

Fig. 5 HPLC profile of Onshido-Seishiso at UV 210 nm (upper) and UV 254 nm (lower)

C-5 御芝堂清脂素の分析

「御芝堂減肥膠囊」の旧製品とされる「御芝堂清脂素」は、わが国では、2001年7月時点において、健康食品として輸入され流通していた。厚生労働省から入手した「御芝堂清脂素」について分析を行ったところ、上記3製品には微量しか含まれていないFFが約2%検出されたが、NFFは検出されなかった。更に、HPLCによりプロファイル分析を行った結果、「御芝堂減肥膠囊」とはかなり異なるパターンが得られ(図5)、両者は、明らかに異なる成分組成であることが判明した。

C-6 未承認医薬品3製品のロット分析

「御芝堂減肥膠囊」については、入手できた4ロットについて分析を行った。その結果、2001年9月28日及び11月10日製造の製品では、1%台のNFF含量であったが、2002年2月15日の製品では、4.4%、3月3日の製品では、5.2%の含量となり、2002年にNFF含量が大幅に増加したことが判明した。なお、2002年2月16日の製品について、「都道府県が個別に分析した結果、約5%のNFF含量を報告しており、我々の結果を裏付けるものとなった。

「紆之素膠囊」も同様に入手できた4ロットについて分析を行った。その結果、2000年5月28日製造の製品(甲状腺末が2000年12月に検出されたもの)でNFF含量が0.1%であり、2001年10月18日以降、2.3~3%の含量であった。また別に都道府県で分析された製品では、10月8日、12日製造品で、約3%の含量が報告されている。

「茶素減肥」に関しては、健康食品として輸入され国内で流通していた商品があり、今回の事件に関連して未承認医薬品として収去された。収去されたものは、その製造年月日から2001年6月8日~2002年6月24日の間に製造された14のロットに分類される。これらの製品について、HPLCを用いNFF含量の分析を行った。その結果、1ロットを除き2.3%~3.5%(平均2.8%)のNFFが検出された。他方、製造年月日が2001年10月28日の製品では、NFFは検出されなかった。なお、同一の製造年月日の同製品で、厚生労働省が2002年7月12日に公表した健康被害事例に係る製品(肝障害、外来受診事例)から、NFFが約3%検出されている。

本製品は、被害者本人が個人輸入したものである。従って、国内流通品と個人輸入品では、異なるロット管理が行われている可能性がある。FFが微結晶状の粉末で入手できるのに対し、NFFは合成の文献上も、国立衛研での合成品もオイルである。従って、全体が粉体である未承認医薬品のカプセル含有物の中に均一に混ぜ合わせるのには難しいものと推定される。収去した国内流通品と、個人輸入した製品は、カプセル、ヒートシール、外箱の外観・表示は同一であった。以上のことを考え合わせると、同一ロットの中で、NFFの分布が異なっているが製品が存在した可能性も考えられる。

以上、製品の製造年月日別にNFF含量を明らかにした結果を表1にまとめた。

「御芝堂減肥膠囊」では、2001年6月頃より肝障害の発生が報告されているが、その件数は少ないことが明らかとなっている(2001年6月~2002年2月の総数19件、月2.1件)。しかし、2002年3月以降、肝障害事例の増加が始まり、特に5月以降、外来受診事例が急激に増加している(3月~4月:総件数15件、月7.5件、5月~7月:総件数80件、月40件、うち外来は、総件数56件、月28件)。このような肝障害の発生事例件数の増加は、同製品のNFF含量の増加と同調しており、NFFが肝障害の原因物質である可能性を示唆しているものと考えられる。

「紆之素膠囊」では、肝障害発生の傾向は、2001年6月頃から始まっているが、他の2製品と異なり、被害は、当初、拡大傾向を示したのち、2001年10月~11月には一旦収束、その後、再び被害が発生し、2002年2月にまた収束している。このように、2002年2月頃までは、被害の発生状況にムラがあり、一定の傾向が見られなかった。これは、この当時、流通していた本製品中の肝障害原因物質の濃度が、一定していなかつたためと考えたと説明可能である。その後、2002年3月からは、被害発生件数が上昇し、一定の発生状況になった後、2002年7月に、発生件数が急激に上昇している。

(2002年7月の増加は、外来受診事例が急増したことによる。)2002年7月の外来の急増は、事件が報道されたことによる例外として考えれ

ば、全体的に見て 2001 年 6 月以降、被害の発生は概ね横這いと考えられ、「御芝堂減肥胶囊」の 2002 年 5 月以降のような激しい増加傾向は

見られない。このような被害発生傾向も、上記 NFF のロット分析の結果とうまく同調しているように見える。

Table 1 Content of N-nitroso-fenfluramine in sliming pills

Name of pill	Date of manufacture	Content (%)
Onshido-Genpikono	Sep.28, 2001	1.0
Onshido-Genpikono	Nov.10, 2001	1.4
Onshido-Genpikono	Feb.15, 2002	4.4
Onshido-Genpikono	Mar.3, 2002	5.2
Sennomoto-Kono	May 28, 2000	0.1
Sennomoto-Kono	Oct.18, 2001	3.0
Sennomoto-Kono	Jan.28, 2002	2.3
Sennomoto-Kono	Mar.18, 2002	3.0
Chaso-Genpi	Jun. 8, 2001	3.4
Chaso-Genpi	Jul.8, 2001	2.3
Chaso-Genpi	Aug.8, 2001	3.5
Chaso-Genpi	Aug.28, 2001	3.4
Chaso-Genpi	Oct.28, 2001	0
Chaso-Genpi	Jan.28, 2002	3.4
Chaso-Genpi	Feb.18, 2002	3.1
Chaso-Genpi	Apr.1, 2002	3.3
Chaso-Genpi	Apr.26, 2002	3.2
Chaso-Genpi	May.26, 2002	2.4
Chaso-Genpi	Jun.6, 2002	2.4
Chaso-Genpi	Jun.24, 2002	2.3

「御芝堂減肥胶囊」と「紆之素胶囊」では、「茶素減肥」に比べ、肝障害発症までに長期間を要した事例が見られ、特に、紆之素胶囊には被害発生まで 540 日も要している事例が報告されている。NFF を原因物質と仮定した場合、これは服用開始後、相当の期間にわたり、2000 年 5 月製造品のように発症に至らない程低の低濃度（0.1%）暴露されたためと考えると合理的に説明可能である。

「茶素減肥」は 2001 年 1 月から健康食品として輸入され国内販売されている。また、他の 2 品目も国内販売されていないが、2000 年には個人輸入で入手可能であった。また、「茶素減肥」中の NFF は平均して 2.8%（2001 年 6 月

28 日製造品以降）含まれており、この値は、他の 2 製品と比較して特に低い値ではない。他方、同製品の健康被害報告は 17 件と、他の 2 製品（それぞれ 115 件、105 件）と比べて少ない。NFF を原因物質と仮定すると、このような関係は、一見説明しにくいように思える。しかし、商品に表示してある服用量が、他の 2 製品では 1 日 12 カプセルであるのに対し、「茶素減肥」では、6~9 カプセルとなっており、実際上の服用量も少ないことが報告されている。従って、原因物質の摂取量が少なくなったため、肝障害の発生件数が少ないものと考えれば、矛盾なく説明できる。

