



Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography / combustion / isotope ratio mass spectrometry

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード: 作成者: 植木, 眞琴 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1598

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 321号	学位授与年月日	平成12年 2月18日
氏名	植木真琴		
論文題目	<p>Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry (ガスクロマトグラフ熱分解炭素同位体比質量分析法による尿中外因性デヒドロエピアンドロステロンの尿中排泄の解析)</p>		

博士(医学) 植木眞琴

論文題目

Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry

(ガスクロマトグラフ熱分解炭素同位体比質量分析法による尿中外因性デヒドロエピアンドロステロンの尿中排泄の解析)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)は代表的な副腎由来ステロイドの一つで、おもに硫酸抱合体となって尿へ排泄される。米国ではDHEAによる老化防止の民間補充療法が試みられるようになり、一般市場でDHEA含有補助栄養食品が販売されている。近年スポーツ選手の間でもDHEAが蛋白同化ステロイドの代用品として乱用されるようになったため、国際オリンピック委員会は1997年にDHEAを禁止薬物に指定したが、体内で産生されるDHEAと外因性DHEAと識別する適当な方法がなく、判定方法の確立が望まれていた。本研究ではヒトステロイドが主として肉類の食物中コレステロールより誘導されるのに対して、合成ステロイドは大豆などの高等植物から得られるフィトステロールを原料として合成されることから、炭素同位体比の差異によるDHEAの検出を試み、そのドーピング検査法を確立した。

〔方法〕

市販ステロイド製剤26種、日本人健常成人男女各10人から採取した一日蓄尿計20検体、健常成人男子5名に、説明と同意のもと自主的に50mgの市販DHEA含有補助栄養食品を服用願い、投与3日後まで個別に採取された尿をそれぞれ試料とした。さらに長野オリンピック参加各国男女選手のうち、ドーピング検査で薬物使用の形跡が認められなかった尿445例についても同様に炭素同位体比の測定を行い、人種差の影響の有無を検証した。主な測定対象成分は、DHEAのドーピング判定上決め手となる硫酸抱合型DHEAおよびそのジオール型代謝物 5α -アンドロスタン- 3α 、 17β -ジオール(以下 5α -ジオール)、 5β -アンドロスタン- 3α 、 17β -ジオール(以下 5β -ジオール)の各グルクロン酸抱合体である。また男性ステロイドと代謝上の関連がなくドーピングの影響を受けないと予想されるグルクロン酸抱合型プレグナンジオール(P2)の炭素同位体比も測定し、個人差や食習慣の違いが測定値に及ぼす影響の補正指標とした。

尿をBond Elute C_{18} に通して脱塩後、疎水性陰イオン交換体triethylamino hydroxypropyl LH-20により各ステロイドを遊離、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体の3画分に分画した。グルクロン酸抱合体は大腸菌由来の β -グルクロニターゼで、硫酸抱合体はリング貝由来のアリルスルファターゼでそれぞれ加水分解しアグリコンを得た。グルクロン酸抱合型ステロイドはさらにGirard's reagent-T(ヒドラジン試薬)で処理してケトステロイドを除去し、ジオール型ステロイドを得た。これら二画分抽出物を無水酢酸でアセチル化し、得られたエステルを測定に供した。

炭素同位体比の測定には熱分解炉を介してガスクロマトグラフ(GC)を接続した炭素同位体比質量分析Isoprime(Micromass, Manchester, UK)を用いた。DB-17カラムを経てGC分離された各ステロイドはヘリウム気中で摂氏850度に加熱した酸化銅触媒管に導入され、ここで炭酸ガスと水に分解したのち液体窒素

浴中で乾燥され、 $^{13}\text{CO}_2$ と $^{12}\text{CO}_2$ の比率がイオン m/z :44と m/z :45にてそれぞれ同時測定された。得られた同位体比はアセチル化による影響を補正の上、標準標記に従い δ 値(国際炭素同位体標準品 PeeDeeBelemnite:PDBからの千分率偏差:‰)で表した。

[結果]

市販男性ステロイド合成品26種の δ 値は -30.1 ± 2.6 で、その値は報告されているC3植物由来成分の δ 値と良く一致した。一方日本人健常者の尿中DHEA、 5α -ジオール、 5β -ジオール、P2の各 δ 値はそれぞれ男子で -19.0 ± 0.9 、 -16.4 ± 2.7 、 -19.0 ± 1.8 、 -20.6 ± 0.9 、女子で -18.6 ± 1.0 、 -15.5 ± 2.4 、 -17.5 ± 2.7 、 -20.0 ± 0.5 で男女間に有意差はなく、すべての尿中内因性ステロイドが合成ステロイドより有意に高い δ 値を示した。長野五輪で採取された欧米人男女選手を主な母集団とする尿試料では、上記4種のステロイドの δ 値はそれぞれ -20.3 ± 2.1 、 -17.5 ± 3.5 、 -20.0 ± 2.8 、 -21.0 ± 1.7 であり、日本人に比べて1から2%低かったが有意な差ではなかった。

