

昭和60年度 日本体育協会スポーツ医・科学研究報告

No. IV 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

＝ドーピング検査の効率化と外因性テス

財団法人 日本体育協会

スポーツ科学委員会

昭和60年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

No.IV スポーツ選手を対象とするドーピング検査法 関する研究＝ドーピング検査の効率化と外因 性テストステロンの検出精度向上について＝

報告者 スポーツ選手を対象とするドーピング検査法研究班・憊三菱油化メディカルサイエンス
班 長 上 館 民 夫
研究主任 植 木 真 琴
研究班員 藤 崎 誠 岩 間 玲 子 杉 本 栄 司
関 口 秀 一

1. はじめに

近年の国際競技大会では薬物の不正使用をチェックするため多大な労力と費用をかけてドーピング検査が実施されている。

ドニケ等によって最先端の分析手法が取り入れられ、今では主要な興奮薬がわずか数時間でスクリーニングできるようになったが、使用される薬物の種類も多岐に渡っており、オリンピックが開催されるごとに禁止薬物も追加されている。

ユニバーシアード神戸大会のドーピング検査では、大会メディカルセンターのスタッフにより採尿・運搬された検体が当研究班を中心とする三菱油化メディカルサイエンスのドーピング検査スタッフによって検査されたが、スポーツ選手を対象とするドーピング検査としてはアジア地区で最大のものとなった。

本報告書では

- (1) ドーピング検査の効率化と迅速化、
 - (2) 外因性テストステロン検査法の分析精度、
 - (3) ユニバーシアード神戸大会でのドーピング検査結果、
- の以上3点について報告する。

2. 方 法

禁止薬物のスクリーニングはドニケ等により開発された方法¹⁾を基本とし、昨年の研究報告に基づ

いて実施した²⁾(図1)。

実際の運営にあたっては、報告時間の制約上、検体本数に応じて検体の集中化(グルーピング)などの効率化をおこなった。1日60検体24時間報告を基準とした場合の検査スケジュールを図2に示した。検査員の配置は第一班(8:30~18:00)6~7名、第二班(11:~20:30)1名、第三班(18:00~)4名の計12名体制とした。所要人員は、前処理時スクリーニングI~IIIが各1名、IVが4名であり、測定時はスクリーニングIとIIIが各1名、IIが2名、IVが4名であった。

用いた装置の種類は昨年の報告と同じであるが、必要とした台数を以下に示す。

GC/NP : 3台(窒素リン検出器付キャピラリーガスクロマトグラフ;スクリーニングI用として)

HPLC : 4台(紫外外部検出器付高速液体クロマトグラフ;カフェイン定量とスクリーニングIII用として)

GC/MS : 3台(磁場型キャピラリーガスクロマトグラフ質量分析計;スクリーニングII, テストステロンおよび確認分析用として)

GC/QMS : 1台(四重極型キャピラリーガス

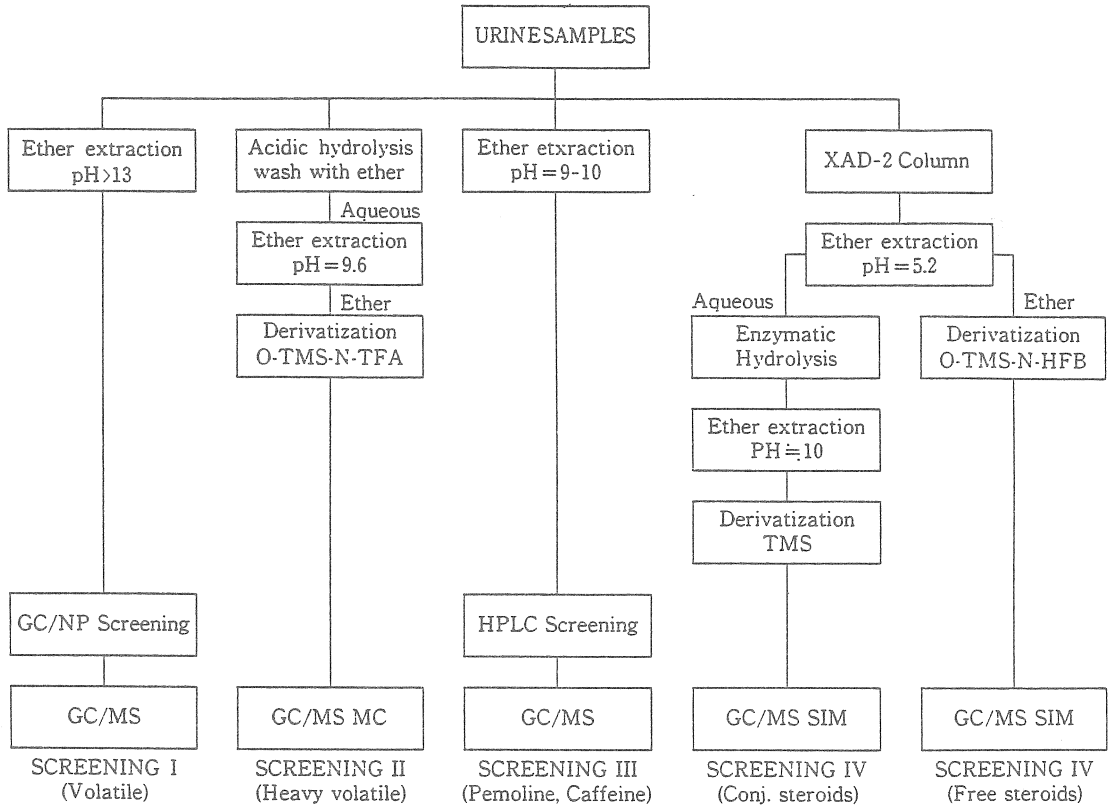


Fig. 1 SCHEME OF URINE ANALYSIS BY IOC-SCREENING PROCEDURE

クロマトグラフ質量分析計；スクリーニングIV用として)

