

# 平成元年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

## No.VI 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

### —HCGによるホルモンドーピングを主体として—

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 菱 木 順 子 高 橋 紋 子 栗 本 文 彦

#### 〔はじめに〕

テストステロンは1982年から国際オリンピック委員会 (IOC) のドーピング薬物リストに禁止薬物として収載されるようになった。それまでいくつかの合成蛋白同化ステロイド剤がいわゆる筋肉増強剤として禁止され検査されてきたが、ガスクロマトグラフ質量分析計の導入により内因性ステロイドとの区別が完全にできるようになり、検出率が飛躍的に向上した。以来、競技が近づくと合成蛋白同化ステロイドの使用を止めテストステロン製剤に切り替える選手が増加した。

テストステロンドーピングは尿中のテストステロンとその幾何異性体であるエピテストステロンとの比率、すなわち T/ET 比を指標として検出する方法がスポーツ界においては広く受け入れられ、実際にこれまで発見されたテストステロンドーピングのケースでは T/ET > 6 の条件を満たしている。このような方法により外因性テストステロンによるテストステロン尿中排泄量の増加が検出できるようになると、検査を逃れるためにいくつかの代用品が新たに使われるようになった。

ヒト胎盤性ゴナドトロピン (HCG) は92個のア

ミノ酸から成る  $\alpha$ -サブユニット、139個のアミノ酸から成る  $\beta$ -サブユニットの二つのサブユニットから構成される分子量約35,000の糖蛋白である。 $\beta$ -サブユニットは黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH) などの  $\beta$ -サブユニットと構造上の類似点が多く、 $\alpha$ -サブユニットが HCG を特徴付けている。生体内において HCG は母体の妊婦黄体を刺激して、妊娠維持に必要なホルモンの産生を刺激するとともに、男子性腺に働いてテストステロンの分泌を促進する働きを持つ。

このような理由から、HCG が新たにドーピング薬物として禁止リストに収載されることになった。

そこで、我々の研究班ではテストステロンドーピングの判定におよぼす HCG の影響を調査すると共に、関連するホルモンの変動、HCG の検出方法等を中心に考察した。

また、最近話題になった蛋白同化ステロイドで、今後使用されるケースが増えると予想されるフラザボールについて、ボランティアに投与実験を行ない、尿中に検出される代謝物の検索を行なった。

コルチコステロンについては、従来より行なっている高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるスクリーニングで検出できるかどうかの予備的な確認を行なった。

本研究班では平成元年度の研究テーマとして、以上3点についてドーピング検査という観点から検討したので報告する。

(HCG投与とテストステロンドーピングの判定について)

一般に、正常人男子にテストピロン・デポー250mgを筋注投与した場合、尿中テストステロン濃度は投与2～3日後に基礎値の3～5倍程度上昇し、以後2週間で徐々に低下して基礎値に復帰する事が知られている。この時、テストステロンはエピテストステロンへ代謝されないので、エピテストステロン濃度は生理的範囲の変動にとどまる。この様に、T/ET比は外因性テストステロンの尿中排泄を反映して推移するので、テストステロンドーピングの判定基準として用いられるようになった。

一方、テストステロンを直接投与する代わりに、HCG投与により内因性テストステロン分泌を促進させた場合にはエピテストステロンも同様に分泌されるので、T/ET比だけを判定基準とするドーピング検査を逃れられる可能性がある。

しかしながら、HCG 5,000Uを筋注した場合のテストステロン上昇は基礎値の2～3倍程度といわれており、しかも効果持続期間が短いため、テストステロン製剤の代用品としても期待するほどの蛋白同化作用は得られないので、今回我々は、T/ET比を変化させずにテストステロン濃度を上昇させるという目的だけでなく、テストステロン製剤を使用している選手がHCGを使用することによってT/ET比を正常化できるかどうかを確認すること、またそのようなドーピングを検出する方法について検討した。

(フラザボールについて)

フラザボールは第一製薬が世界で唯一の販売会社となっている蛋白同化ステロイドでミオトロン

の商標名で流通している。IOCの禁止薬物リストには具体例として記載されていないため殆ど注目されていなかったが、その構造がスタノゾロールと良く似た含窒素ステロイドである事と、ソウルオリンピックで失格となった陸上選手がスタノゾロールとフラザボールとを併用していた事が判明し一躍注目されるようになった。

今回、フラザボールの投与実験を行なって体内動態を解析し、新たに検査対象として追加した。

(コルチコステロイドについて)

コルチコステロイドの局所使用は、関節内注射などが条件付きで認められているが、精神昂揚作用を期待して全身的に大量投与されるケースなどが問題とされている。また、ACTHを使用して内因性コルチコステロイドを上昇させる事もコルチコステロイドドーピングと同じであると判定される。

コルチゾン、コルチゾール、トリアムシノロンアセトニドなどはカフェインの定量と同時にHPLCで検出できるとの報告があるため、カフェインのスクリーニング法(スクリーニングⅢ)にその検索対象としてコルチコステロイドを加えるべく実験を行なった。

## [方 法]

テストステロンとHCGの投与計画はBrooksらの方法<sup>1)</sup>を参考にした。日本で市販されているテストステロン製剤およびHCG製剤の中からエナント酸テストステロン(テストピロン・デポー250mg:日本シェーリング)および、胎盤性性腺刺激ホルモン(HCGモチダ5,000単位:持田製薬株式会社)を自ら志願したボランティアに投与し、尿中テストステロンおよびその関連ホルモンの体内動態を調べた。

尿中テストステロンおよびエピテストステロンは国際オリンピック委員会(IOC)医事委員会に認められた方法によりガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)で測定した。また、その他の関連ホルモンは固相免疫放射測定法(IRMA)または時間分解蛍光法(TR-FIA)によって測定した。

(HCG の測定方法について)

HCG の測定は主としてヨードの放射性同位体である<sup>125</sup>I でラベルされた HCG をトレーサーとして用いる RIA によって測定されてきたが、RIA では放射性同位元素を用いるための特別な管理区域や廃液処理設備が必要であり、また実験動物に免疫した抗血清、すなわち複クローン抗体の抗原抗体反応に基づいた測定であるために、構造上の類似点が多い他のペプチドホルモンの交叉反応を受けやすいなどの欠点があった。ドーピング検査として HCG の検査を行なう場合には非放射能測定であることが望ましく、しかも GC/MS 法の様に分子構造情報を反映する特異性の高い検査である事が望ましい。今回我々は、HCG の測定に、フィンランドのワラック社で開発された TR-FIA 法に基づいたデルフィア HCG 測定キット (ファルマシア) を用いた。

