

昭和63年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

No. VII 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
—新規禁止薬物および新規規制薬物に関する研究を中心として—

財団法人 日本体育協会
スポーツ科学委員会

昭和63年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

No. VII 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

——新規禁止薬物および新規規制薬物に関する研究を中心として——

株式会社三菱油化ビーシーエル

研究班長 中野義彦

研究主任 植木眞琴

研究班員 藤崎 誠 永野玲子 菱木順子

【要約】

国際オリンピック委員会 (IOC) の定めた1988年のドーピングリストには、競技力の改善が期待出来ない薬物や、薬物使用以外の物理的な不正手段も含まれるようになった。今回我々は、このようなドーピングについて考察し検査で判定できるものについてはその検査方法、またそうでない物についてはその対処方法について考察した。

その結果、

- ①あらたに興奮剤として分類された薬物のなかには、興奮剤ではないが、その薬物を服用すると尿中に興奮剤そのもの、または興奮剤と同じ代謝物が検出されるものがあること
- ② IOC のリストに記載されている薬物以外で、日本国内で市販されているものの中にもドーピングと判定される可能性がある薬物があること
- ③②に記載した薬物を服用した場合の尿検査結果
- ④ソウルオリンピック以後話題になっている薬物とその他のドーピング手段などについて明らかにすることが出来た。

ドーピングの物理的な不正手段は検体採取の際にも行なわれるが、日本のドーピング検査では、国際大会派遣選手やトレーニング期間中のドーピ

ング検査については日本体育協会スポーツ科学研究所が、またその他の競技大会については各大会の定める医事委員会がそれぞれ採尿を担当するので、ここでは解説だけに留めた。

【はじめに】

1988年のソウルオリンピック大会では、カルガリー冬季大会や1984年のロスアンゼルス大会などの経験を踏まえてドーピング検査方法が変更され、また禁止事項も追加された。ソウル大会のドーピングハンドブックの記述をみると、禁止事項のなかには検査で対処出来るものとそうでないものがあり、また禁止薬物もこれ迄のように運動能力の改善に結び付く物ばかりでなく、検査を妨害したり判定を困難にする目的で使用されるものが追加されている。

この一年の間に、ドーピングに関する国際シンポジウムが国際アマチュア陸上連盟 (IAAF) の主催で、またドーピングの防止と倫理に関する国際会議がカナダスポーツ省の呼び掛けで相次いで開催された。更にその後ソウル大会で最も注目された競技の一つである陸上男子100mで金メダルが剥奪されるという事件が起こった事もあり、日本で

もスポーツにおけるドーピング問題はかつてない関心を呼んでいる。

1989年2月には、フィンランドで開催されたノルディック世界大会の上位4名および抽選によって選ばれた選手に対して世界初の血液ドーピングテストが実施された。この大会はIOC医事委員長であり、IOC副会長のメロッド王子自らも視察し、次回バルセロナオリンピックでの血液ドーピング検査実施の是非について検討を開始したといわれる。

我々の研究班では、このような状況の変化に対応すべく調査研究を実施したので報告する。

【方法】

新たに禁止リストに追加された薬物についてその構造と効能を調査し、さらに類似物で問題になる可能性のあるものについて検索した。これら薬物のうち、正規の医薬品製剤として国内で入手できたものについては健康なボランティアを募って投与し、投与尿を昭和62年度日本体育協会研究報告に従って通常のドーピング検査と同じ方法で検査した。

昨年の研究テーマである利尿剤と β -遮断剤で投与実験を行なっていなかった薬物の主なものについても投与実験を行なった。興奮剤として新たに追加された物質のほとんどは日本では人体への使用が認められていないので、それらは机上検討にとどめた。

競技力の向上には効果がないが検査結果または検査の判定に影響を与えるとされている薬物につ

いてはその薬物の検出方法、検査結果への影響を新たに調査した。

今回は、以下の要領で投与実験を実施した。

- ①原則として午前中より投与実験を開始した。まず、薬物服用前の尿を採取した。
 - ②ただちに各薬物の効能書きに従って1回量を服用した。
 - ③投与後2日～3日間の尿をそれぞれ別々に採取し、すべての尿についてその色調、比重、pH、尿量および薬物服用からの経過時間を記録した。
 - ④採取した尿を通常のドーピング検査法に従って検査し、未変化体を測定した。
 - ⑤未変化体が検出されなかった薬物については理論的に予想される代謝物を質量分析装置を用いる構造解析手法によって検索した。
 - ⑥以上の実験で得られた知見を基にドーピング検査方法を改良し検査対象薬物を追加した。
- 尚、投与実験を行なうにあたり、経口黄体ホルモン剤は女性のボランティアに投与したが、それ以外の薬物は男性のボランティアに投与した。

【試薬】

市販品として入手可能な標準物質はシグマ社(アメリカ)などから購入し、その他は医薬品製剤より抽出精製し、必要に応じて再結晶し用いた。

投与実験を行なった薬剤を表-1に挙げたが、これらは、ソタロールを除けばいずれも日本の医薬品市場に治療薬として供給されているものでもある。表はその一般名、製品名、投与量、効能(IOC分類)を示している。

表-1 投与実験を行なった薬物の一覧

一般名	製品名	投与量	効能、適応 (IOC分類)
アレニラミン	セゴンチン	15mg	冠状動脈不全(記載なし)
スアリフェン	カルニゲン	8mg	循環調節(記載なし)
ノルエチステロン	ノルルテン	5mg/日、5日	月経周期異常(記載なし)
ト・ロスタノロン	マスタソール	50mg	乳腺症(蛋白同化ステロイド 扱い)
ソタロール	---	80mg	不整脈、高血圧(β -遮断薬)
エタクリン酸	エタクリル	50mg	高血圧(利尿剤)

