

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590616
 研究課題名（和文） いわゆる健康食品に混入された医薬品的成分の段階的検索法の構築
 研究課題名（英文） Studies on detecting system of medicinal ingredients as adulterants in health foods

研究代表者
 三上 栄一（MIKAMI EIICHI）
 愛知県衛生研究所 衛生化学部医薬食品研究室長
 研究者番号：80450865

研究成果の概要：いわゆる健康食品の品質を確保し、安全性を明確にするため、製品に混入される恐れのある健康被害惹起成分をできるだけ簡便で、迅速に、精度高く検索する実用的な評価手法について考案した。分析の第 1 段階として TLC を応用したスクリーニング確認法、第 2 段階として検出された物質をさらに高感度、高精度な方法で確認、定量するために HPLC 法を採用した。さらに第 3 段階として、物質を同定するため、質量に関する情報が得られる GC/MS または LC/MS 法を最終同定法として位置付ける段階的検索法を構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	140,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：健康食品、健康被害惹起成分、スクリーニング確認、ダイエット食品、医薬品的成分、

1. 研究開始当初の背景

近年の代替医療指向を受けていわゆる健康食品が、栄養補給や健康増進を目的として店頭販売だけでなく新聞・雑誌、インターネット広告による通信販売で流通している。製品の多くは民間療法として伝承されているものであるが、なかには効果を増強させるため医薬品的成分を添加し、また毒性成分の混入された事例がある。2002 年には、中国で製造されたいわゆるダイエット食品を購入、摂

取した 800 名を超える消費者が、肝障害など健康被害を引き起こし、このうち女性 3 名が死亡した。また 2005 年にもダイエット食品摂取者の死亡が報告され、同様な消費者の健康被害事例はあとを絶たない。健康食品の入手に限らず、これまで製品の購入は販売店から購入するのが一般的であったが、インターネットの普及により、国内のみならず海外からも個人が簡単に購入できるようになった。流通、販売、購入など形態の変化は、情報の

多様化、国際化が進展することによって新たに生ずる問題であり、今後も消費者自らが気付かないうちに健康被害の危険に晒される同様な被害事例の発生が、懸念される。

市中に出回る健康食品の有効性と安全性を確保するためには、迅速かつ正確な品質評価データを基に不良製剤の速やかな発見と発生防止が不可欠となる。しかし、夾雑物の多い多様な健康食品に混入された医薬品的成分を効率的に分析することは容易ではなく、成分を効率的にスクリーニング分析するための方法が必要となり、早急に関連する実用的な評価手法を考案、構築することが望まれている。こうした研究によって、公衆衛生試験機関などでの医薬品試験の質と量の向上が期待できる。すなわち、国民の健康づくりを支援する科学的調査手段として、社会に流通している健康食品の品質、有効性および安全性を確保でき、消費者の保健衛生福祉の向上に寄与することが可能となる。

2. 研究の目的

医薬品成分の混入された製品は、本来医薬品に該当し薬事法違反（無承認無許可医薬品）であるにもかかわらず、食品と称して製造、輸入又は販売されている。著者らは、このような違法な製品が社会に流通することによって引き起こされる健康被害を未然に防ぐため、効能などを暗示あるいは標ぼうしている製品に関し、その内容から添加を疑われる医薬品的成分の含有について調査を行ってきた。現在まで、痩身成分であるマジンドール（MAZ）やシブトラミン（SIB）、強壮成分であるシルデナフィルやフェントラミン、抗炎症成分であるデキサメタゾン（DEX）、向精神薬であるジアゼパム（DIA）などの混入事例を専門誌、新聞等の媒体により公表し、消費者に注意喚起し、情報提供を行ってきた。いわゆる健康食品は、あくまで食品として取り扱われるため、全成分が必ずしも表示されているものではなく、試験、調査するにあたり、分析者の経験も乏しくかつ高度な技術を要する。すなわち製品品質を確保し、有効性、安全性を明確にする迅速、簡便で、精度の高い実用的な評価法の段階的確立が必要となる。しかし、夾雑物の多い健康食品から医薬品的成分を検出することは容易ではないため、近年は特に複雑な反応や高価で特殊な装置に依存した分析法に頼る傾向が強い。健康食品の品質確保を目的とした評価法で必要なことは、①何処にでもある一般的な、操作が簡便で安価な装置を用い、迅速に成分確認が可能となる方法の確立、②標的物質の存在が確認されたら、一段と高感度、高精度な定量が出来る方法の確立、③次いで、②の段階の結果をさらに高度、精密に同定できる解析

