

***In Vitro* Testosterone 5 α -Reductase 活性阻害作用を有する生薬の探索**

平田規子, 岡本美保, 伊藤仁久, 稲葉一訓, 得永雅士, 松田秀秋*
近畿大学薬学部

Study of Crude Drugs on *In Vitro* Testosterone 5 α -Reductase Inhibitory Activity

Noriko HIRATA, Miho OKAMOTO, Kimihisa ITOH, Kazunori INABA, Masashi TOKUNAGA,
and Hideaki MATSUDA*

School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka, Osaka, 577-8502, Japan

(Received April 14, 2008)

On the basis of a literature search on classical Chinese herbal and medicinal books and recent Chinese medical and pharmaceutical journals, I selected several crude drugs which have been used for the treatment of alopecia, thermal burn, benign prostatic hyperplasia, tonics, and dandruff prevention. Testosterone 5 α -reductase inhibitory activity of the selected crude drugs and other randomly selected crude drugs was assayed to find novel agents for treatment of androgenic alopecia. The ethanolic solutions of *Schisandra chinensis* BAILLON (五味子), *Spatholobus suberectus* DUNN (鷄血藤), *Polygonum bistorta* L. (拳参), *Lygodium japonicum* (THUNB.) Sw. (海金砂), *Psoralea corylifolia* L. (補骨脂), *Myrica rubra* SIEB. et ZUCC. (楊梅皮), *Cornus officinalis* SIEB. et ZUCC. (山茱萸), and *Paeonia suffruticosa* ANDR. (牡丹皮) showed strong inhibition of the enzyme activity.

Keywords: Chinese crude drugs; 5 α -reductase; androgenic alopecia; hair regrowth

Testosterone 5 α -reductase は細胞内に存在する酵素であり、生体内においては主要な androgen である testosterone を不可逆的に活性型の 5 α -dihydrotestosterone (DHT) に変換する¹⁾。この DHT は胎児・乳幼児期から思春期にかけては男性の生殖器および生殖機能発達に重要なホルモンである一方、思春期から壮年期以降では男性型脱毛、痤瘡(ニキビ)、前立腺肥大症、前立腺癌などの androgen 過剰症の誘発要因のひとつであることが知られている。

男性型脱毛は男性の脱毛症の 90%を占めるといわれている。脱毛の誘発は老化や遺伝的素因に深く関与するが、社会環境への不適応によるストレスの増大や食生活の欧米化がその誘発や進行に拍車をかけている。脱毛の病態は、androgen への感受性の増大、毛母細胞、毛乳頭細胞、外毛根鞘細胞など毛包細胞の機能低下、毛乳頭および毛包周辺の血液循環障害、皮脂腺機能の過度な昂進や皮脂分泌障害、毛包の成長に関与する各種酵素活性の異常、頭皮細菌感染によるフケの異常発生、頭皮の過剰乾燥な

どがあげられる²⁾。男性型脱毛は DHT の過剰生成や androgen への感受性の増大が主原因とされることから、testosterone 5 α -reductase を阻害し DHT の生成を低下させる作用は脱毛防止あるいは発毛促進の手段となり得る。

そこで、男性型脱毛に有効な育毛素材の探索を試み、その素材を天然薬用資源に求めた。漢薬の薬能を医・本草学的に考証、あるいは中医学・中薬学などの学術雑誌などを精査し、過去の体験から“禿(脱毛)”, “熱傷(火傷)”, “癰閉(前立腺肥大症)”の治療に用いられた生薬, “屑(フケ)”の改善や強壮薬として使用された生薬, さらに無作為に生薬 75 種を選択し、育毛生薬探索の 1 次スクリーニングとしてこれら生薬の 50% ethanol 抽出液の *in vitro* testosterone 5 α -reductase 活性阻害作用を検討した。

実験方法

1. 実験材料および試薬

実験材料には、Table 1-4 に示した生薬を用いた。これらの生薬は大阪市場（栃本天海堂）にて購入した。

試薬には、tris (hydroxymethyl) aminomethane, testosterone, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt (還元型, NADPH), dichloromethane (ナカライテスク), *p*-hydroxybenzoic acid *n*-hexyl ester (東京化成), ethinylestradiol (和光純薬工業) を用いた。

2. 実験動物

実験動物には、日本 SLC より購入した SD 系雄性ラット (6 週齢) を用いた。飼育環境は恒温恒湿, 12 時間明/12 時間暗サイクルの実験動物飼育室で、市販の固形飼料 (ラボ MR ストック, 日本農産) と水道水を自由に摂取させ、購入後実験に供するまで 1 週間予備飼育し、健康な動物を用いた。

3. 被検体の調製

生薬 (20 g) を 5 倍量 (100 ml) の 50% ethanol を用いて 24 時間室温にて抽出し、ろ過後、ろ液を 100 ml の用量に希釈調製したものをそのまま被検体として実験に供した。有効性を見出された 8 種の生薬については、減圧下溶媒を留去し、凍結乾燥を施したエキス (収率 (%) は Table 5 に記載) を実験に供した。

