

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17840

研究課題名(和文)ドーピング検査の更なる適正化に向けた禁止物質の体内動態解析とその変動要因の特定

研究課題名(英文) Determination of pharmacokinetic properties of prohibited substances to optimize a process of doping test

研究代表者

小田 啓祐(Oda, Keisuke)

広島国際大学・薬学部・講師

研究者番号：60712594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ドーピング禁止物質である1,3-ジメチルアミルアミン(DMAA)のラットにおける体内動態を検討した。その結果、DMAAを静脈内に投与すると、35.2%が未変化体として尿中に検出された。また、尿をアルカリ化するとDMAAの尿中排泄は低下し、血中濃度は上昇した。また、DMAAは様々な組織に分布し、腎臓に最も多く蓄積した。一方、DMAAは経口投与または経皮投与によっても吸収されることが示された。以上の結果から、DMAAは腎臓における再吸収により血中濃度が長時間維持され、さらに経口以外の投与方法によっても容易に吸収されるため、経口摂取していない場合においてもドーピング検査時には注意が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回得られた知見は、ドーピング禁止物質の生体内運命を明らかにし、その制御因子を同定するものである。尿のpHが変化することにより、ドーピング禁止物質の尿中排泄が変化するため、検査時の「陽性・陰性」判断を誤ってしまう可能性が考えられる。また、DMAAのような塩基性の脂溶性低分子化合物の場合、皮膚などからも吸収されてしまうため、経口摂取以外の体内侵入経路を考慮する必要がある。このように、ドーピング禁止物質の体内動態変動要因を社会に広く周知させることにより、「うっかりドーピング」の回避、ドーピング検査の最適化に寄与できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The fate of 1, 3-dimethylamylamine (DMAA), a prohibited substance to athletes, was evaluated by determining plasma concentrations, urinary excretion rate, and tissue distribution after intravenous, oral and transdermal administration in rats. DMAA administered intravenously disappeared from plasma according to a biexponential curve. During 6 h after intravenous administration, 35.2% of DMAA dose was excreted into urine as an intact form. Alkalinized urine pH resulted in decreased urinary excretion rate and higher plasma concentrations of DMAA. The mean oral bioavailability of DMAA was 43.6%. When DMAA was applied to the skin, DMAA was recovered by 5.4% of dose in the urine for 7 days. In conclusion, DMAA was thought to be absorbed from anywhere, including the skin and distributed to various tissues. Long-term retention of DMAA in the body was, at least partly, due to the repeated reabsorption in renal tubules, though the extent of DMAA reabsorption depends on urine pH.

研究分野：薬物動態学

キーワード：ドーピング 薬物動態 腎排泄 LC-MS/MS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スポーツにおけるドーピング禁止物質は、競技における競技力を向上させる、または隠蔽する物質であり、禁止表に多数の化合物がリストアップされている。一部の量的閾値が明記されている物質を除き、尿などの検体にわずかでも検出された場合、ドーピング違反が成立する。近年の科学技術の向上により、物質の定量感度が上昇しており、これまで検出されなかった濃度においても陽性と判断されると考えられる。従って、製品情報に禁止物質の記載がない場合においても、何らかの原因で生じた禁止物質の「汚染製品」であった場合、微量の摂取によりドーピング検査で陽性と判断される事態が生じうる。または、「汚染製品」を経口的に摂取していない場合においても、わずかに経皮吸収・経肺吸収される物質では陽性と判断される事態が生じうる。このように、現在では競技者が意図的に競技力を向上される目的で禁止物質を摂取したのか、またはコンタミネーションなど環境からの汚染で摂取したのかの判断が曖昧となる。

さらに、尿中濃度が限りなく低い場合においても現在ではドーピング陽性と判断されるが、個々の物質ごとに薬物動態特性を解析しておけば、その消失半減期から禁止物質の血中濃度推移を予測でき、競技中に競技力が上昇するほどの濃度であったかを判断する基準となると考えられる。

