

総 説

安定同位体利用技術

炭素同位体比を指標とするドーピング・ 中毒起因物質の由来識別法

植木眞琴

Reprinted from
RADIOISOTOPES, Vol.56, No.12
December 2007



Japan Radioisotope Association

[http : //www.jrias.or.jp/](http://www.jrias.or.jp/)

総 説



安定同位体利用技術

炭素同位体比を指標とするドーピング・中毒起因物質の由来識別法[†]

植木真琴

三菱化学メディエンス株式会社 WADA 公認ドーピング検査機関
174-8555 東京都板橋区志村 3-30-1

Key Words : doping, isotope ratio, steroid, provenance identification, carbon isotope, testosterone

1. はじめに

スポーツドーピング検査や法医中毒学分野では、分子識別情報に基づいて原因物質を同定する必要がある、多くの場合、質量分析法によってその目的が達成される。分析技術が向上し、対象物質の検出率が向上するに従って、ドーピングの手段は一層巧妙になり、また健康ブームの影響で、生体内で作られる天然物を含有する栄養補助食品が多数流通するようになってきたため、化合物を同定するだけでは目的物質の由来を特定できなくなっている。たとえば、スポーツ選手の尿から異常な量の男性ホルモンが検出され、それが生理的な要因による異常であるかを区別しなければならない場合、あるいは毒物犯罪において、犯行現場の遺留品と被疑者から押収された同じ化学種の同一性を証明しなければならない場合などである。

化合物の由来を調べる方法の一つとして、警

察鑑定では押収された覚せい剤などの原末に不純物として含まれる原料物質や、用いられた触媒、微量金属などを調べ、そのプロファイルから流通ルートを特定することが試みられてきた。しかし共存物質のプロファイルから由来を識別する方法は、尿などの複雑な組成を持つ生体試料では不可能なことが多い。元素の同位体組成は由来識別要素として使用し得る情報であり、同一化学種を異同識別する上で有用である。

ガスクロマトグラフ (GC) と同位体比質量分析計 (IRMS) とを熱分解装置を介して接続したガスクロマトグラフ熱分解同位体比質量分析計 (GC/C/IRMS) の実用化以来、複雑な組成を持つ生体試料中の個別分子の同位体比が測定できるようになり、同位体比を指標として被験者の尿に観察されたステロイドプロファイルの異常が体質的なものであるか、あるいはステロイド製剤を服用したドーピングによる異常であることを識別することが可能になった。

炭素同位体比測定によるステロイド識別法は、オリンピックでは筆者が担当した 1998 年長野オリンピック冬季競技大会でのドーピング検査で初めて実施され、翌年の IOC アンチ・ドーピング規則の改正によって、正式に判定基準として採用された。ここではヒト尿中個別ステロイドの炭素同位体比を測定例として、その結果の解釈、測定上の問題などについて解説する。

[†] “Applications of Stable Isotopes in Life Sciences”.
Differentiation of Endogenous and Exogenous Steroids by Monitoring Carbon Isotope Ratio as a Parameter to Indicate the Provenance.
Makoto UEKI : The World Anti-Doping Agency's Accredited Anti-Doping Laboratory in Tokyo, Mitsubishi Chemical Medience Corporation, 3-30-1, Shimura, Itabashi-ku, Tokyo 174-8555, Japan.

2. 炭素同位体比測定が必要になった背景

1994年にアメリカでは、国民医療の自己選択幅を拡大し医療費を抑制しようという考えから、栄養補助食品の規制を大幅に緩和する条例 Dietary Supplements Health and Education Act (DSHEA)¹⁾が交付された。この条例によって天然ホルモン含有物を栄養補助食品として販売することが可能となり、多数のステロイドサプリメントが通信販売などを通じて入手できるようになった。時を同じくしてスポーツ界では、男性ホルモンのテストステロン (T) とその活性代謝物 5 α -ジヒドロテストステロン (DHT) の判定基準が確立した²⁾ことから、T や DHT を使用する代わりに、プロホルモンを含む栄養補助食品を摂取して男性ホルモンを補充すれば、検査で検知されにくいのではないかと考えられるようになった。こうしてステロイドサプリメントは、記憶増進、老化防止の民間療法に積極的に取り上げられ、次第に注目されるようになってきた。放置すればステロイド乱用がスポーツ界から一般社会に波及しかねない状況になってきたため、米連邦政府 Drug Enforcement Administration は、スポーツ界と協力してステロイドを再度規制する条例 Anabolic Steroid Control Act of 2004 を公布し、2005年に発効させた³⁾。この措置によって男性ステロイド系サプリメントの販売が再び規制されるようになった。この条約で規制される化合物は、自然界に存在しない合成蛋白同化ステロイドばかりでなく、ヒト体内で産生される生理的ステロイドも含まれるため、それらステロイドの使用を検知するには対象物質の由来を調べる識別法が必要になってきたのである。

