

## 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方法

三菱化学ビーシーエル

ドーピング検査室長 植木 眞琴

### はじめに

スポーツにおけるドーピング検査や、法医中毒学分野における起因物質の特定を目的とする分析では、しばしば同じ化学物質の由来を確認しなければならないケースに遭遇する。このような分析を異同識別と呼ぶ場合があるが、たとえば原末を頼りに不正に合成された覚せい剤の流通ルートを探る必要がある場合、毒物混入犯の被疑者が複数でどの被疑者の所持品が事件に用いられた者と同一であるかを確認したい場合、あるいはスポーツ選手からドーピングを疑わせる量の内因性ホルモンが検出され、体外から摂取されたドーピングによるものか生理的な異常によるものであるかを区別したい場合などの例である。

これまで裁判化学分野では、原末中の不純物質のプロファイリングを行い、原料物質、合成方法あるいは合成に用いられた器具の推定などが行われてきた。また、スポーツでは検査を逃れるために内因性ホルモンの乱用が深刻になっているが、これまでは外部からのステロイド投与による尿中ステロイドプロファイルの変化などを指標にドーピングの判定が行われてきた。

一方オンライン熱分解装置の開発によって、個別成分のガスクロマトグラフ熱分解同位体比MS分析が可能となったため、同位体比MS(IRMS)が異同識別に利用できるようになってきた。ここでは、我々がテーマとする内因性ステロイドホルモンを用いたドーピングの検出法について解説する。

### ヒト体内のステロイドと合成ステロイド剤

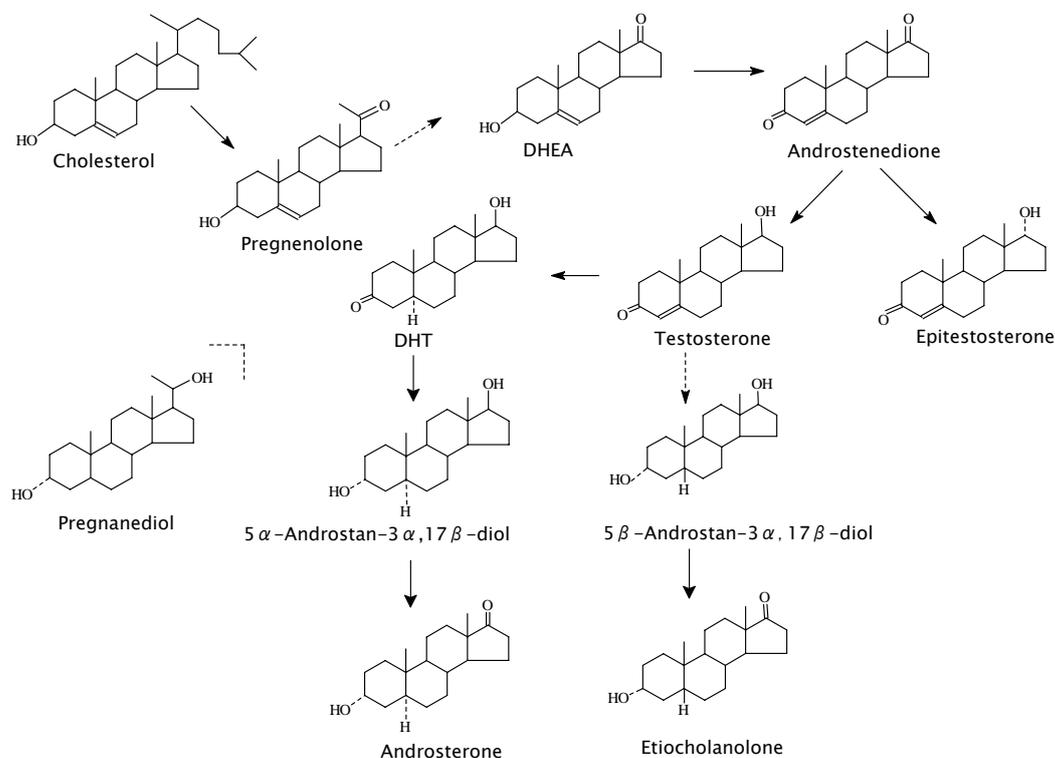


Figure-1 Metabolic pathways of endogenous androgenic steroids in human

生理的ステロイドの生合成経路では、食餌中のコレステロールを出発原料としてプレグネノロン (C21 ステロイド)、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA: C19 ステロイド)、アンドロステンジオン (C19 ステロイド) などを経て男性ホルモンのテストステロン (C19 ステロイド) に至る。それらの生合成過程では炭素骨格の組み換えは起こらず、現在のところフィトステロールなどの植物ステロイドが男性ステロイドに体内で変換するという直接的な証拠はみつかっていないので、内因性ステロイドの炭素骨格の起源はウシ、ブタ、ニワトリ、サカナなどの動物性コレステロールの混合物と考えることができる。

