

氏名（本籍）	おかの まさと 岡野 雅人（三重県）		
学位の種類	博士（薬学）		
学位記番号	論博第 334 号		
学位授与の日付	平成 26 年 7 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学位論文題目	質量分析法を用いるホルモンドーピング検査法に関する研究		
論文審査委員（主査）	教授	渋澤	庸一
	教授	袴田	秀樹
	教授	平塚	明
	教授	井上	勝央

論文内容の要旨

スポーツ競技者による薬物不正使用、いわゆるドーピングは大きな社会問題となっている。ドーピング検査において、ホルモン製剤は、生体試料中から単に検出するだけではなく、生体内で産生されたホルモンとの識別が必要である。本研究では、筋肉増強作用を有するタンパク同化ステロイドホルモン、成長ホルモンに代表される成長促進因子および持久力向上効果のある造血ホルモンを対象として、ホルモンドーピング検査を有効なものとするべく、現行の検査法の妥当性の検証と改良を行った。

第 1 章 日本人におけるテストステロンドーピング検査の妥当性検証と改良

Testosterone ドーピングの標準検査法の原理は、Testosterone 製剤の投与により上昇した尿中の Testosterone (T) および相互変換しない異性体 Epitestosterone (E) のグルクロン酸抱合体のアグリコン比率

(T/E) を GC-MS 法により測定し、T/E の上昇を捉える方法である (Fig. 1)。T/E には人種差があり、東アジア人の T/E は、欧米人のそれよりも低い傾向にある。本研究では、日本人競技者（男性 255 名および女性 256 名）における Testosterone のグルクロン酸抱合に関与する

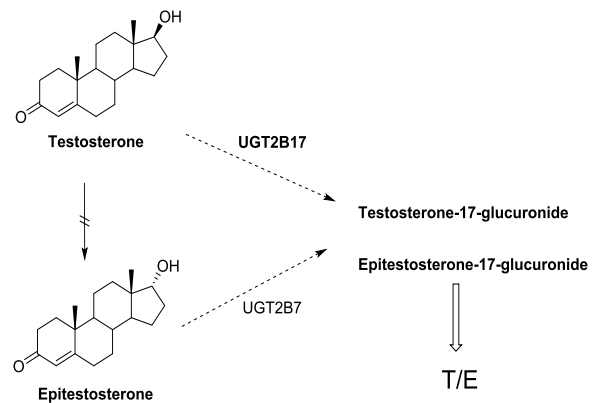


Fig. 1. Detection of testosterone doping.

UGT2B17 の遺伝子多型解析を行った。その結果、日本人競技者の *UGT2B17* ホモ接合型欠失者 (*del/del* 型) は男性で 74.5%、女性で 60.2% を占め、*UGT2B17* 接合型挿入者 (*ins/ins* 型) は男性でわずか 1.2%、女性で 2.7% であり、その頻度は欧米諸国とは著

しく異なることを明らかにした。

del/del 型の T/E は、Fig. 2 に示すように、非 *del/del* 型 (others: *del/ins* + *ins/ins*) と比較して男女ともに有意に低い結果であった ($P < 0.0001$)。これは、Epitestosterone のグルクロン酸抱合が UGT2B17 ではなく、UGT2B7 の関与を受けているため、Epitestosterone 濃度に差異が認められないためであった ($P > 0.05$)。

次に、これまで実施例のほとんどなかった女性に対する Testosterone enanthate 投与試験を行い、投与後の T/E および尿 steroid profile の変動について検討した。Fig. 3 に示すように、*del/del* 型被験者では、T/E は上昇したが ($P < 0.05$)、世界アンチ・ドーピング機構 (WADA) 承認試験法でドーピングと認定される世界統一基準閾値 ($T/E > 4$) には到達しなかった。この結果は、*del/del* 型競技者の多い日本を含むアジア地域における WADA 認定試験所に対して警鐘を鳴らすこととなった。

一方、炭素同位体比を測定することにより、尿中 Testosterone の起源を識別可能とする GC-IRMS 法は、UGT2B17 遺伝子型を問わず Testosterone 製剤の使用を検知可能であった。しかし、GC-IRMS 法は、コストが高く、長い分析工程が必要なためすべての競技者に検査を適用することは困難である。

