

Original

いわゆる「ホスピタルダイエット」類似製品における GC-MS法及びLC-MS-MS法を用いた含有医薬品成分の分析

熊坂謙一*, 宮澤真紀, 松阪綾子, 麻生順子, 小島 尚

Analysis of Undeclared Pharmaceutical Ingredients Found in a Dietary Supplement-Type Product for Weight Loss, So-Called “Hospital Diet”, Using GC-MS and LC-MS-MS methods

Kenichi KUMASAKA*, Maki MIYAZAWA, Ayako MATSUZAKA, Yoriko ASO and Takashi KOJIMA

Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki, Kanagawa 253-0087, Japan

Abstract

We investigated the undeclared pharmaceutical ingredients in a dietary supplement-type product, composed of six types of tablets and two types of capsules. The appearance of this product was closely similar to that of the so-called “hospital diet” that was marketed on the internet and advertised for weight loss. Thus, appearances and imprints of the samples were used to determine the pharmaceutical ingredients in the tablets and capsules because warnings, photographs, and health risks of similar products were shown on the website of the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare. In fact, a histological study revealed that thyroid gland powder was contained in two types of the tablets. In addition, GC-MS and Qtrap LC-MS-MS methods revealed the presence of thyroid hormones and the following five pharmaceutical ingredients: bisacodyl, hydrochlorothiazide, fluoxetine, diazepam and phentermine.

Keywords: hospital diet, weight loss, undeclared pharmaceutical ingredients, GC-MS, Qtrap LC-MS-MS

1. 緒言

近年のインターネットの普及に伴い、様々な医薬品やサプリメントが海外より簡単に個人輸入できるようになった。しかしながら、その個人輸入された製品が原因とされる健康被害が断続的に発生しており、安易な購入と使用の危険性が指

摘されている。なかでも、海外病院のダイエット用の薬として販売されている「ホスピタルダイエット」などの製品では、平成14年の香川県における事例をはじめ、その後も日本各地で死亡事例を含む複数の健康被害が発生しており、その含有成分として、シブトラミン、フルオキシセチンなどの国内

神奈川県衛生研究所

〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋 1 - 3 - 1

*連絡先：熊坂謙一

神奈川県衛生研究所理化学部

E-mail: kumasaka.z3aa@pref.kanagawa.jp

Tel: 0467-83-4400, Fax: 0467-83-4457

*Corresponding author: Kenichi Kumasaka

E-mail: kumasaka.z3aa@pref.kanagawa.jp

Tel: +81-467-83-4400, Fax: +81-467-83-4457

未承認の医薬品成分、向精神薬に該当するジアゼパム、フェンテルミンを含む様々な医薬品成分が検出されている[1-4]。このような医薬品成分は、本来、医師の指示により服用する成分であり、誤った服用では重篤な副作用も懸念されるため、ダイエットのために使用者が判断して服用するものではない。しかし、含有医薬品成分について個人輸入代行ウェブサイトでは明らかにされておらず、また、製品の形状はカラフルな錠剤とカプセル剤であるため、使用者にとってはサプリメントの感覚で抵抗感無く服用する恐れがある。さらに、健康被害が発生している現在でも、同じような製品が個人輸入代行ウェブサイトにて取り扱われている。そのため、今後健康被害の発生が懸念されている。

神奈川県でも平成17年にホスピタルダイエットに類似した製品によると推定される健康被害が発生しており、その因果関係を明らかにするため、我々は含有する医薬品成分の分析を実施した。このような健康被害事例への対応では、結果の信頼性のみならず迅速性が求められる。そのため、製品の外観、含有成分及び分析法などの情報は、公衆衛生に係わる関係者間で共有すべきであり、また、このような情報をもとに含有成分を推定できれば、分析の迅速化を図ることが可能と考えられる。そこで本研究では、我々が分析を行ったホスピタルダイエット類似製品について、その検体となった錠剤及びカプセル剤の外観、含有成分の推定、分析法などについて報告する。

2. 実験

2.1 試薬

甲状腺ホルモン3,5,3'-トリヨード-L-チロニン (T3) 及びL-チロキシニン (T4) の標準品として、3,5,3'-トリヨード-L-チロニンナトリウム及びL-チロキシニンナトリウム (シグマアルドリッチジャパン、東京) を用いた。また、ビスアコジルは日本公定書協会 (東京)、ヒドロクロロチアジド及びジアゼパムは和光純薬 (大阪)、フルオキセチンはシグマアルドリッチジャパン、フェンテルミンとして塩酸フェンテルミンを東京化成工業 (東京) より購入し、標準品とし

た。タンパク分解酵素はプロナーゼ (PRONASE® Protease, *Streptomyces griseus*, 和光純薬) を用いた。移動相の調製ではHPLC用アセトニトリルを使用し、その他の溶媒、塩類は特級グレードを和光純薬より購入した。

2.2 検体

本研究に用いた検体は、様々な色調、形状を持つ計8種類の錠剤及びカプセル剤であり、各剤型及び外観の詳細をTable 1に示した。なお、分析対象とした製品のカラー写真は厚生労働省のウェブサイトに掲載されている[1]。

2.3 甲状腺末の形態確認

各検体の錠剤粉末またはカプセル内容物約50 mgを水で洗浄後遠心し、沈殿物を少量の精製水で懸濁して、加熱溶解した3%アガロースに混和後、固化させ、10%中性ホルマリンで固定した。これを通常の組織のパラフィン包埋法に準じ、自動包埋装置 (サクラファインテックジャパン、東京) を用いてメタノール系列で順次脱水を行い、キシレンで置換した後、パラフィンで包埋した。パラフィン包埋された沈殿物をミクロトームで約5 µmの厚さに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、エンテランで封入後鏡検した。また、陽性対照として日本薬局方乾燥甲状腺「ホエイ」(メルクホエイ) を使用し、同様の操作を行った。

2.4 GC-MS法

2.4.1 試料溶液

粉末にした錠剤各1/5錠相当量、カプセルの場合は各内容物の1/5個相当量を50 mLの遠沈管に量り、酢酸エチル30 mLを加えて30分間振とうした。3000回転/min、10分間遠心分離後、上清 (酢酸エチル) を回収し、残渣には酢酸エチル18 mLを加えて10分間振とうして同様に抽出した。回収した両上清を合わせ、酢酸エチルを加えて正確に50 mLとし、酢酸エチルにより5倍希釈して試料溶液を調製した。