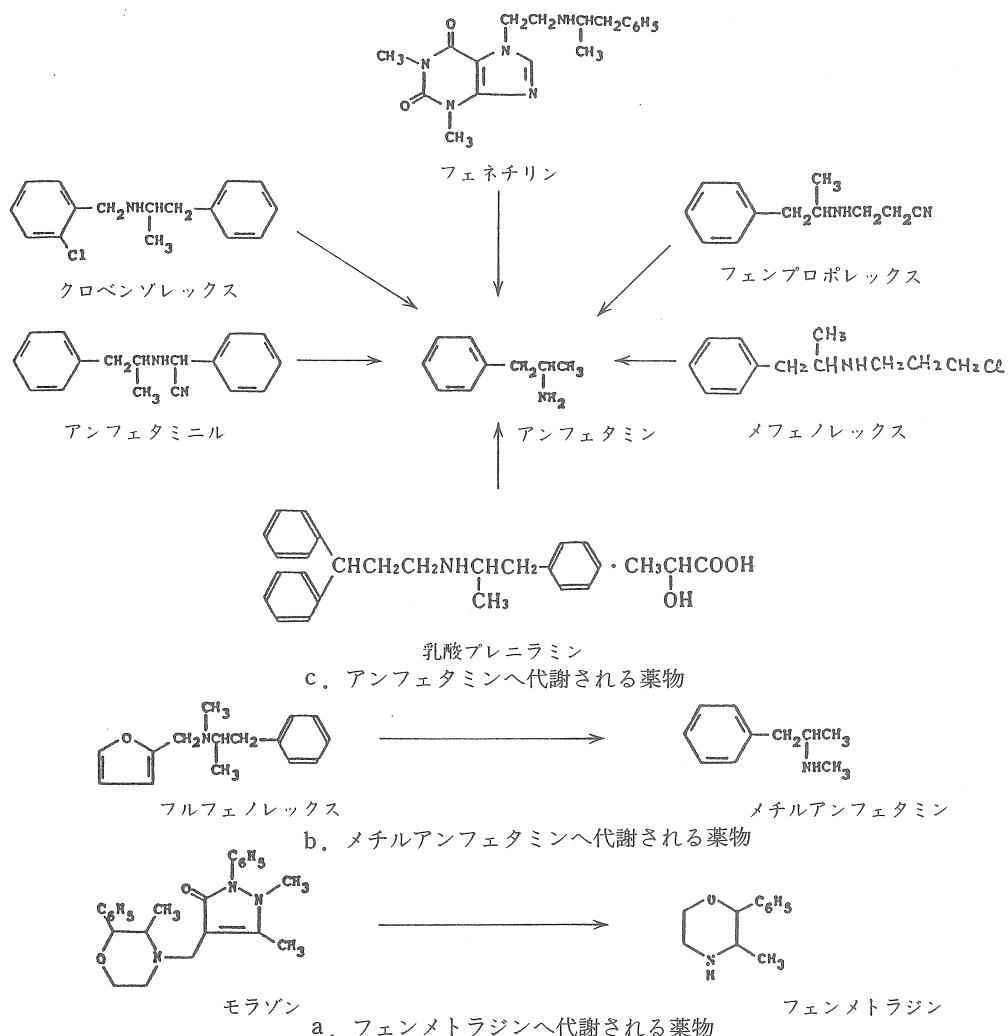


図-1 ヒト体内で代謝されて興奮剤として排泄される薬物

【装置と条件】

高速液体クロマトグラフ (HPLC) 日本分光工業株式会社製 TRIROTAR-III型 ガスクロマトグラフ (GC) ヒューレットパッカード社 (HP) 製 HP5890A型 ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) 日本電子製 JMS-DX303型、以上条件は昭和61年度日本体育協会スポーツ科学研究報告と同じとした¹⁾。

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) HP製 HP5995C/HP9000型コンピュータの変更に伴い条件を若干変更したが、基本的には昭和61年度日本体育協会スポーツ科学研究報告と同じである。

【結果および考察】

—興奮剤—

興奮剤として新たに禁止リストに追加されたものの多くはアンフェタミン、メタンフェタミンなど覚せい剤を前駆体とするやせぐすりである。

これは、覚せい剤の食欲抑制作用を治療に利用したものであるが、我国においては医薬品として認められていないため国内では入手することができない。昭和62年度日本体育協会報告²⁾で述べたように、これら薬物を服用した場合、尿中には未変化体と共にその代謝物として覚せい剤が検出され、GCまたはGC/MSによる興奮剤検査で覚せい剤陽

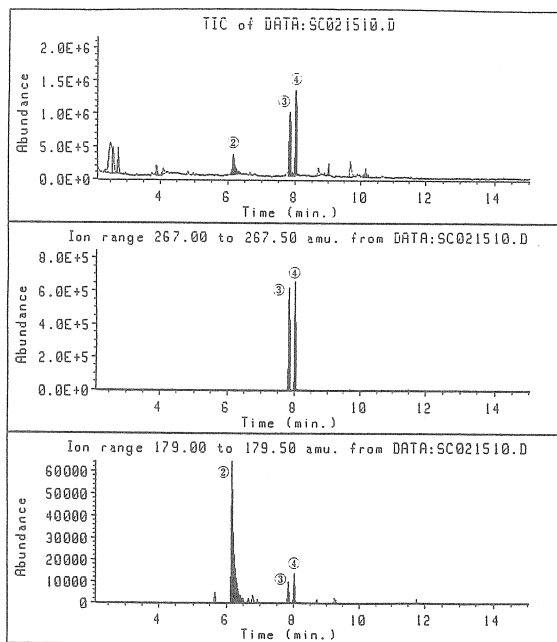


図-2 カルニゲン錠服用尿のGC/MSによる分析例

- ② チラミン
- ③, ④ パラハイドロキシエフェドリン

性と判定される可能性がある。想定されるこれらの薬物の代謝経路、および覚醒剤との関連性を図-1に示した。

—興奮剤陽性と判定される可能性のあるその他の薬剤—

乳酸プレニラミン：

冠不全治療薬として用いられるアンフェタミン誘導体である。

食欲抑制剤と同じく服用後の尿にアンフェタミンが検出される。我々の服用実験では尿中排泄物の主なものはプレニラミンでアンフェタミンとして排泄される量はごくわずかであったが、アンフェタミンが検出されればその量にかかわらず陽性と判定されるので、競技前の服用に際しては事前に大会医事委員に届けて許可を受けるのが望ましい。

