

フェノール性二量体の抗酸化活性と抗菌活性

緒方正裕

Antioxidant and Antibacterial Activities of Dimeric Phenol Compounds

Masahiro OGATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Aomori University, 2-3-1 Koubata,
Aomori City, 030-0943, Japan

(Received March 25, 2008)

We studied the antioxidant and antibacterial activities of monomeric and dimeric phenol compounds. Dimeric compounds had higher antioxidant activities than monomeric compounds. Electron spin resonance spin-trapping experiments showed that phenol compounds with an allyl substituent on their aromatic rings directly scavenged superoxide, and that only eugenol trapped hydroxyl radicals. We developed a generation system of the hydroxyl radical without using any metals by adding L-DOPA and DMPO to PBS or MiliQ water *in vitro*. We found that eugenol trapped hydroxyl radicals directly and is metabolized to a dimer. On the other hand, dipropofol, a dimer of propofol, has strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria. However, it lacks solubility in water and this property is assumed to limit its efficacy. We tried to improve the solubility and found a new solubilization method of dipropofol in water with the addition of a monosaccharide or ascorbic acid.

Key words—antioxidant; antibacterial activity; phenolic compound; eugenol; dipropofol

1. はじめに

21世紀になって高齢化社会が現実のものとなってきた。そのような中、医療問題に目を向けてみると、活性酸素を含むフリーラジカルが原因とされる動脈硬化、糖尿病、発がん、老化や基礎疾患を持ったお年寄りの生命も脅かす院内感染などが社会問題となっている。¹⁻⁵⁾ これらの問題に対して多方面から研究が行われ、発病メカニズムの解明や新薬の開発が行われている。

Phenolをはじめとするフェノール性化合物は、いくつかの生物活性が知られている (Fig. 1)。Phenolは消毒薬として利用されており、天然フェノール性化合物である eugenol は歯科領域で抗菌薬として利用されている。また、catechin や α -tocopherol は抗酸化作用や老化抑制作用などが知られている。⁶⁻⁸⁾ 合成フェノール性化合物では、合成酸化防止剤である BHA (butylated hydroxyanisole) や麻酔薬成分として臨床応用されている propofol

(2,6-diisopropylphenol) などがある。

フェノール性二量体化合物としては、厚朴の成分である magnolol や honokiol に抗酸化活性や虫歯菌に対する抗菌活性があることが報告されている。^{9,10)} Eugenol の二量体である dieugenol は、歯科領域において患者の eugenol の苦みや痛みに対してその代わりとして利用できないか研究が行われている。このような研究の中で、抗酸化作用や抗炎症作用などの報告もある。^{11,12)} Di-BHA は BHA の酸化代謝物として得られている。¹³⁾

フェノール性二量体化合物はなかなか医薬品などに応用されていなかったが、2006年にカネボウから美白有効成分として magnolignan が開発された。作用としては、メラニン生成反応を促進する酵素であるチロシナーゼを直接阻害するのではなく、チロシナーゼタンパク質の成熟阻害という新しいメカニズムに基づき美白作用を示すと報告されている。¹⁴⁾ このようにフェノール性二量体化合物には、単量体と違う新しい作用を持つ可能性がある。

本稿では抗酸化活性と抗菌活性を中心にフェノール性二量体化合物についてわれわれの得た知見を紹介する。

青森大学薬学部 (〒030-0943 青森市幸畑 2-3-1)

