

平成10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
—炭素同位体比質量分析法による天然ステロイドホルモンドーピングの検出—

財団法人 日本オリンピック委員会
選 手 強 化 本 部

平成10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
— 炭素同位体比質量分析法による天然ステロイドホルモンドーピングの検出 —

報告者 三菱化学ビーシーエル ドーピング検査室

研究班長 植木 眞琴

研究班員 岡野 雅人, 佐藤 充彦, 池北 紋子, 高尾由里子, 藤崎 誠

Report of the research project on the testing procedures
for doping control in sports

Detection of doping with naturally occurring steroids by means of
carbon isotope ratio mass spectrometer.

(Granted by the Japanese Olympic Committee research fund 1998)

Chief : Makoto Ueki

Members : Masato Okano, Mitsuhiko Sato, Ayako Ikekita,
Yuriko Takao, Makoto Fujisaki

*Doping control laboratory, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.
3-30-1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo 174, Japan*

Recent prevalence of overuse of hormone-based dietary supplements as anti-aging and/or memory enhancing OTC drugs in the USA resulted in abuse of oral testosterone precursor and the related synthetic steroids by sportsmen. Main purpose of abuse of their steroids is not just a performance enhancement because some of these products were proven to be less-anabolic than the fully formed androgens. In humans, the products are metabolized into androgen, thus, the urinary steroid profiles are manipulated. The commercial androgenic anabolic steroids are chemically synthesized from phytosterols from soybeans that have relatively low ^{13}C -contents than animal steroids. We have developed the testing procedure for the detection of synthetic steroids by means of gas-chromatograph combustion high-precision carbon isotope ratio mass spectrometer. The procedure was applied on the XIIIth winter Olympic games Nagano 1998 for the first time in the Olympic history, then the medical commission of IOC has officially decided in 1999 to authorize the carbon isotope ratio as a criterion to indicate doping with naturally occurring synthetic steroids. This report refers to this new technique as a tool for the differentiation between doping and naturally elevated androgen under normal physiologic condition.

1. はじめに

アメリカで天然ホルモンを含有する栄養補助食品の販売が認められるようになって以来、それらが老化防止剤や記憶力増強剤の代用品として過剰服用されるようになり、結果として、スポーツにおいて経口テストステロン関連製剤を用いたドーピングを助長するようになった。それら製剤は医療用テストステロン製剤に比べれば蛋白同化作用が低いので、単に競技力増強のためだけに使用されるのではなく、尿中ステロイドプロファイルを変化させ、ドーピング判定を困難にするためでもあると思われる。市販のステロイドは大豆のフィトステロールを出発原料として合成され、それらは動物ステロイドよりも ^{13}C 含量が低いので、炭素同位体比を測定することによって合成ステロイドのドーピングが検出できると期待される。我々は、ガスクロマトグラフ熱分解炭素同位体比質量分析計(CIR)を用いてヒト尿中ステロイドの炭素同位体比を測定する方法を開発し、長野オリンピックのドーピング検査において、オリンピック史上初めてこの検査を実施した。その結果を踏まえ国際オリンピック委員会医事委員会は、1999年のドーピング禁止リストから判定基準の一つとして炭素同位体比を公式に採用する事を決定した。本レポートは炭素同位体比によって合成天然ステロイドによるドーピングとステロイドの生理的な上昇とを区別する方法について報告する。

2. 試料と装置

(試料)

アメリカで市販されているステロイド含有栄養補助食品数種(別記)を入手し、その主成分を既に報告した検査方法1)にてあらかじめ確認した。尿サンプルは、自主的に同意したボランティアから、それら製品を能書通りに服用する直前、および服用三日後まで別々

に採取した。その結果を健常者の尿検査結果と比較した。また日常のドーピング検査において、濃度測定に基づく従来のステロイド検査法でテストステロン関連化合物のドーピングが疑われる尿を本法で分析し、炭素同位体比質量分析法の結果と比較した。

(試薬)

市販品の Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech, Sweden)を用い、Axelson らの方法²⁾に従い TEAP-LH20 (triethylamino hydroxypropyl-LH20)を合成した。Bond Elute C_{18} (10cc/500mg)は Varian より購入した。グルファターゼ Type A-II (630 unit arylsulfatase and 1,260 unit β -glucuronidase/30 μ l) (日本バイオテスト, 東京), および大腸菌(E.C.K12)由来 β -グルクロニダーゼ(80 unit/ml : Behringer Mannheim, Germany)は市販品を購入した。ステロイドのアセチル化に用いた無水酢酸は(国産化学, 東京) 自社にて炭素同位体比を測定し、誘導体化に伴うステロイドの炭素同位体比のシフトを補正した。Girard's Reagent T は Sigma より購入した。その他の試薬および有機溶媒は、市販特級品または HPLC 分析用グレードの製品を用いた。

(装置)

使用したガスクロマトグラフ熱分解炭素同位体比質量分析計は、長野オリンピックではプロトタイプとして Optima (VG Micromass, England)を用いたが、大会以後は Isoprime (同上)を使用した。両者の主な違いは質量分離部の磁場が前者では電磁石、後者では永久磁石を使用している点であり、分析感度および精度が同等であることを確認の上用いた。熱分解後に発生する水分の除去にはクリオトラップを使用し、その他の装置条件詳細は表-1に示した。