3. 炭素の安定同位体比とその表現法

炭素の安定同位体比 (CIR) は本来 ^{13}C と ^{12}C の存在比を意味するが、試料の CIR は、便宜上国際標準物質として用いられている Vienna PeeDee Belemnite (VPDB) の CIR に対する

千分率 (‰) の偏差をあらわす $\delta^{13}\text{C}$ 値 (以下 δ 値と記載) として表される。

$$\delta^{13}\text{C}_{(\text{sample})} = (\text{CIR}_{(\text{sample})} / \text{CIR}_{(\text{VPDB})} - 1) \times 1000 \quad (\text{‰})$$

ここで $\text{CIR}_{(\text{VPDB})} = 0.0112372$

個別分子の CIR を測定する場合、具体的には GC で分離した有機物成分を He キャリヤガス流路中、酸化銅触媒下で連続的に熱分解して得られる $^{13}\text{CO}_2$ と $^{12}\text{CO}_2$ の強度測定結果から酸素原子の寄与を補正し、VPDB の CIR に対する千分率偏差を上式から計算することによって目的とする有機物の δ 値が求められる。酸素、水素、窒素など、他の多くの原子は有機物分子中で官能基を構成し、活性原子として化学反応や生成過程において交換反応や脱離による変化を受けやすいのに対して、男性ステロイドの基本骨格を構成する 19 個の炭素は代謝時の入れ替わりがないので、ステロイド分子の由来を炭素源から特定するのに有効である。

4. ステロイドプロファイルの個人差と人種差

尿中に検出されるステロイドの量と成分間の存在比、いわゆるステロイドプロファイルの解析を困難にする要因に人種差と個人差がある。図 1 に C19 ステロイドの主な代謝経路を示したが、テストステロンドーピングのスクリーニング指標として、尿中 T 値と T の 17 エピマーであるエピテストステロン (ET) との比率 T/ET 比が用いられている。当初 T/ET の許容値は、T、ET 間の相互変換が起こらないことを前提に、欧米人を母集団とするデータを元に設定された⁴⁾。欧米人では健常人の T/ET 比がほぼ 1 付近に分布し、T 投与時に ET の上昇が見られないことから、世界アンチドーピング機構 (WADA) は、T/ET が 4 を超えた場合にはドーピングの可能性があるため、同位体比 MS による追加の確認検査が必要であるとしている。一方、日本・中国・韓国を母集団とする東アジア人の T/ET 比のそれは 0.5 以下と低く、欧米人と東アジア人の T/ET 比の差異が

