

200940057A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

総合研究事業

無承認無許可医薬品の調査・分析及び有害性評価に
関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

(H21-医薬-一般-011)

研究代表者 大塚 英昭

平成22(2010)年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
無承認無許可医薬品の調査・分析及び有害性評価に関する研究 大塚 英昭	1
II. 分担研究報告書	
1. 無承認無許可医薬品の調査と分析, 有害性評価に関する研究 合田 幸広	
勃起不全 (ED) 治療薬類似化合物の混入が疑われた「いわゆる健康食品」中の未知物質の同定 鎌倉 浩之	9
LC/MS 及び DART-TOFMS によるカプセル基剤中の ED 治療薬関連成分の分析 最所 和宏	17
無承認無許可医薬品の規制のためのインシリコ評価法に関する研究 栗原 正明	25
「いわゆる健康食品」から検出された勃起不全 (ED) 治療薬類似構造化合物の Phosphodiesterase 6 (PDE6) 阻害活性について 鎌倉 浩之	29
鏡検によるセンナ茎粉末と葉軸粉末の鑑別 徳本 廣子	37
海外市場において <i>Sida</i> 属植物として流通する製品の形態と基原植物について 丸山 卓郎	53
<i>Sida</i> 属植物の成分探索 若菜 大悟	63
トウジン (<i>Codonopsis pilosula</i> および <i>C. tangshen</i>) の成分研究 若菜 大悟	77
2. 無承認無許可医薬品の調査と分析に関する研究 大塚 英昭	
「専ら医薬品」の調査に関する研究 大塚 英昭・合田 幸広	85
無承認無許可医薬品の調査と分析に関する研究 大塚 英昭	91
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	95

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療器機等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

無承認無許可医薬品の調査・分析及び有害性評価に関する研究

主任研究者 大塚英昭 広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授

無承認無許可医薬品とは、医薬品としての承認や許可を受けていないにもかかわらず、医薬品としての目的性を持たせた製品であり、その判断は、医薬品の範囲に関する基準（直近の改正：平成19年4月17日付医薬発第1115003号厚生労働省医薬局長通知「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」）に基づき行われる。本基準は、主に成分本質（原材料）、効能効果、形状、用法用量の4要素に分けられるが、本研究では、特に成分本質（原材料）により無承認無許可医薬品と判断されるべき成分本質について、調査と分析、有害性評価を行うものである。上記通知では、専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）は、321成分（植物由来242、動物由来21、その他58）ある。これらの成分本質のうち、近年、その他（化学物質）の分類で、成分本質が専ら医薬品として判断されるものが急増している。これは主に、合成されたED治療薬類似成分である。本研究では、実態調査の際、新規に出現したこのような成分について、構造決定を行った。さらに、*MacroModel*を用いたドッキングスタディを実行し、Phosphodiesterase (PDE) 5 酵素阻害活性を予測し、専ら医薬品であるかどうかの判断根拠を提示するとともに、以後、迅速に監視・指導が行えるように分析法の開発を行う。また、これらの成分本質の有害性を評価するため、色覚障害作用の原因となるPDE6 酵素阻害活性を実測する。さらに、通常のルートを通じ、新規に申請のあった成分本質（原材料）についても、医薬品としての使用実態、麻薬作用、薬理活性等を調査し、専ら医薬品に分類するべきであるかどうか検討する。また、*Sida* 属植物等、強い生理活性を持つにもかかわらず、専ら医薬品の判断が求められないまま、違法薬物市場で、無承認無許可医薬品として販売されている成分本質について実態調査を行うとともに、痩身用の健康食品に含まれるセンナ由来粉末中の小葉、葉柄、葉軸（以上専ら医薬品）と茎（非医薬品）の形態学的な分別方法についても検討する。本研究は、厚生労働省監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下行われる研究であり、本研究の成果で、健康危機管理に直結するものは迅速に報道発表されるとともに、都道府県等に通知される。

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

A. 研究目的

無承認無許可医薬品とは、医薬品としての承

認や許可を受けていないにもかかわらず、医薬品としての目的性を持たせた製品であり、このような製品の流通により、様々な健康被害が予想されるため、薬事法により、その製造、販売、授与、広告が禁止される。本研究は、厚生労働

省の監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下、これら製品の流通を防ぎ、国民の健康・安全を確保する目的で行われる。近年、健康食品中での出現が急増している無承認無許可医薬品成分に ED 治療薬類似物質がある。このような化合物は、①医薬品としての禁忌や用量について何も考慮されず使用されること、②構造類似体として、ターゲット酵素でない類縁酵素への阻害活性を持つ可能性が否定できないこと、③そのものに含まれる不純物や他の食品との相互作用等が全く考慮されず使用される事等、様々な有害性が予想される。本研究では、これらの化合物の迅速な取締りに対応するため、専ら医薬品として指定するための要件（構造決定、活性予測等）を準備する。さらに、指定以後の迅速広範囲な取締りに対応できるよう分析法を確立する。また、有害性を評価するため、PDE6 活性を測定する。一方で、痩身用健康食品で使用される緩下作用を持つ植物由来の成分本質について、無承認無許可医薬品として取り締まるための鑑定法の確立を行う。さらに、新規に申請のあった成分本質（原材料）についても、国民の健康・安全確保を念頭に、調査研究を行う。さらに強い生理活性を持つにもかかわらず、専ら医薬品の判断が求められないまま、違法薬物市場で、無承認無許可医薬品として販売されている成分本質について実態調査を行う。このような研究は、世界的にも国立の研究機関と大学との共同研究で実施されているが、各国の法体系に即した研究が必須である。申請者らは、監視指導・麻薬対策課が主催する医薬品の成分本質に関する WG のメンバーであり、この分野での日本の状況を良く理解している。さらに分担研究者は、これまで 10 数種の ED 治療薬アナログを構造決定しており、このような情報交換

を諸外国の担当者と常時行っているだけでなく、医薬品監視の拠点である地方衛生研究所とも緊密に交流しており、得られた成果を直ちに、国民の健康保護に還元できる立場にある。以上、本研究は、無承認無許可医薬品に関連して、厚生労働行政に直接貢献することを目的としたものである。

B. 研究方法

買い上げ調査等で強壮や痩身を標榜する製品から未知物質が検出された場合、未知物質を単離し、機器分析による構造決定を行う。次いで、本物質について文献調査を実施するとともに、予想されるターゲットタンパク質がある場合には、*MacroModel* を用いドッキングスタディを実施する。もし、PDE5 阻害活性が予想された場合には、標準的な分析法の開発を行う。さらに、有害性を評価するため、PDE6 活性を測定する。

痩身用健康食品で使用される緩下作用を持つ植物（センナ及び *Cassia* 属）については、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターより標準的な植物を入手し、それぞれの種、部位について鏡検上特徴的となる要素について検討する。特にセンナについては、小葉、葉柄、葉軸（以上専ら医薬品）と茎（非医薬品）について、どの要素が両者の鑑別の要点となるか検討する。