3.方 法

(前処理)

尿中のステロイドはまず遊離型、グルクロン酸抱合型、硫酸抱合型に分画し、遊離画分(F)はアンドロステンジオンなどの非抱合ステロイドの測定に、グルクロン酸抱合体画分(G)はアンドロスタンジオールなどの非 3β 型ステロイドの測定に、また硫酸抱合体(S)はDHEA、エピアンドロステロンなどの 3β 型ステロイドの測定にそれぞれ用いた。各画分の分画には合成 TEAP-LH20カラムを用いた。すなわち尿10-20mlを Bond Elute C18 に添加し同量の蒸留水で洗浄したのち、4mlのメタノールで溶出した。このメタノール溶出液に蒸留水1.5mlを加えて72%-メタノールに調整した試料を9 mmID×0.8mmLの TEAP-LH20カラムに添加し、F画分は4 mlの72%メタノール溶液、G画分は10mlの0.4M 蟻酸/72%メタノール溶液、Sは10mlの0.5M 酢酸/72%メタノール溶液 pH=10にてそれぞれ溶出しステロイド画分を得た。F画分は窒素気流下で乾固し、そのままあるいは5 mlのn-ペンタンで抽出再乾固後、アセチル化して CIR 分析に用いた。またG画分は窒素気流下で乾固し、0.2M-リン酸緩衝液(pH 7.0) 1 mlを加えた後 β -グルクロナダーゼ $25\mu\text{l}$ と共に 50°C で加温し遊離のアグリコンを得た。S画分も同様に窒素気流下で1 ml以下まで濃縮し、氷酢酸と2.5N-水酸化ナトリウムでpH=5.2に調整後、グルファターゼ $30\mu\text{l}$ を加えて 60°C で60分加温した。得られた遊離ステロイドは5 mlのn-ペンタンで抽出し、その乾固物をアセチル化したのち CIR 分析した。

G画分から得たアグリコンの乾固物は更に Shackleton らの方法3)を参考にヒドラジンで処理してケトステロイドを除去し、水酸化ステロイドを得た。すなわち、抽出物を0.5mlの氷酢酸で再溶解したのち200mgの Girard's Reagent Tを加えて 100°C 、30min、加熱し、

ついで3 mlのイソオクタン/ジクロロエタン=2/1混合溶媒で2回抽出した。この抽出液を0.5 mlの2.5N-水酸化ナトリウム、蒸留水の順で洗浄し、約3mgの無水硫酸ナトリウムで脱水したのち窒素気流下で乾固した。乾固物は0.2 mlのシクロヘキサン/エタノール=4/1に溶解して0.5gのセファデックス LH20カラムに添加し、最初の溶出液1.8mlは廃棄し、以後1.4 mlを採取、乾固してアセチル化後 CIR 分析に用いた。

各画分から得たアグリコンの乾固物は内部標準物質として $2.5\mu\text{g}$ の 5α -Androstan- 3β -olを含む $100\mu\text{l}$ の乾燥ピリジンに再溶解し、これに $200\mu\text{l}$ の無水酢酸を加えて 60°C で60分加温した。この反応液を窒素気流下で十分乾固後 $30\mu\text{l}$ のシクロヘキサンで再溶解し、CIR 分析に用いた。

(測定法)

CIRの測定条件を表-1に、またG画分とS画分のステロイドを分析した代表的な CIR クロマトグラムを図-1、図-2に示した。測定された炭素同位体比は Pee Dee Belemnite (PDB)を基準とする天然炭素同位体比からの千分率偏差($\delta^{13}\text{C}$ (‰))で表され、以下の式で計算される。また、アセチル化物については、ステロイド分子中でアセチル化される官能基の数に応じて、次式にて誘導体化試薬による影響を補正した。

[δ 値の計算式]

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left(\frac{\text{試料の CIR}}{\text{PDBの標準 CIR}} - 1 \right) \times 1,000$$