Table 1 Details of sample appearances and speculated and detected pharmaceutical ingredients

No.	Appearances				pharmaceutical ingredients	
	Form	Color	Shape	Imprints	Speculated	Detected
1	tablet	pinkish	round	—	bisacodyl	bisacodyl
2	tablet	lime greenish	round	—	—	bisacodyl
3	tablet	brownish	elliptical	“T—” or “T-T”	thyroid gland powder	thyroid gland powder
4	tablet	light blue	rhomboidal	H	hydrochlorothiazide	hydrochlorothiazide
5	tablet	pale brownish	round	T. ov	thyroid gland powder	thyroid gland powder
6	capsule	brown and yellowish	—	—	—	fluoxetine
7	tablet	cyanic	round	“5” and “GREATER”	diazepam	diazepam
8	capsule	brown and grayish	—	DUROMINE 30	phentermine	phentermine

2.4.2 機器分析条件

Agilent 6890N GC (アジレントテクノロジー) を接続したJMS-GCmate II 磁場型ガスクロマトグラフィー質量分析計 (日本電子、東京) により分析した。カラムにDB-5ms (0.25 mm ϕ $\times$ 30 M、膜厚0.25 μ m、J&W) を使用し、キャリアガスは高純度ヘリウム (2.0 mL/min)、昇温プログラムは60 $^{\circ}$ C、3分間保持後30 $^{\circ}$ C/minの割合で300 $^{\circ}$ Cまで昇温し、その後8分間保持とした。注入量は2 μ L、注入口温度は250 $^{\circ}$ C、インターフェース温度は250 $^{\circ}$ C、イオンチャンバーは210 $^{\circ}$ Cとした。また、イオン化は電子イオン化 (EI) 法とし、スキャン範囲は m/z 50–500とした。なお、検出されたピークのマススペクトルはNISTライブラリにより検索し、検出成分の確認を行った。

2.5 Qtrap LC-MS-MS法

2.5.1 甲状腺ホルモンの分析

甲状腺組織像が観察された検体について、浜田ら及び小坂らの方法[5, 6]に準じて試料溶液及び標準溶液を調製した。なお、タンパク分解酵素液の酵素量はプロナーゼ80 mgとし、試料量は粉末にした各検体1錠相当量又は1カプセル内容物、タンパク分解酵素液での処理時間は24時間とした。陽性対照として日本薬局方乾燥甲状腺20 mgについて同様に操作を行った。また、T3及びT4の標準溶液濃度は1 μ g/mLとした。各溶液は孔径0.45 μ mのシリンジフィルターでろ過した。

2.5.2 ビサコジル、ヒドロクロロチアジド、フルオキセチン及びジアゼパムの分析

試料溶液は、検体採取量を各検体錠剤1個相当の粉末、または1カプセル内容物とし、メタノールを抽出溶媒として2.4.1と同様の操作により調製し、さらに適宜希釈して使用した。また、標準溶液として、ビサコジル、ヒドロクロロチアジド、フルオキセチン、ジアゼパムはメタノールに溶解し、2–5 μ g/mL程度の溶液とした。これらの試料溶液及び標準溶液は、孔径0.45 μ mのシリンジフィルターでろ過した。

2.5.3 検体No. 8 “DUROMINE 30” の分析

検体No. 8の1カプセル内容物を水及びエタノールで洗浄し、イオン交換樹脂を分取した。その約1/3量を量り、メタノール/0.9%塩化ナトリウム/1 mol/L水酸化ナトリウム溶液混液 (10:9:1, v/v) を30 mL加えて30分間振とうして抽出し、遠心分離により抽出液を回収後、残留物には混液15 mLを加えて再度抽出した。これらの抽出液を合わせ、さらに混液を加えて正確に50 mLとし、その1 mLを正確に量り、0.1 mol/Lギ酸アンモニウム溶液 (pH 3.0) を加えて正確に20 mLした。この溶液にメタノール/水混液 (1:1) を加えて適宜希釈した溶液を試料溶液とした。標

準溶液は、塩酸フェンテルミンにメタノールを加えて溶かして2 μ g/mLの濃度とした。各溶液は孔径0.45 μ mのシリンジフィルターでろ過した。

2.5.4 分析機器条件

各成分の共通分析条件として、機器はAgilent 1100シリーズHPLC (アジレントテクノロジー、東京) を接続したQtrap LC-MS-MS system (アプライドバイオシステムズジャパン、東京) を使用した。HPLC用カラムはCadenza CD-C18 (2.0 mm ϕ $\times$ 150 mm、粒径3 μ m、インタクト、京都) を用い、カラム温度は40 $^{\circ}$ C、移動相流量は0.2 mL/min、注入量は2 μ Lとした。また、イオン化法はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用いた。

甲状腺ホルモンの分析では、移動相は浜田ら及び小坂らの方法[5, 6]に準じ水/アセトニトリル/酢酸混液 (650:350:5, v/v) とし、アイソクラティック送液とした。質量分析計のスキャンモードはポジティブイオンモードにおけるエンハンスドプロダクトイオン (EPI)、脱溶媒ガス温度は500 $^{\circ}$ C、プレカーサーイオンは各 $[M+H]^+$ である m/z 651.8 (T3)、 m/z 777.7 (T4) とし、コリジョンエネルギー (CE) は20 Vとした。

ビサコジル、ヒドロクロロチアジド、フルオキセチン及びジアゼパムの分析では、移動相はA液を0.01 mol/Lギ酸アンモニウム (pH 3.0)、B液をアセトニトリルとしてグラジェント送液とした。グラジェント条件はA/B混液比 (70:30, v/v) にて3分間保持後、B液を4%/minの割合で10分間直線的に増加してA/B混液比 (30:70) とし、7分間保持した。なお、ヒドロクロロチアジドの分析では、グラジェント条件をA/B混液比 (90:10) にて3分間保持し、B液を6%/minの割合で10分間直線的に増加してA/B混液比 (30:70) とし、7分間保持した。スキャンはポジティブイオンモード (ただし、ヒドロクロロチアジドのみネガティブイオンモード) におけるEPI及びエンハンスドマススペクトル (EMS) スキャンとした。脱溶媒ガス温度は500 $^{\circ}$ C、EPIスキャンではプレカーサーイオンを各成分の分子量関連イオン $[M+H]^+$ または $[M-H]^-$ とし、CEは30 Vあるいは–30 V (スプレッド15 V) とした。EMSスキャンではCEを30 Vあるいは–30 Vとした。