各ドーピング禁止物質個々について、身体に及ぼす影響についての研究は盛んに行われているが、詳細な動態解析をしている報告は皆無であり、本研究はドーピング禁止物質の体内動態解析の礎となりうると考える。

### 2. 研究の目的

1,3-dimethylamylamine (DMAA)は塩基性の低分子化合物であり、アンフェタミンやエフェドリンと同様の作用を有するため、2010年に世界アンチ・ドーピング機構により禁止物質として指定された。近年、陸上競技、サッカーなど様々な競技において陽性を示す競技者が出ており、2014年までにDMAAに対する76件の陽性反応が検出されたと報告されるなど、非常に注目度の高い禁止物質である。DMAAに関しては経口投与後、尿中に排泄されるとこや(Perrenoud L et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009)、経口投与後の血中濃度推移(Schilling BK et al., BMC Pharmacol Toxicol. 2013)に関する論文が報告されている。また、天然のゼラニウムオイルに混入しているとの報告もあり、意図せず付着する可能性のある物質である(Gauthier TD, Anal Chem Insights 2013)。DMAAのような塩基性の低分子かつ脂溶性の化合物は皮膚や呼吸などの経口以外の経路から容易に体内に侵入すると考えられるが、このようなことはほとんど想定されていない。また、経口投与時のバイオアベイラビリティ、吸収メカニズム、組織分布、尿中排泄メカニズムについての情報は皆無である。そこで本研究ではDMAAの動態特性を解析し、ドーピング検査の更なる適正化に寄与する情報を蓄積する。

### 3. 研究の方法

- (1) 実験動物：DMAAの静脈内投与および経口投与実験では、SD系雄性ラット(8~9週齢)を用い、経皮投与実験ではHWY雄性ヘアレスラット(10週齢)を用いた。実験の前日に自由給水で絶食を行い、広島国際大学動物実験指針に従って実験を行った。
- (2) DMAAの静脈内投与：ペントバルビタールの腹腔内投与(30 mg/kg)により麻酔を行い、頸静脈にDMAAを1 mg/kgで投与した。投与後任意の時間に採血を行い、血漿を分離した。また、膀胱にカニューレを施し、経時的に採尿を行った。投与6時間後に断頭により安楽死させ、脳、腎臓、肝臓、肺、脂肪組織を単離した。また、別の実験で胆汁の回収のため胆管にカニューレを施し、胆汁を経時的に採取した。
- (3) 尿pHの変動によるDMAAの動態変化：尿のアルカリ化には、ラットの大腿静脈にカニューレを施し、1.19 mMのNaHCO<sub>3</sub>を1.0 mL/hで定速静注を行った。定速静注開始30分後に頸静脈にDMAAを1 mg/kgで投与し、NaHCO<sub>3</sub>の定速静注は実験終了まで継続した。尿の酸性化にはDMAAの投与20, 16, 1時間前に4% NH<sub>4</sub>Clを10 mL/kgで経口投与した。
- (4) DMAAの経口投与：ゾンデを用いて2 mg/kgでDMAAを経口投与した。採血時のみジエチルエーテルで麻酔し、経時的に採血を行い、血漿を分離した。
- (5) DMAAの経皮投与：尿中濃度解析にはヘアレスラットを用い、DMAA 5 mgを250 μLのりん酸バッファー(pH 7.0、25%エタノール含有)に溶解させ、背部に塗布した。代謝ケージで飼育し、経時的に尿を採取した。血中濃度解析にはSDラットを用い、ペントバルビタールの腹腔内投与(30 mg/kg)により麻酔を行い、腹部を剃毛後、尿中濃度解析と同量のDMAAを腹部に塗布し、経時的に採血を行った。