[アセチル化物の δ 値の補正式]⁴⁾

$$\delta_s = \delta_{sA} + 2 m(\delta_{sA} - \delta_A) / n$$

ここで各パラメータは

n : ステロイド骨格中の炭素数

Androstans, Androstenes 19

Pregnans, Pregnenes 21

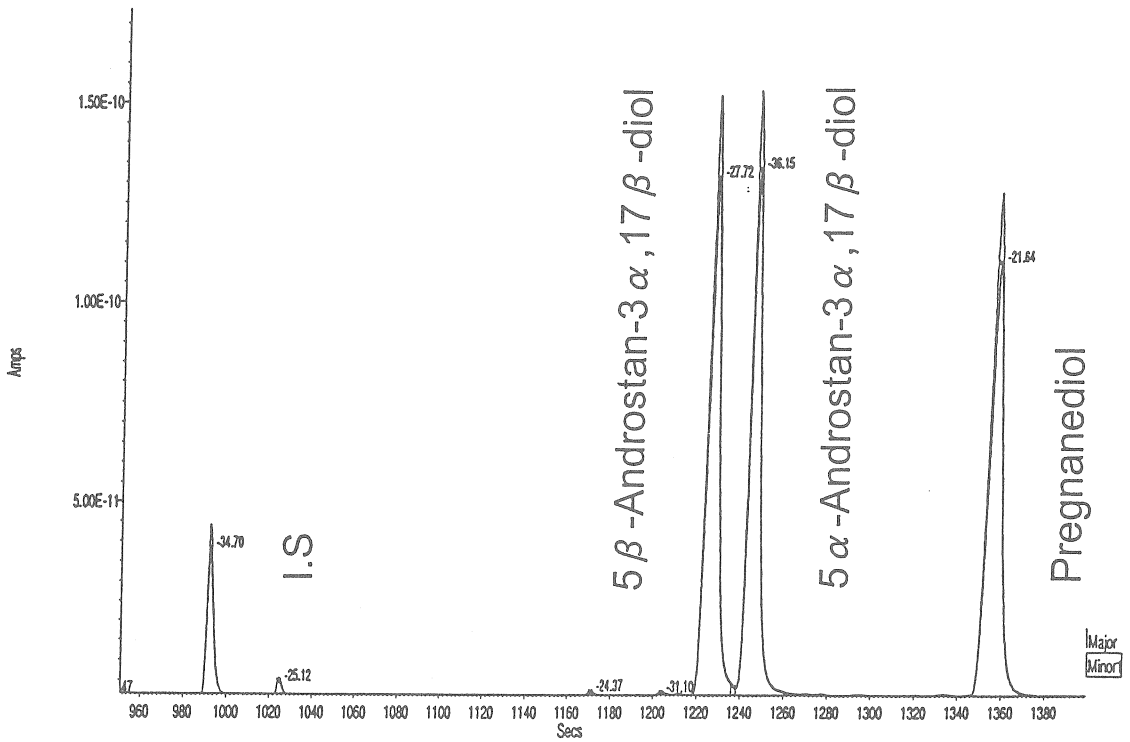


図1 グルコン酸抱合体画分に検出されるステロイドの炭素同位体比 MS 分析

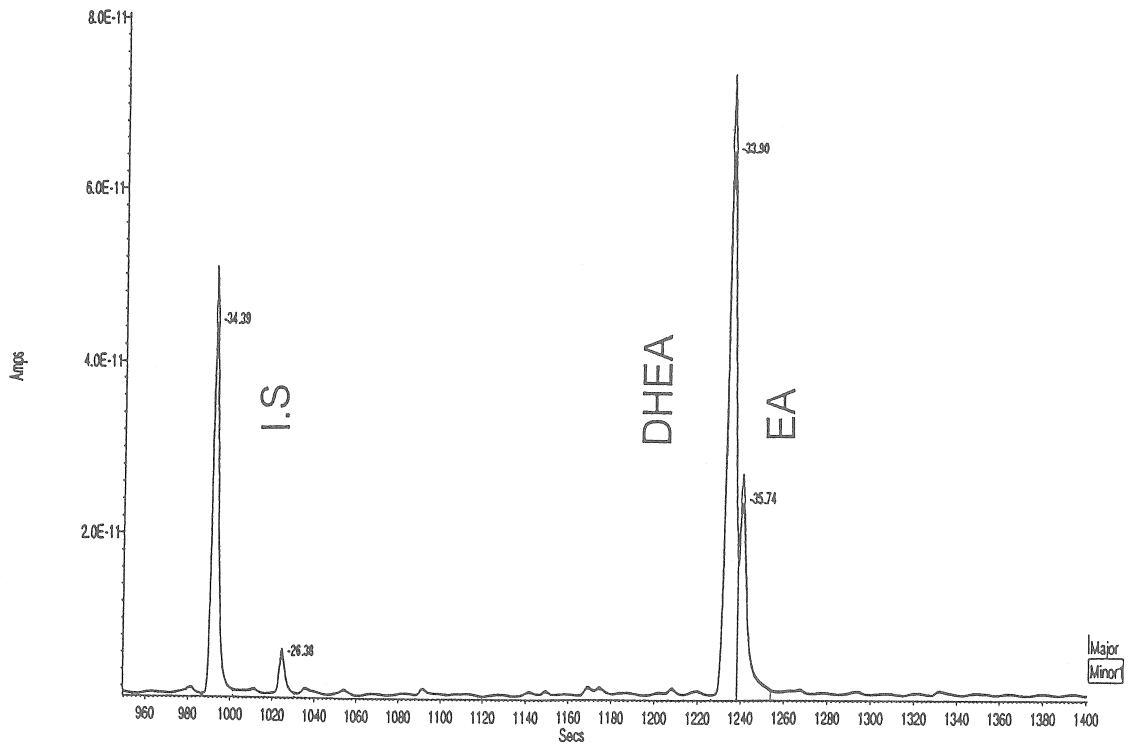


図2 硫酸抱合体画分に検出されるステロイドの炭素同位体比 MS 分析

表1 GC 熱分解炭素同位体比質量分析計の装置条件

装置	: Isoprime型GC熱分解炭素同位体比質量分析計 (Micromass社) HP6890series2型GC-HP7673型試料自動注入装置付。		
分析カラム	: DB-17 (J&W社)、サイズ 0.25mm I.D. X 30m L 膜圧 : 0.25 ミクロン、液相 : 50%-Phenylmethylsilicone		
オープン温度	初期温度	50°C	1.0分保持
	第一温度	250°C	昇温速度 20°C/min.
	第二温度	300°C	昇温速度 5°C/min.
	終温度		9.0分保持.
注入温度	260°C	パージオフ	30秒
注入条件	スプリットレス	試料注入量.	2 μ l
移動相流量	1 ml/min (定流量)		
質量分析部			
	:インターフェイス	350°C	熱分解炉温度 850 °C
	リトラップ	-100°C	トラップ電流 400 μ A
検出イオン	$^{12}\text{CO}_2$	44 m/z	$^{13}\text{CO}_2$ 45 m/z
	$^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$	46 m/z	