スプリフェン(パラハイドロキシエフェドリン)：

循環器調節薬として用いられる複合剤カルニゲン錠には、その有効成分の一つとしてスプリフェンが含まれている。一般に、フェニルアルキルアミン骨格から成る薬物、たとえばアンフェタミン、

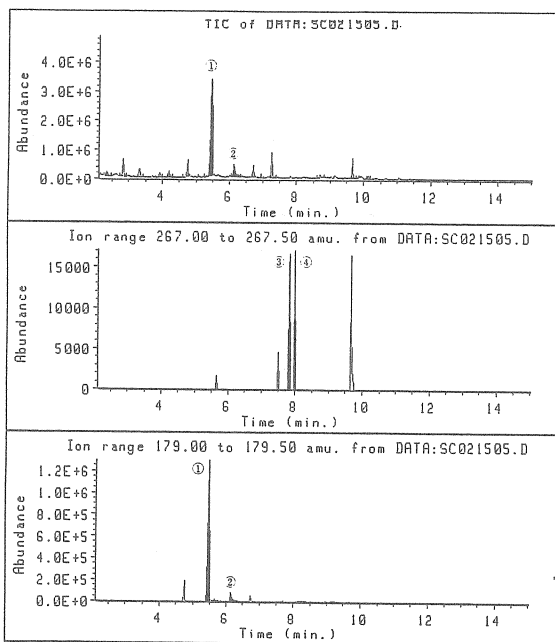


図-3 エフェドリン錠服用尿のGC/MSによる分析例

- ① エフェドリン
- ② チラミン
- ③, ④ パラハイドロキシエフェドリン

エフェドリンなどは、体内でその一部がアルキル基に対してパラ位が水酸化されたフェノールアルキルアミン、すなわちパラハイドロキシアンフェタミン、パラハイドロキシエフェドリンへそれぞれ代謝され、抱合体として尿中へ排泄される。従ってスプリフェンを服用するとGC/MSによる抱合型興奮剤の検査でエフェドリンを服用した場合と紛らわしい分析結果を与える。図-2、カルニゲン錠を服用した尿の分析結果、図-3にエフェドリンを服用した尿の分析結果をそれぞれ示したが、図-2に示したようにカルニゲン錠を服用した尿の例ではパラハイドロキシエフェドリンおよびその幾何異性体と推測される二種類の製剤由来成分がほぼ同量検出された。一方、図-3に示したエフェドリン服用後の尿では未変化体のエフェドリンが主成分として検出され、代謝物として検出されたパラハイドロキシエフェドリンの量はごくわずかであった。このように両者間には明確な差異が認められたが、服用の可否については大会の医事委員に事前に届けて確認しておく必要がある

