

平成2年度 日本体育協会スポーツ医・科学研究報告

No.XI スポーツ選手を対象とするドーピング検査方法に関する研究

ペプチドホルモンを主体とするホルモンドーピングについて

—ドーピング検査としてのエリスロポエチンの測定方法—

財団法人 日本体育協会

スポーツ科学委員会



## 平成2年度 日本体育協会スポーツ医・科学研究報告

### No.XI スポーツ選手を対象とするドーピング検査方法 に関する研究

#### ペプチドホルモンを主体とするホルモンドーピングについて ——ドーピング検査としてのエリスロポエチンの測定方法——

報告者 株式会社 三菱油化ビーシーエル

研究班長 植木 眞 琴

研究主任 藤 崎 誠

研究班員 栗本文彦、菱木順子、  
高橋紋子、杉本栄司

#### はじめに

1990年4月にベオグラードで開催された国際オリンピック委員会 (IOC) 実行委員会において、ドーピング物質の分類とドーピングの方法に関する討議が行なわれ、新たにエリスロポエチン (EPO) を禁止薬物として追加することが承認された<sup>1)</sup>。IOC では正常スポーツ選手による EPO の使用は血液ドーピングと同じ行為であるとの理由から禁止薬物とすることとした。また EPO が糖鎖を持つグリコペプチドであることから、ペプチドホルモンとその類似物質として分類されている。EPO は赤血球の分化産生を促進する因子であり、最近になって遺伝子組換えによって合成された EPO (recombinant EPO : rEPO) の製剤が入手可能となった。

1878年に Paul Bert は、高山地帯で低酸素状態で暮らしているヒトの赤血球数が700~800万と平地で生活しているヒトに比べて増加していることを見出し、生活環境の酸素の濃度に応じて赤血球数を調節する機構がある事を報告している。スポーツ選手の高地トレーニングは、持久力などを向上させるためにこの効果を利用したものであると

いえる。その後、この様な調節機構が体液中の因子によるとの仮説の下にいくつかの実験が行なわれた。

1950年に Reissmann らは、2匹のラットを外科的に縫合し一方のラットを7.6%の低酸素状態で飼育すると、通常大気で生活させた他方のラットにおいても骨髄中の赤芽球に過形成が認められるようになり、赤血球の生成が促進されることを見出した<sup>2)</sup>。この実験以後赤血球の生成が低酸素刺激によって直接促進されるのではなく、体液中に存在する因子による事を示唆する報告が相次いだ。いわゆる赤血球産生成促進因子の純化に初めて成功したのは1977年のことで、宮家はフェノール処理によって蛋白分解酵素を不活性化した再生不良性貧血患者の尿から70,400U/mg の高単位 EPO を得る事に25年を費やして成功した<sup>3)</sup>。この様にして純化された EPO が Lin、Jacobson らによって rEPO 合成のクローニングに用いられ、さらにイムノアッセイによる高感度定量法の開発へと発展してきた。

低酸素刺激を受けた動物の腎に EPO の mRNA が存在することなどから、EPO が主として腎の近

位尿管細胞で合成されるらしいことがわかって来ている。治療薬としてのEPOの適用は腎疾患に起因する腎性貧血であり、輸血を必要とするようなヘマトクリット値25%以下の症例で、週3回の透析後に500U/kgのEPOを投与すると輸血が不要となるなど、顕著な効果が認められている。また、副作用としては高血圧が報告されている。

EPOとドーピング検査についての報告としてはBerglundが血液ドーピングの検出方法についての研究のなかで、その検出指標として有用であると報告している。すなわち、あらかじめ採血保存しておいた1350mlの血液を再輸血した前後では1日で62%もの血清中EPOの減少が認められ、両者を比較する事によって血液ドーピングを行なっているか否か判定できるという<sup>4)</sup>。また次の2nd. IAF Symposium on Doping in SportではHenry Mandinらが血液ドーピングの代用品としてEPOが使われる可能性を示唆した<sup>5)</sup>。日本では世界に先駆けてEPOが治療薬として承認を受け、中外製薬やキリンなどからすでに入手可能となったため、今回の研究報告ではEPOの測定法の評価を行なうと共に、ドーピング検査としてEPOの測定値を評