m : アセチル化される官能基の数

monohydroxy

1

dihydroxy

2

δ_S : 未誘導体化ステロイドの δ 値

δ_A : アセチル化剤 (無水酢酸) の δ 値

δ_{SA} : ステロイドアセチル化物の δ 値

を示す。

すなわち δ 値が正ならば試料の ^{13}C 比が天然同位体比よりも高く、負ならば低いことを示す。

図-3は、テストステロンと主な前駆体および代謝物との関係を示す。今回の研究では、g 現在問題になっているテストステロン関連化合物のドーピングを見分ける際にキーとなる3種類の男性ステロイド、DHEA、5 α -および5 β -Androstan-3 α ,17 β -diolを測定対象に選んだ。また男性ホルモンを投与しても、代謝経路から考えて、その炭素同位体比が影響を受けないと思われるステロイドのひとつであるプレグナンジオール(P 2)のCIR

を併せて測定し、CIRの個人差を補正するためのリファレンスに用いた。

4. 結果と考察

日本国内で入手できる数種の化学合成テストステロン製剤を対象に δ 値を測定した。表-2はアセチル化された各ステロイドのCIR分析を行い、得られた結果を補正して遊離ステロイドの δ 値に換算した結果を示す。

表に示したように、いずれの化学合成ステロイドにおいても-28前後の δ 値を示し、これらの化学合成ステロイドでは標準炭素同位体比よりも ^{13}C 含量が低いことが確認された。植物原料について炭素同位体比を調べた報告では、原料となる植物の生育地域によってその炭素同位体比が異なり、熱帯に分布するトウモロコシやサトウキビなど、C 4植物成分の δ 値はおよそ-15、またステロイド合成の出発原料として使われるフィトステロールを産生する大豆など、温帯に分布するC 3植物の δ

