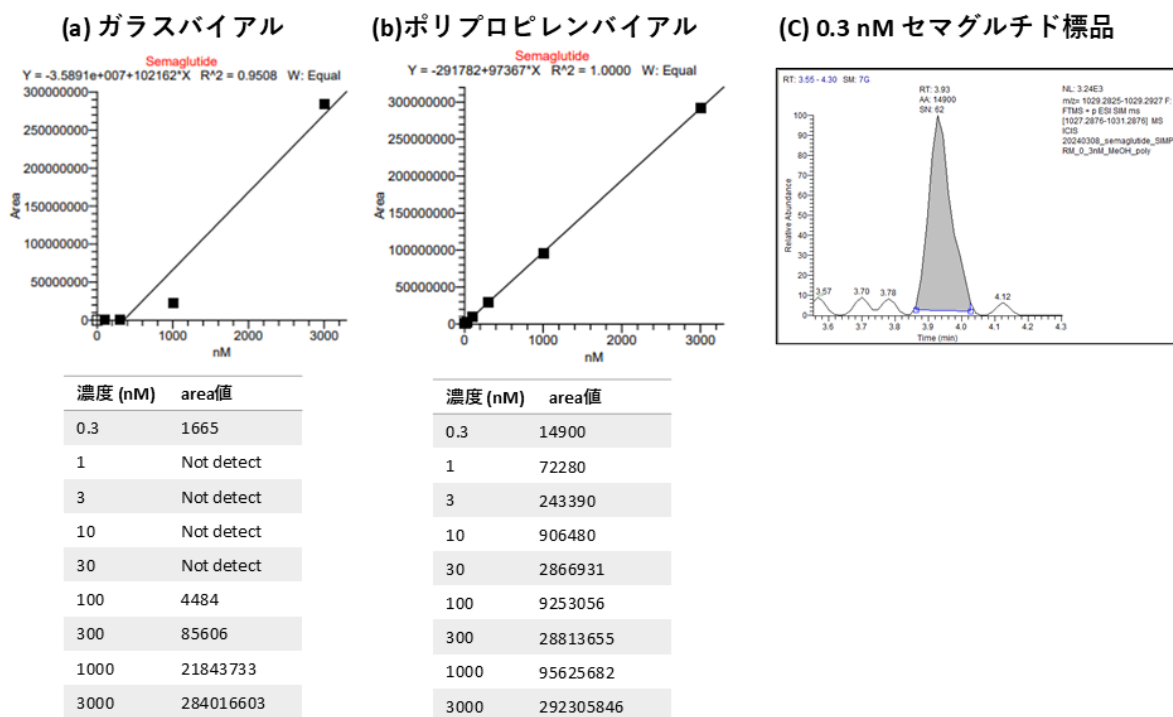


図1. セマグルチド標品のLC/MS測定における測定バイアルの影響

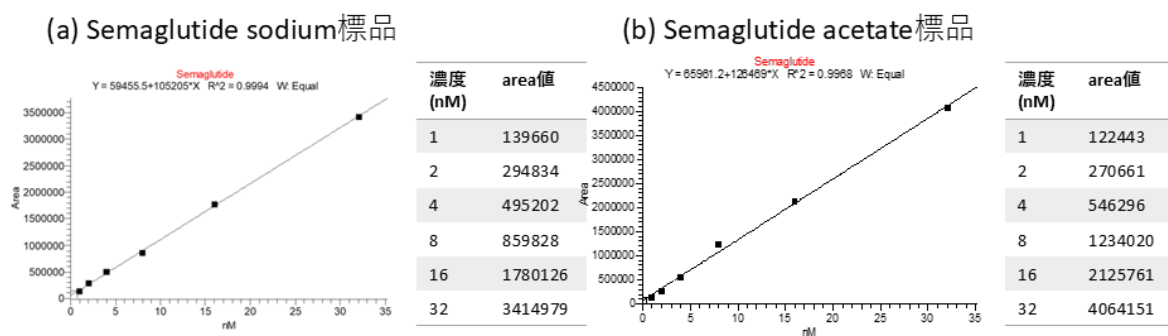


図2. セマグルチド絶対検量線における標品の違い

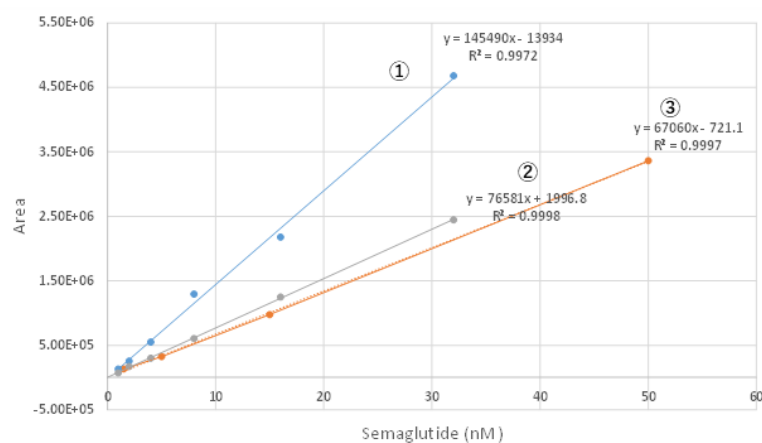


