

平成9年度 日本オリンピック委員会スポーツ医・科学研究報告

No.V スポーツ選手を対象とするドーピング検査法に関する研究

(長野オリンピックドーピング検査システムの構築)

財団法人 日本オリンピック委員会
選 手 強 化 本 部

平成9年度日本オリンピック委員会スポーツ医・科学研究報告

V. スポーツ選手を対象とするドーピング検査法に関する研究

—長野オリンピックドーピング検査システムの構築—

研究班長：植木眞琴¹⁾

研究班員：池北紋子¹⁾ 岡野雅人¹⁾ 比留間知美¹⁾

佐藤充彦¹⁾ 藤崎誠¹⁾

Report of the research project on the testing procedures for doping control in sports
—Doping control test for the XVIII Olympic Winter Games, Nagano 1998—

By

Makoto Ueki¹⁾, Ayako Ikekita¹⁾, Masato Okano¹⁾, Tomomi Hiruma¹⁾

Mitsuhiko Sato¹⁾, Makoto Fujisaki¹⁾

Doping control laboratory, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.

Summary

Major problem of doping in sports is misuse of hormones according to the laboratory statistics issued by the IOC medical commission. One strategy for the problem is a long-term detection of anabolic agents by means of high resolution mass spectrometer (HR-MS). Our latest HR-MS procedure allowed the high sensitive detection of five problematic compounds, i.e. clenbuterol, nandrolone, methyltestosterone, metandienone and stanozolol. However, factors influencing in the high sensitive detection became known by our subsequent studies. Biological background affected the detection limit of metandienone, and endogenous nandrolone metabolite could be detected in female urine samples under certain conditions. The biological background could be successfully eliminated by high performance liquid chromatography (HPLC) fractionation. Pregnancy and oral administration of norethisterone resulted in the urinary excretion of 19-norandrosterone. Both factors could be confirmed by measuring urinary hCG or tetrahydro-norethisterone respectively. Recently, some unauthorized medicines have been misused in Olympic sports without any declaration. The typical examples are bromantane and carphedon. Carphedon is a stimulant that is structurally related to piracetam, and misused by athletes for the stimulation of oxygen uptake. These two stimulants are detected by our steroid screening procedure.

Key words : anabolic agents, metandienone, nandrolone, bromantane, carphedone

1. はじめに

IOC 医事委員会の統計によれば競技スポーツで最も問題となっているドーピングはホルモンの計

画的な乱用である。ホルモンドーピング対策の一つに高分解能質量分析計を用いた高感度検査法がある。昨年の研究報告で我々は特に感度上問題となる5種類の蛋白同化剤、すなわち 1 ng のクレン

¹⁾三菱化学ビーシーエル ドーピング検査室

Doping control laboratory, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.

ブテロール、各2 ng のナンドロロンとメチルテストステロン代謝物、各3 ng のメタンジエノンとスタノゾロール代謝物を検出できるスクリーニング方法を確立した。しかしその後の検討により、いくつかの問題点が明かになってきた。アトランタオリンピックでの検査で問題とされたようにメタンジエノン代謝物検出に際して尿中内因性物質が測定を妨害する場合がある。また、女性の尿には従来法で検出できない程度の内因性のナンドロロン代謝物19-ノルアンドロステロンが微量に含まれる場合があることがわかつてきた。最初の問題点については、今回 HPLC を用いた妨害成分の除去を試みた。内因性ナンドロロン代謝物の排泄には妊娠または経口避妊薬の服用が影響しており、妊娠の有無は尿中の hCG 値によって、また経口避妊薬服用の有無はその尿中代謝物 tetrahydro-norethisterone の検出有無によって判定できることが確認された。

一方最近になって、オリンピックスポーツにおける未承認医薬品の使用が問題になっている。その例としてブロマンタンとカルフェドンが挙げられる。そこで本研究班ではそれらの検出方法についても検討を加えた結果、これら 2 種類の新しい興奮剤はいずれもステロイドテスト法で検出できることが確認された。

2. 試料と装置

分析条件の検討には薬物を服用していないことが明かな職員から採取した尿と、それに既知濃度の標準物質を添加したもの用いた。また、IOC 医事委員会から供給されたテスト検体や、実際の競技会などで目的物質を含むことが確定した尿試料を評価用に用いた。すべての測定において前処理に用いた水をブランクとして試料同様に処理・分析し、分析中に試料への汚染がない事を確認した。

(試薬)

ステロイド標準品は IOC 医事委員会の委託によりドイツケルン体育大学生化学研究所で合成されたものを入手し使用した。その他のステロイド標準品は Sigma (USA)、誘導体化試薬は Nagel (Germany)、蛋白同化剤の脱抱合に用いたグルフ

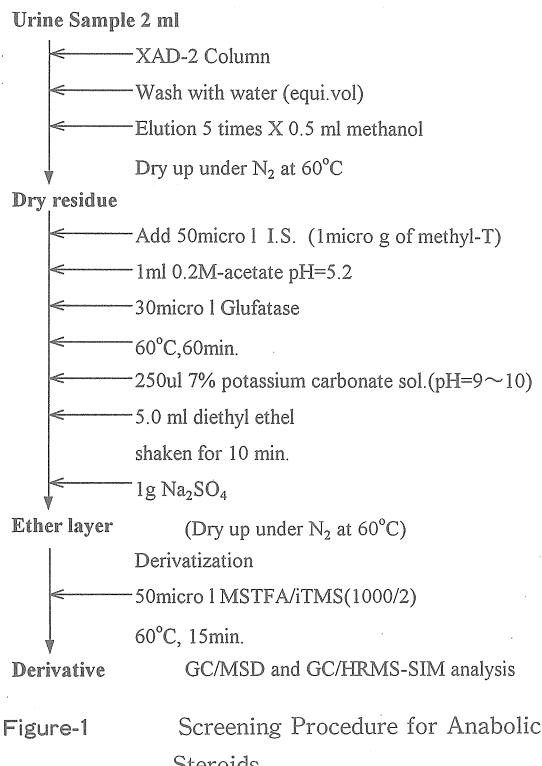
アターゼ(type A-II)とグルクロニターゼはそれぞれ日本バイオテスト社および Behringer Mannheim (Germany)、XAD-2樹脂は Organon(USA)、陽イオン交換樹脂 AG 50W X 8は Bio-Rad(USA)、より購入した。その他の試薬および溶媒は昨年の研究報告と同等品または市販特級品を用いた。カルフェドンは IOC ロシアラボラトリの Semenov 氏より譲受した。

(装置)

比較検討のために実施した従来法による実験では卓上型ガスクロマトグラフ質量分析計 HP5970 MSD、Hewlett Packard (USA) を、また高感度検出法では JMS-700型ガスクロマトグラフ質量分析計 MStation (日本電子) を用いた。尿中のステロイド分離精製にはミクロ高速液体クロマトグラフ Nanospace(資生堂：高圧グラジエントポンプ、オートサンプラー、UV 検出器、高圧バルブ切り替え器より構成)を用い、HPLC 用フラクションコレクター Gilson (USA) で溶出液を自動的に採取した。

3. 方法と結果

Figure-1に、既に文献で報告した一般的なステロイドのスクリーニング条件を示した¹⁾。また、HP5970 MSD による従来からの測定法(以下「従来法」と呼ぶ)および MStation HR-MS による高感度法(以下「高感度法」とよぶ)の装置条件を Table. 1-a, -b に示した。また HPLC によるステロイド抽出のための装置条件は Table. 2 に示した。まず Figure-1 に示す方法で抽出した試料についてすべての蛋白同化剤を対象に分析し、次いで判定が困難な成分については目的物質により最適な条件に変更して再度分析を行い詳細に検討した。高感度法の対象となる 5 成分のうち妨害成分や内因性成分の影響で確認が困難なものはメタンジエノン (metandienone; 主代謝物は epimetandienone, 6 β -hydroxymetan-dienone, epimethenediol など) とナンドロロン (nandrolone; 主代謝物は 19-norandrosterone および 19-noretiocholanolone) であり、これら 2 薬剤について確認分析条件の検討を行った。



前回のアトランタ大会で9人の陽性者がみつかり問題となったプロマンタンは、薬剤の性格上ステロイド隠蔽剤として大量に服用されることが予想されたため、ステロイドテストへの影響を除去する方法を中心に検討を行った²⁾。本年度から禁止薬物に指定されたカルフェドンの検出方法検討では、従来から実施している複数のスクリーニング方法のいずれで検出が可能かを比較した。

(メタニジエノン)

メタニジエノン代謝物のうち投与中止後最も長期間尿中に検出される成分はエピメテニジオールであるといわれ³⁾、IOC 医事委員会でもこの成分の検出を必須としている。検討ではエピメテニジオールを25ng/mlとなるように添加した健常者尿を作成し用いた。まず Figure-1 の方法により XAD-2カラムによる抽出後、グルファターゼによって抱合体の加水分解を行なった。加水分解後のステロイドはエーテルの代わりに同量の n-ペンタンで抽出し、溶媒は窒素気流下で乾固した。これを30%

