

分担研究報告書

油症認定患者血液中 PCB 等追跡調査における分析法の改良およびその評価に関する研究

分担研究者 吉村健清 福岡県保健環境研究所 所長
研究協力者 梶原淳睦 福岡県保健環境研究所 生活化学課 専門研究員
飯田隆雄 (財)北九州生活科学センター 理事長

研究要旨

油症追跡調査の PCB 及び PCQ の分析法は機器が整備されて長い年月が経過し精度の維持が困難になってきた。このため近年開発された分析法への移行が課題となっている。本研究では各油症追跡班で行っている PCB 及び PCQ の分析法について実施状況を調査し、今後の分析法及び精度管理のあり方を検討した。その結果、各追跡班ごとに行っている PCB,PCQ の分析を福岡、長崎、広島はこれまで通り追跡班で行うが、その他の追跡班分は一括して分析を行うこと、分析データの信頼性を確保するため定期的に同一試料を配布しクロスチェックを行うことが妥当と思われる。

A. 研究目的

「血中 PCB 濃度及び性状の異常」は油症診断基準の所見のひとつである。「血中 PCB 濃度」は一般人でも高い場合があるため「血中 PCB の性状」の異常が重要である。「PCB の性状」とは、PCB のパックドカラムガスクロマトグラムピークパターン (GC パターン) のことであり、その異常とは油症認定患者の PCB GC パターンが一般人とは異なる特有の GC パターンを示すことをさしている。具体的には油症認定患者では血中 PCB GC パターンのピーク 1 が相対的に低く、ピーク 5 が相対的に高いことに基づいており、最も濃度の高いピーク 2 を基準として、これに対する比を取ることで、油症認定患者と一般人の違いを非常に明確にすることができる。

PCB 及び PCQ の分析は PCB のパックドカラムによる GC/ECD 検出器による分析法が行われてきたが、PCB のパックドカラムによる GC パターン法のピーク 1、ピーク 2 およびピーク 5 の比が、それぞれのピークを構成する主成分の PCB #

118、PCB#153 および PCB#156 の相対比で置き換えられることが明らかになった¹⁾。すなわち、PCB#118、PCB#156 および PCB#153 の 3 つの PCB を分離定量することで、PCB 同族体パターン解析をより厳密に行うことができる。福岡県では PCB 同族体をゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 及び高分解能ガスクロマトグラフィー / 高分解能質量分析法 (HRGC/HRMS) により迅速・精密に分離分析できる分析法を開発し実施している²⁾。

従来のパックドカラム GC/ECD 検出器の分析法は多くの油症追跡班で実施されているが機器が整備された後、長い年月が経過し機器の精度維持が困難になってきた。また、正確で高感度な近年開発された分析法への移行が課題となっている。本研究では各油症追跡班で行っている PCB 及び PCQ の分析法について実施状況を検討し、今後の分析法及び精度管理のあり方を検討した。

B. 研究方法

油症追跡班の行政担当者を通じ、分析担当者に PCB 及び PCQ の分析法について実施状況及び問題点に関するアンケートを配布し、今後の精度管理のあり方を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は PCB 及び PCQ の分析方法の調査を目的としたもので、個人情報等は対象としていない。

C. 結果及び考察

各追跡班の PCB 及び PCQ の分析法は福岡県を除き従来のパックドカラム GC/ECD 検出器を用いた分析法で行っていた。分析方法を変更しない方がデータの継続性が維持されるが、老朽化した機器を更新できないことや検査員の移動に対し技術の継承に困難を生じていた。また、福岡、長崎、広島を除くと年間の検査件数が 20 検体以下であり効率的でない。既に、一部の追跡班では福岡県で PCB 及び PCQ の分析を行っていた。福岡、長崎、広島は分析体制も充実しており、データの継続性を維持するためにも分析を続けることが望ましいと思われる。その他の追跡班の検体は合計で 70 件程度であり、一ヶ所の分析機関に委託し分析することが妥当と思われる。

福岡県では PCB、PCQ の分析を福岡県、福岡市、北九州市及び第一薬科大学で実施しているが、毎年、データの相互比較のため同一試料を陽性コントロールとして分析するクロスチェックを行っている。しか

し、追跡班間で最近は精度管理のためのクロスチェックは行われていない。今後、安定的に正確なデータを得るには定期的なクロスチェックの実施が必要と思われた。

D. まとめ

油症追跡班の PCB 及び PCQ の分析法について実施状況を調査し、今後の分析法及び精度管理のあり方を検討した。その結果、データの継続性を考慮し、各追跡班ごとに行っていた PCB、PCQ の分析を福岡、長崎、広島はこれまで通り追跡班で行い、その他の追跡班分は分析機関に委託し一括して分析すること、分析データの信頼性を確保するため同一試料を配布しクロスチェックを行うことが妥当と思われる。

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

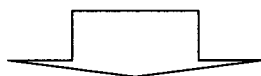
F. 参考文献

1)中川礼子、芦塚由紀、堀 就英、平川博仙、飛石和大、飯田隆雄：血中 PCB パターン判定における従来法と異性体分析法の同等性について。福岡医誌 94：144-147, 2003.

2)堀 就英、飛石和大、芦塚由紀、中川礼子、戸高 尊、平川博仙、飯田隆雄：ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 及び高分解能ガスクロマトグラフィー/高分解能質量分析法 (HRGC/HRMS) による血中 PCB 異性体分析。福岡医誌 96：220-226, 2005.