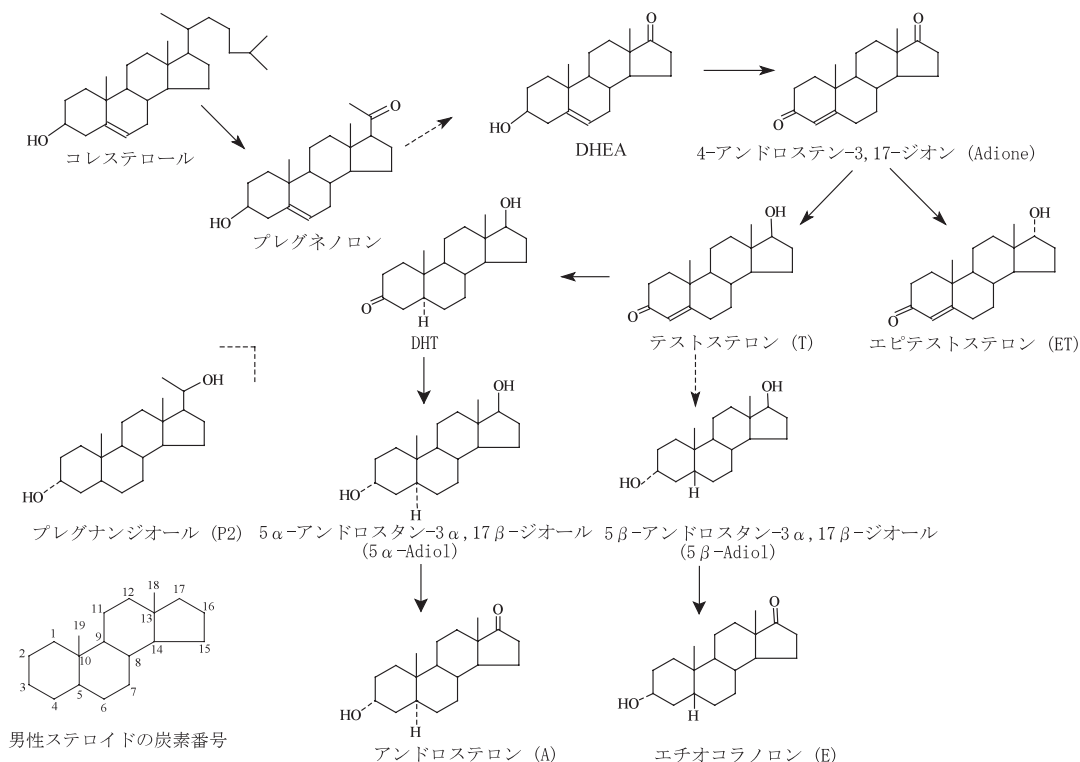


図1 ヒトにおけるC19ステロイドの主な代謝経路

Tの濃度差に依存することが統計的に確認された。更に、Tを投与しても、T/ETの上昇を示さない東アジア人の事例が知られるようになってきた。図2は、説明と同意の上で日本人男女ボランティア6名に50 mgのプロピオン酸テストステロンを服用させ、服用前後のT, ET, T/ET比の推移を調べた6例のうち、代表的な男子2例の結果をグラフ化している。図2のa)はいわゆる欧米人型代謝を示す例でテストステロン投与時のT, ET間の相互変換は見られないが、b)のボランティアではT投与後にETの尿中排泄がほぼ同期して推移しており、T/ET比を指標としたテストステロンドーピングの検知は不可能であることを示している。T, ETに共通するプリカーサーである4-Androstene-3, 17-dione (Adione)を服用した別の実験から、図中a), b)に示したT/ET比の差異は、17-steroid oxidoreductaseのフェノタイプの個人差によって東アジア人の多くではT,

ET間の変換が起こるためと考えられた。

加齢と共に分泌量が著しく低下するため、近年ステロイドサプリメントによる補充療法で注目されているDHEAに着目すると、欧米人では尿中DHEA硫酸抱合体の高値は希なのに対して、東アジア人の尿中DHEA硫酸抱合体の濃度分布は遥かに高く、高頻度で生理的に高値を示す例が観察される。そのため、東アジア人については尿中濃度を指標としてDHEAのドーピングを検知することは不可能であった²⁾。以上のことから、T, DHEAのドーピング判定に際して、個人差・人種差には依存しないと期待される同位体比測定法が注目されるようになったのである。