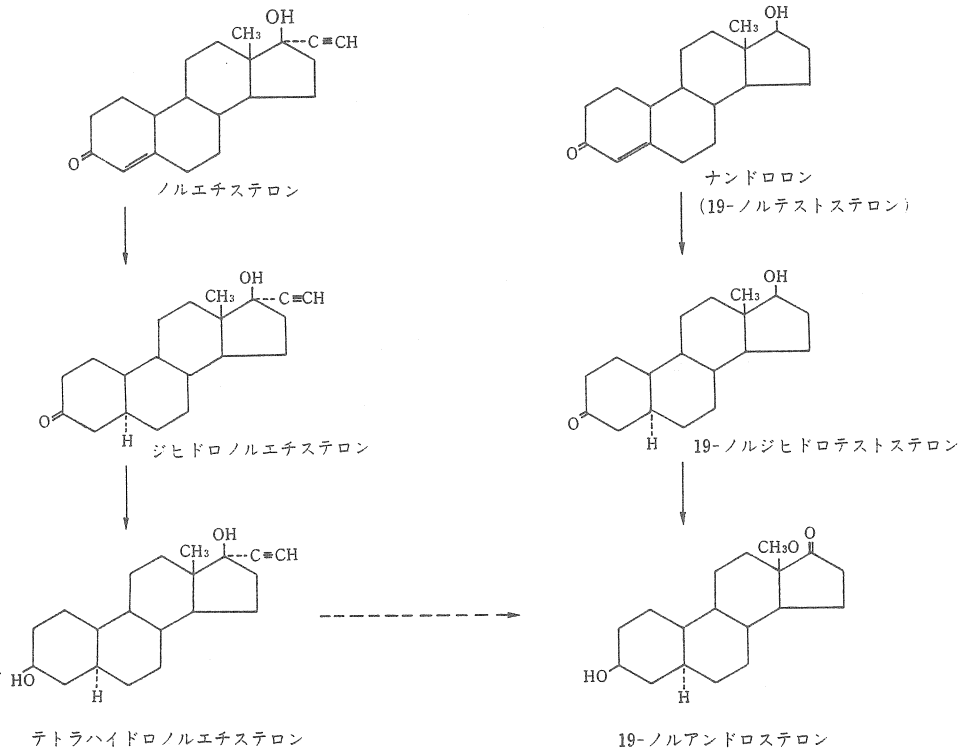


図-4 ノルエチステロンおよびナンドロロン(19-ノルテストステロン)の代謝上の関連性

る。

—蛋白同化ステロイド陽性と判定される可能性がある薬物—

ノルエチステロン：

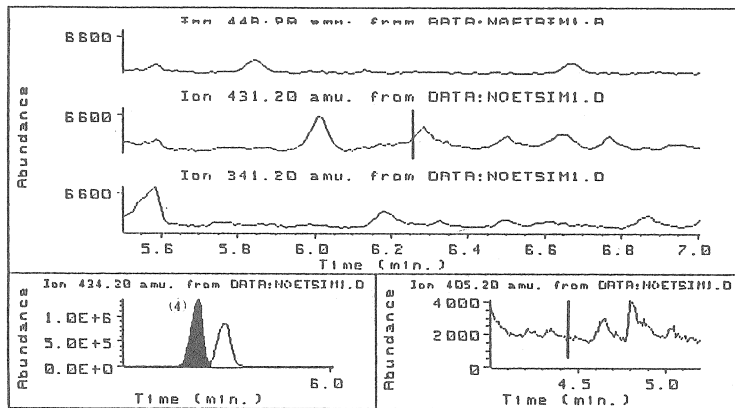
経口黄体ホルモンの一種で、月経困難症や性周期調節に使われる。代表的な蛋白同化ステロイドのナンドロロンと類似した構造をしており、体内で一部がナンドロロンの主要な代謝物ノルアンドロステロンに代謝されることから、ナンドロロン陽性かノルエチステロンかをめぐって度々話題になる。ナンドロロン使用の痕跡をノルエチステロンによってカモフラージュしようとして失格になった例がある。

図-4にノルエチステロンとナンドロロンの代謝経路を、また図-5にそれぞれを服用した尿の分析結果を示した。

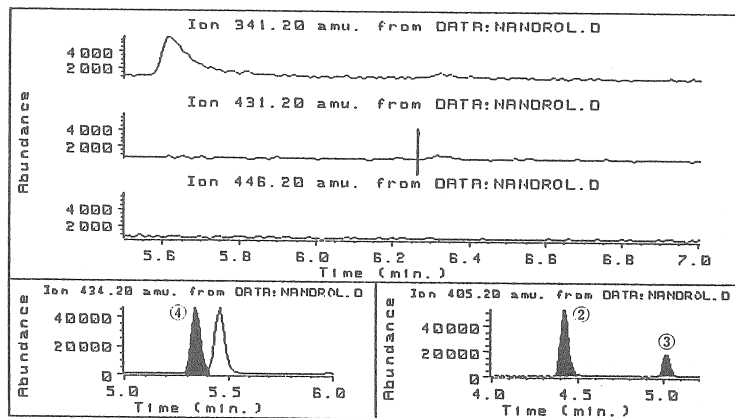
ノルエチステロンを服用した例ではその主要代謝物としてテトラヒドロノルエチステロン(ピーク①)、副代謝物としてノルアンドロステロン(ピーク②)がそれぞれ検出されたのに対して、ナン

ドロロン陽性の尿では主要代謝物としてノルアンドロステロン(ピーク②)、副代謝物としてノルエチオコラノロン(ピーク③)がそれぞれ検出された。またピーク④は内因性ステロイドのアンドロステロンを示す。

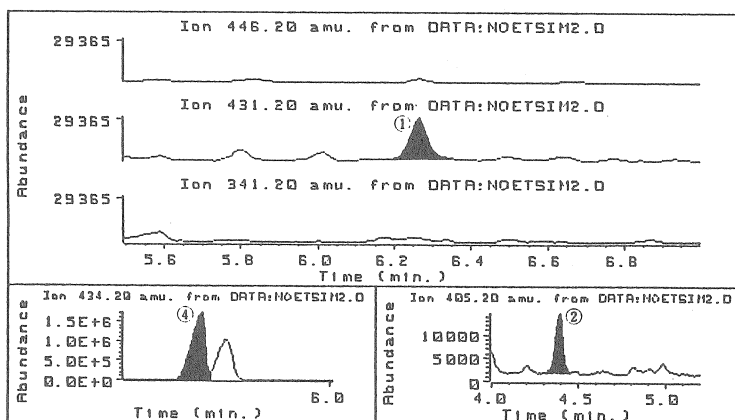
ノルエチステロン服用とナンドロロンの判定との関係を明らかにするために、ノアルテン錠服用時の内因制アンドロステロンとノルアンドロステロンとの比すなわちAN/NORAの推移をグラフとして示した(図-6)。ナンドロロンは筋肉注射剤として用いられるため尿検査で長期間検出されるが、その検出限界の目安はAN/NORA=1000である。図-6に示したようにノアルテンを処方どおり5mg服用すると次回(投与105分後)の尿から速やかにAN/NORAが1000以下に下がり、最終投与(第5回目)迄の間はほぼ1000以下で推移した。3日後には3500まで上昇し、NORA濃度が急速に低下している事がわかる。通常、最終服用後2~4日後に生理が発来するが、この例では4日後であった。また他の一例では1日後に発来した。以上