検体No. 8 “DUROMINE 30” の分析では、移動相は0.01 mol/Lギ酸アンモニウム (pH 3.0)/アセトニトリル混液 (75:25, v/v) とし、アイソクラティック送液とした。スキャンはポジティブイオンモードにおけるEPIとした。脱溶媒ガス温度は500 $^{\circ}$ C、また、EPIスキャンではプレカーサーイオンを分子量関連イオン $[M+H]^+$ (m/z 150) とし、CEは30 V (スプレッド15 V) とした。

3. 結果

3.1 検体外観、推定された含有成分及び検出医薬品成分

我々が分析を行った検体は、6種類の錠剤及び2種類のカプセル剤の計8種類であった。Table 1に示したとおり、そのうちの5種類の錠剤、カプセル剤では、識別コード及び製品名と思われる表示が認められた。また、ホスピタルダイ

エット等の製品の外観及び含有成分が厚生労働省のウェブサイト[1]に掲載されていたことから、これらの情報を基に検体中の含有成分を部分的にでも推定することが可能であった。また、最終的に確認された医薬品成分等の構造をFig. 1

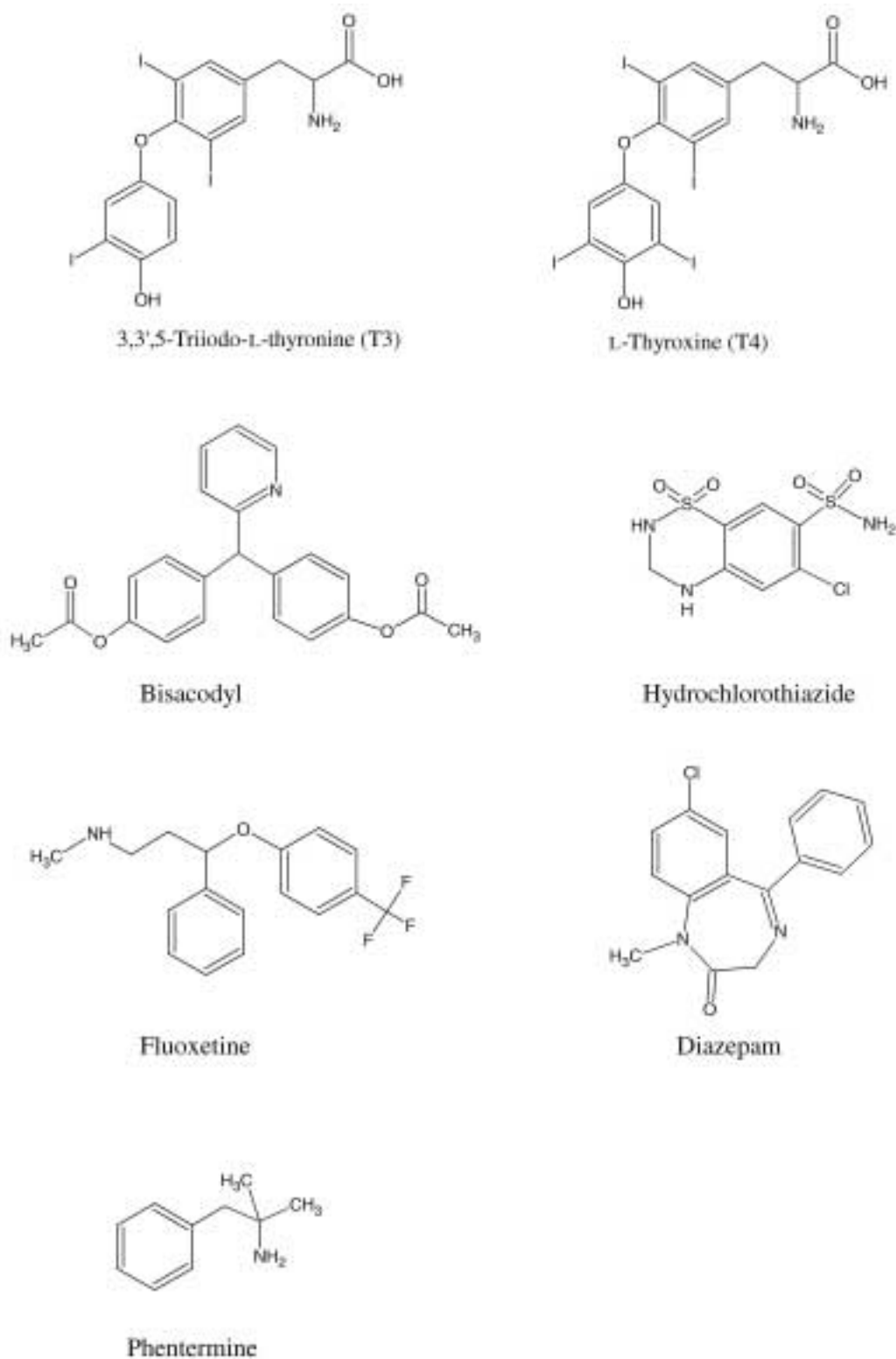


Fig. 1 Structures of the detected ingredients

に示した。

3.2 甲状腺末の形態確認

甲状腺末を含有する検体では、本法によりその特徴的な組織像として、エオジンで赤く染色される胞内部のコロイドと、ヘマトキシリンで青紫色に染色される胞上皮細胞の核が密に集まった胞組織が観察される[5, 7]。検体No. 3 及び陽性対象における組織写真をFig. 2に示した。本分析では検体No. 3 及びNo. 5 にて、この特徴的な胞組織が確認された。