D. 結論

中国から輸入された、未承認医薬品のうち、特に健康被害の多い3製品「御芝堂減肥膠囊」、「紆之素膠囊」、「茶素減肥」について製品分析を行い、これらの製品に3%程度のNFFが含まれていることを明らかにした。さらに、NFF含量について、各製品のロットごとに分析を行った結果、NFFが肝機能障害の原因物質とすると、健康被害の発生状況と分析結果に矛盾が生じないことが明らかとなった。また、3製品のプロフィールは互いに類似しており、NFF以外に、共通して nicotinamide, gallic acid, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, caffeine, catechin, riboflavin, epicatechin, epigallocatechin gallate, gallic acid, epicatechin gallate を含んでいることが判明した。NFF以外の物質は、日常的に食品から摂取される物質であり、肝機能障害の原因物質の可能性をもたず、この点からも NFF が原因物質である可能性が高いものと考えられた。

E. 健康危機情報

3製品の含有成分として明らかになった化合物のうち、NFF以外は健康危機を引き起こす化合物とは考えられない。

F. 研究発表

論文発表
なし

学会発表等

- 1) Goda, Y.: Health damaged diet pills imported from China and studies on their analyses, International Seminar on Harmonization of Oriental Herbal Medicine, KFDA, Seoul, September 26 (2002).
- 2) 合田幸広：未承認医薬品の分析、第39回全国衛生化学技術協議会年会薬事部門自由集会、山形（2003.Oct.5）。
- 3) 合田幸広：生薬分野での最近の話題、第31回生薬分析シンポジウム、神戸（2003.Nov.14）。
- 4) 鎌倉浩之、代田修、川原信夫、合田幸広：未承認医薬品の成分分析について、日本薬学会第123年会、長崎（2004.Mar.29）。

厚生労働科学研究補助金（特別研究事業）
未承認医薬品及び健康食品の成分の分析、単離、構造決定並びに
分析法の検討

分担研究報告書

毒性試験用 N-ニトロソ-フェンフルラミン大量分取に関する研究

分担研究者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長

中国製ダイエット食品（未承認医薬品）の健康被害事例のうち最も重篤な肝機能障害の原因物質解明を目的として、肝機能障害の候補物質の一つである N-ニトロソ-フェンフルラミン（NFF）について、収去品（茶素減肥）の大量抽出並びに大量分取を試み、予備毒性実験に供出した。さらに、NFF 以外の他の未知成分については抽出エキスの成分検索並びに、単離物質の構造解析を行った。

協力研究者

川原 信夫（国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長）

A. 研究目的

中国から輸入されたダイエットを目的とした複数の未承認医薬品及び健康食品により、全国で 800 名以上の健康被害が発生し、大きな社会問題となっている。健康被害事例の約半数は「御芝堂減肥胶囊」、「紵之素胶囊」、「茶素減肥」の 3 製品（いずれも未承認医薬品）が原因とされている。未承認医薬品による健康被害事例の多くは肝機能障害であり、次いで甲状腺障害となっている。障害事例のうち特に肝機能障害は重篤であり、4 名の死亡者が発生している。健康障害が報告された未承認医薬品の中には、これまでも甲状腺末が含まれていることが報告された製品（紵之素胶囊）があり、含有する甲状腺末により、甲状腺障害が生じた可能性が示唆されるが、肝機能障害に関与する成分については、これまでに全く報告がない。

国立医薬品食品衛生研究所における現在までの分析データより、これらの未承認医薬品のほとんどすべてから、N-ニトロソ-フェンフルラミン（NFF）が高濃度で検出されている。NFF はその構造から、肝臓に蓄積し易いものと推定されることから、肝機能障害の原因物質の候補の一つとなっている。しかし同物質の毒性や薬理活性については全く実験的な知見の蓄積がない。したがって、NFF が肝臓障害の原因物質とは断定できない状況であり、同時に他の未知の化学物質が肝臓障害を引き起こしている可能性も否定できない。

そこで今回、肝機能障害の原因物質解明を目的として、肝機能障害の候補物質の一つである NFF については、収去品（茶素減肥）の大量抽出を行い、予備毒性実験に必要な量（約 10 g）の分取を試みた。さらに、NFF 以外の他の未知成分については抽出エキスの成分検索並びに、単離物質の構造解析を行った。

B. 研究方法

本実験では富山県において収去した茶素減肥 (2002. 6. 24.製造) 120 カプセル入り 40 箱を開封し、カプセル内容物 (1154 g) を原料として使用した。カプセル内容物は約 300 g ずつ 4 分割し、それぞれ室温でヘキサン (5.5 L)、酢酸エチル (2.0 L)、メタノール (2.0 L) で順次冷浸し、抽出を行った。各分画を濃縮、乾固し、ヘキサン分画 (55 g)、酢酸エチル分画 (90g)、メタノール分画 (301 g) を得た (Chart 1.)。

初めにヘキサン分画 (約 50 g) をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル) で分離を行い、9：1 の溶出分画より NFF を得た (Chart 1.)。次に酢酸エチル分画 (12.0 g) をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム：メタノール) で分離を行い、14：1 の溶出分画 (1.01 g) を MPLC (クロロホルム：メタノール=34：1) で分取し、カフェイン (123 mg) 及びニコチン酸アミド (112 mg) を単離し、それぞれ標品 (和光純薬) との直接比較により同定した。

最後にメタノール分画 (29.6 g) をダイヤイオン HP-20 を用いたカラムクロマトグラフィー (メタノール：水) で分離を行い (Chart 2.)、100%メタノール溶出分画 (530 mg) について逆相系カラムを用いた MPLC で分取し、50%メタノール溶出分画よりピリドキシン (5.0 mg) を単離し、標品 (和光純薬) との直接比較により同定した。さらに 100%メタノール溶出分画 (216 mg) について以下の HPLC 条件で分取を行った。

分取条件

HPLC : JASCO GULLIVER System

送液ポンプ : PU-986

検出器 : UV-970 (211, 254 nm)

カラム : Inertsil PREP-ODS 10 μ m

20 ϕ \times 250mm (GL Science)

カラム温度 : r.t.

移動相 : H₂O/CH₃CN = 40/60, 41/59, 25/75

H₂O/MeOH = 45/55

流速 : 10.0 mL/min

まず、検出波長 211nm、移動相に 40%アセトニトリルを用いて分離を行い、5 分画 (Fr. 1 ~ 5) を得た。主スポットの認められた Fr. 5 (103 mg) を引き続き移動相に 75%アセトニトリルを用いて分離し、化合物 1 (6.7 mg) を得た。また、Fr. 4 (12.8 mg) は移動相に 55%メタノールを用いて分離し、化合物 2 (0.8 mg) を得た。さらに Fr. 2 は移動相に 41%アセトニトリルを用いて分離し、化合物 3 (0.7 mg) を得た (Chart 2.)。これらの化合物 1 ~ 3 について各種スペクトルデータによる構造解析を行った。

C. 研究結果

ヘキサン分画 (約 50 g) はシリカゲルクロマトグラフィーを用いて繰り返し分離し、ヘキサン：酢酸エチル (14：1) の溶出分画より最終的に NFF 約 10.4 g を得た。また酢酸エチル分画よりカフェイン及びニコチン酸アミド、さらにメタノール分画よりピリドキシンを得た。