まず、被検検体中の HCG を抗 HCG 単クローン抗体に結合させた後、ついでユーロピウムで標識した第二単クローン抗体でサンドイッチした。ここに、キレート試薬を加えて標識抗体のユーロピウムを遊離させるとともに、溶液中に Eu-キレート形成し発蛍光体とした。この蛍光を、励起波長 340nm、測定波長 615nm で 1 秒間に 1,000 回の時間分解蛍光測定を行ない、標準試料の蛍光強度との比較から濃度を求めた。この測定に用いられている抗体はいずれも抗 HCG マウス単クローン抗体であり、しかも HCG の二つのサブユニットを挟み込んで結合するサンドイッチ法で測定を行なうため、従来の複クローン抗体 RIA に比べ LH, FSH, TSH など構造の類似した他のペプチドホルモンの影響を殆ど受けないという点で優れている。

(LH, FSH の測定方法について)

LH, FSH の測定法は HCG 同様  $\beta$ -サブユニットの構造の類似性による交叉反応を受けないことを条件に第一ラジオアイソトープ研究所のものを選択した。LH の測定はスパック-S LH キット、

また FSH の測定はスパック-S FSH をそれぞれもちいた。いずれのキットも第二抗体が<sup>125</sup>I でラベルされており、放射能によって定量する点を除けば、HCG とほぼ同じ手順で検査が行なわれる。すなわち抗 LH (FSH) 単クローン抗体を固定化した試験管に試料中の LH (FSH) を結合させ、次いで<sup>125</sup>I 標識第二単クローン抗体を反応させ、結合した第二抗体の放射能を測定することによって LH (FSH) を定量した。

(フラザボールおよびコルチコステロイドの測定について)

フラザボールの投与尿は従来より行なっているステロイド検査、すなわちスクリーニング-IV<sup>2)</sup>に準じて前処理を行ない、検出されたステロイドから代謝物を同定した。また、コルチコステロイドは標準品をカフェイン定量と同じ条件、すなわちスクリーニング-III<sup>2)</sup>で HPLC で測定し、次に正常人の 1 日蓄尿をもちいて内因性コルチゾン、コルチゾールの検出を試みた。

その他の測定方法で特に明記しない物は、すでに報告済で IOC 医事委員会に認められた方法による<sup>3)</sup>。

## 【結果と考察】

(テストステロン/HCG ドーピングについて)

テストピロン・デポー (エナント酸テストステロン注射液) 投与後引き続いて HCG モチグ (ヒト胎盤性ゴナドトロピン) を投与した場合の尿中テストステロン濃度 (T)、エピテストステロン濃度 (ET)、および LH, FSH, HCG の三種のペプチドホルモンの測定値を表-1 に示した。部分尿のため、T, ET についてはクレアチニン補正で尿希釈の影響を補正し、単位を  $\mu\text{g/gCRN}$  とした。これは、クレアチニン 1 g あたりのテストステロン排泄量を意味し、尿中へのテストステロン一日排泄量にほぼ比例する。

表-1 テストステロンドローピング判定に及ぼすHCG併用の影響

時間 hrs	T μg/gCRN	ET μg/gCRN	T/ET mole/mole	LH IU/l	FSH IU/l	HCG IU/l	T/LH n mol/IU
0.0	63.6	25.9	2.45	1.0	3.3	<1.0	270.0
9.5	79.5	17.9	4.43	1.0	3.7	<1.0	310.0
14.0	75.0	10.4	7.20	1.6	4.5	<1.0	225.0
24.0	117.8	17.0	6.94	2.0	9.7	<1.0	590.0
30.0	130.6	13.1	10.00	1.2	4.4	<1.0	500.0
33.0	216.0	13.9	15.50	0.4	0.4	<1.0	775.0
51.5	131.2	7.9	16.60	1.0	3.4	<1.0	830.0
58.0	160.3	16.5	9.73	1.2	3.4	157.0	891.7
71.0	127.9	26.8	4.77	1.2	5.0	214.0	1191.7
75.5	234.4	59.8	3.92	1.3	1.7	157.0	784.6
80.5	267.0	80.6	3.31	0.9	1.5	153.0	1177.8
104.5	242.9	76.7	3.17	1.0	2.6	153.0	1520.0
123.5	374.3	72.7	5.15	1.5	1.6	89.0	1133.3
243.0	111.5	20.9	5.33	0.6	0.9	2.0	266.7
384.0	15.2	3.0	5.00	0.6	0.9	<1.0	83.3

薬物を服用していない状態で再尿し、ただちにエナントテストステロン250mgを筋注した。続いて48時間後にヒト胎盤性ゴナドトロピン5000Uを筋注した。

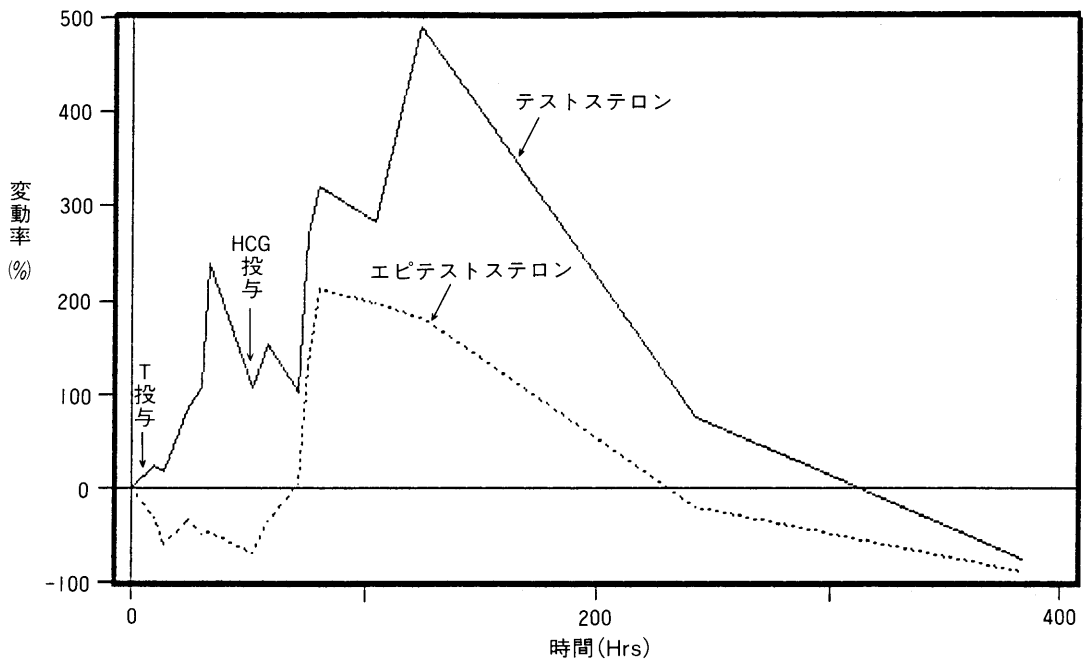


図-1 テストステロンドーピングのHCG投与による尿中T, ETの推移

T, ETの排泄量(図-1):

