

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11530

研究課題名(和文) 成長ホルモンの分子量の違いを利用した新しいドーピング検査法の開発

研究課題名(英文) Development of a New Doping Testing Method Using Differences in the Molecular Weight of Growth Hormone

研究代表者

石川 真由美 (Ishikawa, Mayumi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60398831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：GHには分子量が異なるいくつかのVariantがあり、分子量20,000のGH(20K-GH)は血中のGHの約6%を占め、GH産生に占める割合も一定の割合でほとんど変化がない。外部からのGH投与は、そのほとんどが分子量22,000のGH(22K-GH)であるため血中や尿中の20K-GHの割合が低下する。この特性を活かし、頭髪を20K-GHに特異的な抗体を用いて免疫染色をおこなうことで外部からのGH投与の有無の判定を試みた。正常人では毛根部で20K-GHに特異的な抗体に染まる部分が認められたが、GH分泌不全症でGHの補充療法を受けている患者の毛根では染まらないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、毛根部に成長ホルモン(GH)が一定期間、分子として残存することが明らかになった。また体内に少ない分子量20,000のGH(20K-GH)を、20K-GHに特異的な抗体を用いて毛根部で検出できることが明らかになった。

GHは体内にも存在する内因性ホルモンのために、今まではドーピングにGHを使用したか否かの判定が難しかった。頭髪の採取は侵襲が比較的少なく簡便であり、毛根部の20K-GHの免疫染色は、新たなドーピング検出方法につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There are several Variants of GH with different molecular weights. GH with a molecular weight of 20,000 (20K-GH) accounts for about 6% of GH in blood and its share of GH production is constant and hardly changes. External GH administration decreases the percentage of 20K-GH in blood and urine because most of it is GH with a molecular weight of 22,000 (22K-GH). Taking advantage of this characteristic, we attempted to determine the presence or absence of external GH administration by immunostaining head hair with an antibody specific for 20K-GH. It was found that the hair follicles of normal subjects were stained with antibodies specific for 20K-GH, but not those of patients with GH deficiency who were receiving GH replacement therapy.

研究分野：内分泌学

キーワード：成長ホルモン ドーピング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ドーピングの主流は体内に存在する内因性ホルモンなどの天然型生理活性物質を用いており、成長ホルモン(GH)も使用されている(植木 眞琴. BUNSEKI KAGAKU 63: 161-169, 2014)。GHは分子量の異なるいくつかの variants があり、大部分を占めているのは分子量 22,000 の GH(22K-GH)で薬品としても使用されている。同じく variants の一種で分子量 20,000 の GH(20K-GH)が、血中の GH の約 6%を占め、その割合はほとんど変化しない(Ishikawa M, et al. J Clin Endocrinol Metab. 84: 98-104, 1999.)。外部からの GH 投与があった場合には、自身の下垂体からの GH 分泌が抑制される。ドーピング目的に個体に GH を投与した場合には、その GH はほとんどが 22K-GH であるため、下垂体からの 20K-GH 産生は抑制され、血中や尿中の 20K-GH の割合が低下する。

GH の variants の分子量の違いを生かしたドーピング検査は過去にも開発されている。その検査は尿中の 20K-GH を測定する方法で、最後の GH 投与から約 2 日間で尿中 20K-GH 値が低下し、GH のドーピングの有無がわかる (Momomura S, et al. Endocrine J. 47: 97-101, 2000.)が、ドーピング検査として使用するには判定できる期間が短期間すぎて実用的ではなかった。

そこで我々は、頭髪を材料としたドーピング検査の開発を試みた。頭髪は侵襲なく採取でき、一か月に 1cm ほど伸長することから、毛根部から 1cm 刻みで頭髪を切断し、各部位を解析することで、1 か月ごとの薬物摂取歴を分析することが可能である(水野 大. ぶんせき 12: 589-590, 2017.)。体内に取り込まれた外部からの薬物は、毛乳頭に入り込んだ毛細血管部を介して毛根部に移行し、メラニン色素と結合して毛髪内部に蓄積するとされている(木倉 瑠理, 他. 国立医薬品食品衛生研究所報告 116: 30-45, 1998, H. Kimura, et al. J Anal Toxicol 23:577-580, 1999.)。外部から GH の投与があった場合には製剤として使用される GH がほとんど 22K-GH であることから 20K-GH の GH に占める割合が減少する。GH が頭髪内に取り込まれ、頭髪に残留する GH の分子量の解析ができれば、とくに 22K-GH と 20K-GH の比が解析できれば、外部からの GH 投与を知ることができる可能性がある。