メタノール分画より単離された化合物 1 は無色油状物質として得られ、¹H NMR スペクトルにおける δ 7.70 (2H, m) 及び 7.50 (2H, m) のシグナルより 1, 2 置換ベンゼン環の存在、並びにその化学シフトよりカルボニル炭素が結合していることが示唆された。また δ 4.27 (4H, t, $J = 6.7$ Hz)、1.70 (4H, m)、1.39 (4H, m)、1.30 (8H, m)、0.88 (6H, t, $J = 6.4$ Hz) のシグナル及び ¹H-¹H COSY、HMQC スペクトル等より 2 対の直鎖状ヘキシルアルコールの存在が明らかとなった (Fig. 1)。さらに HMBC スペクトル

ルにおいて δ 7.70 及び 4.27 のプロトンと δ 167.7 のカルボニル炭素の間に相関が認められたことより、**1** はフタル酸ジヘキシルエステルと推測され、標品との直接比較によりその構造をフタル酸ジ-*n*-ヘキシルと同定した。

化合物 **2** は淡黄色結晶として得られ、¹H NMR スペクトルにおける δ 6.44 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) 及び 6.20 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) より一組のメタカップリングプロトン、 δ 7.94 (2H, d, $J = 8.8$ Hz) 及び 7.08 (2H, d, $J = 8.8$ Hz) より 1, 4 置換ベンゼン環の存在が示唆された。また δ 6.62 (1H, s) はその化学シフトよりフラボノイド誘導体の 3 位プロトンと推測され、 δ 3.88 (3H, s) よりメトキシ基を有する 5, 7, 4'-trihydroxyflavone 骨格の存在が示唆された (Fig. 2)。さらにメトキシ基の結合位置を確認する目的で δ 3.88 を照射し、NOE 差スペクトルを測定したところ、 δ 7.08 に明確な NOE が観測されたことからメトキシ基は 4' 位に結合していることが明らかとなった。以上の結果より **2** は 5, 7-dihydroxy-4'-methoxyflavone と推測され、文献値とのデータ比較により、その構造を 4'-methoxyapigenin と同定した。

化合物 **3** は淡黄色結晶として得られ、¹H NMR スペクトルにおけるシグナルのパターンは **2** と類似しており、 δ 6.44 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) 及び 6.20 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) より、一組のメタカップリングプロトン、 δ 7.49 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz)、7.39 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) 及び 7.08 (2H, d, $J = 8.5$ Hz) より 1, 2, 4 置換ベンゼン環の存在が示唆された。また **2** と同様の δ 6.62 (1H, s) 及び 3.94 (3H, s) のシグナルより、**3** はメトキシ基を有する 5, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavone 誘導体と推測された (Fig. 2)。そこでメトキシ基の結合位置を確認する目的で δ 3.94

を照射して NOE 差スペクトルを測定したところ、 δ 7.08 に明確な NOE が観測されたことからメトキシ基は 4' 位に結合していることが明らかとなった。以上の結果より **3** は 5, 7, 3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone と推測され、文献値とのデータ比較により、その構造を 4'-methoxyluteolin と同定した。

D. 考察

今回分離、精製された NFF は約 10.4 g であり、予備毒性実験に十分供給可能と考えられた。また、比較的大量含有されていたカフェイン、ニコチン酸アミド、ピリドキシン等は合成品を添加したものと思われた。一方、単離、同定されたフタル酸ジ-*n*-ヘキシルは可塑剤と推測されるが、ジ-*n*-ヘキシルエステル体は日本での使用実績がないことから、中国の製造工程における混入物と考えられた。さらに 4'-methoxyapigenin 並びに 4'-methoxyluteolin はフラボノイド誘導体であることから、天然由来の成分と考えられた。本製品の原料として緑茶、エビスグサ、蓮の葉、クコの実、サンザシ、菊の花の 6 種が記載されており、文献検索の結果、これらの化合物は菊花の成分として報告 (Ryu Shi Yong ら *Arch. Pharmacol Res.*, **11** (3), 230-239, 1988) されていることが明らかとなった。

E. 結論

今回、肝機能障害の原因物質解明を目的として、肝機能障害の候補物質の一つである NFF について、収去品 (茶素減肥) の大量抽出を行い、予備毒性実験に必要な量 (約 10 g) の分取に成功し、毒性試験部門へ供与した。さらに、NFF 並びに LC/MS 等で同定された成分以外の未知成分については各種抽出分画の成分検索を行い、メタノー

ル分画より微量成分としてフタル酸ジ-*n*-ヘキシル、4'-methoxyapigenin 並びに 4'-methoxyluteolin を単離、同定した。

今回分離した化合物はビタミン、可塑剤、フラボノイド誘導体等であり、これらが肝機能障害に直接関与しているとは考えにくく、現時点では NFF が最も有力な原因物質であると思われた。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