5. ヒト尿中男性ステロイドと医薬品男性ステロイドの差異

図1に示したように、男性ステロイドの代謝ではコレステロールを原料とするプレグネノロ

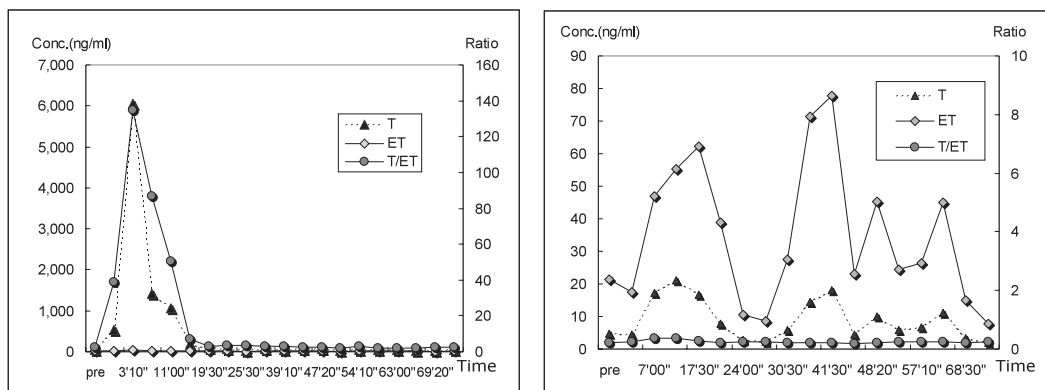


図2 プロピオン酸テストステロン服用後の尿中テストステロン及びエピテストステロンの濃度と T/ET 比の推移の例

ボランティア 1 は欧米型の代謝を示し、プロピオン酸テストステロン投与後 T の尿中排泄が増加したものの ET への変換は観察されず、T/ET 比が速やかに上昇した。ボランティア 2 は東アジア系人種に見られる代謝型で、投与された T の一部が 17 エピマーである ET に変換し、両者がほぼ連動して尿に排泄されるため、T/ET 比を指標としたドーピングの検出は不可能であった

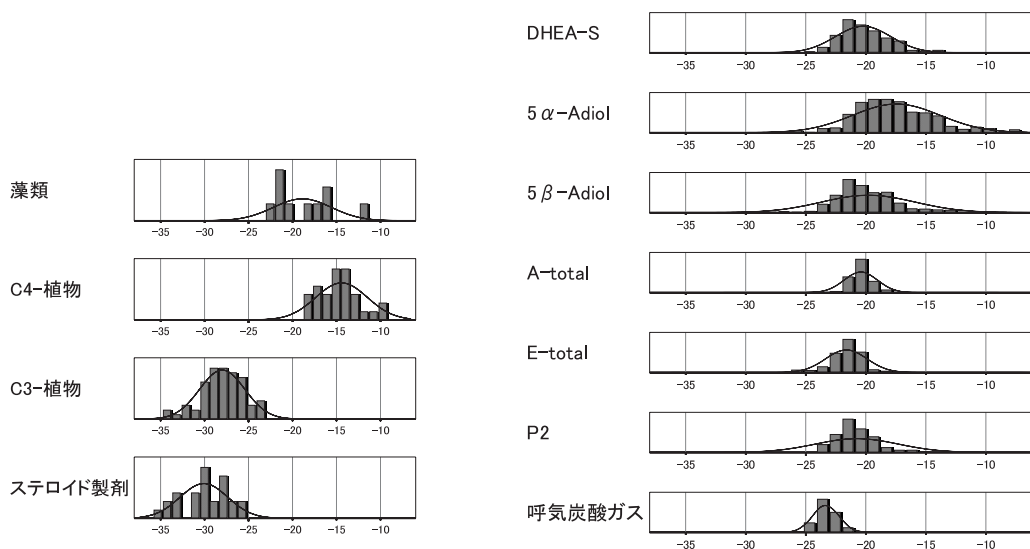
ンが起点となり、17 位の C2 側鎖が切断されて C19 ステロイドとなる。次いで DHEA, Adione をプロホルモンとして T, DHT が合成され、 5α -androstane- 3α , 17β -diol (5α -Adiol) と 5β -androstane- 3α , 17β -diol (5β -Adiol) を経て、終末産物の Androsterone (A), Etiocholanolone (E) へと代謝され、最終的にそれらはグルクロン酸抱合体又は硫酸抱合体となって尿中に排泄される。代謝過程でアンドロスタン骨格の 19 個の炭素原子は入れ替わらないため、外因性ステロイドの影響がなければ、理論上内因性男性ステロイドの CIR はすべて同じ値となる。原料のコレステロールは卵、イカの臓器、ウシ、ブタ、ニワトリなど、食餌中の動物性脂肪にも多く含まれるが、ヒト体内で生合成される男性ステロイドの原料物質はメバロン酸経路を経て、あるいはスクアレンを中間体として体内で生合成されたコレステロールであり、食餌中のコレステロールは直接男性ステロイドへは代謝されないため、内因性ステロイドの CIR はヒト血清中脂質成分などのそれと良く一致し、食餌からのコレステロール摂取による影響は受けにくいと言われている。

一方、医薬品ステロイドの主たる原料はヤマ

イモ、カラバル豆、大豆などの C3 高等植物が産生するフィトステロールで、Diosgenin, Solasodine からは DHEA, T や 19-Nortestosterone などの男性ステロイドが、また Hecogenin, Deoxycholic acid からは種々の副腎皮質ステロイド類が合成される⁵⁾。植物ステロイドの炭素源は炭酸同化作用によって大気中の炭酸ガスから固定されたもので⁶⁾、フィトステロールの δ 値は、 δ 値約 -7‰ の大気中の炭酸ガスと炭素固定時の同位体効果によって決定される⁷⁾。