これまで過去、数ヶ月間にさかのぼって、GH のドーピングを検出できる検査方法がなく、本研究が成功すれば、ドーピング検査の一助になると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では頭髪を用いた GH のドーピング検出方法を試みた。

そのため、(1) 頭髪内に GH が残存しているかどうかを確認すること、(2) 頭髪は一か月に 1cm ほど伸長することから、毛根部から 1~3cm 刻みで頭髪を切断し、各部位の GH、特に 20K-GH の残存量を解析することで、1 か月以上、遡って GH の投与歴を分析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象は健常人と、GH 分泌不全症で GH 補充療法を受けている患者と受けていない患者の 3 群とし、頭髪は各 3 本ずつ採取した(日本医科大学武蔵小杉病院倫理委員会承認番号 452-30-23)。

(2) 質量分析と western blot について

頭髪を毛根から 3cm おきに切断し、プロテインキナーゼ等を用いた酵素処理法によりアミノ酸を抽出し、質量分析計 (X500R QTOF システム, Sciex 社) にて質量解析を行った。また頭髪を粉碎し、western blot 法で GH が検出できるか否か試みた。

(3) 免疫染色について

① 抗 GH 抗体作製とその特性

20K-GH に特異的なマウスモノクローナル抗体(37-7C)と 20K-hGH と 22K-hGH の双方にほぼ同じ親和性をもつマウスモノクローナル抗体(41-6G)を、それぞれ作製した。GH の 3 次元構造が保たれている状態であれば、20K-GH のみ、または 20K-GH と 22K-GH の両方を検出できることを、2 種類の抗体を用いたサンドイッチ法(うち 1 種類は今回作製した抗体)を用いて確認をおこなった(富士フィルム和光純薬株式会社に委託)。

② 免疫染色について

・ 正常人、成人成長ホルモン分泌不全症 (AGHD) で GH の補充を受けている患者(つまり 22K-GH を自己注射している患者)と AGHD で GH の補充を受けていない患者の頭髪を、毛根部、毛根から 1cm、毛根から 2cm のところで切断し、99%メタノールに入れ、一晚以上、4°C で固定した。

・ 上記、頭髪を PBS にて洗浄し、ブロッキングを行った後、上記の 2 種類の抗体を 1 次抗体として用いてインキュベートし(抗体は 100 倍希釈、4°C、48 時間)、その後、2 次抗体(抗マウス IgG 抗体)で検出をおこなった。

4. 研究成果

(1) 質量分析と western blot の結果

GH が頭髪内に取り込まれているのか、その量は本研究で使用する質量分析計 (X500R QTOF システム, Sciex 社) で検出できるのかが、一つの課題であり、我々は、まず正常人の毛髪から GH を検出することを試みた。下垂体から抽出した GH は質量分析計で検出できたが、頭髪はケラチンが多く GH の検出ができなかった。そこで Western blot 法を用いた検出を試みたが、GH は検出できなかった。