価する場合に配慮すべき種々の影響因子について検討した。

まず、ラジオイムノアッセイによるEPO定量法の精度を評価し、その方法によって正常人血清中のEPO測定値の分布を調べた。ついで各種血液疾患とEPOとの関連を確認した。また総括として、ドーピング検査としてのEPO測定方法の問題と今後の課題について考察した。

### 測定方法

エリスロポエチン (EPO) の濃度は、三菱油化株式会社と中外製薬株式会社が共同で開発した測定キット“エリスロポエチン RIA「中外」”を用いて測定した。本測定法は二抗体法に基づくラジオイムノアッセイ (RIA) であり、図-1は測定手順の概要を示す。血清または血漿に対して抗エリスロポエチン抗体を加えて試料中のEPOと反応させた後、トレーサーとしてヨウ化EPOを加えて平衡化する。次いで第二抗体との反応により抗原-抗体複合体を沈殿させ、得られた沈殿の放射能から濃度を計算するものである。

<sup>125</sup>I-EPOのγ線の測定には、ARC1000型ガ

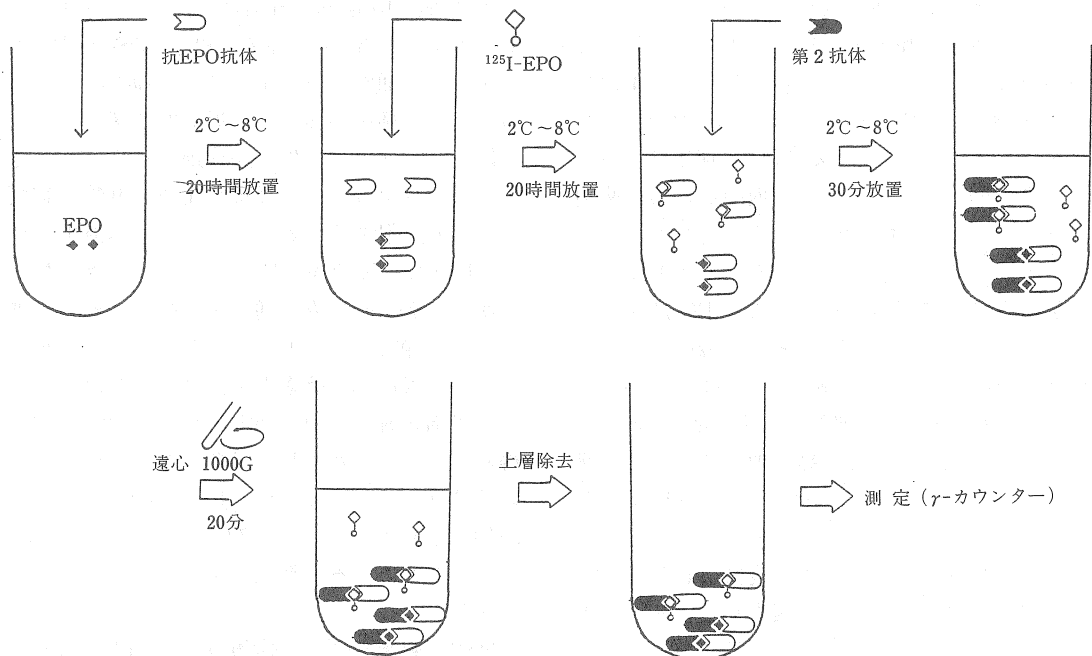


図1 ラジオイムノアッセイによるEPOの定量手順

ンマーカウンターを用い、アロカオートウエルガンマシステム（アロカ株式会社）にてデータ処理を行なった。

### 操作手順

- 1) 512 (mU/ml) の EPO 標準液を、添付の緩衝液で倍々希釈して256、128、64、32、16、8、4の各濃度の検量線試料を作成する。
- 2) 検量線試料または測定試料各100 $\mu$ lに緩衝液200 $\mu$ lを加える。また、ゼロ濃度標準液は緩衝液のみ300 $\mu$ lを用いる。
- 3) 抗 EPO 抗体100 $\mu$ lを加え、摂氏 2～8 度で20時間静置する。
- 4) この反応混合液400 $\mu$ l、または非特異的結合補正試料として緩衝液400 $\mu$ lに<sup>125</sup>I-EPO100 $\mu$ lを加え、摂氏 2～8 度で20時間静置する。