テストステロン投与後、Tは速やかに上昇し、24時間後に正常値の上限を越える事が観察された。一方、テストステロン投与ではETに増加は見られずむしろ低値の傾向を示したが、続いて48時間目にHCGを投与するとT, ETともにHCG投与の翌日より急激な上昇が見られた。図では吸収排泄曲線が比較しやすい様に基礎値を0とする変動率で示したが、テストステロン投与後2日間で観察されたTの上昇はテストステロン投与による外因性のものであり、その後のETの上昇はHCGの性腺刺激作用により、内因性エピテストステロンの尿中排泄量が増加したためであると考えられる。

HCG投与後Tが二峰性を示したのは、外因性テ

ストステロンに内因性テストステロンが重畳しているためと解釈できる。Brooksらの報告ではテストステロン投与とHCG投与との間隔は2週間で、T, ETとも基礎値に復帰した後HCGを投与しており、外因性テストステロンによるTの変動と内因性テストステロンによるTの変動とが明瞭に区別されている。一方我々の実験では、テストステロン投与後Tが高濃度を維持された状態でHCG投与を行なった場合の各ホルモンへの影響を調べたので、両者のTへの影響の区別が不明瞭である。これをより明瞭に区別するためには、同じボランティアに単独投与のクロスオーバー試験を行なって比較すれば良い。

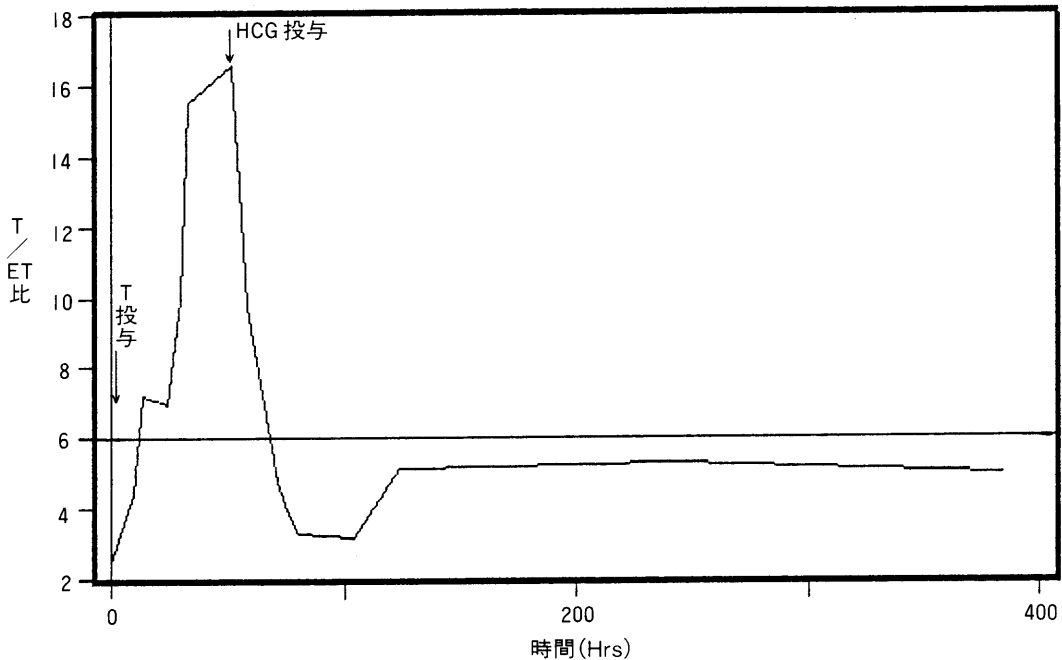


図-2 尿中T/ET比の推移

テストステロンドーピング判定への影響 (図-2) :

図-2は同じ投与実験でのT/ET比の推移を示す。図から明らかなように、T/ET比は外因性テストステロン濃度を反映して急激に上昇し14時間値では判定基準の6を越えている。その後、51.5時間には16.6まで上昇しているが、HCGの投与後、尿中にHCGが検出されるようになると急激に低下し、HCG投与の翌日以降は6以下で推移した。この様に、HCG投与ではテストステロン同様エピテストステロンの分泌も促進されるため、あらかじめ投与されたテストステロンによりTが上昇していたにも拘らずT/ET比は急激に正常化されることが観察された。

この事は、T/ET比だけをテストステロンドーピング検出の基準とした場合には、HCGの併用により検査を逃れる事が可能な事を示している。

テストステロンドーピングの判定に有用なもう一つの指標としてテストステロンとLHとの比率(T/LH比)が、Brooksらによって以前より提唱されている。LHは性巢の間細胞におけるテストステロンの生成分泌を促進するので、テストステロン分泌の重要な指標の一つとなる。

T/LHの正常比は男女共400以下であり、生理的な変動では400を越えることは殆どないので、テストステロンドーピング判定の補助的判定基準として400という値が使われている。