PCB、PCQ分析機関（2006年）

追跡班	分析機関	2006年検体数
関東以北班	福岡県保健環境研究所	10
千葉県	千葉県衛生研究所	4
愛知県	愛知県衛生研究所（PCQは福岡県で実施）	12
大阪府	福岡県保健環境研究所	18
島根県	福岡県保健環境研究所	2
山口県	山口県環境保健センター	13
高知県	高知県衛生研究所	12
鹿児島県	鹿児島県環境保健センター	2
広島県	広島県立総合技術研究所保健環境センター	50
長崎県	長崎県環境保健研究センター	140
福岡県	福岡県保健環境研究所	57
	福岡市保健環境研究所	34
	北九州市環境科学研究所	38
	第一薬科大学	33



PCB、PCQ分析機関（改正案）

追跡班	分析機関	2006年検体数
関東以北班	一括して実施	73
千葉県		
愛知県		
大阪府		
島根県		
山口県		
高知県		
鹿児島県		
広島県	広島県立総合技術研究所保健環境センター	50
長崎県	長崎県環境保健研究センター	140
福岡県	福岡県保健環境研究所	57
	福岡市保健環境研究所	34
	北九州市環境科学研究所	38
	第一薬科大学	33

分担研究報告書

妊婦の喫煙状態、AhR 遺伝子多型と PCB・ダイオキシン類濃度との関連

分担研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科公衆衛生学分野 教授

研究要旨

妊婦の喫煙によって、母と胎児へ悪影響を及ぼすことが知られている。代謝酵素の遺伝子多型とその活性については多くの報告があるものの、このような遺伝子多型と PCB やダイオキシン類濃度との関連についての報告は数少ない。そこで、低曝露レベルと考えられる一般集団の妊婦を対象にして、喫煙状態と化学物質代謝に関与する *AhR* R554K 遺伝子多型と血中のダイオキシン類濃度との関連について調べた。本研究における非喫煙者と喫煙者のカットオフ値を 15 ng/mL とし、喫煙群 42 名、非喫煙群 198 名となった。また、非喫煙群 (198 名) を 2 分位し、それぞれ低環境的喫煙曝露群 (99 名)、高環境的喫煙曝露とした。その結果、RK/KK 型で低環境的喫煙曝露群と比較して、RK/KK 型で喫煙群では、Total non-ortho、PCBs 値、Total coplanar PCBs 値、Total PCDDs TEQ 値、Total PCDFs TEQ 値、Total PCDD/PCDFs TEQ 値、Total non-ortho PCBs TEQ 値、Total coplanar PCBs TEQ 値、Total TEQ 値で有意な負の関連がみられた (それぞれ $p < 0.05$)。また、RR 型で高環境的喫煙曝露群では、Total non-ortho PCBs 値、Total mono-ortho PCBs 値、Total coplanar 値、Total 値、Total PCDFs TEQ 値、Total PCDD/PCDFs TEQ 値、Total non-ortho PCBs TEQ 値、Total mono-ortho PCBs 値、Total coplanar PCBs TEQ 値、Total TEQ 値で有意な負の関連がみられた (それぞれ $p < 0.05$)。この結果は、喫煙によって、母から胎児へのダイオキシンの移行が亢進する可能性を示唆しているが、今後、臍帯血や児の出生アウトカムなどの胎児側からの母の喫煙による影響に関する検討が必要である。

A. 研究目的

妊婦の喫煙によって、母と胎児へ悪影響を及ぼすことが知られている (1)。タバコの煙には、ニコチン、多環芳香族炭化水素 (PAHs) などをはじめとした 4000 以上もの化学物質を含んでいる。*Ah* レセプターは、PAHs や TCDD などの受容体として知られ、CYP1A1 や CYP1B1、GST などを誘導する (2, 3, 4)。

代謝酵素の遺伝子多型とその活性については多くの報告があるものの、このような遺伝子多型と PCB やダイオキシン類濃度との関連についての報告は数少ない。

そこで、低曝露レベルと考えられる一般集団の妊婦を対象にして、喫煙状態 (喫煙、受動喫煙、非喫煙) と化学物質代謝に関与する *AhR* R554K 遺伝子多型と血中ダイオキシン類濃度との関連について調べた。

B. 研究方法

対象者は 2002-2004 年に札幌市内の産科において、インフォームドコンセントを得られた妊娠 23 週-35 週の妊婦である。出産前における血中ダイオキシン類の測定を実施した 254 名のうち、異常値を示したもの (1 名)、血清コチニン値不明者 12 名、遺伝子多型不明者 2 名を除外した 240 名を解析対象者とした。出産前に採血した血液を用いて、血中ダイオキシン類を測定した。また、血清コチニン値を Cozart EIA cotinine Kit (Cozart) を用いた ELISA 法により 2 回測定を行い、平均値を測定値として使用した。本研究における非喫煙者と喫煙者のカットオフ値を 15 ng/mL とし、喫煙群 42 名、非喫煙群 198 名となった。また、非喫煙群 (198 名) を 2 分位し、それぞれ低環境的喫煙曝露群 (99 名)、高環境的喫煙曝露群 (99 名) とした。

(倫理面への配慮)

北海道大学医学研究科・医の倫理委員会および研究協力施設の研究倫理委員会に諮り、承認を得たうえで実施した。

C. 研究結果

対象者の基本属性ならびに各遺伝子多型の頻度はそれぞれ表1のようになった。

喫煙、各遺伝子多型と血中 PCB・ダイオキシン類値との関連をそれぞれ調べた(表2)。低環境的喫煙曝露群と比較して、高環境的喫煙曝露群では、Total non-ortho PCBs 値、Total 値、Total PCDDs TEQ 値、Total PCDFs TEQ 値、Total PCDD/PCDFs TEQ 値、Total non-ortho PCBs TEQ 値、Total TEQ 値について、それぞれ有意に負の関連がみられた(それぞれ $p < 0.05$)。また、低環境的喫煙曝露群と比較して、喫煙群では、Total PCDFs 値、Total non-ortho PCBs 値、Total coplanar PCBs 値、Total 値、Total coplanar PCBs TEQ 値、Total TEQ 値で有意な負の関連がみられた(それぞれ $p < 0.05$)。また、AhR R554K 遺伝子多型との関連について調べた結果、各ダイオキシン類濃度との有意な関連はみられなかった。

次に、各遺伝子型(RR or RK/KK)における喫煙状態と血中ダイオキシン類濃度との関連を調べた(表3)。RK/KK 型で低環境的喫煙曝露群と比較して、RK/KK 型で喫煙群では、Total non-ortho、PCBs 値、Total coplanar PCBs 値、Total PCDDs TEQ 値、Total PCDFs TEQ 値、Total PCDD/PCDFs TEQ 値、Total non-ortho PCBs TEQ 値、Total coplanar PCBs TEQ 値、Total TEQ 値で有意な負の関連がみられた(それぞれ $p < 0.05$)。また、RR 型で高環境的喫煙曝露群では、Total non-ortho PCBs 値、Total mono-ortho PCBs 値、Total coplanar 値、Total 値、Total PCDFs TEQ 値、Total PCDD/PCDFs TEQ 値、Total non-ortho PCBs TEQ 値、Total mono-ortho PCBs 値、Total coplanar PCBs TEQ 値、Total TEQ 値で有意な負の関連がみられた