- (6) 解析：血漿、尿、胆汁サンプルは等量のアセトニトリルを加えて除タンパクを行い、組織サンプルは9倍量の50%アセトニトリルを加えてホモジナイズを行った。遠心後に上清を採取し、LC-MS/MSにより定量を行った。その際、内標準として2-Heptylamineを用いた。

#### 4. 研究成果

まず初めに、DMAAをラットに急速静注し、動態学的パラメータを算出した。その結果、DMAAの体内からの消失は二相性を示し、消失相から見積もられるVdは $1.94 \pm 0.13$  L/kg、 $t_{1/2}$ は $107.7 \pm 8.3$  min、 $AUC_{0-360min}$ は $26.0 \pm 0.2$   $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$ 、 $CL_{tot}$ は $38.4 \pm 0.2$  mL/min/kgと算出された (Fig.1)。また、尿中排泄率は360 minまでのデータから $36.1 \pm 0.4\%$ と算出された。Vdの値は全体液量よりも大きく、DMAAの組織移行性は高いことが示された。また、胆汁排泄や肝代謝はほとんどなく、腎排泄型の薬物であると考えられた。

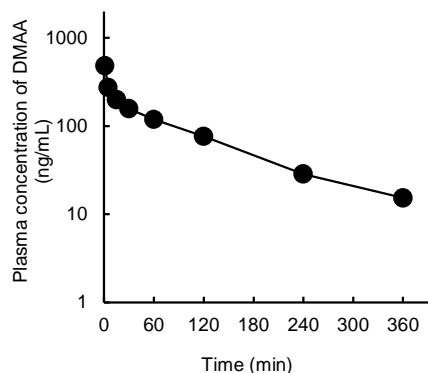


Fig. 1  
Plasma concentration of DMAA after intravenous administration

次に、経口投与および経皮投与時における体内動態を評価した。その結果、2 mg/kgで経口投与時には $T_{max}$ が15 min、 $C_{max}$ が $175.9 \pm 10.1$  ng/mL、バイオアベイラビリティは $43.6 \pm 10.4\%$ と算出された。なお消失に関するパラメータはDMAA静脈内投与時とほぼ同程度であった。従って、DMAAは消化管から速やかに吸収されるものと考えられた (Fig.2A)。

一方、経皮投与時においては、DMAAの血漿中濃度は速やかに上昇し、一定の値を示した。従って、経皮投与時はDMAAの吸収が持続的であると考えられた (Fig.2B)。また、経皮投与時における尿中排泄率をヘアレスラットを用いて検討した。その結果、経皮投与後の尿中排泄速度は時間の経過と共に減少したが、数日にわたって尿中で検出されることが示された (Fig.3A)。

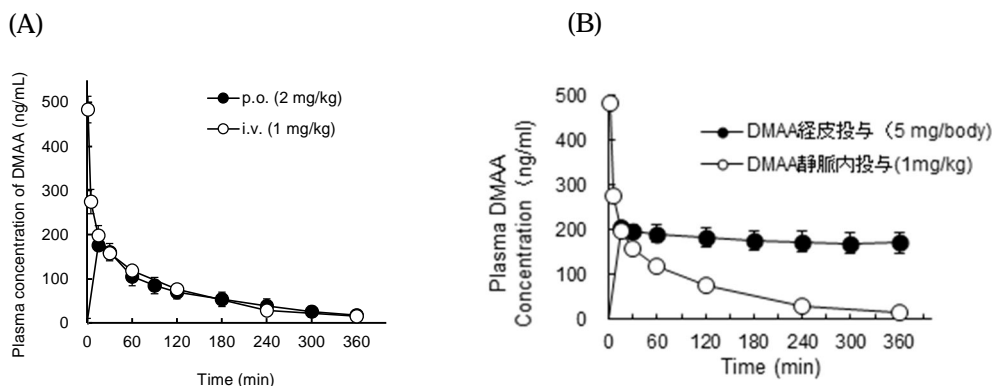


Fig. 2  
Plasma concentration of DMAA after oral (A) and transdermal (B) administration in rats.