図3. セマグルチド絶対検量線における標品ストック濃度の影響

検量線①：1 mg/mL stock 溶液より調製
 検量線②～③：10 μ M stock 溶液より調製

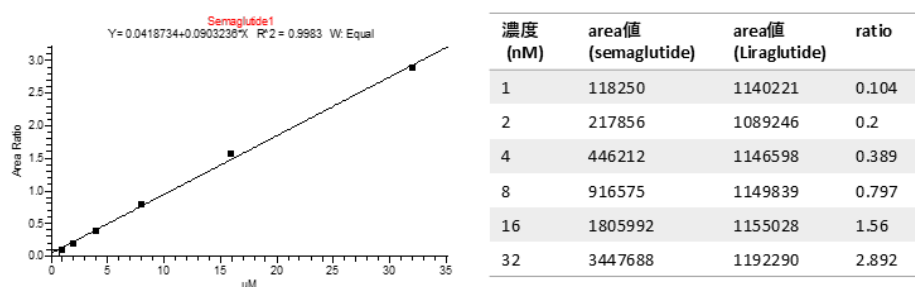


図4. 内標準法によるセマグルチド検量線

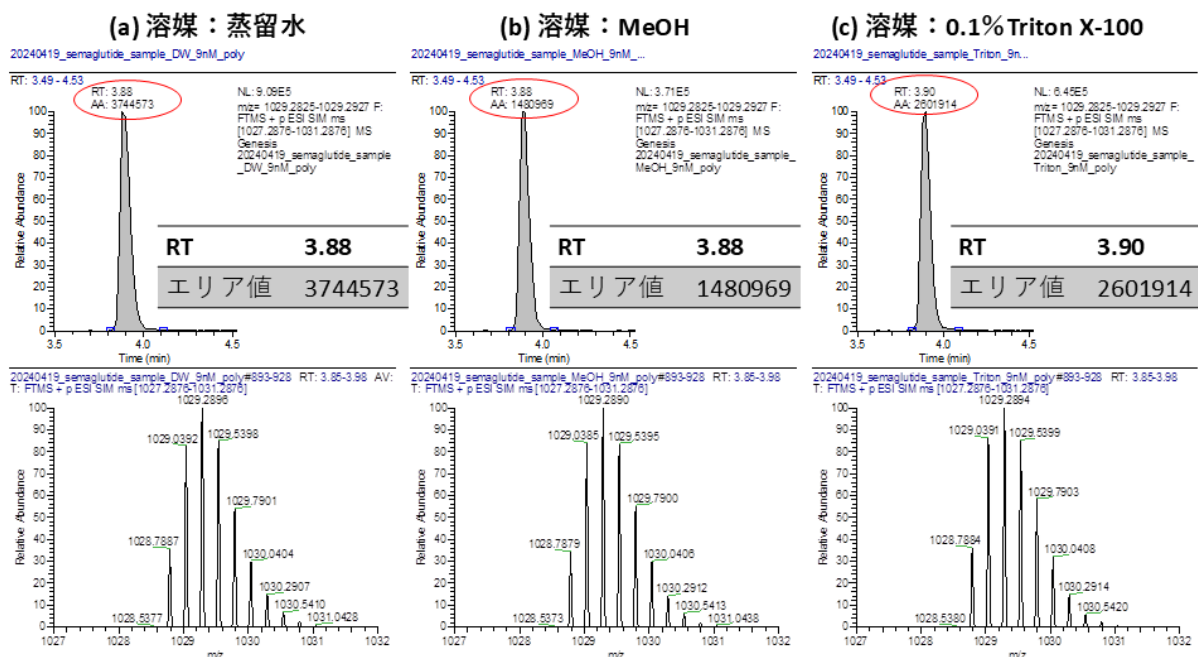