c. 薬物未投与の尿



b. ナンドロロン投与尿



a. ノルエチステロン投与尿

図-5 ナンドロロンとノルエチステロン投与尿の比較

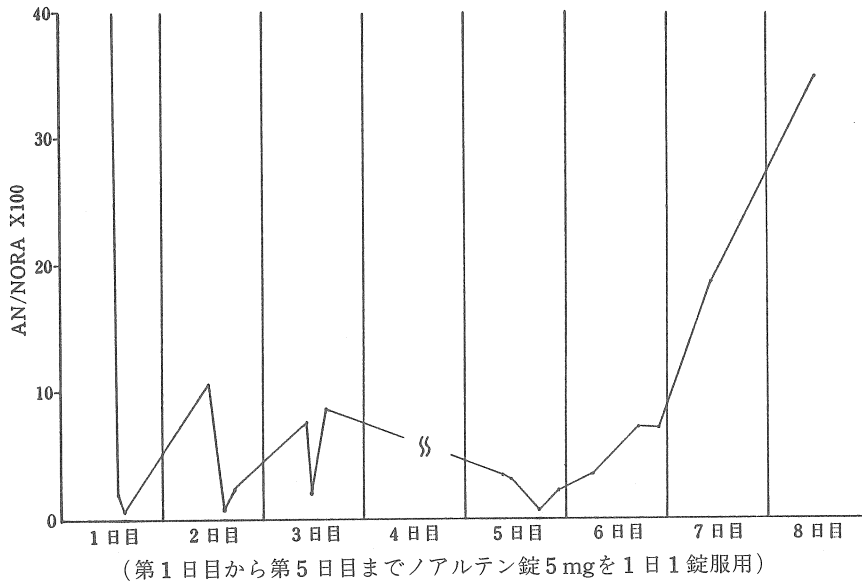


図-6 ノルエチステロン服用時のアンドロステロン/ノルアンドロステロン比の推移

のことより、やむをえずノアルテンを用いて生理の予定日を競技会の日程からずらす必要が生じた場合、ナンドロロン陽性と判定されないための目安としては1カ月前の生理予定日迄に変更し服用を中止すれば良いと思われる。

ドロスタノロン (ドロモスタノロン) :

マシゾールの商標で50mg/ml 油注剤として販売されており、日本では抗乳腺腫瘍作用に基づく乳腺症の治療薬としての適応を受けている。

ボディビルディングでは蛋白同化ステロイド使用による女性化乳房の防止に使われる。また女性の多毛、月経異常、男性の精子減少などの副作用が警告されているが、これらの副作用は本剤の蛋白同化作用によるものである。ソウルオリンピックのドーピング薬物リストでは具体的な薬物名として記載されていないが1987年統計で蛋白同化ステロイドと判定された例が報告されている。また1989年1月に実施されたドーピング検査機関の認定試験では既に試験検体として検査対象となっている。図-7に示した様に、ドロスタノロンは抱合型ステロイドの検査で3-ol-17-one 型代謝物としてエチオコラノロンのあとに溶出され、448(M⁺), 443(M⁺-15), 343(433-TMSOH) の三つのフラグメントイオンによってスクリーニングされた。

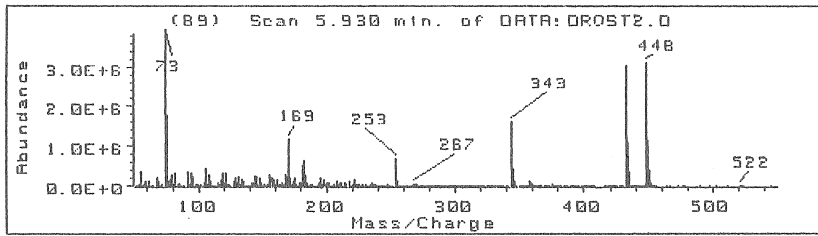
—新たに検出可能となった薬物—

ソタロール :

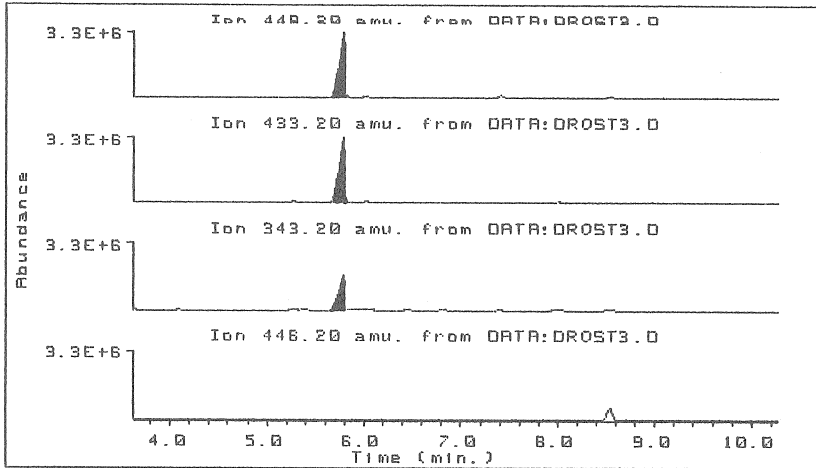
ソタロールは交感神経刺激様作用を持たない親水性β-遮断剤で、その主要な尿中排泄物は未変化体である。プリストルマイヤーズ社(カナダ)の製剤であるが日本ではまだ市販されていない。親水性β-遮断剤のラベタロール、ナドロール、ソタロールなどは従来のGC, GC/MS 条件では検出が困難なためHPLCで検出を行なっているが、感度が十分でない点、また構造情報が得られないので確認分析としては使えないなどの点で問題があった。今回これら親水性β-遮断剤のGC/MSによる高感度検出法を検討したところ、塩酸加水分解の代わりにβ-グルクロニダーゼによる加水分解に変更し、誘導体化反応を非酸性条件下で行なうことによりO-TMS-N-TFA 誘導体として検出できることを投与の3日後の尿まで確認した。この時の操作フロー図を図-8に、またβ-遮断剤混合物の分析例を図-9にそれぞれ示した。この条件によりIOCリスト記載のすべてのβ-遮断剤が検出可能となった。

エタクリン酸 :

エデクリルの商標名で万有製薬から販売されているループ利尿剤で、その大部分は未変化体とし



b. ドロスタノロンの3-ol-17-one 型代謝物のマススペクトル



a. マスクロマトグラム (黒塗り部分が代謝物を示す)