アセトニトリル水溶液(V/V)200μlに再溶解し、その80μlを HPLC に注入してエピメテニジオールの画分を分取した⁴⁾。まず Table. 2 に示した条件にて分取した波長200nm での HPLC クロマトグラムと、分取した試料の質量クロマトグラムをそれぞれ Figure-2 a と Figure-3 a に示した。エピメテニジオールの検出はおもに精密イオン質量 448.319(m/z), 343.246(m/z) および 358.269(m/z) の 3 イオンで検出を行っているが、イオン 358.269 (m/z) に対する他の二イオンの標準試料と尿試料との相対強度比一致率はそれぞれ 448.319 (m/z) で 96.7%, 343.246 (m/z) で 76.3 % と改善の余地が認められた。次に前処理カラムで目的成分を含む部分を粗分画して大部分の妨害成分を除いた後、バルブ切り替えによって自動的に粗分画された部分が分離カラムに導入され、二段階で精製されるように分取条件を変更して同様に検討した。(Table-2, Condition-2) この条件で長野オリンピック期間中に確認を行った HPLC クロマトグラムと分取した試料の質量クロマトグラムの例を Figure-2-b, Figure-3-b に示した。図に示すように分取試料からは大部分の妨害成分が除去され、質量クロマトグラムのイオン相対強度比の一致率も 448.319(m/z) で 103.8%, 343.246(m/z) で 104.8% と大幅に改善され、尿中の成分がエピメテニジオールの標準試料と一致することが確認された。IOC 医事委員会への結果報告後、この尿が検査機関の能力判定のために選手の尿と共に送付されたブラインドコントロール試料であることが通知され、本法の有用性が裏付けられた。

(プロマンタン)

プロマンタンは、古典的な抗ウイルス剤アマンタジンの基本骨格の adamantan に p-bromoaniline 残基を導入した臭素化合物で、旧ソ連諸国では未認可医薬品として熱中症対策、免疫力の向上、蛋白代謝の改善などに効果が期待される新しい免疫賦活剤 (Immuno-stimulant) として使用されてきた⁵⁾。日本においてこの未知化合物が初めて検出されたのは1995年の競技大会であったが、その時点での化合物の詳細が明かでなく、プロマンタンを含む検体では正確なステロイド測定が

Table.1-a Chromatographic conditions by GC/MS

Instrument	: HP5970 GC/MSD equipped with HP7673A ALS		
Column	: Ultra 1 (HP) 0.2mm I.D. X 17m L Film thickness 0.11 micro m		
Oven temp	: Temp1 180°C	hold 1min.	
	: Temp2 229°C	Rate 3°C/min.	
	: Temp3 300°C	Rate 40°C/min.	
	Final hold	2.0min.	
Injector	: Temp	290°C	Split ratio 11:1
Carrier flow	: 70 kpa He at	180°C	
MS conditions	: Transfer line	300°C	
Workstation	HP9000-345 Unix Workstation with ChemLAN		

Table.1-b Chromatographic conditions by GC/HRMS

Instrument:	JEOL JMS700 Mstation equipped with HP6890GC		
Column:	Ultra 1 (HP) 0.2mm I.D. X 17m L. Film thickness 0.11 μ m		
Oven temp:	: Temp1 180°C	hold 1min.	
	: Temp2 229°C	Rate 3°C/min.	
	: Temp3 300°C	Rate 40°C/min.	
	Final hold	3min.	
Injector:	Temp	290°C	Split ratio 11:1
Carrier flow:	15.0 psi He at	180°C (Constant press)	
MS conditions:	GC Interface temp.	300°C	
	Chamber temp.	200°C	
Ionizing energy	70eV	Ion Current 600 μ A	
		Resolutiōn 1,000-10,000	
Workstation:	HP model 715/64 Unix Workstation		

Table.2 HPLC Conditions for Fractionation of Epimethendiol

Condition 1	Column	Capsule Pak UG120(C18),5 μ m, 2.0 mm I.D. X 150 mmL (Shiseido)
	Mobile Phase A	30 % Acetonitrile aqueous solution(V/V)
	Mobile Phase B	100 % Acetonitrile
	Flow rate	0.4 ml/min
	Fractionation	① linear gradient, from B 0 % at 0 min to B 100 % at 17.5 min ② fraction of 9.6~10.6 min was collected
Condition 2	Pre-column	Capsule Pak UG120(Phenyl),5 μ m, 2.0 mm I.D. X 35 mmL (Shiseido)
	Main Column	Capsule UG120(C18),5 μ m, 2.0 mm I.D. X 150 mmL (Shiseido)
	Mobile Phase A	30 % Acetonitrile aqueous solution(V/V)
	Mobile Phase B	100 % Acetonitrile
	Flow rate	0.4 ml/min
	Fractionation	① sample was injected into the pre-column with 100 % A ② fraction of 7.5~9.0 min from the pre-column with 100 % A was switch to the main column ③ mobile phase for the main column, 0~9.0 min = 0% B, 9.1~22.5 min = linear gradient 0 % B to 50 % B ④ fraction of 19.7~21.2 min from the main column was collected