手段の開発である。

本研究では、健康食品中に混入される恐れのある成分を効率的にスクリーニング検出し、さらに高精度な同定手法を段階的に構築することを目的とした。このうち薄層クロマトグラフィー（TLC）は、安価で簡易な方法でありながら、条件設定を工夫すると試料中に含まれた成分の全容を一目で確認でき、同時に多検体を処理できる利点がある。液体クロマトグラフィー（HPLC）は、精度よく定量でき、フォトダイオードアレー（多波長）検出器を併用した時、クロマトグラム上に現れたピークの保持時間、吸収スペクトルから成分を正確に確認・定量が可能となる。ガスクロマトグラフィー／質量分析計（GC/MS）と液体クロマトグラフィー／質量分析計（LC/MS）は、高価な機器設備と熟練技術者を必要とするが成分の質量に関する情報が得られるため、高精度な確認が可能となる。また酵素免疫測定法（ELISA）は、特定抗原に対する抗体が存在する物質に高感度、特異的に測定可能となる。これらの分析手法の特徴を組み合わせながら、違法な医薬品、不純物成分の混入した健康食品を確認、定量、同定する段階的評価の基本検索法を検討した。こうした研究の成果を学術雑誌、学会、ホームページで公表することによって、衛生試験機関での医薬品、食品試験の質と量の向上に寄与できる。

3. 研究の方法

市販のいわゆる健康食品に混入された違法な成分を検出するため、分析の第1段階として、物質の有無を検索する手段として有効なTLCを応用したスクリーニング確認法の採用を検討した。第2段階として、検出された物質をさらに感度高く精度よい方法で確認、定量するためにHPLCを用いる方法を検討した。第3段階として、物質そのものを同定するため、その質量に関する情報が得られるGC/MSまたはLC/MS法を最終同定法として位置付けることを検討した。以上3段階の確認、定量、同定手法にそれぞれ工夫を凝らしながら、成分混入が疑われた市販の健康食品から違法な薬物混入を検索する手法の構築を目指した。一方、従来の段階的な分析法や医薬品の化学的性状に基づいた夾雑物除去操作を取り入れた迅速簡便法などでは分析困難な甲状腺ホルモンなど生体高分子物質の検出には、ELISAの導入を検討した。また、著者らの構造類似化合物分析法、薬効別医薬品分析法の報告例を参考とし、HPLC、GC/MSあるいはLC/MSなどの機器分析に適應できる試料調製法、多成分スクリーニング検出法、検索法を検討した。

4. 研究成果

(1) 複数のイオン化法を用いた GC/MS によるダイエット健康食品中医薬品成分の同時検索法の検討

ダイエット健康食品中に高頻度で検出されるフェンフルラミン、*N*-ニトロソフェンフルラミン (NFE)、SIB、MAZ、フェノールフタレインについて、GC/MS を用いたスクリーニング同時検索法の検討を行った。試料の内容粉末に既知濃度薬物を添加し、メタノールを加え 10 分間超音波抽出した後、遠心分離し、試験溶液を調製し、添加回収試験を行った。また、市販品の試験溶液も同様に調製した。電子イオン化法 (図 1) 及び化学イオン化法にて測定する最適化条件を検討したところ、各イオン化モード共に良好な回収率 (90%以上) と定量結果を得ることができた。本法により、5 成分は 13.5 分以内に分析でき、かつ単一機器における複数のイオン化法を用いることで異なる条件として試験を実施することが可能なため、確認試験としても精度が高い。このことから、成分検出の信頼性を高めることが可能となり、分析法の有効性が示された。

