

**Fig. 5. Effects of cholebine on the tissue concentrations of PenCDF.** Cholebine was given to PenCDF-treated rats for 7 days (A) and 28 days (B). The values represent the mean of 2 (Brain of PenCDF+Cholebine-group in (A)) or mean  $\pm$  S.D. of 3 (others) rats. The PenCDF concentrations in each tissue of PenCDF-group were as follows: In (A), Liver,  $5.13 \pm 0.57 \mu\text{g/g}$  tissue; Spleen,  $7.56 \pm 0.64 \text{ ng/g}$  tissue; Thymus,  $8.35 \pm 0.63 \text{ ng/g}$  tissue; Brain,  $4.61 \pm 0.64 \text{ ng/g}$  tissue; Adipose tissue,  $0.34 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$  tissue; Serum,  $0.39 \pm 0.09 \text{ ng/mL}$ . In (B), Liver,  $1.48 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$  tissue; Spleen,  $3.73 \pm 0.39 \text{ ng/g}$  tissue; Thymus,  $3.22 \pm 0.22 \text{ ng/g}$  tissue; Brain,  $3.24 \pm 0.31 \text{ ng/g}$  tissue; Adipose tissue,  $14.21 \pm 1.94 \text{ ng/g}$  tissue; Serum,  $0.19 \pm 0.01 \text{ ng/mL}$ . Significant difference from each PenCDF-treatment group, \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

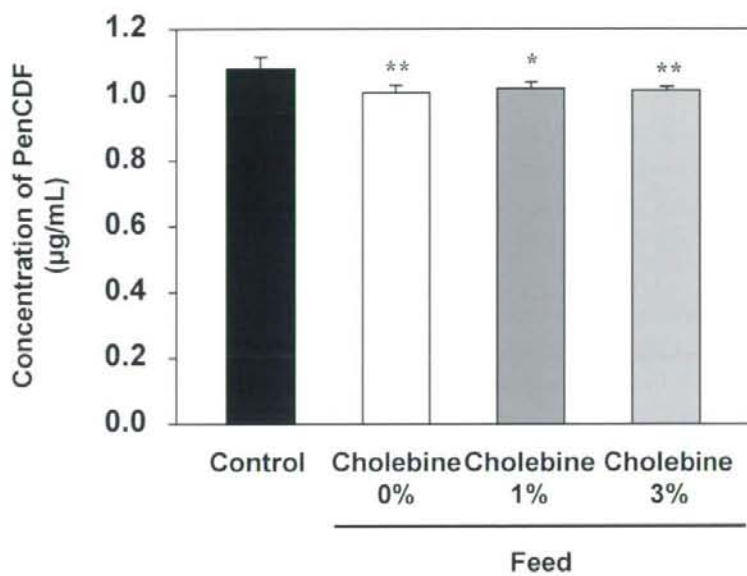


Fig. 6. The binding of cholebine to PenCDF. The values represent the mean  $\pm$  S.D. of 3 assays. Significant difference from the control: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

ダイオキシン後世代影響の抗酸化物質による軽減

研究分担者 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** 本研究では、ダイオキシン後世代影響を軽減する物質の探索を目的として、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 母体曝露によって惹起される胎児ステロイドホルモン合成酵素発現低下に対する抗酸化物質の影響を観察した。妊娠 15 日目の Wistar 系ラットに抗酸化物質を尾静脈内投与し、そのうち TCDD を経口投与した。その翌日より妊娠 20 日目まで初回と同用量の抗酸化物質を尾静脈内投与し、胎児の精巣と脳下垂体におけるステロイドホルモン合成関連タンパク質の mRNA 量を定量した。その結果、TCDD 母体曝露による胎児精巣のステロイドホルモン合成酵素 mRNA の低下は、 $\alpha$ -リポ酸 (LA) の併用によりほぼ完全に回復することが明らかとなった。また、胎児脳下垂体における性腺刺激ホルモン mRNA の発現低下も、LA を併用することによりコントロールレベルまで回復した。一方、LA 以外の抗酸化物質では、同様の回復効果は認められなかった。以上の結果から、LA は胎児の性腺刺激ホルモンの回復を介してステロイドホルモン合成系の障害を消去するものと考えられ、これは抗酸化ストレス作用以外の機構を介して惹起される可能性が示された。

A. 研究目的

ダイオキシン類による後世代影響は、母体に急性毒性が現れない低用量の曝露で引き起こされる。次世代への影響は社会的な関心も大きく、早期の予防法、並びに治療法の開発が期待されている。当研究室におけるこれまでの検討から、ダイオキシン類による後世代影響は、胎児生殖器官におけるステロイドホルモン合成酵素の発現低下に起因すると考えられている (1,2)。この発現低下は、脳下垂体より分泌される制御因子である黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) の分泌低下を起点とするものと思われ (1,2)、事実、胎児への直接的な LH の補充は、ステロイ

ドホルモン合成酵素の発現低下、並びに出生後の性行動異常をコントロールレベルまで改善する (データ未発表)。従って、ダイオキシン母体曝露時における胎児ステロイドホルモン合成酵素発現低下の回復は、ダイオキシンによる後世代影響の改善を考える上で有効な手段の一つと考えられる。

ダイオキシンの毒性発現機構については、これまでも多くの研究成果が報告されている。その詳細については未解明な点が多いが、ダイオキシン中毒症状のほとんどは、細胞の可溶性画分に存在する芳香族炭化水素受容体の活性化、もしくは酸化的ストレスの惹起を起点とするものと考え

られている (3,4)。従って、ダイオキシンの胎児期曝露による後世代影響が、このいずれかの機構を介して引き起こされている可能性は十分に考えられる。そこで本研究では、ダイオキシン後世代影響を軽減する物質の探索を目的として、抗酸化物質による 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 誘発性胎児ステロイドホルモン合成酵素発現低下に対する影響を観察した。

## B. 研究方法・研究結果

### 精巣のステロイドホルモン合成酵素に対する影響

妊娠 15 日目の Wistar 系ラットに  $\alpha$ -リポ酸 (LA, 20 mg/kg)、3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA, 500 mg/kg)、およびアスコルビン酸 (VC, 200 mg/kg) を尾静脈内投与し、その 30 分後に TCDD を 1  $\mu$ g/kg 経口投与した。その翌日より妊娠 20 日目まで、初回と同用量の LA、BHA および VC を 1 日 1 回尾静脈内投与し、最終投与 30 分後に胎児より臓器を摘出した。臓器より mRNA を抽出し、分析対象 mRNA 量を半定量的 reverse transcriptional-polymerase chain reaction 法により解析した。これまでに報告された結果と同様、胎児精巣におけるステロイドホルモン合成酵素である steroidogenic acute regulatory protein、cytochrome P450 (CYP) 11A1、並びに CYP17 の mRNA 量は、TCDD 母体曝露時において有意に低下した (Fig. 1)。LA の併用は、TCDD によるこれらの発現低下をコントロールレベルまで回復させることが明らかとなった。これに対し、他の抗酸化物質では、これらを TCDD 処理母ラットに与えても、同様の回復効果は認めら