3.3 GC-MS法によるスクリーニング

含有する医薬品成分のうち、化学薬品についてはEIイオン

化によるGC-MS法によりスクリーニングを行い、ライブラリ検索による迅速な成分確認を目指した。その結果、Fig. 3に示したとおり、8 検体中4 検体よりピークが検出された。検体No. 1 及び2 では保持時間12.78分にピークを認め、そのマススペクトルをライブラリ検索した結果、ビスコジルが該当し、その M^+ である m/z 361、アセチル基の脱離と推定される m/z 319及び277のフラグメントイオン等が確認された。検体No. 6 では保持時間9.37分にピークを認め、そのマススペクトルはフルオキセチンが該当し、その M^+ である m/z 309、4-トリフルオロフェノキシ基の脱離と推定される m/z 148のフラグメントイオン等が確認された。検体No.7では11.32分にピークを認め、そのマススペクトルはジアゼパムなどが該当し、その $[M-H]^+$ である m/z 283の他、 $[M-CH_2N]^+$ と推定される m/z 256のフラグメントイオン等が確認された。

3.4 Qtrap LC-MS-MSによる同定

3.4.1 甲状腺ホルモンの確認

検体No. 3 及びNo. 5 についてタンパク分解酵素による消化を行い、Qtrap LC-MS-MS法にて含有する甲状腺ホルモンT 3 及びT 4 を確認した。Fig. 4にその代表例として検体No. 3 におけるトータルイオンクロマトグラム及びそのマススペクトルを示した。プレカーサーイオン m/z 651.8では保持時間5.23分にT 3 のピークを認め、また、プレカーサーイオン m/z 777.7では保持時間9.57分にT 4 のピークを認めた。これらのピークマススペクトルでは、各プレカーサーイオンの他、 $[M+H-CO-H_2O]^+$ と推定される m/z 605.8 (T 3) 及び m/z 731.8 (T 4) が確認された。これらの結果は陽性対照及び標準溶液の分析結果と一致しており、検体No. 3 及びNo. 5 における甲状腺ホルモンT 3 及びT 4 の含有を確認した。

3.4.2 ビスコジル、ヒドロクロロチアジド、フルオキセチン及びジアゼパムの確認

メタノール抽出した試料溶液について、EPIスキャン及びEMSスキャンによるLC-MS-MS分析を実施した。EPIスキャンでは、GC-MS法での検出成分及び事前に推定された各成分について、その分子量関連イオン $[M+H]^+$ または $[M-H]^-$ をプレカーサーイオンとしてMS-MS分析を行った。なお、ヒドロクロロチアジドは当初のグラジエント条件では保持が弱いことから、グラジエント送液の初期混合比を変更して分析を行った。

その分析結果をFig. 5に示した。検体No. 1 及び2 ではそれぞれ保持時間17.03及び17.04分にビスコジルと一致するピークを認め、そのマススペクトルでは4-アセチルフェニル及びアセチル基の脱離 $[M+H-CH_3COOC_6H_4-CH_3CO]^+$ と推定される m/z 184のフラグメントイオン等が確認された。No. 4 では保持時間7.45分にヒドロクロロチアジドと一致するピークを認め、そのマススペクトルでは $[M-H-CHN]^-$ 及

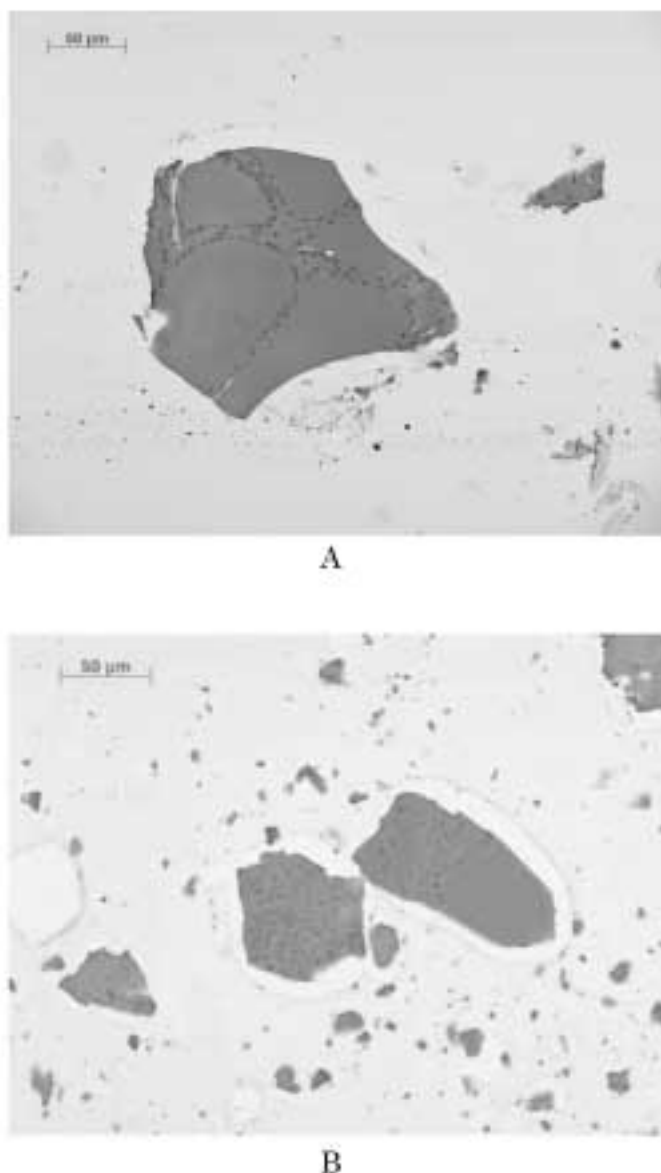


Fig. 2 Histological study of thyroid gland powder obtained in sample No. 3 (A) and the positive control (B) stained with hematoxylin-eosin.