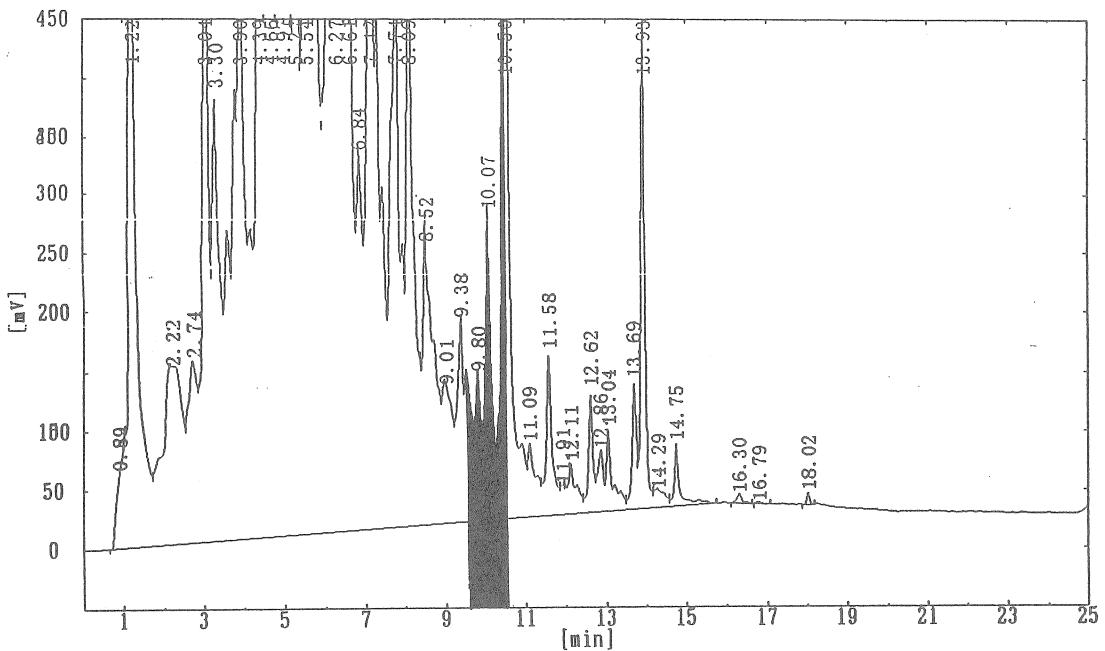


Figure-2.a

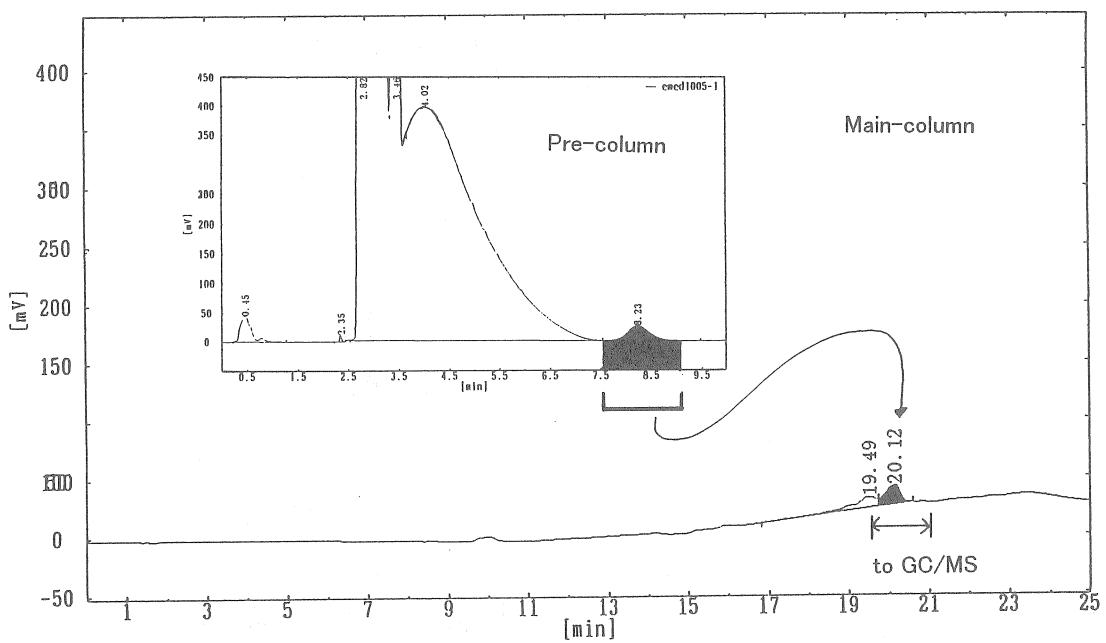


Figure-2.b

出来なかつたため、検査結果は要注意データとしてコメント付きで報告された。アトランタオリンピックでは9例のプロマンタン陽性者が発見されたと言われている。本報告では試料中のプロマンタンを除去し、正確なステロイド測定を行う条件について検討した。Ayotteらおよび我々の検討結果から、プロマンタンは主として水酸化型代謝物のグルクロン酸抱合体としてFigure-1の方法で検出されることが判明している⁶⁾。Figure-4-a, -bにはプロマンタンの共存によってステロイド測定が困難になった例の質量クロマトグラムと、検出された成分の質量スペクトルとを示した。ステロイ

ドのスクリーニング条件で、プロマンタンは水酸基の位置が異なると思われる4種類の代謝物 Hydroxy-bromantan-O-trimethylsilylether (Hydroxybromantan-O-TMS) として検出される。Figure-4-bに示すようにその質量スペクトルには臭素化合物に特徴的な2種類のアイソトープクラスターからなる分子イオン (M^+) 393 (m/z) と395 (m/z) が明確に検出されるため、簡単かつ精度良く検出可能であった。4種類の代謝物のうち3種類はステロイドドーピングの判定に重要な生理的ステロイド成分、それぞれ Androsterone と Etiocholanolone の間, Dehydro-epiandrosterone

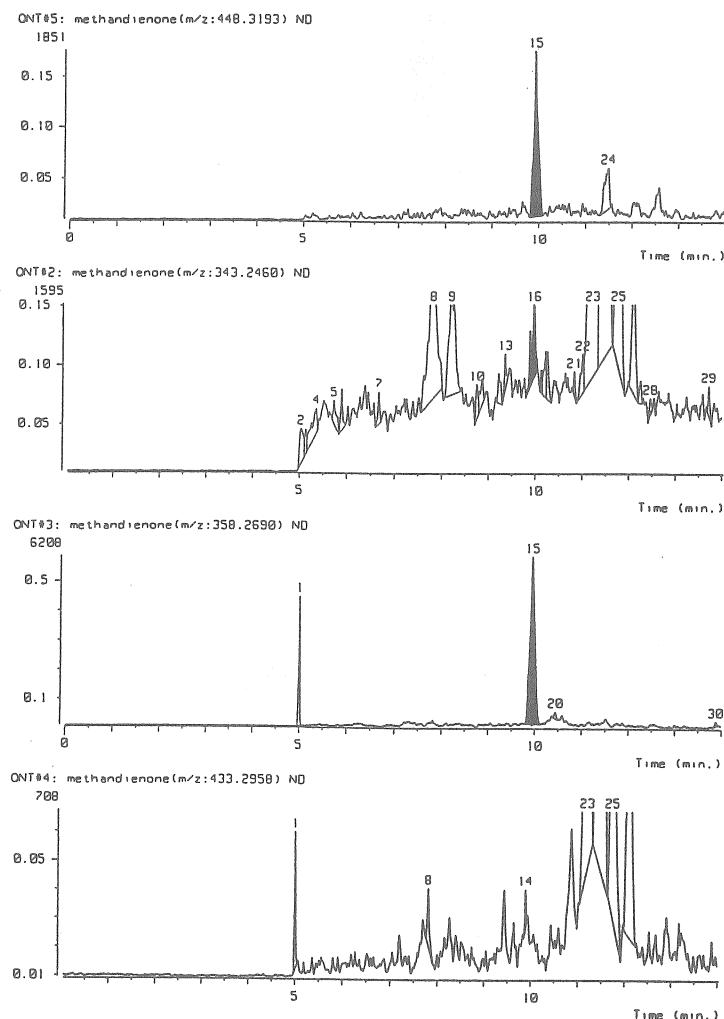


Figure-3.a

(DHEA) の位置および Dihydrotestosterone (DHT) の位置に検出され、それらのステロイドの正確な定量が困難であった。 (Figure-4-a) さらにプロマンタン濃度の高い検体では共存するステロイドの検出位置が遅れるため、テストステロンの判定も困難であった。そこでプロマンタンが塩基性物質であることに着目して、以下 4 種類の方法によって中性ステロイドとの分離を試みた。また、プロマンタンが高濃度の場合ガスクロマトグラフカラムへの試料添加量が過負荷となる傾向があるので、試料注入量は通常の $2.0\mu\text{l}$ と $1/4$ ($0.5\mu\text{l}$) の二通りの条件で以下①から④の分析を行った。

た。

- ①陽イオン交換樹脂 Dowex AG50Wx8を1N 塩酸酸性で H^+ 型とした後0.2N 酢酸緩衝液 pH=5.3で安定させ、その2.0mlをカラムにつめ尿2.0mlを添加。通過した溶出液を Figure-1 の方法に従って酵素加水分解し、以下同様に処理して測定した。
- ②Axelson らの方法に従って陽イオン交換樹脂 Triethylaminohydroxypropyl Sephadex LH20 (TEAP LH20) を合成し、中性ステロイドのグルクロン酸抱合体を分取し測定した。
- ③Figure-1 の方法に従ってステロイドの加水分

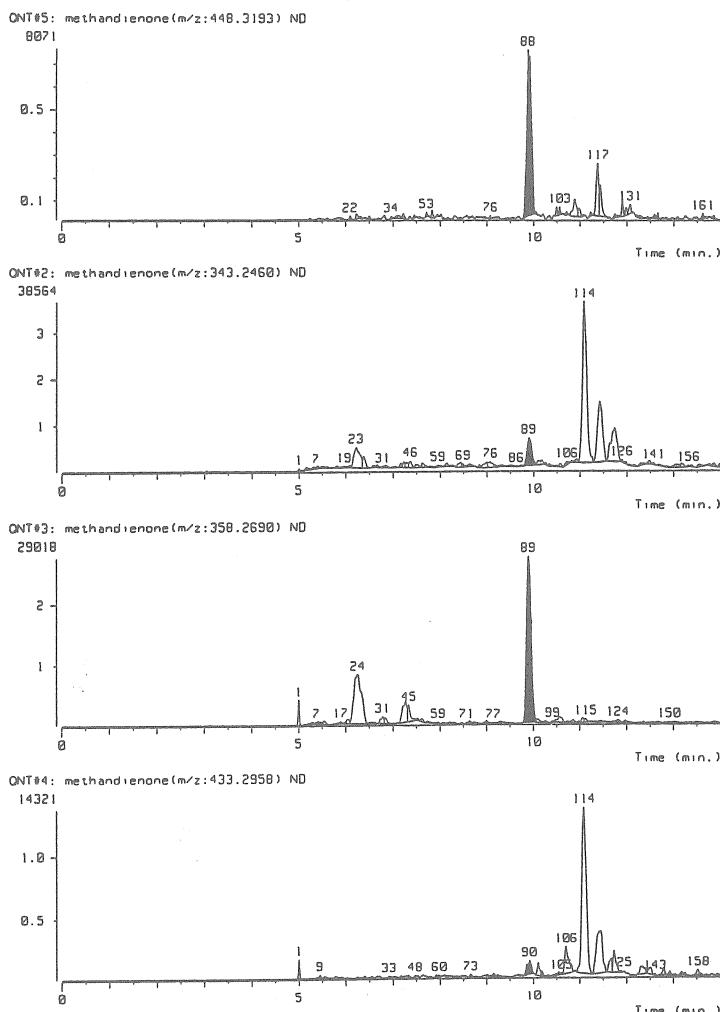


Figure-3.b

解物を調整し、エーテルの代わりにn-ペンタンによってステロイドを抽出、以下同様に処理した。

④③の方法でn-ペンタン抽出する際、 K_2CO_3 を添加せずに中性のまま抽出を行い、以下同様に処理した。

各方法で分析した場合の総イオンクロマトグラムをFigure-5に示した。図中最上段はステロイド標準品、上から五段目は通常のスクリーニング方

法で試料注入量のみを1/4とした場合を示す。通常の前処理方法、およびイオン交換樹脂を用いた抽出①、②では試料中のプロマンタン代謝物除去は不完全であり、ステロイドテストへの妨害を防ぐことができなかった。これは①では高濃度のプロマンタン代謝物によってイオン交換樹脂が過負荷になりその一部がステロイド抽出液中に混入すること、また②ではプロマンタン代謝物もステロイド同様に大部分がグルクロン酸抱合体となって尿