(Figure-1)

それに対して、男性ステロイド、副腎皮質ステロイド、黄体ホルモンなどの合成ステロイド剤は、温帯に分布する大豆、カラバル豆などの C3-植物が産生する植物フィトステロールを原料として、全化学的に、あるいは部分的に細菌培養を経て合成される。こうして合成されたステロイド剤の炭素原子の起源は空気中の炭酸ガスであり、植物体の炭素同位体比は炭酸同化作用の過程で、葉面からの炭酸ガス吸収過程や、炭素原子を 3-ホスホグリセリン酸に固定する際の同位体効果によって影響を受け、C3-植物固有の同位体組成を有するに至ることが知られている。

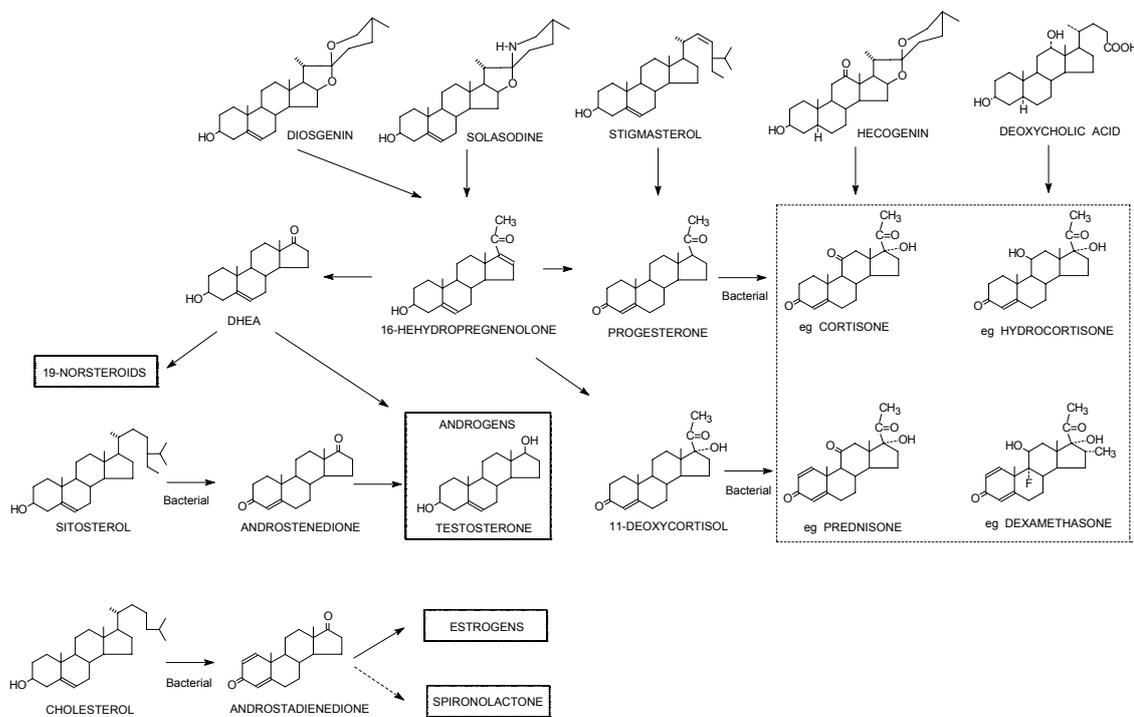


Figure 2 Synthetic pathways of steroid pharmaceuticals from the source materials

このように、ヒト体内で合成されるステロイドの炭素と合成ステロイド剤のそれは起源が明確に異なるため、未知資料中のステロイドの炭素同位体比を測定比較することによって、 $\delta$  値を指標とする同一化学種の由来識別が可能になると期待される。