れなかった。

### 下垂体性腺刺激ホルモンに対する影響

脳下垂体より分泌される LH および卵胞刺激ホルモン (Follicle-stimulating hormone, FSH) は、末梢生殖組織におけるステロイド合成を制御する上位因子である。そこで次に、TCDD によって引き起こされる性腺刺激ホルモンの発現変動に対する抗酸化物質の効果を検討した。LH および FSH は共に  $\alpha$ - と  $\beta$ -サブユニットからなるヘテロダイマーであるが、これらのうち、両ホルモンの  $\beta$ -サブユニットの mRNA 発現量は、TCDD による母体曝露によって有意に低下した (Fig. 2)。この発現の低下は、LA の併用によりほぼ完全に回復したが、他の抗酸化物質の併用では、同様の効果は認められなかった (Fig. 2)。これに対し、両性腺刺激ホルモンの  $\alpha$ -サブユニットについては、TCDD 母体曝露に伴う変化は認められず、また、抗酸化物質による影響も観察されなかった (Fig. 2)。また、下垂体分泌型の別の性腺刺激ホルモンである prolactin についても、TCDD および抗酸化物質による影響は観察されなかった (Fig. 3)。さらに、酸化ストレス応答性の転写因子である NF-E2 related factor 2 (Nrf2) の mRNA 量を定量した結果、BHA を母体に投与した場合、胎児の脳下垂体において有意に増加することが明らかとなった (Fig. 4)。

### (倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「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実施した。

### C. 考察

本検討では、抗酸化物質に注目しダイオキシンの後世代影響に対する効果を観察した。その結果、TCDD 母体曝露に伴う胎児精巣のステロイドホルモン合成タンパク質、並びに下垂体における性腺刺激ホルモンの mRNA 発現低下が、LA の併用によりほぼ完全に回復することが明らかとなった。これに対し、他の抗酸化物質では、LA と同様の効果を得ることはできなかった。これまでの検討から、TCDD 母体曝露による胎児精巣でのステロイドホルモン合成酵素発現低下の作用点は、精巣ではなく脳下垂体にあることが明らかとなっている (1,2)。従って、抗酸化物質がこの TCDD による作用を消去する場合、投与された抗酸化物質が作用点に到達していることが必要である。本検討では、胎児の脳下垂体中における酸化ストレスの状態を測定していないため、実際に抗酸化物質が到達しているか否かについては不明である。しかし、BHA 処理において、胎児脳下垂体中の Nrf-2 mRNA 量は有意に増加した。Nrf-2 は、酸化ストレス応答性の転写因子であり、BHA など抗酸化物質により活性化されることが明らかとなっている (5,6)。従って、少なくとも BHA は、胎児の脳下垂体に到達し、抗酸化作用を発揮していたと考えられる。しかし、BHA の併用は、胎児脳下垂体における LH および FSH の  $\beta$ -subunit の TCDD による発現低下を回復しなかった。以上の結果から、LA による回復効果は、抗酸化作用以外の作用を介して発揮されていることが強く示唆された。

LA は抗酸化物質であると共に、ピルビン酸等の  $\alpha$ -ケト酸の脱水素反応に必須な補酵素として働くビタミンであり、体内の

エネルギー産生に必要な物質である (7)。また、本ビタミンは、グリシン開裂反応にも関わり、ヌクレオチド合成に必要な一炭素ユニットの供給にも関与している (7)。これらの事実を考慮した場合、TCDD による LH や FSH の発現低下は、LA のビタミン作用を必要とする  $\alpha$ -ケト酸脱水素反応等の失調に基づく可能性が考えられる。LH や FSH の発現制御については不明な点が多い。現在のところ、視床下部から遊離されるゴナドトロピン遊離促進ホルモンが発現制御の中心を担っていると考えられている。これに対し、 $\alpha$ -リポ酸による LH や FSH の発現制御については、これまで全く報告がない。本研究成果は、下垂体性腺刺激ホルモンの発現制御の解明に関して、新たな知見を提示するものであると考えられる。

### D. 結論

TCDD 母体曝露による胎児精巣のステロイドホルモン合成タンパク質、並びに下垂体における性腺刺激ホルモンの発現低下が、LA の併用によりほぼ完全に回復することが明らかとなった。これに対し、他の抗酸化物質では、LA と同様の効果を得ることはできなかった。以上の結果から、TCDD による脳下垂体の LH/FSH の発現低下は、酸化ストレスに起因するのではなく、LA のビタミン作用を必要とする  $\alpha$ -ケト酸脱水素反応等の失調に基づく可能性が示された。

### E. 参考文献

- 1) Mutoh, J., Taketoh, J., Okamura, K., Kagawa, T., Ishida, T., Ishii, Y. and Yamada, H., Fetal pituitary gonadotropin as an initial

target of dioxin in its impairment of cholesterol transportation and steroidogenesis in rats. *Endocrinology*, 147, 927-936 (2005).

2) Taketoh, J., Mutoh, J., Takeda, T., Ogishima, T., Takeda, S., Ishii, Y., Ishida, T. and Yamada, H., Suppression of fetal testicular cytochrome *P450 17* by maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: A mechanism involving an initial effect on gonadotropin synthesis in the pituitary. *Life Sci.*, 80, 1259-1267 (2007).

3) Fernandez-Salguero, P. M., Hilbert, D. M., Rudikoff, S., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J., Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 140, 173-179 (1996).

4) Ishida, T., Hori, M., Ishii, Y., Oguri, K. and Yamada, H., Effects of dioxins on stress-responsive systems and their relevance to toxicity. *J. Dermatol. Sci., Suppl.* 1, 1, S105-S112 (2005).

5) McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Chanas, S. A., Henderson, C. J., McLellan, L. I., Wolf, C. R., Cavin, C. and Hayes, J. D., The cap 'n' collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related Factor 2) controls

both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res.*, 61, 3299-3307 (2001).

6) Venugopal, R. and Jaiswal, A. K., Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant responsive element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase<sub>1</sub> gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14960-14965 (1996).

7) Packer, L., Roy, S. and Sen, C. K., Alpha-lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Adv. Pharmacol.*, 38, 79-101 (1997).