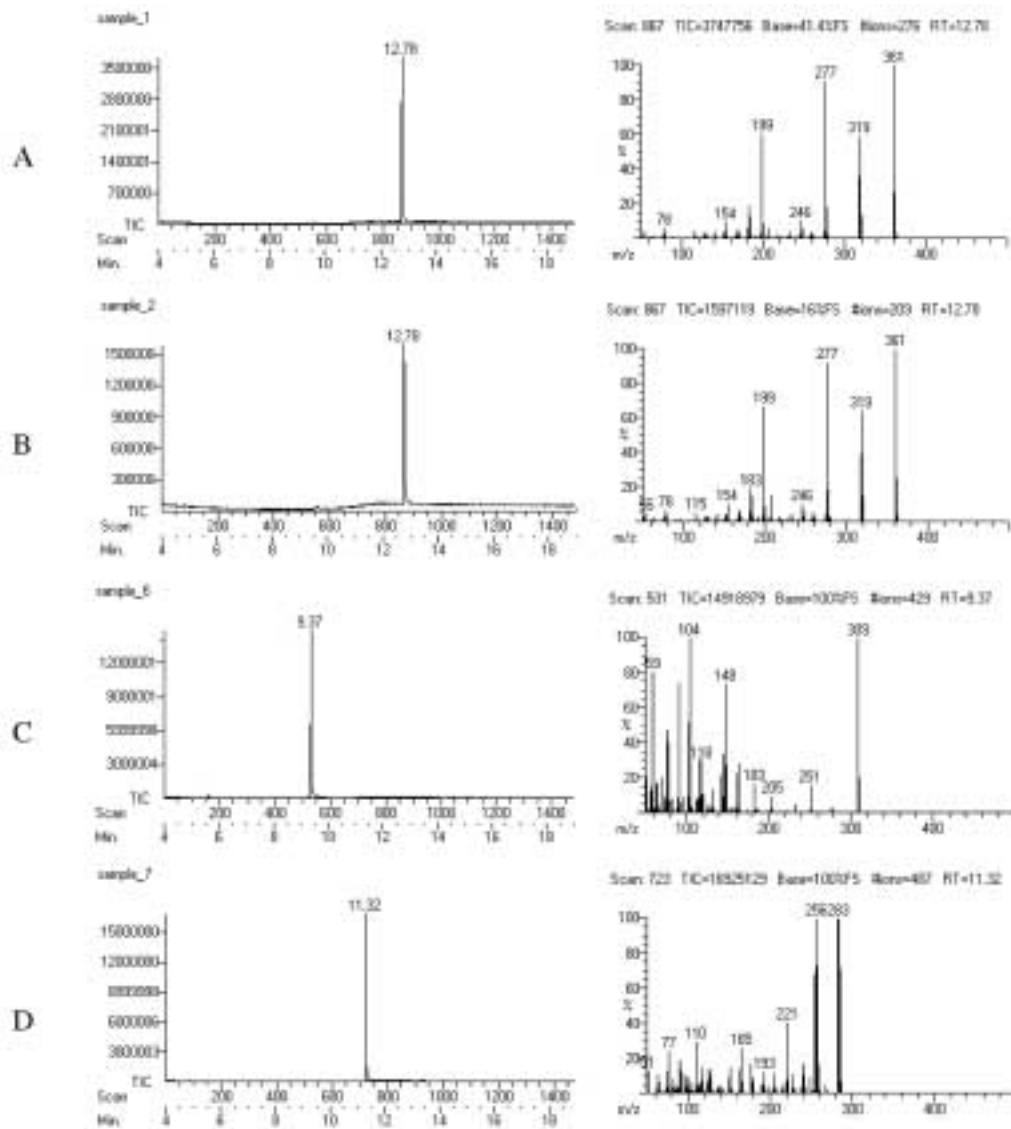


Fig. 3 GC-MS analysis of the ethyl acetate extract of samples.
No peak was obtained from sample No. 3, 4, 5, and 8.

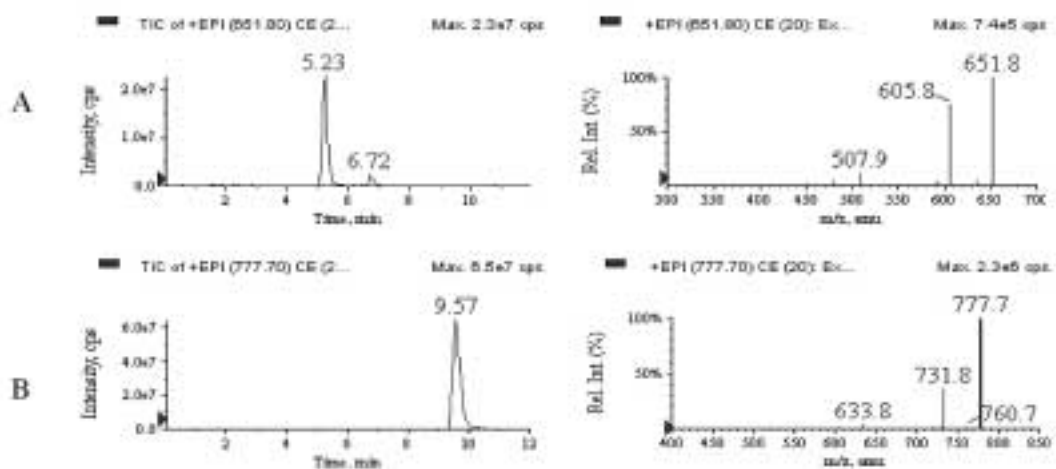


Fig. 4 Qtrap LC-MS-MS analysis of thyroid hormones in protease-digested solution of sample No. 3 scanned in the EPI mode.
(A) 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine; (B) L-thyroxine.