新規に申請のあった成分本質（原材料）については、まず基原植物の学名、和名、生薬名等について調査するとともに、医薬品としての使用実態を調査する。さらに、RTECS, Chemical Abstract, PubMed, 上記通知に記載されている参考文献等を利用しながら、毒性データ、二次代謝成分や生理活性、麻薬、向精神薬、覚せ

い剤様作用があるかどうか調査する。これらのデータを総合的に判断して、専ら医薬品に分類すべきであるかどうか検討する。

また、従来区分されているのにもかかわらず、文献情報等が少ないトウジン等の品目について、対象物を入手し、成分検索を行う。また、向精神作用等を持つ成分を含有する可能性が高く、一部の種（オウカシ：*Sida cordifolia*, *S. mysorensis*, オウカボ：*S. rhombifolia*）についてのみ専ら医薬品としての判断が行われている *Sida* 属植物については、市販品を買い上げ、成分分析を行うとともに、市販品の基原種の同定を行う。また、向精神作用等、強い生理活性を持つ化合物の確認が行われた場合には、これらの化合物について定量分析を行う。
＜倫理面への配慮＞

本研究では、ヒト由来試料を用いた実験は行なわず、倫理面で大きな支障となる問題はないと考えられる。

C. 結果と考察

C.1 強壯を標榜する無承認無許可医薬品に関する分析及び有害性評価

地方衛生研究所より問い合わせを受けた強壯を標榜する「いわゆる健康食品」に含まれていた不明ピークについて単離し、各種機器分析を行い、同定を行ったところ、ミカン科植物に多く含まれているヘスペリジンであることが判明した。さらに、近々の事象であるため、個別の分担報告書には記載しないが、地方衛生研究所より未知ピークの同定を依頼され、NMR 及びMS の測定により、本化合物は、FDA が最初に検出を報告した methisosildenafil (aildenafil, dimethylsildenafil) であることを明らかにした。

また、強壯を標榜する健康食品のカプセル基剤について MeOH 抽出後、LC/MS 分析を行ったところ、カプセル剤 107 製中 13 製品より ED 治療薬であるタダラフィルが検出され、1 カプセルあたりの含有量は 0.4~0.8mg であった。通常の薬用量は、5-10mg であり、今回の含量は数錠服用すれば、ある程度の活性が予想される量である。また、簡易分析法として抽出操作を伴わない Direct Analysis in Real Time (DART)-TOFMS による簡便なスクリーニング法について検討を行ったところ、LC/MS でタダラフィルが検出された 13 製品全てより同物質由来と考えられるシグナルが検出され、本法は、このようなカプセル基剤中の ED 治療薬成分に検出に対しても、有用なスクリーニング法であることが明らかとなった。

さらに、強壯を標榜する健康食品より同定されたヒドロキシチオホモシルデナフィルについて Human phosphodiesterase 5 (PDE5) とのコンピュータシミュレーションによる結合モデルを構築し、活性について検討したところ、同化合物は、PDE5 と結合し、阻害活性を示すものと考えられた。

ED 治療薬は、PDE 5 阻害を活性発現のための機序としている。従って、「いわゆる健康食品」に違法に混入された ED 治療薬の構造類似化合物に対し、類推される副作用として、同じ酵素ファミリーである PDE6 阻害が考えられる。PDE6 は主に網膜に発現しており、PDE6 阻害の程度によっては ED 治療薬の構造類似化合物による視覚障害も懸念される。事実、シルデナフィルでは、PDE6 阻害に対する PDE5 阻害の選択性が数倍程度しかなく、色覚異常が副作用として報告されている。そこで、「いわゆる健康食品」から単離・精製した ED 治療薬類似構造化合物 6

化合物について、PDE6 阻害活性試験を行い、これらの物質の PDE5 阻害活との比較を行った。その結果、その結果、プソイドバルデナフィルにおいて、PDE5 より PDE6 に選択的に阻害活性を示すことが明らかとなり、本化合物を含む強壯を標榜する健康食品を摂取すると、色覚障害が現れる危険性が高いことが判明した。さらに、シルデナフィル類似化合物でも、シルデナフィルと比較して、PDE5 選択性は、小さくなっており、混入されている構造類似化合物量を考えると、シルデナフィルと同様の副作用が生じる可能性がより高いものと考えられた。

C.2 鏡検によるセンナ茎粉末と葉軸粉末の鑑別

センナ茎由来と称する食品中に、「専ら医薬品成分」であるセンナの小葉や葉軸、果実などが混入している例が明らかにされている。刻みの製品であれば、肉眼でもこれらの混入を判別することは可能であるが、製品が粉末状の場合、特に茎と葉軸の鑑別は難しい。そこで、鏡検により、センナ茎粉末と葉軸粉末が鑑別できるかどうか検討した。その結果、センナの茎には、規則的に気孔が分布する部位があり、この部位はほぼ方形～等径性多角形の表皮系細胞より形成されている一方、気孔周辺の表皮細胞の長軸方向の径は、ほとんど全て、気孔のものより小さいことが判明した。これに対し葉軸では、主として長軸方向に長い長方形～長六角形の表皮細胞より形成されており、気孔周辺の表皮細胞は近接した気孔よりも長軸方向の径が大きいことが判明した。さらに茎、葉軸を混合した粉末においても、出現する表皮片は由来する組織に見られた特徴をよく表しており、両者を区別することが可能であることが判明した。従って、気孔を伴う表皮片に限定し、表皮細胞と気孔の

大きさの関係に着目して鑑定を行なうことにより、粉末状態となったセンナ茎粉末中に混入した「専ら医薬品成分」である葉軸粉末を容易に確認できることが明らかとなった。さらに、これらの表皮細胞の特徴を把握しておくことで、センナ茎の粉末に小葉が混入した場合や、小葉の粉末中に夾雑する茎や葉軸などについても、鑑別が行なえるものと考えられた。

C.3 新規に調査依頼があった成分・本質について

新規に調査依頼があった植物由来物質 5 品目のうち、特に専ら医薬品と考えられるもの及び、安全性についてさらに考慮すべきと考えられる品目は存在しなかった。一方、化学物質 1 品目は、ヒドロキシチオホモシルデナフィルであり、本化合物は、その構造から、明らかに、シルデナフィルやタダラフィル様の ED 治療薬としての作用を期待して合成された化合物と考えられた。さらに、前述したように、計算による活性予測から、シルデナフィル等と同様の作用があるものと推定され、指定医薬品かつ医師の処方箋の必要な医薬品であるクエン酸シルデナフィルに相当する成分と考え、専ら医薬品として使用される成分本質として規制すべきであると考察した。なお、昨年度 Spice と称するハーブ製品より検出同定された、カンナビシクロヘキサノール CP-47497, JWH-018 の合成カンナビノイド類 3 品目は、専ら医薬品の判断を行うことなく、直接指定薬物として薬事法の規制下に置かれることになっている。

C.4 植物系成分・本質の調査と分析及び有害性評価

毒性不明のアルカロイド成分が存在するため、詳細な成分検索が必要と判断がなされたトウジン [*Codonopsis pilosula* (Franch.)