#### F. 健康危険情報

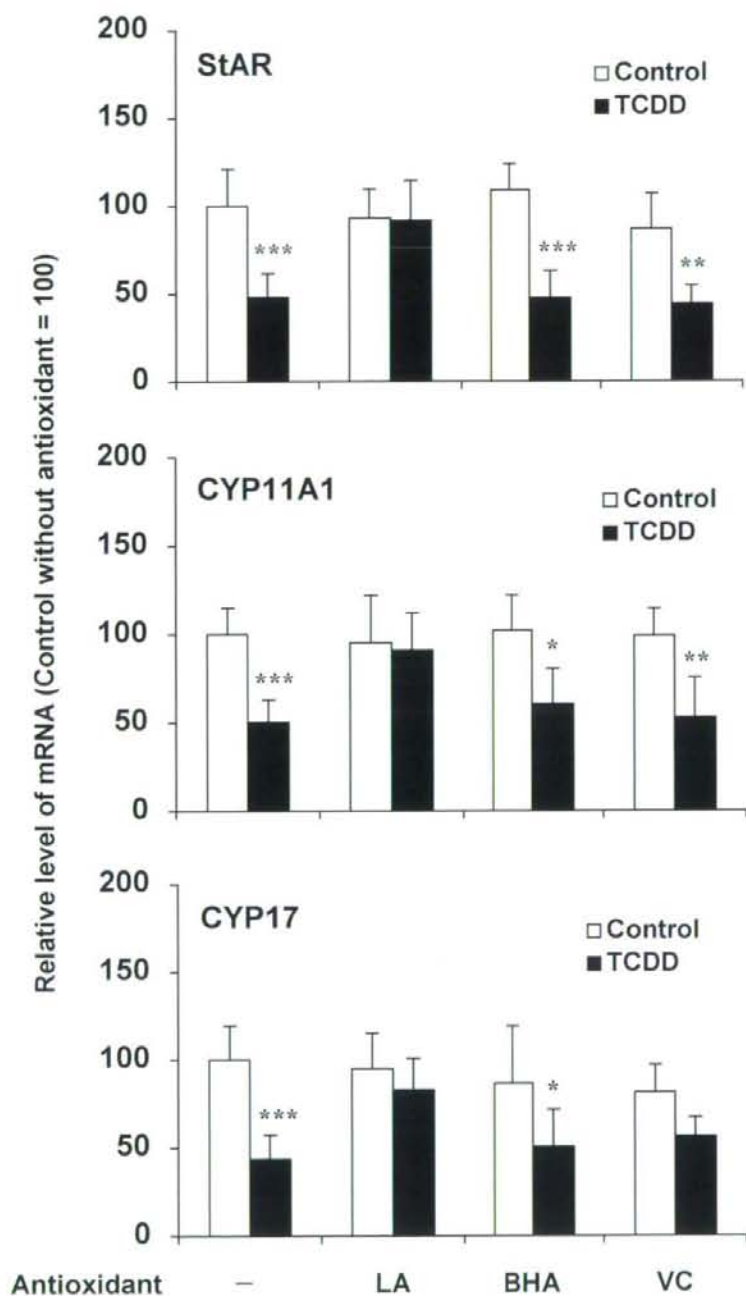
特になし。

#### G. 研究発表

1. フォーラム 2008 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (熊本、2008年10月)
2. 第25回日本薬学会九州支部大会 (宮崎、2008年12月)
3. 日本薬学会第129年会 (京都、2009年3月)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



**Fig. 1.** The effect of antioxidants on the alteration of steroidogenic acute regulatory protein (StAR), cytochrome P450 (CYP) 11A1, and CYP17 mRNAs in fetal testis after maternal exposure to TCDD. Values represent the mean  $\pm$  S.D. of 6 (LA-, BHA- and VC-treated groups) or 12 (control and TCDD-treated group) fetuses. Significant difference from each control: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

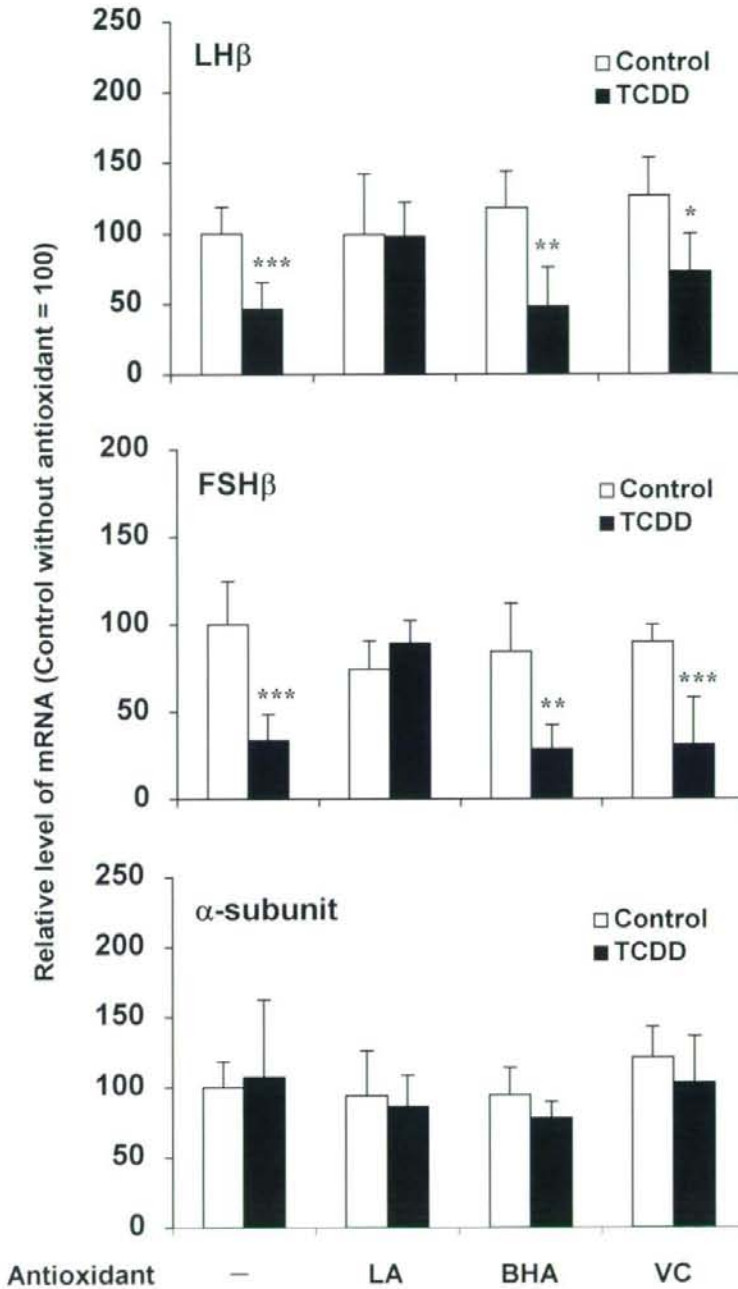


Fig. 2. The effect of antioxidants on the alteration of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) mRNAs in fetal pituitary after maternal exposure to TCDD. Values represent the mean  $\pm$  S.D. of 8 (control), 6 (TCDD only), 4 (LA-treated group), 3 (BHA-treated group), 4 (VC only) and 3 (VC+TCDD-treated group) fetuses. Significant difference from each control: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .