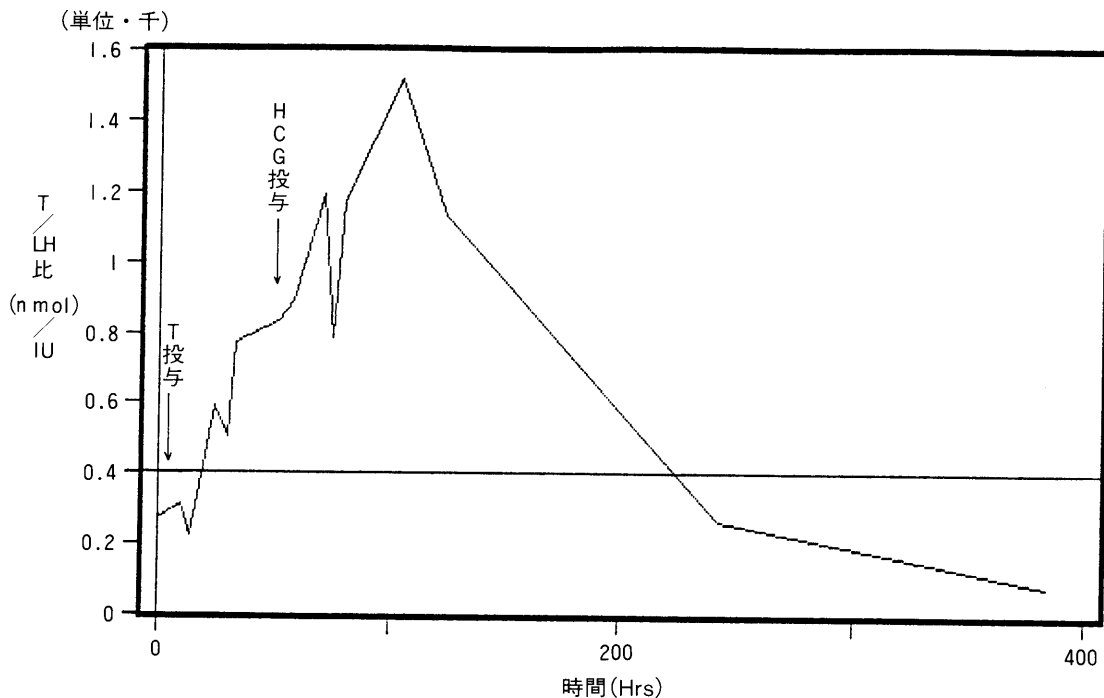


図-3 尿中 T/LH 比の推移

図-3には T/LH 比の推移を示した。テストステロン濃度が基準値上限を越える投与1日後には  $T/LH > 400$  となり、5日後をピークとして、およそ10日後には基礎値に復帰するのが観察された。また、この間 LH, FSH の有意な変動はみられなかった。従来、測定に用いる抗原によっては投与された HCG の  $\beta$ -サブユニットの交叉反応により、LH, FSH の測定値が高めの傾向となるが、今回用いた方法では表-1 に示した様に、抗体の交叉反応などの特異性の問題はなかった。

図-3から明らかなように、テストステロン投与であるか HCG 投与であるかに拘らず、Tが一時的に基礎値より有意に上昇している間は T/LH 比も高値となり、T/LH 比を指標とした場合には HCG の併用によってテストステロン使用の形跡を隠せない事が明らかであった。

HCG ドーピングは当然の事ながらもっばら男子選手によっておこなわれるが、Tが一層上昇するのでテストステロン濃度測定に際してはむしろ正常尿との区別が容易となると期待された。

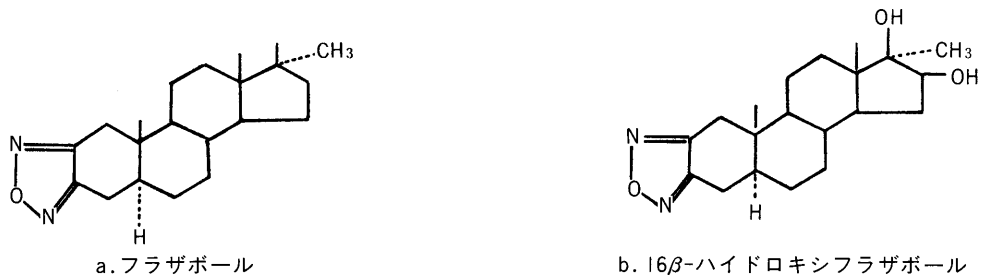


図-4 フラザポールとヒト尿中主代謝物の構造

(フラザポールの測定について)

フラザポールの投与実験は、健常男子のボランティアにミオトロン 1 mg 錠20錠を経口投与して行ない、以後 3 日間の随時尿について尿中代謝物の検索を行なった。前処理は従来より行なっているステロイド検査、すなわちスクリーニング-IV<sup>2)</sup>に準じて行ない、検出されたステロイドから代謝物を同定した。

フラザポールとその代謝物の構造式を図-4に示したが、未変化体は17位にメチル基を持つこと、アンドロスタン骨格A-環のC<sub>2-3</sub>位に、第五番目の環としてオキサジアゾール環を有し極性が高いという特徴を持つことから、スタノゾロールの場合と同じく遊離型ステロイドとして尿中へ排泄される可能性も考えられた<sup>4)</sup>。しかしながら、我々の実験結果では遊離画分への未変化体および当初予想されたような6β型の代謝物の排泄は、ほとんど認められなかった。β-グルクロニターゼによる加水分解を行なった後、その抱合型ステロイド画分の代謝物を種々検索した結果、モノヒドロキシ型代謝物が検出され、そのTMS誘導体のマススペクトルで検出されたD-環フラグメントより、16β-ヒドロキシフラザポールと推定された(図-5)。

この16β-ヒドロキシ体をターゲットとし、テストステロンやナンドロロンに代表される抱合型ステロイドのスクリーニングに組み入れ再度分析を行なった結果、投与後3日以上に渡って検出が可能であった。以上の結果より、フラザポールの検査は可能となった。

(コルチコステロンのスクリーニングについて)

コルチコステロンのスクリーニングが従来のカフェイン定量と同じ条件で測定可能か否かを確認するため、まず内因性コルチコステロイドとしてコルチゾンと、コルチゾールを、また合成コルチコステロイドとしてトリアムシノロンアセトニドを対象としてHPLCによるスクリーニング-IIIでの分析を試みた。