e-mail: ogata-ms@aomori-u.ac.jp

本総説は、平成19年度日本薬学会東北支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

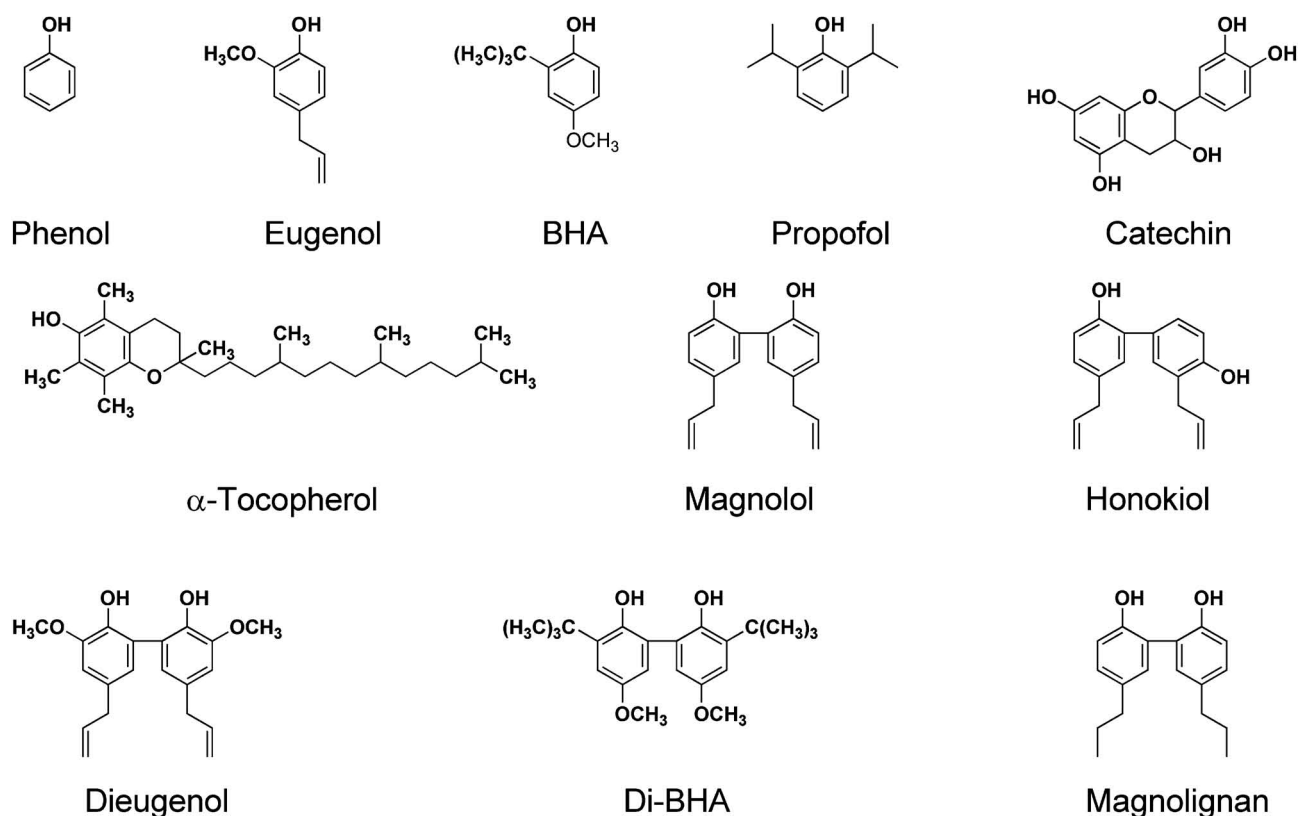


Fig. 1. Structures of Phenolic Compounds

2. Eugenol の抗酸化機構の解明

フェノール性化合物の抗酸化機構を考える上で、フェノール性水酸基以外の置換基がどのような役割をしているか調べることは重要である。そこで、methoxy 基と allyl 基を有する eugenol とその類縁体を用いて各種測定を行った。類縁体としては、dihydroeugenol, dieugenol, tetrahydrodieugenol, iso-eugenol, diisoeugenol, dehydrodiisoeugenol を用いた (Fig. 2)。脂質過酸化抑制能としては TBA 法を用いた。その結果、二量体は単量体よりも強い活性を認めたが、allyl 体とその還元体では有意な差は認められなかった (Table 1)。

次に脂質過酸化の前段階で発生が予想される活性酸素種であるスーパーオキシドとヒドロキシルラジカルに対する捕捉能を ESR のスピントラッピング法を用いて検討した。スーパーオキシドは、キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で発生させ、スピントラッピング剤である DMPO を加え DMPO-OOH のシグナルとして測定し、ヒドロキシルラジカルは Fenton 反応で発生させ、DMPO を加え DMPO-OH として測定した。その結果、スーパー

オキシド捕捉能は、allyl 基を有する化合物に認められた。Allylbenzene には、捕捉能が認められないことから、フェノール性水酸基と allyl 基の相互作用であると考えられるが、詳細については検討中である。一方、ヒドロキシルラジカル捕捉能は、eugenol にのみ認められた (Table 1)。

フェノール性化合物の抗酸化活性を評価する際、金属イオンとのキレート反応が問題となる。今回用いた TBA 法 (Fe-ascorbic acid) も Fenton 反応 (Fe-H₂O₂) も金属を用いている。そこで eugenol がキレート反応を介さずヒドロキシルラジカルを捕捉するかを検討するため、金属を用いない発生系の検討を行った。パーキンソン病治療薬である L-DOPA は、神経細胞毒性が知られており、その原因として活性酸素の関与が指摘されている。¹⁵⁾ L-DOPA と PBS ではシグナルは観測されいなが、DMPO と L-DOPA を PBS 中で 37°C、12 時間反応させるとヒドロキシルラジカルに特徴的な 1 : 2 : 2 : 1 のシグナルが観測される (Fig. 3)。さらに 24 時間反応させるとピークが高くなることによりヒドロキシルラジカルが時間依存的に増えることが観察された。同