鎌倉浩之、代田修、川原信夫、合田幸広：未承認医薬品の成分分析について、日本薬学会第 123 回年会（2003 年 3 月 27-29 日、長崎）

H. 知的所有権の取得状況

1. 取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

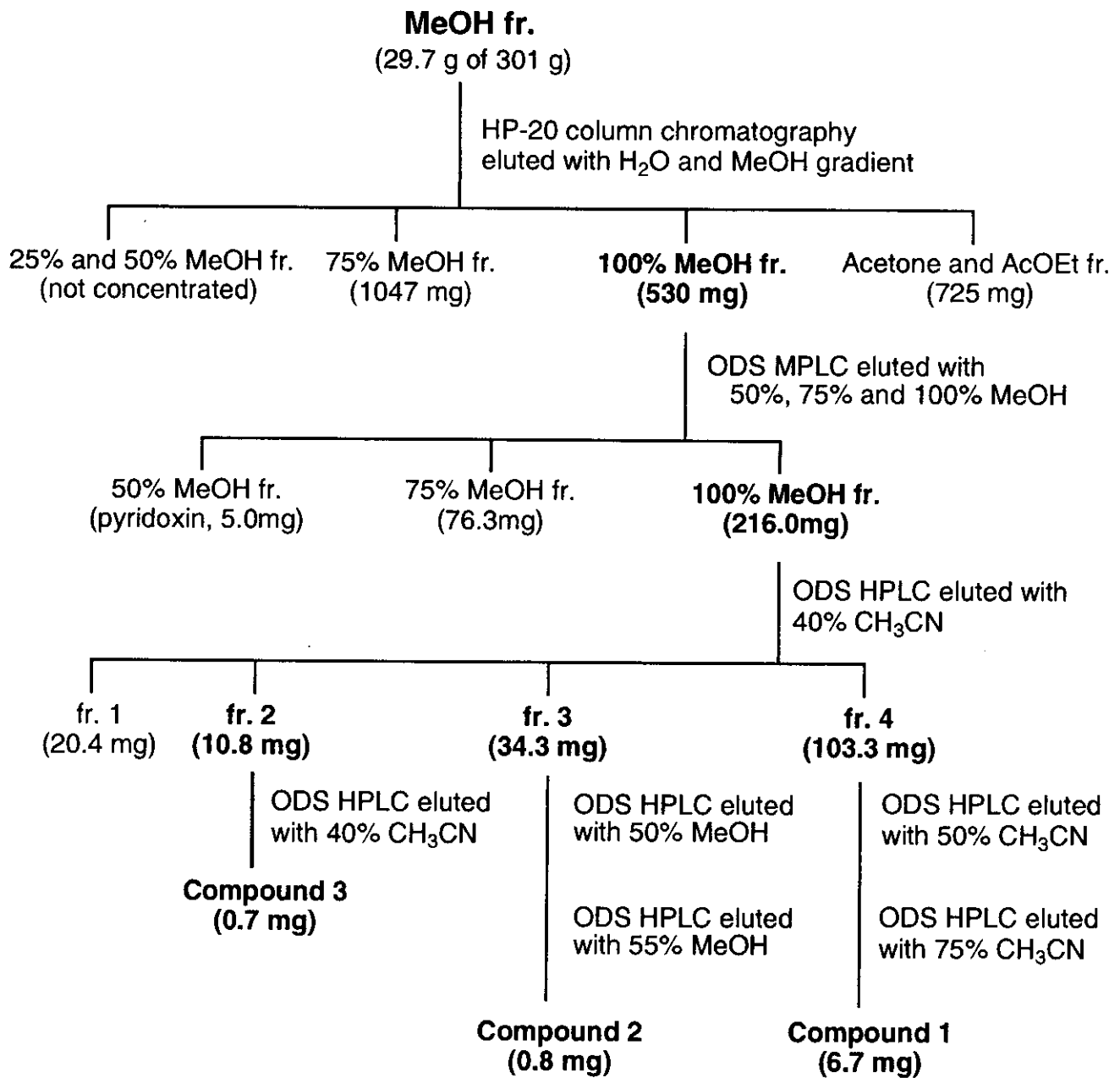


Chart 2. Isolated compounds (1-3) from Chaso Diet

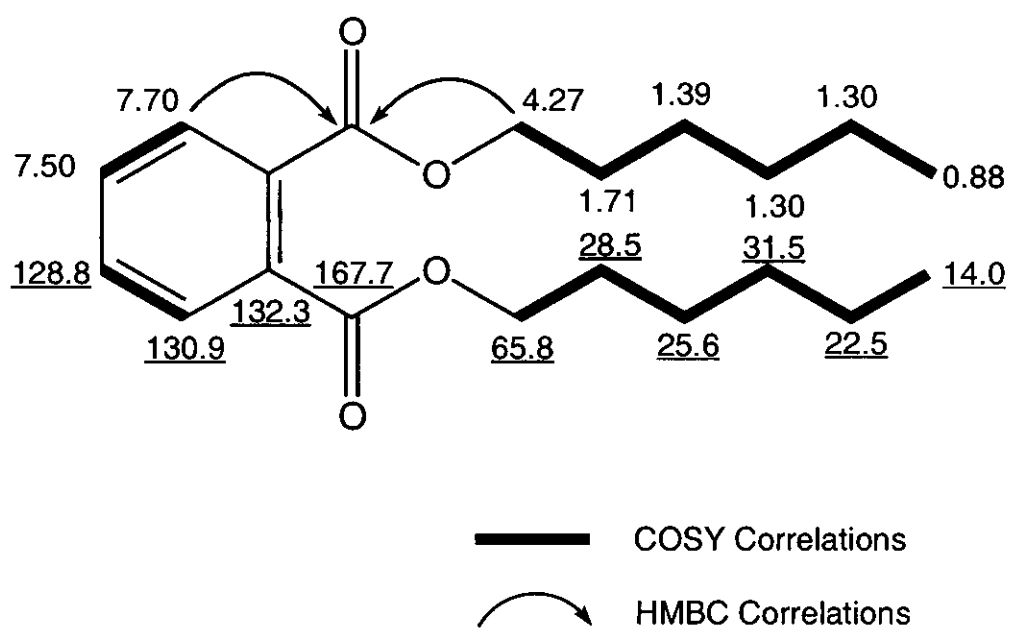
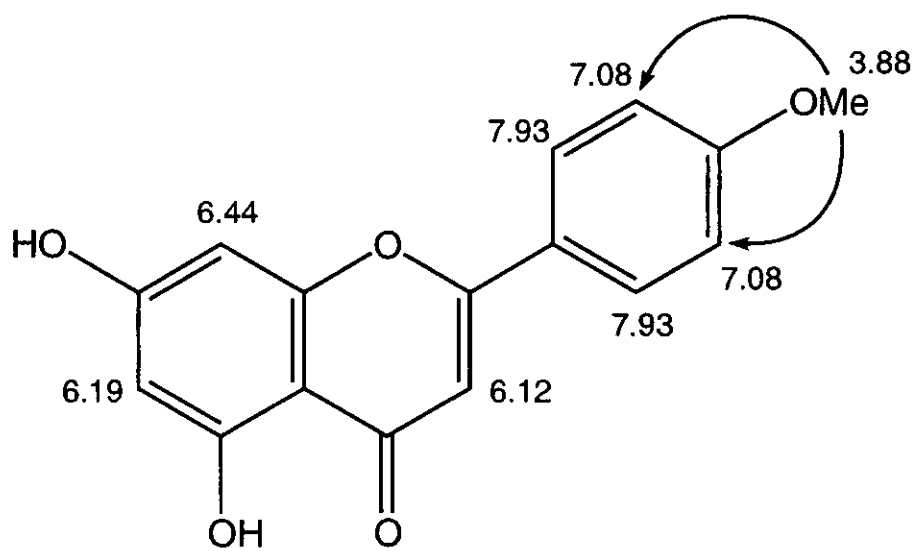
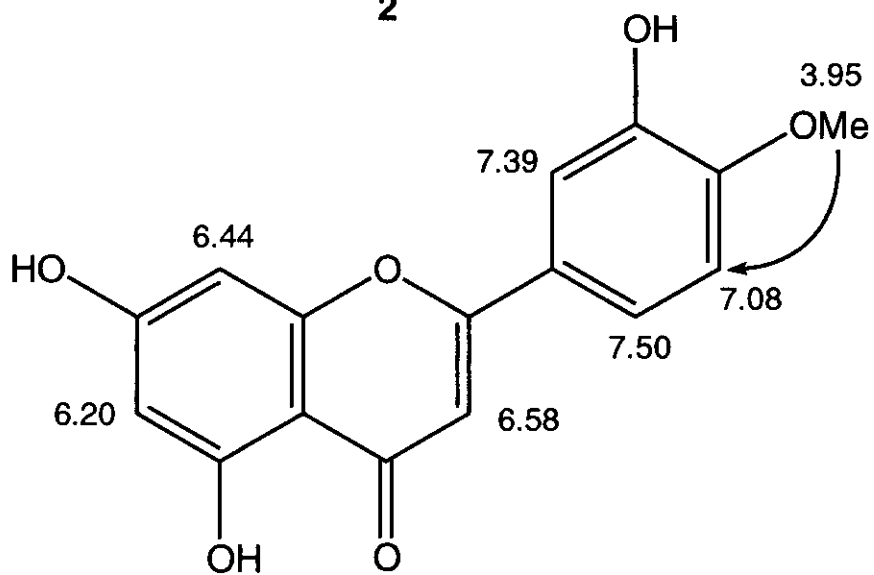