Nannf. および *C. tangshen* Oliv.]について、含有成分を明らかにする目的で、研究を行った。その結果、既知ピロリジンアルカロイドとして codonopyrrolidinium B, radicamine A を、新規化合物として4種のピロリジンアルカロイドを単離、構造決定した。ピロリジンアルカロイドには、bgugaine のように、強い肝毒性を持つ化合物が知られており、本植物から複数のピロリジンアルカロイドが単離されたこと及びトウジンが日本において医薬品としての使用実態があること等を考え合わせると、トウジンは引き続き、専ら医薬品の区分であることが適切であるものと考えられた。

Sida 属植物の有害性評価及び規制の範囲の検討に資する知見を得ることを目的に、海外より *Sida* 属植物の採集及び購入を行うと共に、形態観察及び rDNA の internal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列解析による基原種の推定を行った。その結果、*Sida* 属植物は、花の外観による鑑別が非常に難しいことが明らかとなった。さらに、海外市場に流通する *Sida* 属植物製品には、誤同定によるものと思われる別植物の流通が、高頻度 (16 試料中、*Sida* 属植物以外であったもの 8 試料、*Sida* 属植物以外の植物も同定されたもの 2 試料、DNA の増幅が出来なかったもの 1 試料、*Sida* 属植物であったもの 5 試料) で確認された。また、*Sida* 属植物が確認された 7 試料中、表示された学名と遺伝子鑑別がほぼ一致した試料は、国内の園芸店から入手した全植物 1 試料と、Brazil から商社を通じて入手した 5 試料中の 1 試料 (*S. cordifolia* leaf) のみであり、流通の段階で、ほとんど植物学的な同定がなされていないことが明らかとなった。*Sida* 属植物は、Ephedrine 等の向精神作用を持つアルカロイドを含むこ

とが知られており、違法薬物市場でも流通の可能性のある植物属である。従って、*Sida* 属植物の有害性評価を行うには、まず、分析を行う植物の同定が重要であり、規制を行うためには、遺伝子情報による鑑別法の確立が重要であるものと考えられた。

次に、*Sida* 属植物含有製品 4 品目について、成分探索を行い、アルカロイド成分 5 種を含む 12 成分を単離・同定した。このうち、遺伝子分析により *S. cordifolia* と推定された製品からは、quinazoline アルカロイドである vasicine, vasicinone, 3-hydroxyepigamine を始め 9 化合物が単離同定された。また、全製品に ephedrine 類の含有が示唆される結果が得られた。次年度以降、継続して *Sida* 属植物製品の収集及び成分の構造決定を行うと共に、ephedrine 類、及び今回単離したアルカロイド類を標品とした LC/MS 分析を行う予定である。

これまで食薬区分が行われていないイランイランノキ (*Cananga odorata* var. *odorata*) の葉について、精油以外の成分研究を行い、新規変形モノテルペン及びメガスティグマン配糖体を含む 5 化合物を単離構造決定した。

D. 結論

本研究は、厚生労働省の基準 (医薬品の範囲に関する基準) に直接対応した研究である。無承認無許可医薬品成分の同定、活性予測、専ら医薬品への指定、分析法の提示といった本研究で行われる一連の成果が監視指導行政で利用されることで、薬事法による無承認無許可医薬品の迅速な取締りが行われ、国民の健康被害を防止することが可能となる。また、使用者に対して失明の危険を伴う PDE6 阻害活性等、重篤な危険性が予想される ED 治療類似薬の場合、行政を良く理解した本研究体制で行うことで、

迅速な対応が可能となる。本研究では、強壯を標榜する健康食品由来の ED 治療類似薬成分等について構造決定を行うと共に、PDE5 阻害活性を予測した。また、PDE6 阻害活性を実測して、プソイドバルデナフィルについて、PDE5 より PDE6 に選択的に阻害活性を示すこと示し、本化合物摂取により色覚障害が現れる危険性が高いこと明らかにした。また、痩身を標榜する健康食品中に含まれる場合が多いセンナについて、専ら医薬品成分となる部位の鑑別法を確立した。実態調査に本研究のような化学的、植物学的な研究を組み合わせることで、初めて有効な法規制が行えることになる。また、事前に市場で流通するグレーズーンの植物体として考えられる *Sida* 属植物や、新たに申請を受けた成分本質（原材料）等について、専ら医薬品に分類するべきであるかどうか検討した。これらの研究成果は、今後、医薬品の成分本質に関する WG での議論に反映させることで、直接厚生労働行政に貢献することが出来る。

以上、本研究は、厚生労働省の監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下行われる研究であり、本研究の成果で、厚生労働省の健康危機管理に直結するものは、迅速に報道発表されるとともに、都道府県等に通知される。また、食薬区分の判断等、様々な形で施策に反映される。

E. 健康危機情報

本研究で取り扱った ED 治療類似物質は以下のとおりである。メチソシルデナフィル（アイルデナフィル）、ヒドロキシチオホモシルデナフィルであり、後者は、既に専ら医薬品として判断が行われている。また、プソイドバルデナフィルにおいて、PDE5 より PDE6 に選択的に阻害活性を示すことが明らかとなり、本化合物を

含む強壯を標榜する健康食品を摂取すると、色覚障害が現れる危険性が高いことが判明した。

F. 研究発表等

論文発表

- 1) Maruyama, T., Khan, A. A., Choudhary, M. I., Tsuda, Y., Goda, Y., Farille, M., Reduron, J.-P., Botanical origin of Indian celery seed (Fruit *J. Nat. Med.* **63**, 248-253 (2009).
- 2) Harinantenaina, L., Matsunami, K. Otsuka, H., Chemical constituents of *Pteris cretica* Linn. (Pteridaceae). *Biological Systematics and Ecology*, **37**, 133-137 (2009).
- 3) Wakana, D., Kawahara, N., Goda, Y., Three new triterpenyl esters, codonopilates A-C, isolated from *Codonopsis pilosula*. *J. Nat. Med.* **64**, accepted (2010).