HPLCの検出器として必要に応じ多波長検出器を使用した。

GC/MSのデータ処理はデータ処理システムのインダイレクトコマンド機能を利用して分析時に並行して実施し、また2台のGC/NPはパーソナルコンピュータにオンライン接続し、分析条件設定、推定薬物名検索などを全自動で行った。

確認分析は昨年の報告に従ったが、抱合型ステロイド画分の加水分解を以下の2つの条件で行い、テストステロン対エピテストステロン比がいずれも6を越えた場合に陽性を判定した。すなわち抱合型ステロイド画分を

- (1) 1 mlの0.2M 酢酸ナトリウム (pH=5.2) に溶かし、Helix Pomatia (カタツムリ) 由来のβ-グルクロンダーゼ/アシルスルファターゼ溶液50μℓ¹⁾を加えて37℃で12時間加

熱する方法。

- (2) 1 mlの0.1M リン酸カリウム (pH=7.0) に溶かし、E.Coli (大腸菌)由来のβ-グルクロンダーゼ溶液¹⁰⁾10μℓを加えて50℃、1時間加温する方法である。

- i) Boehringer (西ドイツ) 10003422-64
- ii) Boehringer (西ドイツ) 10146720-25

3. 結果および考察

3-1. ドーピング検査法の効率化と迅速化

(スクリーニング I)

大部分の興奮薬および麻薬系鎮痛剤の一部は未変化体または非抱合型の代謝物としてスクリーニングIで検出された。薬物の検索は保持時間(RT:リテンションタイム)を標品と比較することによって行うが、通常は各測定日ごとにすべての対象薬物を注入し、RTを求めておかなければならないので標品の入手が検索の前提となる。

TIME	SCHEDULE			
8:00	Sample Arraival			
8:30	Check and pH determination of samples			
9:00	Start Screening			
	SCREENING-I	SCREENING-III	SCREENING-II	SCREENING-IV
	Extraction	Extraction	Grouping(1/5) Extraction	Fractionation
	1.0**	1.0**	1.0**	4.0**
11:00	Analysis-a)	Determination-b)	Analysis-c)	Enzyme hydrolysis
12:00	GC/NP (3)	HPLC (4)	GC/MS (3)	2.0-3.0**
19:00	Reanalysis or	Confirmation analysis		Determination 3.0** GC/MS (3)
4:30				Grouping(1/5) Analysis-e) 1.0** GC/QMS (1)
				Confirmation analysis
	** Number of Staffs () Number of instruments			
9:00	Report Results to Medical Commission of the Event			
	a) Free stimulants and Narcotics		d) Testosterone/Epitestosterone	
	b) Caffeine and Pemoline		e) Conjugated anabolic steroids	
	c) Conjugated Stimulants and Narcotics		f) Free anabolic steroids	

Fig. 2 ORGANIZING OF THE WORK FLOW

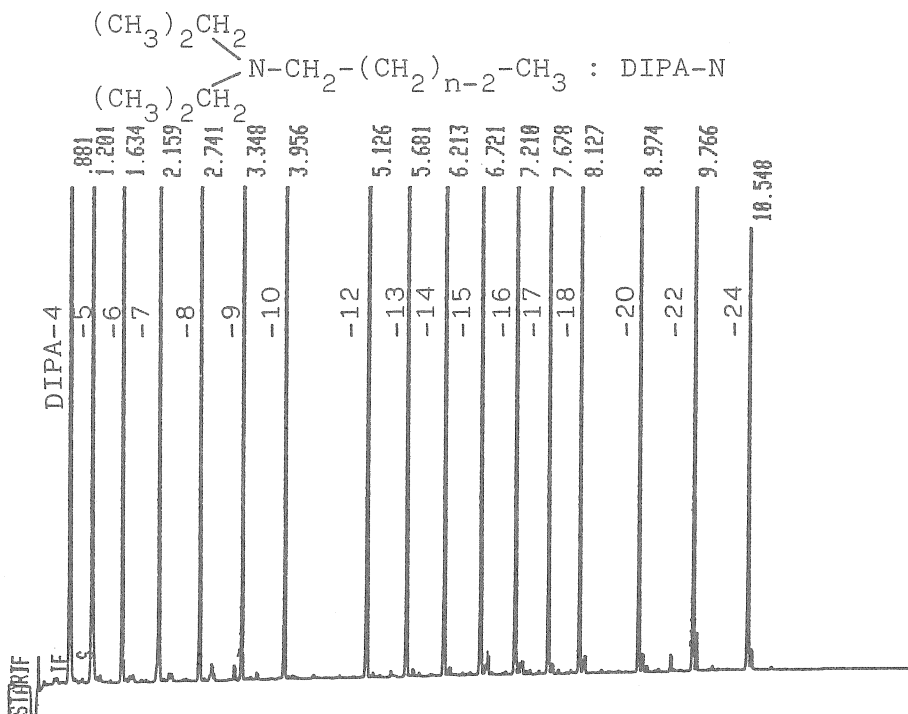


Fig. 3 Chromatogram of DIPA-Mixture.
(GC/NP Calibration running)

RUN # 2, SEP/03/85 ,20:16:57
 WORKFILE ID: B SCREEN-1 ,WORKFILE NAME:
 SAMPLE # 1
 ISTD

RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
1.133	268880	BB		0.000
2.496	50159	PV	9	15.645
2.759	276370	PB	12	63.789
3.484	24440	BV	17	6.938
4.252	1225400	PB	21&	100.000
5.176	61708	PB		0.000
5.348	64151	VB		0.000
5.473	42617	PP		0.000
5.539	403360	PB	26	35.945
5.998	30630	VV		0.000
6.028	41916	VB		0.000
6.697	1093400	PB	28R	118.960

TOTAL AREA= 3583000
 ISTD AMT= 1.0000E+00
 SAMPLE AMT= 1.0000E+00
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

a) Report from Networking Integrator.