- 5) 第二抗体500 $\mu$ lを加えて摂氏 2～8 度で30分間静置し、第二抗体を反応させる。
- 6) 冷却遠心機(1000G、20分)で、生じた抗原-抗体複合体と遊離の抗原、抗体とを分離し、上清を吸引除去する。
- 7) ガンマーカウンターで残渣の放射能を測定し、そのカウント数から濃度を算出する。

### 検量線の作成

次式より結合放射能比B/B<sub>0</sub>を求め、各標準液の濃度 (mU/ml) とそのB/B<sub>0</sub>より検量線を作成した。

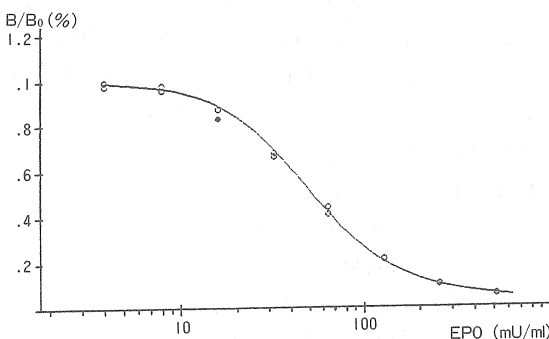


図2 EPO 検量線の代表例

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{各試験管のカウント値} - \text{非特異的結合補正試料のカウント値}}{\text{ゼロ濃度標準液のカウント値} - \text{非特異的結合補正試料のカウント値}} \times 100$$

図-2に代表的な検量線の例を示した。検量線はX軸に濃度の対数、Y軸にB/B<sub>0</sub>(%)をとって作成し、各試料のB/B<sub>0</sub>から試料中のEPO濃度を算出した。

### EPO 測定方法の評価

測定法の精度確認は WHO 方式<sup>6)</sup>によって実施した。

#### a. 検出感度の確認

検出限界下限値を決定するため種々の濃度の検体を二重測定し、各濃度における精度のプロファイルを WHO 法によりプロットした。その結果、50mU/ml 付近で最も良い精度が得られた (図-3)。検出限界下限値は“0 濃度と区別できる最小濃度”と定義されるが、以上の結果より検出限界下限値を5.9mU/mlと定めた。

#### b. 日内変動と日差変動

任意に選んだ3種類の検体を用いてEPO濃度を複数回測定し、日内変動と日差変動とを求めた (表-1)。日内変動はEPOの平均濃度21.4、56.8、74.9 (mU/ml) の時、それぞれ5.45、2.43、4.25 (%) また、日差変動は24.3、36.2、74.7 (mU/