学会発表等

- 1) 合田幸広, 食薬区分と違法(脱法)ドラッグ「漢方薬・生薬認定薬剤師研修会」(2009年9月, 東京)
- 2) 永島次郎, 杉本幸子, 松浪勝義, 大塚英昭, Duangporn Lhieochaiphant, Sorasak Lhieochaiphant イランイランノキ(*Cananga odorata* Hooker f. var. *odorata*)の新規配糖体成分, 日本生薬学会第56回年会(2009年10月, 京都)
- 3) 若菜大悟, 川原信夫, 細江智夫, 河合賢一, 合田幸広, トウジン(党参)のアルカロイド成分, 日本生薬学会第56回年会(2009年10月, 京都)
- 4) 徳本廣子, 下村裕子, 飯田 修, 合田幸広:

- 鏡検によるセンナ茎粉末と葉軸粉末の鑑別,
日本生薬学会第 56 回年会 (2009 年 10 月,
京都)
- 5) 合田幸広, 健康食品の基原と品質, 医療経
済研究・社会保険福祉協会第 18 回健康食品
フォーラム (2009 年 10 月, 東京)
- 6) 最所和宏, 花尻 (木倉) 瑠理, 合田幸広, 平
成 20 年度無承認無許可医薬品の買い上げ調
査について—強壯用健康食品—, 第 46 回全
国衛生化学技術協議会年会 (2009 年 11 月,
盛岡)
- 7) Goda, Y., Survey analyses of illegal
compounds in dietary supplements
intended for sexual enhancements or diet
and herbal products implying
psychotropic effects by NIHS in Japan,
FHH Standing Committee Meeting (2009 年
11 月, 香港)
- 8) 最所和宏, 花尻 (木倉) 瑠理, 合田幸広,
LC/MS 及び DART-TOFMS によるカプセル基剤
中の ED 治療薬関連成分の分析, 日本薬学会
第 130 年会 (2010 年 3 月, 岡山)
- 9) 若菜大悟, 丸山卓郎, 鎌倉浩之, 杉村康司,
飯田修, 合田幸広, *Sida* 属植物の含有成分
から見た安全性の評価に関する研究, 日本
薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月, 岡山)
- 10) 丸山卓郎, 若菜大悟, 鎌倉浩之, 杉村康司,
飯田修, 合田幸広, *Sida* 属植物として海外
市場に流通する植物製品の基原種について,
日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月, 岡
山)
- 11) 鎌倉浩之, 最所和宏, 合田幸広, ED 治療薬
類似化合物の PDE6 阻害活性について, 第
16 回日本食品化学学会総会・学術大会 (2010
年 6 月, 大阪)
- 報道発表等
- 1) 平成 20 年度無承認無許可医薬品等買上調査
の結果について (2009 年 8 月 20 日) 厚生労
働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課
<http://www.mhlw.go.jp/za/0820/d13/d13.html>
- 2) 新規医薬品成分を含有していた「いわゆる
健康食品」についてヒドロキシチオホモニ
ルデナフィル (2010 年 1 月 14 日) 神奈川県
<http://www.pref.kanagawa.jp/osirase/yakumu/yakuan/kensyoku/220114press.html>

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査と分析，有害性評価に関する研究
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

勃起不全（ED）治療薬類似化合物の混入が疑われた「いわゆる健康食品」
中の未知物質の同定

研究協力者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官

研究要旨 地方衛生研究所より問い合わせを受けた強壯を標榜する「いわゆる健康食品」に含まれていた不純物の同定を行った。平成 17 年 8 月 25 日付けの「シルデナフィル、バルデナフィル及びタダラフィルの迅速分析法について」の通知をもとに調製した試験液を分析したところ、UV 283 nm に強い吸収を持つピークを認めた。本ピークの UV スペクトルが ED 治療薬類似構造化合物ホンデナフィルのそれに類似していたための疑義照会であった。そこで、本ピーク物質の同定を行うこととした。液液分配法及び平成 17 年 8 月 25 日付け通知による 1%ギ酸水溶液アセトニトリル混液超音波抽出法により試験溶液を調製し、LCMS 測定を行った。解析の結果、本ピーク物質はヘスペリジンと推定された。市販品との比較によりヘスペリジンと同定された。

A. 研究目的

強壯を標榜する健康食品に、シルデナフィル、バルデナフィルまたはタダラフィルといった ED 治療薬（医薬品成分）やこれら ED 治療薬（医薬品成分）の一部改変した構造をもつ化合物が添加されている事例が後を絶たない。

平成 21 年度、地方衛生研究所より、強壯を謳う健康食品に含まれる物質の同定の協力依頼があった。地方衛生研究所において、平成 17 年 8 月 25 日付けの「シルデナフィル、バルデナフィル及びタダラフィルの迅速分析法について」の通知をもとに試験液を調製し、シルデナフィル、ホンデナフィル、バルデナフィル、タダラフィル、キサントアントラフィル及びチオキナピペリフィルについて試験を行ったところ、試験品の中に、これらに該当するピークは認められなかったが、化合物の混入が疑われる不明なピークが検出された。本ピークは UV 283 nm に強い吸収を持ち、UV スペクトルが ED 治療薬類似構造化合物ホンデナフィルのそれ

に類似していたことから疑義照会を受けた。そこで本ピーク物質の同定を行うこととした。

B. 研究方法

試薬・試液：アセトニトリル、メタノールは LiChrosolv gradient grade LC 用（Merck 社）を、その他の試薬は特級品を用いた。

1. 液液分配による試験液の調製

カプセル中の試料粉末 0.2 g をねじ口試験管に取り、アンモニア水 0.5 mL を加え、3 mL の酢酸エチルで 2 回振とう抽出を行い、有機層を合わせて溶媒留去し、残渣を得た。メタノールを加えて正確に 10 mL とし、これを試験原液とした。これをメタノールで適宜希釈し、分析を行った。

2. 「シルデナフィル、バルデナフィル及びタダラフィルの迅速分析法について」（薬食監麻発第 0825002 号 平成 17 年 8 月 25 日）の通知（通

知法)に基づく試験液の調製

試料 0.2g を 1%ギ酸水溶液 : アセトニトリル (1:4)2mL で超音波抽出 (5 分) を行い, 遠心分離後上清 1mL を取り, アセトニトリル 1 mL を加え, 0.45 μ m メンブランフィルターろ過し、試験溶液とした。

3. LC-PDA-MS 測定

LC部にShimadzu Prominence UFLC システムを配したShimadzu LCMS-2010 EV 質量分析計 (島津製作所製) を用いた。

測定条件

カラム

Hypersil Gold C18 (1.9 μ m), 2.1 mm x 100 mm (Thermo Fisher Scientific 社), 40 $^{\circ}$ C

移動相

A 液 (0.1 %ギ酸溶液)

B 液 (0.1 %ギ酸アセトニトリル溶液)

グラジエント条件

initial (% B = 10) - 20 min (% B = 40) - 30 min (% B = 80) - 50 min (% B = 80)

流速 : 0.3 mL/min

フォトダイオードアレイ検出器 (PDA)

200-600nm, 1.2nm 間隔でスキャン

注入量 : 1 μ L

インターフェース電圧 : 4.5 kV

CDL 電圧 : -20 V

CDL 温度 : 250 $^{\circ}$ C

ヒートブロック温度 : 200 $^{\circ}$ C

イオン化法 : ESI ポジティブ

検出器 : 100-1,000 amu を 2,000 amu/s でスキャン

C. 研究結果

1. 液液分配による試験液の分析

図 1 に PDA 検出器による全吸収強度クロマトグラムを, 図 2 に MS 検出器による全イオン強度クロマトグラム (TIC) を示した。特徴的な吸収を示すピークは無く, TIC においてもピークは認められなかった。

2. 通知法に基づく試験液の分析

図 3 に PDA 検出器による抽出クロマトグラム (210 nm, 280 nm 及び 320 nm) を, 図 4 に TIC を示した。抽出クロマトグラムでは 3 本の主要なピークが検出された。これら 3 本のピークの UV スペクトル及びマススペクトルを図 5 及び図 6 にそれぞれ示した。