図-7 ドロスタノロン投与尿のGC/MSによる分析結果

て尿中に排泄される。昨年の研究では HPLC によって標準品の測定ができることを確認したが、実際の服用尿では低濃度のため検出できなかった。そこで今回は GC/MS による検出方法について検討した結果を図-10に示す。リン酸酸性下でエーテル抽出した画分の乾固物をヨウ化メチルでメチル化し GC/MS で分析した。GC/MS 法を用いると 1ng/ml 以下の感度を得られ、HPLC で検出できなかった実際の尿検体からも質量スペクトルを採取することができた。

—ソウルオリンピック以後話題になっている薬物について—

フラザボールとスタノゾロール：

フラザボールはミオトロン社の商標で第一製薬から発売されている経口蛋白同化ステロイド剤である。図-11にフラザボールとスタノゾロールの構造式を示したが、両者は第五番目の環すなわちフ

ラザボールでは、2, 3-c オキサジアゾール環を、スタノゾロールでは、2, 3-c ピラゾール環をそれぞれ有する含窒素ステロイドという点で共通している。スタノゾロールは未変化体をターゲット (検出指標) としてスクリーニングしていた1984年ロスアンゼルスオリンピック当時は検出確率が低く、潜在的な陽性者がかなりいたものと思われる。代謝物の水酸化スタノゾロールをターゲットとするようになって以来検出感度が向上し、また1988年のソウルオリンピックでスタノゾロールが検出出来るようになったことが知られるようになったため、その代用品としてフラザボールが注目されてきている。新聞では注射剤があるように報道されているが、我々の調査では経口用の 1mg 錠剤が日本で発売されているだけで、外国での入手は困難と思われる。また、ヨーロッパでは Suricbol というスラング名で呼ばれている。

尿試料 5 ml

ブプラノロール10 μ g (内部標準)
1N-リン酸緩衝液 pH7.0, 1 ml
 β -グルクロニダーゼ液30 μ l
50 $^{\circ}$ C, 60min・加熱
エーテル 5 ml で20分抽出

水 層

NaHCO₃ : K₂CO₃ = 2 : 1 でpH=9.6とする
2-Methyl propanol 1 ml 添加
エーテル 5 ml 添加
無水硫酸ナトリウム 3 g 添加
20分間振とう

エーテル層 (乾固物)

0-TMS-N-TFA 化反応
100 μ l MSTFA \rightarrow 30 μ l MBTFA
50 $^{\circ}$ C, 5 min. 50 $^{\circ}$ C, 15min.

GC/MS-SIM 分析

図-8 β -遮断薬スクリーニングのための前処理方法

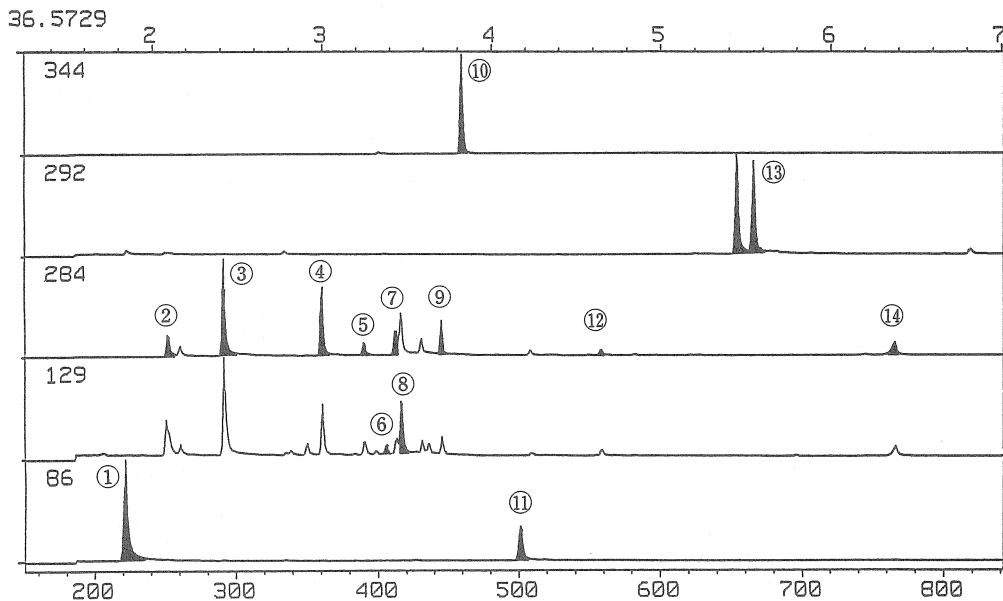
—その他のドーピング不正手段—

血液ドーピング：

冒頭に述べたように1989年2月、フィンランドで開催された世界ノルディック選手権において世界初の血液ドーピングの検査が実施された。IOCではまだ血液ドーピングの検査を実施するか否かについて結論を出していないので、実際の検出方法の詳細についてはIOCの統一的な検査方法はない。そこで、1987年5月にイタリアのフローレンスで開催されたスポーツにおけるドーピングに関する国際シンポジウムで Bo Berglund によって発表された方法について述べる³⁾。