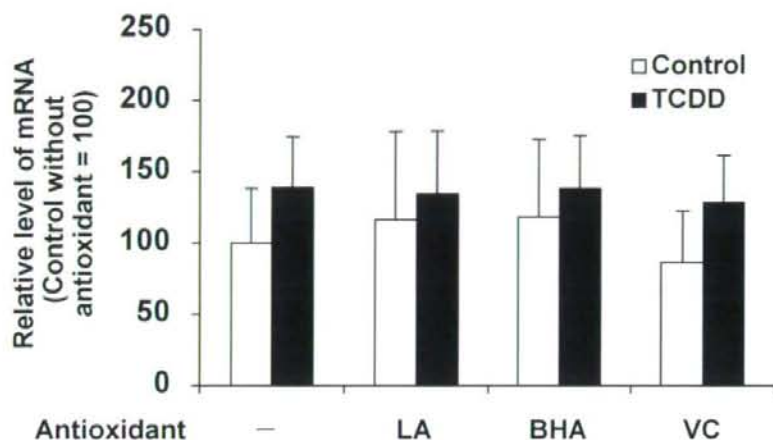


Fig. 3. The effect of antioxidants on the alteration of prolactin mRNAs in fetal pituitary after maternal exposure to TCDD. Values represent the mean  $\pm$  S.D. of 8 (control), 6 (TCDD only), 4 (LA-treated group), 3 (BHA-treated group), 4 (VC only) and 3 (VC+TCDD-treated group) fetuses.

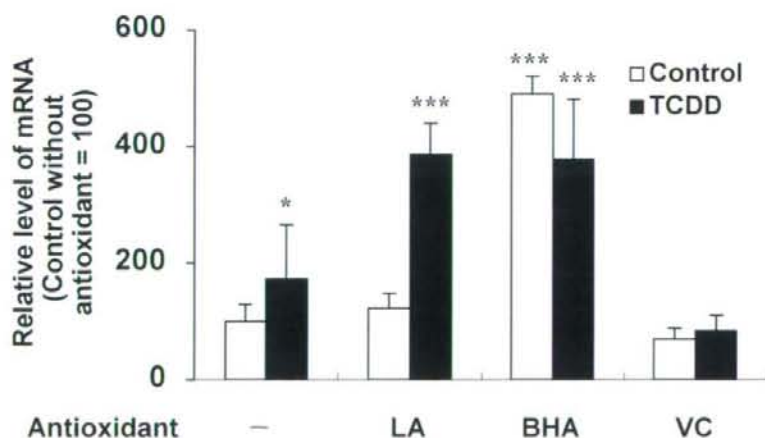


Fig. 4. The effect of antioxidants on the alteration of NF-E2 related factor 2 mRNAs in fetal pituitary after maternal exposure to TCDD. Values represent the mean  $\pm$  S.D. of 7 (control), 6 (TCDD only), 3 (LA-treated group), 3 (BHA-treated group), 4 (VC only) and 3 (VC+TCDD-treated group) fetuses. Significant difference from control with antioxidant absence: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

食物成分 resveratrol によるダイオキシン中毒症状軽減の試み：投与経路の違いに基づいた血中 resveratrol 濃度の経時的変化

研究分担者 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** これまでの研究から、植物ポリフェノールである resveratrol が、ダイオキシン中毒症状の一部に対し有効である可能性が明らかとなっている。また、resveratrol の効果は、その生物学的利用率 (bioavailability) の改善に伴って増強される可能性も示された。本研究では、ダイオキシン中毒症状に対する resveratrol の臨床応用を目指す基礎研究の一環として、resveratrol の経口、皮下および経皮投与における bioavailability を比較・検討した。Wistar 系雄性ラットに resveratrol を投与した場合、血漿中薬物濃度 - 時間曲線下面積 (area under the curve extrapolated infinity,  $AUC_{inf}$ ) は、経口投与 < 皮下投与 < 経皮吸収の順番で増加する傾向が認められた。また、平均滞留時間と半減期についても、同様の傾向が認められた。ダイオキシン中毒症状に対する resveratrol の適用には、さらなる吸収効率の改善は必要不可欠であるが、経皮吸収法は有望な手段の一つであると考えられた。

#### A. 研究目的

当研究室では、ダイオキシン中毒症状に対する予防法や治療法の開発を目的として、resveratrol に注目し検討を行ってきた。その結果、resveratrol が TCDD により惹起される体重増加抑制および脂肪肝を軽減することを明らかにした (平成 17 年度、平成 18 年度分担研究報告書にて報告済み)。さらに、この作用の一部は、resveratrol の生物学的利用率 (bioavailability) の改善に伴い増強された (平成 19 年度分担研究報告書にて報告済み)。Resveratrol は、ダイオキシン類による芳香族炭化水素受容体の活性化に対する antagonist 様作用 (1,2)、および抗酸化ストレス作用 (3,4) を有することが知られている。さらに最近、Jang らは、resveratrol の前投与が、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

による口蓋裂と水腎症の発生頻度を低下させると報告している (5)。これらの事実から、resveratrol がダイオキシン中毒症状に対し有効である可能性は十分に期待できる。

昨年度のマウスを用いた検討において、resveratrol の bioavailability を改善する手段として皮下投与を用いた。その結果、投与時における血漿中薬物濃度 - 時間曲線下面積 (area under the curve extrapolated infinity,  $AUC_{inf}$ ) は、経口投与時に比べ約 4 倍増加した。しかし、この投与方法は、投薬時の動物へのストレス負荷が大きく、臨床応用を考える上でも大きな問題となる。投与時の負担が少なく、且つ高い bioavailability を得ることのできる投与方法を構築することは、臨床応用に向けた重要な命題の一つである。以上のような背景

のもと、本研究では、resveratrol の bioavailability と投与方法との関連性を明らかにするため、経口投与、皮下投与および経皮吸収時における resveratrol の bioavailability を比較・検討した。

## B. 研究方法・研究結果

これまでの検討では、resveratrol の血中濃度測定にマウスを使用した。しかし、個体から得られる血液量が少量であるため、採血は経時的なものではなく、このため kinetic parameters の解析が容易ではなかった。そこで本検討ではラットを用い、尾部より採血を行うことで血液中の resveratrol 量を経時的に観察した。