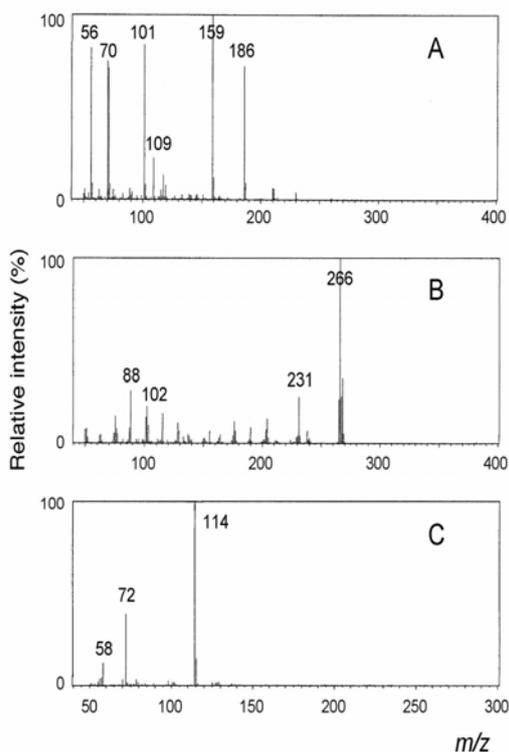


図 1. NFE (A)、MAZ (B) 及び SIB (C) の GC/MS スペクトル

(2) いわゆる健康食品に添加される恐れのある副腎皮質ホルモンの同時検索法の検討

抗炎症効果を暗示させる健康食品が数多く販売されているため、混入される恐れのある

酢酸コルチゾン、酢酸フルドコルチゾン、ヒドロコルチゾン、酢酸パラメタゾン、DEX、トリアムシノロン、ベタメタゾン (BET)、プレドニゾン及びメチルプレドニゾンの 9 種の内用副腎皮質ホルモンの同時検索法について、検討した。これらの化合物はステロイド骨格を有し、構造が類似しているため、HPLC/多波長検出器を用いて分析し、市販品調査に応用した。標準溶液及び試料溶液の保持時間、ピークの吸収スペクトルから各成分の存在の有無を確認し、それらが一致した DEX、BET は分離作用が異なる充填剤 (逆相と π 電子分離) カラムを用いることにより、標準品との異同を判定した。移動相が薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル混液 (27:73) のとき、45 分以内で 9 種薬剤の同時検索が可能となった。

(3) いわゆる健康食品に添加される恐れのある向精神薬の同時分析法の検討

リラックス効果を標ぼうした健康食品が数多く販売されており、中には効果を增强させるために医薬品を添加している事例が報告されている。そこで、健康食品に添加される恐れのある薬物として、オキサゾラム、ニトラゼパム、オキサゼパム (OXE)、トフィゾパム (TOF)、トリアゾラム、クロチアゼパム、DIA の 7 種の催眠鎮静作用、抗不安作用を有する向精神薬の同時検索法について、検討した。これらの化合物はベンゾジアゼピン骨格を有し、構造が類似しているため、HPLC/多波長検出器を用いて分析し、市販品調査に応用した。標準溶液及び試料溶液の保持時間、ピークの吸収スペクトルから各成分の存在の有無を確認し、それらが一致した場合は LC/MS により、標準品との異同を判定する方法について検討した。移動相に 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを加えることで OXE と TOF が完全に分離した。また、pH を 2.4 に調製することにより、20 分以内で 7 薬剤の同時分析が可能となった。DIA が検出された市販品については、最適化条件を検討した LC/MS 法により分析し、最終同定した。

(4) 健康食品に添加が疑われるダイエット成分甲状腺ホルモン (チロキシン、T4) の分析法の開発

生体高分子物質である甲状腺ホルモンの主生理活性成分 T4 の分析には、HPLC 法は適用できず、LC/MS 法を用いた分析のみが報告されてきた。LC/MS による分析は精密で微量測定も可能であるが、高価な機器設備と熟練技術者を必要とする。また分析の前処理として、試料を酵素で分解した後液々分配で精製するため、操作に長時間を要するなどの問題がある。こうした機器分析にともなう諸問題を解決するため、本研究では迅速・簡便・高感度な新たな T4 スクリーニング法として、ELISA を応用することを目的とし、検討を加

えた。ELISA 法は、検出したい物質の特定抗体が開発された化合物にのみ可能であるが特異性は高い。主として臨床検査分野で汎用されてきた市販の T4 検査キットを用い、健康食品からの遊離型 T4 の検出を試みたところ、検出結果（13 検体、うち陽性 4 検体）は LC/MS（図 2）による検出結果と全く同一であった。なお、ELISA による T4 の検出限界は、若干の余裕をもたせ $0.02 \mu\text{g/mL}$ （キット下限値 = $0.005 \mu\text{g/mL}$ 、LC/MS 下限値 = $0.5 \mu\text{g/mL}$ ）とした。迅速、簡便な T4 スクリーニング法としての ELISA の有用性が示された。

