

〈特集：第25回年次学術集会から〉

ドーピング検査の現状と将来

鈴木 秀典

Doping tests: Present and future

Hidenori Suzuki

Summary Doping jeopardizes the spirit of sport and is a serious challenge facing sport today. To promote the international harmonization of anti-doping activities, World Anti-Doping Agency provides uniform regulations of doping control, including the collection of urine and blood samples, laboratory analysis of prohibited substances and result management. The presence of prohibited substances in an athlete's sample constitutes anti-doping rule violation. Reliable analytical instruments and methods have proceeded advances in detection, measurement and interpretation in doping analysis. In addition, the longitudinal observation of biological markers in individual athletes, referred to as the Athlete Biological Passport program, has been launched to further detect and deter drug abuse. Development of novel analytical techniques in doping detection will make a further contribution to protecting 'clean sport'.

Key words: doping, doping analysis, prohibited substances

1. 緒言：世界共通のアンチ・ドーピング活動

アスリートが自己の競技能力を向上するために、薬物や方法を不正に使用することをドーピングという。古くは古代ギリシア時代から行われていたといわれている。近代オリンピック大会においては、1960年のロンドン大会自転車競技で薬物（おそらくアンフェタミン）を使用していた選手が、レース中に急死する事故が起きている。これを契機に、オリンピック大会では、1968年開催のグルノーブル冬季オリンピックおよびメキシコ夏季オリンピックからドーピング検査が開始された。ドーピング行為は、共通のルールの上で正々堂々と競い合うスポーツの根幹を揺るがすものである。それだけでなく、使

用した薬物がアスリートの健康に害を及ぼす可能性、さらにヒーローである一流のアスリートの行動を真似して青少年が薬物を使用する危険性など、その悪影響は広範囲に及ぶ。こうした世界共通のドーピング問題に対処するために、1999年に世界アンチ・ドーピング機構（World Anti-Doping Agency, WADA）が各国政府とスポーツ界によって設立された。WADAは、すべての加盟スポーツ団体に共通のルールとして、「世界アンチ・ドーピング規程」（World Anti-Doping Code）を作成し、これに基づいてドーピング検査から教育・啓発まで、幅広いアンチ・ドーピング活動を行っている。日本ではWADAの一員として、日本アンチ・ドーピング機構（Japan Anti-Doping Agency, JADA）が国内の活

動を担っている。

II. アンチ・ドーピング規則違反と禁止物質

検査配分計画から、検体の取り扱い、分析、そして不服申し立ての最終的な解決までの全ての過程をドーピング・コントロールと呼び、規程および国際基準に則って行われている。世界アンチ・ドーピング規程には、何がアンチ・ドーピング規則違反行為になるのか定められているが、その1つに、「生体からの検体に禁止物質が存在すること」という条項がある。すなわち、アスリートの血液や尿検体を分析することで、禁止物質を特定することが違反行為の証明となる。このためには、何が禁止物質であり、どのように分析するのが規定されている。「世界アンチ・ドーピング規程」の下に5つの国際基準が策定されており、その1つである「禁止表国際基準」(Prohibited List International Standard、以下、禁止表)に、禁止物質や禁止方法が具体的に記載されている。医薬品の開発技術は急速に進歩しているため、不正使用される新規薬物が次々と合成され、加えて検査をすり抜ける方法も開発されている。そのために、禁止表は少なくとも年1回改定されている。通常は毎年1月1日に当該年の禁止表が発効されるが、2014年は、さらに9月にも改定された。禁止表の日本語版および原本となる英語版は、JADAのホームページに掲載されている (<http://www.playtruejapan.org/>)。禁止物質および禁止方法は、1) 競技力を向上させる、又はさせ得る、2) 健康上の危険性を及ぼす、又は及ぼし得る、3) スポーツ精神に反する、これら3つの要件のうち2つを満たすと判断されるときに、禁止表に掲載することが考慮される。これに加え、禁止物質および禁止方法の使用を隠蔽する可能性があるものも、禁止表に掲載される。禁止表の特徴として、一部を除いた多くのセクションにおいて、禁止表に掲載されていない類似の化学構造あるいは類似の生物学的効果を有する物質も禁止物質として違反を問うことができるようになっている。