図5.リベルサス®錠からのセマグルチド抽出における抽出溶媒の影響

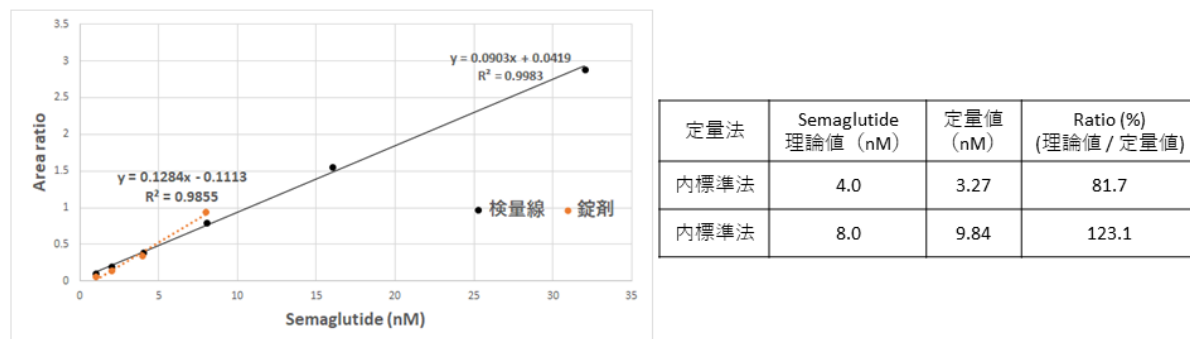


図6.内標準法によるリベルサス®錠からのセマグルチドの定量

RT: 3.18 - 6.01 SM: 7B

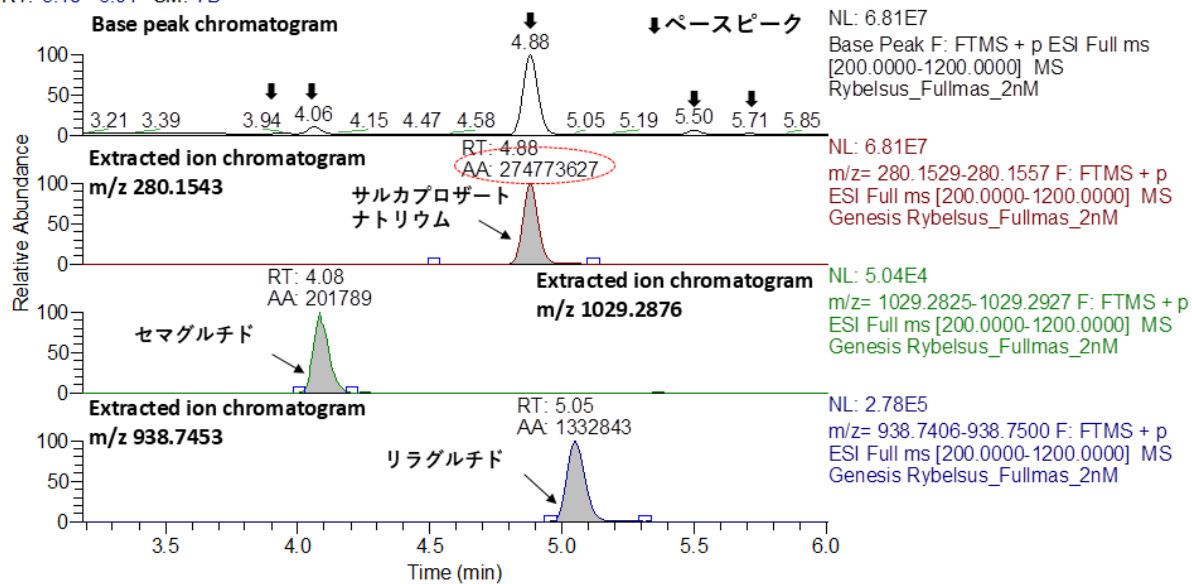


図7.Full scanによるリベルサス®錠に含まれる成分の検出