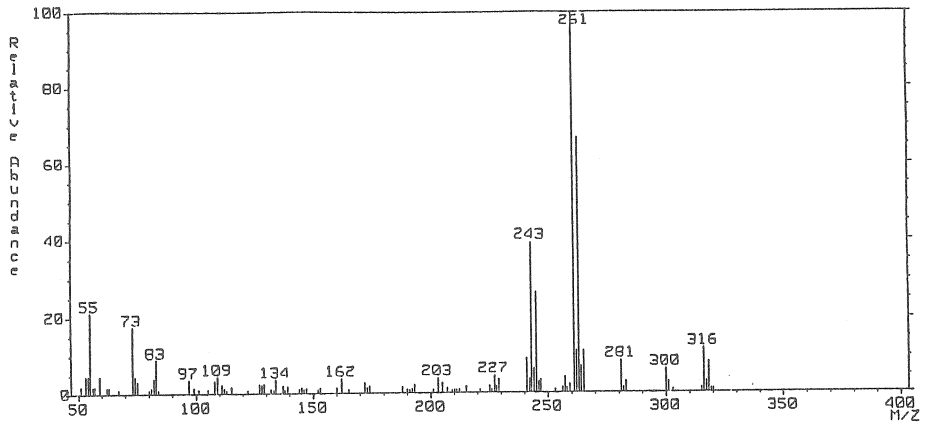
血液ドーピングはあらかじめ1000~1500mlの血液を採取・保存しておき、1ヶ月以上の間隔において競技の直前に輸血することによって競技の際の持久力を増強することを目的とするが、血液ドーピングを行なった場合、

①最初の採血により血液中のヘモグロビン量が約15%低下する。

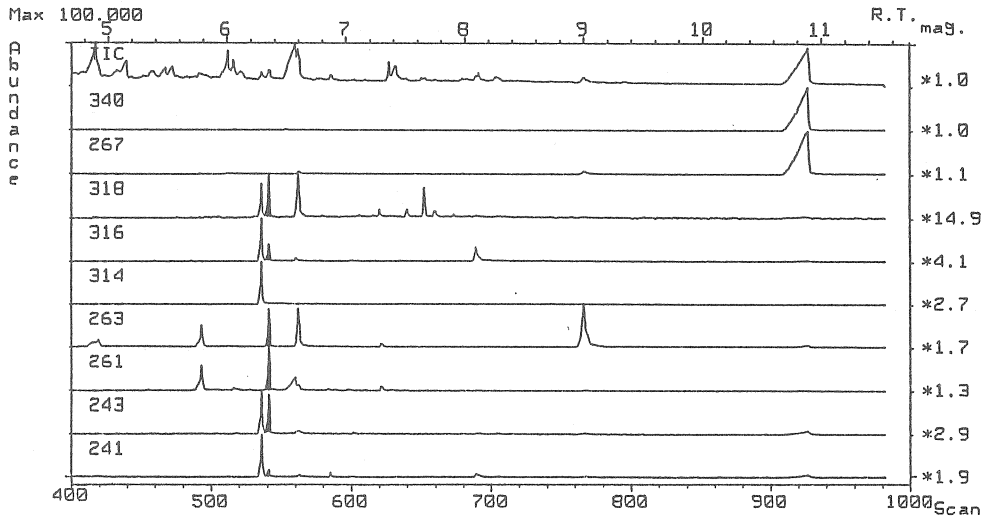


- ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭
①ブプラノロール ②アルプレノロール ③オクスプレノロール
④メトプロロール ⑤アルプレノロール代謝物 ⑥アテノロール
⑦オクスプレノロール代謝物 ⑧プロプラノロール
⑨メトプロロール代謝物 ⑩ソタロール ⑪ナドロール
⑫プロプラノロール代謝物 ⑬ラベタロール ⑭アセプトロール

図-9 GC/MSによる β -遮断剤の分析例



b. エタクリン酸のマススペクトル



a. エテクリル服用尿のマスキロマトグラム
(黒塗りのピークはエタクリン酸を示す)

図-10 GC/MSによるエテクリルカプセル服用後の尿の分析結果

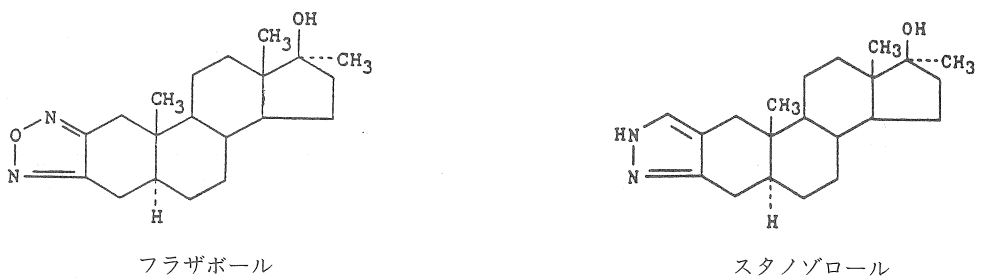
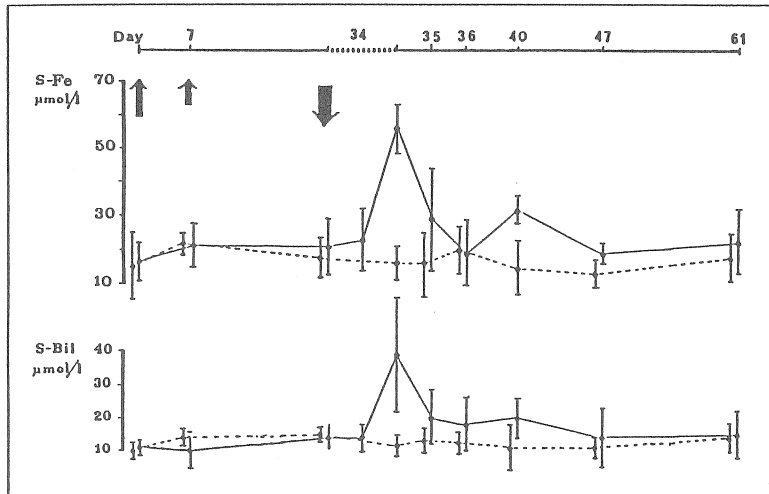
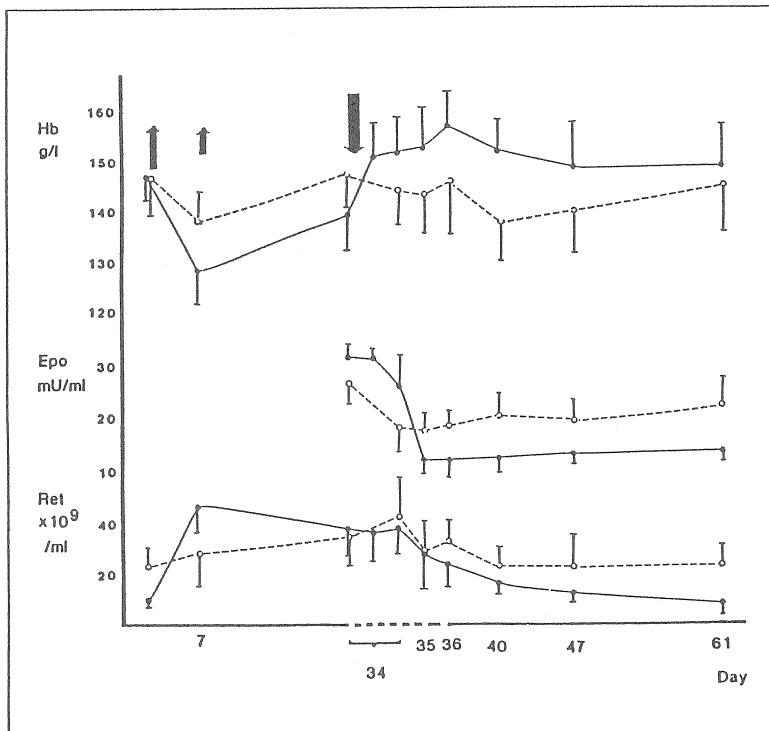