1 週間馴化した 5 週令の Wistar 系雄性ラットに、propylene glycol に溶解した resveratrol を 150 mg/kg body weight/2 mL 経口投与した。そののち、経時的に尾部より約 750  $\mu$ L 採血した。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、その血漿 50  $\mu$ L に内標準物質である 7-ethoxycoumarin (10  $\mu$ g/mL) を 10  $\mu$ L 添加した。さらに、酢酸エチルを 100  $\mu$ L 加え攪拌したのち、遠心にて分離した上清 90  $\mu$ L を分取した。この抽出操作を 3 回行い、窒素ガスにて酢酸エチルを留去し、残渣をメタノール 100  $\mu$ L に溶解して HPLC 定量用のサンプルとした。Fig. 1 には、血中濃度推移の一例を示す。Resveratrol を経口投与した場合、血中濃度は投与後 30 分で最高値に達し、3 時間後にその約 30% に低下した。経口投与時における  $AUC_{inf}$ 、平均滞留時間 (mean residence time: MRT)、および半減期 (elimination half-life:  $t_{1/2}$ ) は、それぞれ  $0.42 \pm 0.07 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ 、 $2.5 \pm 0.3 \text{ hr}$  および  $1.8 \pm 0.2 \text{ hr}$  であった (Table 1)。

次に、皮下投与時における resveratrol の血中濃度の推移を観察した。経口投与の場合と同様に調製した resveratrol を、ラットの背部皮下に投与し (150 mg resveratrol/kg body weight/2 mL propylene glycol)、経時的に尾部より採血して resveratrol 濃度を測定した。Fig. 2 に血中濃度推移の一例を示す。皮下投与の場合、血中濃度は投与後 20 分で最高値に達しており、その濃度は経口投与時における最高血中濃度と同程度であった。また、投与 24 時間後では、resveratrol の血中濃度は、最高値の約 1/3 に低下した。皮下投与時における  $AUC_{inf}$ 、MRT および  $t_{1/2}$  は、それぞれ  $1.93 \pm 0.41 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ 、 $24.9 \pm 4.1 \text{ hr}$  および  $17.2 \pm 2.8 \text{ hr}$  であった (Table 1)。

最後に経皮吸収による検討を行った。これまでの当研究室における検討から、resveratrol の高い吸収率が得られる軟膏剤の基材として、fatty alcohol propylene glycol (FAPG) 基材が見いだされている。そこで、本検討における経皮吸収実験の軟膏基材として、FAPG 基剤を選択した。75  $^{\circ}\text{C}$  にて propylene glycol に溶解した resveratrol (90 mg/mL)、並びに 75  $^{\circ}\text{C}$  にて溶解させた oleic acid、stearyl alcohol および polyethylene glycol 6000 を乳鉢中にて混和し、軟膏剤を調製した (resveratrol/propylene glycol:stearyl alcohol:oleic acid:polyethylene glycol 6000 = 55%:35%:5%:5%)。ラットへの塗布の方法は、以下の 3 通りに分けて行った。1) 馴化したラットをペントバルビタールにて麻酔したのち、バリカンで背部左側の体毛を刈り (縦 x 横 = 5 cm x 3 cm)、その部分に軟膏剤 150 mg resveratrol/kg body weight/3 g ointment を塗布した (Rat 1)。2) 同様に麻酔したラットの背中中央付近

の体毛をバリカンにて刈り（縦 x 横 = 5 cm x 3 cm）、その部分に軟膏剤を塗布した（Rat 2）。3）同様に麻酔したラットの腹部、および背部の体毛をバリカンにて刈り、その背部約 5 cm x 3 cm の部分に軟膏剤を塗布した（Rat 3）。いずれの方法も、毛を刈る部分は異なるが、背部の同じ面積に同量の軟膏剤を塗布し、塗布後は包帯にて塗布面を保護して採血を行った。Fig. 3 は、3 通りの投与方法における resveratrol の血中濃度の推移を示している。投与部位の違いにより差は見られるが、投与 2~6 時間後に血中濃度は最高値に達し、24 時間後においてもその血中濃度は最高値の 70% ~ 80% を維持していることが明らかとなった。3 ラットの動態学的パラメータをまとめると、それぞれ  $2.31 \pm 0.15 \mu\text{g} \cdot \text{hr/mL}$  ( $\text{AUC}_{\text{inf}}$ )、 $71.7 \pm 26.3 \text{ hr}$  (MRT) および  $49.7 \pm 18.2 \text{ hr}$  ( $t_{1/2}$ ) であった (Table 1)。

#### (倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「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実施した。

### C. 考察

本検討より、resveratrol の bioavailability は、経口投与 < 皮下投与 < 経皮吸収の順番で改善される傾向にあることが明らかとなった。経皮吸収に関しては、投与方法の異なるデータをまとめたものであり、厳密には一つのパラメータとして示すことはできない。しかし、経口投与、並びに皮下投与に比べ各動態学的パラメータが増加することは明らかであった。経皮吸収は、選定される基材、薬物濃度、吸収促進剤の有無、さらに塗布部分などの要因に

より吸収効率が大きく変動する。本検討においても、動物の個体間で投与開始から数時間における血中濃度が大きく異なっていた。この原因を明らかにすることはできなかったが、塗布する部位が若干違うものの、その他の条件は全く同じであったことから、塗布後の薬物接触部の補綴などの些細な違いが要因となった可能性が考えられる。一方、経口投与と皮下投与では、3 個体の血中濃度の推移に大きな差は認められなかった。従って、resveratrol の経皮吸収による安定した血中濃度を得るためには、塗布された軟膏剤から皮膚を通過する過程において、安定した resveratrol の通過が必要不可欠であり、この達成に向けたさらなる条件検討が必要であると考えられた。

前年度、マウスを用いた検討から、ダイオキシンの一部に対して resveratrol の皮下投与が、経口投与に比べ有効であることが明らかとなっている。この時の投与量当たりに換算した  $\text{AUC}_{\text{inf}}$  は  $0.43 \mu\text{g} \cdot \text{hr/mL}$  であり、本検討における経皮吸収における値に比べ約 28 倍高い値であった。このことから、resveratrol の経皮吸収には、大きな種差があることも示唆され、本ポリフェノールをダイオキシン毒性軽減の目的でヒトへ適用するには、ヒトでの availability が満足すべきものか否かを検証する必要も残っている。

### D. 結論

ラットを用いて resveratrol の bioavailability を解析した結果、経口投与 < 皮下投与 < 経皮吸収の順番で改善される傾向にあることが明らかとなった。しかし、本検討における経皮吸収時の  $\text{AUC}_{\text{inf}}$  は、マウスにおける皮下投与時の値に比べ

