

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 (2) 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 高橋知里 (同志社女子大学薬学部)
徳川宗成 (同志社女子大学薬学部)
北尾美結 (同志社女子大学薬学部)
長谷川結依 (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の加速等、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】

Semaglutide sodium および Semaglutide の 2 種の標品を用いて絶対検量線法、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用試料を調製した。液体クロマトグラフィ-質量分析計 (LC/MS) により、両セマグルチド標品を用いて作成した検量線を比較した。正規品のリベルサス®錠から蒸留水によりセマグルチドを抽出した後、内標準法による検量線と同様に希釈し、リベルサス®錠に含まれるセマグルチド含量を定量した。リベルサス錠の試買品 4 種に含まれるセマグルチドを正規品に対する含量比として算出した。

【結果】

2 種のセマグルチド標品を用いて作成した検量線を比較したところ、同一濃度の検量点におけるセマグルチドのピーク面積値は、Semaglutide sodium と比較して Semaglutide が約 3～4 倍高値であった。一方で、両検量線は、絶対検量線法、内標準法のいずれの手法でも良好な直線性を示した。内標準法によるセマグルチド検量線を用いて正規品リベルサス®錠を定量したところ、理論値通りの定量値が得られた。試買品 4 種について、正規品との比較により求めたセマグルチドの含量%は、97.3%から 143.3%の範囲にあった。

【考察】

試買品のセマグルチド含量が、正規品より高く算出された理由は不明である。錠剤からセマグルチド抽出時に、ばらつきが生じている可能性が考えられ、今後、抽出条件も含め、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[2]。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[3]。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。

令和 5 年度より、文献報告[4]を基に、液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC/MS) を用いたセマグルチドの定量法を構築している。これまでの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を明らかにした。また、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ことや、錠剤からのセマグルチド抽出・測定に関して、添加剤 SNAC の影響を取り除くことが課題として挙げられた。今年度も継続して定量法の構築に取り組んだ。

B. 研究方法

B-1 試料

標品として、Selleck Biotechnology 社 (Kanagawa, Japan) より Semaglutide sodium 1 mg (S9697, 現在の cat# E7333, Batch, S969701)と Semaglutide 1 mg (S9697, Batch, S969702)を購入した。AdipoGen Life Sciences 社 (San Diego, USA) より Liraglutide 1 mg (#AG-CP3-0034, Lot A01720)を購入した。リベルサス®錠 (正規品) は、3MG 製剤 (製造番号 MJG6999) を購入し、定量系の構築のためのポジティブコントロールとして用い

た。インターネットで試買した 21 サンプルのリベルサス錠 (3 mg 錠) のうち、4 サンプルを定量に使用した。

B-2 LC/MS による測定系の構築

B-2-1 内標準法による検量線の作成

各標準品の溶解性に基づき、1 mg/mL の濃度で MeOH に溶解した Semaglutide sodium、および 0.2 mg/mL の濃度で DMSO : MeOH = 9 : 1 に溶解した Semaglutide を 1 次ストック溶液とした。これらのストック溶液を 10 µM まで MeOH で希釈した後、500 nM リラグルチド MeOH 溶液を混合し、1 µM セマグルチド、50 nM リラグルチド混液を調製した。直ちに 50 nM リラグルチドを含む MeOH 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。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 : 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 : 0-7 min: 30-90% B, 7-

12 min: 90% B, 12-12.01 min: 90-30%

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)

Target ion: セマグルチド (C₁₈₇H₂₉₁N₄₅O₅₉)
[M+ 4H]⁴⁺, m/z 1029.2876 (Positive)

リラグルチド (C₁₇₂H₂₆₅N₄₃O₅₁) [M+ 4H]⁴⁺,
m/z 938.7453 (Positive)

サルカプロザートナトリウム
(C₁₅H₂₁NO₄) : [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

ベーパーライザ温度 : 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 錠剤からのセマグルチド抽出と定量

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

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)。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°C, 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°C, 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 MeOH を加えて 24.3 倍希釈し、10 μ M セマグルチドとした。さらに 500 nM リラグルチド溶液と混合し、1 μ M セマグルチド、50 nM リラグルチド混液を調製した。直ちに 50 nM リラグルチドを含む MeOH 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-2-1 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、試買品の定量では、検量線は使用せず、セマグルチドのピーク面積を正規品と比較した。LC の分離条件、及び MS 測定条件は方法 B-2-1 と同様にした。

C. 研究結果

C-1 内標準法による検量線の作成

セマグルチド標品は、Selleck 社からナトリウム塩として Semaglutide sodium が販売されているが、最近、フリー体である Semaglutide が販売された。リベルサス®錠のインタビューフォームによると錠剤に含まれるセマグルチドは、フリー体 (分子式 : $C_{187}H_{291}N_{45}O_{59}$ 、分子量 : 4113.58) と考えられた[1]。そこで、フリー体とナトリウム塩の両者の標品を用いて絶対検量線を作成して比較した。両検量線ともに良好な直線性を示したが、各検量点におけるセマグル