3. 照会のあったピーク物質の同定

通知法に基づく試験溶液の分析において得られた PDA 検出器のデータから 283 nm に強い吸収を持つ Peak 1 が目的物であると考えられた。アンモニアアルカリ性条件での液液分配による試験液の分析結果から, ED 治療薬及び ED 治療薬類似構造化合物やアルカロイド成分といった酢酸エチル可溶性の塩基性化合物は, 試験試料から検出されないことが判明しており, これらを除外してマススペクトルの解析を行った。Peak 1 のマススペクトルは m/z 303(base), 449, 465, 611 及び 633 に主なピークを認めた。m/z 611 と 633 の差は 22 amu で 611 の Na 付加イオンピークと考えられた。さらに m/z 611 と 465 の差は 146 amu, 465 と 303 の差は 162 amu で, それぞれ (164-H₂O) amu 及び (180-H₂O) amu と考えられた。また m/z 449 は (465-OH+H) と考えられた。これらのことから本物質は m/z 303 を示す物質に m/z 180 及び 164 の物質がエステル結合した [M+H]=611 の物質と考えられた。分子量 302 の化合物としてケルセチンやヘスペレチンが考えられた。また分子量 164 はデオキシヘキソースが, 180 はヘキソースが考えられた。試みとしてルチン及びヘスペリジンの分析を行ったところヘスペリジンに保持時間, UV スペクトル及びマススペクトルが完全に一致し, 本物質がヘスペリジンと同定された。

D. 考察

平成 15 年 4 月に, 強壯を標榜した「いわゆる健康食品」から違法に混入された ED 治療薬

シルデナフィル（医薬品成分）が検出された報告があつて以来、そのような「いわゆる健康食品」による事例が後を絶たない。今回の事例では、ED治療薬類似構造化合物であるホンデナフィル系の化合物の混入が疑われた。これまでも地方衛生研究所との情報交換や研究協力をを行い、ED治療薬やそれらの構造類似体が違法に添加された「いわゆる健康食品」を摘発してきている。今回、結果としては、内容物の一つであるオレンジ果実（容器に記載有）由来のヘスペリジンであったが、健康被害を未然に防ぐためにも、今後も監視、取り締まりが重要であると考えられる。

E. 結論

強壯を標榜する「いわゆる健康食品」に認められたホンデナフィル系のED治療薬類似構造化合物を疑わせたピークはヘスペリジンであった。

参考

1) 医薬品成分（シルデナフィル及び類似成分）が検出されたいわゆる健康食品について；厚生労働省健康被害情報・無承認無許可医薬品情報、【医薬品成分が検出された無承認無許可医薬品について】. (<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>)

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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

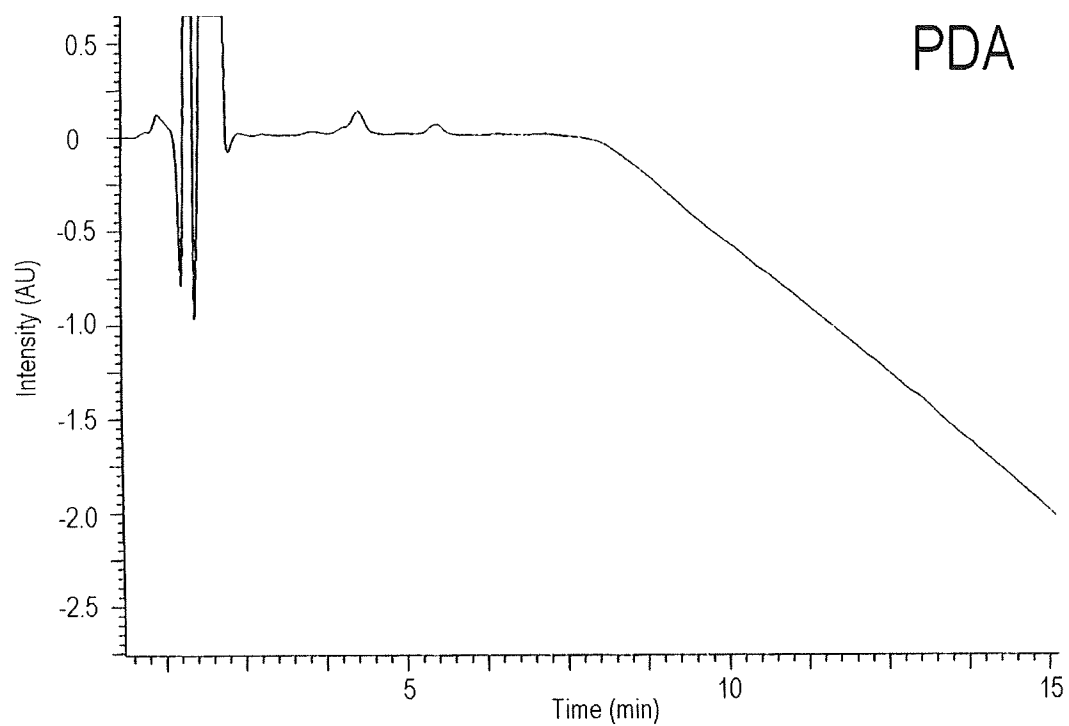


図 1 液液分配による試験液の分析結果 (PDA 検出器による全吸収強度クロマトグラム)

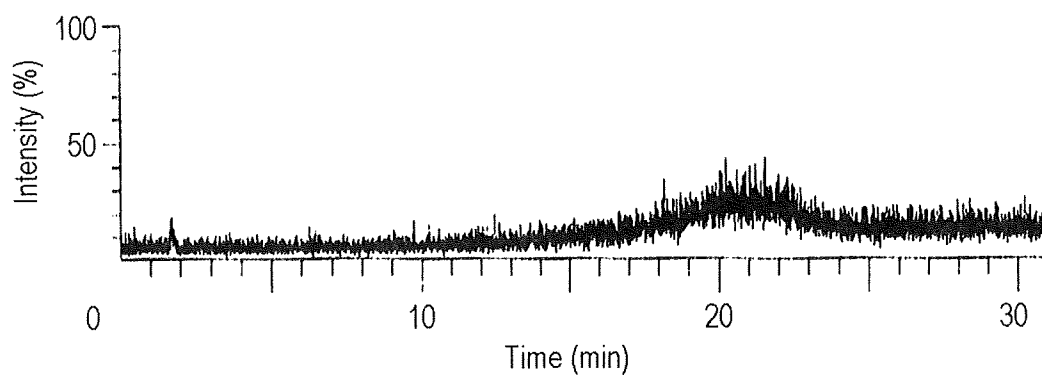


図 2 液液分配による試験液の分析結果 (MS 検出器による全イオン強度クロマトグラム)