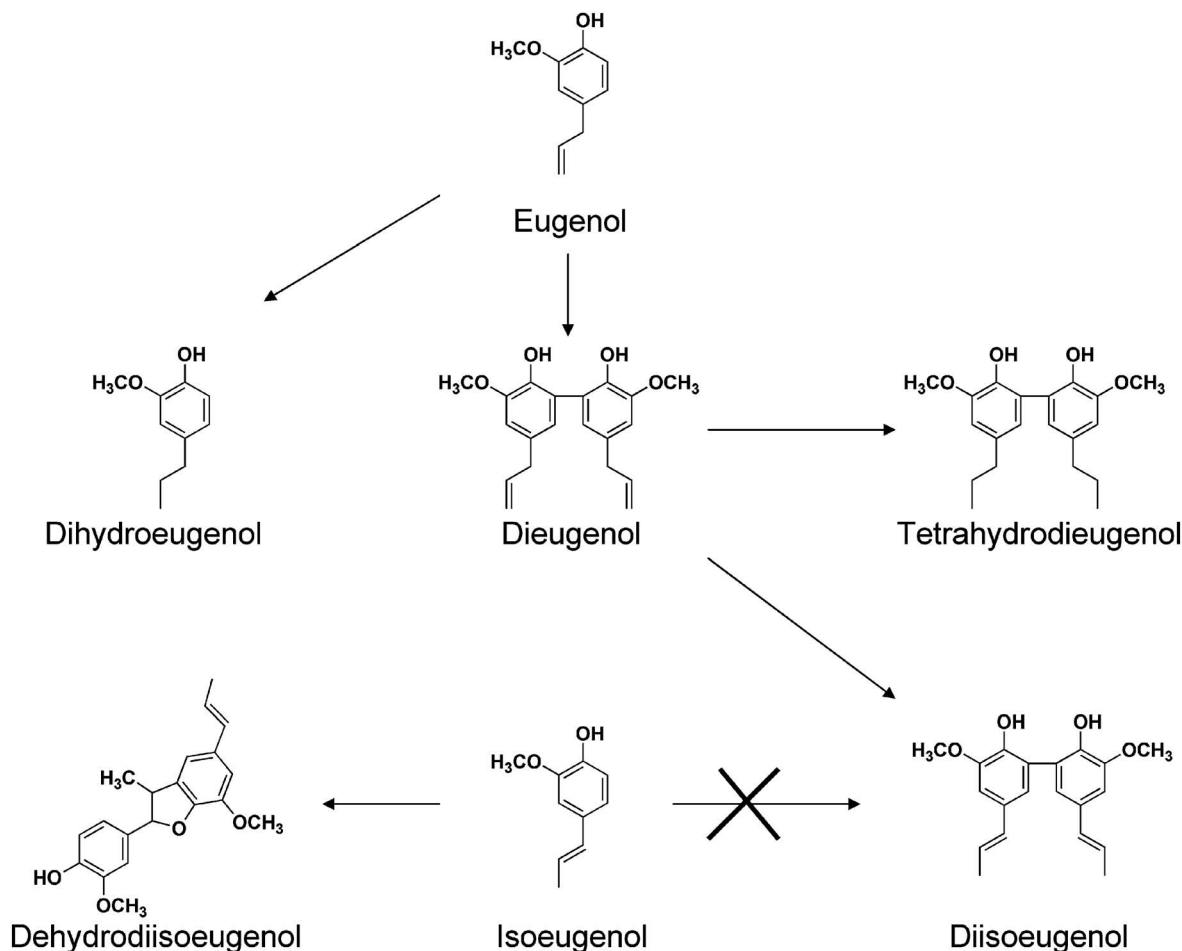


Fig. 2. Structures of Eugenol and Its Related Assessed Compounds

Table 1. Inhibition of Lipid Peroxidation, DPPH, Superoxide and Hydroxyl Radical by Eugenol and Its Related Compounds

Samples	TBA (62.5 μM)	DPPH IC_{50} (μM)	DMPO-OOH IC_{50} (mM)	DMPO-OH IC_{50} (mM)
Eugenol	43%	>800	5.3	1.8
Dieugenol	86%	160	3.3	>10
Dihydroeugenol	64%	421	>10	>10
Tetrahydrodieugenol	79%	164	>10	>10
Isoeugenol	40%	>800	8.3	>10
Diisoeugenol	49%	280	7.2	>10
Dehydrodiisoeugenol	20%	>800	>10	>10
Allylbenzene	0%	>800	>10	>10
α -Tocopherol	97%	80	>10	>10

様の結果は、MiliQ 水を用いても観察された。この金属を使用せず L-DOPA と DMPO を MiliQ 中に加えるだけという極めて簡単な系ができたので、eugenol が直接ヒドロキシルラジカルを捕捉するかを検討した。その結果、eugenol は濃度依存的にヒ

ドロキシルラジカルを捕捉していることが確認された (Fig. 4).^{16,17)}

Eugenol の抗酸化機構を推定してみると、eugenol は活性酸素種を捕捉し、自身は二量体へと代謝され、代謝物である dieugenol はヒドロキシルラ

ジカル捕捉能がないことから脂質ラジカルを捕捉し、脂質過酸化連鎖反応を停止していると考えている (Fig. 5).¹⁸⁾

3. Dipropofol の抗酸化活性

パラ-パラ結合しているフェノール性二量体化合物の抗酸化活性は、propofol 類縁体を用いて検討を行った。類縁体として 2,6-dimethylphenol と 2,6-di-*t*-butylphenol を用いた。TBA 法と DPPH 捕捉能ではオルト-オルト体よりも低濃度で活性を示した (Table 2)。特に isopropyl 基を持つ propofol の二量体である dipropofol は α -tocopherol と同等の活性を認めた。

この強い活性を認めた dipropofol について 2 つの神経細胞毒性モデルを用いて細胞保護作用について検討を行った。1 つ目のモデルとしては、脳虚血傷害における神経細胞死に關与するグルタミン酸の神経細胞毒性を用いた。グルタミン酸は、神経伝達

物質として機能しているが、脳虚血時に過剰放出されると、種々のレセプターを介したのち、細胞内グルタミン酸カスケードが活性化されカルシウムイオンの流入を促進し、酸素ラジカルが産生される。この酸素ラジカルは、細胞内に過酸化物を蓄積させ、最終的に細胞死を惹起すると考えられている。¹⁹⁾ 神経細胞のモデル細胞としては、マウス神経芽細胞腫とラット初代網膜神経細胞とのハイブリドームである N18-RE-105 細胞を用いた。

Dipropofol 及び propofol のグルタミン酸毒性及び細胞内グルタチオンの生合成酵素阻害剤である BSO (buthionine sulfoximine) 毒性の抑制効果を Fig. 6 に示す。活性の定量は、LDH 法を用いた。その結果、dipropofol は 62.5 nM 以上の濃度でほぼ完全にグルタミン酸による細胞死を抑制したが propofol には活性が認められなかった。



Fig. 3. ESR Spectra of Hydroxyl Radicals Produced by Incubation of L-DOPA with Spin-trapped 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO)

(A): L-DOPA alone (in PBS), (B): L-DOPA+DMPO (in PBS, after 12 h), (C): L-DOPA+DMPO (in PBS, after 24 h), (D): L-DOPA+DMPO (in MilliQ water, after 24 h).



Fig. 4. Trapping Effect of Eugenol on Generating Hydroxyl Radical by L-DOPA

(A): L-DOPA+DMPO, (B): L-DOPA+DMPO+500 μ M eugenol, (C): L-DOPA+DMPO+1 mM eugenol. All experiments: 200 μ M L-DOPA and 2.5% DMPO used. After adding L-DOPA, the ESR spectra were repetitively acquired for 24 h.