(それぞれ $p < 0.05$)。しかし、RK/KK 型で高環境的喫煙曝露群、RR 型の低環境的喫煙曝露群ならびに喫煙群では有意な関連はみられなかった。

D. 考察

本研究の結果から、妊婦の喫煙状況が血中の PCB・ダイオキシン類 TEQ 値に影響を与えることが明らかになった。本研究では、喫煙により妊婦の喫煙状況が Total PCDDs や Total non-ortho PCBs などの血中ダイオキシン類の低下がみられたが、Choi AL らの報告における対象集団においても、非喫煙群と比較して喫煙群において、Total PCB 値が有意に低いことが示されている(5)。これらの結果の原因は不明であるが、喫煙による PCB・ダイオキシン類代謝系の亢進、血中タンパク質の影響などが考えられる。また、喫煙により血中 PCB・ダイオキシン類濃度が低下することによる健康影響についても明らかではないが、近年、喫煙群の母親より出生した新生児の血中 PCB 濃度は、受動喫煙群、非喫煙群の母親より出生した新生児と比較して、有意に高いことが報告されていることから、妊婦の喫煙による PCB・ダイオキシン類の胎児への蓄積性が懸念される(6)。そのため、今後、胎児側からの母の喫煙による影響に関する検討が必要である。

さらに、本研究では、AhR R554K 多型が RR 型の場合、RK 型では影響がみられなかった高環境的喫煙曝露群において、Total PCDFs TEQ 値、Total PCDD/PCDFs TEQ 値、Total non-ortho PCBs TEQ 値、Total mono-ortho PCBs 値、Total coplanar PCBs TEQ 値、Total TEQ 値が低下していることが示された。このことから、AhR R554K が RR 型の場合、能動的喫煙だけでなく、環境からの喫煙曝露により血中ダイオキシン類濃度への影響がみられることが明らかになった。しかし、同じ RR 型でも喫煙群の場合、血中ダイオキシン類濃度との有意な関連はみられなかった。これは、RR 型で喫煙群の数が 7 名であり、他の群の人数と比較して少ないためであると考えられる。その

ため、喫煙と血中ダイオキシン類濃度との関連について、サンプルサイズを大きくした、さらなる解析が必要であると考えられる。また、AhR 遺伝子以外の代謝系に関与する遺伝子による感受性についても検討する必要がある。

E. 結論

AhR R554K 多型と喫煙による血中 PCB TEQ 値への負の複合影響が明らかになった。また、この複合影響には、能動的喫煙だけではなく、環境的喫煙による影響も認められた。

F. 研究発表

1.論文発表
なし

2.学会発表
なし

参考文献

1) Cnattingius S (2004) The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob. Res.* 6: S125-S140.

2) Antilla S, Tuominen P, Hirvonen A, Nurminen M, Karjalainen A, Hankinson O and Elovaara E (2001) CYP1A1 levels in lung tissue of tobacco smokers and polymorphisms of CYP1A1 and aromatic hydrocarbon receptor. *Pharmacogenetics* 11: 501-509.

3) Harper PA, Wong JMY, Lam MSM and Okey AB (2002) Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem. Biol. Interact.* 141: 161-187.

4) Lin P, Hu SW and Chang TH (2003) Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (*AhR*), hydrocarbon receptor nuclear translocator (*Arnt*), cytochromes

P4501A1 (*CYP1A1*) and 1B1(*CYP1B1*), and inducibility of *CYP1A1* and *CYP1B1* in human lymphocytes. *Toxicol. Sci.* 71: 20-26.

5) Choi AL, Levy JI, Dockery DW, Ryan LM, Tolbert PE, Altshul LM and Korrick SA (2006) Does living near a Superfund site contribute to higher polychlorinated biphenyl (PCB) exposure? *Environ. Health Perspect.* 114: 1092-1098.

6) Lackmann GM, Angerer J and Tollner U (2000) Parental smoking and neonatal serum levels of polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene. *Pediatr. Res.* 47: 598-601.

表 1 対象者の基本属性

属性	計 (n = 240)	低環境的喫煙曝露群 (n = 99)	高環境的喫煙曝露群 (n = 99)	喫煙群 (n = 42)	P-value
Serum Cotinine Concentration, ng/mL	1.69 (0.05-389.41)	0.80 (0.05-1.36) ^a	2.17 (1.38-7.59) ^a	76.89 (16.68-389.41) ^a	< 0.001***
Maternal Age, mean ± SD, year	30.61 ± 4.47	30.97 ± 4.53	30.71 ± 4.28	29.52 ± 4.70	0.206
BMI, mean ± SD, kg/m ²	21.41 ± 3.48	21.48 ± 3.51	21.16 ± 3.31	21.82 ± 3.80	0.570
Parity, n (%)	0 121 (50.6) 118 (49.4)	45 (45.5) 54 (54.5)	53 (54.1) 45 (45.9)	23 (54.8) 19 (45.2)	0.404
Educational Levels, n (%)	0 ≤ 9 (years) 10-12 13-16 ≥ 17	1 (1.0) 29 (29.3) 67 (67.7) 2 (2.0)	1 (1.0) 42 (42.4) 55 (55.6) 1 (1.0)	2 (4.8) 23 (54.8) 16 (38.1) 1 (2.4)	0.038*
Economic Status; Annual Income, n (%)	< 3,000,000 (yen) 3,000,000-5,000,000 5,000,000-7,000,000 7,000,000-10,000,000 ≥ 10,000,000	15 (15.2) 43 (42.4) 23 (23.2) 15 (15.2) 4 (4.0)	13 (13.1) 58 (58.6) 20 (20.2) 6 (6.1) 2 (2.0)	13 (31.0) 17 (40.5) 9 (21.4) 3 (7.1) 0 (0.0)	0.042*
Alcohol Intake during Pregnancy, g/day	1.39 (0.36-51.83) ^b	1.19 (0.36-51.83) ^{a,b}	1.16 (0.36-19.18) ^{a,b}	2.10 (0.46-14.76) ^{a,b}	0.350
Caffeine Intake during Pregnancy, mg/day	112.38 (2.00-542.50)	98.50 (3.00-420.25) ^a	108.50 (2.00-425.50) ^a	157.38 (17.00-542.50) ^a	0.004**
AhR R554K, n (%)	Arg/Arg Arg/Lys Lys/Lys Arg/Lys + Lys/Lys	72 (30.0) 120 (50.0) 48 (20.0) 168 (70.0)	37 (37.4) 40 (40.4) 22 (22.2) 62 (62.6)	28 (28.3) 55 (55.6) 16 (16.2) 71 (71.7)	0.065

^a, Median (min-max). Kruskal-Wallis test was conducted to estimate associations.