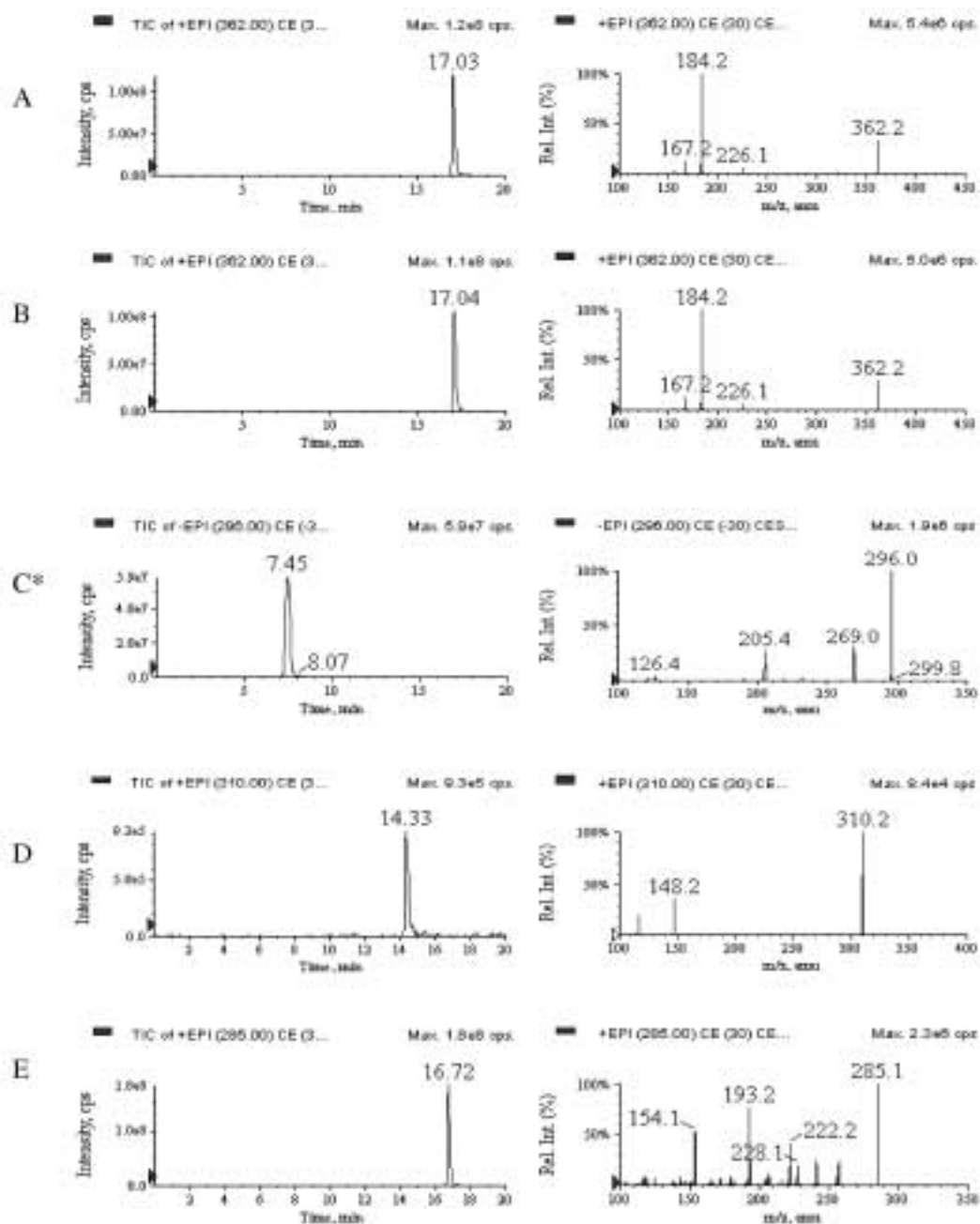


Fig. 5 Qtrap LC-MS-MS analysis of the methanol extract of samples scanned in the EPI mode. (A) Sample No. 1; (B) sample No. 2; (C) sample No. 4; (D) sample No. 6; (E) sample No. 7. No peak was obtained from sample No. 3, 5, and 8. *Initial ratio of the gradient mobile phase for sample No. 4 (C) was 0.01 mol/L ammonium formate (pH 3.0)/acetonitrile mixture (90 : 10, v/v), while the ratio for others was (70 : 30, v/v).

び $[M-H-CHNSO_2]^-$ と推定される m/z 296、205 のフラグメントイオン等が確認された。No. 6 では保持時間 14.33 分にフルオキセチンと一致するピークを認め、そのマススペクトルでは 4-トリフルオロフェノキシの脱離 $[M+H-CF_3C_6H_4OH]^+$ と推定される m/z 148 のフラグメントイオン等が確認された。No. 7 では保持時間 16.72 分にジアゼパムと一致するピークを認め、そのマススペクトルでは、 $[M+H-CO-CH_2-CH]^+$ 、 $[M+H-CO-Cl]^+$ 、 $[M+H-CO-CH_2-CH-Cl]^+$

及び $[M+H-CO-PhCN]^+$ と推定される m/z 228、222、193 及び 154 のフラグメントイオン等が確認された。

一方、EMS スキャンでは、検体 No. 1 及び 2 ではビスコジル、No. 4 ではヒドロクロロチアジド、No. 7 ではジアゼパムと一致する保持時間及び各成分の $[M+H]^+$ または $[M-H]^-$ を含むマススペクトルを持つピークを検出した。また、検体 No. 6 ではフルオキセチンの明瞭なピークを確認できなかったものの、分子量関連イオン $[M+H]^+$ によるマスキング

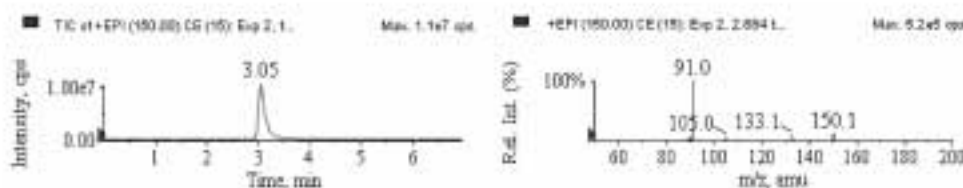


Fig. 6 Qtrap LC-MS-MS analysis of sample No. 8 extracted with a mixture of methanol/0.9% NaCl/1 mol/L NaOH (10 : 9 : 1, v/v) scanned in the EPI mode.