### 種々のステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値

C4-植物の  $\delta$  値は -14‰前後であり、-28‰の値を示すC3-植物に比べて明らかに有意に高い(重たい)炭素同位体組成であることが明らかにされている。そこで我々は市販のC19ステロイド製剤およそ30種類について炭素同位体比分析を行い、それらの $\delta$ 値分布がC3-植物のそれと良く相関することを確認した。(Table-1)

**Table 1.  $\delta$ -values calculated for synthetic steroids**

Commercial name	Generic name	Manufacturer	$^{13}\text{C}$ $\delta$ ‰
17alpha-Epitestosterone	Epitestosterone	Sigma Chemical Co.	-33.1
Androstenedione	4-Androstene-3,17-dione	Sigma Chemical Co.	-28.7
Androstenedione	4-Androstene-3,17-dione	Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.	-26.1
BHP5	Pregnenolone	Bodyonics	-31.2
Dehydroepiandrosterone	DHEA	Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.	-31.4
Dehydroisoandrosterone	DHEA	Sigma Chemical Co.	-33.5
Dehydroisoandrosterone	DHEA	Wako Pure Chemical Industries., Ltd.	-34.1
New DHEA	DHEA	Leiner Health Products Inc.	-30.5
Pregnenolone	Pregnenolone	Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.	-30.5
Schiff DHEA	DHEA	Schiff Products	-30.6
Testosterone	Testosterone	Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.	-28.4
Testosterone	Testosterone	Wako Pure Chemical Industries.Ltd.	-28.2
Testosterone	Testosterone	Sigma Chemical Co.	-28.4
Dehydroisoandrosterone Acetate	DHEA acetate	Wako Pure Chemical Industries., Ltd.	-34.5
Dehydroepiandrosterone Acetate	DHEA acetate	Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.	-35.6
Mylis	DHEA sulfate	Kanebo Co., Ltd.	-27.1
Enarmon	Testosterone propionate	Teikoku Zoki Pharmaceutical Co.,Ltd.	-30.1
Enarmon Deot	Testosterone enanthate	Teikoku Zoki Pharmaceutical Co.,Ltd.	-26.2
Stanolone	5alpha-Dihydrotestosterone	Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.	-28.1
Testinon 10mg	Testosterone propionate	Mochida Pharmaceutical Co.,Ltd.	-29.6
Testinon Depot 125mg	Testosterone enanthate	Mochida Pharmaceutical Co.,Ltd.	-26.8
Testosterone acetate	Testosterone acetate	Sigma Chemical Co.	-32.8
Testosterone Propionate	Testosterone propionate	Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.	-30.1
Testosterone propionate	Testosterone propionate	Wako Pure Chemical Industries., Ltd.	-28.9
Testoviron-Depot	Testosterone enanthate	Scherling AG	-27.4
TESTRON DEPOT-S	Testosterone enanthate	Fuji Pharmaceutical Co.,Ltd.	-29.9

一方、443人のオリンピック選手について検査したヒト尿中ステロイドの $\delta$ 値には成分や性別による有意差は見られず、主要なヒト尿中ステロイドの $\delta$ 値は-21 から-22‰であり、合成ステロイド製剤よりも有意に $^{13}\text{C}$ 含量が高い（重い）炭素原子で構成されることが確認された。このことは、ヒト尿中の特定のステロイドに $\delta$ 値の異常があり、その $\delta$ 値が同じ原料物質から代謝される他のステロイド成分に比べて有意に低い場合にはドーピングによる影響と見なすことができることを示している。Figure-3の左側上段3つのヒストグラムは藻類、C4植物、C3植物の各 $\delta$ 値の違いを、また下4段目のヒストグラムは、ステロイド薬剤の $\delta$ 値の分布を示す。薬剤の $\delta$ 値はC3植物のそれと良く一致するのに対して、ヒトの呼気中炭酸ガス、尿中ステロイドの $\delta$ 値はいずれも-20‰をやや上回る程度であり、濃度分布に見られるような境界領域の重なりはほとんどないことを示している。