III. ドーピング検査における薬物分析

ドーピング検査は5つの国際基準の1つである「検査及びドーピング捜査に関する国際基準」に基づいて厳格に行われる。検体の分析はこれも別の国際基準である「分析機関に関する国際基準」に従ってWADAが認定した検査機関で行われ、検体分析とその管理の手続きに関しても規定されている。現在、世界で約30の認定分析機関がある。

検査方法は分析技術の進歩と共に大きく進化した、禁止物質の検出に貢献してきた。1972年のミュンヘン・オリンピックでは窒素選択的検出器を組み合わせたガスクロマトグラフィー(GC)が導入され、当時のドーピングで主流であった興奮薬の検出に貢献した¹⁾。1980年代に入ると四重極型質量分析計と連動したガスクロマトグラフィー(GC/MS)が登場し、蛋白同化男性化ステロイドの検出力が向上した。その後、赤血球を増加させるエリスロポエチンや筋力を増強させる成長ホルモンなどのペプチド性物質も不正使用されるようになり、等電点電気泳動、免疫ブロット法(immunoblotting)、あるいは放射免疫測定法(RIA法)(radioimmunoassay)などの手法も分析に取り入れられた。エリスロポエチン受容体活性化薬であるエポエチンベータベゴルは、慢性腎不全に伴う貧血の治療薬として2007年にヨーロッパで販売が開始されたが、WADA、製薬会社およびドーピング検査機関が一体となって販売以前に検出法を開発し、ドーピング使用に備えた²⁾。この結果、2008年の北京オリンピックで違反を見出している。また従来の検査は尿検体を用いていたが、輸血によるドーピング(血液ドーピング)などの検出のため、現在は血液検体も用いられている。

以下に、蛋白同化男性化ステロイドと成長ホルモンのドーピング検査における分析について例として取り上げて述べる。

a) 蛋白同化男性化ステロイド

蛋白同化男性化ステロイドを含む蛋白同化薬(禁止表のS1セクション)は、検出された違反が疑われる分析結果の約50%を占めている。蛋白同化男性化ステロイドは、骨格筋量の増大、筋力の増強、回復の促進あるいは闘争心亢進な

どを期待して使用される。特に、医薬品として承認されておらず、従来の分析法では検出されないように合成された化合物、いわゆる「デザインドラッグ」と呼ばれる物質は問題となってきた。社会的に大きく報じられた物質の1つが、テトラヒドロゲストリノン (THG) である。2003年、米国アンチ・ドーピング機関 (USADA) に匿名で使用済み注射器が送られてきた。分析の結果、注射器からTHGが同定された³⁾。THGは、当時標準的な蛋白同化男性化ステロイドの分析方法であったGC/MSでは検出できないように「デザイン」されていたため、これを受けて直ちに液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) による新しい分析法が確立された³⁾。THGを合成したBALCO社は、この他にも複数の禁止薬をアスリートに提供していたことがわかった。米国の陸上選手マリオン・ジョーンズは、BALCO社の薬物使用を認め、シドニーオリンピックで得た5つのメダルすべてを剥奪されている。この事件を端緒として、標的とした蛋白同化男性化ステロイド分析を補完する手段の必要性が認識され、その1つとして、non-targeted approachが導入された。すなわち、LC-MS/MSを用いて、蛋白同化男性化ステロイドで保存されている構造に由来する、特徴的で共通する生成イオンを検出する方法である。この方法によって、多くのステロイド誘導体をスクリーニングすることが可能になり、結果として、新たな化合物によるドーピングを摘発している⁴⁾。さらに、LC-MS/MS、GC-MS/MS、高分解能質量分析装置 (HRMS) などの技術を用いて、薬物使用后、長期間体内に残存する代謝物を測定することによって、禁止物質の検出可能な期間を拡げる手法もとられている⁴⁾。