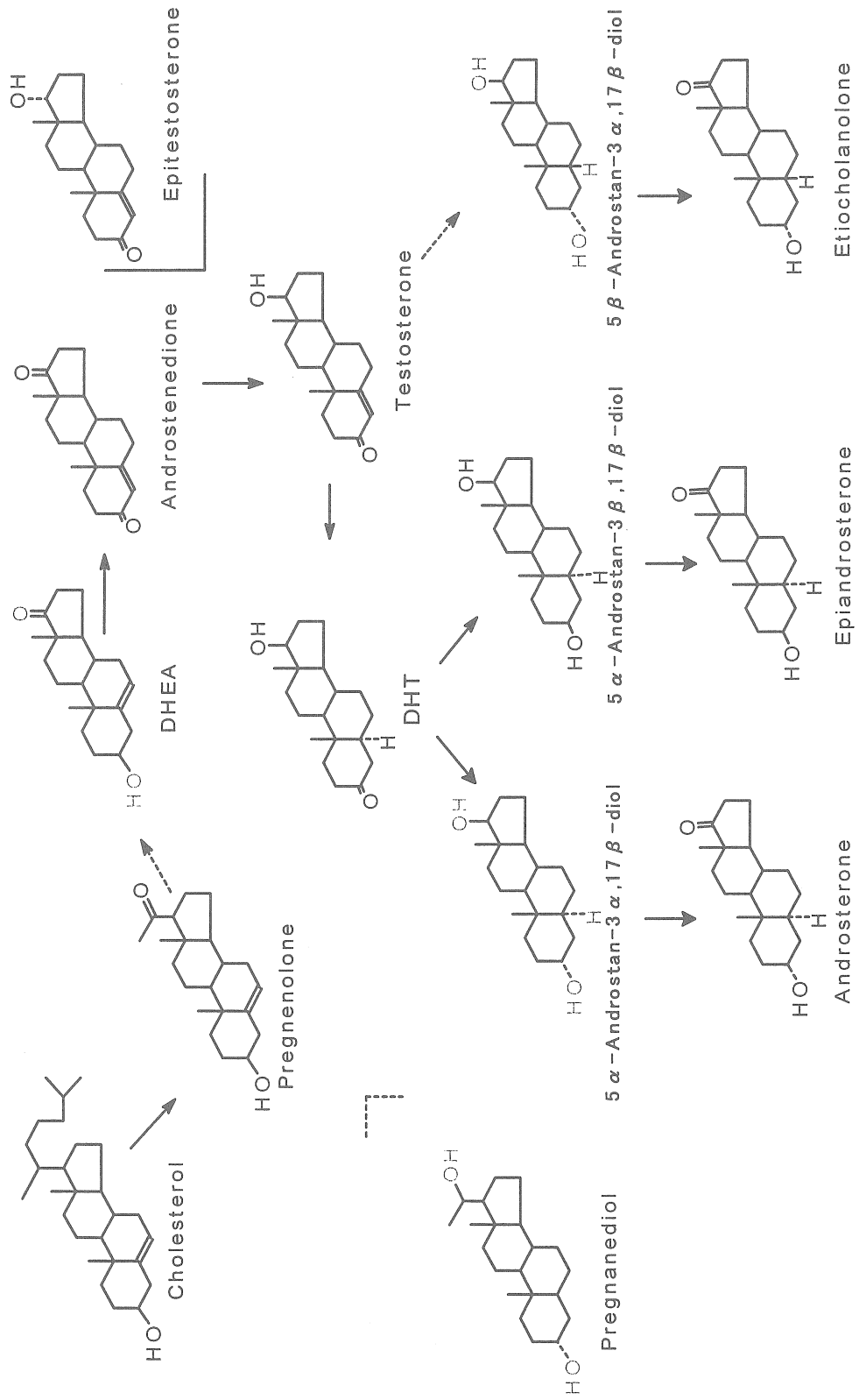


Fig 3 Metabolism of hormone precursor into androgens

表2 市販化学合成ステロイドの δ 値

化合物	メーカー	δ 値
Pregnenolone	東京化成工業	-30.5
4-Androstene-3,17-dione	シグマ	-28.7
Dehydroepiandrosterone	和光純薬	-34.1
Testosterone	東京化成工業	-28.4
Dihydrotestosterone	東京化成工業	-28.1

値はおよそ-30前後と報告されている。表-2に示した合成ステロイドの δ 値はそのことを裏付けるものであった。

この結果を日本人健常者の尿中ステロイドの炭素同位体比と比較するため、濃度測定による通常のスレロイド検査で異常を認めなかった日本人職員、男女各10人の随時尿中ステロイドの δ 値を求め表-3と表-4に示した。表-3の結果は、5 α -Androstan-3 α ,17 β -diolでやや広い分布を示したが、 δ 値はいずれの成分においてもおよそ-11から-23の範囲に収まり、成分間や男女間に有意の差は認められなかった。また、表-3に示したヒト尿中ステロイドの δ 値は合成ステロイドの δ 値と比較し有意に低いことが確認された。食習慣などの影響によって個人差が生ずる可能性があるため、Shackletonらは男性ホルモン使用の影響を受けにくい内因性プレグナンジオールをリファレンスとして補正する事を提案している³⁾。表-4は表-3に示した δ 値の絶対値をP2の絶対 δ 値で補正した相対 δ 値を示す。各ステロイドのP2に対する相対値上限は、ステロイドの種類、性別に関わらず様に1前後の値を示した。この結果は、分子を構成する炭素原子の入れ替わりがない場合、代謝経路上で連続したステロイド間の δ 値の差が極めて狭い範囲に収束する事を示している。以上のことから、合成ステロイドの使用により、尿中ステロイドの¹³C含量が低下するものと推測され、CIR測定により化学構造

が全く同じステロイドであっても体内で分泌された生理的なものであるか、あるいはドーピングによって摂取された体外由来のものであるかが判別できると期待された。

この仮定を検証するため、予備試験としてそれぞれアンドロステジオン、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)、テストステロン、ジヒドロテストステロンのいずれかを自主的に服用したボランティアから服用前、および服用3日後までの随時尿を個別に提供願う尿のCIR分析をおこなった。(表-5)

ステロイドを投与した場合、代謝経路が不可逆的であれば投与されたステロイドによる炭素同位体比への影響は下位のステロイドに及ぶと考えられる。表-5に示したように、DHEA投与後の尿では、代謝上で上下関係のないP2を除く測定対象すべての成分において δ 値の低下が観察された。一方テストステロン投与後では、DHEAの δ 値には有意の変化がなく、その下位ステロイドである5 α -、5 β -アンドロスタンジオールの¹³C含量のみが低下した。同様にして、(5 α -)ジヒドロテストステロン投与後の尿では5 β -アンドロスタンジオールの¹³C含量には有意の変動はなく、5 α -アンドロスタンジオールのみ¹³C含量の低下が認められた。5 α ステロイドと5 β ステロイドの相互変換は起こらないことが、ジヒドロテストステロンの安定同位体標識化合物を用いた我々の実験で既に確認されているが⁶⁾、この結果からもその事実が確認され

表3 尿中ステロイドの δ 値の分布

ステロイド	n	平均	平均±SD	性別
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	10	-19.0	-17.2~-20.8	男
	10	-18.6	-16.6~-20.6	女
	20	-18.8	-17.0~-20.6	男女
5α -Androstan- 3α 、 17β -diol	10	-16.4	-11.0~-21.8	男
	10	-15.5	-10.7~-20.3	女
	20	-15.9	-10.9~-20.9	男女
5β -Androstan- 3α 、 17β -diol	10	-19.0	-15.4~-22.6	男
	10	-17.5	-12.1~-22.9	女
	20	-18.3	-13.7~-22.9	男女
Pregnanediol	10	-20.6	-18.8~-22.4	男
	10	-20.0	-19.0~-21.0	女
	20	-20.3	-18.7~-21.9	男女

Unit: δ $^{13}\text{C}\%$

表4 尿中ステロイドの相対 δ 値の分布 (P 2補正)