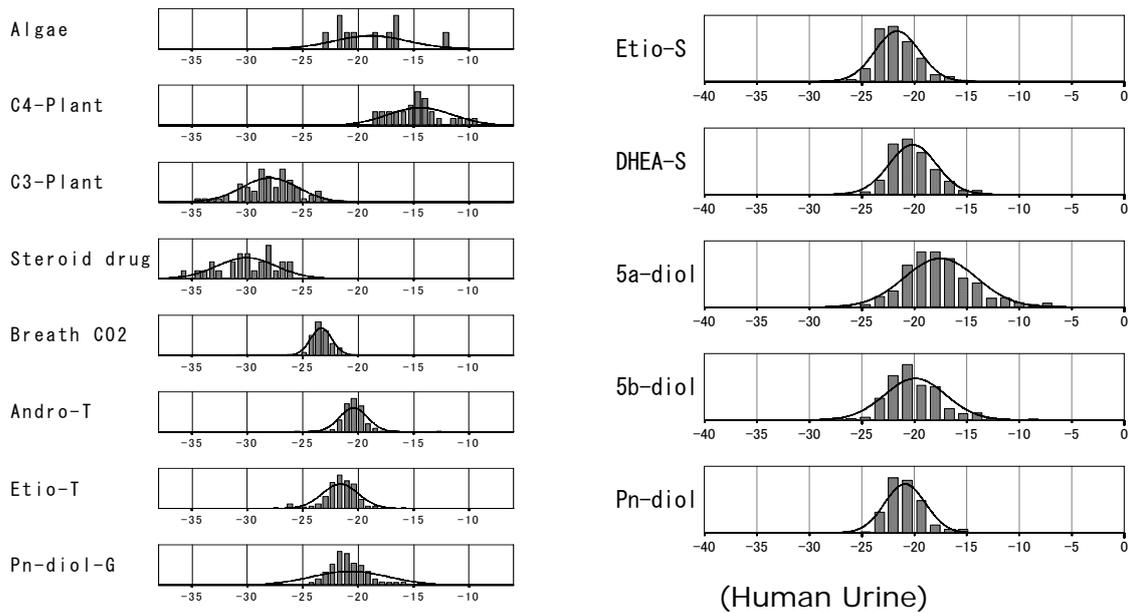
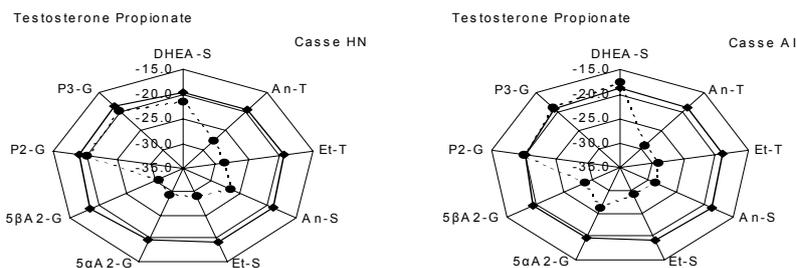


Figure-3 Distribution of  $\delta$ -values of steroids in plants and in human

Figure-4 に示したように、ボランティアにプロピオン酸テストステロン製剤を投与した前後に尿中のステロイドの  $\delta$  値を調べたところ、投与前の各成分の  $\delta$  値はほぼ一致しており、投与前のレーダーチャートは同心円を描いたのに対して、投与後のそれらはテストステロンの代謝物であるアンドロステロンとエチオコラノロンの総量および硫酸抱合体 (An-T, Et-T, An-S, Et-S)、および  $5\alpha$  型、 $5\beta$  型代謝物であるアンドロスタンジオールのグルクロン酸抱合体 ( $5\alpha$  A2-G,  $5\beta$  A2-G) では有意に  $\delta$  値が低下し、明らかな合成ステロイドの影響が観察されたのに対して、代謝経路上ではテストステロンよりも前に位置する DHEA の硫酸抱合体 (DHEA-S) および、生体成分としてはテストステロンと同じ起源をもつが、男性ホルモンとは代謝上の関連性が薄い女性ホルモン、プレグナンジオール、



プレグナントリオールのグルクロン酸抱合体 (P2-G, P3-G) には投与前後で有意の変化は認められなかった。以上のように、炭素同位体比を指標とする生体成分の由来識別は長野オリンピックで初めて実用化され、いまではドーピング判定方法として世界中で正式に採用されるようになった。

#### 文献

M.Ueki, M.Okano: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 2237-2243(1999).