蛋白同化男性化ステロイド分析では、体内で作られる内因性ステロイドが存在するため、体外から摂取した合成の内因性ステロイドと区別する必要がある。その方法の1つが、テストステロンのグルクロン酸抱合体と内因性のステロイドであるエピテストステロンのグルクロン酸抱合体との比 (T/E比) を尿中で検出する方法である。体外から内因性ステロイドが投与されるとT/E比が上昇するため、この変化を薬物使用の指標としている。しかしながら、日本人を含むアジア人ではテストステロンをグルクロン

酸抱合体に代謝する主要な酵素であるUDP-glucuronosyltransferase 2B17の活性が低いため、元々T/E比が低く、テストステロンを外因性に投与してもT/E比の基準値まで上昇しにくい⁵⁾。近年、より信頼できる分析方法として、同位体比質量分析法 (IRMS) が導入されている。合成ステロイドの多くは植物ステロールやその配糖体を出発原料として合成されているが、内因性ステロイドは動物性コレステロールに由来しているため、両者の炭素同位体¹³Cと¹²Cの含量比は異なっている。この炭素の同位体比に着目し、体外から摂取した合成ステロイドを検出している⁶⁾。

b) 成長ホルモン

成長ホルモン (GH) も蛋白同化男性化ステロイドと同様、筋力や闘争心の増強を目的としてドーピングで不正使用されている。内因性のGHとしては、主に22 kDaと20 kDaのアイソフォーム、およびその他の断片が血中で検出される。一方、外因性の遺伝子組換えGHは22 kDaのアイソフォームであるため、外因性に組換えGHを投与すると、22 kDaアイソフォームが血中で増加し、それに伴うネガティブフィードバック機構によって、内在性のすべてのアイソフォームが減少し、結果として、血中22 kDaアイソフォームの割合が上昇することになる。従って、22 kDaアイソフォームを特異的に認識する抗体とすべてのGHを認識する抗体を用いれば、両者の比の変化として外因性のGH投与を検出することができる⁷⁾。この他に、GHの投与に伴ってinsulin-like growth factor-1とprocollagen type IIIが変動することを利用し、これを生体指標としてRIA法を用いて測定する方法もとられている。2012年ロンドン・パラリンピックにおいて違反を摘発している実績がある。

IV. 新しい概念の検査： アスリートバイオロジカルパスポート (ABP)

ドーピングを企てるアスリートあるいはその関係者は、新たな物質を合成したり、巧妙な禁止物質の使用法を考えたりして、検査で検出されないように様々な手段を講じてきた。これらに対処するために、禁止物質を直接検出するのではなく、生体指標の変化を経時的に追跡する

ことで薬物使用を見つけ出そうという、従来とは異なった考え方に立脚する検査、アスリートバイオロジカルパスポート (ABP) が近年始まっている。これは尿あるいは血液から得られる複数の検査値および検査値から求められる計算値を、長期間にわたって個人毎に追跡するものである。例えばエリスロポエチンを使用すると血液ヘモグロビン濃度や未熟な赤血球の割合 (% 網状赤血球数) は高値となり、使用を中止するとヘモグロビン濃度は比較的維持され、% 網状赤血球数は急激に低下する。こうした計測可能な数値を複数回の測定から得ることによって、アスリート固有の変動範囲が予測でき、その範囲から逸脱することを利用してドーピングを検出できる⁸⁾。すでに、ABPに基づいてアンチ・ドーピング規則違反となったアスリートも出ている。ABPには、上に述べた血球新生刺激物質や輸血 (血液ドーピング) を検出するための検査 (血液モジュール) の他に、尿検体から蛋白同化男性化ステロイド使用を検出する検査 (ステロイドモジュール) が現在行われている。遺伝子多型による個体差が大きいT/E比も、個人内の時間的変動を観察することで、ドーピング使用の重要な情報が得られる。これらの新手法は、従来の禁止物質の直接検出法と補完しあい、ドーピングの検出や抑止に大きく貢献すると思われる。