4. *In Vitro* Testosterone 5 α -Reductase 活性阻害試験

5 α -Reductase 粗酵素液の調製は今井³⁾の方法に準じた。すなわち、24 時間絶食した 6 週齢の SD 系雄性ラットの肝臓を氷冷した Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) で灌流後、摘出した。これに、5 倍量の氷冷した Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.2) を加えてホモジナイズし、900 \times g, 10 分間遠心分離した。この上清を 5,000 \times g, 10 分間遠心分離し、さらに上清を 9,000 \times g, 10 分間遠心分離した時に得られた上清を 5 α -reductase 粗酵素液として用いた。粗酵素液のタンパク量を Lowry 法 (Peterson 改良法)⁴⁾にて測定し、タンパク量が 14 mg/ml になるように Tris-HCl buffer にて希釈調整した。粗酵素液は、使用するまで -80 $^{\circ}$ C で凍結保存し、用時溶解して用いた。

5 α -Reductase 阻害活性試験は Ibata⁵⁾の方法に準じた。すなわち、Tris-HCl buffer 1.0 ml, testosterone (500 μ g/ml) 0.3 ml, 50% ethanol に溶解した被検液 0.2 ml および粗酵素液 1.0 ml を混和し、NADPH (0.77 mg/ml) 0.5 ml を加えて反応を開始した。37 $^{\circ}$ C, 30 分間 incubation した後、

dichloromethane 5.0 ml を加えて反応を停止した。内部標準物質 (I. S., *p*-hydroxybenzoic acid *n*-hexyl ester, 0.1 mg/ml) 0.5 ml を加えて 10 分間振とうし、900 \times g, 10 分間遠心分離した。上層を除去した後、dichloromethane 層約 4 ml を分取し、溶媒を留去後 methanol 5.0 ml を加え、HPLC 用の被検液とした。なお、陽性対照薬には ethinylestradiol を用いた。また、比較対照として玫瑰花を用いた。阻害率 (%) は 5 α -reductase によって変換されずに残った testosterone 量を指標に次式から求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{(\text{被検液を加えた時の testosterone 量} - \text{control 30 min 時の testosterone 量})}{(\text{control 0 min 時の testosterone 量} - \text{control 30 min 時の testosterone 量})} \times 100$$

Control 0 min : NADPH を加える前に dichloromethane を加えることにより、反応を停止させたもの。

Control 30 min : 被検液を加えずに反応を起こしたもの。

HPLC (Jasco 880-PU, 875-UV) は以下の条件で測定し、内部標準物質法を用いて testosterone 量を求めた。カラム; YMC-Pack ODS-AM (150 \times 4.6 mm I. D.), 移動相; methanol-H₂O (65:35 若しくは 60:40). 流速; 1.0 ml/min. 検出波長; UV 254 nm, カラム温度; 40 $^{\circ}$ C, 注入量; 10 μ l, I. S.; *p*-hydroxybenzoic acid *n*-hexyl ester, 保持時間 (min); Testosterone ; 7-8, I. S.; 15-16.

実験結果および考察

男性型脱毛の発症機序は androgen と遺伝的要因が関与することは 1940 年代に Hamilton によって明らかにされている⁶⁾。すなわち、思春期以前に去勢されると男性型脱毛は起こらないが、去勢された男性に testosterone を投与すると男性型脱毛の家系のみに脱毛が生じる。また思春期以後、すでに脱毛している人を去勢するとそれ以上進まないが、testosterone を投与すると再び脱毛が進行し始めると報告されている。さらに、遺伝的に 5 α -reductase が欠損している人に男性型脱毛は発症しないと報告され⁷⁾、これらから男性型脱毛は遺伝的素因と DHT の存在あるいは 5 α -reductase 活性が深く関与していることは明確である。

男性型脱毛の特徴は、抜け毛の増加、毛径の減少 (軟毛化)、毛成長速度の低下などであり、androgen が関与することによる毛周期 (haircycle) の異常に起因するといわれている。つまり、成長期、退行期、休止期からなる一定の haircycle に従って成長と脱落を繰り返すが、男性型脱毛は成長期期間の短縮と、それによる毛包のミニチュ

ア化が確認される。Androgen の作用メカニズムとして、血中の testosterone は標的細胞に入ると 5 α -reductase により不可逆的に活性型の DHT へ変換される。この変換された DHT は、核内の androgen 受容体と結合し、遺伝子転写、蛋白合成を介して作用を発現する¹⁾。つまり、androgen の標的組織のひとつである毛乳頭細胞には、androgen 受容体が局在し^{8, 9)}、androgen が作用すると、毛包上皮細胞に抑制的に働く TGF- β などの細胞増殖因子が毛細胞増殖を抑制することによりアポトーシスを誘発し、頭髮の脱毛化が引き起こされるといわれている^{10, 11)}。さらに、androgen は皮脂腺機能を活性化させるため、過剰分泌した皮脂が毛根を塞いだり、過酸化されて毛根のエネルギー代謝の異常を引き起こしたりするといわれている¹²⁾。