本研究から、T/E による世界統一基準閾値をもとにした Testosterone ドーピング検査法は、その有効性に限界があることが明らかとなった。本研究の成果を踏まえ、日本においては、競技者各個人の T/E や steroid profile を追跡する手法で、Testosterone ドーピングの検査を開始するに至っている。

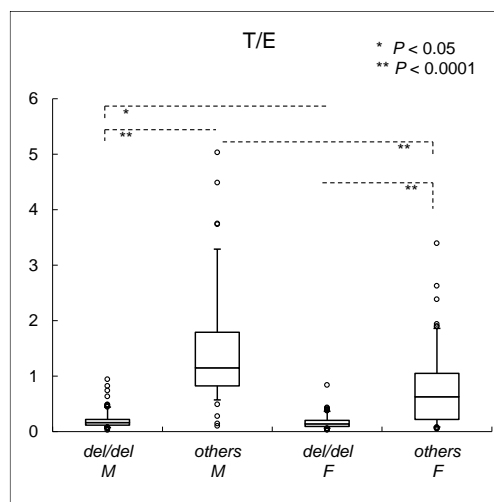


Fig. 2. Box plots of T/E ratios.

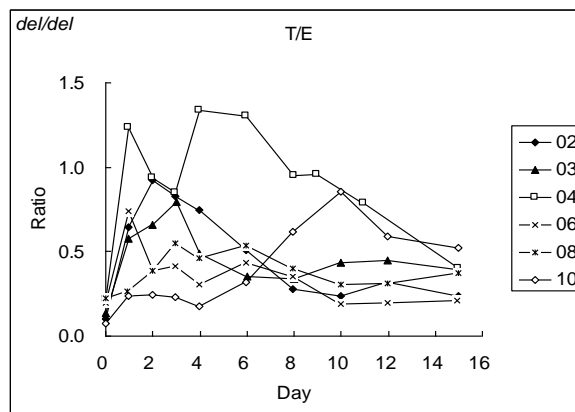


Fig. 3. T/E ratios after injection of testosterone enanthate into *del/del* subjects (subjects- 02, 03, 04, 06, 08 and 10).

第2章 成長ホルモン分泌刺激製剤 GHRP-2 の UPLC-MS/MS を用いたドーピング検査法の開発

遺伝子組換え成長ホルモン (rhGH) は GH 分泌不全症治療薬として、GH 分泌刺激製剤 GHRP-2 (Fig. 4) は診断薬として承認販売されている。一方、インターネット上では GHRP-2 を含有するサプリメントが販売されており、競技者による GHRP-2 の乱用が懸念されている。はじめに、現行の WADA 承認試験法である「GH isoform differential immunoassay」法の世界統一基準による rhGH ドーピング検査法の妥当性について検討した。検査法の原理は、下垂体から分泌される GH は複数の同族体から構成されているのに対して、大腸菌から生成される rhGH は、22-kDa のみからなることに起因する。すなわち、rhGH を使用すると循環血中の 22-kDa GH

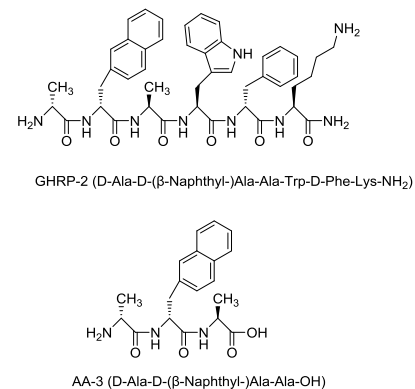


Fig. 4. GHRP-2 and AA-3.