Fig. 1 ¹H and ¹³C NMR data of **1**



2



3

NOEs

Fig. 2 ¹H NMR data of 2 and 3

厚生科学研究費補助金（特別研究事業）

（分担研究報告書）

未承認医薬品及び健康食品による健康被害の原因究明のための研究

未承認医薬品及び健康食品の分析法の検討

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

研究要旨 痩身を標榜した健康食品による健康被害の報告が増加してきている。これらの健康食品中には医薬品成分を添加していると思われる製品もあり、それらの市場での流通は国民の健康への被害が危惧される。健康食品中には食品由来の数多くの成分があり、これらの成分が添加された医薬品成分の分析の妨害となる場合が多い。また、迅速に簡便な処理で分析できることが望ましいと考えられる。これらの観点に基づき、乾燥甲状腺末および食欲減退薬等の分析法について検討した。対象とした乾燥甲状腺末については前処理に 50%アセトンおよびアセトンで処理することにより、USP25 による条件で効率よく加水分解され、これを LC/MS で分析することにより効率的な同定・定量が可能であった。また、食欲減退薬等 14 種類について、GC/MS により、迅速な分析が可能であった。

協力研究者 鎌倉浩之
国立医薬品食品衛生研
究所生薬部
主任研究官

A. 研究目的

近年、痩身を標榜した健康食品による健康被害の報告が増加してきている。これらの健康食品中には医薬品成分を添加していると思われる製品もあり、それらの市場での流通は国民の健康への被害が危惧される。健康被害を未然に防ぐためには、医薬品成分が添加された健康食品は、無承認無許可医薬品として監視することが重要である。

健康食品中には食品由来の数多くの成分があり、これらの成分が添加された医薬品成分

の分析の妨害となる場合が多い。また、迅速に簡便な処理で分析できることが望ましいと考えられる。

乾燥甲状腺末の分析に関して、アメリカ薬局方 25 版法（USP25 法）では、微生物由来のたんぱく質加水分解酵素を用いた方法によりこれを行っている。USP25 法をそのまま健康食品に含まれる甲状腺末の分析に適用した例もあるが、酵素による加水分解収量が試料の種類によって異なり、また大量の酵素を必要としている。乾燥甲状腺末自身の分析では問題はないが、健康食品に含まれている場合には、加水分解反応に際し、前処理が必要であると考えられる。また、酵素試薬の違いによる加水分解の反応性に関する検討はなされていない。これらの観点に基づき、乾燥甲状腺末の分析法について検討した。また、対象とする健康食品が痩身を標榜しているこ

とから、食欲減退薬等 14 種類の分析法に関しても検討を行った。

B. 研究方法

1. 乾燥甲状腺末の分析

試薬・試液：試薬；3,5,3'-トリヨード-L-チロニン (T3) ナトリウム塩、L-チロキシニン (T4) ナトリウム塩 は ICN Biochemicals Inc. 社製、アクチナーゼ E は科研製薬 (株) 製、プロナーゼは Fluka 社製、プロナーゼ プロテアーゼ、プロナーゼ プロテアーゼ (Nuclease-Free) は CALBIOCHEM 社製、甲状腺末 (Porcine, Grade III) は SIGMA 社製、アセトニトリル (HPLC 用) は Riedel - de Haen 社製、その他の試薬は特級品を用いた。

加水分解用緩衝液；2-メルカプト-1-メチルイミダゾール 0.05 mol、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 0.04 mol、塩化ナトリウム 0.11 mol を水に溶かし全量を 1 L とし、6 M 塩酸溶液および 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液で pH 8.4 に調製した。

加水分解酵素溶液；酵素に加水分解用緩衝液を加え約 10,000 U/mL になるように溶解した。

試料調製：乾燥甲状腺末の分析は、USP25 をもとにした酵素分解法で行った。

試料粉末 0.2g を 10 mL のねじ口試験管に精密に量り、これに 50 % アセトン溶液 3 mL を加え、10 分間振とう抽出をした。その後 3,000 r.p.m 10 分遠心分離し、上清液を除いた。この操作をさらに 50 % アセトン溶液で 1 回、アセトンで 1 回行った後、デシケーター中で減圧溶媒留去した。乾燥後、加水分解用緩衝液 5 mL、加水

分解酵素溶液 100 μ L を加え緩やかに倒置混和した後、28 時間、時々倒置混和しながら 37 $^{\circ}$ C の振とう恒温水槽中で反応を行った。反応後 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液 5 mL を加え、10 分間振とう抽出した後 3,000 r.p.m 10 分遠心分離し、上清液を分取した。これに酢酸エチル 30 mL を加え、10 分間振とう抽出した後 3,000 r.p.m 10 分遠心分離し、酢酸エチル層を分取した。再度、この操作を行い、酢酸エチル層を合わせ、減圧濃縮した。残渣を 0.5 mL の 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液で 6 回洗い込み、合わせた後、減圧留去した。これをデシケーター中で減圧下十分乾燥した後、メタノール 0.5 mL を加えて溶解、遠心上清 20 μ L を LC/MS で分析した。

LC/MS 分析：移動相；0.1 % ギ酸溶液 - 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液 グラジエント、流速；0.2 mL/min、カラム；Inertsil ODS-80A 2.0 mm id x 150 mm、装置；JMS-T100LC (日本電子 (株) 製)、UV 230 nm および ESI ポジティブイオン化モードで 100~1,000 aum の範囲をモニターした。

2. 食欲減退薬等の分析

試薬・試液：カフェインは和光純薬 (株) 製、1-エフェドリン塩酸塩は大日本製薬 (株) 製、dl-メチルエフェドリン塩酸塩はアルプス薬品 (株) 製、(-)-ノルエフェドリン、フェンフルラミン塩酸塩、マジンドール塩酸塩、フェンテルミン塩酸塩は SIGMA 社製、シブトラミン塩酸塩は Abbott GmbH 社製 (北陸製薬 (株))、カチノン塩酸塩、アンフェプロモン塩酸塩、メフェノレクス塩酸塩、フェンプロポレク

ス塩酸塩、ベンズアンフェタミン塩酸塩、*N*-ニトロソフェンフルラミンは当所で合成した。その他の試薬は特級品を用いた。

試料調製：試料粉末 0.2g を 10 mL のねじ口試験管に精密に量り、これに 10 % アンモニア溶液 1 mL を加え、ボルテックスミキサーで混和した後、*tert*-ブチルメチルエーテル 5 mL を加え、10 分間振とう抽出をした。その後 3,000 r.p.m 10 分遠心分離し、有機層を分離した。再度、*tert*-ブチルメチルエーテル 5 mL を加え、同様に操作した後、有機層を合わせて減圧溶媒留去した。減圧下デシケーター中で乾燥後、メタノール 0.2 mL を加えて溶解、遠心上清 1 μ L を GC/MS で分析した。

GC/MS 分析：カラム；DB-5 0.25 mm id x 30 m x 0.25 μ m df (J&W 社製)、キャリアガス；He (100 kPa) カラム流量 1.5 mL/min、スプリット 1/32、注入口温度；250 $^{\circ}$ C、インターフェース温度；280 $^{\circ}$ C、カラム温度；70 $^{\circ}$ C (2分保持)、10 $^{\circ}$ C/分で 280 $^{\circ}$ Cまで昇温、5分保持
装置；Shimadzu GCMS QP-5050、EI で 40~350 aum の範囲をモニターした。