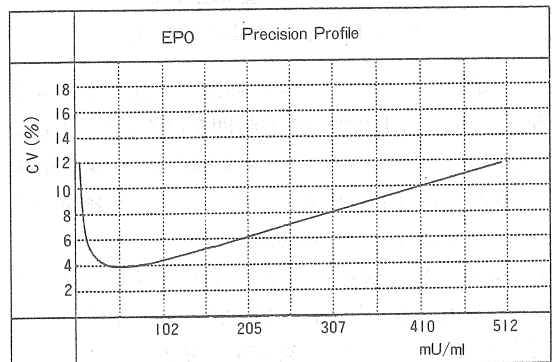


図3 ラジオイムノアッセイによるEPO定量法の精度プロファイル

ml) の時、それぞれ11.1、8.76、6.98 (%)であった。図-3同様、50mU/ml付近で最も良い精度が得られた。

c. 希釈直線性

実検体を2~32倍の範囲で希釈測定し、希釈時の直線性を確認した。希釈後の濃度が検量線範囲、すなわち5.9~512mU/mlの範囲では原点を通る良好な直線性を示し、希釈測定が可能であると判断した。

d. 共存物質の測定値に与える影響

血液試料中に含まれる尿素、クレアチニン、または鉄剤として投与される可能性がある鉄イオン(硫酸第一鉄)をそれぞれ添加し測定値に与える影響を調べたところ、予想される濃度範囲の添加量では有意差を認めなかった。

e. 検体採取条件の影響

抗凝固剤として、EDTA-2カリウム、EDTA-2ナトリウム、ヘパリンを添加して得た血漿を血清試料と比較した結果、ヘパリン血漿で若干高値の傾向を示したものの、ほぼ同様の結果が得られた。また溶血の影響も認められなかった。

以上の基礎的検討によりEPOの測定精度を確認したので、以後実際の検体を用いて臨床的有用性について考察した。

**血清中EPOの基準値および  
ヘマトクリット値について**

三菱油化ビーシーエルに勤務する従業員男女各50人についてEPOの濃度範囲を調査した。年齢範囲は男性24歳~58歳(平均年齢36歳)、女性19歳~56歳(平均年齢25歳)全体では平均年齢30歳であった。得られたEPO濃度についてSmirunov-Grubbsの棄却検定を行ない、各データが全データの平均値に対して、有意差を持たなくなるまで異常者を棄却したのち、異常値の除去されたデータ群について分布型の評価を行なった。次いで、決定された測定値のヒストグラム(分布型)から基

表1 ラジオイムノアッセイによるEPO定量の再現性

日内再現性 (mU/ml)			
	試料 A	試料 B	試料 C
N	20	20	20
Mean	21.4	56.8	74.9
SD	1.16	1.38	3.19
CV (%)	5.45	2.43	4.25

日差再現性 (mU/ml)			
	試料 D	試料 E	試料 F
N	10	10	10
Mean	24.3	36.2	74.7
SD	2.70	3.17	5.21
CV (%)	11.10	8.76	6.98

準値を求めた。

男子、女子、全データの各々についてのヒストグラムを図-4のA、B、C.に示したが、いずれのヒストグラムも正規分布型であり性差は認められなかった。正規分布として算出した基準値は男性8.9~34.5(平均21.7)、女性8.5~31.3(平均19.9)全体では8.6~33.0(平均20.8)であり、基準値範囲についても男女差は認められなかった。検定の結果棄却されたデータは女子1例のみであった。次に、基準値調査対象群についてヘマトクリットとの相関関係を調べ図-5のA、B、C.に示した。図はA、B、C.それぞれ男子、女子、全体の場合を示す。女性のヘマトクリット値が男性に比べて低値の傾向を示し、またEPO、へ