極めて低い値となり、経皮投与法の利点には大きな動物種差が存在することも示唆された。ダイオキシン中毒症状に対する resveratrol の適用を考えた場合、さらなる吸収効率の改善は必要不可欠と考えられる。しかし、同一動物種間で比べた場合、経皮吸収は最も高い bioavailability を得られる方法であり、今後の臨床応用を考える上で有効な手段の一つであると思われる。

#### E. 参考文献

- 1) Amakura, Y., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Yoshida, T. and Maitani, T., Screening of the inhibitory effect of vegetable constituents on the aryl hydrocarbon receptor-mediated activity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Biol. Pharm. Bull., 26, 1754-1760 (2003).
- 2) Casper, R. F., Quesne, M., Rogers I. M., Shirota, T., Jolivet, A., Milgrom, E. and Savouret, J.-F., Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: Implications for prevention of dioxin toxicity. Mol. Pharmacol., 56, 784-790 (1999).
- 3) Frankel, E. N., Waterhouse, A. L. and Kinsella, J. E., Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. Lancet, 341, 1103-1104 (1993).
- 4) Fuhrman, B., Lavy, A. and Aviram, M., Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density-lipoprotein to lipid-peroxidation. Am. J. Clin. Nutr., 42, 549-554 (1995).
- 5) Jang, J. Y., Park, D., Shin, S., Jeon, J. H., Choi, B. I., Joo, S. S., Hwang, S. Y., Nahm, S. S. and Kim, Y. B., Antiteratogenic effect of resveratrol in mice exposed in utero to

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Eur. J. Pharmacol., 591, 280-283 (2008).

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

特になし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

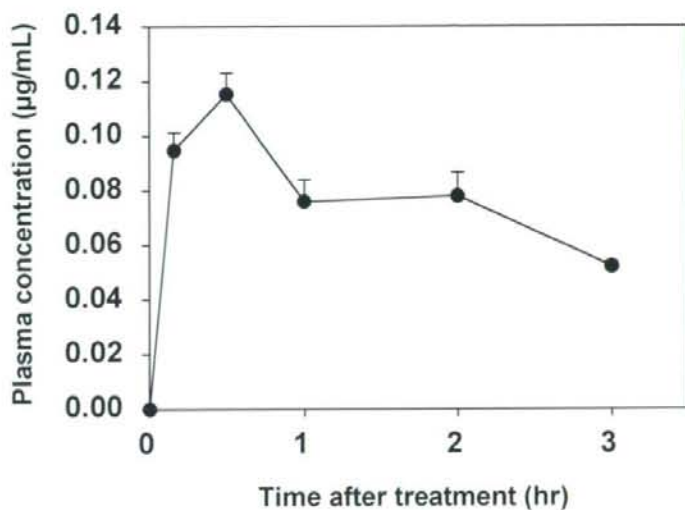


Fig. 1. Plasma concentration of resveratrol given to rats by oral administration. The values represent the mean  $\pm$  S.D. (4 assays).

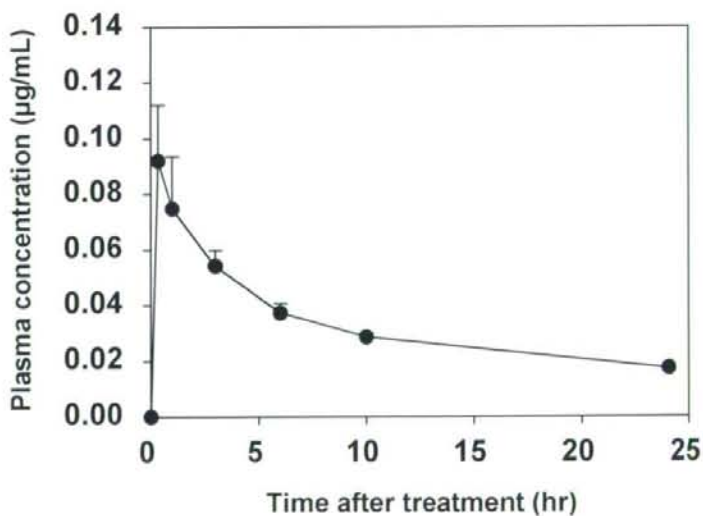
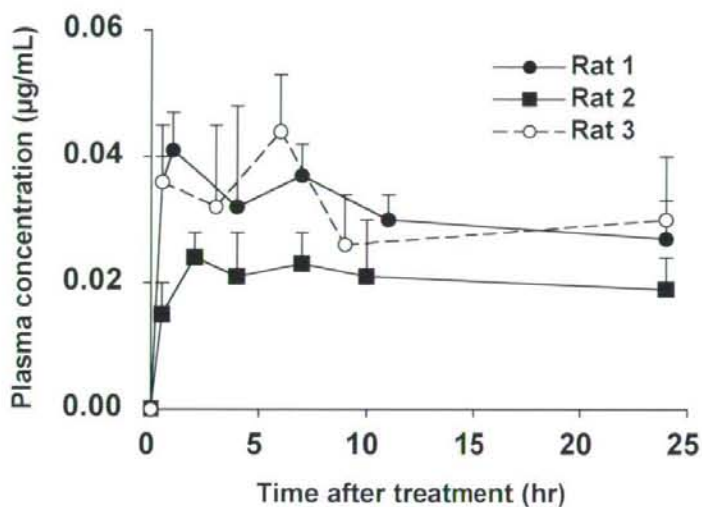


Fig. 2. Plasma concentration of resveratrol injected subcutaneously to rats. The values represent the mean  $\pm$  S.D. (4 assays).



**Fig. 3.** Plasma concentration of resveratrol given to rats by transdermal absorption. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (4 assays). The details of treatment to Rat 1, Rat 2 and Rat 3 are described in the text.

**Table 1.** Pharmacokinetics parameters of resveratrol given by oral, subcutaneous and transdermal absorption administration obtained by non-compartmental analysis.

Parameter	Administration route		
	Oral	Subcutaneous	Transdermal
AUC <sub>inf</sub> (µg·hr/mL)	0.42 $\pm$ 0.07	1.93 $\pm$ 0.41 ***	2.31 $\pm$ 0.15 ***
MRT (hr)	2.5 $\pm$ 0.3	24.9 $\pm$ 4.1	71.7 $\pm$ 26.3 **
t <sub>1/2</sub> (min)	1.8 $\pm$ 0.2	17.2 $\pm$ 2.8	49.7 $\pm$ 18.2 **

Significant difference from each value of oral administration: \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; from each value of subcutaneous injection: \*,  $p < 0.01$ . Notes. AUC<sub>inf</sub>, area under the curve extrapolated to infinity; MRT, mean residence time; t<sub>1/2</sub>, elimination half-life.