このとき、回収率確認のための内部標準物質の候補として、ドニケらの方法を参考にしてベタメサゾンを各試料に添加して分析した<sup>5)</sup>。

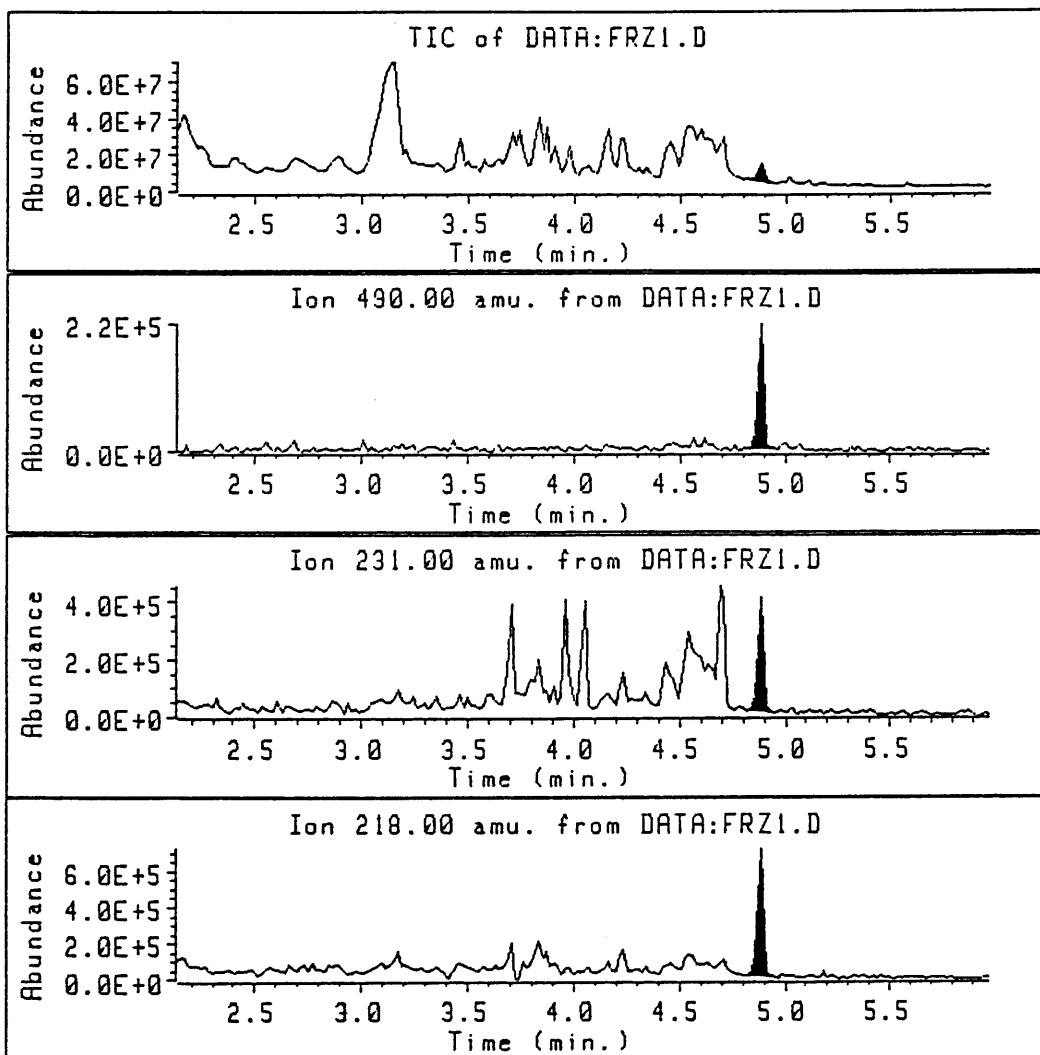
その結果、これら4成分は従来の条件をなんら変更する事なく分離することが可能で、検出波長としては246nmが至適波長であった。

カフェインの抽出条件でコルチコステロイドを抽出した場合の回収率はいずれの成分でも85%~100%であり抽出条件も変更の必要を認めなかった。

図-6は、標準混合物の分析結果を示し、また、図-7-8はそれぞれヒト尿にコルチゾンまたはコルチゾールを2 μg/mlの濃度で添加した試料の分析結果を示す。それぞれの添加回収率はコルチゾンで86%、またコルチゾールで87%を示した。

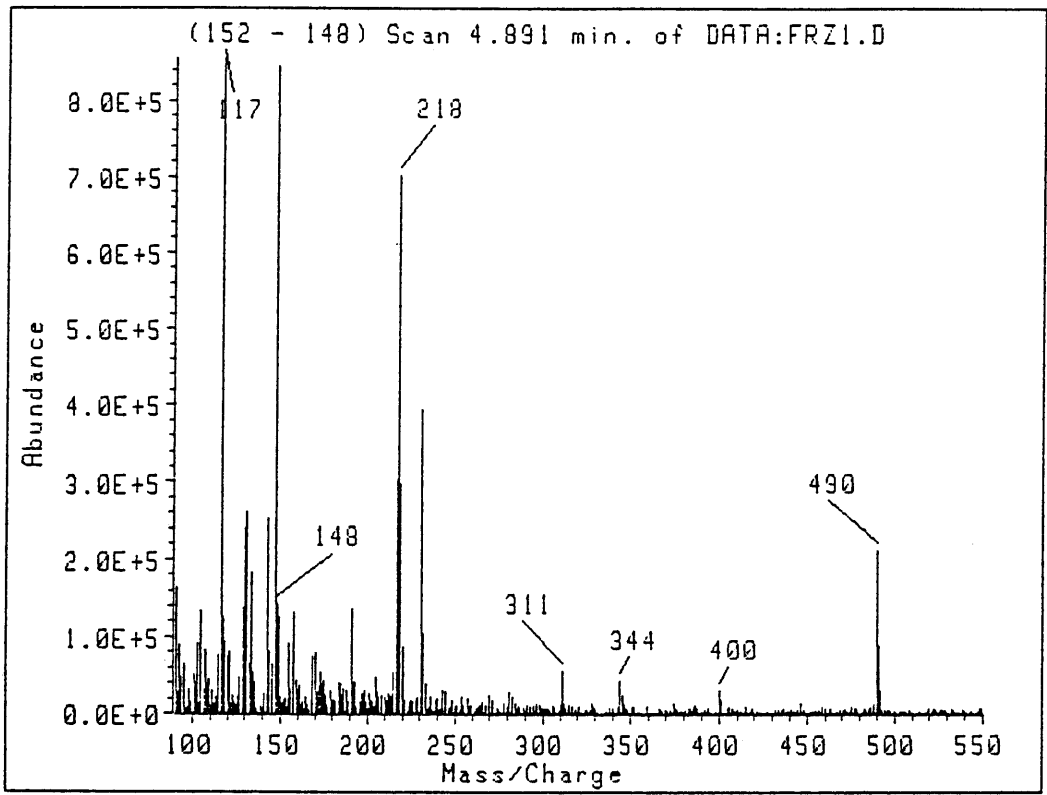
図-9には薬物未投与の正常男子から得た1日蓄尿の代表的な分析結果の例をしたが、コルチゾン、コルチゾールとも明瞭なピークとして検出されたものの、その定量値は10<sup>-4</sup>g/lのオーダーでHPLC法の感度としては必ずしも十分ではなかった。