^b, 28 low environmental smokers, 32 high environmental smokers and 18 smokers.

表 2 喫煙ならびに AhR 遺伝子多型と血中ダイオキシン類濃度との関連

	喫煙状態				AhR Polymorphism	
	低環境的喫煙曝露群 (n = 99)		喫煙群 (n = 42)		Arg/Lys + Lys/Lys (n = 168)	
	β (SD)	P-value	β (SD)	P-value	β (SD)	P-value
Total PCDDs (pg/g lipid)						
Total PCDFs	Ref.	0.109	-0.102 (0.071)	0.155	Ref.	-0.030 (0.054)
Total PCDD/DFs	Ref.	0.061	-0.135 (0.067)	0.045*	Ref.	-0.008 (0.051)
Total non-ortho PCBs	Ref.	0.102	-0.104 (0.070)	0.142	Ref.	-0.031 (0.054)
Total mono-ortho PCBs	Ref.	0.020*	-0.249 (0.076)	0.001**	Ref.	-0.019 (0.059)
Total coplanar-ortho PCBs	Ref.	0.349	-0.134 (0.079)	0.094	Ref.	-0.071 (0.060)
Total	Ref.	0.294	-0.205 (0.085)	0.017*	Ref.	-0.081 (0.065)
	Ref.	0.021*	-0.261 (0.108)	0.016*	Ref.	-0.065 (0.083)
Total PCDDs TEQ	Ref.	0.045*	-0.130 (0.067)	0.055	Ref.	-0.016 (0.053)
Total PCDFs TEQ	Ref.	0.024*	-0.138 (0.070)	0.051	Ref.	-0.016 (0.054)
Total PCDD/DFs TEQ	Ref.	0.045*	-0.130 (0.067)	0.055	Ref.	-0.017 (0.051)
Total non-ortho PCBs TEQ	Ref.	0.034*	-0.382 (0.102)	< 0.001***	Ref.	-0.064 (0.079)
Total mono-ortho PCBs TEQ	Ref.	0.349	-0.134 (0.079)	0.094	Ref.	-0.071 (0.060)
Total coplanar-ortho PCBs TEQ	Ref.	0.085	-0.277 (0.088)	0.002**	Ref.	-0.068 (0.068)
Total TEQ	Ref.	0.048*	-0.179 (0.069)	0.010**	Ref.	-0.033 (0.053)

Logarithm of each Dioxin values and serum cotinine were used for multiple regression analysis.
Adjusted for maternal age, BMI before pregnancy, parity and educational level

表3 喫煙と *AhR* 遺伝子多型の組み合わせと血中ダイオキシン類濃度との関連

<i>AhR</i> 遺伝子多型	Arg/Lys + Lys/Lys			Arg/Arg		
	低環境的喫煙曝露群 (n = 62)	喫煙群 (n = 35)	高環境的喫煙曝露群 (n = 71)	低環境的喫煙曝露群 (n = 37)	喫煙群 (n = 28)	高環境的喫煙曝露群 (n = 28)
喫煙状態 (pg/g lipid)	β (SD)	P-value	β (SD)	P-value	β (SD)	P-value
Total PCDDs	Ref.	0.144	-0.123 (0.082)	0.135	-0.058 (0.079)	0.459
Total PCDFs	Ref.	0.160	-0.134 (0.077)	0.081	-0.011 (0.074)	0.877
Total PCDD/DFs	Ref.	0.136	-0.125 (0.081)	0.124	-0.059 (0.078)	0.449
Total non-ortho PCBs	Ref.	0.218	-0.235 (0.087)	0.007**	-0.020 (0.084)	0.794
Total mono-ortho PCBs	Ref.	0.689	-0.164 (0.090)	0.071	-0.059 (0.087)	0.495
Total coplaimar-ortho PCBs	Ref.	0.741	-0.224 (0.097)	0.022*	-0.050 (0.093)	0.59
Total	Ref.	0.134	-0.240 (0.123)	0.052	-0.024 (0.18)	0.839
Total PCDDs TEQ	Ref.	0.097	-0.181 (0.079)	0.024*	-0.072 (0.076)	0.345
Total PCDFs TEQ	Ref.	0.087	-0.160 (0.081)	0.048*	-0.030 (0.078)	0.698
Total PCDD/DFs TEQ	Ref.	0.086	-0.175 (0.077)	0.023*	-0.059 (0.074)	0.427
Total non-ortho PCBs TEQ	Ref.	0.385	-0.373 (0.116)	0.001**	-0.073 (0.111)	0.948
Total mono-ortho PCBs TEQ	Ref.	0.689	-0.164 (0.090)	0.071	-0.059 (0.087)	0.495
Total coplaimar-ortho PCBs TEQ	Ref.	0.522	-0.282 (0.100)	0.005**	-0.015 (0.096)	0.875
Total TEQ	Ref.	0.172	-0.213 (0.079)	0.008**	-0.046 (0.076)	0.548

Logarithm of each Dioxin values and serum cotinine were used for multiple regression analysis.