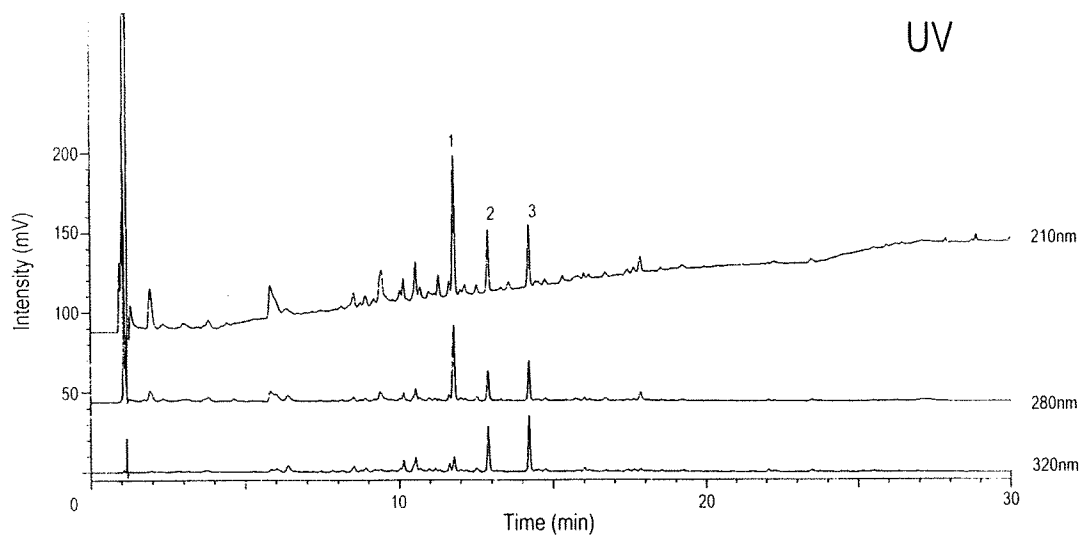


図 3 通知法に基づく試験液の分析結果 (PDA 検出器による抽出クロマトグラム)

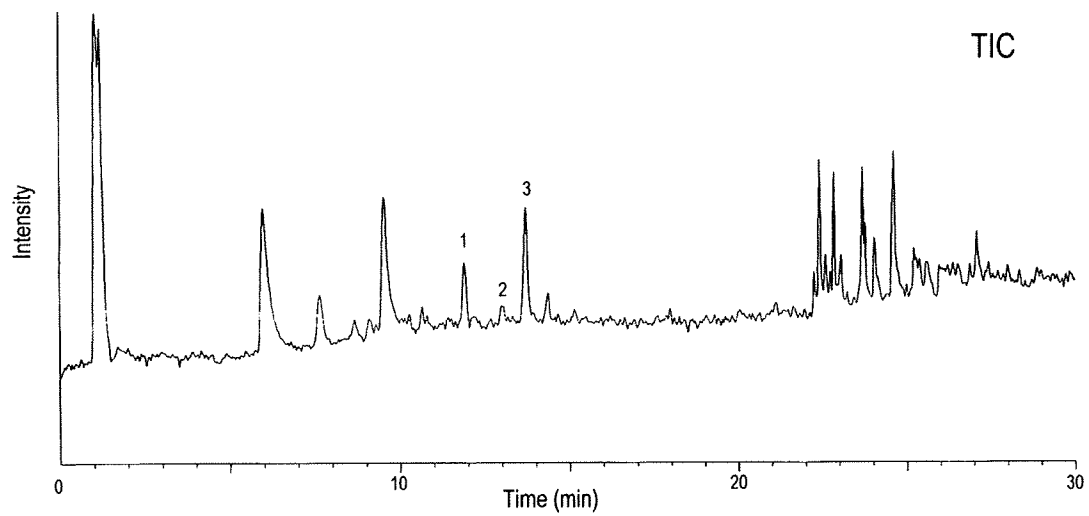


図 4 通知法に基づく試験液の分析結果 (MS 検出器による全イオン強度クロマトグラム)

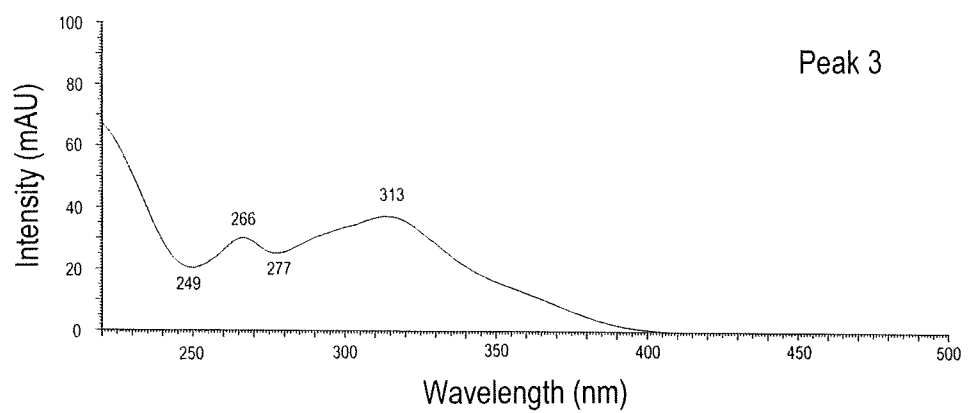
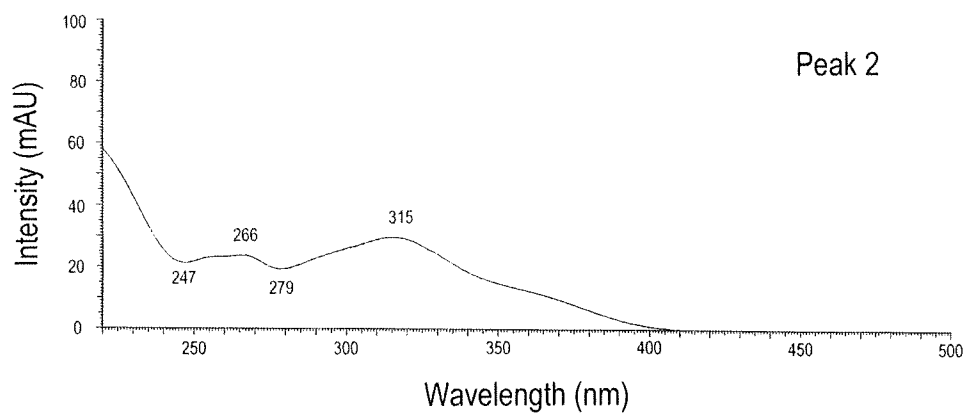
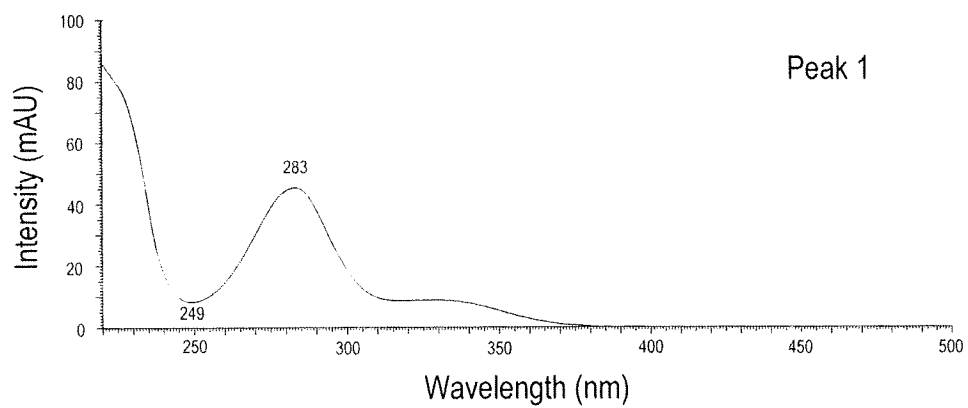