濃度 (Rec) が上昇し、内因性 GH 同族体濃度 (Pit) は negative feedback により低下するので、その比率 (Rec/Pit) の上昇から rhGH の使用を検出する。まず、rhGH (0.04 mg/kg, n = 5) または成長促進因子 GHRP-2 (100 μg 塩酸塩, n = 10) を投与後の血清試料を用いて「GH isoform differential immunoassay」による検出可否について検討した。その結果、rhGH 投与後の Rec/Pit は、日本人健常者の基準値 (n = 100) と比較して有意に高値を示し (P<0.001)、WADA 基準閾値に基づくドーピングの判定が可能であった。しかし、GHRP-2 投与後は、GH 濃度の顕著な上昇を認めたものの、Rec/Pit は日本人健常者の基準値と比較して有意差は認められず

(P>0.05)、WADA 承認試験法では検出できないことが明らかとなった。次に、rhGH と GHRP-2 の併用投与による Rec/Pit への影響を検討した。Fig. 5 に示すように、rhGH (0.04 mg/kg, n = 10) 投与後に Rec/Pit が顕著に上昇し

(P<0.001)、引き続き GHRP-2 (100 μg 塩酸塩) 投与により 2.5 時間から 4.5 時間において、Rec/Pit が減少した。このように、GHRP-2 の使用は、rhGH ドーピングの隠ぺい効果を有していることが明らかとなった。

rhGH ドーピング検査法の弱点を補うために、ヒト尿中 GHRP-2 およびその代謝物 D-Ala-D-(β-naphthyl)-Ala-Ala-OH (AA-3, Fig. 4) の UPLC-MS/MS による直接的な測定法を開発した。本法における GHRP-2 および AA-3 の検出下限は、それぞれ 0.05 ng/mL および 0.02 ng/mL であった。また、日間再現性は、それぞれ 1.9 – 4.3 % および 3.2 –

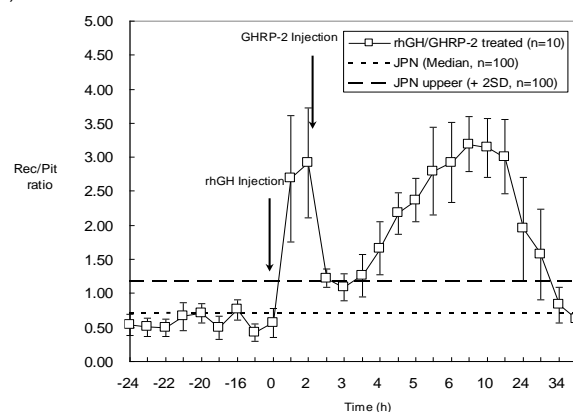


Fig. 5. Trends of Rec/Pit after rhGH/GHRP-2

3.9 %と良好な精度を示した。Fig.5 で示した GHRP-2 の投与により Rec/Pit が減少した時間帯 (2.5 – 4.5 時間) において、代謝物 AA-3 は、明瞭に検出が可能であり (Fig. 6)、24 時間後まで検出が可能であった。

本研究で開発した UPLC-MS/MS 法は、GHRP-2 の使用を検出できるだけではなく、rhGH ドーピング検査法の弱点を補うことが可能な方法である。

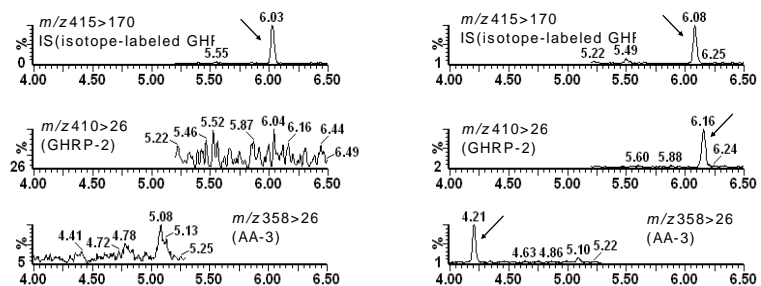


Fig. 6. MRM chromatograms after administration of GHRP-2. (left: 0 h, right: 4.5 h).