図-11 フラザボールおよびスタノゾロールの化学構造



矢印↑は採血，↓は輸血をそれぞれ示す。
また実線が実験群，点線が対照群を示す。

図-12 血液ドーピングを実施した場合の血清鉄 (S-Fe) 血清ビリルビン (S-Bil) 量の推移。



矢印↑は採血，↓は輸血をそれぞれ示す。
また実線が実験群，点線が対照群を示す。

図-13 血液ドーピングを実施した場合のヘモグロビン (Hb) , エリスロポエチン (Epo) , 幼若化赤血球 (Ret) の推移。

②採血約1週間後から再輸血までの間は幼若化赤血球（新しい赤血球）の比率が高い。

③エリスロポエチン（造血ホルモン）の量は再輸血後急激に減少する。

④再輸血直後はヘモグロビンの分解により血清鉄および血清ビリルビンが増加する。

などがわかっている。これら①～④が単に異常であることを確認しただけでは血液ドーピングを証明した事にはならないので、その検査方法としては競技前後のエリスロポエチンの量が有意に減少していることを確認しなければならない。すなわち競技当日およびその翌日ないしは翌々日に採血し、血液検査によってエリスロポエチン量を定量する必要がある。

図-12, 13は Bo Berglund の論文から引用したもので、1350ml 採血しその34日後に輸血した場合の①～④の経時変化を示しているが、再輸血によってエリスロポエチンが急激に減少していることがわかる（この例では62%の減少が観察された）。以上のように、現段階での血液ドーピングの検出方法は煩雑で採血を伴うが、抑止力として活用できる程度にはなっている。世界ノルディックでは宗教やその国の事情で採血の習慣のない国などの参加がなかったためこのような検査ができたと推測されるが、より参加国の多い世界陸上選手権やオリンピックでの実施については検査方法以外に解決すべき問題点が残されているといえる。

【おわりに】

同じ1987年の国際シンポジウムにおいて、もう一つの注目すべき発表がアメリカテキサス大学の F.W. Booth らによって行なわれた⁴⁾。F.W. Booth らは、現在研究が進められている遺伝子組み替えの技術が確立し、ヒトの遺伝病の治療が可能となるならば、競技力の高いスーパーアスリートを生み出す遺伝子ドーピング（Gene Doping）が試みられるようになるであろうと警告している。遺伝子ドーピングによって実際にスーパーアスリートを生み出すことが可能であるか否かは別としても、現にアメリカではノーベル賞受賞者の精子を幹旋

する精子銀行がビジネスとして成り立っているし、また競馬の世界では血統操作によってサラブレッド系とアラブ系の優秀な競争馬が人為的に作り出されている。

最近のドーピングは尿検査や血液検査による検出が困難なものが増加しており、また遺伝子ドーピングを失格とすることは失格した選手本人の存在意義を問う事になる。このような背景から、昨年カナダのスポーツ省の主催で教育、倫理、法律、報道など全社会的にドーピング防止キャンペーンを展開しようという趣旨のドーピングに関する国際会議が開催されたが、日本でも薬物に関してクリーンであるという現状を維持するため、検査だけでなく総合的な対策を考える時期に来ていると思われる。

【文 献】

- 1) 中野義彦, 植木眞琴, 藤崎 誠, 永野玲子, 菱木順子：昭和61年度日本体育協会研究報告, 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 (β -受容体遮断薬と利尿剤のスクリーニング方法を中心として)
- 2) 中野義彦, 植木眞琴, 藤崎 誠, 永野玲子, 菱木順子：昭和62年度日本体育協会研究報告, 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 (利尿剤の検査方法, 及び β -ブロッカーの体内動態に関する研究を中心として)。
- 3) Bo Berglund : Official Proceedings of the International Athletic Foundation World Symposium on Doping in Sport. Florence, 10-12 May, 1987 Can blood doping be detected?
- 4) F.W. Booth, Frank W. Booth, Philip Babiji, Donald B. Thomason, Ted S. Wong Paul R. Morrison : Official Proceedings of the International Athletic Foundation World Symposium on Doping in Sport. Florence, 10-12 May, 1987 Contractive Activity and Gene Expression in Skeletal Muscle.