Adjusted for maternal age, BMI before pregnancy, parity and educational level

油症原因物質等の体外排泄促進に関する研究

分担研究者 長山 淳哉 九州大学大学院医学研究院保健学部門 准教授

研究要旨 カネミ患者の健康障害の改善には、現在でも患者体内に高濃度で残存する原因物質を積極的に体外へ排泄することが最も有効である。動物実験では食物繊維と葉緑素にダイオキシン類の体外排泄促進作用が示されている。そこでこの研究では食物繊維と葉緑素に富む栄養補助食品である玄米発酵食品ハイ・ゲンキ葉緑素入り (FBRA) にそのような作用が認められるかどうか、油症患者の協力により検討した。その結果、FBRA を1年目のみ摂取したAグループと2年目のみ摂取したBグループでそれぞれFBRAの摂取により、カネミ油症の原因物質であるPCDFsが108ngと24ng、PCDDsが16ngと4ng、PCDFs/DDsが120ngと24ngそれぞれ体内残留量が低下し、PCDFs、PCDDsの排泄促進が示された。そして、もともとの汚染レベルが高かったAグループのほうがBグループよりもFBRAによるダイオキシン類の排泄に、より促進的な効果が認められた。

A. 研究目的

カネミ油症の主原因物質はダイオキシン類のPCDFsとPCDDsである。油症発症以来40年にわたって患者を苦しめているこの猛毒物質による健康障害を少しでも改善するための最善の方策は体外への積極的な排泄促進である。これまでの動物実験による知見では食物繊維や葉緑素がダイオキシン類を吸着し、消化管での吸収と再吸収を抑制し、体外への排泄を促進することが示唆されている¹⁾²⁾³⁾。そこで、この研究では食物繊維と葉緑素を比較的多量に含む栄養補助食品によるダイオキシン類の体外への排泄を血液の汚染レベルの変化にもとづく体内負荷量の変化を指標として調べた。

B. 研究方法

この研究で用いた食物繊維と葉緑素に富む栄養補助食品は株式会社玄米酵素(本社：北海道札幌市)が30年以上にわたって製造・販売している玄米発酵食品ハイ・ゲンキ葉緑素入り(以下FBRAと略)である。

被験者は油症患者で、Aグループは最初の1年間、そしてBグループは2年目の1年間

FBRAを摂取する。したがって、Aグループは2年目の1年間、Bグループは最初の1年間は自由に喫食した。

Aグループは男性3名、女性7名で、平均年齢が67.7歳、Bグループは男性4名、女性4名で、平均年齢が64.1歳であった。

この両グループについて、FBRA摂取前のPCDFs、PCDDsによる汚染レベルを調べるために1週間以内に2回の採血(1回当りの採血量は約10ml)を行い、それらの濃度を平均して摂取前の各自の汚染レベルとした。

このようにして研究開始前のPCDFsとPCDDsによる汚染レベルの判明した油症患者に対して、Aグループでは最初の1年間、Bグループは2年目の1年間、毎日毎食後1人当たり2~3包(7.0~10.5g)のFBRAを食べていただいた。この他はAグループでもBグループでも毎日自由に喫食した。

FBRAの摂取開始1年後と2年後に、再び1週間以内に2回の採血を行い、それらの平均濃度を1年後および2年後の汚染レベルとした。これと摂取前のレベルを比較することにより、FBRAによるPCDFsとPCDDsの体外排泄促進効果を評価した。

C. 研究結果および考察

AグループとBグループの摂取前、1年後および2年後のPCDFs、PCDDsおよびPCDFsとPCDDsを合計したPCDFs/DDsの血中平均濃度の変化は表1のようであった。数値はすべてTEQ換算値である。

表1からわかるように、PCDFsとPCDDs、PCDFs/DDsについて、Aグループのほうが平均濃度でBグループよりも2倍前後高い。つまり、最初の1年間FBRAを摂取したAグループのほうがBグループよりもダイオキシン類による汚染レベルの高い患者が多かった。

FBRAの摂取によるPCDFs、PCDDs、PCDFs/DDsの血中濃度の低下は次のようであった。

PCDFsではAグループ：0.027 pg/g、Bグループ：0.005 pg/g。PCDDsではAグループ：0.004 pg/g、Bグループ：0.001 pg/g。PCDFs/DDsではAグループ：0.032 pg/g、Bグループ：0.007 pg/gであった。

このように、FBRAによるダイオキシン類の血中濃度の低下はBグループよりもAグループで大きく、ダイオキシン類による汚染レベルが高いほど、有効であるように思えた。

ここで、血液の脂肪含有率を0.3%と仮定して、ダイオキシン類の脂肪重量当りの平均濃度を算出すると、表2のようになる。

これらの脂肪重量当りの濃度で、体内の脂肪組織がダイオキシン類に汚染されていると考え、FBRAの摂取によりどの程度体内蓄積量が減少したのか考えてみる。体重を60kg、体脂肪率を20%と仮定すると、体内には脂肪が12kg存在する。

表3に示されているように、FBRA摂取前のAグループとBグループには、体内にそれぞれPCDFsが2988ngと1236ng、PCDDsが420ngと280ng、PCDFs/DDsが3408ngと1524ng存在した。それが1年間FBRAを摂取することにより、体内残留量はPCDFsが

2880ngと1212ngに、PCDDsが404ngと276ngに、そしてPCDFs/DDsが3288ngと1488ngになった。これらの結果より、体内からAグループ、BグループそれぞれPCDFsは108ngと24ng、PCDDsは16ngと4ng、PCDFs/DDsは120ngと24ng排泄されたことになる。

以上の結果から、FBRAは油症の主原因物質であるこれらPCDFsとPCDDsおよびPCDFs/DDsの体外への排泄を促進するが、体内汚染レベルの高い油症患者でより有効と考えられた。

このようなFBRAによるダイオキシン類の体外排泄促進は、これまでの我々の一般人を対象とした研究でも示されている⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。

E. 参考文献

- 1) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄: ラットにおける Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins の糞中排泄に対する食物繊維の効果. *衛生化学* 43: 35-41, 1997.
- 2) 森田邦正, 松枝隆彦, 飯田隆雄: ラットにおける Polychlorinated dibenzo-p-dioxins の糞中排泄に対するクロレラ, スピルリナ及びビクロロフィリンの効果. *衛生化学* 43: 42-47, 1997.
- 3) 森田邦正: 食物繊維による体内ダイオキシン類の排泄促進. *生活と環境* 43: 39-44, 1998.
- 4) Nagayama J., Takasuhga T., Tsuji H. and Iwasaki T.: Decrease in blood levels of dioxins after the one year intake of FBRA in Japanese. *Organohal. Comp.* 52: 293-296, 2001.
- 5) Nagayama J., Takasuhga T., Tsuji H., Umehara M., Sada T. and Iwasaki T.: Active elimination of causative PCDFs/DDs congeners of Yusho by one year intake of FBRA in Japanese people. *Fukuoka Acta Med.* 94: 118-125, 2003.
- 6) Takasuga T., Senthilkumar K., Takemori H., Ohi E., Tsuji H. and Nagayama J.:

Impact of FEBRA (fermented brown rice with *Aspergillus oryzae*) intake and concentrations of PCDDs, PCDFs and PCBs in blood of humans from Japan. *Chemosphere* 57: 1409-1426, 2004.