***** SOURCE FILE (GC-A) = JOC1243R *****

NET-RT	RRT-1	RRT-2	DIPA-I	DRUG (FLAG)
0.000	0.000	0.000	0.0	
1.133	0.266	0.169	481.0	
2.496	0.587	0.373	758.7	<u>NOREPHEDRI</u>
2.759	0.649	0.412	803.6	<u>EPHEDRINE</u>
3.484	0.819	0.520	923.0	ETAFEDRINE
4.252	1.000	0.635	1051.2	DPA (IS-1)
5.176	1.217	0.773	1209.9	
5.348	1.258	0.799	1241.0	
5.473	1.287	0.817	1263.7	
5.539	1.303	0.827	1275.6	CAFFEINE
5.998	1.411	0.896	1360.9	
6.028	1.418	0.900	1366.5	
6.697	1.575	1.000	1496.8	NMPZ (IS-2)

b) Result identifying Ephedrine

DRUG DATA BASE (DIPA INDEX TABLE FOR GC-A)

NO.	DRUGS	NET-RT	RRT-1	RRT-2	DIPA-I
1	HEPTAMINOL	1.30	0.305	0.194	524.7
2	AMPHETAMIN	1.41	0.331	0.210	530.1
3	PHENTERMIN	1.58	0.371	0.236	589.4
4	METHAMPHET	1.68	0.394	0.251	610.2
5	ETHYLAMPHE	1.95	0.458	0.291	661.4
6	FENFLURAMI	1.96	0.460	0.293	663.3
7	DIMETHYLAM	2.02	0.474	0.301	674.6
8	NORPSEUDO	2.46	0.577	0.367	752.5
9	NOREPHEDRI	2.47	0.580	0.369	754.2
10	NICOTINE	2.60	0.610	0.388	776.5
11	CHLORPHENT	2.68	0.629	0.400	790.2
12	EPHEDRINE	2.76	0.648	0.412	803.8
13	METHOXYPHE	2.82	0.662	0.421	813.7
14	METHYLEPHE	3.01	0.707	0.449	845.0
15	PHENMETRAZ	3.23	0.758	0.482	881.2
16	PHENDIMETR	3.35	0.786	0.500	901.0
17	ETAFEDRINE	3.47	0.815	0.518	920.7
18	DIETHYLPRO	3.56	0.836	0.531	935.5
19	NIKETHAMID	3.78	0.887	0.564	971.6
20	LEPTAZOLE	3.96	0.930	0.591	1001.2
21	DPA (IS-1)	4.26	1.000	0.636	1052.6
22	PROLINTANE	4.32	1.014	0.645	1062.8
23	FENCAMFAMI	4.66	1.094	0.696	1121.1
24	METHYLPHEN	5.02	1.178	0.749	1182.7
25	PETHIDINE	5.10	1.197	0.761	1196.4
26	CAFFEINE	5.55	1.303	0.828	1277.6
27	BENZPHETAM	5.61	1.317	0.837	1288.4
28	NMPZ (IS-2)	6.70	1.573	1.000	1497.4
29	METHADONE	7.25	1.702	1.082	1610.7
30	PIPRADOROL	7.30	1.714	1.090	1621.4
31	DIP IPANONE	8.80	2.066	1.313	1961.0
32	DEXTRAMORA	10.75	2.523	1.604	2421.5
33	STRYCHNINE	12.10	2.840	1.806	2740.3

c) Partial Listing of Retention Indices

Fig.—4 Computer Report for the Positive Sample of Stimulants.

検索の手懸りとして RT のかわりに DIPA インデックスを用いると未知物質の RT 予測や、装置に影響されない化合物の検索が可能である³⁾。すなわち、薬物標品を注入するかわりに種々の炭素鎖を持つ DIPA [1-(N,N-diisopropyl amino) -alkane] の化合物を注入して保持時間の検量線を作成し、この検量線から計算した値を利用して検索を行う方法である。この方法によれば、対象薬物が増加してもガスクロマトグラフの調整は短時間で終了し、必ずしも標品を必要としない等の利点がある。図 3 に DIPA 混合物 (炭素鎖 4 ~ 24) を注入して得たクロマトグラムを示した。また、図 4 にはそれぞれ a) ガスクロマトグラフの波形解析結果、b) 尿分析データを用いて各ピークの DIPA インデックスを計算し、エフェドリンとその代謝物ノルエフェドリンとが推定結果として得られた例、c) 検索のもととなった薬物リストの部分打出しを示した。この様に、尿中から同定

された代謝物のインデックスをデータベースに順次追加し、検索の手懸りに利用することもできた。

(スクリーニング II)

抱合体として検出される興奮薬、麻薬系鎮痛剤およびその代謝物はスクリーニング II で検出する。検出に GC/MS を用いるスクリーニングでは擬陽性が少ないので検体の集中化を行ってプレスクリーニングすることができた。図 5 に国際競技大会のドーピングテストで発見されたエフェドリン陽性例を示した。この例では 5 本の尿を 1 グループとする集中化をおこなったが、エフェドリンとその代謝物ノルエフェドリンが明瞭に検出された。また陽性となったグループのスクリーニング I の結果と照合し、ただちに陽性検体を同定できた。

(スクリーニング III)