DHEA 50mg経口投与前後の尿中DHEA濃度は投与後速やかに上昇し、72時間後にはほぼ基礎値まで戻ったが、個人差が大きく一定の傾向が認められないため、濃度によるドーピング判定は不可能と考えられた。一方尿中DHEAの推移を δ 値で見ると、全例で投与6から8時間後に極小値を示し、以後72時間にかけて緩やかに投与前値に復帰した。測定された極小 δ 値は、いずれのボランティアにおいても投与前値に比べて4から6%で有意に低く、外因性DHEAによって尿中に排泄されるDHEAの ^{13}C 含量が有意に低下することが確認された。代謝物の 5α -および 5β -ジオールでも同様に δ 値の有意な低下が見られたが、P2の δ 値はDHEAの投与に関わらずほぼ一定であり、各人の内因性ステロイドの δ 値を代表していると考えられた。

以上の結果を踏まえ本法を実際の検査に適用し、DHEAドーピングが疑われた5例について追跡調査を行った。1例ではDHEA濃度が $1,590\text{ng/ml}$ で、DHEA、 5α -および 5β -ジオールの δ 値は -23.9 、 -24.0 、 -25.1 と有意な低値であり、それらのP2に対する相対 δ 値もそれぞれ1.37、1.37、1.43と約40%の偏差が認められた。本例では採尿票にDHEA服用の申告があり、 δ 値の低下とDHEA服用の関連は明かであった。その他の3例ではDHEA濃度が2,410、2,470、4,030(ng/ml)と高値を示し、3種の δ 指標は前記の例同様有意の低値を示した。これら3例ではP2に対する相対 δ 値は1.30から1.93と著しい偏差が認められ、DHEAドーピングと判定された。一方他の1例では、尿中DHEA濃度は4,660と高値を示したものの、3種の δ 指標は正常範囲内であり、相対 δ 値も0.81、0.93、1.05といずれも正常範囲内であり、生理的な高DHEA排泄であると判定された。以上の結果から、上記4成分の δ 指標の絶対値、およびP2の δ 値に対する他の3種のDHEA関連ステロイドの相対 δ 値を指標とすることによってDHEAドーピングと生理的なDHEA高排泄者との区別が可能であることが確認された。

[結論]

本研究により、合成品DHEAの ^{13}C 含量がヒト体内で合成されるDHEAに比べて有意に低いこと、DHEA製剤の服用により尿中に排泄されるDHEAおよびその主代謝物の ^{13}C 含量も同様に低下することが確認された。生理的な高DHEA排泄者はテストステロンに比べて発生頻度が高く、濃度測定に基づく従来の検査法では偽陽性が避けられない。本法は、DHEAの炭素同位体比を測定し、化学構造が同じで ^{13}C 含量の低い外因性ステロイドをより直接的に検出する方法であり、性差、人種差の影響をほとんど受けないという優れた特徴をもつ。本研究は外因性テストステロン関連化合物、テストステロン、アンドロステンジ

オン、ジヒドロテストステロンの検出が可能であることも示しており、今後国際的ドーピング検査への普及が期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、プリカーサーステロイドの一つ、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)の検出方法に関するものである。DHEAは近年老化防止の民間補充療法やスポーツにおける蛋白同化剤の代用品として使用されている。国際オリンピック委員会は1997年にDHEAをドーピング禁止薬物に指定したが、生体内で産生される副腎由来のDHEAと外部から投与されたDHEAを識別する適当な方法がなく、判定方法の確立が望まれていた。DHEAの尿中排泄量は加齢によって著しく減少し個人差も大きいいため、その濃度によって使用を判定することはできない。申請者らはヒトステロイドが主として肉類などの食物中コレステロールから生合成されるのに対して、合成ステロイドは大豆などの高等植物から得られるフィトステロールを原料として化学合成される事に着目し、ステロイド骨格の炭素同位体比の差異からドーピング検出を行う方法について検討した。