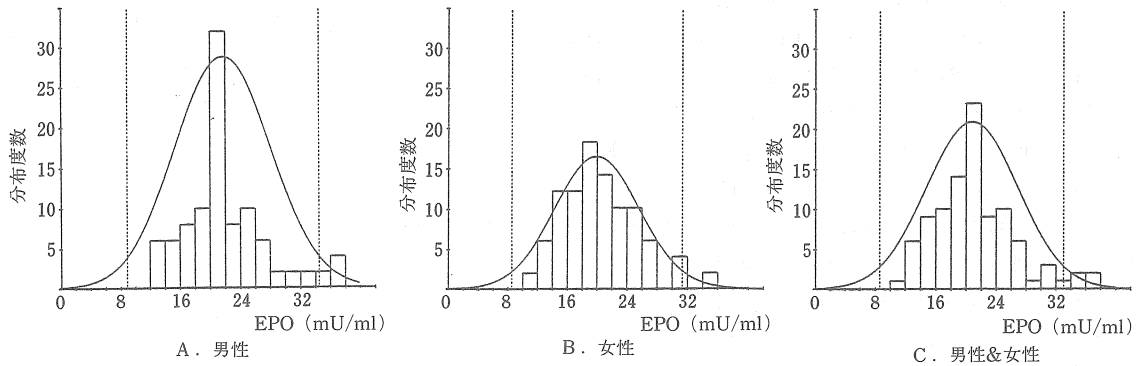


図4 健常者における血清中EPOのヒストグラム

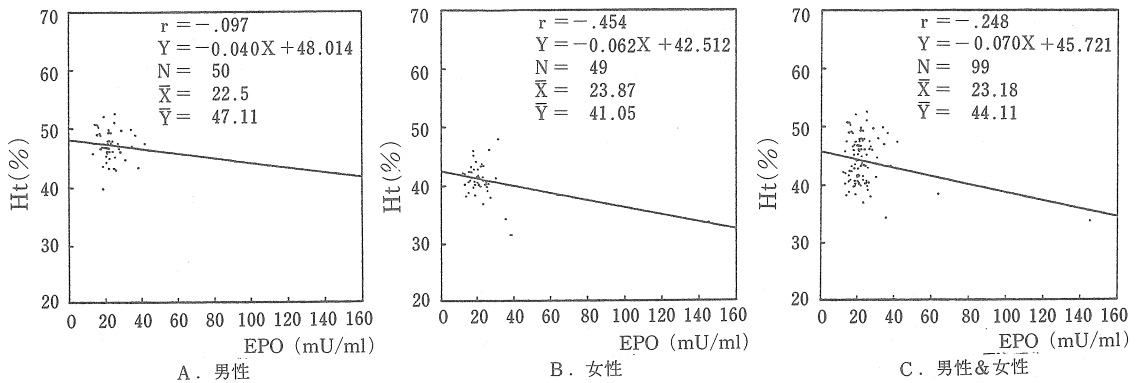


図5 基準値調査対象群におけるヘマトクリット値と血清中EPO量の相関

マトクリット値共比較的狭い範囲に分布しているが、図B、Cから明らかな様に女性群について、その他のデータから逸脱する傾向を持つものが数例認められた。うち1例はEPO基準値調査で棄却された例であった。そこで、棄却された女子職員1名について健康診断結果の追跡調査をおこなったところ、EPOが145mU/mlで異常高値、ヘマトクリット値(全血液容量に対する赤血球容量比)が33.7%と異常低値であった。同様の例が今回の母集団以外にも、通常勤務の女子職員について2例認められ、鉄欠乏性貧血の加療で鉄剤を服用中であった。今回の調査では男女間にEPOの有意差は認められなかったが、成人若年女性の中には鉄欠乏性貧血によるEPO高値の例が数%程度含まれ、両者間に負の相関関係のある事が確認された。また、測定結果の評価に際してはこの様な女性の特異性につき注意を要するものと思われた。

#### 臨床例についての調査<sup>7)</sup>

基準値の調査でEPOと貧血との関連が示唆されたため、近畿大学医学部第三内科に通院または入院加療中の患者検体の供与を受け、濱崎らの協力によりEPOと臨床症状との関係を調査した。