HPLC によるスクリーニングでは熱に不安定な

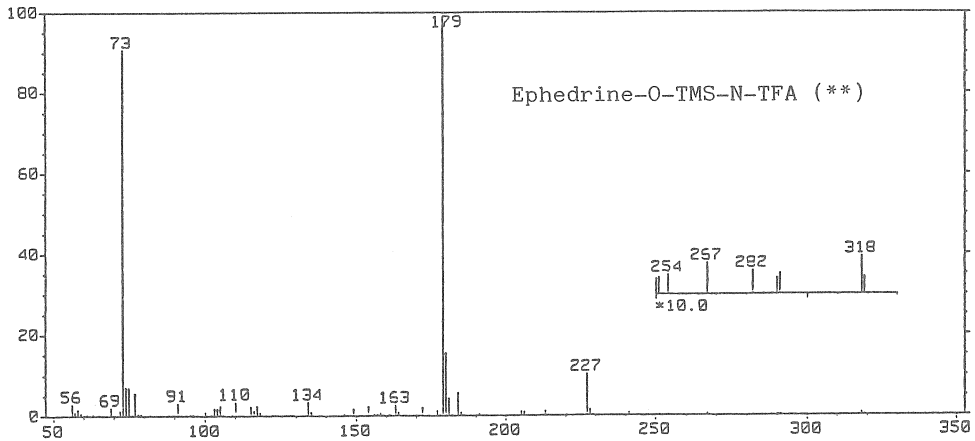
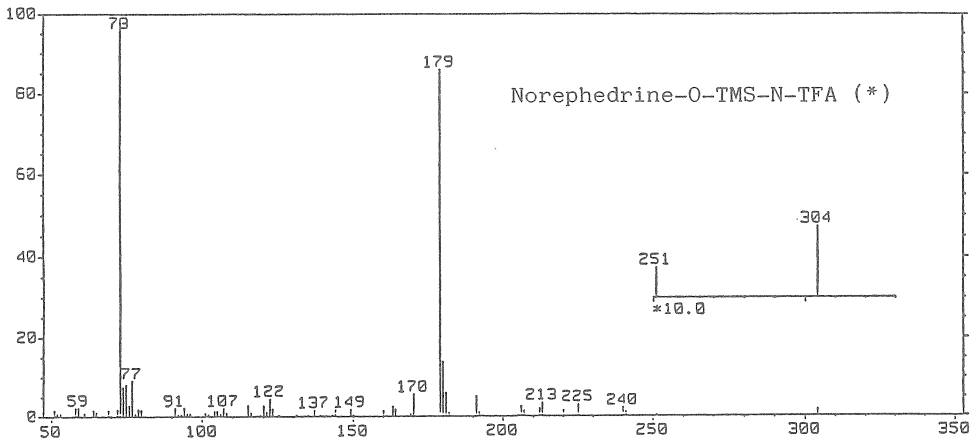
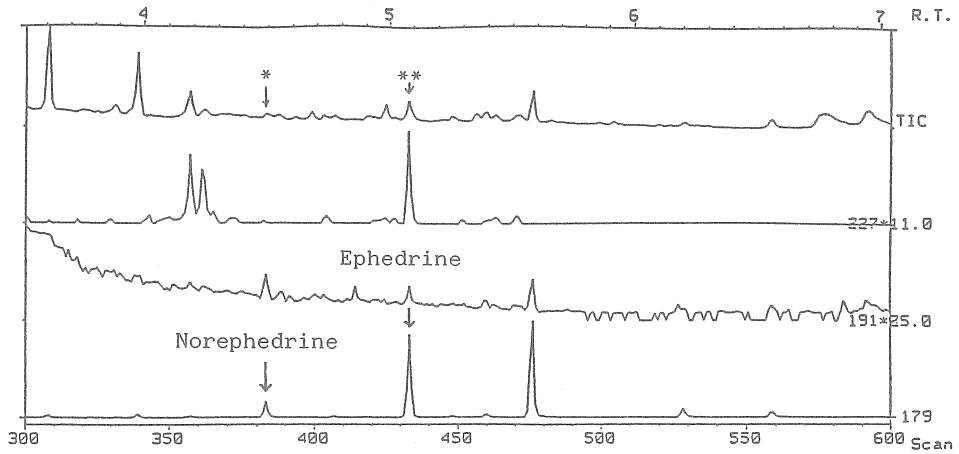
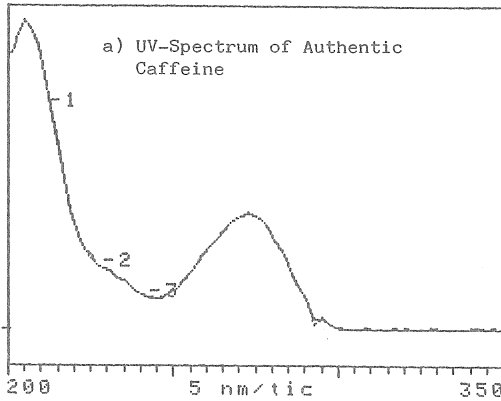
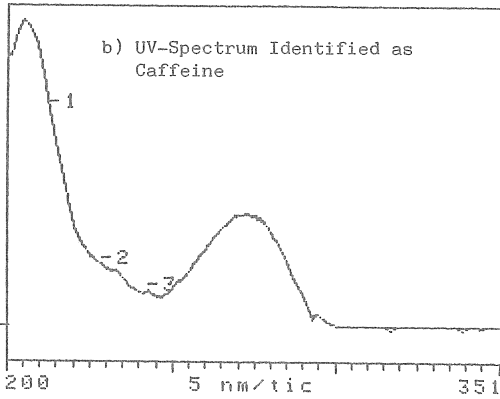


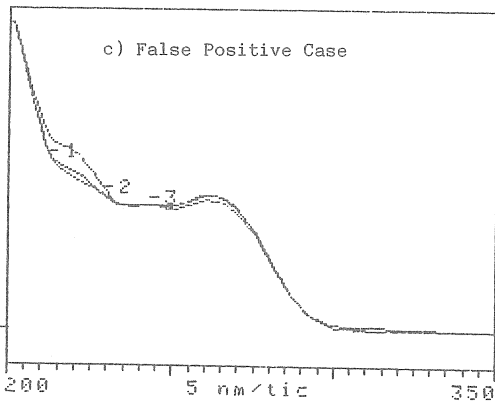
Fig. 5 Result of GC/MS Analysis (Screening Procedure II)



a) Reference Standard of Caffeine



b) Urine Sample (1)



c) Urine Sample (2)

Fig. 6 Results of Confirmation Analysis (Screening III)