図 5 ピーク 1~3 の UV スペクトル

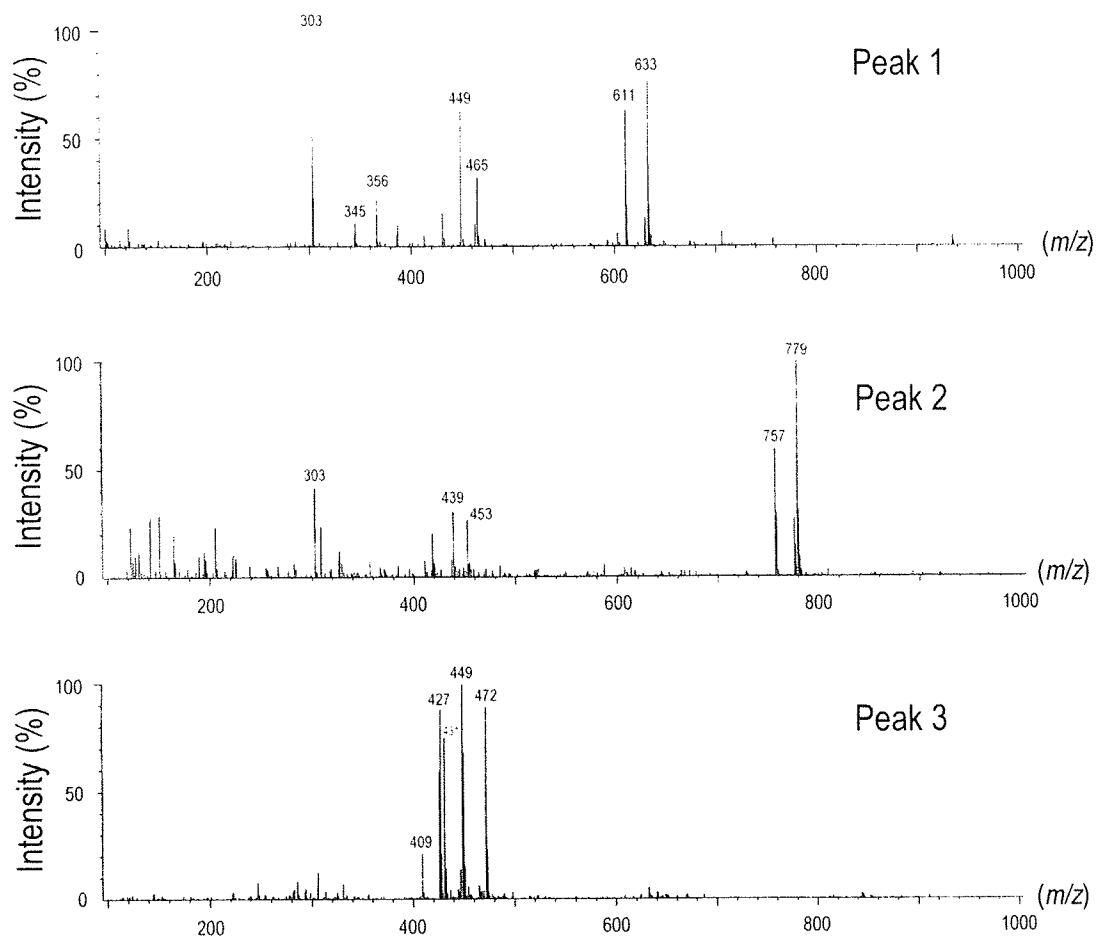


図6 ピーク 1~3 のマススペクトル

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査と分析、有害性評価に関する研究

分担研究者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部部长

研究協力者 最所 和宏 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

LC/MS 及び DART-TOFMS によるカプセル基剤中の ED 治療薬関連成分の分析

研究要旨 近年、強壯を標榜する健康食品より、ED 治療薬やそれらの構造類似体及び関連化合物等が検出される事例が相次いでおり、世界的な問題となっている。このような製品の検査手法として、我々は、これまで LC/PDA を用いてスクリーニングを行った後、LC/MS による一斉分析を実施してきた。2008 年、シンガポール健康局より、カプセル剤の基剤よりタダラフィルの検出が報告され、カプセル内容物だけでなく、基剤についても検査の必要性があることが判明した。そこで、酸性 MeOH 抽出後 LC/MS による一斉分析を検討し、同基剤中の ED 治療薬関連成分の分析を行った。結果は、カプセル剤 107 製中 13 製品よりタダラフィルが検出され、1 カプセルあたりの含有量は 0.4~0.8mg であった。また、抽出操作を伴わない Direct Analysis in Real Time (DART) -TOFMS による簡便なスクリーニング法を行った結果、13 製品よりタダラフィルが検出され、MeOH 抽出後 LC/MS による一斉分析法の結果と完全に一致した。

研究協力者

花尻（木倉）瑠理 国立医薬品食品衛生研究所
室長

関連成分の分析を行ったので報告する。また、抽出操作を伴わない Direct Analysis in Real Time (DART) -TOFMS による簡便なスクリーニング法についても報告する。

A. 研究目的

近年、強壯を標榜する健康食品より、ED 治療薬やそれらの構造類似体及び関連化合物等が検出される事例が相次いでおり¹⁻⁸⁾、世界的な問題となっている。このような製品の検査手法として、我々は、これまで LC/PDA を用いてスクリーニングを行った後、LC/MS による一斉分析を実施してきた。2008 年、シンガポール健康局より、カプセル剤の基剤よりタダラフィルの検出が報告され⁹⁾、カプセル内容物だけでなく、基剤についても検査の必要性があることが判明した。本研究では、酸性 MeOH 抽出後 LC/MS による一斉分析により、同基剤中の ED 治療薬

B. 研究方法

試料は、平成 17 年度から 20 年度に買い上げたカプセル剤 107 製品のカプセル基剤を用いた。

1. 酸性 MeOH 抽出後 LC/MS による分析方法

上記試料 20 mg に 2% 酸メタノール 0.5 mL を加えて、超音波下抽出を 60 分間行った。さらに、水 0.5 mL を加えて、10 秒間ボルテックス攪拌抽出を行った。次に 10 分間 3000rpm で遠心し、上澄液をろ過、ろ液を下記条件の LC/MS に注入し、定性・定量分析を行った。