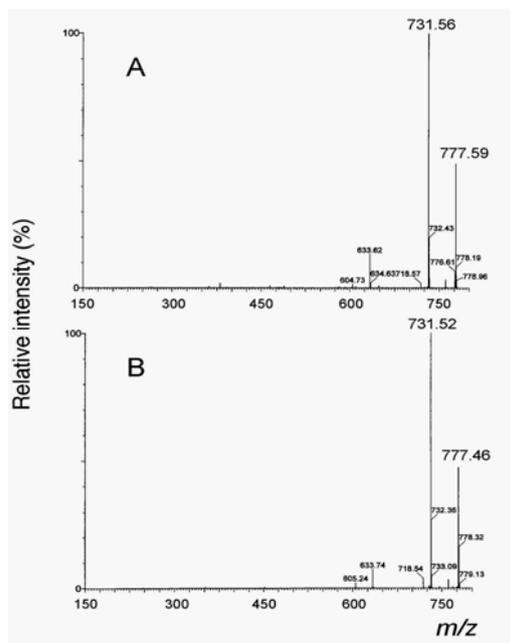


図 2. T4 の LC/MS スペクトル
A: 検体、B: 標準品

(5)逆相 TLC/スキャニングデンシトメトリーによる生薬分析法の検討—ヤクチ、インヨウカク、シコン、ダイオウ、モッコウ、クジンの確認試験—

健康被害惹起成分のうち、生薬由来のものは少なくない。生薬をスクリーニング確認するために用いられてきた順相 TLC の展開溶媒は、従来からクロロホルム、ジクロロメタン等のハロゲン系溶媒が汎用されてきた。逆相 TLC は、有害試薬の使用を低減化させ、かつ Rf 値の再現性に優れているため、多成分を含有している生薬分析に有効とされる。展開溶媒として水、アセトニトリル、メタノール、n-ヘキサン、2-ブタノールの溶媒系を用い、生薬の主成分（オキシマトリン、ノートカトン、コスツノリド、イカリイン、センノシド A、アセチルシコニン）を指標とした確認試験法を検討した。その結果、他の共存成分と分離された単一なスポット (Rf 値 0.43 から 0.61) を得ることができた。また、スキャニングデンシトメータを併用することにより、主成分

を、簡易、迅速、確実に同定することが可能となった。

(6)未知医薬品成分分析手順の考案

いわゆる健康食品に違法な医薬品成分の添加がある場合、迅速に製品の品質を評価し、消費者の健康を護るため、筆者は、起こりうる医薬品成分の混入事例を大きく 3 区分し、対応策を考案した。成分を検出するため、分析の第 1 段階として、成分の全容を一目で確認でき、同時に多検体を処理できる TLC を応用したスクリーニング確認法を採用した。第 2 段階として、検出された物質をさらに感度高く精度よい方法で定量するために HPLC を用いた。多波長検出器を併用した HPLC はこの目的に有用であった。第 3 段階として、質量に関する情報が得られる裁判化学的な同定法として LC/MS 法を位置付けた。一方化学構造がすこぶる類似した医薬品成分の確認・同定が必要な混合物から、それぞれの物質を簡便に HPLC 法により同時分析できる方法を確立した。さらに、上記の段階的なクロマトグラフィーが適用できない生体高分子には、ELISA を導入した。

本研究では、違法な医薬品の混入した試料を確認、定量、同定する段階的評価の操作例、及び従来、複雑な前処理操作にかかる労力と時間が不可欠であった類似化合物、あるいは生体高分子医薬品に対する簡便な分離・同定の操作例を検討した。こうした研究によって、違法な医薬品成分を迅速かつ簡便に検出する手法を考案した。その結果、薬事法違反を取り締まる科学的調査手段として、消費者の保健衛生福祉に寄与することが可能となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ①池田清栄、三上栄一、大野 勉、逆相 TLC/スキャニングデンシトメトリーによる生薬分析—ヤクチ、インヨウカク、シコン、ダイオウ、モッコウ、クジンの確認試験—、生薬学雑誌、63、6-9、2009、査読有
- ②三上栄一、医薬品成分が検出されたいわゆる「健康食品」について、愛知県薬剤師会誌「薬苑」、No55、52-56、2008、査読無
- ③上野英二、椛島由佳、大島晴美、大野 勉、NCIモード GC/MS およびデュアルカラム GC-マイクロECD による畜水産物中残留農薬の多成分分析、食品衛生学雑誌、49、390-398、2008、査読有
- ④三上栄一、池田清栄、大野 勉、最近のいわゆる「健康食品」に混入された医薬品成分の検出状況に関する検討、社会薬学、26、