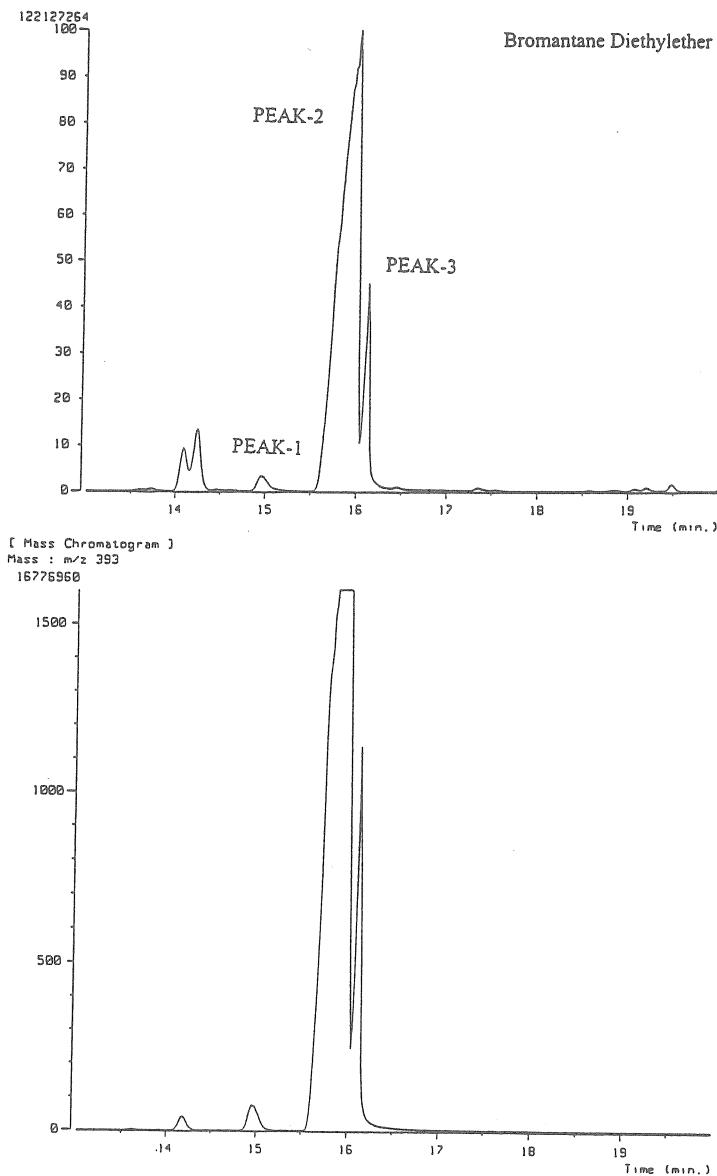


Figure 4.a

に排泄されるためと考えられた。①, ②の抽出液では分析装置への試料注入量を通常の1/4量に減らすことにより若干の改善は見られたものの(例: Figure-6, 上から三段目), 目的とするステロイドの分析カラムへの保持時間は上段に示した標準物質のそれと比べて1~2分遅れて溶出され, しか

もピーク形状が非対象になるために, 正確な同定と定量が不可能であった。(例: 上から二段目) 次に, ステロイド抽出液中のプロマンタン混入を最小限とするため, Figure-1に示した抽出溶媒をジエチルエーテルから低極性有機溶剤のn-ペンタノンに変更して検討した。抽出溶媒の変更によって

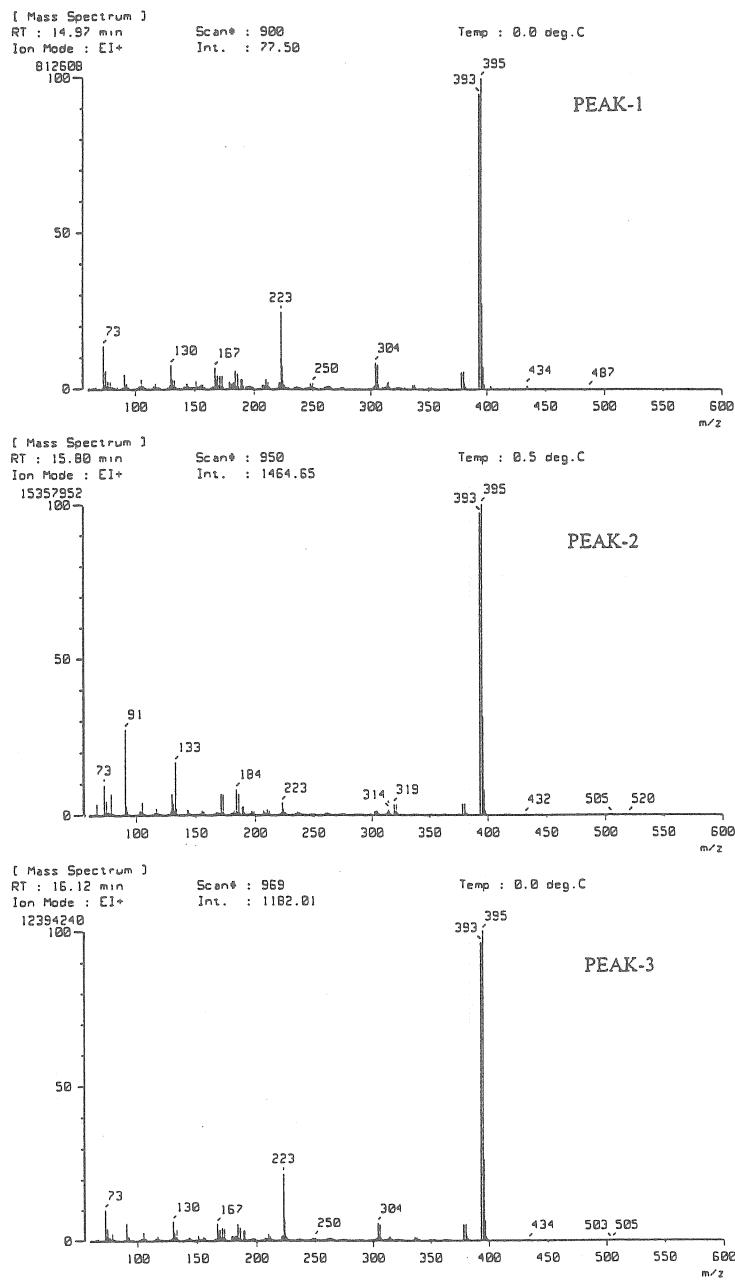


Figure-4.b

ステロイド抽出液への妨害物質の混入はかなり改善されたものの、図の最下段に示したように DHEA のピーク（ピーク 4）付近にプロマンタンの主代謝物の一部が依然として検出された。これは抽出時にスタノゾロールなどの塩基性ステロイドの抽出を改善するために加えている K_2CO_3 の影響と予