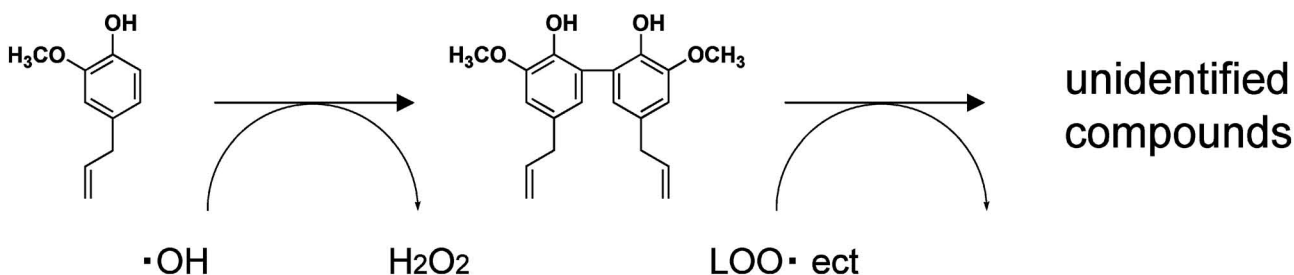
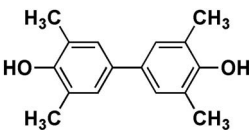
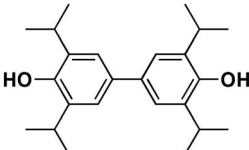
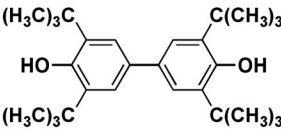


Fig. 5. Antioxidant Mechanism of Eugenol

Table 2. Inhibition of Lipid Peroxidation and DPPH by Dipropofol and Its Related Compounds

Samples	TBA (62.5 μM)	DPPH IC ₅₀ (μM)
 Di (2,6-dimethylphenol)	85%	593
 Dipropofol	98%	80
 Di (2,6-di- <i>t</i> -butylphenol)	97%	184
α -Tocopherol	97%	80

もう1つのモデルは、アルツハイマー病の原因であると注目されているアミロイド β ペプチド ($A\beta$)による神経細胞毒性を用いた。アルツハイマー病の発症原因はすべて解明されている訳ではないが、 $A\beta$ ペプチドをラット胎児脳由来の初代培養神経細胞に添加すると神経細胞死が起こることが報告されたことにより、 $A\beta$ ペプチドによる毒性がアルツハイマー病の原因であることが強く支持されている。²⁰⁾また、アルツハイマー病患者の脳にはTBARSが多く存在していることから $A\beta$ ペプチドによる神経細胞毒性は、フリーラジカルの形成を介して発現するのではないかと考えられている。²¹⁾神経細胞モデルとして、 $A\beta$ の毒性が観察されるラット黒褐色細胞腫PC12細胞と、より高次な系であるラット胎児由来の初代培養海馬細胞を用いた。

Figure 7(A)にPC12細胞での結果を示す。0.2 μM の $A\beta$ (25–35)で処理するとMTT還元能は40%まで低下した。これに対してdipropofolを10 μM 添加するとMTT還元能は完全に回復した。一方、propofolは1 μM で65%まで回復させたものの10 μM の濃度では逆に直接細胞毒性を示した。

$A\beta$ ペプチドはPC12細胞に対しては細胞死を引

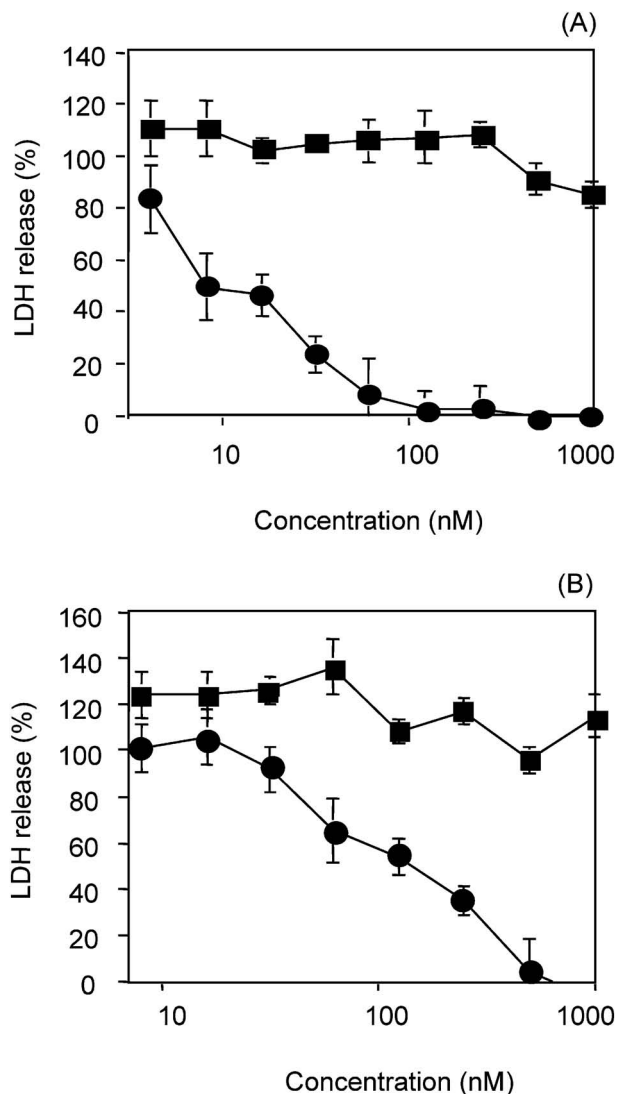


Fig. 6. Inhibitory Effects of Dipropofol on the Cytotoxicity of Glutamate (A) and BSO (B)

Cell survival was determined by LDH assay. ■: propofol, ●: dipropofol.