本研究では、主として次のような点について検討された。

- 1) 試料の前処理方法
- 2) ガスクロマトグラフ熱分解同位体比質量分析計(GC/C/IRMS)による炭素同位体比の測定
- 3) 市販ステロイド製剤26種類の炭素同位体比の測定
- 4) 日本人健常成人男女各10人の尿中プレグナンジオール(P2)、DHEAおよび2種の 5α -、 5β -ジオール型DHEA代謝物の炭素同位体比とその分布
- 5) 長野オリンピック参加選手から採取した約450人の尿中上記4成分の炭素同位体比と分布
- 6) DHEAを投与したボランティア尿中上記成分の炭素同位体比の推移
- 7) 本法の実際の検査への適用性評価と炭素同位体比によるドーピング事例の解析

ステロイド以外の有機物も炭酸ガスと水に熱分解されるため、試料の抽出精製は精度上重要な因子であるが1)では自家合成の疎水性陰イオン交換樹脂TEAP LH-20を用いて尿ステロイドをグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体画分に分離し、その後酵素加水分解することで効率的に夾雑物が除去された。また2)ではステロイドをアセチル誘導体とすることにより高感度測定が実現した。炭素同位体比測定に際してアセチル化による影響を補正したのち、得られた結果を国際表記に従い δ 値[(試料の ^{13}C 含有の国際標準からの偏差/国際標準の ^{13}C 含有) $\times 1000$]で表した。3)では市販男性ステロイド26種の δ 値は -30.1 ± 2.6 で、合成原料として使用される大豆などのC3植物成分の δ 値と良く一致した。4)では日本人健常成人の尿中DHEA、 5α -、 5β -ジオール代謝物ならびにP2の各 δ 値はそれぞれ男子で -19.0 ± 0.9 、 -16.4 ± 2.7 、 -19.0 ± 1.8 、 -20.6 ± 0.9 、女子で -18.6 ± 1.0 、 -15.5 ± 2.4 、 -17.5 ± 2.7 、 -20.0 ± 0.5 であり有意な性差はなく、全てのステロイド成分が合成ステロイドより有意に高い δ 値(^{13}C 含量)を示した。5)では長野五輪で採取された欧米人男女選手を主な母集団とする尿試料で、それぞれ -20.3 ± 2.1 、 -17.5 ± 3.5 、 -20.0 ± 2.8 、 -21.0 ± 1.7 であり、日本人に比べて1から2%低かったが、同位体比には濃度で観察されるような人種による有意差は認められなかった。6)ではDHEA 50mg経口投与で、投与後尿中DHEA濃度

が速やかに上昇し72時間後にはほぼ基礎値まで戻ったが、濃度推移や排泄量の個人差が大きく一定の傾向が認められなかった。一方尿中DHEAの δ 値は全例で投与6から8時間後に4から6%の有意な低下を示し、以後72時間にかけて緩やかに投与前値に復帰した。5 α -および5 β -ジオール代謝物でも同様に δ 値の有意な低下が見られたが、P2の δ 値はDHEA投与の有無に拘わらずほぼ一定であり、各人の内因性ステロイドの δ 値を代表していると考えられた。従ってP2に対するDHEA及びその代謝物の相対 δ 値は、食生活などの個人差をより受けにくい指標として有用であった。7)では本法を日常検査に適用し、ステロイドプロファイルに異常が認められた10人の事例についてその原因を考察した結果、 δ 値の低下が見られた成分とそれらの濃度との関係から、テストステロン1例、ジヒドロテストステロン1例、アンドロステンジオン3例、DHEA4例がドーピング事例と判定された。DHEAドーピングが疑われた1例では、尿中DHEA濃度が4,660ng/mlと高値であったにも拘わらず、その絶対 δ 値、P2に対する相対 δ 値とも正常範囲内で、他の4例とは明かに異なる傾向を示した。この事から、当事例はドーピングではなく生理的な高DHEA排泄者であると判定された。

炭素同位体比によるドーピング判定法は性差、人種差、年齢差の影響を受けにくい優れた方法であり、長野オリンピックでの試験的実施の成果により、判定基準として使用されることが2000年版IOCドーピング規則に明記された。今後国際的な検査への有用性が期待される。

この発表の際、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 加齢によるDHEA低下の原因について
- 2) ステロイドの人種差について
- 3) DHEAの蛋白同化作用の強さとその作用機序について
- 4) DHEAの合成原料であるC3植物について
- 5) 菜食の場合の検査値への影響について
- 6) 炭素同位体比の具体的な測定方法について
- 7) GCオンライン炭素同位体比測定 of 技術的な問題点について
- 8) 尿におけるDHEAの存在形態と抱合形式について
- 9) アンドロステンジオンドーピング例におけるステロイドプロファイルについて
- 10) DHEA投与後の δ 値変動と、ドーピングを検出できる期間について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 松 島 肇
副査 大 橋 京 一 副査 三 浦 直 行