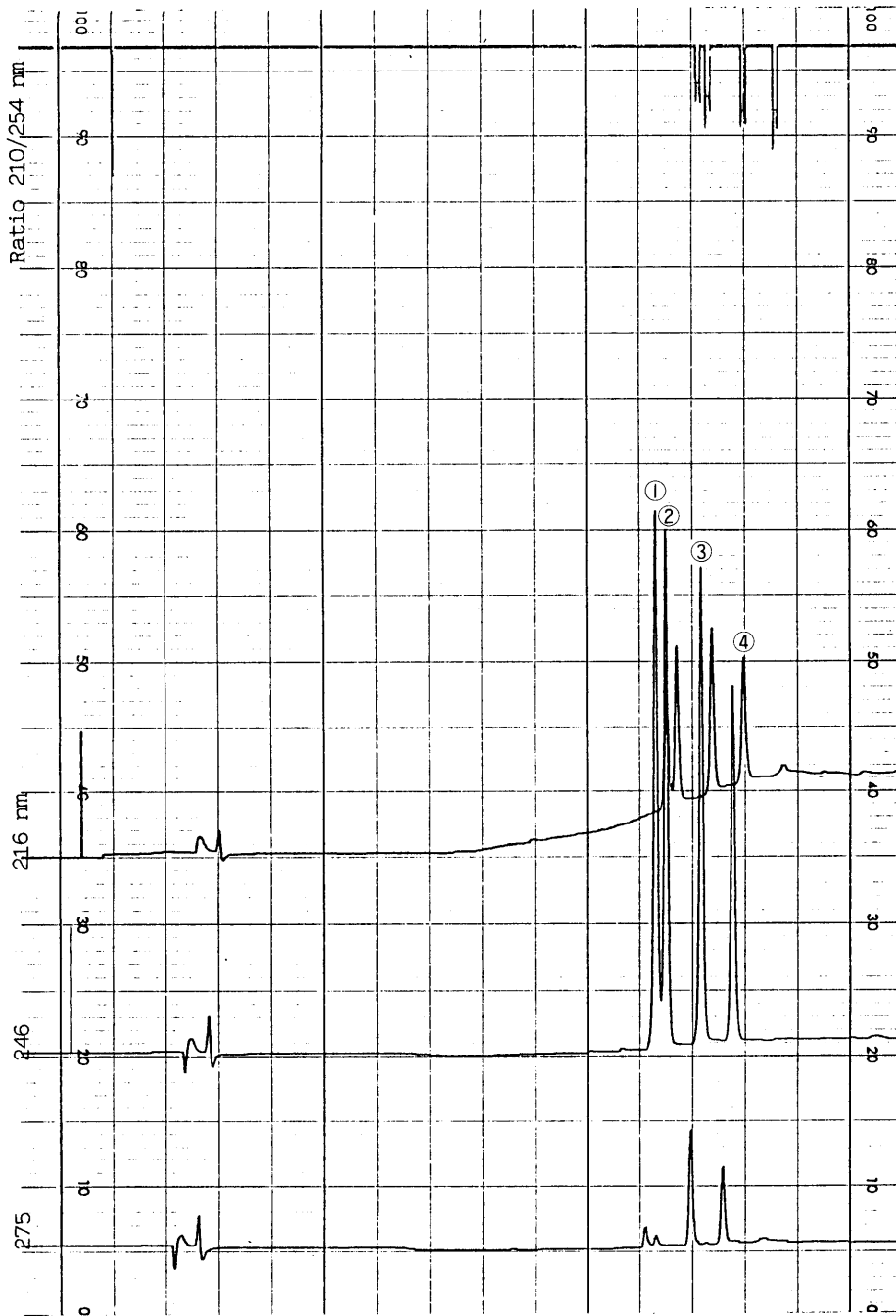


a. 投与尿のマスキロマトグラム(黒塗り部分が代謝物を示す)