き起こさないため、実際に脳内で $A\beta$ ペプチドの毒性より神経細胞を保護するかは判断できない。そこで $A\beta$ 毒性によって細胞死が誘導される初代ラット胎児海馬細胞においてdipropofolが細胞保護活性を示すかを検討した。その結果、20 μM の $A\beta$ (25–35)で処理すると65%までMTT還元能を低下させたが、10 μM 、1 μM のdipropofolの添加により $A\beta$ 毒性が完全に抑制された。一方、propofolも10 μM でやや毒性を抑制することが確認された (Fig. 7(B)).

次に試験管内や細胞を用いたモデル実験で強い活性を示したdipropofolが*in vivo*でも効果があるか

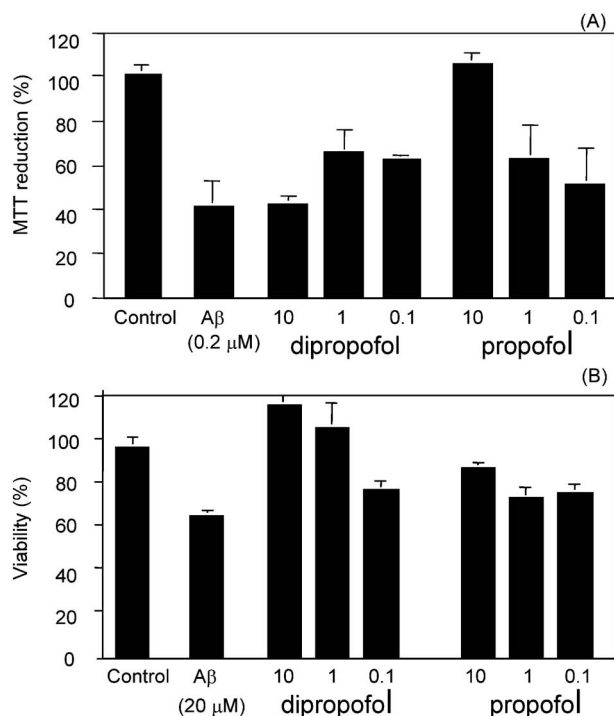


Fig. 7. Inhibitory Effects of Dipropofol on the Cytotoxicity of Aβ(25-35)

Cell survival was determined by MTT assay. (A): PC12 Cells, (B): rat primary culture hippocampus cells.

検討した。100%酸素下で48時間飼育したのちの傷害を肝臓及び心臓を対象として検討した。その結果、100%酸素暴露群では両臓器とも脂質過酸化傷害の指標であるTBARSが有意に増加した (Fig. 8)。これに対して dipropofol 投与群では、このTBARSの上昇を有意に抑制し α -tocopherol と同等の強い活性を認めた。

4. Dipropofol の抗菌活性²²⁾

二量体と原料の抗菌活性について黄色ブドウ球菌、枯草菌、大腸菌を用いて検討を行ったところ、dipropofol にのみ強い活性を認めた (Table 3)。Dipropofol の抗菌スペクトルは、vancomycin と同様にグラム陽性菌のみに活性を示した。グラム陽性菌では、院内感染の原因菌として知られている MRSA や MRSA 感染症に用いられる vancomycin に高度耐性である VRE に対しても感受性菌と同様に強い活性を示した (Table 4)。

5. Dipropofol の水溶化²³⁾

Dipropofol の *in vivo* での検討で、MRSA 感染マウスに dipropofol を静脈又は腹腔内に投与し、生存時間の延長を指標として検討したがコントロール

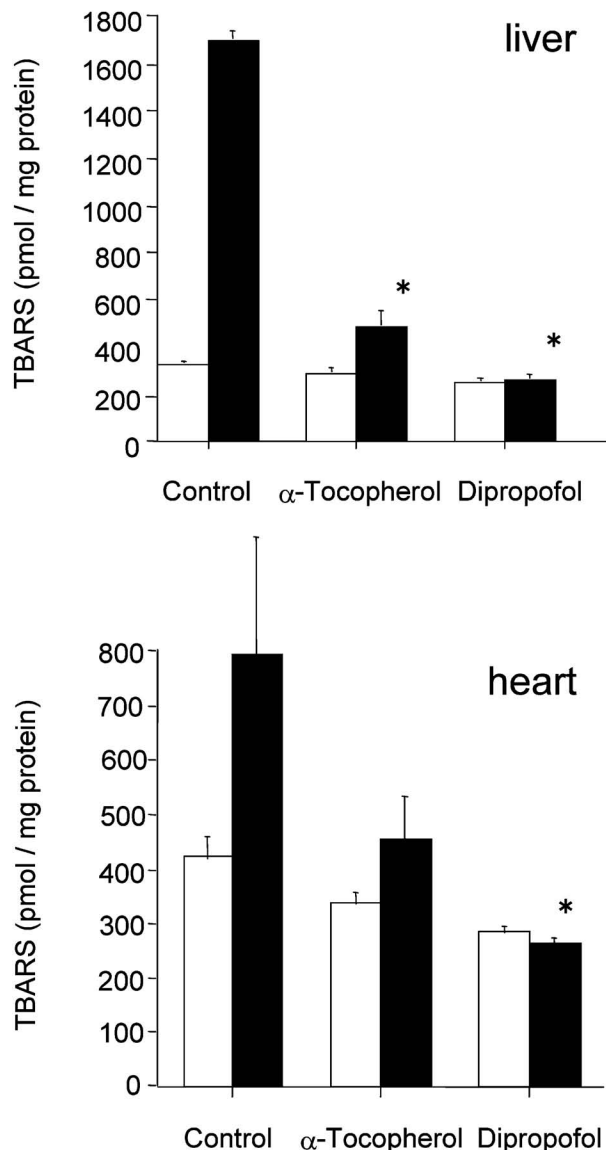


Fig. 8. Effect of Dipropofol on the Alteration of the TBARS Value Caused by Hyperoxia

Open bars: mouse maintained under air, dotted bars: mouse exposed to 100% oxygen for 48 h. * $p < 0.01$ versus control mouse exposed to 100% oxygen.