7) Nagayama J., Takasuga T., Tsuji H. and Iwasaki T.: Promotive excretion of causative agents of Yusho by one year intake of FBRA in Japanese people. *Fukuoka Acta Med.* 96: 241-248, 2005.

表 1. PCDFs および PCDDs の血中濃度の変化

ダイオキシン類	血中濃度 (pg-TEQ/g)*		
	摂取前	1 年後	2 年後
PCDFs			
A グループ	0.747±0.952	0.720±0.921	0.712±0.919
B グループ	0.310±0.248	0.308±0.253	0.303±0.253
PCDDs			
A グループ	0.105±0.065	0.101±0.060	0.100±0.062
B グループ	0.072±0.014	0.070±0.014	0.069±0.014
PCDFs/DDs			
A グループ	0.853±1.02	0.821±0.979	0.812±0.979
B グループ	0.382±0.251	0.379±0.262	0.372±0.261

* : 平均値±標準偏差

表 2. PCDFs および PCDDs の脂質重量当りの血中平均濃度の変化

ダイオキシン類	血中平均濃度 (pg-TEQ/g 脂肪)*		
	摂取前	1 年後	2 年後
PCDFs			
A グループ	249	240	237
B グループ	103	103	101
PCDDs			
A グループ	35.0	33.7	33.3
B グループ	24.0	23.3	23.0
PCDFs/DDs			
A グループ	284	274	271
B グループ	127	126	124

* : 血液の脂肪含有率を 0.3%と仮定した。

表 3. PCDFs および PCDDs の体内残留量の変化

ダイオキシン類	体内残留量 (ng/人)*		
	摂取前	1 年後	2 年後
PCDFs			
A グループ	2988	2880	2844
B グループ	1236	1236	1212
PCDDs			
A グループ	420	404	400
B グループ	288	280	276
PCDFs/DDs			
A グループ	3408	3288	3252
B グループ	1524	1512	1488

*: 体重を 60kg、体脂肪率を 20%と仮定した。

分担研究報告書

Resveratrol によるダイオキシン類毒性軽減効果：bioavailability 改善と毒性軽減効果への影響に関する検討

分担研究者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学専攻分野 教授
研究協力者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学専攻分野 准教授
石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院分子衛生薬学専攻分野 助教

研究要旨 当研究室におけるこれまでの検討から、植物ポリフェノールである resveratrol の摂取が、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 毒性の一部である体重増加抑制、並びに脂肪肝の惹起を軽減する可能性が示されている。しかし、この軽減効果は顕著なものではなく、その原因は resveratrol の生物学的利用率 (bioavailability) の低さにあると予想された。そこで本研究では、resveratrol の bioavailability 改善と、それに伴う TCDD 毒性軽減効果への影響について検討を行った。その結果、代謝酵素の阻害剤である piperine を併用することにより、TCDD のマウス体重増加抑制に対する resveratrol の軽減効果が増強される傾向が観察された。さらに、resveratrol を皮下投与した場合、TCDD 処理マウスの体重増加抑制はコントロール群と同程度まで回復することが明らかとなった。また、TCDD による酵素誘導の指標である *erhox*yresorufin *O*-deethylase 活性、並びに酸化ストレスの指標であるチオバルビツール酸反応生成物量に関しても、resveratrol の皮下投与では経口投与時に比べ顕著に低下した。この場合、resveratrol 皮下投与時における血漿中薬物濃度 - 時間曲線下面積は、経口投与時に比べ約 4 倍増加した。本研究より、resveratrol の bioavailability を改善することにより、ダイオキシン類毒性軽減効果を増強することができる可能性が強く示唆された。今後は、経皮吸収法などによるより一層の bioavailability の改善と患者への負担の軽い投与方法の開発が必要であると考えられる。

A. 研究目的

当研究室では、これまでに、ダイオキシン類による中毒症状の予防法の開発を目的として、日々の摂取が容易であり安全性が高いと考えられる食物成分に注目し検討を行ってきた。その結果、赤ワインやピーナッツの渋皮に多く含まれている植物

ポリフェノールである trans-resveratrol (resverastrol) が、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) による体重増加抑制作用、並びに脂肪肝の惹起を軽減する可能性があることを明らかにした (平成 18 年度、並びに平成 19 年度分担研究報告書にて報告済み)。また、この機構について検討

した結果、TCDD による芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor: AhR) を介したタンパク質誘導、並びに酸化ストレスの惹起に対して、僅かではあるものの効果があることを明らかにしている。これまでの検討で明らかにした resveratrol の毒性軽減作用は、その傾向が認められるものの顕著ではなかった。この原因の一つとして、resveratrol のバイオアベイラビリティの低さが考えられる。事実、resveratrol を経口投与した場合、その血中濃度は数分以内に最高濃度に達したのち、1~2 時間後にほとんど消失することが明らかとなっている (1-3)。従って、resveratrol の生物学的利用率 (bioavailability) を改善することにより、ダイオキシン類中毒症状に対する軽減効果を増強できるのではないかと期待された。

以上のような背景のもと、本年度は、ダイオキシン類中毒症状に対する resveratrol の軽減効果増強を目的として、resveratrol の bioavailability 改善が TCDD 毒性に及ぼす影響を検討した。

B. 方法・結果

Resveratrol 経口投与における血中濃度の推移および piperin との併用における resveratrol の TCDD 毒性への効果

これまでの研究から、resveratrol は、生体内において主にグルクロン酸抱合反応、並びに硫酸抱合反応によって代謝されることが明らかにされている (1)。そこで、黒胡椒の辛味成分であり、グルクロン酸抱

合反応の阻害剤であることが知られている piperin を併用し、resveratrol の経口投与時における bioavailability の改善とそれに伴う TCDD 毒性軽減効果への影響を観察した。