図 3-a に市販合成ステロイド製剤の δ 値を測定した筆者らのデータと、大豆の脂質画分について測定された δ 値とを比較したグラフを示した。合成ステロイド製剤の δ 値の分布は $-30.1 \pm 2.6 (\text{‰})$ であり²⁾、Smith らが報告した高等植物由来の炭素化合物のそれと良く一致した⁷⁾。

一方、長野オリンピックで検査対象となり薬物使用の痕跡が認められなかった選手について測定された尿中 DHEA の δ 値は -20.3 ± 2.1 (図 3-b) で、Scholler らが報告した北米居住者の血清脂質の δ 値⁸⁾ $-21.6 \pm 1.0\text{‰}$ に比較すると ^{13}C 含量が高めの傾向にはあったが、合成ステロイド製剤の δ 値は、ヒト尿中 C19 ステ



a. 市販ステロイド製剤と植物脂質画分

b. ヒト尿中 C19 ステロイドと呼吸中炭酸ガス

図3 市販ステロイド製剤とヒト尿中 C19 ステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値の分布

市販ステロイド製剤は主として C3-植物が産生するフィトステロールを原料として合成されるが、図 3-a の結果はそれらが C3-植物由来であることを示している。ヒト尿中ステロイドの ^{13}C -含量は調査したステロイド製剤よりもおよそ 10% 高く、両者の間には有意の差がみられた

(S: 硫酸抱合体, total: 総量 他はグルクロン酸抱合体画分)

呼吸炭酸ガスは三大栄養素の燃焼ガスであり、個人の炭素摂取源の平均的 $\delta^{13}\text{C}$ 値を示すと考えられるが、その ^{13}C 含量も市販ステロイド製剤に比べて有意に高値であった。植物の δ 値分布は Smith らの報告値⁷⁾をグラフ化した

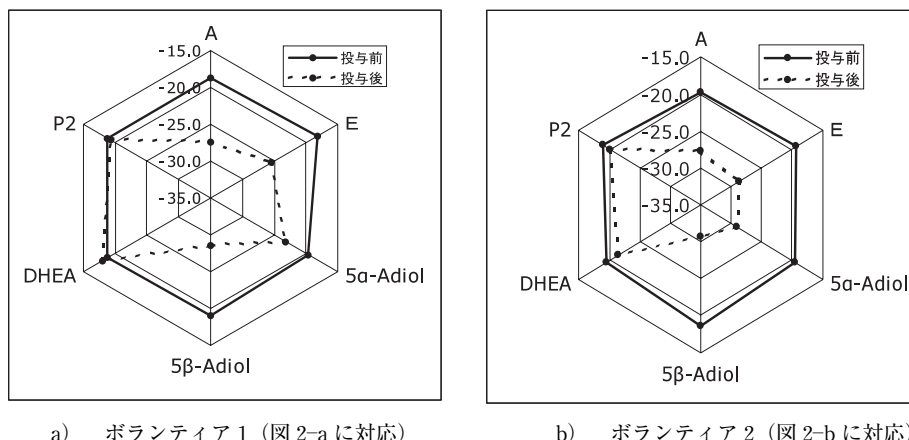
ロイドの CIR に対して有意に低い値を示した。

このことから、同じ代謝経路上にあるステロイドの δ 値の均一性が失われており、あるステロイドの ^{13}C 含量が、他のステロイドのそれに比べて有意に低い場合には、外因性ステロイドの影響があったと判断される。

6. ヒト尿中炭素同位体比の変動要因と結果の解釈

1990 年に Brooks らは、CIR の差異から外因性コルチコステロイドを検出する方法について報告した⁹⁾。また 1997 年に Shackleton らは 5 α -Adiol と 5 β -Adiol の δ 値を指標としてテストステロン系男性ステロイドのドーピングを検知できることを報告している^{10), 11)}。その後もテストステロンに注目した研究がいくつか発表されたが¹⁰⁾⁻¹⁴⁾、当時問題となっていた DHEA、