興奮剤のスクリーニングとカフェインの定量を行うが、しばしば擬陽性を経験する。

この様な例では GC/MS を用いた確認分析に先だって検出ピークの紫外スペクトルを採取し、標品のそれと比較すると、確認分析の頻度を大幅に減らすことができた。

図6はカフェインの溶出位置に検出されたピークの紫外スペクトルを多波長検出器を用いて測定したものである。スペクトルでの定量値は尿(1)が11.8 μ g/ml, 尿(2)が21.1 μ g/mlであった。尿(1)から得られたスペクトルb)は標品のスペクトルa)と良い一致を示しているが、尿(2)から得られたスペクトルc)は、標品とは明らかに異なっており、陰性と判定された。

ユニバーシアード神戸大会では、スクリーニングでのカフェイン定量値が15以上となり陽性と疑われたものが4例あったが、これらは尿(2)の場合と同じ理由により陰性と判定された。

(スクリーニングIV)

スクリーニングIVでは1検体ずつ前処理をおこない、一部をテストステロンの定量に使い、残りを5検体ずつ集中化してアナボリックステロイドのスクリーニングに用いた。

アナボリックステロイドはIOC禁止リスト記載の12種とその代謝物について検索したが、陽性例はみられなかった。

3-2 外因性テストステロンの分析精度について

第一回ヘルシンキ世界陸上選手権のドーピング検査において2例のテストステロン陽性検体がスクリーニングされ、イギリスのベケット博士らによって確認分析がおこなわれた結果、この2例はいずれも陰性と判定された⁴⁾。

その理由として、エピテストステロンが低値であったため、結果としてテストステロン対エピテストステロン比 (T/ET 比) が判定基準の6を越えたものと説明されたが、その後の検討により、アンドロステンジオール高値の検体では、希に Helix Pomatia 酵素消化液中に共存する3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase および5-4-ene steroid