Piperine の影響をみる前に、基礎的情報入手の目的で、マウスにおける resveratrol 経口投与時における血中濃度の推移を測定した。5 週令の C57BL/6J 系雄性マウスに resveratrol 20 mg/kg を経口投与し、一定時間後に血液を採取した。採取した血液 (約 0.1% EDTA 含有) を 2,000 r.p.m. で 15 分間遠心したのち、その上清を血漿サンプルとして使用するまで -80 °C に保存した。血漿中 resveratrol の抽出は、血漿 50 µL に内標準物質である 7-ethoxycoumarin (10 µg/mL) を 10 µL 添加し、酢酸エチルを 100 µL 加え攪拌したのち、遠心にて分離した上清 90 µL を分取した。この抽出操作を 3 回行ったのち、窒素ガスにて酢酸エチルを留去し、その残渣をメタノール 100 µL に溶解して HPLC 定量用のサンプルとした。分析の結果、投与約 5 分後に resveratrol 血中濃度は最高値に達し、1 時間以内にそのほとんどが消失した (Fig. 1)。

次に、piperin 併用時の resveratrol の TCDD 毒性軽減効果について検討した。5 週令の C57BL/6J 系雄性マウスに piperin 20 mg/kg を経口投与し、その 5 分後に resveratrol 20 mg/kg を経口投与した。その後、resveratrol の血中濃度が最高となると予想される 90 分後に、TCDD 100 µg/kg を経口投与した。一方、コントロール群には、piperin と resveratrol の溶媒である

0.2% Tween 80/0.5% methylcellulose 溶液、並びに TCDD の溶媒である corn oil を同量経口投与した。投与翌日より、同量の piperin と resveratrol を初日と同様のスケジュールで 1 日 1 回、5 日間経口投与し、最終投与 30 分後に臓器を摘出して臓器重量を測定した。その結果、投与 1 日目より、resveratrol と piperin の併用群では、TCDD による体重増加抑制が軽減されることが明らかとなった (Fig. 2; TCDD + piperine + resveratrol vs. TCDD)。一方、TCDD による肝肥大、並びに胸腺に萎縮に対しては、piperine と resveratrol の併用による軽減効果は観察されなかった (Table 1)。

皮下投与 resveratrol の TCDD 毒性への影響

Resveratrol の bioavailability の改善を図る場合、経口投与は腸管からの吸収率や初回通過代謝の問題があり、不利と予想される。このため、先の結果でも、bioavailability 改善効果が不十分であった可能性が考えられる。そこで、さらなる bioavailability の改善を目的として、皮下投与法を用いて検討を行った。

まず、resveratrol 皮下投与による bioavailability の改善を確認するため、投与後の血中濃度の推移を測定した。その結果、皮下投与の場合、投与 20 分ほどで血中濃度が最高に達したのち、24 時間後においても、最高濃度の 10 分の 1 程を維持することが明らかとなった (Fig. 3)。皮下投与における最高血中濃度は、経口投

与のそれとほぼ同程度であった (経口投与 $C_{max} = 3073.7 \text{ ng/mL}$; 皮下投与 $C_{max} = 4837.0 \text{ ng/mL}$)。また、投与 2 時間までにおける血漿中薬物濃度 - 時間曲線下面積 (area under the curve: AUC) を比較した場合、皮下投与では経口投与の約 4 倍に増加した。以上の結果より、皮下投与では、resveratrol の bioavailability が改善されることが明らかとなったので、次に TCDD 毒性に対する効果を検討した。5 週令の C57BL/6J 系雄性マウスに resveratrol 225 mg/kg を皮下投与し、その後、resveratrol の血中濃度が最高となると予想される 90 分後に、TCDD 100 $\mu\text{g/kg}$ を経口投与した。一方、コントロール群には、resveratrol の溶媒であるプロピレングリコール、並びに TCDD の溶媒である corn oil を同量投与した。投与翌日より、同量の resveratrol を 1 日 1 回、5 日間皮下投与し、最終投与 30 分後に臓器を摘出して臓器重量を測定した。Fig. 4 には、投与期間中の体重変化を示している。TCDD 処理群では、既報と同様、投与初日から体重の抑制が観察された。これに対し、resveratrol を皮下投与した場合、体重増加がほぼコントロールレベルまで改善されることが明らかとなった。一方、投与 5 日目における臓器重量を測定した結果、脾臓では、resveratrol の併用により TCDD による萎縮の軽減傾向が認められた。しかし、肝臓肥大、並びに胸腺の萎縮に対する影響は認められなかった (Table 2)。次に、resveratrol による TCDD 毒性軽減の機構を模索するため、AhR 依存的なタンパク質誘導の指標である ethoxyresirufin *O*-deethylase

(EROD) 活性、並びに酸化ストレスの指標であるチオバルビツール酸反応生成物量 (thiobarbitric acid reactive substance content: TBARS) を測定した。その結果、resveratrol の皮下投与により、EROD 活性値、並びに TBARS 値は、TCDD 処理群に比べそれぞれ約 25%、並びに約 34% 低下することが明らかとなった (Fig. 5 および 6)。

Resveratrol 経皮吸収に関する予備的検討

これまでの研究から、resveratrol の bioavailability 改善に伴い、TCDD 毒性に対する軽減効果が増強される、ないしその傾向にあることが明らかとなった。しかし、油症患者への適用を考えた場合、piperin との併用による経口投与や 24 時間毎の皮下投与は、患者への負担が大きいと予想される。そこで、これらの問題を解消する一手段として、resveratrol の経皮吸収法を用い、resveratrol の bioavailability 改善の可能性について検討した。

Resveratrol をエタノール (60 mg resveratrol/mL ethanol)、DMSO (165.8 mg resveratrol/mL DMSO)、もしくはプロピレングリコール (135.4 mg resveratrol/mL propylene glycol) に溶解したのち、基材に混和し軟膏剤を調製した。次に、5 週令の C57BL/6J 雄性マウスをペントバルビタールで麻酔し、バリカンで剃毛した背部約 6 cm² に調製した resveratrol 軟膏剤 0.3 g を塗布した。塗布後、マウスをケージに戻して飼育し、血液を採取して resveratrol の血中濃度を定量した。