研究成果の刊行に関する一覧表

(2006～2008 年度分)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kajiwara J, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Inoue S, Tobiishi K, Onozuka D, Takao Y, Nakagawa R, Iida T, Yoshimura T, Furue M	Time trend of concentration of Dioxin like PCBs, PCDFs, and PCDDs in blood of Yusho patients	Masatoshi Morita	Persistent Organic Pollutants (POPs) research in Asia	Dioxin 2007		2008	400-403
Masuda Y, Yoshimura T, Kajiwara J, Ryan J	Transition of PCB and PCDF concentration in Yusho patients for 38 years	Masatoshi Morita	Persistent Organic Pollutants (POPs) research in Asia	"The 27th International symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs) : Dioxin 2007 was held in September 3-7th 2007 at hotel Okura Tokyo"		2008	431-436
上ノ土武、柴田智子、古江増隆	ダイオキシン類と皮膚疾患	玉置邦彦	最新皮膚科学体系 2006-2007	中山書店	東京都、日本	2006	293-302

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Endo T, Matsuoka M, and Koga N	Metabolism of 2,2',3,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB146) by liver microsomes from rats, hamsters and guinea pigs	Organohalogen Compounds	70	1185-1188	2008
Kato Y, Haraguchi K, Kubota M, Ikushiro S, Sakaki T, Koga N, Yamada S, and Degawa M	A possible mechanism for the decrease in serum thyroxine level by 4-OH-2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl in mice	Organohalogen Compounds	70	1601-1604	2008
Nagayama J., Hirakawa H., Kajiwara J., Todaka T., Shibata S., Tsuji H. and Iwasaki T	Promotive excretion of polychlorinated dibenzofurans by FBRA in patients with Yusho	Organohalogen Compounds	70	1574-1577	2008
Nagayama J., Todaka T., Hirakawa H., Kajiwara J., Yoshimura T. and Furue M	Evaluation on toxic contribution of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs determined in the preserved umbilical cords of Yusho patient	Organohalogen Compounds	70	410-413	2008
Aozasa O, Ohta S, Nakao T, Miyata H, Ishizawa H, Sakashita S, Sato R, Mizuno R	PCB contamination assessment of yusho patients by using preserved human umbilical cord	Bull Environ Contam Toxicol	81(6)	578-582	2008
Todaka T, Hori T, Hirakawa H, Kajiwara J, Yasutake D, Onozuka D, Iida T, Furue M.	Congener-specific analysis of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 127 elderly residents in Nakagawa Town, Fukuoka Prefecture, Japan	Chemosphere	73(6)	865-872	2008



Yoshimura T, Onozuka D, Kaneko S, Furue M	Mortality among Yusho patients: 40 Years of Follow-Up	Organohalogen Compounds	70	422-425	2008
古江増隆	序言	福岡医学雑誌	98(5)	127-128	2007
神奈川芳行, 松本伸哉, 田島文一, 上ノ土武, 柴田智子, 古江増隆, 今村知明	2001~2003年度に血中PCDFs濃度を測定した油症患者の平均値と現在残留する症状等の比較	福岡医学雑誌	98(5)	129-135	2007
柴田智子, 徳永章二, 古江増隆	尿中ジアセチルスベルミンと油症に関する検討	福岡医学雑誌	98(5)	136-140	2007
清水和宏, 小川文秀, 佐藤伸一	油症認定患者血中 Total Antioxidant Power の検討	福岡医学雑誌	98(5)	141-142	2007
吉村俊朗, 中野治郎, 片岡英樹	カネミ油症検診者の血清アルドラーゼ	福岡医学雑誌	98(5)	143-148	2007
高尾佳子, 小野塚大介, 片岡恭一郎, 戸高尊, 平川博仙, 梶原淳睦, 吉村健清	油症患者血液中 2,3,4,7,8-PeCDF 濃度の4年間の傾向	福岡医学雑誌	98(5)	149-152	2007
松本伸哉, 神奈川芳行, 田島文一, 上ノ土武, 柴田智子, 古江増隆, 今村知明	カネミ油症患者における, ダイオキシン濃度と, 最近及び過去の臨床症状の関係	福岡医学雑誌	98(5)	153-159	2007
徳永章二, 柴田智子, 古江増隆	油症患者の既往歴頻度と血中脂質 2,3,4,7,8-PeCDF レベルとの関連	福岡医学雑誌	98(5)	160-165	2007
辻博, 池田正春	油症における性腺機能の検討	福岡医学雑誌	98(5)	166-169	2007
橋口勇, 吉嶺嘉人, 前田英史, 後藤康治, 石河真幸, 藤井慎介, 友清淳, 福山宏, 奥村英彦, 赤峰昭文	油症患者における歯周疾患ならびに口腔内色素沈着の疫学的調査(第六報)	福岡医学雑誌	98(5)	170-175	2007
堀就英, 安武大輔, 戸高尊, 平川博仙, 井上英, 梶原淳睦, 中川礼子, 芦塚由紀, 飯田隆雄, 吉村健清	福岡県油症検診(2006年度)受診者における血液PCB濃度と性状	福岡医学雑誌	98(5)	176-181	2007
増田義人, 吉村健清, 梶原淳睦, John Jake Ryan	油症発生より38年間の患者血液中 PCBs, PCDFs の濃度変遷	福岡医学雑誌	98(5)	182-195	2007
松枝隆彦, 梶原淳睦, 岩本眞二, 飯田隆雄, 伊津野知佳, 吉村健清	油症認定患者と一般人におけるダイオキシン類の血中残留性と暴露経路の関連性について	福岡医学雑誌	98(5)	196-202	2007
武藤純平, 石田卓巳, 石井祐次, 山田英之	ダイオキシン類母体曝露がマウス胎仔精巢の性ステロイドホルモン生成系発現に及ぼす影響	福岡医学雑誌	98(5)	203-207	2007