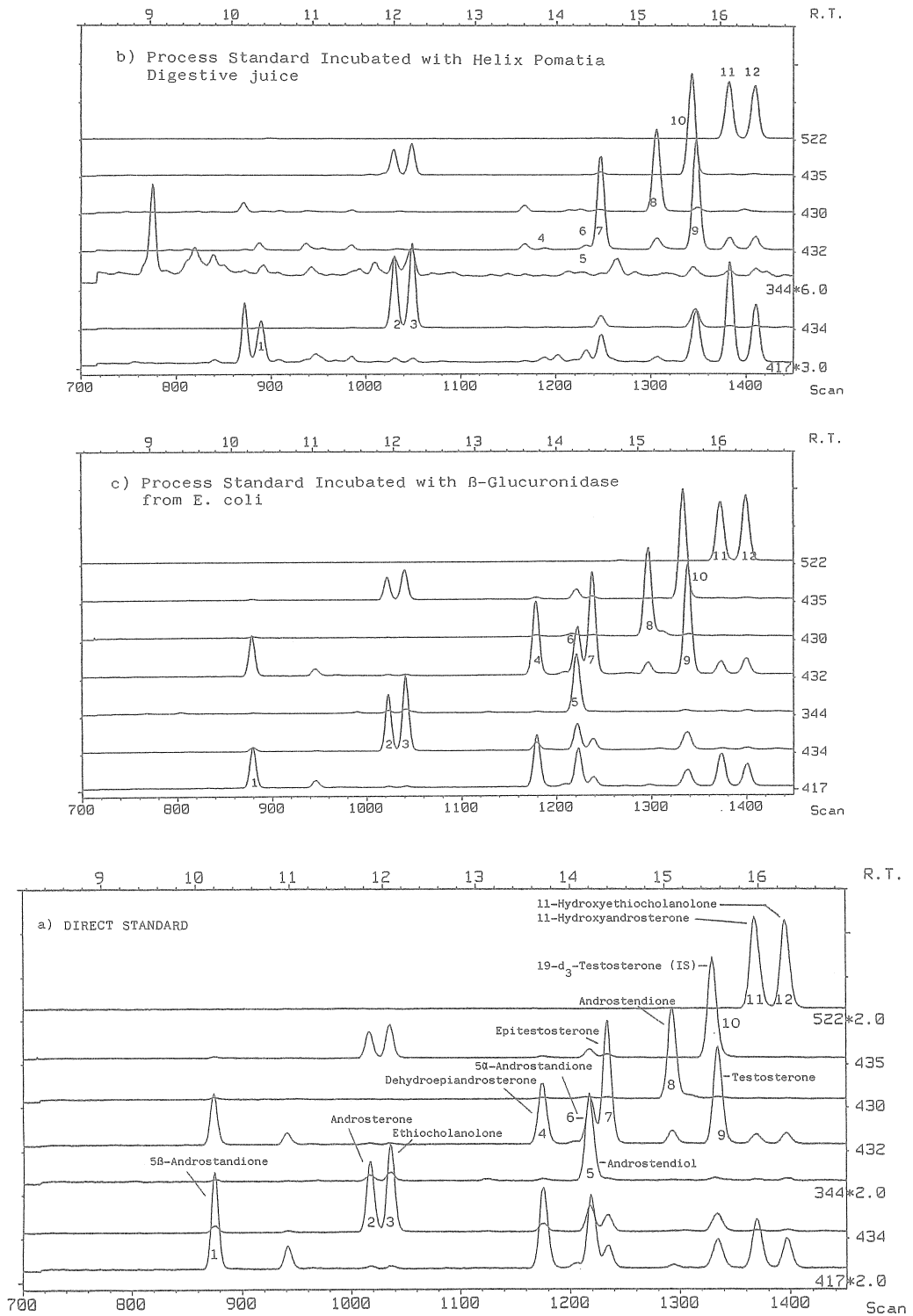


Fig. 7 Mass Fragmentgrams of Reference Steroids

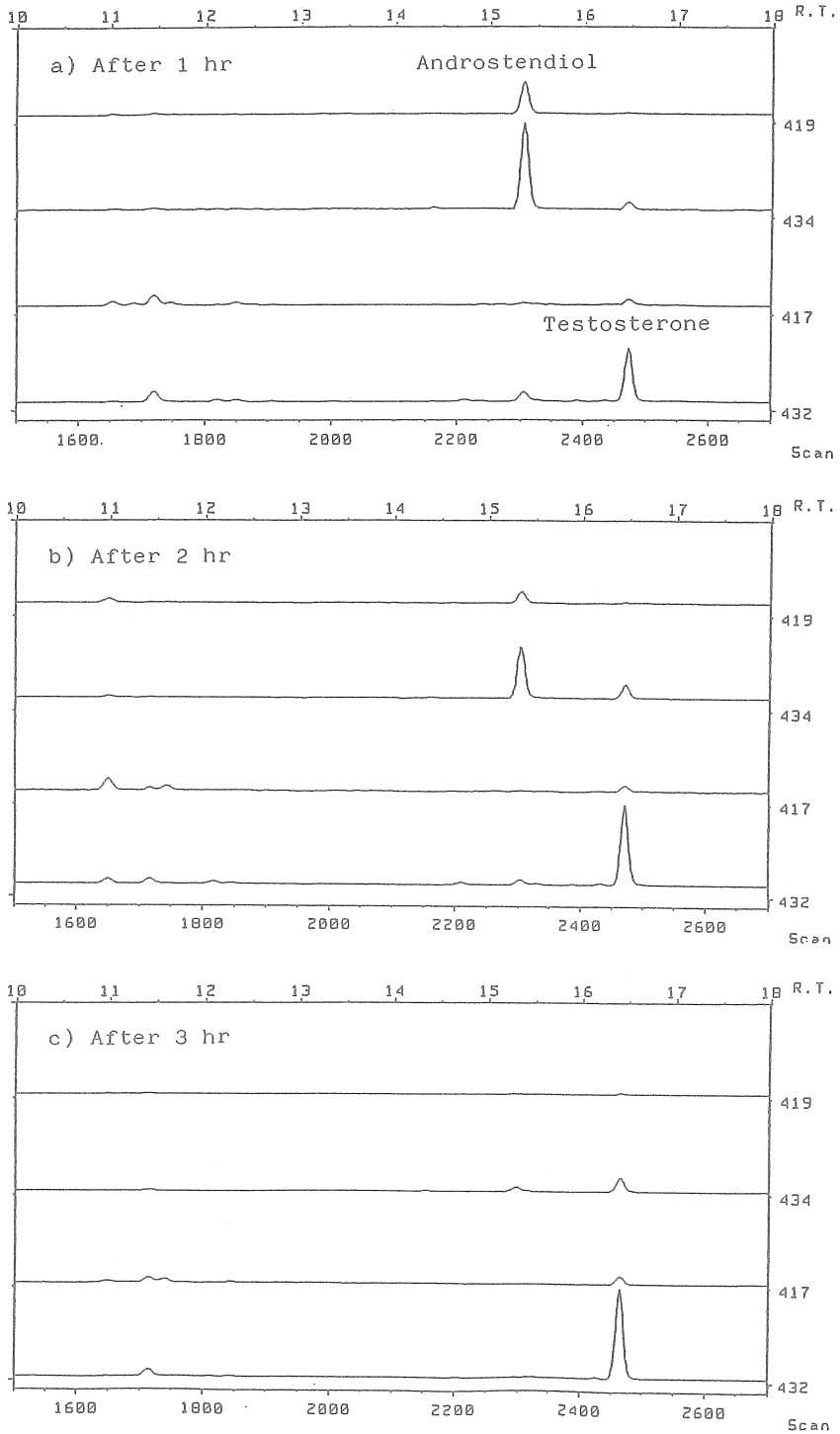


Fig. 8 Conversion of Androstendiol to Testosterone by the Incubation with *Helix pomatia* Digestive Juice

isomerase により、アンドロステンジオールからテストステロンへの転換が起こり、擬陽性となることが確認された⁵⁾⁶⁾。

図7は、12種類のステロイド標品混合物 a) を *Helix Pomatia* 酵素消化液または *E. Coli* 由来の β -グルクロニダーゼとそれぞれ加温し、その変化を調べた結果を示した。各ステロイドの内部標準物質(19-d₃テストステロン)に依する相対回収率は、c) ではいずれも75%以上であったのに対し、b) では3-Hydroxy-5-ene型ステロイド、すなわちアンドロステンジオールとデヒドロエピアンドロステロン、および5 α , β -アンドロステンジオンの回収率が極端に低下していることが確認できた。このことをアンドロステンジオールの標品で確認したところ、55°Cにおける *Helix Pomatia* 消

化酵素との加温により、1時間後には9%が、さらに3時間後にはそのほとんどがテストステロンに転換していることが判明した(図8)。

図9はテストステロン陽性が疑われた検体を2種類の加水分解条件で確認した結果を示した。エピテストステロンの定量値はa), b)でそれぞれ4.8と2.0 (nmol/l)の差なのに対し、3-kete-4-ene型ステロイドの定量値はテストステロンが167(T/ET比=34.8)と0.9 (T/ET比=0.5), アンドロステンジオンが85と1.3(nmol/l)であり, a), b)の間には大きな差が認められた。

尿中のテストステロンは、そのほとんどがグルクロン酸抱合体として存在するため、a)とb)で見られた差異は加水分解酵素のアリル硫酸ターゼ活性の有無によるものではなく、*Helix Po-*