LC 条件

カラム : Inertsil ODS-3 (2.1 x 150 mm、 5 mm、
GL サイエンス)
移動相 A 液 : アセトニトリル/5mM ギ酸アンモニ
ウム緩衝液 (pH 3.5) 25/75
移動相 B 液 : アセトニトリル
グラジエント (A 液/B 液) : 100/0 (0-3 min) -
3 %/min - 70/30 (13-55 min)
流速 : 0.3 mL/min
カラム恒温槽温度 : 40°C
検出器 : ダイオードアレイ検出器 (モニター波
長 290 nm)

MS 条件

イオン化法 : ESI ポジティブモード
乾燥ガス流量 : 600 L/hr
コーンガス流量 : 50 L/hr
乾燥ガス温度 : 450 °C
キャピラリー電圧 : 3000 V
コーン電圧 : 20、40、60、100、140 V (1 - 50
min)
質量電荷比範囲 : 100 - 800

図 1 に 13 種類の ED 治療薬やそれらの構造類似
体の標準溶液の各種クロマトグラム及び図 2 に
タダラフィルのマススペクトルを示した。

2. DART-TOFMS によるスクリーニング法

試料を DART イオン源と TOF/MS の間にかざし
て直接質量分析を行った。

DART 条件

イオン化法 : ポジティブモード
ガス : He
ガス流量 : 6~8 L/mL
ヒーター温度 : 250°C
ニードル電極 : 3 kV
ディスク電極 : 100 V
グリッド電極 : 250 V

TOFMS 条件

オリフィス 1 電圧 : 15 V
オリフィス 2 電圧 : 5 V
リングレンズ : 5 V
オリフィス 1 温度 : 80°C
質量電荷比範囲 : 100 - 800

C. 研究結果及び考察

1. LC/MS による分析方法は、まず、カプセル内
容物と同一の抽出方法であるアセトニトリ
ル・ギ酸混合液による抽出方法を試みたが、抽
出溶液がゲル状となり薬物の抽出は困難であ
った。そこで、2%ギ酸メタノールによる抽出を
行った後、水を加えて更にボルテックス攪拌抽
出する方法を行ったところ、ゲル状とはならず、
薬物の抽出が可能であると考えられた。図 3 に
タダラフィルが検出された製品からの抽出物
の各種クロマトグラムを示し、そのクロマトグ
ラムの保持時間 12.2 分付近のピークのマスス
ペクトルを示した (図 4)。保持時間及びマスス
ペクトルはタダラフィル標準溶液のものと一
致した。カプセル剤 107 製品のカプセル基剤に
ついて分析を行い、表 1 に ED 治療薬関連成分
が検出された製品の分析結果を示した。13 製品
よりタダラフィルが検出され、1 カプセルあた
りの含有量は 0.4~0.8mg であった。製品中の
含有量の相対標準偏差は 2.5%以下であり、精度
良く分析できた。カプセル基剤の色調は白色、
暗赤色、白色と青色の組み合わせ及び白色半透
明の 4 種類が存在していた。タダラフィルの薬
用量は、数 mg 程度からであり、数カプセルの
服用である程度の活性があるものと考えられ
た。

2. DART-TOFMS を用いたスクリーニング分析は、
カプセル基剤を DART イオン源と TOF/MS の間
にかざして直接質量分析する簡便な方法で、13 製
品よりタダラフィルに相当するイオンピーク
が検出された。この結果は、酸性メタノール抽
出後の LC/MS による分析結果と完全に一致した。

D. 結論

強壯を標榜する健康食品のカプセル基剤は、酸性 MeOH 抽出後 LC/MS による一斉分析により、同基剤中の ED 治療薬関連成分の定性・定量分析が可能であった。DART-TOFMS を用いたスクリーニング分析は、基剤を DART イオン源と TOF/MS の間にかざすだけの簡便な方法であり、多検体を迅速に分析できる有用なスクリーニング分析法であった。

E. 参考文献

- 1) Blok-Tip L, Zomer B, Bakker F, Hartog D, Hamzink M, Hove JT, Vredenburg M, Kaste DD, Food Addit. Contam., 21(8), (2004) 737-48.
- 2) Oh SS, Zou P, Low MY, Koh HL, J. Toxicol. Environ. Health A, 69(21), (2006) 1951-8.
- 3) Reepmeyer JC, Woodruff JT, J. Chromatogr. A Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 1125(1), (2006) 67-75.
- 4) 厚生労働省ホームページ
<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>
- 5) Uchiyama N, Saisho K, Kikura-Hanajiri R, Haishima Y, Goda Y, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 56(9), (2008) 1331-1334
- 6) Choi DM, Park S, Yoon TH, Jeong HK, Pyo JS, Park J, Kim D, Kwon SW, J AOAC Int., 91(3), (2008) 580-588
- 7) Zou P, Hou P, Oh SS, Chong YM, Bloodworth BC, Low MY, Koh HL, J. Pharm. Biomed. Anal., 47(2), (2008) 279-284
- 8) Reepmeyer JC, d'Avignon DA, J. Pharm. Biomed. Anal., 49(1), (2009) 145-150
- 9) シンガポール保健科学局ホームページ
http://www.hsa.gov.sg/publish/etc/media/lib/hsa_library/corporate/pr20072009.Par.16125.File.tmp/HSAPressRelease-HS AWarnsAgainstConsumingXPTongkatAliSupremeCapsulesFoundToContainUndeclaredPotentSubstance-08May09.pdf

F. 研究発表等 学会発表

- 1) 最所和宏、花尻（木倉）瑠理、合田幸広、平成 20 年度無承認無許可医薬品の買い上げ調査について—強壯用健康食品—, 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会（盛岡, 2009 年 11 月）
- 2) 最所和宏、花尻（木倉）瑠理、合田幸広、LC/MS 及び DART-TOFMS によるカプセル基剤中の ED 治療薬関連成分の分析, 日本薬学会第 130 回年会（岡山, 2010 年 3 月）

Table1 Analysis results of the products which were detected ED treatment drugs and their synthesis analogue in capsule shell of health foods advertising roborant nutrition (n=3)

Samples	Color	Detected drugs	Contents* (mg)	RSD (%)
H17K18	white, blue	tadalafil	0.5	2.3
H18K83	white	tadalafil	0.5	1.8
H18K91	white, blue	tadalafil	0.5	2.4
H19K7	white, blue	tadalafil	0.5	2.2
H19K102	half transparent white	tadalafil	0.7	2.5
H20K13	dark red	tadalafil	0.5	2.2
H20K21	white	tadalafil	0.5	2.2
H20K49	white, blue	tadalafil	0.4	2.1
H20K58	half transparent white	tadalafil	0.4	2.1
H20K59	white	tadalafil	0.5	2.0
H20K93	white	tadalafil	0.7	1.2
H20K104	white	tadalafil	0.8	1.1
H20K127	white, blue	tadalafil	0.5	1.5

***These contents indicated the amounts of contained drugs per one capsule.**