EPOに影響を及ぼすと推測される各種血液疾患を中心として、EPOと赤血球数、白血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数、血清鉄およびその他の一般生化学項目との測定値を比較検討した。高齢者貧血28例、慢性関節性リウマチ(リウマチ性貧血)9例、鉄欠乏性貧血15例、再生不良性貧血23例、骨髄異形成症候群12例、真性赤血球増加症9例、悪性リンパ種36例、急性白血病42例のうち、再生不良性貧血では平均4042(標準偏差7379)、骨髄異形成症候群では同2340(4185)、急性白血病では同264(432)と、これら3症例でEPOの明らかな上昇が認められ、特に前二者にお

いては重篤な症例ほど EPO の著明な増加として観察された。特に、再生不良性貧血の同種骨髄移植施行例では骨髄の生着、造血の回復に伴って EPO が正常化するのが観察された。また、鉄欠乏性貧血では EPO 高値、真性赤血球増加症では低値傾向にあるが高齢者貧血、リウマチ性貧血、悪性リンパ腫では EPO との関係は認められなかった。これらの症例のうち、鉄欠乏性貧血、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、急性白血病では EPO とヘマトクリット値との負の相関関係が認められ、おおむね従来の報告と一致する結果が得られた。以上の結果より、EPO は老人性の貧血を除けば貧血状態を反映してヘマトクリットと負の相関関係を示し、また病的な赤血球増加状態では抑制される傾向にある事が確認された。

基準値対象群の例でも明らかなように、スポーツ選手を対象とするドーピング検査として EPO を考えた場合、ヘマトクリット値または赤血球数を反映して鋭敏に反応することが十分期待できる。すなわち、赤血球産生促進因子としてばかりでなく血液ドーピングの検出指標の一つとしても重要であることを確認した。

#### ドーピング検査としての EPO 定量

ペプチドホルモンの検査では一般に血清を検査材料とするが、ドーピング検査では尿を用いて検査が行なわれる。また採血の習慣がない国、あるいは宗教的な理由から採血に同意しない場合も予想され、血液を検査材料として用いたドーピング検査には問題を残している。さらに、大規模な国際スポーツ競技大会では検体受領後24時間以内の報告が条件となる場合が多い。現在では尿を用いた EPO の測定に対する評価が確定していないため、今回は血清を測定材料とする EPO の測定について赤血球量との関連から考察したが、測定には全行程で2～3日を要し、スクリーニングとして用いるためには測定時間の短縮が望まれる。確認分析については、IOC では質量分析計 (MS) による確認分析が、現時点で認められた唯一の確認分析方法であるとしており<sup>9)</sup>薬物の使用が疑われる場合には、検出された薬物の構造に関する裏付けが求められる。従って、構造確認が困難なペプチドホル

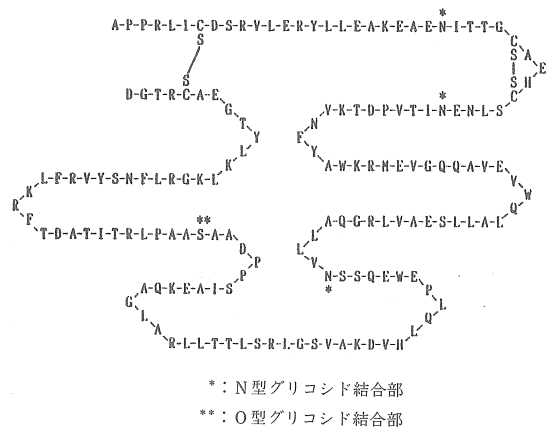


図6 ヒト EPO のアミノ酸配列

糖鎖部分は合成方法によって若干異なり、それぞれ  $\alpha$ -EPO、 $\beta$ -EPO、 $\gamma$ -EPO などと呼ばれている

モンに関しては分析結果だけで陽性であるか否かを判定するような基準は示されていない。

一般に尿、臓器などの生体試料を原料として製剤化されたペプチドホルモンをドーピングに用いた場合には内因性のそれとの区別が困難であり、そのことがドーピング物質として用いられる理由の一つに挙げられる。EPO 合成品には、大腸菌に EPO 遺伝子を組込んで合成された蛋白鎖に糖鎖を付加した部分合成品、チャイニーズハムスターの卵巣など、動物細胞を用いた遺伝子組替えによって合成された全合成品などが知られているが<sup>9)</sup>、合成品では製品により糖鎖部分の構造に若干違いがあるといわれ、内因性のそれと厳密に区別するためには糖鎖部分の違いを証明しなければならない。