群との有意差は得られなかった (data not shown)。Dipropofol が *in vivo* で効果が認められなかった理由としては、この化合物はとても脂溶性が高いため、生体内では脂質に富んだ組織に移行するのに対し、菌は栄養を得るため水分の多い環境に定着するものと考えられる。したがって、dipropofol と菌が接触する機会が限られ抗菌活性を示さなかったと考えた。そこで、この化合物が生体内で抗菌活性を示すためには水溶化が必要であると考え、次に水溶化の検討を行った。

Table 3. Antibacterial Activities of Phenolic Compounds against *S. aureus*, *B. subtilis* and *E. coli*

Compound	<i>S. aureus</i> 209P	<i>B. subtilis</i> PC219	<i>E. coli</i> K12
α -Tocopherol	>128	>128	>128
BHA	>128	>128	>128
Eugenol	>128	>128	>128
Propofol	>128	>128	>128
2,6-Dimethylphenol	>128	>128	>128
2,6-Di- <i>tert</i> -butylphenol	>128	>128	>128
Di-BHA	>128	>128	>128
Dieugenol	>128	>128	>128
Dipropofol	2	4	>128
Di (2, 6-dimethylphenol)	>128	>128	>128
Di (2, 6-Di- <i>t</i> -butylphenol)	>128	>128	>128

Table 4. Antibacterial Activities of Dipropofol and Vancomycin against Standard Strains, MRSA and VRE

Organism	Dipropofol	Vancomycin
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209-P	2	0.5
<i>S. aureus</i> S _{MITH}	2	1
<i>S. epidermidis</i> IFO-12648	2	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC-9341	2	0.5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC-21212	2	2
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	>128	>128
<i>E. coli</i> 445	>128	>128
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC-8090	>128	>128
<i>Proteus mirabilis</i> IFO-3849	>128	>128
<i>P. vulgaris</i> OX-19	>128	>128
<i>Morganella morganii</i> IID K _{ONO}	>128	>128
<i>Serratia marcescens</i> IFO-12648	>128	>128
<i>Enterobacter cloacae</i> IFO-133535	>128	>128
<i>E. aerogenes</i> NCTC-10006	>128	>128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 46001	>128	>128
<i>P. aeruginosa</i> E-2	>128	>128
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IFO-12552	>128	128
MRSA N315 IR94	2	0.5
MRSA N315 IR94-HR-1	2	1
MRSA 70	2	0.5
<i>E. faecalis</i> (van A)	4	>128
<i>E. faecium</i> (van A)	2	>128
<i>E. faecalis</i> (van B)	4	32
<i>E. faecium</i> (van B)	4	>128
<i>E. gallinarum</i> (van C)	4	16
<i>E. casseliflavus</i> (van C)	4	32

一般的に脂溶性の薬剤について MIC (minimum inhibitory concentration) を測定するときは、有機溶媒に溶かし、水で希釈して使用する。Dipropofol を有機溶媒に溶解すると微黄色の透明な液となるが、水で希釈すると析出し白濁する。一方、dipropofol をメタノールに溶かし、糖を加えて蒸発乾固

させ、水を加えると透明な水溶液を与えることを見出した (Fig. 9)。

マンノースに吸着、溶解させたときの結果を示す (Fig. 10(A))。Dipropofol は培地中に拡散しないため、disk 法では活性は認められない。これに対し、糖は培地中に拡散するため培地の色が変わって