想されたため、 K_2CO_3 を加えずに n-ペンタン抽出を行ったところ、図中上から四段目に示したようにプロマンタンの影響をほぼ完全に除去することができた。

以後、プロマンタンが検出された場合のステロイド測定では K_2CO_3 を加えずに n-ペンタンを抽

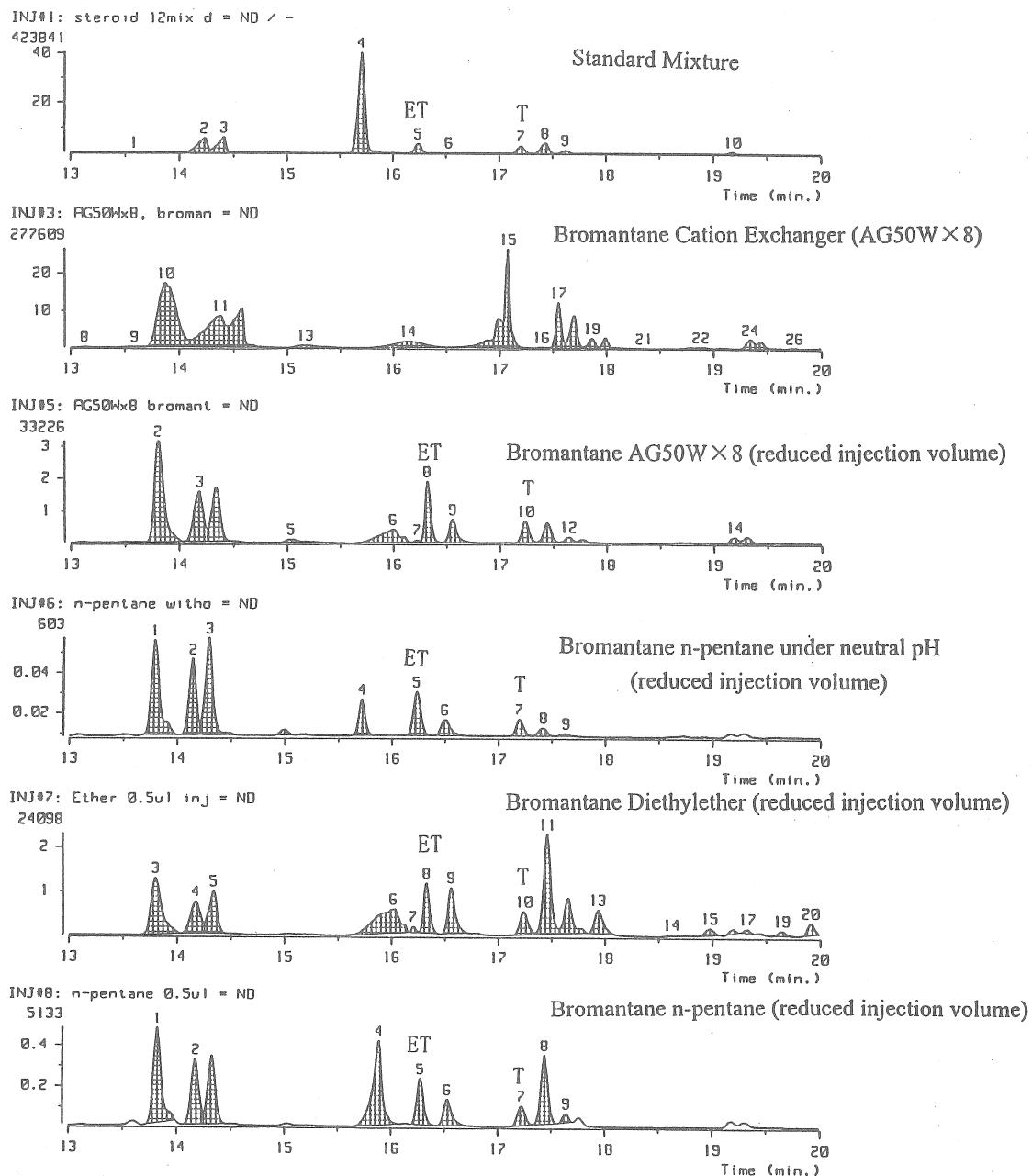


Figure-5

出溶媒に用いてステロイドの加水分解物を抽出することとした。

(カルフェドン)

カルフェドン (4-Phenyl-2-oxo-1-pyrrolidineacetamide) は、ピラセタムのフェニル誘導体で、その主な代謝物は3-hydroxy 体とフェニル基のp-位の水酸化体である⁷⁾。トリメチルシリル (TMS) 化では acetamide の nitrile 化体などの様々な分解物が生成しそれらの TMS 化物として検出されるために、多量に服用すれば同時に服用した他の薬物の検出が困難になる。スクリーニング方法の検討ではカルフェドンの標準試料をブランク尿に添加し、4.0 μg/mlの濃度の試料を作成して用いた。まず、既に発表したスクリーニング条件により興奮剤、麻薬、蛋白同化剤、利尿剤、β遮断剤の各スクリーニング方法での検出の有無を調べたところ、蛋白同化剤のスクリーニング (Figure-1 の方法) ではニトリル化体の Carphedon-

3-enol-O-TMS 化物 (分子量272) として、また利尿剤のスクリーニングでは未反応のカルフェドン (分子量218) として明瞭に検出された。これらスクリーニングの前処理はいずれも XAD-2カラムを用いた固相抽出法である。アルカリ下でエーテル抽出を行う興奮剤や麻薬の液-液抽出条件でのカルフェドンの抽出率は10-50%程度で、良好な抽出率は得られなかった。このことからカルフェドンの抽出には有機溶剤による液-液抽出よりも固相抽出のほうが適していることが推測される。これはカルフェドンがアセトアミド化合物で、興奮剤・麻薬のような強アルカリ化では抽出されにくいためである。液-液抽出での回収率を改善するためには抽出条件をカルフェドンに併せて変更しなければならず、他の薬剤の抽出率にも影響することから、当面は運用上 Figure-1 に示した XAD-2抽出によりステロイドと同時に測定し、陽性が疑われる場合には利尿剤のスクリーニングで未変化体を確認することとした。Figure-6に利尿剤のスク

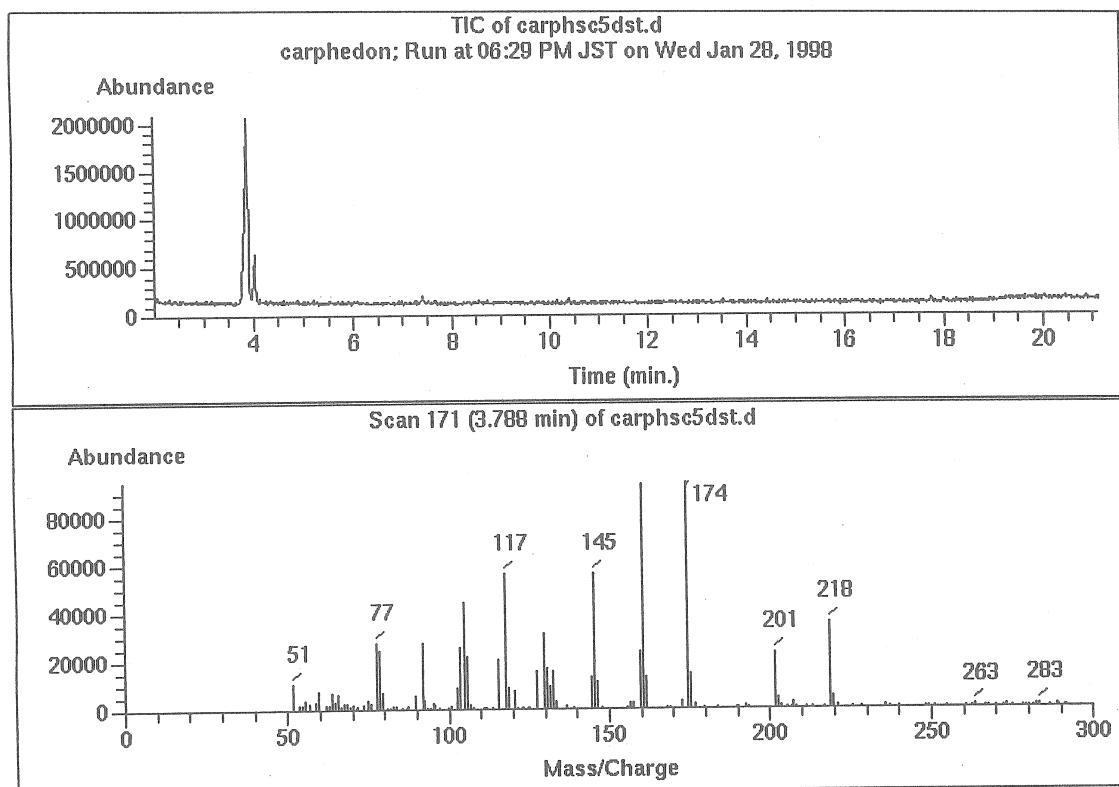


Figure-6

リーニング条件で検出されたカルフェドンの質量クロマトグラムと質量スペクトルを、Figure-7に β -遮断薬のスクリーニング条件で検出されたCarphedon-N-TMS体(分子量290)とその分解物ニトリル体(分子量272)の質量クロマトグラムと質量スペクトルをそれぞれ示した。以上の検討結果を踏まえて未知成分が検出された過去の検査結果について調査した結果、1996年2月に日本で開催された国際スポーツ大会の検体にカルフェドンが検出されており、日本で開催されたスポーツ大会でも少なくとも2年前には既にカルフェドンが使用されていたことが立証された。(Figure-8)

(ナンドロロン)