第3章 エリスロポエチン製剤ダルベポエチンアルファの UPLC-MS/MS を用いたドーピング検査法の開発

遺伝子組換え EPO (recombinant EPO: rEPO) 製剤は、腎性貧血治療薬として臨床で使用されているが、持久力系競技におけるドーピング行為が深刻な事態となっている。現在の EPO ドーピングの検査法は、WADA の承認した電気泳動法であるが、いまだに検出精度の高い質量分析法は確立されていない。本章では、Bottom-up アプローチにより、質量分析法を用いたヒト尿試料中のダルベポエチンアルファ (Darbepoetin alfa) の測定法を開発した。尿試料 10 mL を抗 EPO モノクローナル抗体により精製し、V8-プロテアーゼによる消化後、得られた Darbepoetin alfa に特異的なペプチド V₁₁

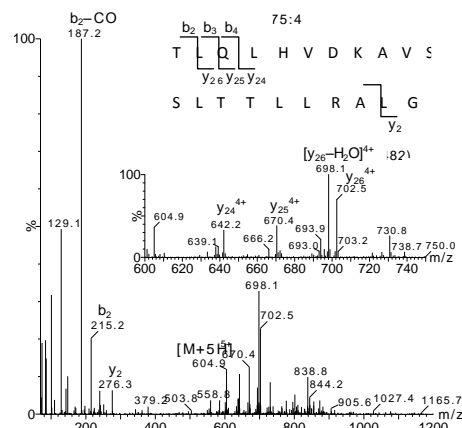


Fig. 7. Product ion mass spectrum of the peptide V₁₁.

(⁹⁰TLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKE¹¹⁷, Fig. 7) を UPLC-MS/MS により測定した。その結果、本法における Darbepoetin alfa の検出下限は、1.2 pg/mL であった。また、日間再現性は、11.3 – 13.7 %と良好な精度を示した。Darbepoetin alfa 15 µg の静脈内投与前後の尿試料の MRM クロマトグラムを

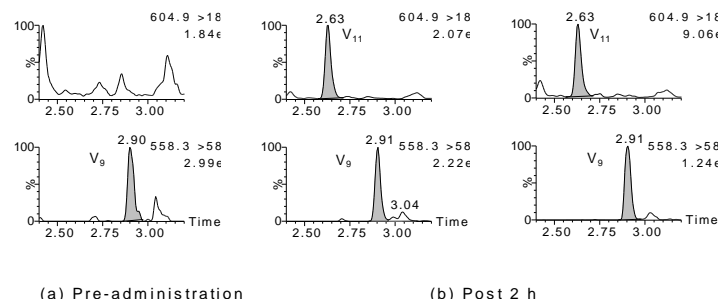


Fig. 8. MRM chromatograms after administration of darbepoetin alfa. (left: 0 h, middle: 2 h, right: 47 h)

Fig. 8 に示した。Darbepoetin alfa および内因性 EPO に共通のペプチド V₉ (⁶³VWQGLALLSE⁷²) は投与前後で検出されているのに対して、ペプチド V₁₁ は、投

与後に認められ、少なくとも 47 時間まで検出が可能であった。本法は、現行の WADA 承認試験法である等電点電気泳動法が、分析に 3 日を要するのに対し、わずか半日での迅速分析を可能とした。本法は、質量分析によるヒト尿中の EPO 製剤の検出をドーピング検査に適用可能とした最初の報告である。

本研究は、現行の Testosterone ドーピング検査法は、遺伝子多型が考慮されていないという問題点を明らかとし、日本における検査体制の見直しを喚起した。また、乱用が懸念されているものの、検査法が確立されていない成長促進因子 GHRP-2 および Darbepoetin alfa の UPLC-MS/MS を用いたドーピング検査法を開発した。本研究成果が、健全なスポーツの脅威であるドーピングの撲滅に寄与し、競技者のみならず青少年への健康被害を防止することに活かされることを願うものである。

【研究結果の掲載誌】

- (1) *Drug Test. Anal.* **2013**, 5, 166–181.
- (2) *Drug Test. Anal.* **2010**, 2, 548–556.
- (3) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, 24, 2046–2056.
- (4) *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 1317–1329.