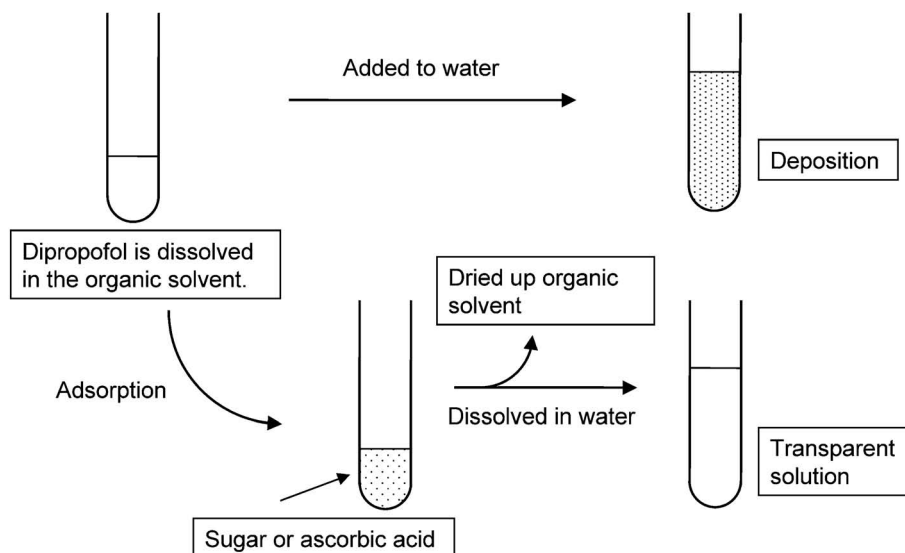


Fig. 9. An Outline of This Experiment

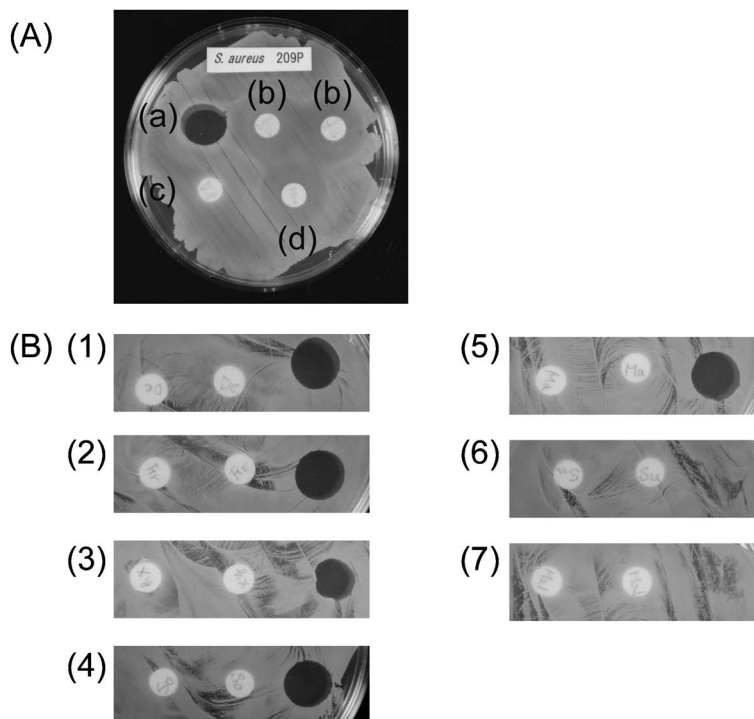


Fig. 10. The Antibacterial Activity of the Dipropofol Complex

(A): Dipropofol-mannose complex dissolved in water, (a): direct application of the complex solution, (b): the solution (a): was adsorbed on paper disks, (c): dipropofol was adsorbed on a paper disk from a methanol solution, (d): mannose solution adsorbed on a paper disk. (B): dipropofol complex with other saccharoides, (1): glucose, (2): fructose, (3): xylose, (4): sorbitol, (5): mannose, (6): sucrose, (7): maltose. Left and center were dipropofol-sugar complexes dissolved in water and adsorbed on paper disks. Right was the direct application complex of solution.

いるが抗菌活性は認められない。しかしながら、溶液を直接滴下すると抗菌活性が認められ、dipropofolが溶解していることが確認できた。次に他の糖についても検討を行った。その結果、グルコースなどの単糖では活性があり、二糖類のスクロース、

マルトースでは活性がなかった (Fig. 10(B))。シクロデキストリンや界面活性剤にも溶解はしたが、活性はなかった (data not shown)。これらの結果から、糖と dipropofol はミセルを形成し、溶解していると考えられ、活性部位が表面に出ている単糖

のみが活性を示すと考えているが、機構に関する詳細については現在検討中である。

6. Dipropofol と Ascorbic acid の相互作用²³⁾

Ascorbic acid は糖の一種であり、抗酸化作用においては ascorbic acid の還元作用により、 α -tocopherol との併用で相乗作用を示すことが報告されている。Dipropofol は酸化されるとキノン体を形成し、このキノン体は抗菌活性も示さないことが分かっている。そこで、dipropofol と ascorbic acid を併用することで相乗作用が起こるかの検討を行った。その結果、表のアスターリスクの濃度において FIC index が 0.5 以下となり、相乗効果が認められた (Table 5)。

次に dipropofol を ascorbic acid に吸着させ溶解性の検討を行ったところ、先に示した糖と同様に水溶化したので、この溶液について抗菌活性の検討を行った。Fig. 11 (A) は黄色ブドウ球菌についてのもの、ascorbic acid 単独でも阻止円が認められたが、吸着・溶解させたものでは阻止円が大きくなっており、dipropofol が培地中に拡散していることが

分かった。Figure 11 (B) では、直接滴下した場合、今まで抗菌活性を示さなかった大腸菌に対しても活性が認められた。

大腸菌に対する抗菌活性が認められたことの原因としては、dipropofol が ascorbic acid とともに外膜を通過した、あるいは ascorbic acid とのなんらかの相互作用により、ascorbic acid の抗菌活性を増強したなどが考えられるが、これについては詳細な検討が必要である。

7. 総括

以上のことをまとめると、抗酸化活性では、いずれの化合物も単量体より二量体に強い脂質過酸化抑制能が認められた。結合様式としては、パラ-パラ結合した二量体の方が強い活性を示した。活性酸素捕捉能では、eugenol にのみヒドロキシルラジカル捕捉能が観察され、スーパーオキシドを捕捉するのは allyl 基を有するフェノール性化合物であることを発見した。また、ヒドロキシルラジカルの発生に関しては金属を介さない方法として L-DOPA の自然酸化による発生法を見出した。これらの検討によ

Table 5. MICs of Dipropofol and in Combination with Ascorbic Acid

DP	A. A	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0 (mg/ml)
6.25		-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.12		-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.56		-	-	-	-	-	-	+	+	+
0.78		-	-	-	*	*	*	+	+	+
0.39		-	-	+	+	+	+	+	+	+
0.19		-	-	+	+	+	+	+	+	+
0 (μ g/ml)		-	-	+	+	+	+	+	+	+

DP : dipropofol, A. A : ascorbic acid. + : growth, - : inhibition, * synergism.