17-19、2008、査読無

⑤三上栄一、池田清栄、大野 勉、ダイエット用健康食品（美秀堂、加強型）に添加された医薬品成分の検索、愛知県衛生研究所報、58、29-35、2008、査読無

⑥Yuko Ito, Tomomi Goto, Sadaji Yamada, Tsutomu Ohno, Hiroshi Matsumoto, Hisao Oka, Yoichiro Ito、Rapid determination of carbamate pesticides in food using dual counter-current chromatography directly interfaced with mass spectrometry、J. Chromatogr. A、1187、53-57、2008、査読有
⑦大野 勉、三上栄一、池田清栄、逆相TLC/スキャンニングデンシトメトリーによる生薬分析—オウゴン、シャクヤク、カンゾウ、アロエ、ボタンピ、センブリ、オウレン、センナの確認試験—、愛知県衛生研究所報、58、49-53、2007、査読無

〔学会発表〕（計10件）

①山本新也、近藤裕一、鈴木 勝、山内俊平、墨岡成治、三上栄一、大野 勉、宮本謙一、複数のイオン化法を用いたGC/MS/MSによる

ダイエット健康食品中医薬品成分の同時分析、日本薬学会129年会、2009.3.26、京都

②大野 勉、池田清栄、三上栄一、逆相TLC/スキャンニングデンシトメトリーによる生薬分析—サイコ、アカメガシワ、サンシュユの確認試験—、第37回生薬分析シンポジウム、2008.12.5、大阪

③池田清栄、三上栄一、大野 勉、エボジアミン及びルテカルピンを指標としたゴシュユの品質評価、日本生薬学会第55年会、2008.9.20、長崎

④伊藤裕子、館井浄子、渡邊美奈恵、大島晴美、三上栄一、大野 勉、HPLCによるうなぎ蒲焼き中のマラカイトグリーンおよびロイコマラカイトグリーンのスクリーニング分析法、第96回日本食品衛生学会学術講演会、2008.9.18、神戸

⑤Eiichi Mikami, Seiei Ikeda, Tsutomu Ohno、Detection of pharmaceutical adulterants in slimming supplements、The 8th Asian Conference on Clinical Pharmacy、2008.7.3、Indonesia、Surabaya

⑥池田清栄、三上栄一、大野 勉、いわゆる健康食品中のシネフリン及びカフェイン含量について、日本薬学会第128年会、2008.3.27、横浜

⑦上野英二、椛島由佳、大島晴美、大野 勉、多成分分析法による畜水産食品中の農薬残留実態調査 NCIモードGC/MSおよびGC- μ ECDによる分析、第94回日本食品衛生学会学術講演会、2007.10.27、静岡

⑧三上栄一、池田清栄、大野 勉、最近のいわゆる「健康食品」に混入された医薬品成分の検出状況に関する検討、日本社会薬学会第

26年会、2007.9.17、千葉県野田

⑨池田清栄、三上栄一、大野 勉、逆相TLC/スキャンニングデンシトメトリーによる生薬分析(6)—タクシャ、ボウイ、キジツ、ケイヒ、ビンロウジ、キクカの確認試験—、日本生薬学会第54回年会、2007.9.14、名古屋

⑩Eiichi Mikami, Seiei Ikeda, Tsutomu Ohno, Hiroo Ishihara, Mikio Nishida、Case study of pharmaceutical adulterants in dietary supplements in Japan during 2006、The 7th Asian Conference on Clinical Pharmacy、2007.7.7、China、Shanghai

〔図書〕（計1件）

①「食品テロにどう備えるか？—食品防御の今とチェックリスト」編者：今村知明、分担執筆：大野 勉他、日本生活共同組合連合会出版部、2008

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/3f/levi.html>

http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/3f/ken_shoku6.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 栄一 (MIKAMI EIICHI)

愛知県衛生研究所 衛生化学部医薬食品研究室長

研究者番号：80450865

(2) 研究分担者

大野 勉 (OHNO TUTOMU)

愛知県衛生研究所 衛生化学部長

研究者番号：50450862

池田 清栄 (IKEDA SEIEI)

愛知県衛生研究所 主任

研究者番号：20450869