論文審査の結果の要旨

岡野雅人氏の博士学位申請論文は、筋肉増強作用を有するタンパク同化ステロイドホルモン、成長ホルモンに代表される成長促進因子および持久力向上効果のある造血ホルモンドーピングを対象として、現行の検査法の妥当性の検証と改良を行ったものである。

ドーピング検査においては、元来生体内には存在しない興奮薬や利尿薬などは、検出されたことによりドーピングと判定することが可能である。筋肉増強作用を有するタンパク同化ステロイドホルモン、成長ホルモンに代表される成長促進因子および持久力向上を期待する造血ホルモンの使用を検出することは困難を伴う。その最大の理由は、ホルモン製剤は単に検出するだけでなく、本来生体内にあるホルモンと体外から摂取したホルモン製剤とを認識する必要があることが挙げられる。実際、タンパク同化ステロイドホルモンの検出例の中でもテストステロンが最も多いのは、検出された時、競技者が言い逃れる可能性があると考えられる。本論文はホルモンドーピングに焦点を当て、ドーピング検査の有用性を示したものである。

第1章では、タンパク同化ステロイドホルモンであるテストステロン製剤のドーピング検査における妥当性について検討した。競技者による筋肉増強効果を意図したタンパク同化ステロイドホルモン製剤の不正使用は、数十年來スポーツにおける重大な懸案事項となっている。タンパク同化ステロイドホルモンによるドーピング検査における課題はテストステロン製剤を使用した場合の、外因性と内因性の異同識別である。テストステロン製剤によるドーピングを検知するため、世界アンチドーピング機構(WADA)は一次スクリーニング検査における世界共通の判断基準を設けているが、内因性ステロイドホルモン等の尿中排泄については、アジア人種と欧米人種とでは大きく異なる可能性があり、その基準を見直すべきとの議論がなされてきた。そこで、日本人競技者に対して、より実効性のあるドーピング検査を実施するため、日本人スポーツ競技者のテストステロンのグルクロン酸抱合に関与する遺伝子多型および内因性ステロイドホルモンの尿中のプロファイルを検討した。さらに、これまで実施例がなかった女性に対するテストステロン製剤の投与試験を行った。投与前後の現行のWADA承認試験法により分析し、妥当性を検討した。その結果、世界統一基準閾値をもとにしたテストステロンドーピング検査法は、有効性に限界があることを明らかにした。

第2章では、成長ホルモン放出ペプチド(GHRP-2)のドーピング検査法の開発を目的とした。GHRP-2は成長ホルモン分泌不全症の診断薬として承認販売されている。一方、医薬品としては販売されていないにもかかわらず、インターネットではGHRP-2を含有するサプリメントが販売されており、容易に入手が可能である。競技者によりGHRP-2が乱用されている可能性が懸念されている。遺伝子組換え成長ホルモン(rhGH)の予試験を行いWADAが承認したrhGHのドーピング検査法の妥当性を検討した。また、GHRP-2の投与試験を行い、rhGHのドーピング検査法による検出可否について検討した。本章で検討したUPLC-MS/MS法は、ドーピング検査に適用することにより、GHRP-2ドーピング検出を可能にしたばかりか、rhGH検査法の弱点を補うことも可能となった。

第3章では、造血ホルモンのエリスロポエチン(EPO)製剤であるダルベポエチンアルファの質量分析によるドーピング検査法の開発を検討した。遺伝子組換え技術により開発されたEPO製剤は、腎性貧血治療に大きく貢献した。一方、スポーツ競技の世界では、酸素運搬能を向上させる目的で、長距離自転車競技者によるドーピング行為へとつながる結果となった。EPO製剤によるドーピングは、後を絶たない状況である。現在、WADAが承認したEPOドーピングを直接検出する方法は、等電点電気泳動法であるが、検査には3日間必要である。ドーピング検査や法医鑑定では、最も信頼性の高い分析法は質量分析法である。EPO製剤のドーピング検査法に質量分析法は用いられ

ていなかった。本章では、質量分析法で EPO 製剤のドーピング検査を可能にし、半日の分析時間で、ダルベポエチンアルファの分析を可能にした。

以上、本研究は、現行のテストステロンドーピング検査法は、遺伝子多型が考慮されていないという問題点を明らかとし、日本における検査体制の見直しを喚起した。また、乱用が懸念されているものの、検査法が確立されていない成長促進因子 GHRP-2 およびダルベポエチンアルファの UPLC-MS/MS を用いたドーピング検査法を開発した。本研究成果が、健全なスポーツの脅威であるドーピングの撲滅に寄与し、競技者のみならず青少年への健康被害を防止することに活かされることが期待される。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として十分な価値を有するものと認める。