アンドロステンジオン (Adione) を同時に網羅する方法はなく、市販テストステロン製剤とステロイドサプリメントの識別はできなかった。筆者らは DHEA の大部分が硫酸抱合体として尿に排泄されることに着目し、ゲートウェイステロイドとして DHEA 硫酸抱合体の δ 値を同時に測定することにより、最も問題となる DHEA, Adione, T, DHT のドーピングを識別できることを示した²⁾。安定同位体比は分子を構成する原子の由来のみに依存し、人種差、個人差には影響されないと考えられるが、実際いくつかの研究グループにより、尿中ステロイドの δ 値の日差変動はステロイドプロファイルのそれに比べて遥かに低いことが確認されている。海外での長期移住等のない正常者 5 名の尿中ステロイドについて 5 年間の推移を調査した筆者らの検討では、その間 δ 値に有意の変



a) ボランティア 1 (図 2-a に対応)

b) ボランティア 2 (図 2-b に対応)

図 4 プロピオン酸テストステロン服用前後の、尿中 C19 ステロイドに見られる ^{13}C 含量の推移
 投与前の尿では、測定対象とした 6 種のステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は均一で、レーダーチャートがほぼ正六角形を示したのに対し、T 投与後の尿では、ERS として測定した P2 と代謝上上位の DHEA には変動は見られず、4 種の T の代謝物 5α -Adiol, 5β -Adiol, A, E の $\delta^{13}\text{C}$ 値が有意に低下し、 ^{13}C 含量が低下していることが観察された

動は見られず、濃度変動は 10 倍にも達する一方、 δ 値の変動は最大でも 3% に留まっていた¹⁵⁾。また、Flenker らは、ヒト尿中ステロイドよりも ^{13}C 含量の高い δ 値 -10 から -20 程度の高 ^{13}C コントロール食を摂取する実験の結果、1 例を除いて 25 日間の δ 値の変動は +3% を超えず、女子 1 例での変動も成分によって +3% 程度であったことを報告している¹⁶⁾。

Shackleton らは、男性ステロイドと同じ炭素源から生合成され、かつ男性ステロイド代謝には影響を与えない非男性ステロイド、たとえばプレグナンジオール (P2) を、被験者が産生する内因性ステロイドの δ 値を表す内因性参照標準 (ERS: Endogenous Reference Standard) とみなし、その δ 値と検査対象となる男性ステロイド成分の CIR とを相対比較することによって、食習慣の違いによる差異を補正できると報告している^{10), 11)}。たとえば、ある選手の尿中ステロイドの δ 値が他の選手に比べて有意に低く植物性ステロイドのそれに近かったとしても、ERS の δ 値と有意差がなければ、検出された男性ステロイドは ERS と同じ炭素源から生合成されたものであると合理的に判断できる。IOC 医事委員会及び WADA が組織す

る炭素同位体比測定法開発作業班は、P2 の他にも Pregnanetriol, Cholesterol, 11-hydroxy-androsterone, 11-ketoetiocolanoloneなどを ERS に使用し得るとしている¹⁷⁾。

7. ステロイド投与時の炭素同位体比変動

図 2 に示したプロピオン酸テストステロン投与例 2 例から採取された同一の尿試料について、CIR 測定を行った結果を図 4 に示した。図 4 の a, b はそれぞれ図 2-a, 図 2-b の投与前及び投与後 11 時間 (a) と 9 時間 20 分後 (b) の尿に対応し、b に示したボランティアは、ステロイドプロファイルではドーピングが検知できなかった事例である。

図 4 に示した CIR の推移を比較すると、投与前の尿では、いずれのステロイドの δ 値もほぼ -19% で、そのレーダーチャートはほぼ正六角形であった。一方プロピオン酸テストステロン投与後の尿では、P2 (ERS) と DHEA の δ 値には変化が見られなかったものの、 5α -Adiol, 5β -Adiol, A, E の δ 値が成分によって -4 から -10% 変動し、投与後テストステロンの代謝物の ^{13}C 含量が著しく低下する δ 値の均一性の欠如が観察された。これら投与後の尿

では DHEA の δ 値が P2 のそれに対して有意の差を認めなかったことと、Adione の代謝物である 6-Hydroxyandrostenedione の濃度には異常が認められなかったことから、原因物質がプロホルモンではなく T であることが容易に確認可能であった。

8. 今後の展開

従来ステロイドプロファイルによる判定では個人差・人種差の影響があり、すべての選手に公平な判定基準を設定することは不可能であった。また、ステロイドプロファイルに異常が見られ、その異常が明らかにドーピングによるものと判定できない場合、規則により最低 1 か月に 1 回、合計 3 回以上のフォローアップ検査を行った後に最終判断を下さなければならなかった。安定同位体比は個人差・人種差・性差に依存しない指標であり、フォローアップのために必要以上に選手を拘束する必要がなく、多くの場合 1 回の検査結果で判定できるという点で極めて有効である。