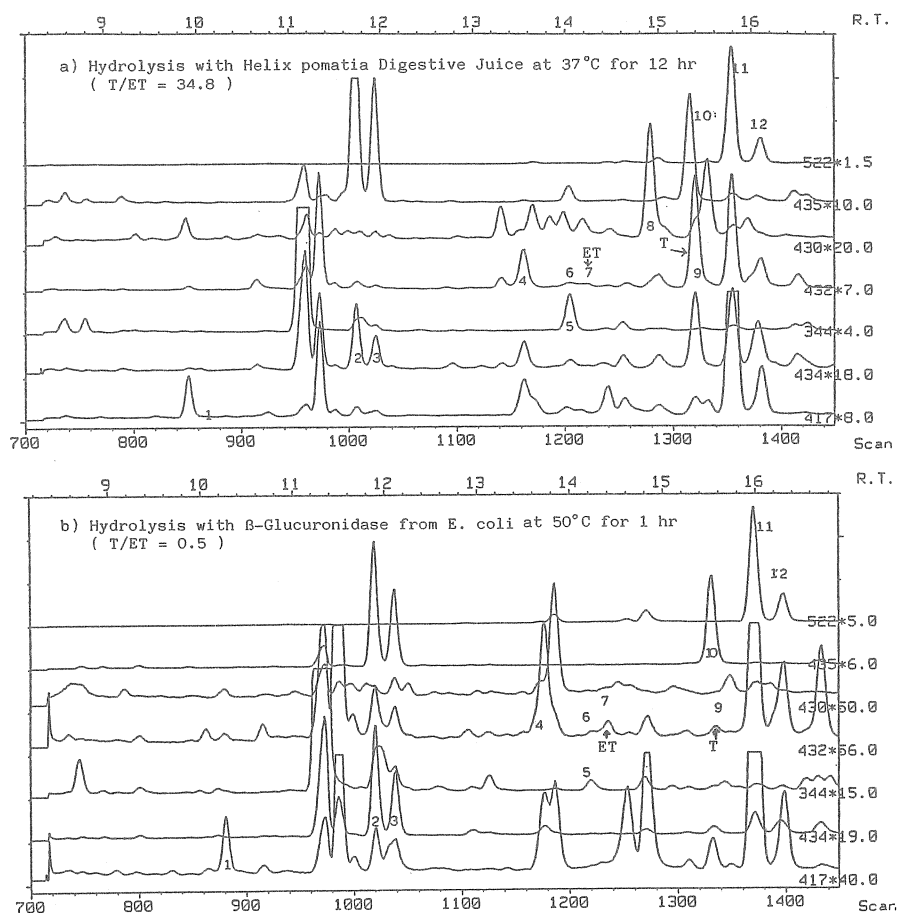


Fig. 9 Results of Confirmation Analysis (Screening IV)

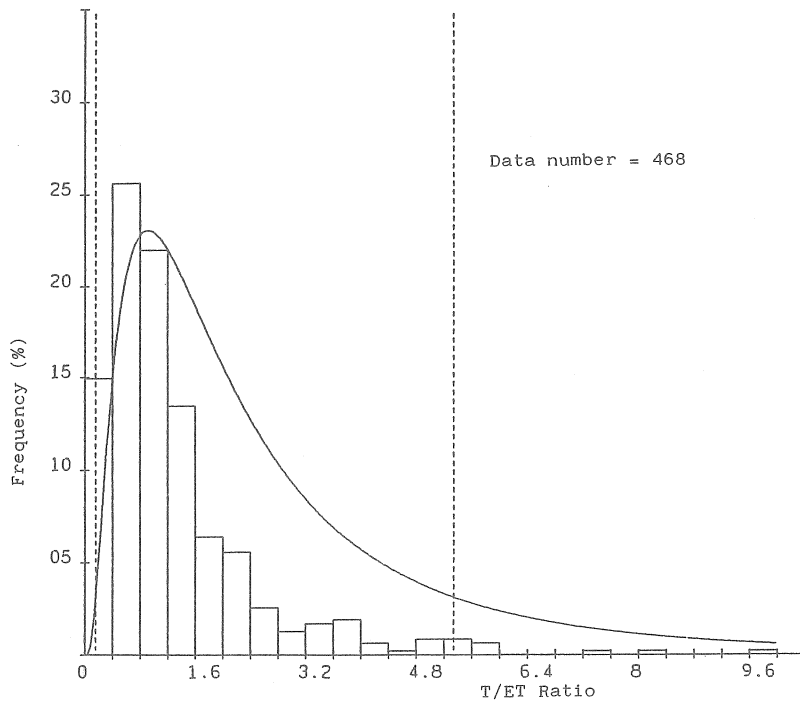


Fig. 10 The Distribution of T/ET Ratio
 Normal Range 0.1573–5.3387
 Average 0.9163

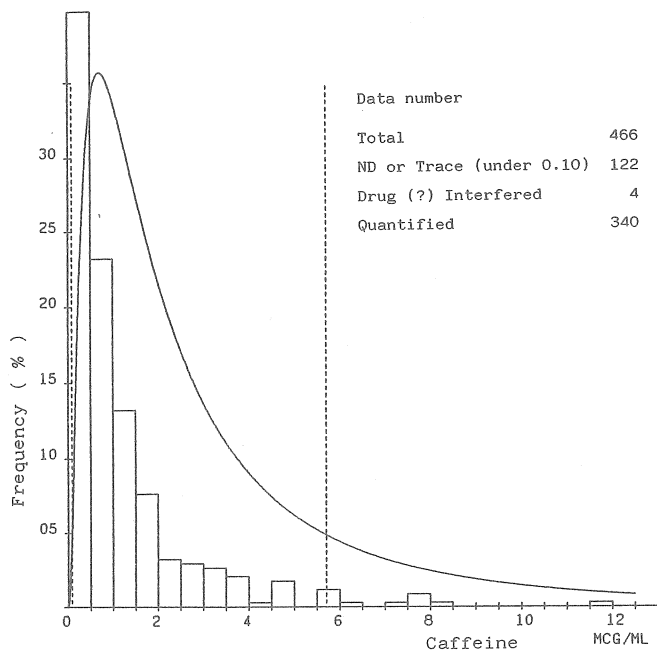


Fig. 11 The Distribution of Urinary Caffeine Concentration
 Normal Range 0.0864–5.7051 mcg/ml
 Average 0.7021 mcg/ml

matia 消化液中の酵素により、アンドロステノジオールからテストステロンへの転換が起こったためと推測された。

3-3 ユニバーシアード神戸大会のドーピング検査結果について

ユニバーシアード神戸大会のドーピング検査では468組の尿検体 (A, B検体) が搬入され、合計1,649アッセイのスクリーニングが実施された。再検査例数は興奮剤が46例、アナボリックステロイドが6例あった。