(図-6) しかしながら、生体試料中に排泄されるペプチドホルモンの MS による確認方法は現在まだ確立されておらず、RIA 等の免疫学的手法による定量分析によって検査が行なわれている。すなわち、イムノアッセイによって濃度を測定し、その濃度が異常であるか否かを統計的に判断する必要がある。その際、判定基準として基準値 (正常者の EPO の濃度範囲) またはカットオフ値 (それ以上の濃度の検体を陽性と判定するための境界値) が予め設定されていなければならないが、IOC では禁止対象として掲げているペプチドホルモンについての判断基準は示していない。今後 IOC 認



定ドーピング検査機関で標準化された分析条件を確立する場合には非放射化分析の方が好ましいと思われるが、一部の国ではキットの入手が困難であり、また我が国においても外国製の測定キットを入手する場合には、あらかじめ厚生省から生物製剤の輸入許可をとる必要がある。そのため当面は各国の事情に合わせ必要に応じて測定が行なわれる見込みである。バルセロナオリンピックではEPOの測定を実施すべく準備中であり(私信)また我々の研究班でも尿を試料として用いたEPOの定量方法を開発中である。

尿中のEPO濃度に関しては報告により血清中濃度よりも高濃度であったとする報告と、逆に低濃度であるというデータとがあり、十分に評価が確定していないため、この点については今後の課題としたい。

通常勤務の女子社員のなかにも数%の鉄欠乏性貧血者が居ることが判明したことや、ヘマトクリット値による比較よりも鋭敏に貧血状態を検知できる可能性が示唆されたことから、血清EPOと女子選手の持続力との関係や、水泳選手または高地トレーニングなど、長時間酸素欠乏状態でトレーニングをおこなう競技とEPOの関係などを調査することにより興味ある結果が得られるものと期待される。

以後の研究では尿中のEPO測定の可能性、血液ドーピングとの関連性等について検討して行くこととしたい。

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、臨床データの収集に御協力いただいた近畿大学医学部第三内科の濱崎浩之博士および堀内篤博士に深謝致します。

## 文 献

- 1) IOC 医事委員会、IOC 発信 : Ref. No. LAB/76/90/rea
- 2) Kranz and Jacobson, Erythropoietin and the Regulation of Erythropoiesis. The University of Chicago Press, 1970
- 3) Miyake, T., Goldwasser, E., : Purification of human erythropoietin. : J. Biol. Chem., 252, 5558-5564, 1977
- 4) Bo Berglund, Can blood Doping be detected?, Official Proceedings of the 1st. International Athletic Foundation World Symposium on Doping in Sport in Florence, 10-12 May, 1987
- 5) Henry Mandin, Erythropoietin as possible substance for blood doping. Official Proceedings of the 2nd. IAF Symposium on Doping in Sport in Monte Carlo, 5-7 June 1989.
- 6) Whitehead, T.P. : Principles of quality control, WHO Publication, LAB/76. 1 : 1976.
- 7) RIA 法による血中エリスロポエチン濃度測定法の基礎的ならびに臨床的検討。濱崎浩之、堀内篤、栗本文彦、桜井兵一郎。医学と薬学、23巻5号、976-985、1990
- 8) IOC 医事委員会、スポーツにおけるドーピングに関するオリンピック憲章、検査機関の認定要件と試験実施上の遵守基準6.2.1-d
- 9) 平嶋邦猛、エリスロポエチンの基礎と臨床 ; 臨床透析、4号1巻、105、1988