蛋白同化剤の高感度検出法が正式にIOCの認可条件として実施されるようになり、新たに微量の

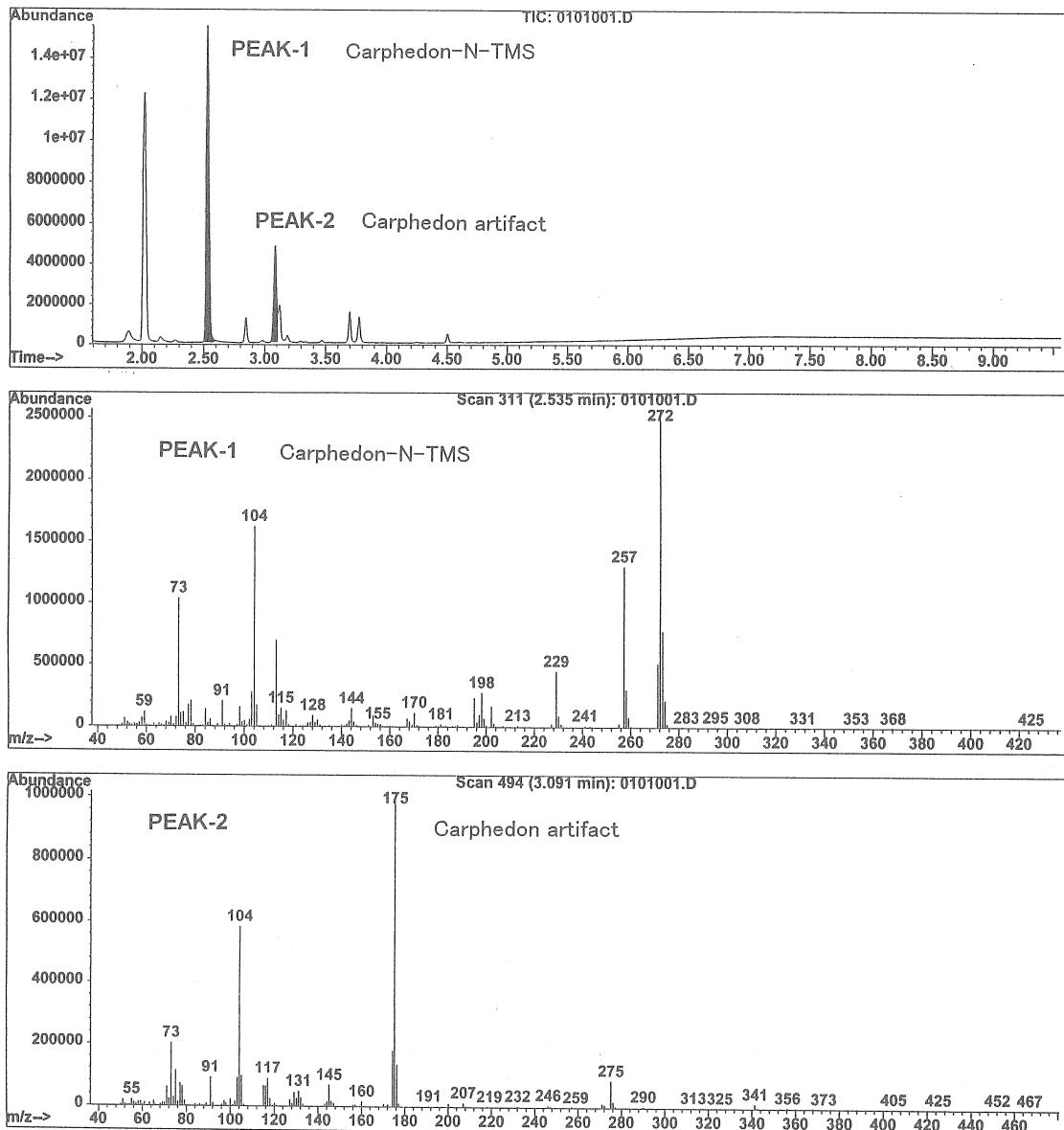
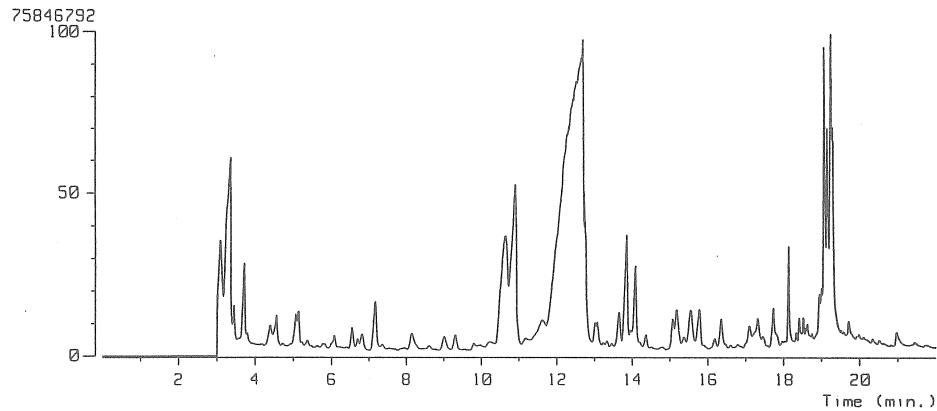
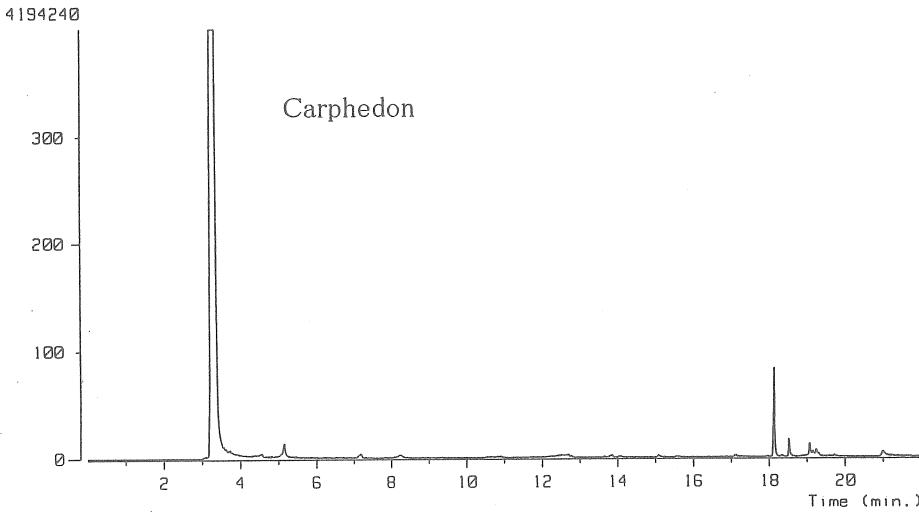


Figure-7



[Mass Chromatogram]
Mass : m/z 272



[Mass Spectrum]
RT : 3.27 min
Ion Mode : EI+
Scan# : 197
Int. : 399.99

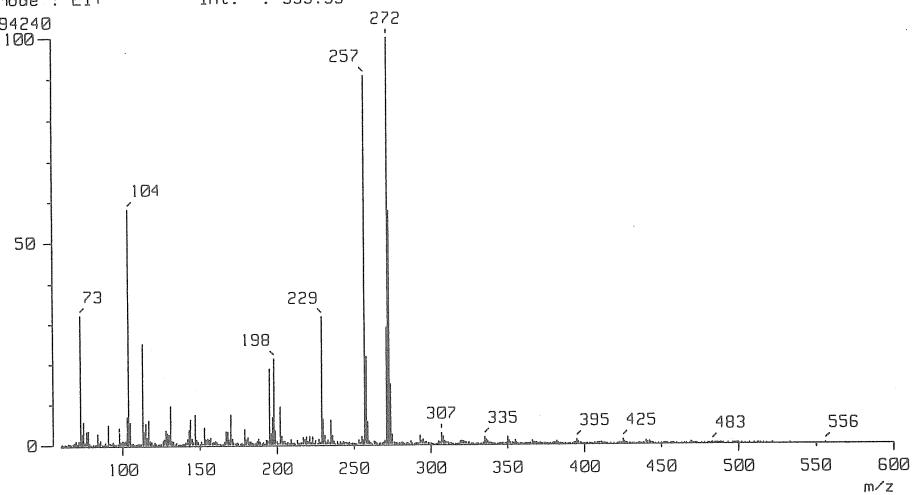


Figure-8

ナンドロロン代謝物を検出する際の問題点が明かになってきた。我々は既に昭和63年度の日本体育協会スポーツ科学研究報告で、17-ethynil-19-nortestosterone を含む経口避妊薬服用後の尿にナンドロロンと同じ代謝物19-norandrosterone が検出されることを報告した⁸⁾が、高感度検出法ではこれまで以上に経口避妊薬の影響が長く残ることになる。幸い19-norandrosterone の陽性結果が17-ethynil-19-nortestosterone の服用による場合には、その主代謝物 tetrahydro-17-ethynil-19-nortestosterone が19-norandrosterone よりも多く検出されるため、tetrahydro-17-ethynil-19-nortestosterone の有無と、その19-norandrosteroneとの比率を調べることにより判定が可能である。一方、Dehennin らは1987年に内因性19-norandrosterone の存在を報告している。ヒト体内のステロイドホルモンは食物中のコレステロールを原料に合成されるが、男性ホルモンから酵素アロマターゼを触媒として女性ホルモンを合成する反応やプレグナン類の生合成など、いくつかの生合成課程においてステロイド骨格からメチル基が脱離する反応を伴う。それらの反応に関与する酵素の副反応の詳細は明かでないが、いずれも女性において亢進

する反応であり、性別差や妊娠の関与が推測されている。以上より、ナンドロロンの判定に際しては経口避妊薬の申告や妊娠の有無に留意する必要があると考えられる。

長野オリンピック期間中に実施したドーピング検査でヒト胎盤性ゴナドトロピン (hCG) が高値を示した尿は3例で、うち2例はhCGの測定値から妊娠女性と判定された。それら2例の尿には19-norandrosterone が検出されたが、濃度はいずれも2 ng 以下であった。また残りの1例はIOC医事委員会が選手の尿と同時に送付したブラインドコントロール検体で、男性のボランティアにhCGを投与後採取された検体であった。この例ではhCGは検出されなかった。一方、tetrahydro-17-ethynil-19-nortestosterone と19-norandrosterone が同時に検出された例は3例で、うち2例は経口避妊薬の服用を申告していたが、残りの1例は無申告であった。ドーピング検査の際、使用薬物の申告を怠ると意図的に申告しなかったと見なされる場合があるため、特に経口避妊薬を服用している場合には正しく申告する必要がある。