CIR 測定による薬物代謝の研究は、これまでの化学分析による方法では得られなかった新たな情報を提供してくれるようになった。最近では、警察鑑定における規制薬物の流通ルートや、遺伝子識別が不可能な有名酒類、農産物の原産地識別などにも利用されるようになってきた。今後様々な炭素源についてその δ 値が明らかにされるようになれば、同位体比質量分析法の薬毒物や食品への更なる応用が期待される。

文 献

- 1) U. S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Dietary supplement health and education act of 1994, <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/dietsupp.html>
- 2) Ueki, M. and Okano, M., Analysis of exogenous DHEA excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 2237-2243 (1999)
- 3) Drug Enforcement Administration, Federal Register, Rules and Regulations December 16: Anabolic Steroid Control Act of 2004, **70**, 74653-74658 (2005)
- 4) Donike, M., barwald, K. R., Klostermann, K., Schaezner, W. and Zimmermann, J., Detection of exogenous testosterone, *Leistung und Gesundheit, Kongressbd*, pp.293-298, Deutscher Aertzte-Verlag, Koeln (1983)
- 5) Coppen, J.J.W., Steroids: From plants to pills-the changing picture. *Trop.Sci.*, **21**, 125-141 (1979)
- 6) Lehninger, A. L., Photosynthesis: Calvin pathway and Hatch-Slack pathway, Lehninger, A. L., editor, *Biochemistry* second edition, pp.632-640, Worth publishers, NY (1975)
- 7) Smith, B. N. and Epstein, S., Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants, *Plant Physiol.*, **47**, 380-384 (1971)
- 8) Scholler, D. A., Minagawa, M., Slater, R. and Kaplan, I. R., Stable isotopes of carbon, nitrogen and hydrogen in contemporary North American human foodstuff, *Ecol. Food Nutr.*, **18**, 159-170 (1985)
- 9) Brooks, R. V., Kicman, A. T., Poojara, N. and Southan, G. J., Proceedings on the 2nd. International Symposium on the Analysis of Anabolizing and Doping Agents in Biosamples, Gent (1990)
- 10) Shackleton, C. H., Phillips, A., Chang, T. and Li, Y., Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstenediols, *Steroids*, **62**, 379-387 (1997)
- 11) Shackleton, C. H., Roitman, E., Phillips, A. and Chang, T., Androstenediol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry, *Steroids*, **62**, 665-673 (1997)
- 12) Becchi, M., Aguilera, R., Farizon, Y., Flament, M. M., Casabianca, H. and James, P., Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 304-308 (1994)

- 13) Aguilera, R., Becchi, M., Casabianca, H., Hatton, C., Catlin, D. H., Starcevic, B. and Pope, Jr. H. G., Improved method of detection of testosterone abuse by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids, *J. Mass Spectrom.*, **31**, 169-176 (1996)
 - 14) Horning, S., Geyer, H., Machnik, M. and Schanzer, W., Recent Advances in Doping Analysis (4), Schanzer, W., Geyer, H., Gotzmann, A. and Mareck-Engelke, U., eds., p.115, Verlag Sport und Buch Straus, Koln (1997)
 - 15) Okano, M., Sato, M. and Ueki, M., Five year follow-up study on steroid profiles in individuals- Stability and intra-individual variation of δ -values-, Recent Advances in Doping Analysis (12), Schanzer, W., Geyer, H., Gotzmann, A. and Mareck-Engelke, U., eds., Verlag Sport und Buch Straus, Koln (2005)
 - 16) Flenker, U., von Kuk, C., Guenter, U., Huelsemann, F., Gougoulidis, V. and Shaenzer, W., Influence of changes in diet on the dynamics of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in selected urinary steroids: Diet free from Cholesterol, Recent Advances in Doping Analysis (13), Schanzer, W., Geyer, H., Gotzmann, A. and Mareck-Engelke, U., eds., pp.227-233, Verlag Sport und Buch Straus, Koln (2006)
 - 17) World Anti-Doping Agency, Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids. International Standard for Laboratories Version 4 Annex C, Technical document TC 2004 EAAS section 3.3 (2004), <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=372>
-