Susumu BAN, Tomoko KONDO, Mayumi ISHIZUKA, Seiko SASAKI, Kanae KONISSHI, Noriaki WASHINO, Syoichi FUJITA, Reiko KISHI	Using Microarray Analysis to Evaluate Genetic Polymorphisms Involved in the Metabolism of Environmental Chemicals	福岡医学雑誌	98(5)	208-214	2007
Junya NAGAYAMA, Hironori HIRAKAWA, Junboku KAJIWARA, Takao IIDA, Takashi TODAKA, Takeshi UENOTSUCHI, Satoko SHIBATA, Hiroshi TSUJI, Teruaki IWASAKI.	Excretion of Causative PCDFs Congeners of Yusho by One Year Intake of FBRA in Patients with Yusho	福岡医学雑誌	98(5)	215-221	2007
Takashi TODAKA, Hironori HIRAKAWA, Junboku KAJIWARA, Tsuguhide HORI, Kazuhiro TOBUSHI, Daisuke ONOZUKA, Takao IIDA, Takesumi YOSHIMURA, Masutaka FURUE	Dioxin Concentration in the Blood of Patients Collected during Medical Check-up for Yusho in 2004-2005	福岡医学雑誌	98(5)	222-231	2007
芦塚由紀, 中川礼子, 平川博仙, 堀就英, 梶原淳睦, 飯田隆雄, 吉村健清	2005年度油症検診における血液中ポリ塩化クアテルフェニルの分析	福岡医学雑誌	98(5)	232-235	2007
太田千穂, 忸岡樹子, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸	2,2',4,5,5'-五塩素化ビフェニル(CB101)のラット, ハムスターおよびモルモット肝ミクロソームによる代謝	福岡医学雑誌	98(5)	236-244	2007
Imamura T, Kanagawa Y, Matsumoto S, Tajima B, Uenotsuchi T, Shibata S, Furue M	Relationship between clinical features and blood levels of pentachlorodibenzofuran in patients with Yusho	Environ Toxicol	22(2)	124-131	2007
Imamura T, Kanagawa T, Matsumoto S, Tajima B, Uenotsuchi T, Shibata S, Furue M	Epidemiological aspects of Yusho : Clinical features and blood levels of pentachlorodibenzofuran in Yusho patients	DIOXIN 2007 Organohalogen Compounds	69	87-90	2007
Imamura T, Ide H, Yasunaga H:	History of public health crises in Japan	J Public Health Policy	28(2)	221-237	2007
Tomoaki Imamura, Shinya Matsumoto, Yoshiyuki Kanagawa, Bunichi Tajima, Shiro Matsuya, Masutaka Furue and Hiroshi Oyama:	A technique for identifying three diagnostic findings using association analysis.	Medical and Biological Engineering and Computing	45(1)	51-59	2007
Takao Iida, Takashi Todaka, Hironori Hirakawa, Tsuguhide Hori, Kazuhiro Tobiishi, Takahiko Matsuueda, Shaw Watanabe, Taketo Yamada	Concentration and distribution of dioxins and related compounds in human tissues	Chemosphere	67	S263-S271	2007
Takashi Todaka, Hironori Hirakawa, Tsuguhide Hori, Kazuhiro Tobiishi, Takao Iida, Masutaka Furue	Concentration of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-ortho and mono-ortho polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients	Chemosphere	66	1983-1989	2007

Kajiwarra J, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Inoue S, Tobiishi K, Onozuka D, Takao Y, Nakagawa R, Iida T, Yoshimura T, Furue M	TIME TREND OF CONCENTRATIONS OF DIOXIN LIKE PCBs, PCDFs, AND PCDDs IN BLOOD OF YUSHO PATIENTS	Organohalogen Compounds	69	91-93	2007
Masuda Y, Yoshimura T, Kajiwarra J, Ryan JJ	TRANSITION OF PCB AND PCDF CONCENTRATIONS IN YUSHO PATIENTS FOR 38 YEARS	Organohalogen Compounds	69	94-97	2007
Todaka T, Hirakawa H, Kajiwarra J, Tobiishi K, Onozuka D, Iida T, Yoshimura T, Furue M	DIOXIN CONCENTRATION IN THE BLOOD OF PATIENTS COLLECTED DURING MEDICAL CHECK-UP FOR YUSHO IN 2006.	Organohalogen Compounds	69	2129-2132	2007
Hori T, Inoue S, Yasutake D, Todaka T, Hirakawa H, Kajiwarra J, Nakagawa R, Ashizuka Y, Iida T, Yoshimura T, Furue M	PCBs CONCENTRATIONS IN BLOOD OF YUSHO PATIENTS: 2006 YUSHO ANNUAL INSPECTION IN FUKUOKA, JAPAN	Organohalogen Compounds	69	2137-2140	2007
Koga N, Ohta C, Haraguchi K, Matsuoka M, Kato Y, Endo T	The formation of a catechol metabolite of 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (CB101) by liver microsomes from rats, hamsters, guinea pigs and humans	Organohalogen Compounds	69	1757-1760	2007
Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Matsuoka M, Endo T, Koga N,	The distribution of metabolites of 2,2',3,4,4',5',6-heptachlorobiphenyl (CB183) in rats and guinea pigs	Organohalogen Compounds	69	1761-1764	2007
Y. Kato, S. Ikushiro, R. Takiguchi, K. Haraguchi, N. Koga, S. Uchida, T., Sakaki, S. Yamada, J. Kanno, and M. Degawa	A novel mechanism for polychlorinated biphenyls-induced decrease in serum thyroxine level in rats	Drug Metab Dispos	35(10)	1949-1955	2007
Shimizu K, Ogawa F, Thiele JJ, Bae S, Sato S.	Lipid peroxidation is enhanced in Yusho victims 35 years after accidental poisoning with polychlorinated biphenyls in Nagasaki, Japan	J Appl Toxicol	27(2)	195-197	2007
内博史, 吹譯紀子, 柴田智子, 古江増隆	ダイオキシンと皮膚	アレルギーの臨床	27(12)	938-944	2007
Todaka T, Hirakawa H, Kajiwarra J, Hori T, Tobiishi K, Iida T, Yoshimura T and Furue M	Follow-up survey of dioxins concentrations in the blood of Yusho patients in 2002-2005	Organohalogen compounds	68	1605-1607	2006
Takashi Todaka, Hironori Hirakawa, Tsuguhide Hori, Kazuhiro Tobiishi, Takao Iida, Masutaka Furue	Concentration of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-ortho and mono-ortho polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients.	Chemosphere	66	1983-1989	2007
太田千穂, 原口浩一, 尾崎真理, 森岡樹子, 古賀信幸	2,2',3,4,4',5,5',6-七塩素化ビフェニル(CB187)の主代謝物の合成	中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要	38	197-201	2006

Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Ozaki M, Koga N	In vitro metabolism of 2, 2', 3, 4, 4', 5, 5', 6-heptachlorobiphenyl (CB183) with liver microsomes from rats, guinea pigs and hamsters	Organohalogen compounds	68	1733-1736	2006
上ノ土武、柴田智子	ダイオキシン類が人体に及ぼす影響油症を通じて明らかになったこと	日皮会誌	116(13)	2174-2177	2006
柴田智子、上ノ土武、古江増隆	環境ホルモンと皮膚疾患－油症をモデルにして－	皮膚アレルギーフロンティア	4(3)	163-167	2006