Figure-9に今回研究対象とした主なドーピング物質の構造式を示した。

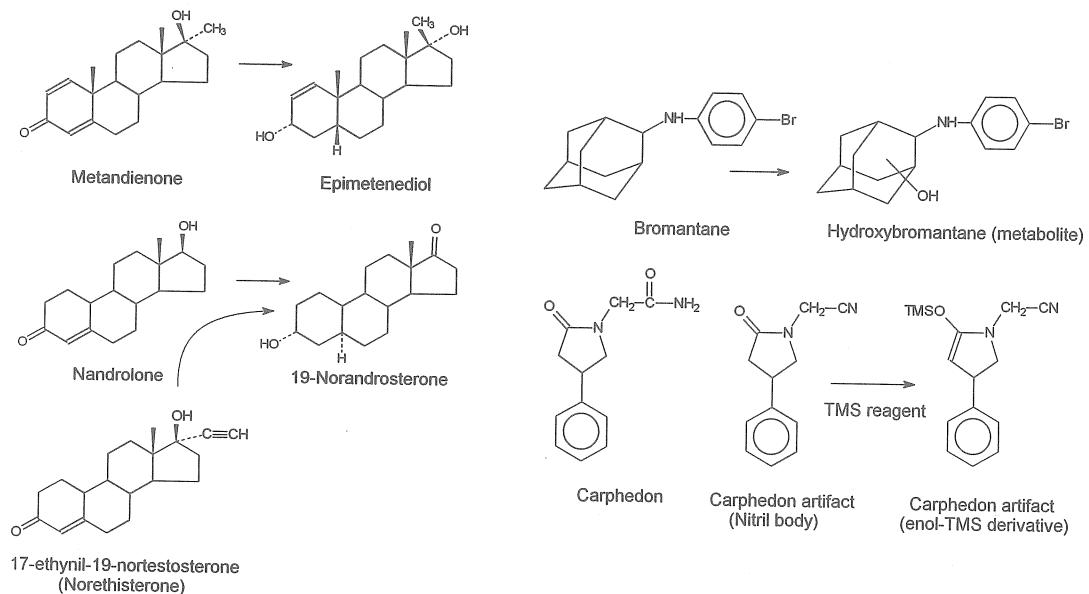


Figure-9 Molecular formula of some dope agents and metabolites

4. まとめ

以上、本年度からIOCが正式に採用した蛋白同化剤の高感度検出法の問題点について検討した。また今回の追加検討によって、長野オリンピックを前に急遽禁止薬物に指定されたカルフェドンなど、未認可医薬品のドーピング検査にも対応可能になった。近年インターネットの普及と共に通信販売形態での薬剤売買が盛んになり、数多くのホルモン剤がアメリカを中心として取り引きされるようになってきた。しかも我々の検査結果は、これら薬物が時を同じくして直ちに日本に上陸していることを示している。このようなホルモン剤の中には生体内で合成されるステロイドや男性ステロイドの前駆体、たとえばDHEA, Androstenedione, 4-androstene-3 α , 17 β -diol, 19-nor-4-androstenedioneなどが含まれ、その多くはヒト体内で男性ホルモンそのものに代謝されるドーピング薬物である。選手が栄養補助食品と間違えて使用しないよう充分な注意が必要であると共に、これらの成分を検出する検査方法の開発も急務となっている。本研究班では既に炭素同位体比質量分析計を用いて生体内で合成されたステロイドと体外から摂取した化学構造が同じステロイドとを判別する方法について検討を開始している¹⁰⁾。生理的ステロイドのドーピング防止のため、今後とも研究を続けて行く予定である。

5. 文 献

- 1) 植木眞琴：バイオロジカルマススペクトロメトリー（上野民夫、他編），現代化学 増刊31，東京：東京化学同人，204-214（1997）
- 2) Ueki M, Ikekita A, Okano M, Hiruma T.: Recent advances in doping analysis(5), Schanzer W et.al. (Editors), Sport und Buch Straus, Cologne, 279-286 (1998)
- 3) Horning S, Schanzer W: Recent advances in doping analysis(4), W.Schanzer et.al. (Editors), Sport und Buch Straus, Cologne, 261-270 (1997)
- 4) Gotzmann A, Geyer H, Schanzer W: Recent advances in doping analysis(4), W.Schanzer et.al. (Editors), Sport und Buch Straus, Cologne, 239-246 (1997)
- 5) Krapivin S.V et.al.: Byull Eksp. Biol. Biol. Med. (Russian Federation), 116, 515 (1993)
- 6) 植木眞琴：ファルマシア, 33(9), 1005-1008(1997)
- 7) Semenov V., "Metabolism and degradation of Carphedon", Moscow Dope Control Laboratory (private communication), Moscow, (1998)
- 8) 中野義彦他：昭和63年度日本体育協会スポーツ科学研究報告 VII, 1-12 (1988)
- 9) Dehennin et.al.: J.Steroid Biochem, 26, 399-405 (1987)
- 10) 植木眞琴：衛生化学44(2), 21-28(1998), 投稿中

[海外出張報告]

1. ドーピング検査ラボラトリーの国際認定に関するワークショップ参加とISO(国際標準化機構)の検査機関認定に関する調査。(カナダ、イギリス、フィンランド)

近年ドーピングに関する法的問題がたびたび話題となり、検査機関も国際的に通用する法的対応が求められている。現在世界に25カ所あるドーピング検査機関は、IOC医事委員会による審査と年1回の定期的な追認定試験を経て公認されているが、現在の方式はスポーツ界だけの認証であるという指摘がある。そこでIOC医事委員会では検査機関に国際標準化機構(ISO)の認証取得を同時に取得させる方向で作業を進めている。日本の産業界ではISO9000シリーズの認証が一般的であるが、これは品質管理の基本理念についての要求であり化学分析について技術的なガイドラインを示すものではない。IOCでは2000年1月1日までに化学分析分野では最も厳しい要求事項を規定しているISO guide 25を取得するよう求めている。現在日本にはISO guide 25の審査が出来る認証機関、認証を取得した検査機関のいずれもないため、正確な情報を収集するため海外調査を実施した。調査地としてはIOC関係者によって国際認定ワークショップが開催されたThe 5th International Congress of TDM and Clinical Toxicology (Vancouver, Canada), ISO guide 25認証を既に取得済のロンドンラボラトリー(King's College London,

Department of Pharmacology), ロンドンの ISO 認証審査機関 NAMAS(National Measurement Accreditation Service)と LGC(Laboratory for

Government Chemist)および IOC ヘルシンキラボラトリー(United Laboratories)を対象とした。

日 程	滞 在	行 動 日 程
11月／9－12日	バンクーバー	TDMCT 国際会議出席 (12日移動)
11月／13日	ロンドン	IOC ロンドンラボラトリー訪問
11月／14日	テディントン	NAMAS, LGC 訪問 (15日移動)
11月／16－17日	ヘルシンキ	IOC ヘルシンキラボ訪問 (19日帰国)

The 5th International Congress of TDM and Clinical Toxicology

この会議は薬物治療監視と臨床毒物学国際協会が主催し、カナダ臨床化学会、米国臨床化学界薬物部会が後援する国際会議で、今回が第五回の開催である。事前登録者はおよそ450人だが、北米大陸では安全管理従事者に対する乱用薬物検査の実施が法律で義務づけられており、また米国ではプロスポートを含めて年間28,000人ものドーピング検査を実施していることからドーピング検査に関する国際認証への関心は深い。当社からの参加は植木のほか桜井兵一郎品質管理担当理事（自己負担にて参加）、また海外からは Prof. J. Segura (IOC Doping Sub-commission, Barcelona), Prof. D. Cowan (IOC London Lab.), Dr. P. Hemmersbach (IOC Doping Sub-commission, Oslo), Dr. L. Bowers (IOC Indiana Lab.), Dr. A. Pipe (CCES: Director, Canadian Center for Ethics in Sports), Dr. W. Exum (Medical Commission of US Olympic Committee) など検査機関、選手関係者、スポーツ統括団体を含む多数のスポーツドーピング関係者が参加した。WS7, International Accreditation of Athlete Drug Testing Laboratories は以下のようない内容であった。

Prof. Segura からは IOC の認定システムはこれまで有効に機能してきたが、最近いくつかの検査機関で選手の上告に敗訴する例が出てきたこと、国際調和のために明確なガイドラインが必要なこと、国際的に受け入れられるためには国やスポーツに依存しない国際的な第三者認証が必要なことから ISO guide 25導入が必要との IOC 方針が述べられた。