ステロイド	n	平均	平均±SD	性別
DHEA / P2	10	0.92	0.86~0.98	男
	10	0.93	0.85~1.01	女
	20	0.93	0.85~1.01	男女
5α -Androstan- 3α 、 17β -diol / P2	10	0.79	0.53~1.05	男
	10	0.78	0.54~1.02	女
	20	0.79	0.55~1.03	男女
5β -Androstan- 3α 、 17β -diol / P2	10	0.92	0.76~1.08	男
	10	0.88	0.64~1.12	女
	20	0.90	0.70~1.10	男女

表5 テストステロン関連物質の服用による、尿中ステロイドの¹³C含量の変動

	DHEA	5 α -A ₂	5 β -A ₂	P ₂
アンドロステンジオン投与	-19.8	-26.8	-24.3	-13.9
対P ₂ 比	1.42	1.93	1.75	-
DHEA投与	-23.9	-24.0	-25.1	-17.5
対P ₂ 比	1.37	1.37	1.43	-
テストステロン投与	-17.3	-21.8	-24.5	-16.8
対P ₂ 比	1.03	1.30	1.46	-
ジヒドロテストステロン投与	-18.2	-27.3	-17.5	-18.3
対P ₂ 比	0.99	1.49	0.96	-

た。これらの結果から、アンドロステンジオン投与後の尿においては下位ステロイドである5 α -、5 β -アンドロスタンジオールの¹³C含量の低下が予想されるが、表-4の結果では、それらに加え、上位に位置するDHEAの¹³C含量の低下も観察された。この点については今後例数を増やして確認の必要があるが、DHEAからアンドロステンジオンを生ずる3 β -水酸化ステロイド脱水素酵素と5,4-ene-ステロイド異性化酵素による代謝経路が可逆反応であるために、投与されたアンドロステンジオンの一部がDHEAに代謝されたためであると考えられる。

DHEA投与時にみられたDHEAの δ 値の低下は5 α -、5 β -アンドロスタンジオールのそれと同程度かより大きいものに対して、アンドロステンジオン投与時にみられたDHEAの δ 値の低下は小さいので、従来法によるステロイドプロファイルを併せて考慮すればDHEAドーピングとアンドロステンジオンドーピングとの区別は可能と考えられる。以上の結果を踏まえ、従来のステロイドテストでは判定が困難であったDHEA疑いの例3例についてCIR分析を行い、ステロイドを使用していないことが予め確認されているDHEA高排泄者の尿の分析結果と比較した。(表-6)

表は4例について炭素同位体比を測定した

結果を示している。

症例1はテストステロンのドーピング判定基準であるT/ET比が許容値の6を超えた例で、2回の異なる日に採取された尿試料のT/ETがそれぞれ12.2と9.7を示したが、その原因はテストステロンの高値によるものではなく、エピテストステロンの低値によるものであった。CIR分析の結果はいずれの成分においてもおよそ-16から-18と有意な¹³C含量の低下はみられず、P₂に対する相対 δ 値も約0.9から1.0の範囲で、異常は認められなかった。この結果からこの例は失格処分とせず、以後経過観察することとされた。

症例2および症例3は共に尿中DHEAが高値を示し、その濃度は症例2では2,419、症例3では7,477ng/mlであった。また症例2はドーピング検査の採尿時にDHEA使用を申告していた。それらの症例ではP₂を除くすべての測定対象成分で δ 値の低下が有意であり、DHEAおよびその代謝物の¹³C含量は内因性ステロイドのそれよりも低値を示した。比較のため、DHEA高排泄者の尿と比較したところ、DHEA高排泄者の尿では、対象成分の絶対 δ 値、相対 δ 値ともに異常はみられず、濃度と δ 値との間に相関はみられなかった。最終的に2例の結果はDHEAの使用によるものと判断され、陽性と見なされた。競技連盟に

表6 テストステロン関連化合物のドーピングが疑われた炭素同位体比測定例

上段: δ 値、下段: P_2 に対する相対 δ 値

	DHEA	5α - A_2	5β - A_2	P_2
高DHEA排泄者	-18.2	-17.7	-16.4	-15.8
	1.15	1.12	1.04	—
症例1 (男子): 1st. OOCT	-17.7	-15.7	-17.2	-18.2
	0.97	0.86	0.95	—
	-17.8	-18.2	-15.7	-18.3
	0.97	0.99	0.86	—
症例2 (男子)	-25.4	-23.8	-22.7	-14.6
	1.74	1.63	1.55	—
症例3 (男子)	-30.3	-26.7	-28.6	-15.7
	1.93	1.70	1.82	—

よる調査の結果、これら症例による DHEA の使用が確認された。

5. ま と め

生体内では、男性ステロイドは食物のコレステロールを原料としてコレステロール側鎖切断酵素によって炭素数21のプレノロンへと変換され、以後炭素数21のコルチコステロイド類と炭素数19の男性ステロイド類へと代謝される。男性ステロイドは更に芳香化酵素であるアロマターゼによって19位の炭素を失うと同時にステロイドのA環が芳香化し、炭素数18のエストロゲンへと進む。これらの生合成経路で炭素を失う代謝は基本的に不可逆であり、さらにC19ステロイドの代謝過程において炭素原子の入れ替わりは起こらないので、体内で生合成された男性ステロイドの炭素同位体比はきわめて安定に一定に保たれると考えられる⁵⁾。