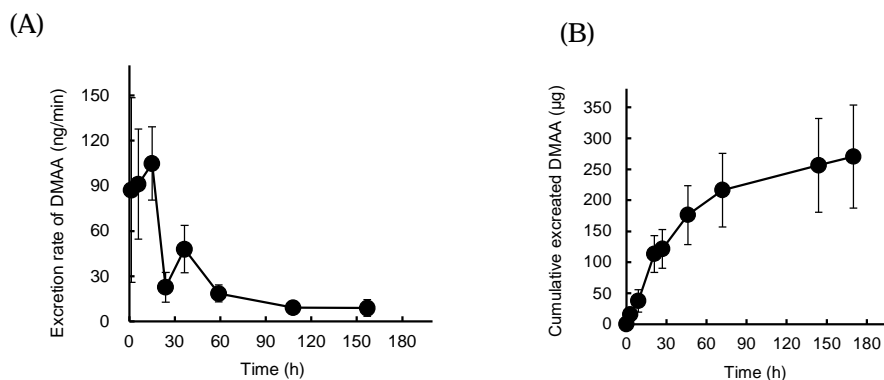


Fig. 3  
Renal excretion rate (A) and cumulative excretion amount (B) of DMAA after transdermal application in rats.

次に、DMAA の尿中排泄に及ぼす尿 pH の影響について検討した。その結果、尿をアルカリ化することにより、DMAA の尿中排泄は減少することが示された。一方、尿を酸性化させることにより、DMAA の血漿中濃度は減少傾向を示し、尿中排泄は顕著に増大することが示された。従って、DMAA は尿細管において pH 依存的に再吸収されていることが示され、尿の pH によって尿中への排泄が変動することが示された (Fig.4)。

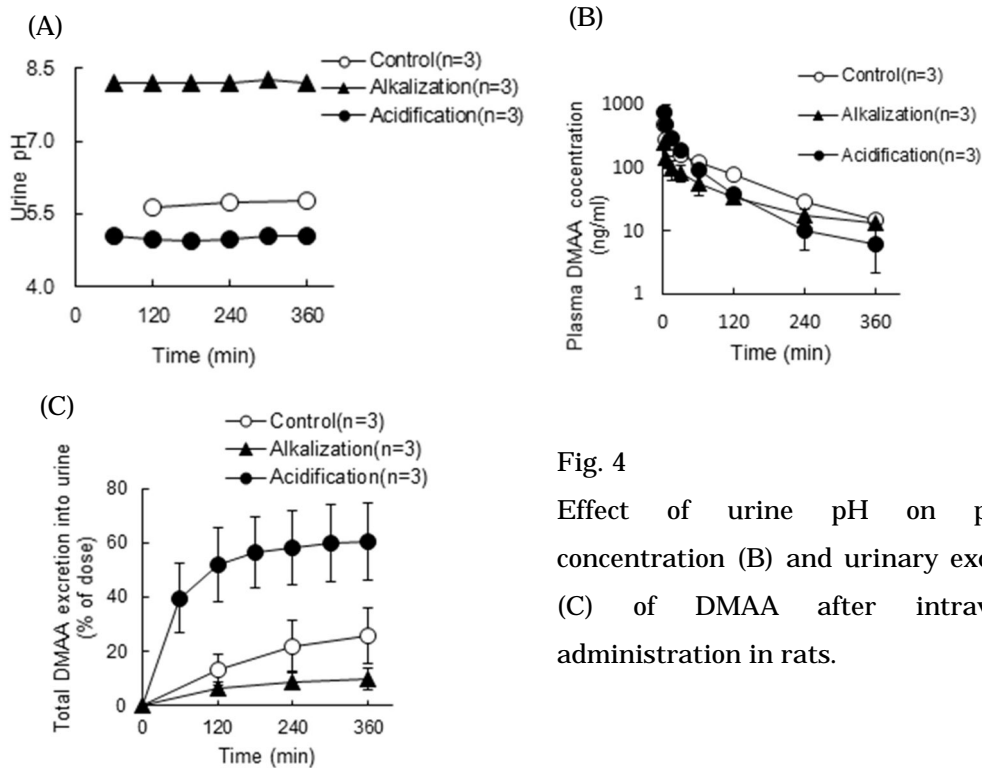


Fig. 4 Effect of urine pH on plasma concentration (B) and urinary excretion (C) of DMAA after intravenous administration in rats.