Prof. Cowan からは ISO 認定取得時の経験から各検査機関が明確な品質指針を持ち、分析手法、分析内容（定性、定量）ごとに検査システムを整然と体系的に整理し、それらの品質基準を文書化することの重要性が紹介された。また ISO の査察官は必ずしもドーピング検査の専門家ではないので、査察を受ける側が業務に関する明確なポリシーを持つ必要があることについても述べられた。フロアでは選手側のコーチやチームドクターなども聴講しており、自分のサポートしている選手がドーピング陽性となった場合の経験と要望などについても意見が出され盛んな意見交換であった。

この WS の後、実際の対応について調査するために、ISO 認証を受けた検査機関 3 カ所を訪問した。IOC ロンドンラボ（王立ロンドン大学）では ISO 認証と日々の業務管理のために製薬会社スマスクライインの品質管理経験者を採用し、専門的に担当させている。ここではどのような文献を参考に準備を進めたか質問し、具体的に認証機関の NAMAS を紹介していただいた。ロンドンラボではそのほかに日々の職員のトレーニング、陽性検体の報告に至る意志決定のプロセスなどの文書化など、実際的な情報を得ることができた。翌日 NAMAS (国家計測認定審査所) を訪れ、化学検査機関の認証基準、再現性の良い測定を行うための品質基準、分析化学における品質の国際的指針、品質マニュアルなどに関する文書などを多数入手した。これらの情報は日本に ISO guide 25認定検査機関が存在しないためにそのほとんどが初めて入手したものであった。次に訪れた LGC (国家公務員化学検査所) は NAMAS と同じ敷地にあり 150 年以上の歴史をもつ検査所で、化学検査に関する

すべての ISO 認証を受けている。ここではラボラトリの組織、運営、設備面での対応状況（安全性、データの保護、守秘対応など）について見学した。建物は美しく整然と配置され広大なグランド（牧場）を持つなど、日本では考えられない生まれた環境であった。最後に訪問した IOCヘルシンキラボ（ユナイテッドラボラトリーズ）は我々 IOC 東京ラボ同じ私企業で検査室運用面についても興味があった。ここでの ISO 取得範囲は薬毒物学で、ドーピング検査は臨床の薬物検査と同じエリアで実施されている。また、品質管理担当者は薬物検査担当の一人を指名し、その担当者の業務は別の職員が品質管理するという形態をとっている。実質的な試験責任は Dr. A. Leinonen であるが、登録上の責任者はいわゆる技師長ではなく、外部から専門家 Dr. K. Kuoppasalmi 氏を招いている。ヘルシンキラボではドラッグ健診や製薬会社の治験に関する受託分析を行っているため、国際的な第三者認証取得によって顧客信頼を得ることと、法的な対応に配慮した品質管理システムを構築することが ISO 取得の主な目的である。ISO 対応状況については特にロンドンラボと大きく異なる点はなかったが、個人的にはロンドンラボでは研究指向で最終意志決定における教授の権限が大きく、一方ヘルシンキラボでは文書化、マニュアル化によって極力権限の分散化を計ろうとしているように感じられた。これはヘルシンキの責任者が外部招聘者であることも影響していると考えられる。この出張を通じて、多くの参考文献や貴重な情報が入手でき、今後 ISO guide 25へ向けて準備すべき方向性が明かにできた。

2. ドーピング分析に関するケルンワークショップ参加・発表と国際オリンピック委員会医事委員会、高感度分析に関する作業班会議出席。（ドイツ、スイス）

日 程	滞 在	行 動 日 程
3月／15-20日	ケルン	ドーピング分析 WS 参加・発表
3月／20日	ローザンヌ	移動（ケルン→チューリッヒ→ローザンヌ）
3月／21-23日	ローザンヌ	IOC 本部、ワーキンググループ会議
3月／24日	機内	移動（ローザンヌ→チューリッヒ→成田）
3月／25日	成田帰着	

ただし IOC 作業班会議は公務として IOC の経費負担にて出席。

ケルンワークショップ(Manfred Donike Workshop/Cologne Workshop on Dope Analysis 以下 WS)は、IOC 医事委員会の故 Manfred Donike 氏によって創設されたドーピング検査機関の実質的な定期技術ミーティングである。氏の没後もドニケ記念ワークショップとして開催されており、今年で第16回目を迎える。内容は認定検査機関間の技術交流、ドーピング事例研究、新分析技術の紹介などからなり、WS 期間中には認定検査機関の責任者のミーティングも開かれ、IOC の要求する技術レベルと認定を維持する上で必須の WS である。ここ数年アジア大会（バンコク）、東南アジア大会（ジャカルタ）、コモンウェルズ大会（ペナン）など、東南アジア地区で大きな大会の開催または招聘が予定されているため、これらの国に加えインド、韓国、中国などからの参加者が急増 WS の主要勢力になりつつある。

IOC 医事委員会は、この WS に併せてローザンヌの本部でドーピング分析に関する作業班会議（Meeting of Working Group of Heads of Laboratory : Analytical Criteria for Reporting Low Concentration of Anabolic Steroids）を召集した。この作業班は IOC 認定機関からの代表者 7 人 (Ayotte C : Montreal, Bowers L : Indianapolis, Cowan D : London, Kazlauskas R : Sydney, Pascual T : Barcelona, Schänzer L : Cologne, Ueki M : Tokyo) と IOC 医事委員会ドーピング小委員会メンバー(Catlin D : LA, Segura J : Barcelona, Yang Zeyi : Beijing) とで構成され、今回は蛋白同化剤の高感度検査法に関する品質基準を次回の認定試験までに策定することを目標としている。

備考) 往復航空券および20-23日の宿泊費、食事はIOCの経費負担によった。

今回のケルン WS には40カ国107人が参加し過去最大規模となった。主なテーマは蛋白同化剤の検出方法、ステロイドの代謝、尿試料の前処理方法、質量分析技術、ペプチド糖蛋白ホルモンの検出法、興奮剤の分析などである。興味深い発表としてステロイドの地下市場調査に関するもの1題、ホルモン前駆体の代謝と検出に関するもの4題(うち1題はDHEAとandrostenedioneに関する植木のもの)があげられる。最近アメリカではインターネットを通じて男性ステロイドホルモンの前駆体が多数販売されており、クレジットカードさえあれば処方箋なしで入手することができる。注目すべき発表として高感度法の普及に伴い、生体内でのナンドロロン(蛋白同化ホルモン)代謝物の分泌に関するものが4題あり、今後ナンドロロンの陽性判定に関して物議を醸す可能性もある。このような症例は長野オリンピック期間中にも何例か認められたが、いずれも背景調査の上陰性と判定された。今後低濃度のナンドロロン陽性者の取り扱いには注意が必要である。東京ラボからはNagano Strategy against Natural Hormone Dopingと題して、長野オリンピックで初めて検査が実施された炭素同位体比質量分析計(CIRMS)による男性ステロイドとその前駆体の代謝研究と検出方法について報告した。CIRMSでは、外因性ステロイド乱用により炭素13含量が低下することを利用してドーピングの検出を行うが、現在のところCIRMS以外にDHEA, Androstenedioneなどのステロイドを検出する有効な手段がなく重要な発表であったと自負している。同じセッションではOrkland(USA)小児病院のShakletonが東京、バルセロナ、イギリス、ドイツの四カ所のラボで同じ

試料を異なる装置で測定した結果を紹介し、従来のGC/MSに比べて格段にデータの精度が向上し、分析結果がほとんど一致していたことを示した。今後この四検査機関で各国選手の尿やステロイド薬剤の炭素同位体比の分布調査などを行い、シドニー・オリンピックからの正式採用へ向けて準備が開始される。東京ラボのもう一つの発表はバルセロナのProf. Seguraとの共同で”Oral versus Inhaled Salbutamol”という題であった。これは長野オリンピック期間中に将来に向けて実施された研究プロジェクトで、サルブタモールの光学異性体R型とS型の比率を測定することによって尿中に排泄されたサルブタモールが経口投与か吸入によるものかを区別しようとする試みである。実験では濃度とS/R比率を調べ、いずれかが低ければ吸引、逆に高ければ経口投与と判断できる可能性が示された。長野で検出された48例のサルブタモールはいずれも本測定法で測定した吸引摂取のデータと一致し、事前申告もあったため陰性とされた。

IOCの作業班会議は昨年の認定試験の結果を踏まえて召集された。高感度検査法は今回のテストから必須となったが、陽性判定のための判定基準がラボによってまちまちで、早急に明確なガイドラインを作成する必要がある。会議では高感度分析の対象となる5薬剤について合格基準を試験的に作成した。たとえば抽出条件、誘導体化方法、分析機器、分析時の検出イオンの数とその強度の一一致率などに評価点数を設け、次回の認定試験から合格基準を明確にすると共に、その基準を満たさないものを不合格にしようという方向で作業を進めている。(内容は非公開) 今回はまとめの時間が不十分であったが、長野オリンピックでの検査については関心を持たれており、来年のWSで発表したい。

以上。