グラムではEPIスキャンと同一の保持時間にピークを認めた。

なお、甲状腺末が検出された検体No. 3 及びNo. 5、及びフェンテルミンの含有が推定された検体No. 8 のメタノール抽出試料溶液では、ピークは検出されなかった。

3.4.3 検体No. 8 “DUROMINE 30” の分析

検体No. 8 では、カプセル内容物のイオン交換樹脂様の粒子に対して、メタノール/0.9%塩化ナトリウム/1 mol/L水酸化ナトリウム溶液混液 (10 : 9 : 1) を加えてアルカリ条件下で抽出し、試料溶液を調製してQtrap LC-MS-MSにより分析を行った。その結果、Fig. 6に示したとおり、EPIスキャンにおいて保持時間3.05分にフェンテルミンに一致するピークを認め、そのマススペクトルにてベンジルイオンと推定される m/z 91のフラグメントイオン等が確認された。

4. 考察

今回の事例の様に、含有成分不明の製品を分析する際、過去の医薬品成分の検出事例、製品外観より含有成分を推定することは、少量しかない検体の浪費を防ぐ有効な手段である。また、一斉分析法では対象とならない甲状腺の形態学的確認の実施、及び、検出成分の妥当性を確認する上で有用であるだけでなく、分析対象とする標準品の入手など、分析の効率性及び迅速性を確保する上で重要となる。我々が本検体入手した際、その製品名称及び入手経路は不明であり、また、製品パッケージ等は入手できなかったが、その外観はいわゆるホスピタルダイエットとして個人輸入されている製品を連想させるものであった。

分析当時、ホスピタルダイエット及び類似製品の健康被害事例として、香川県、兵庫県、広島県における検体の特徴及び含有成分が厚生労働省のウェブサイト等で公表されていた[1]。この情報を基に、検体No. 1、4、7 及び8 では、それぞれ、ピサコジルまたは甲状腺末、ヒドロクロロチアジド、ジアゼパム及びフェンテルミンの含有を想定した。また、No. 4 に刻印された“H”は推定されたヒドロクロロチアジド (Hydrochlorothiazide) の頭文字に一致した。また、No. 7 では“5”及び“GREATER”の刻印があり、このうち“5”は有効成分含量と推察され、ジアゼパムの薬用量と一致していると考えられた。さらにNo. 8 にラベルされた識別コード“DUROMINE 30”は、国内では未承認であるが海外では実

在する医薬品の製品名であり、フェンテルミンの含有が推察された[8]。一方、検体No. 3 では“T-”または“T-T”、検体No. 5 では“T.ov”といった識別コードがあった。厚生労働省ウェブサイトには類似した検体の記載はないが、他の分析事例では甲状腺末が検出されていることを踏まえて、これらの識別コードは甲状腺 (Thyroid gland) の頭文字を意図していると考えられた。一方、検体No. 2 及びNo. 6 については類似製品の情報がなく、また、識別コードも見られないことから、これらの検体については含有成分を推定することはできなかった (Table 1)。

分析法に関して、甲状腺末の確認方法では、形態学的な試験方法として組織切片を作成し染色する方法[5, 7]があり、また、含有する甲状腺ホルモンT3 及びT4 を確認する分析法として、組織を酵素消化する方法が報告されている[5, 6]。一方、化学薬品の分析法としては、TLC法、PDA検出器を接続したHPLC法、GC-MS法及びLC-MS法などが想定される[2, 3, 9-14]。使用すべき分析法は、分析対象とする医薬品成分の化学構造、及び入手した検体量等によっても異なるが、EIマススペクトルのライブラリ検索を活用できるGC-MS法は、検出成分の標準品がない場合であっても含有成分の推定ができる場合があるため、スクリーニング法として優先すべき手法と考えられる。また、坂らは、DART (Direct Analysis in Real Time) イオン源を用いた飛行時間型質量分析計による精密質量測定、ダイレクトプローブによるEI及びCIイオン化質量分析、さらにLC-MS法を組み合わせる分析を行っている[3]。このうち、DARTイオン源とTOF-MSを組み合わせた分析法では試料の前処理無しに精密質量を測定することが可能であるため、検体の使用量を抑えつつも含有成分の推定に繋がる効率の良い手法と考えられる。一方、事前に推定される成分が無く、他の機器分析において何も成分が検出されない場合には、TLC法による確認が有効と考えられる。TLC法では紫外線照射及び様々な発色試液の使用が可能であるなど、検出方法の幅が広く、また、HPLC等にてカラムに保持されない成分及び溶出しにくい成分を含めて、試料溶液中の含有成分の状況を目視で把握しやすいといった利点がある[11]。なお、本研究ではある程度対象成分を絞り込むことができたため、甲状腺末の形態学的分析及びGC-MS法によるスクリーニングを優先し、続いてESIイオン化によるQtrap LC-MS-MSによる分析を実施した。

その結果、甲状腺末の確認では、検体No. 3 及びNo. 5 より

甲状腺末が検出され (Fig. 2及び4)、この結果は事前に含有成分を推定した結果と一致した。なお、検体の組織標本の作成法では、本事例で行ったパラフィン包埋切片以外にも、より簡易な塗抹標本の作成も考えられる。しかし、坂本らは甲状腺末を含有する中国製健康食品を対象として、両者の有用性について比較した結果、パラフィン包埋切片では甲状腺末の大きさと夾雑物の影響を受けにくく、甲状腺組織を確認しやすいことから検査用標本として有用かつ確実性が高いとしている[7]。また、本事例では、パラフィン包埋切片の作成において夾雑物除去のため検体粉末をあらかじめ水で洗浄したほか、検体粉末そのままでは固定・包埋操作が困難であることから、加温して溶かしたアガロースに検体を混和して固めることにより、一連の操作を円滑に行うことが可能となった。また、Qtrap LC-MS-MS法にて含有する甲状腺ホルモンT3及びT4を確認したが、試料の酵素処理時間については、製品中の夾雑物の影響により至適時間が異なることが報告されている[5, 6]。今回は酵素処理の至適時間の検討はせずに一律24時間処理して甲状腺ホルモン2成分を確認したが、本検体は一般的な健康食品とは異なり、酵素阻害を引き起こす可能性がある夾雑成分が少ないことから、酵素処理時間を短縮しても甲状腺ホルモンを確認できる可能性が考えられた。