図-5 フラザボール投与尿抱合型画分のGC/MSによる分析



b. 16 $\beta$ -ヒドロキシフラザボール bis-o-TMS 誘導体のマススペクトル



- ① ハイドロコルチゾン ② コルチゾン ③ ベタメサゾン(内部標準)  
 ④ トリアムシノロンアセトニド

図-6 HPLCによるコルチコステロイドの分析

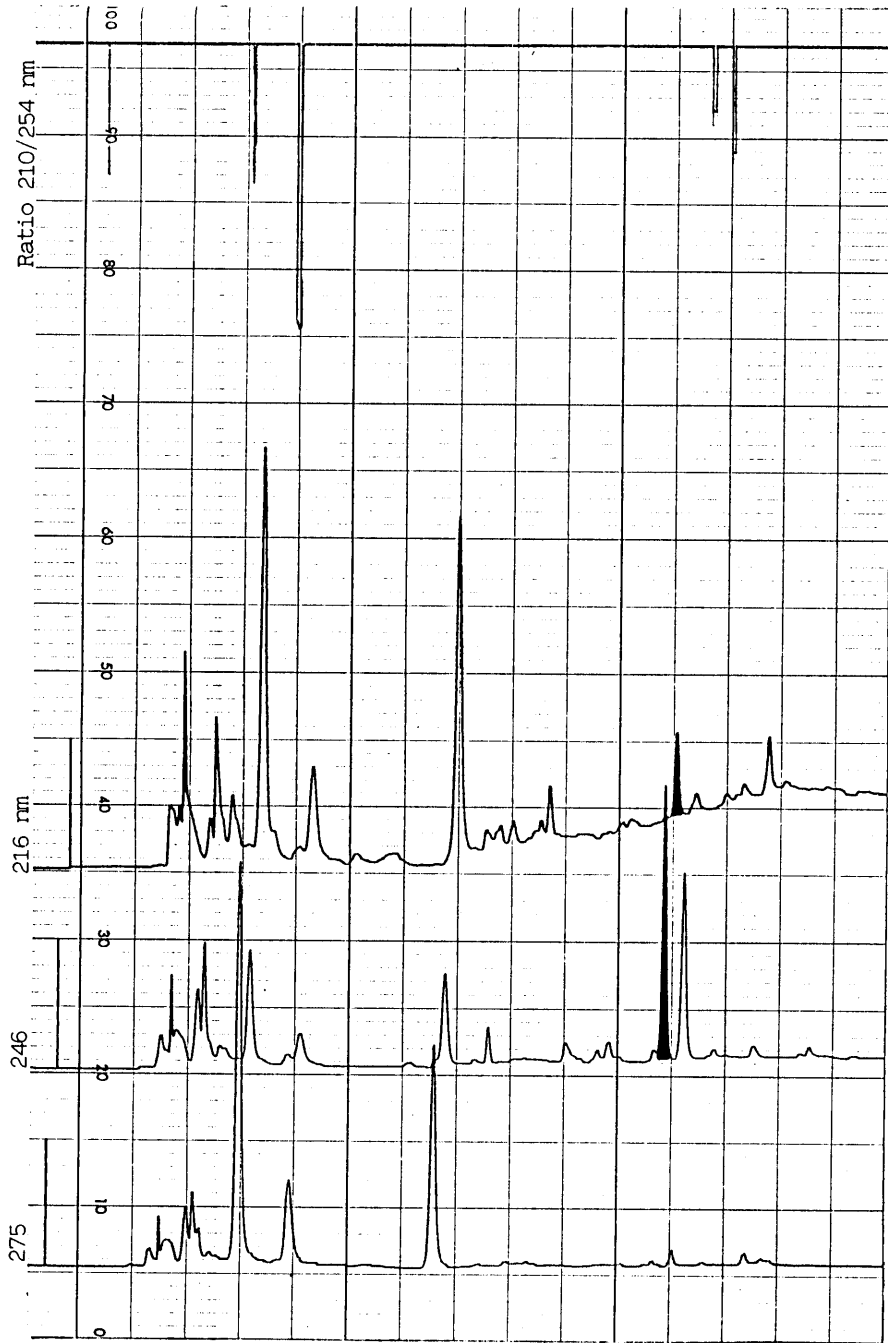


図-7 コルチゾン添加尿  
 (黒塗り)はコルチゾンを示す コルチゾン  $2 \mu\text{g/ml}$ )

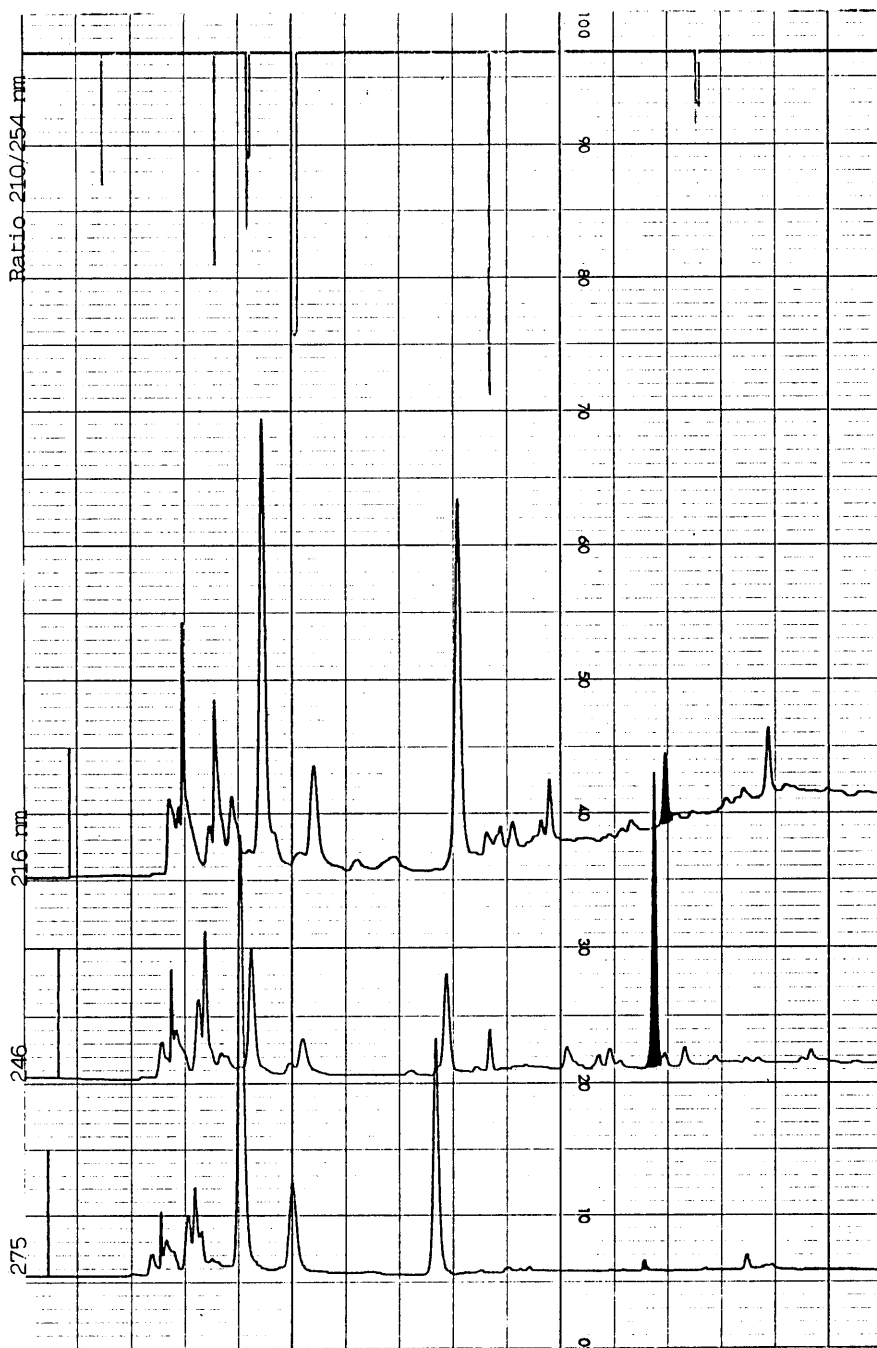
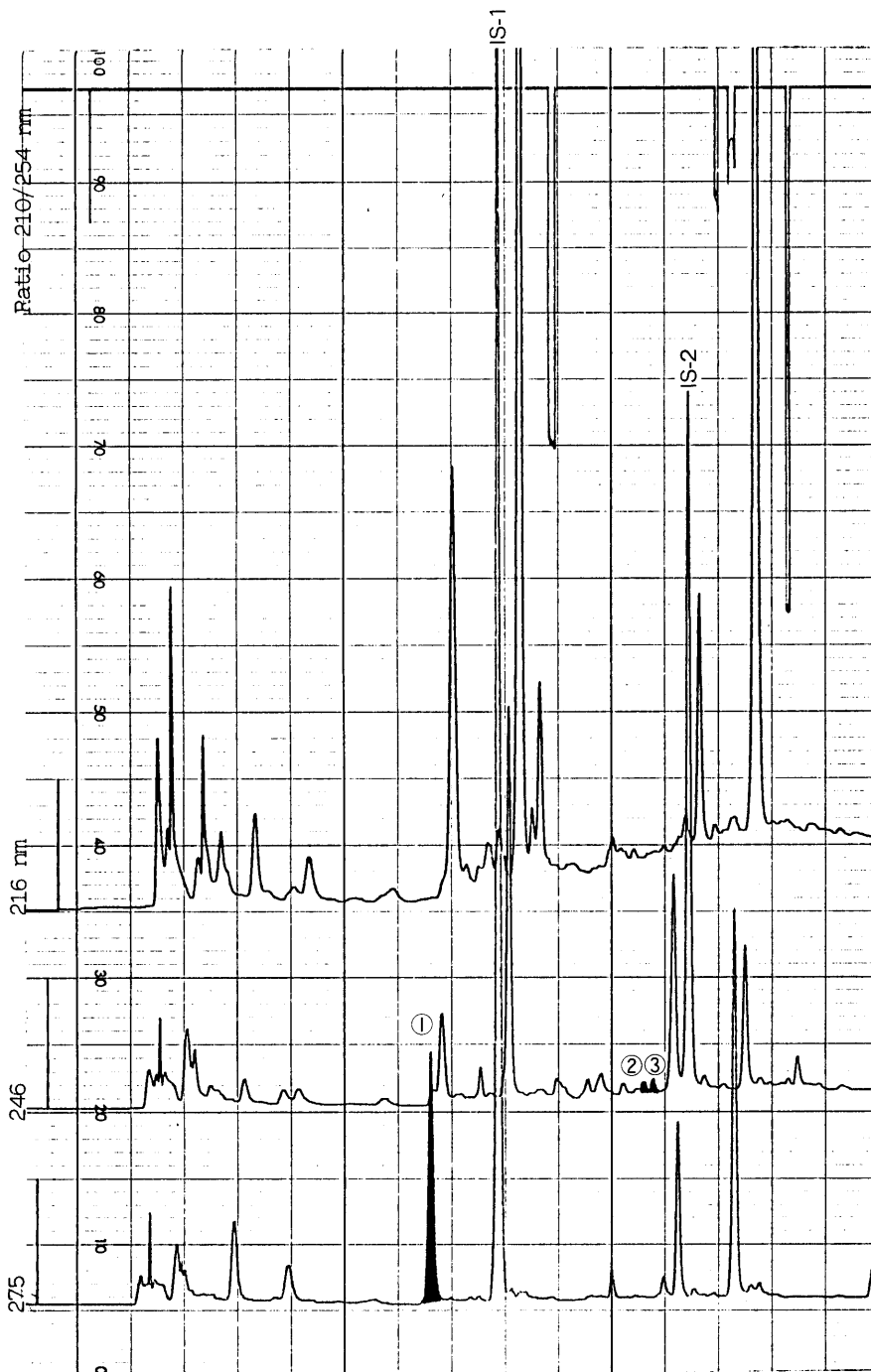