V. ドーピング検査における今後の分析手法

血液は有用な検体であるが、現在ドーピング検査で用いられている静脈血採血は、医療現場と同様に採血に伴う事故の可能性が懸念されるため、侵襲がより少ない方法が求められる。従来、薬物濃度のモニタリングや新生児の先天代謝異常スクリーニングに用いられてきた、乾燥血液スポットdried blood spot分析をドーピング検査に導入しようとする研究も進んでいる。現在多くの物質が検出可能となっている。例えば、蛋白同化ステロイド、 β 2作用薬、興奮薬などが、LC-HRMSを用いて同時に多数測定可能である⁹⁾。静脈採血に比べ、侵襲が少ないだけでなく、検体の取り扱いや輸送が簡便で、保管温度や保存スペースの制約が少ない等、ドーピング検査にとって大きな利点がある。一方、問題点として

は、採取される血液の絶対量が少ないため再分析が限られたり、定量性に関しては静脈血に劣る、などが挙げられている。

さらに最新のトランスクリプトーム解析を基盤とした検体の経時的なスクリーニングによって、ドーピング検出の精度を高めようという研究もなされている。例えば、エリスロポエチン投与によって変動する遺伝子群が見出されている¹⁰⁾。将来、トランスクリプトミクスに加え、ゲノミクス、プロテオミクスやメタボロミクスなどを包括的に解析する、いわゆるomics-based approachも開発される可能性がある。

VI. 結語

最新の医科学研究を悪用し、常に新しい物質や使用方法を探し行われてきたドーピングに対して、試料分析科学研究は着実に進歩し、ドーピングを摘発し抑止する上で大きく貢献してきた。多くのクリーンなアスリートを守り、スポーツの公正性を担保するために、今後も、より迅速かつ正確で、より負担の少ない検査技術の開発が期待されている。

参考文献

- 1) Edited by JL, Fourcroy: LD, Bowers: Ensuring quality results in a global testing system. Pharmacology, Doping and Sports. 9-21, Routledge Taylor & Francis Group, UK (2009)
- 2) Lasne F, Martin L, Martin JA, de Ceaurriz J: Detection of continuous erythropoietin receptor activator in blood and urine in anti-doping control. Haematologica, 94: 888-890, 2009.
- 3) Catlin DH, Sekera MH, Ahrens BD, Starcevic B, Chang YC, Hatton CK: Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine. Rapid Commun Mass Spectrom, 18: 1245-1249, 2004.
- 4) Geyer H, Schänzer W, Thevis M: Anabolic agents: recent strategies for their detection and protection from inadvertent doping. Br J Sports Med, 48: 820-826, 2014.
- 5) Okano M, Ueda T, Nishitani Y, Kano H, Ikekita A, Kageyama S: UDP-glucuronosyltransferase 2B17 genotyping in Japanese athletes and evaluation of the current sports drug testing for detecting testosterone misuse. Drug Test Anal, 5: 166-181, 2012.
- 6) Edited by JL, Fourcroy: R Aguilera: Isotope ratio

- mass spectrometry. Pharmacology, Doping and Sports. 61-89, Routledge Taylor & Francis Group, UK (2009)
- 7) Bidlingmaier M, Wu Z, Strasburger CJ: Test method: GH. Baillière's Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 14: 99-109, 2000.
- 8) Gore CJ, Parisotto R, Ashenden MJ, Stray-Gundersen J, Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Hahn AG: Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. Haematologica, 88: 333-344, 2003.
- 9) Thevis M, Thomas A, Schänzer W: Targeting prohibited substances in doping control blood samples by means of chromatographic-mass spectrometric methods. Anal Bioanal Chem, 405: 9655-9667, 2013.
- 10) Pitsiladis YP, Durussel J, Rabin O: An integrative 'omics' solution to the detection of recombinant human erythropoietin and blood doping. Br J Sport Med, 48: 856-861, 2014.