甲状腺粉末以外の含有成分のスクリーニングでは、EIイオン化のGC-MS法を用いて分析を行った。検出されたピークについてNISTマススペクトルライブラリにより検索した結果、事前に含有成分を推定した検体No. 1及びNo. 7の他、検体外観では含有成分を推定できなかった検体No. 2及びNo. 6でも迅速に成分確認することが可能であった (Fig. 3)。なお、検体No. 7にて検出されたピーク成分は、ライブラリ検索の結果、マススペクトルの類似性よりジアゼパムだけでなくケタゾラムなどの可能性も考えられたが、本検体では事前の成分推定及び m/z 325付近にイオンピークが観察されないことを踏まえて、ジアゼパムと考えられた。しかし、EIイオン化により未知成分の分析を行う場合は分子量関連イオンが明瞭に確認できない場合もあるため、信頼性を確保するためには複数の分析手法・分析条件を組み合わせることが重要と考えられた。一方、検体No. 4及びNo. 8では、事前に成分推定されたヒドロクロロチアジド及びフェンテルミンは検出されなかった。

Qtrap LC-MS-MS法では、メタノール抽出した試料溶液において、フェンテルミン以外の各種化学薬品が検出された (Fig. 5)。また、検体No. 7では、EMSスキャンによりジアゼパムの分子量関連イオン $[M+H]^+$ に相当する明瞭なイオンを確認でき、我々の事前推定とGC-MS分析の結果を裏付ける結果となった。なお、検体No. 8に表示されていた“DURUMINE 30”は、有効成分フェンテルミンを結合するイオン交換樹脂を含有した医薬品製剤の名称である[8]。単一組成の有機溶媒ではフェンテルミンは抽出されないことから、メタノール/0.9%塩化ナトリウム/1 mol/L水酸化ナトリ

ウム溶液混液 (10: 9: 1) を用いてイオン交換樹脂から分離させることにより、EPIスキャンによりフェンテルミンを検出することが可能であった (Fig. 6)。

以上の分析の結果、計8種類の錠剤及びカプセルより、ピサコジル、甲状腺末、ヒドロクロロチアジド、フルオキシセチン、ジアゼパム及びフェンテルミンの計6種類の医薬品成分が検出された。この中で注目すべき点は、ジアゼパム、フェンテルミンといった向精神薬が2成分含まれていたこと、また、薬理作用ではダイエットとはあまり関連性がないと思われるフルオキシセチン、ジアゼパムといった成分が含まれていたことである。このことは、分析対象成分を推定する際は、薬効にとらわれずに過去の検出事例などの情報収集を元に、広い視野で検討する必要性を示唆していると考えられる。なお、甲状腺粉末以外の各医薬品成分含有量は、検体No. 1及びNo. 2のピサコジルは、それぞれ4 mg及び2 mg、No. 4のヒドロクロロチアジドは49 mg、No. 6のフルオキシセチンは18 mg、No. 7のジアゼパムは5 mg、No. 8のフェンテルミンは28 mgであった。本定量ではPDA検出器及びODSカラムによる逆相HPLC法を使用した。確認された各含有量は、薬用量より考えればいずれも医薬品製剤として妥当な含有量であると考えられる。また、検体No. 7及び8におけるジアゼパム、フェンテルミン含有量は、各検体に刻印または表示された“5”、“30”とほぼ一致したこと、検体No. 4におけるヒドロクロロチアジドの含有量は、西岡らの報告[2]にある水色中粒の錠剤での含有量とほぼ一致していたことから、妥当な定量値であると考えられる。

以上の結果より、本研究において過去の検出事例と製品外観を参考に分析方法を計画したことは、分析の迅速性と信頼性を確保する上で重要な要因となった。このことから、健康被害の早期原因究明と未然防止をより強化するためにも、迅速な分析法の構築の他に、検体外観についても活発に情報交換を図ることが必要不可欠であると考えられる。さらに、このような医薬品成分を含有する製品が個人輸入により安易に入手できる現状は、使用者の安全と医薬品の適正使用の観点から好ましい状況とは言えない。使用者に対して安易な服用を避けるよう啓発を図る必要があり、また、医師または医療従事者の判断が伴わない場合の医薬品の個人輸入のあり方についても、検討する必要があると考えられる。

文献

- [1] 厚生労働省 「ホスピタルダイエット」などと称されるタイ製の向精神薬等を含有する無承認無許可医薬品による健康被害事例について、available from <<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/jirei/030902-1.html>>, (accessed 2009-12-21)
- [2] 西岡千鶴, 野崎香織, 山下みよ子, 毛利孝明, 塚本武: 香川県環境保健研究センター所報 **2003**, 2, 84-93
- [3] Saka K., Konuma K., Asai S., Unuma K., Nakajima M.,

- Yoshida K. : *Forensic Sci Int.* **2009**, 191, e 5–10
- [4] Unuma K., Tojo A., Harada K., Saka K., Nakajima M., Ishii T., Fujita T., Yoshida K. : *BMJ Case Reports* **2009**
- [5] 浜田洋彦, 小坂妙子 : 宮崎県衛生環境研究所年報 **2000**, 12, 83–88
- [6] 小坂妙子, 浜田洋彦 : 食品衛生学雑誌 **2002**, 43, 225–229
- [7] 坂本義光, 湯澤勝広, 小縣昭夫, 上村尚 : 東京都健康安全研究センター研究年報 **2003**, 54, 78–80
- [8] MEDSAFE (New Zealand Medicines and Medical Devices Safety Authority), available from <<http://www.medsafe.govt.nz/profs/Datasheet/d/durominecap.htm>>, (accessed 2009–12–3)
- [9] 守安貴子, 蓑輪佳子, 岸本清子, 重岡捨身, 門井秀郎, 安田一郎 : 東京都健康安全研究センター研究年報 **2005**, 56, 81–86
- [10] 伊達英代, 豊田安基江, 寺内正裕, 杉本光永, 松尾健, 齋池千恵子 : 薬学雑誌 **2008**, 128, 811–817
- [11] 熊坂謙一, 松阪綾子, 麻生順子, 宮澤真紀, 土井佳代, 小島尚 : *Chromatography* **2007**, 28, 37–42
- [12] Liu S. Y., Woo S. O., Koh H. L. : *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, 24, 983–992
- [13] Bogusz M. J., Hassan H., Al-Enazi E., Ibrahim Z., Al-Tufail M. : *J Pharm Biomed Anal.* **2006**, 41, 554–564
- [14] Wang J., Chen B., Yao S. : *Food Addit. Contam.* **2008**, 25, 822–830