図-8 コルチゾール添加尿  
 (黒塗りはコルチゾールを示す コルチゾール 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )



①カフェイン ②ヒドロコルチゾン ③コルチゾン  
 IS-1(エチルテオフィリン)  
 IS-2(ベタメサゾン)

図-9 健康人1日蓄尿の内因性コルチコステロイド検出例

## [結 語]

以上、テストステロン製剤と HCG 製剤とを併用した場合のドーピング検査への影響を中心として、特にテストステロンドーピングの判定に関連して調査を行なった。今回投与と実験を実施できたのが一例だけである事、クロスオーバーテストでないため、おのおのを単独で投与した場合との違いについて明らかにできなかったなどの問題を残している。しかしながらそれらの点については、エピテストステロンを除き、内分泌学的興味や機能検査診断の面から数多くの報告がなされており、今回の実験データは予備試験としてそれらの報告と矛盾しない一応の成果を得ることができた。

多様化・高度化した最近のドーピングを反映し、T/ET 比やカフェイン濃度が判定基準近辺の値を示すケースが増えているといわれているが、公認検査機関では検査結果について分析上判定基準に照らしてどの様な分析結果であったかを報告するだけであり、選手が陽性であったか否かについてまでは判定しないので、最終結果の判断は通常は競技会実行委員会、IF、NF 等の医事委員会に委ねられる事になる。

現在 IOC が定めているテストステロンドーピング判定の最低条件は尿中 T/ET 比が 6 を超える事であるが、実際の判定に際しては様々な補助的指標を求め、テストステロンを使用したと十分な証拠が得られた場合にのみ陽性と判定される。テストステロンやペプチドホルモンの様に体内でも生合成される薬物の場合にはドーピングの判定に、より多くの時間を費やす事になる。

テストステロンの場合を例にとると、テストステロン濃度あるいは T/ET 比に異常があった場合、その異常が外因性テストステロンによるものであるか否かを判定するには、選手自身が再び摂取しない様な条件下で、少なくとも 2 週間程度は経過観察と内分泌機能を検査し、それがその選手の基礎値であるかどうかを調べなければならない。HCG

の併用によってテストステロンドーピングによる T/ET 比上昇が正常化できる事は、逆に HCG 負荷によって短時間でその T/ET 比の異常が改善されればテストステロンドーピングであると判定できる可能性を示している。

このように、生体成分を薬物として用いるドーピングに関しては、結果を解釈する上で基礎データを充実させてゆく事が重要であり、今後とも研究の対象として調査を継続する予定である。

## [文 献]

- 1) HCG Doping in Sport and Methods for its Detection. R.V. Brooks, S.P. Collyer, A.T. Kicman, G.J. Southan and M.A. Wheeler 2nd. World Symposium on Doping in Sport in Monte Carlo 5-7 June 1989.
- 2) 利尿剤の検査方法, および  $\beta$ -ブロッカーの体内動態に関する研究を中心として。昭和62年度日本体育協会スポーツ科学研究報告: 中野義彦, 植木眞琴, 藤崎誠, 永野玲子, 菱木順子: 財団法人日本体育協会スポーツ科学委員会発行
- 3) IOC スクリーニング法によるドーピング薬物の検査方法。昭和59年度日本体育協会スポーツ科学研究報告: 上館民夫, 植木眞琴, 藤崎誠, 岩淵仁美, 岩間玲子: 財団法人日本体育協会スポーツ科学委員会発行
- 4) Furazabol の吸収, 分布, 排泄および代謝産物について。立沢晴夫, 竹越敏夫, 長南光治, 秋元健, 笠原明: Clinical Report Vol.4 No.10 Oct. '70
- 5) Dope Analysis M. Donike, H. Geiyer, A. Gotzmann, M. Kraft, F. Mandel, E. Nolteernsting, G. Opfermann, G. Sigmund, W. Schanzer, J. Zimmermann 1st. World Symposium on Doping in Sport in Florence 10-12 May 1987.