チドのピーク面積値の比較において、フリー体の標品が、ナトリウム塩の標品と比較して 3-4 倍高値であった (図 1a)。

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 の範囲で両検量線ともに良好な直線性が認められた。しかし、上述の各検量点におけるセマグルチドのピーク面積値の違いに起因して、両検量線の傾きは一致しなかった (図 1b)。

C-2 リベルサス®錠に含まれるセマグルチドの定量

図 2 に Semaglutide 標品 (フリー体、検量点 4.0 nM)、およびリベルサス®錠 (セマグルチド理論値 4.0 nM) から抽出されたセマグルチドと内部標準物質リラグルチドの SIM クロマトグラムを示す。リラグルチドは全サンプルに同濃度を添加しているが、その面積値は、標品サンプルと比較して錠剤サンプルが低く、錠剤に含まれる成分によるイオンサプレッションを受けている可能性が示唆された。

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 3 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 3.81 nM, 7.83 nM と定量され、理論値に対する定量値の割合 (%) は、それぞれ 95.3%, 97.9%であり、ほぼ理論値通りの定量値が得られた。

C-3 インターネットで購入した錠剤に含まれるセマグルチドの定量

インターネットで試買したリベルサス錠 4 検体のセマグルチド含量を正規品と比較した (図 4)。理論上 4 nM のセマグルチド

を含む試買品 2～5 のセマグルチド含量は、正規品に対してそれぞれ 129.5%, 143.3%, 97.3%, 127.4%と算出された。

D. 考察

昨年度までの検討により、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[5]。ポリプロピレンバイアルを用いて吸着への対策を行うことで、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明らかにした。本年度はセマグルチド標品として、ナトリウム塩、およびフリー体を用いて内標準法による検量線試料を作成した。昨年度と同様に SIM 法により測定した結果、両検量線は、良好な直線性を示したが、その傾きは一致しなかった。両標品ともに MeOH を用いて検量点溶液を調製したが、フリー体の検量点溶液はストック溶液からの DMSO の持ち込み (0.06%以下) があり、溶媒組成はわずかに異なる。溶液中に含まれる Na イオンや DMSO の影響でイオン化効率が両検量点溶液で異なることが示唆されるが、現時点でこの原因は不明である。リベルサス®錠のインタビューフォームから、錠剤中に含まれる主成分はフリー体のセマグルチドであることが予想されたため、以後はフリー体の Semaglutide 標品を検量線の作成に用いることとした。

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。正規品リベルサス®錠に含まれるセマグルチドの定量において、全試料に内部標準物質として 50 nM リラグルチドを含むように調製したにもかかわらず、検出された

リラグルチドのピーク面積値は、検量線試料と比較して錠剤からの抽出試料が低かった。昨年度の検討により SNAC の保持時間がリラグルチドと近接していることが明らかになっており、リラグルチドのイオン化が錠剤に多量に含まれる SNAC により抑制された可能性がある。MS による定量においてセマグルチドもリラグルチドと同等のイオン化抑制を受けると考え、内標準法により求めた検量線により、正規品リベルサス®錠を定量したところ、ほぼ理論値通りのセマグルチドを含有することが示された。

試買品の定量にあたっては、標品は用いず、SNAC 等の添加剤を同等に含むと考えられる正規品に対するセマグルチド含量比 (%) を算出した。試買品 4 種のうち、1 種は、正規品とほぼ等しい含量 (97.3%) を示したが、残り 3 種の含量は、正規品を大きく上回った (127.4%～143.3%)。本結果は、一回の測定結果であり、その再現性に関しては、現在、確認中である。一方で、研究班の結果から試買したリベルサス錠は、真正品であることが示唆されており、錠剤からの蒸留水によるセマグルチド抽出時に、ばらつきが生じた可能性がある。抽出溶媒の変更も含めて、今後検討を進めていく。

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。内標準法により検量線を作成し、正規品リベルサス®錠に含有されるセマグルチド含量を理論値通りに定量できることを示した。一方で、試買品に含有されるセマグルチドは、正規品との比較において、高い含量を示した。この理由は不明であるが、錠剤からセマグルチドの抽出がばらついている可能性があり、抽出法のさらなる検討が必要と考えられた。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. ChemicalBook サルカプロザートナトリウム
https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_JP_CB62739113.htm
3. 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！－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－」<https://www.kokusen.go.jp/pdf/n->

20200903_1.pdf

4. 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.
5. 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.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
北尾 美結、高橋 知里、徳川 宗成、中島 花奈、Zhu Shu、木村 和子、吉田 直子、前川 京子、LC/MS 法を用いた GLP-1 受容体作動薬セマグルチド測定法の構築、日本薬学会関西支部、2025 年 10 月 4 日（京都）