図10に T/ET 比, 図11にカフェイン定量値のヒストグラムをそれぞれ示した。

検体の測定値から推定した正常値(平均値±2×標準偏差)は T/ET 比が0.2~5.3, 平均値0.9, カフェインが0.1~5.7 μ g/ml, 平均値0.7 μ g/mlであり, いずれも対数正規型の分布であった。

これらの値は, 他の IOC 認定機関の報告値と良く一致した⁴⁷⁾。

現在カフェインの規制値は15 μ g/mlと定められているが, カフェインの錠剤 (186mg) や嗜好品負荷による当研究班の成績では10 μ g/mlを越えた例はな

Table.1 DOPING CLASSES WITH EXAMPLES

<p>A. Psychomotor stimulant drugs e.g.;</p> <ul style="list-style-type: none"> amphetamine benzphetamine chlorphentermine cocaine diethylpropion dimethylamphetamine ethylamphetamine fencamfamine meclofenoxate methylamphetamine methylphenidate norpseudoephedrine pemoline phendimetrazine phenmetrazine phentermine pipradol prolintane and related compounds. 	<p>D. Narcotic analgesics e.g.;</p> <ul style="list-style-type: none"> anileridine codeine dextromoramide dihydrocodeine dipipanone ethylmorphine heroin hydrocodone hydromorphone levorphanol methadone morphine oxocodone oxomorphone pentazocine pethidine phenazocine piminodine thebacon trimeperidine and related compounds.
<p>B. Sympathomimetic amines e.g.;</p> <ul style="list-style-type: none"> chlorprenaline ephedrine etafedrine isoetharine isoprenaline methoxyphenamine methylephedrine and related compounds. 	<p>E. β-Blockers e.g.;</p> <ul style="list-style-type: none"> atenolol labetalol metoprolol oxprenolol propranolol alprenolol and related compounds.
<p>C. Miscellaneous central nervous system stimulants e.g.;</p> <ul style="list-style-type: none"> amiphenazole bemegrade caffeine doxapram ethamivan cropropamide crotethamide leptazol nikethamide picrotoxine strychnine and related compounds. 	<p>F. Anabolic steroids e.g.;</p> <ul style="list-style-type: none"> clostebol dehydrochloromethyltestosterone fluoxymesterone mesterolone metenolone metandienone methyltestosterone nandrolone norethandrolone oxymesterone oxymetholone stanozolol testosterone and related compounds.

Definition of positive.

For caffeine --- if the concentration in urine exceeds 15 μ g/ml
 For testosterone --- if the ratio of the total concentration of testosterone to that of epitestosterone in the urine exceeds 6

かった⁹⁾。

一方、実際のドーピング検査の例では12 μ g/mlを示した例が2例あった。ロサンゼルスオリンピック以後、IOC医事委員会では規制値を10 μ g/mlに引き下げようとの意見があるとされている⁹⁾。

4. 結 語

測定効率化や自動化により、当面の国際大会規模のドーピングテストは充分対処できる体制となった。しかしながら、欧米諸国に比べるとドーピングテストの実施される機会は少ないようである。アナボリックステロイド等のホルモン剤は継続的に使用される薬物であり、選手の健康管理の面からするとトレーニング期間中の使用こそがむしろ問題であると思われる。

昨年4月モスクワで開催されたIOC医事委員会において、1988のカルガリ・ソウル両オリンピックから新たに β -ブロッカーを禁止リストに加えることが決定された⁹⁾。

この決定によりIOCおよびIAAF(国際アマチュア陸上連盟)の禁止薬物リストは表1の様に改められる。

β -ブロッカーはスクリーニングIIによって検出できることを既に確認しているが、今後の継続課題として検討してゆく予定である。

5. 文 献

- 1) M. Donike et. al, Screening Procedure in Doping Control; Sportsmedical Congress in Caracas, May, 15th. (1983)
- 2) 上館他, 「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(III)」; 昭和59年度日本体育協会 スポーツ科学研究報告

- 3) M. Donike et. al, Identification of Dope Agents by Retention time Measurements.; 3rd. Cologne Workshop in Dope Analysis, Feb., Köln (1985)
- 4) K. Kuoppasalmi et. al, Doping Analysis in HELSINKI; Clinical Chemistry Research Foundation Library (1983)
- 5) K. Kuoppasalmi et. al, Detection of Exogenous Testosterone in Doping Analysis (Methodological Aspects); Medicine and Exercise Science. Proc. Olympic Scientific Congress, Oregon, July (1984)
- 6) C. Clausnitzer, The Use of β -Glucuronidase from E. Coli for Screening Procedure of Anabolic Steroids.; II nd. International Symposium "Modern Problems of Doping Control in Sports", Moscow, April (1985)
- 7) M. Donike et. al, The Detection of Exogenous Testosterone; Deutsche Sportärtekongress Köln 1982, 293-298 (1982)
- 8) 上館他, 「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」; 昭和58年度日本体育協会 スポーツ科学研究報告
- 9) 黒田, 「ロサンゼルスオリンピック大会とそれ以後のドーピングに関する話題を追って」; 臨床スポーツ医学, 2(4), 437-440 (1985)

6. 謝 辞

スクリーニングIVの内部標準19-d₃テストステロンを恵与していただき、貴重な御助言をいただいた東京薬科大学馬場茂雄教授に深謝致します。