C. 研究結果

1. 乾燥甲状腺末の分析

今回試料前処理として取り入れた 50% アセトンおよびアセトンによる抽出を取り入れた。USP25 法の加水分解法を適用した場合と比較し、甲状腺末添加試料加水分解後の T4 の回収率は良好であった。図 1 に甲状腺末の、図 2、3 に健康食品中に添加した甲状腺末の前処理をした場合としなかった場合の LC/MS による分析結果をそれぞれ示した。

2. 食欲減退薬等の分析

本条件で対照とした物質の回収率は 70% 以上であった。

図 4 に健康食品に薬物を添加した試料および健康食品のみの GC/MS による分析結果を示した。また、図 5 には *N*-エチルアンフェタミンとフェンフルラミンの分離を示した。

D. 考察

健康食品には、目的物質の測定の妨害となる食品由来の成分が含まれると考えられる。乾燥甲状腺末の分析においてコントロールとして用いた健康食品では、前処理を行わない場合には、乾燥甲状腺末だけで酵素分解を行った場合と比較して定量値で 1/10 ~ 1/20 程度であった。これは、食品由来のフェノール性化合物等が酵素阻害をしているためと推察した。そこで、50%アセトンおよびアセトンによる前処理を加えたところ、甲状腺末だけで酵素分解を行った場合と同程度の定量値が得られた。また、酵素分解後の抽出操作により、クロマトグラム上の夾雑ピークを除くことが可能であった。本法による酵素使用量は USP25 法と同程度であり、試料由来の酵素阻害物質の影響を受けにくい方法と考えられた。酵素試薬の違いによる加水分解反応性の差異について現在検討を行っている。

食欲減退薬等の分析においては、対象薬物が塩基性であることから、アルカリ条件下での抽出による前処理を行った。10%アンモニアアルカリ条件で *tert*-ブチルメチルエーテルによる抽出を行ったところ、クロマトグラム上の妨害ピークとして特に目立ったものは認められなかった。本法により対象とした 14 物質の同時検出が可能と考えられた。

甲状腺末および食欲減退薬の検出限界、定量限界については、現在検討中である。

E. 結論

健康食品中の甲状腺素および食欲減退薬等の一部について LC/MS、GC/MS を用いた分離・同定・定量法が確立された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表等

鎌倉浩之：試験操作とその問題点 健康食品試験についての説明会、食品衛生指定検査機関協会（2002.9）

鎌倉浩之、代田 修、川原信夫、合田幸広：無承認無許可医薬品の買い上げ調査について 第 39 回全国衛生化学技術協議会年会（2002.10）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