男性ステロイドの炭素同位体比を変化させる要因として想定されるのは、主としてエステル体を含む外部からのステロイド投与と、¹²C化合物と¹³C化合物とで代謝速度が違うために生ずる同位体効果および、長期にわたる偏食や菜食によって体内ステロイドのプールが入れ替わる事であると考えられる。それらの要因のうち急激な炭素同位体比の変化をも

たらすのは男性ホルモンまたはその前駆体の投与である。

一方ステロイドの濃度およびステロイド間の比率によって判定する従来の判定方法では、ホルモンのホメオスタシスを前提に、その恒常性からはずれた生理的にあり得ない変動であることを証明する事によってドーピングの判定が行われる。この方法は今でも有力な判定方法として、特にテストステロンおよびジヒドロテストステロンの陽性判定に用いられているが、尿中へのステロイド排泄におよぼす多数の因子の影響を受け、更に最近になって多量に流通し始めた男性ホルモンの前駆体の服用によってテストステロン使用の痕跡を消したり、判定を困難にするなどのドーピングも行われるようになったため、それらへの対応には限度が出てきた。

わが国では、生理的なテストステロンの高排泄や腎におけるクリアランスによってテストステロンの陽性判定基準を超える基礎値を持つ症例があることが医学的に報告されており、このような症例をドーピング事例から除外するため、以前から競技外ドーピング検査による平常時のデータ蓄積や追跡調査によって慎重に対応されてきた。我々の統計は日本人には生理的テストステロン高排泄以上の頻度でDHEA高排泄者がいることを示しており、

現在アメリカを中心に広がっている DHEA ドーピングの判定上大きな問題となることが考えられる。

炭素同位体比によるドーピング判定法は、現在実用レベルにある最も有力な生理的ホルモンによるドーピングの判定法であり⁷⁾、長野オリンピックにおいて実施された我々の検査をきっかけに、ドーピング判定方法の基準の一つとして本年度の IOC ドーピングリストにも正式に追加された。この方法による検査では、単にドーピングの陽性判定を行うばかりでなく、内因性ステロイドによるステロイドの生理的変化とドーピングによるステロイドの異常とを区別できるので、近い将来必須のドーピング検査手法としてすべての IOC 検査機関に配備されるであろう。

今後の課題は、日本人以外の正常者の炭素同位体比測定例数を増やして基礎データの充実を図るとともに、ステロイド使用時の変化を更に調査し、日々増加し続けている他の男性ホルモン前駆体に検査対象範囲を広げることである。

今後長野オリンピックでドーピング検査対象となった全選手の炭素同位体比を詳細に調査して行く計画である。

6. 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) Axelson M., Sahlberg B.L. and Sjovall J.: J. Chromatogra., 224, 355-370 (1981)
- 3) Schakleton C.H. et.al., Steroids, 62, 1-9 (1997)
- 4) Jones D.M. et.al., Biol. Mass Spec., 20, 641-646 (1991)
- 5) 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)
- 6) Ueki M., Okano M., Toxin Reviews, 18(2), (1999) Accepted for publication.

植木眞琴：衛生化学44(2), 21-28 (1998)

海外出張報告

本研究期間中以下の海外出張を実施した。

＜ドーピング分析に関するケルンワークショップ発表（3月14-20日：現地）ドイツケルン体育大学，ケルン市＞

参加者：植木眞琴

本ワークショップは、現在のIOC医事委員会におけるドーピング対策の基礎を築いた故マンフレッドドニケ教授がIOC公認ドーピング検査機関の技術交流とレベルアップのために創設した年次技術会議である。ドニケ氏が第十三回を最後に逝去して以後はマンフレッドドニケワークショップという名前になって引き継がれ、今年で第十七回になる。

近年アジア地区において大規模総合スポーツ大会が開催される機会が増え、アジア地区においてもIOCの認可取得を希望する機関が増えており、それら機関の認定準備の情報収集の場としても大変重要な役割を担うに至っている。既に最初の認定取得後14年を迎えた我々にとっても、近年の急速な技術進歩や、新しいドーピング物質の流行に併せて常に技術改良を進めてゆく上では参加不可欠のワークショップである。

今回我々は昨年のワークショップで速報として発表した炭素同位体比の測定による生理的男性ステロイドを用いたドーピングの検出方法に続いて、日本オリンピック委員会スポーツ医・科学研究として行った本研究の成果について発表した。昨年のワークショップでは、炭素同位体比測定に関する研究発表はケルンと東京（我々）の2カ所からの発表のみであったが、今回は6題の発表があり、今回のワークショップの最も重要なトピックスの一つとなった。

今回のワークショップの主なトピックスは以下の通りである。

1. 新しいドーピング物質

PFC：perfluorocarbons

HES：hydroxyethyl starch

これらは静脈内投与によって血漿量を増やし、熱交換を高めるなどの目的で乱用され、EPOの検出法の一つである血液中Hbやヘマトクリットの上昇をごまかす隠蔽剤の一種としても用いられると言われている。特にHESはヨーロッパ選手権で優勝したドイツの陸上選手が大会時での使用を認めた事が報道されるなど話題になっている。

HESは我が国においても失血時の低血圧防止など、緊急時の使用が認められているが、健康人が使用することはあり得ないので、いずれドーピング物質に指定されるであろう。

2. 大麻の測定方法

長野五輪でオリンピック選手による大麻の使用が問題になり、社会で使用されるいくつかの乱用薬物検出についての報告があった。これらについては、我々は既に技術を確立しているので省略する。