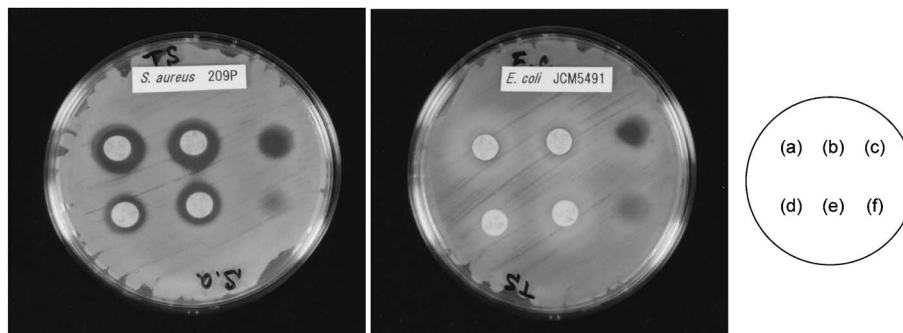


Fig. 11. Dipropofol-ascorbic Acid Solution in Water

Left: *S. aureus* 209P, Right: *E. coli* JCM5491. (a) and (b) were paper disks with dipropofol-ascorbic acid complex solutions, (c): direct application of the dipropofol-ascorbic acid complex solution, (d) and (e) were paper disks with ascorbic acid alone, (f): direct application of ascorbic acid alone in the medium.

り, eugenol は二段階の抗酸化機構を有すると推定した。

抗菌活性では, 強い抗酸化活性を示した dipropofol にのみ耐性菌を含むグラム陽性菌に対して活性を示した。しかし, dipropofol は水に溶けないため *in vivo* での評価が難しい。そこで水溶化を目的として種々の方法を検討したところ, メタノールに溶かした dipropofol を糖又は ascorbic acid に加え, 溶媒をとばし, 水を加えると可溶することを見出した。Ascorbic acid の場合は, さらに抗菌活性の相乗効果, グラム陰性菌に対しても活性を示すなど dipropofol の有効性が高まることを明らかにした。

また, dipropofol は脳神経細胞死に関与するグルタミン酸と A β ペプチドによる毒性から神経細胞を保護する効果, *in vivo* の系として 100% 酸素暴露下で飼育したマウスの酸素毒からマウスを保護することを明らかにした。

今後, dipropofol と ascorbic acid を用いて *in vivo* での抗菌効果を検討するとともに dipropofol のハイブリッド医薬品としての可能性を追求していきたい。

本研究は, 共立薬科大学及び青森大学薬学部において行った研究であり, ご指導頂きました遠藤豊成共立薬科大学名誉教授並びに文献記載の共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。本研究は, 勸漢方医薬研究振興財団の助成により行われたものです。

REFERENCES

- 1) Parthasarathy S., Santanam N., Ramachandran S., Meilhac O., *J. Lipid Res.*, **40**, 2143–2157 (1999).
- 2) Urano S., Hoshi-Hashizume M., Tochigi N., Matsuo M., Shiraki M., Ito H., *Lipid*, **26**, 58–61 (1976).
- 3) Perchelle J. P., Rechellet E. M., *Free Radic. Biol. Med.*, **7**, 377–408 (1989).
- 4) Reiss U., Gershon D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 255–262 (1976).
- 5) Livermore D. M., *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**, 557–584 (1995).
- 6) Chen L., Zhang H. Y., *Molecules*, **12**, 946–957 (2007).
- 7) Wiicox J. K., Catignani G. L., Roberts 2nd. L. J., *Free Radic. Med.*, **34**, 795–799 (2003).
- 8) Shklar G., Schwartz J. L., *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.*, **32**, 114–119 (1996).
- 9) Lo Y. C., Teng C. M., Chen C. F., Chen C. C., Hong C. Y., *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 549–553 (1994).
- 10) Clark A. M., Ei-Ferally F. S., Li W. S., *J. Pharm. Sci.*, **70**, 951–952 (1981).
- 11) Fujisawa S., Atsumi T., Kadoma Y., Sakagami H., *Toxicology*, **177**, 39–54 (2002).
- 12) Murakami Y., Shoji M., Hanazawa S., Tanaka S., Fujisawa S., *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 1060–1066 (2003).
- 13) Rahimtula A., *Chem. Biol. Interact.*, **45**, 125–135 (1983).
- 14) Nakamura K., Yoshida M., Uchiwa H., Kawa Y., Mizoguchi M., *Pigment Cell Res.*, **16**, 494–500 (2003).
- 15) Basma A., Morris E. J., Nicklas J. W., Geller H. H., *J. Neurochem.*, **64**, 825–832 (1995).
- 16) Ogata M., Kaneya D., Shin-ya K., Li L., Abe Y., Katoh H., Seki S., Seki Y., Gonda R., Urano S., Endo T., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1167–1170 (2005).
- 17) Shoji T., Li L., Abe Y., Ogata M., Ishimoto Y., Gonda R., Mashino T., Mochizuki M., Umemoto M., Miyata N., *Anal. Aci.*, **23**, 219–221 (2007).
- 18) Ogata M., Hoshi M., Urano S., Endo T., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1467–1469 (2000).
- 19) Murphy T. H., Miyamoto M., Sastre A., Schnaar R. L., Coyle J. T., *Neuron*, **2**, 1547–1558 (1989).
- 20) Yankner B. A., Duffy L. K., Kirschner D. A., *Science*, **250**, 279–282 (1990).
- 21) Hensley K., Carney J. M., Mattson M. P., Aksenova M., Harris M., Wu J. F., Floyd R. A., Butterfield D. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 3270–3274 (1994).
- 22) Ogata M., Sato T. K., Kunikane T., Oka K., Seki M., Urano S., Hiramatsu K., Endo T., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1120–1122 (2005).
- 23) Ogata M., Oka K., Seki M., Hoshi M., Takatsu H., Mashino T., Urano S., Endo T., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1565–1568 (2007).