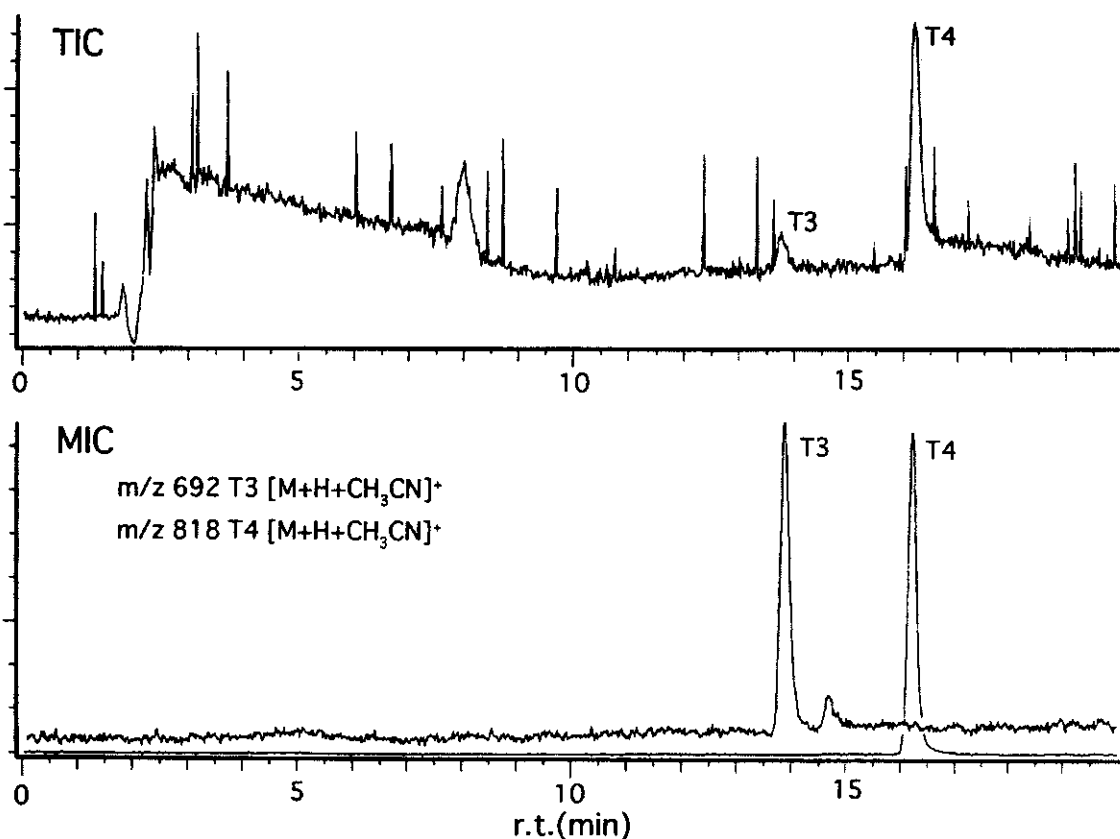


図 1. 甲状腺素加水分解後のクロマトグラム

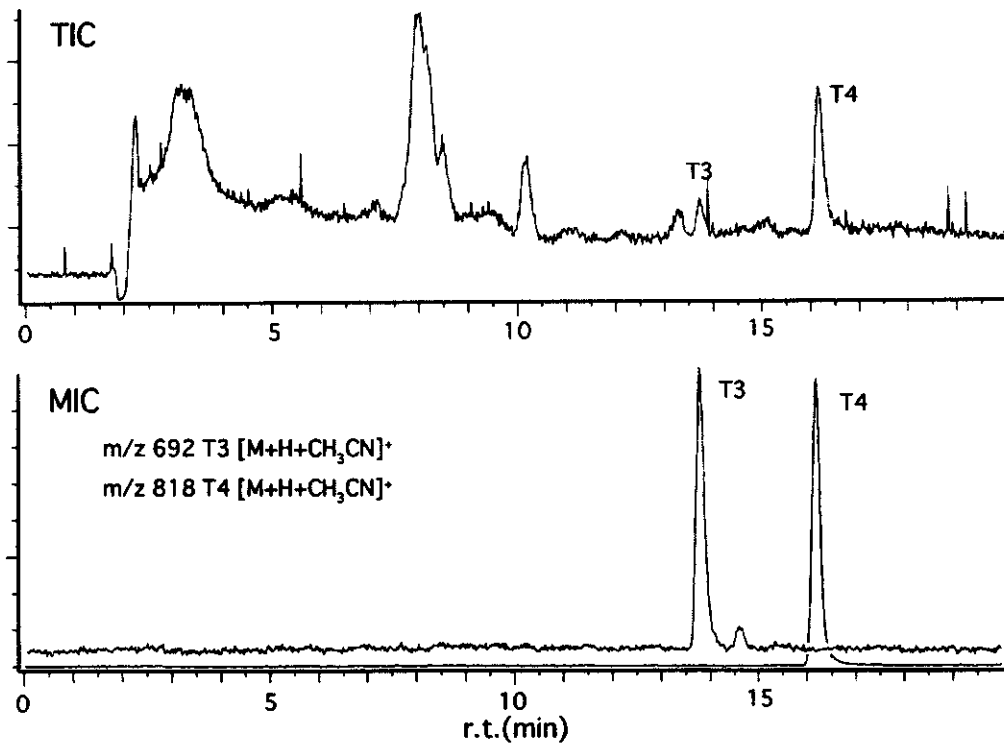


図 2. 甲状腺末添加健康食品試料の加水分解後のクロマトグラム

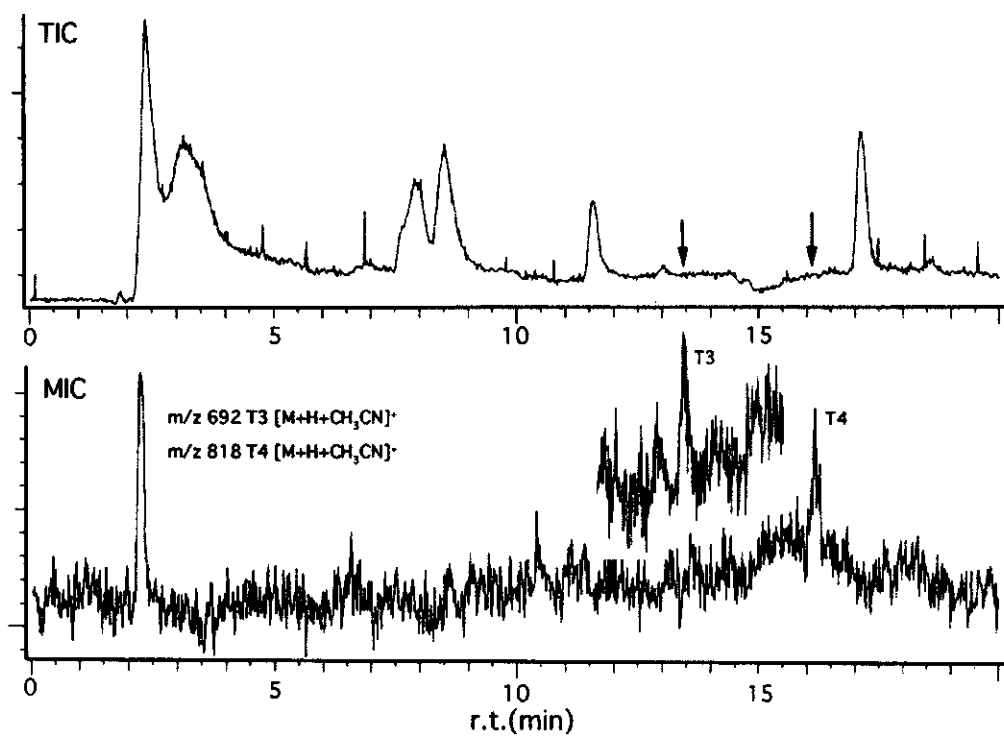


図 3. 甲状腺末添加健康食品試料（前処理無し）の加水分解後のクロマトグラム

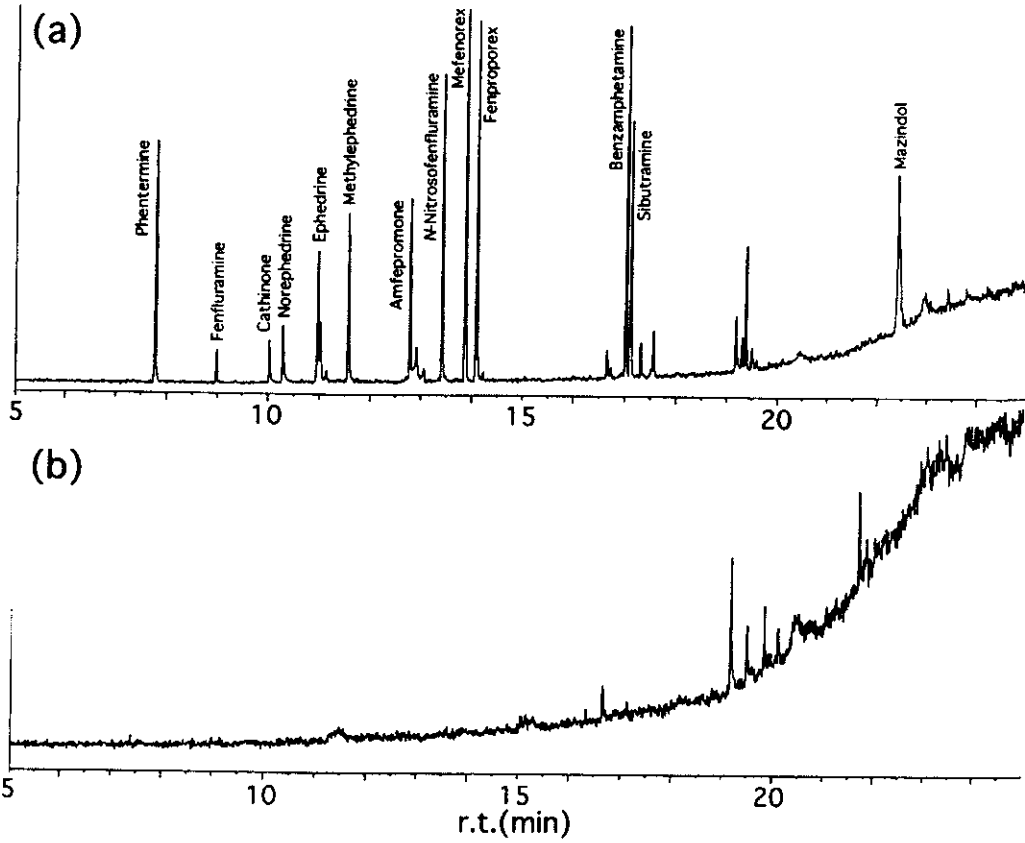


図4. 健康食品試料のトータルイオンクロマトグラム
 (a) 薬物添加試料 (b) 無添加試料

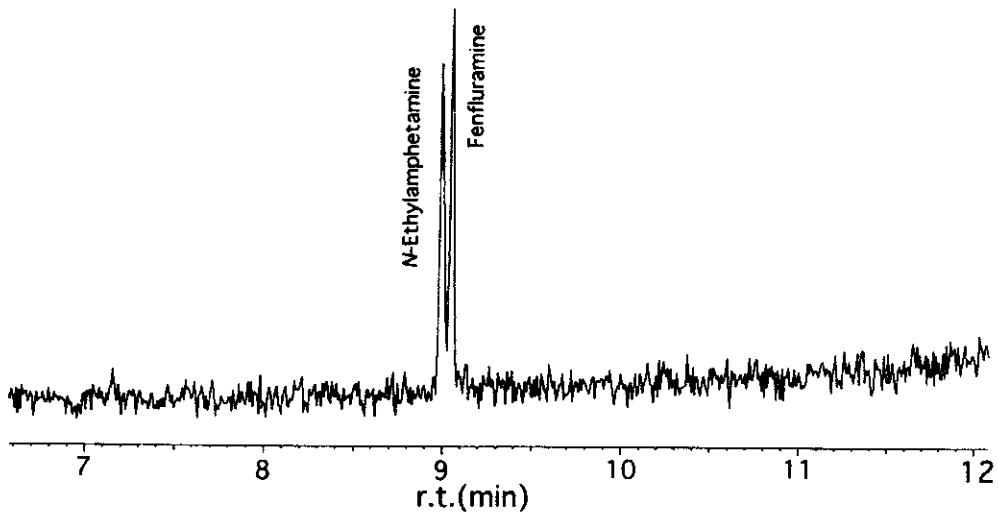


図5. *N*-Ethylamphetamine および Fenfluramine のトータルイオンクロマトグラム

ダイエット用未承認医薬品および健康食品による健康被害の原因究明のための研究

—N-ニトロソフェンフルラミンのラット 28 日間反復投与毒性試験—

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本試験は平成14年度厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）「ダイエット用未承認医薬品および健康食品による健康被害の原因究明のための研究」の一環として、N-ニトロソフェンフルラミンのラット 28 日間反復投与毒性試験を行い、N-ニトロソフェンフルラミンによる肝障害を含めた毒性影響を調べることにある。

5 週齢の F344/Ducrj ラット (SPF) 雌雄に N-ニトロソフェンフルラミンを 28 日間連続投与することにより、器官重量における肝臓の絶対及び相対重量の増加、血液化学的検査においてアラニンアミノトランスフェラーゼ及びアルカリフォスファターゼ等に高値が認められ、70 mg/kg 群では肝臓に障害が起きている可能性が高いことが推察された。

N-ニトロソフェンフルラミンを 28 日間 70 mg/kg 投与後 14 日間の休薬期間を置くことにより、肝臓の絶対及び相対重量は対照群とほぼ同等の値となるが、血液化学的検査におけるアラニンアミノトランスフェラーゼの高値が残っていることから、回復傾向にあるものの完全には回復に至っていないものと考えられた。

A. 研究目的

近年、痩身効果を暗に期待させる様々な「健康食品」がインターネットなどにより販売、消費されている。その一つとして輸入された、所謂中国産痩せ薬の服用により、死亡を含む重篤な肝障害を引き起こす事件が発生した。厚生労働省はその因果関係究明対策として、平成14年度厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）により「ダイエット用未承認医薬品および健康食品による健康被害の原因究明のための研究」を開始した。

肝障害を引き起こしたと考えられた品目から共通して N-ニトロソフェンフルラミンが 1 から 3% の量で検出され、これが肝障害の原因物質である可能性が考えられた。

本分担研究は、N-ニトロソフェンフルラミンのラット 28 日間反復投与毒性試験を行い、N-ニトロソフェンフルラミンによる肝障害誘発との関連性を含めた毒性影響を明らかにすることである。

B. 研究方法

1. 被験物質

被験物質として、当研究所の有機化学部が合成した N-ニトロソフェンフルラミンを使用した。ダイエット用未承認医薬品および健康食品等から抽出した物質と本合成品は、NMR スペクトルの完全な一致から同一物質であることが確認され、HPLC 分析によって算出された純度は 98.34% であった。

2. 動物