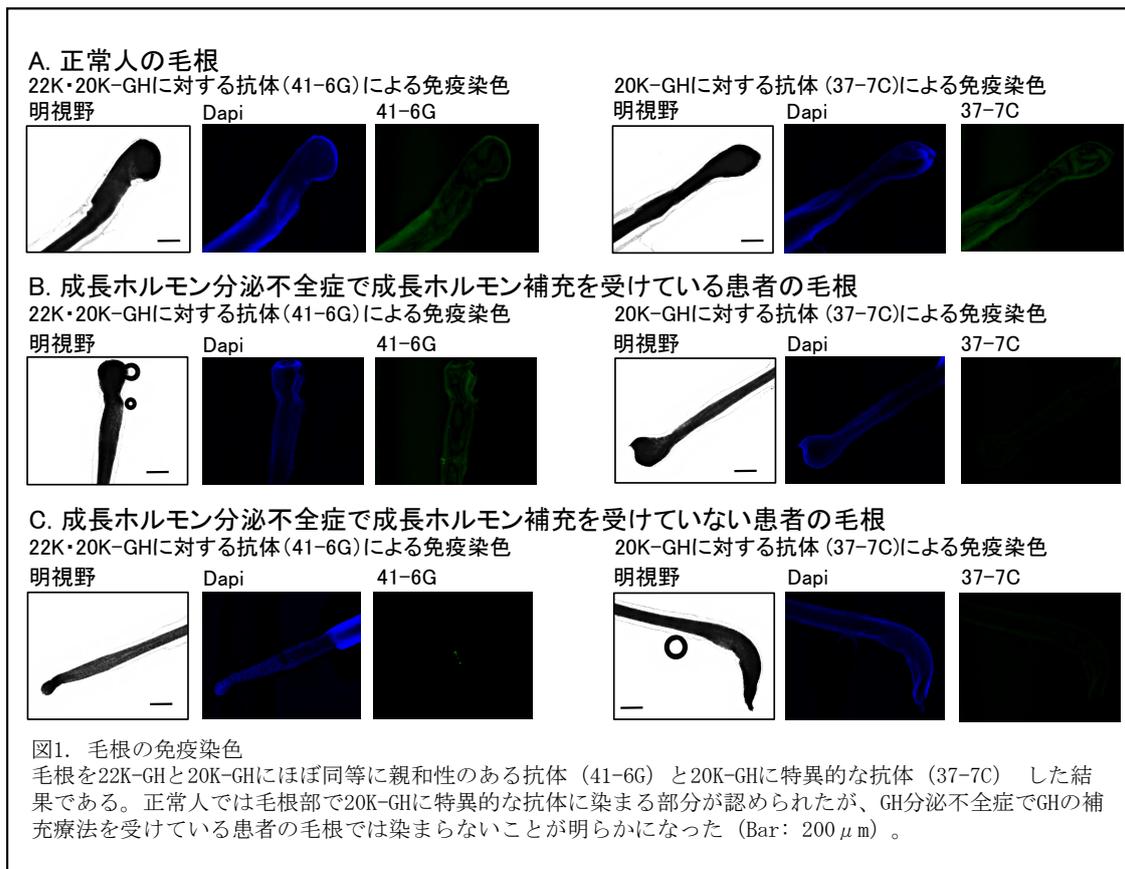
(2) 正常人、ならびに成人成長ホルモン分泌不全症 (AGHD) で GH の補充を受けている患者 (つまり 22K-GH を自己注射している患者) と AGHD で GH の補充を受けていない患者の頭髪を、前記の 2 種類の抗体を用いて免疫染色をおこなった。

正常人では、毛根部分で 22K-GH と 20K-GH にほぼ同等に親和性のある抗体 (41-6G) と 20K-GH に特異的な抗体 (37-7C) 双方に染まった (図 1A) が、毛根から 1cm、3cm の部分は、双方の抗体に全く染まらなかった。また 37-7C 抗体は 41-6G 抗体よりも露光時間を長くしないと検出ができず、20K-GH と 22K-GH の比を解析することはできなかった。

成人成長ホルモン分泌不全症 (AGHD) で GH の補充を受けている患者の毛根では 22K-GH と 20K-GH にほぼ同等に親和性のある抗体 (41-6G) には染まったが、20K-GH に特異的な抗体 (37-7C) にはかなり露光時間を長くしても明らかに抗体に陽性の細胞は認められなかった。また正常人と同様、毛根から 1cm、3cm の部分は双方の抗体に全く染まらなかった (図 1B)。

AGHD で GH の補充を受けていない患者の頭髪の毛根では、上記の双方の抗体に陽性の細胞は認められなかった (図 1C)。

今後の課題として、頭髪の採取時に毛根組織を破壊してしまうと検体として使用できないこと、また正常人でもこれらの抗体における染まり具合が必ずしも一定でないこと (アーチファクトが多い)、どのくらい前に毛根にとり込まれた GH を免疫染色で見ているのかわからないこと、20K-GH の割合を免疫染色の結果から推定することは困難であることなどが挙げられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	石川 隆紀 (Ishikawa Takaki) (50381984)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関