最後に、DMAA の腎排泄機構を明らかにするため、有機カチオントランスポーター阻害剤であるシメチジンの影響について検討した。シメチジン 20 mg/kg を DMAA の投与 20 分前に投与し、DMAA の血漿中濃度および尿中排泄量を測定したところ、シメチジンの投与により DMAA の血漿中濃度は上昇し、尿中排泄は低下することが示された。従って、DMAA の尿中排泄に有機カチオントランスポーターが関与するものと考えられた (Fig.5)。

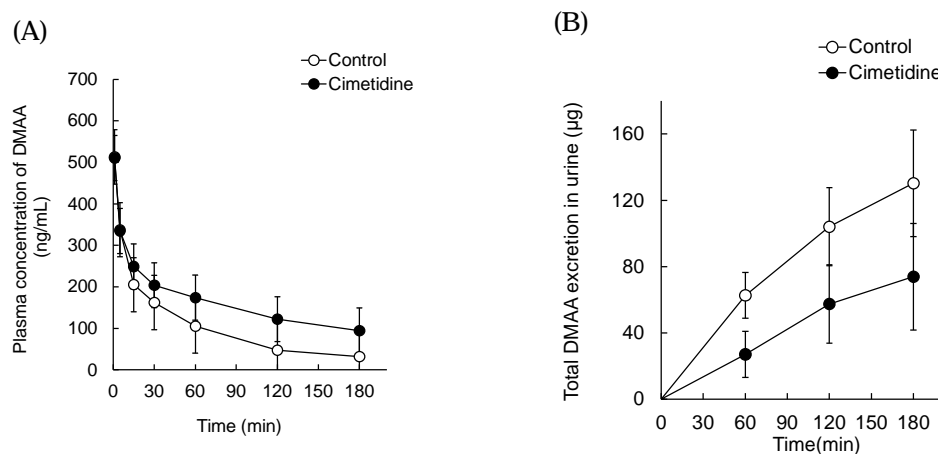


Fig. 5 Effect of cimetidine, an inhibitor of organic cation transporter, on plasma concentration (A) and renal excretion (B) of DMAA after intravenous administration in rats.

以上の結果から、ドーピング禁止物質である DMAA の体内動態が明らかとなった。DMAA のような塩基性の低分子脂溶性化合物は、経口や経皮などの経路から容易に吸収されることが示され、長時間にわたって尿中に検出されることが示された。また、尿の pH によりその尿中排泄は変動するため、ドーピング検査時には尿の pH も考慮する必要があると考えられる。また、体内侵入経路が多岐にわたるため、薬物の摂取が意図的であるかどうかを厳密に調べる必要があると考えられる。一方で、尿中排泄メカニズムは他の有機カチオン系の薬物と同様に、腎臓に発現する OCT2 や MATEs を介するものと考えられた。各トランスポーターに対する明確な寄与率は算出できていないが、これらのトランスポーターの基質薬物とは相互作用を引き起こすため、ドーピング検査時には DMAA の尿中排泄が変動するものと考えられる。

このように、様々な要因によりドーピング禁止物質の体内動態は変動するため、変動要因を熟知することは適切なドーピング検査の実施に寄与できるものと期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大津 真依、小田 啓祐、麻生 進太郎、森 信博
2. 発表標題 ラットにおけるドーピング禁止物質1,3-ジメチルアミルアミンの体内動態変動要因の探索
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----