5 週齢の F344 ラット雌雄 (F344/Ducrj、SPF、日本チャールス・リバー株式会社) 各 55 匹を購入後、一週間検疫・順化飼育した後、健康状態が良好で、検疫・順化終了時および入荷時からの体重増加量が平均的な動物 50 匹を使用した。群分けは、検疫・順化終了時の体重に基づいて、体重層別化無作為抽出法により 5 群に分けた。実験開始時 (6 週齢) の平均体重は雄で 123g (114~134g)、雌で 100g (94~105g) であった。群構成を以下の表に示した。

飼育は、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、照明サイクル 12 時間 (照明 5~17 時) の SPF 動物室で、ポリカーボネート製ケージに 2~4 匹づつ収容し、市販の動物用飼料 (CRF1, オリエンタル醉

母工業)と水道水を自由に摂取させた。

3. 投与方法

投与用量の決定は、N-ニトロソフェンフルラミンのラットを用いた7日間の強制経口投与試験を参考に、死亡の認められず肝臓重量増加

5. 血液学及び血液化学的検査

全動物について検査を行った。採血 16 時間前より、動物には除餌を行った。解剖に先だち、エーテルにより軽く麻酔したラットの眼窩静脈叢より採血し、全血を用いて M-2000 (シスメックス(株))により血液学的検査を行い、また血清

投与用量及び群構成

群	投与量 mg/kg	本群匹数		回復試験群匹数	
		雄	雌	雄	雌
第1群 対照群	0	8	8	5	5
第2群 L群	2	8	8	0	0
第3群 ML群	7	8	8	0	0
第4群 MH群	20	8	8	0	0
第5群 H群	70	8	8	5	5

等の明らかな変化の認められた 70 mg/kg を最高用量とし、公比は $\sqrt{10}$ として 20 mg/kg を中間高用量、7 mg/kg を中間低用量、最低用量を 2 mg/kg とした(投与量および群構成の表参照)。

検体を一定量のコーン油(和光純薬)に溶解させ投与溶液を調製し、投与液量を 2 ml/kg とし各群の動物の直近の体重を基に投与液量を計算し、28 日間連続して胃ゾンデにより強制経口投与した。対照群には、溶媒のコーン油(和光純薬)のみを投与した。回復試験群は、対照及び最高用量群の 2 群について 28 日間連続して胃ゾンデにより強制経口投与した後、14 日間の休薬期間をおいた。

4. 一般状態の観察、体重および摂餌量測定

一般状態の観察は実験期間を通じて全例を対象として毎日投与後、回復期間中は毎朝 1 回実施した。体重の測定は週 2 回の頻度で実施した。摂餌量は投与第 1~2 日、以後週 2 回の頻度で測定し、計算により 1 日 1 匹当たりの摂餌量を求めた。

を用いて 7150 型アナライザー((株)日立製作所)により血液化学的検査を行った。血液学的検査の項目は、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(PCV)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数(Plt)、白血球数(WBC)及び白血球百分比である。なお、白血球百分比の検査は HEG-120A (オムロン(株))を用いた。血清による血液化学的検査では、総蛋白質量(TP)、アルブミン量(A1b)、尿素窒素量(BUN)、クレアチニン量(CRN)、尿酸量(UA)、糖量(Glc)、中性脂質(NEFA)、リン脂質(PL)、トリグリセリド量(TG)、総コレステロール量(TCho)、総ビリルビン量(TBil)、アルカリフォスファターゼ活性(AIP)、トランスアミナーゼ活性(AIT、AsT)、コリンエステラーゼ活性(ChE)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ活性(γ -GT)、ロイシンアミノペプチダーゼ活性(LAP)、乳酸脱水素酵素活性(LDH)、カルシウム量(Ca)、マグネシウム量(Mg)、リン量(P)、ナトリウム量(Na)、カリウム量(K)、塩素量(Cl)について測定を行なった。アルブミン・グロブリン比(A/G)は上記の蛋白質量とアルブミン量の測定値から算出した。