一般的な脂溶性基材である流動パラフィン・白色ワセリン混合基材を用いた予備検討から、経皮的に resveratrol を投与した場合、投与後 5 時間後から 48 時間後において高い血中濃度を維持していた (データ未掲載)。そこで、流動パラフィン・白色ワセリン混合基材に加え、脂肪アルコール・プロピレングリコール混合基材 (FAPG 基材)、さらに、カテキン類の経皮吸収に関する研究 (4)での実績を有する、米国 PCCA 社製 Lipodermal base[®] を用いて塗布後、5 時間後の血中濃度を測定した。その結果、流動パラフィン・白色ワセリン混合基材、並びに Lipodermal base[®] に比べ、FAPG を使用した場合、resveratrol の血中濃度が顕著に増加することが明らかとなった (Fig. 7)。さらに、吸収促進剤としてオレイン酸の添加を添加した FAPG においても検討を行ったが、改善効果は認められなかった。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は全て、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認を受けたのち実施した。

C. 考察

本研究では、ダイオキシン類の中毒症状に対する予防法の開発を目的として、食用植物成分である resveratrol に注目し検討を行った。今回の検討では、resveratrol の bioavailability 改善を目的として、piperin との併用、および皮下投与による検討を行い、TCDD 毒性に対する効果を検証した。

その結果、TCDD による体重増加抑制に対する resveratrol の軽減作用は、piperine との併用、もしくは皮下投与により、単独経口投与時に比べ増強されることが明らかとなった (Fig. 2 および 4)。

今回、piperin との併用による resveratrol の経口投与実験において、resveratrol の血中濃度の推移を明らかにすることはできなかった。これに関連して、ラットへの piperin と curcumin の併用処理実験では、curcumin の AUC および最高血中濃度が、curcumin 単独処理に比べそれぞれ約 1.5 倍および 1.3 倍増加することが明らかにされている (5)。従って、resveratrol においても、piperin との併用により、その bioavailability は経口投与に比べ改善されたものと予想される。一方、皮下投与の場合、経口投与に比べ、投与 2 時間後における AUC は約 4 倍まで増加し、また、最高血中濃度はほぼ同程度であった (Fig. 1 および 3)。この結果から、resveratrol の bioavailability の増加によって、ダイオキシン類毒性に対する軽減作用も増強されることが強く示唆された。

Resveratrol 皮下投与時における TCDD 毒性軽減効果増強の機構について検討するため、EROD 活性、並びに TBARS 値を測定した結果、それぞれ TCDD 処理群に比べ有意に低下することが明らかとなった (Fig. 5 および 6)。Resveratrol 経口投与時では、TCDD 処理群に比べ EROD 活性値の低下は約 10%に止まり、TBARS 値は変化しない (平成 18 年度分担研究報告書に掲載済み)。これらは、resveratrol の投与期間や投与量が異なるため、単純には

比較できない。しかし、ダイオキシン類の毒性のほとんどは AhR との結合、並びにそれに伴う機能性タンパク質の発現変動を起点としていると考えられており、さらに、酸化ストレスの惹起も毒性の主要因の一つと考えられている。このため、resveratrol の bioavailability 改善がこれらの指標の抑制を増強することと、毒性軽減効果の増強とは矛盾なく解釈できる。一方、resveratrol 皮下投与時におけるこれらの指標は、コントロールレベルまで低下しないにもかかわらず (Fig. 5 および 6)、TCDD による体重増加抑制はコントロールレベルまで改善された (Fig. 4)。この違いについては、理由を明らかにすることはできなかった。このことから、resveratrol は、AhR への競合作用、および酸化ストレスの低下に加え、未知の要因に対して作用する可能性も考えられる。このため、resveratrol による毒性軽減機構の開明には、ダイオキシン類による毒性発現機構の解明も含めて検討する必要があると考えられる。

皮下投与により resveratrol の bioavailability が増加した要因については、初回通過効果の軽減と投与の徐放化に加え、投与量の増加も関与していると考えられる。事実、皮下投与における resveratrol の投与量は、225 mg/kg であり、経口投与の約 11 倍にあたる。このような違いはあるが、本研究では、経口投与以外の resveratrol 投与法は、その bioavailability 改善に十分有効である可能性を確認できた。しかし、これを直ちに実用化するのは、1 日 1 回の皮下投与が患者への負担を増

大きせると共に、投与時に苦痛を与えるものと予想される。これら問題を解決する手段として、経皮吸収への展開は有効であると考えられる。また、resveratrol の bioavailability の改善率と、TCDD 毒性軽減効果との間の関連性についてはほとんど明らかになっていない。この点についても、今後明らかにすべき課題であると考えられる。

約 40 年前に発生したカネミ油症事件における油症患者の血中ダイオキシシンレベルは、健常人に比べ未だ高い値を示しており (6)、影響の長期化が危惧されている。このため、安全かつ有効な予防法の開発は急務であり、その目的を達成するためにも、resveratrol をはじめとした食物成分による毒性軽減法の開発に関する研究は有用であると考えられる。

D. 参考文献

- 1) Yu, C., Shin, Y. G., Chow, A., Li, Y., Kosmeder, J. W., Lee, Y. S., Hirschelman, W. H., Pezzuto, J. M., Mehta, R. G. and van Breemen, R. B., Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm. Res.*, 19, 1907-1914 (2002).
- 2) Marier, J.-F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.-P. and Ducharme, M. P., Metabolism and Disposition of resveratrol in rats: Extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302, 369-373 (2002).
- 3) Safe, S., Verschoyle, R. D., Boocock, D., Jones, D. J. L., Wisher, N., Ruparelia, K. C., Potter, G. A., Farmer, P. B., Steward, W. P. and Gescher, A. J., Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. *Br. J. Cancer*, 90, 736-744 (2004).
- 4) Lambert, J. D., Kim, D. H., Zheng, R. and Yang, C. S., Transdermal delivery of (-)-epigallocatechin-3-gallate, a green tea polyphenol, in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 58, 599-604 (2005).
- 5) Guido, S., David, J., Thangam, J., Majeed, M., Rajendran, R. and Srinivas, P. S. S. R., Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.*, 64, 353-356 (1998).
- 6) Furue, M., Uenotsuti, T., Urabe, K., Ishikawa, T. and Kuwabara, M., Overview of Yusho. *J. Dermatol. Sci., Suppl.* 1, S3-S10 (2005).