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

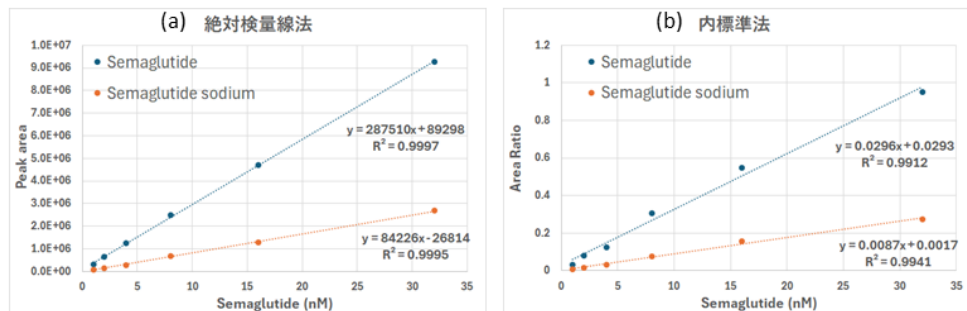
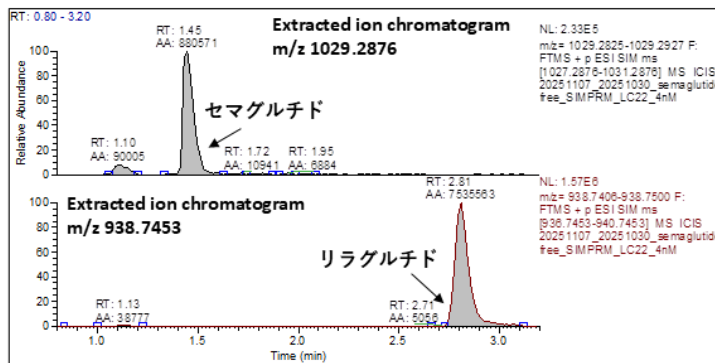


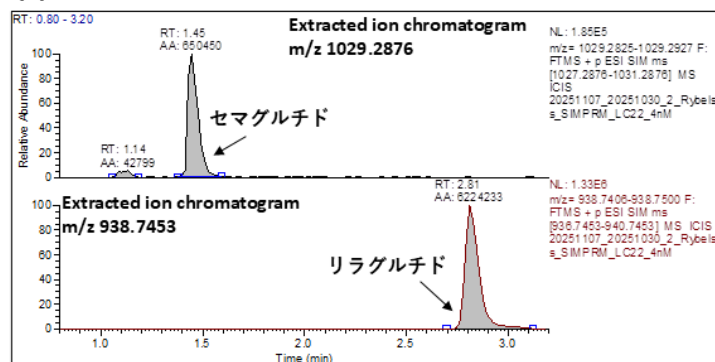
図1. 2種の標品試料における検量線の比較

(a) Semaglutide 標品（検量点4.0 nM）



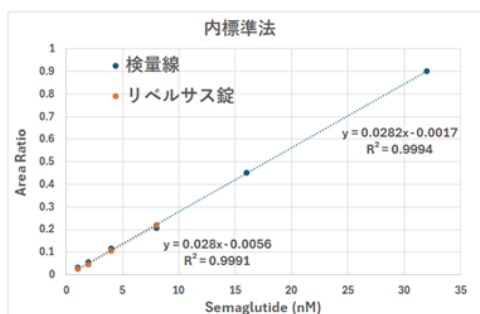
	RT (min)	ピーク面積	Ratio
セマグルチド	1.45	880571	0.117
リラグルチド	2.81	7535563	

(b) リベルサス錠（セマグルチド理論値4.0 nM）



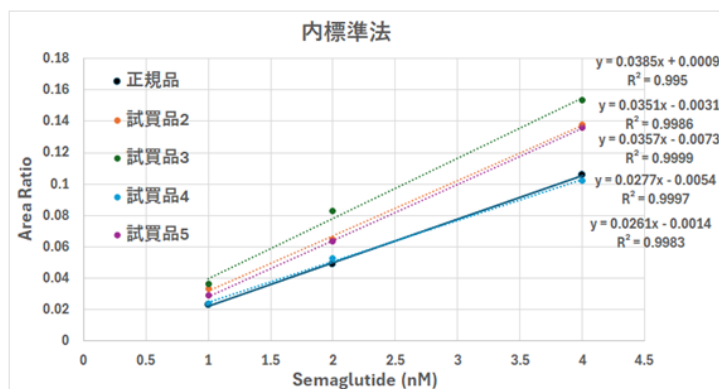
	RT (min)	ピーク面積	Ratio
セマグルチド	1.45	650450	0.105
リラグルチド	2.81	6224233	

図2. SIM法による標品及びリベルサス錠に含まれるセマグルチドの検出



定量法	Semaglutide 理論値 (nM)	定量値 (nM)	Ratio (%) (理論値 / 定量値)
内標準法	4.0	3.81	95.3
内標準法	8.0	7.83	97.9

図3. 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



サンプル	Semaglutide 理論値 (nM)	定量値 (nM)	Ratio (%) (理論値 / 定量値)
試買品2	4.0	5.18	129.5
試買品3	4.0	5.73	143.3
試買品4	4.0	3.89	97.3
試買品5	4.0	5.10	127.4

図4. リベルサス®錠（正規購入品）と試買品との成分含量比較