3. DHEAなどのドーピング

デヒドロエピアンドロステロンは、既に本研究報告でも述べた通り、副腎で分泌され、体内でテストステロンに代謝される男性ホルモン前駆体である。近年この種の前駆体の栄養補助食品としての販売がアメリカ国内で黙認されるようになり、全世界に爆発的に広がっている。DHEAの問題として、生体内物質でありドーピングの証明が難しい、テストステロンよりも高頻度で高排泄者があるため、濃度の正常範囲が決められないなどの問題が残されている。

このセッションでは従来のステロイドプロファイルに対するDHEAやアンドロステンジオン服用の影響について議論されたが、使用の痕跡は検出できても、通常の方法ではドー

ピングの証明は困難であるという結論であった。やはり男性ホルモン前駆体のドーピング判定には、炭素同位体比の使用が今後必須になるであろう。

4. ドーピング物質の生体内分泌

分析の高感度化に伴い、いくつかのドーピング物質が体内でも造られることがわかってきている。すなわち、ナンドロロンの代謝物 19-ノルアンドロステロンは妊婦尿にごく微量排泄され、また合成黄体ホルモン剤のノルエチステロン服用時の代謝物としても検出される事がある。このことから、ナンドロロンを使用している男子選手が外因性であるとの証明がされていないとの訴によって無罪を主張するケースが発生している。選手の側から依頼を受けたバリの非 IOC ラボが、アンドロスタンジオールを服用すると尿中に 19-ノルアンドロステロンが検出されるという報告を行ったが、分析方法の詳細について明らかでなく、4カ所の IOC ラボから「自分達の検討結果では検出されなかった」という反対意見が出され、信頼性の面ではほかの分析機関の総攻撃を受けた。さらに、同じ物質に関して選手から異議を唱えられている IOC のローザンヌラボが本ワークショップのアワードに選ばれるなど、波乱含みの展開であった。

現在のところ判定に際して以下の点を考慮する事とされている。

- 男性での尿排泄は現在の検出感度以下である。
- 女性の場合、妊娠の有無を hCG または プレグナンジオールの上昇によって確認する。
- ノルエチステロンの使用は従来通り申告の有無を確認すると共に、代謝物の検出によって申告の真偽を確認する。

5. 炭素同位体比質量分析法 (CIR)

CIR 分析が実施できる検査機関は長野五輪

以後 6カ所に増加し、近日中にさらに 2カ所増える見込みである。また、新たに IOC の認定を受けようとする新規のラボに対しては必須の装置であるとして、最初から配備されるため、昨年認可を受けたペナン(マレーシア)とバンコック(タイ)は既に配備を完了している。しかし、その 2カ所で実施されている方法は(ソフトウェア)は長野五輪後にバルセロナで開発された簡易法であり、スクリーニングとしては利用可能であるが、確認分析としては別途我々が実施しているような分析を追加して行わなければならないという問題は残されている。我々の発表内容については本研究報告で詳しく述べたので省略するが、この分野はドーピング検査技術の一つとして、さらに重要な位置をしめることになるう。

6. 遺伝子組み替え成長ホルモン

ドニケの生前に IOC 医事委員会は GH2000 というプロジェクトを発足させ、シドニー五輪に向けて成長ホルモンのドーピング撲滅を目指してきた。今回イギリスのショクセン博士らによる研究の成果が初めて明らかになった。

ショクセンらの方法では、GH 投与によって変動するパラメータとして IGF-1 (インシュリン様成長因子-1)、IGFBP2 (IGF 結合蛋白 2)、IGFBP3 (IGF 結合蛋白 3)、オステオカルシン、ALS (アルカリフォスファターゼ) などの血液中濃度を測定する。

これらの値の多変量解析により、GH の使用後 20日程度まで検出できるという。この方法は多種類の検査を行う点で問題が残されているが、ミュンヘンのストラスバーガーによる発表はより簡潔で理解しやすいものであった。この方法では、血液中の総 GH 濃度と遺伝子組替体の GH-22KD とを測定し、22KD の比率が増えていけば陽性とするものである。弱点は、日本の三井製薬が開発を終え、現在臨床試験が進行中の GH-20KD 遺伝子組換体

のドーピングが検出できない可能性がある事である。三井製薬の製品が発売になると少なくとも総 GH, GH-20KD, GH-22KD の 3 種類の測定が必要になる可能性がある。

7. IOC 公認検査機関責任者会議（2 回）

主な議題は、2 月のローザンヌ国際アンチドーピング会議における「反ドーピングに関するローザンヌ宣言」、次々に開発される新しいドーピング手法に対抗するための検査機関の対応（情報伝達と法的対応に関する連携）、および技術の融和と標準化である。

第一点目については既に JOC から和訳が配布

されている。

第二点目については新たに IOC 公認ドーピング検査機関間のインターネットメーリングリストが開設され、新しい情報をタイムリーにやりとりできる体制が構築されることとなった。（現在試験中である）

第三点目については 3 ヶ月以内に国際アンチドーピングエージェンシーが召集され、第一回の会合がもたれる予定であり、現在ワーキンググループによる準備が進められている。IOC はこのための資金の拠出を宣言しているが、あらゆる面で財政・組織建て直し中の IOC としては、今後とも紆余曲折が予想される。