上記のことから抗 androgen 活性を有するものは、脱毛を予防するとともに、haircycle の恒常性を維持することができると予想され、その素材を天然薬用資源に求めた。

そこで、漢薬古来の薬能を医・本草学的に考証、あるいは中医学・中薬学などの学術雑誌などを精査し、過去の経験から、育毛・発毛素材として利用されていることから“禿”，皮膚の再生、修復という観点から“熱傷”，androgen の阻害という観点から“癭閉”の治療に用いられた生薬、頭皮の清浄化から“屑”の改善、毛包細胞の賦活作用から強壯薬に使用されたもの、さらには無作為に選択した生薬の 75 種の育毛効果を *in vitro* testosterone 5 α -reductase 活性阻害作用を指標に検討した。

Table 1 Inhibitory Effects of 50% Ethanol Extract Solutions from Crude Drugs Used for Treatment of Alopecia and Ethinylestradiol on *In Vitro* Testosterone 5 α -Reductase Activity

Samples			Inhibition (%)
Japanese name	Botanical origin	Parts used	
何首烏	<i>Polygonum multiflorum</i> THUNB.	Rhizome	57.4
弟切草	<i>Hypericum erectum</i> THUNB.	Whole plant body	32.1
竹節人参	<i>Panax japonicus</i> C. A. MEYER	Rhizome	31.9
当薬	<i>Swertia japonica</i> MAKINO	Whole plant body	7.3
麦門冬	<i>Ophiopogon japonicus</i> GAWL.	Tuber	2.4
香附子	<i>Cyperus tindtorius</i> L.	Rhizome	0.3
银杏葉	<i>Ginkgo biloba</i> L.	Leaf	-0.2
牛膝	<i>Achyranthes fauriei</i> LEVEILLÉ	Root	-4.4
玫瑰花	<i>Rosa rugosa</i> THUNB. var. <i>plena</i> REGL.	Bud	79.0
Ethinylestradiol (final conc.; 1 mM)			51.6

The reaction solution contained 50% ethanol extract solution (0.2 ml); all crude drugs (20 g) were extracted with 50% ethanol (100 ml) at room temperature) obtained from traditional Chinese medicine or 50% ethanol solution (0.2 ml) of various concentrations of test compound: 1.0 ml of Tris-HCl buffer (pH 7.2), 0.3 ml of testosterone (500 μ g/ml in propylene glycol-Tris-HCl buffer (1:1 v/v)), and 1.0 ml of the enzyme solution. The reactions were started by the addition of 0.5 ml of NADPH (0.77 mg/ml in Tris-HCl buffer). The mixture was incubated at 37°C for 30 min, and the reaction was stopped by addition of 5.0 ml of dichloromethane. After addition of 0.5 ml of hexyl *p*-hydroxybenzoate (0.1 mg/ml in methanol, an internal standard (I.S.) for HPLC), the tube was shaken for 10 min and centrifuged at 900 x *g* for 10 min. The organic layer (4 ml) was transferred to another tube and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 5.0 ml of methanol, and an aliquot of 10 μ l was injected into the HPLC system.

Table 2 Inhibitory Effects of 50% Ethanol Extract Solutions from Crude Drugs Used for Treatment of Thermal Burn on *In Vitro* Testosterone 5 α -Reductase Activity

Samples			Inhibition (%)
Japanese name	Botanical origin	Parts used	
楊梅皮	<i>Myrica rubra</i> SIEB. et ZUCC.	Bark	80.7
拳参	<i>Polygonum bistorta</i> L.	Rhizome	58.2
丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> BUNGE	Root	22.7
半枝蓮	<i>Scutellaria barbata</i> D. DON.	Whole plant body	20.2
露蜂房	<i>Polistes mandarinus</i> SAUSSURE	Beehive	9.8
紫草	<i>Lithospermum throrhizon</i> SIEB. et ZUCC.	Root	8.5
槐角	<i>Sophora japonica</i> L.	Fruit	3.5
千里光	<i>Senecio scandens</i> BUCH.-HAM.	Whole plant body	7.5
半边蓮	<i>Lobelia chinensis</i> LOUR.	Whole plant body	4.7
大薊	<i>Cirsium japonica</i> DC.	Root	3.8
当归	<i>Angelica acutiloba</i> KITAGAWA	Root	2.8
鹿角膠	<i>Cervus nippon</i> TEMMINICK	Boiled and extracted	2.3
石葦	<i>Pyrrosia shearerii</i> CHING.	Leaf	3.9
毛冬青	<i>Ilex pubescens</i> HOOK.	Root	0.0

Inhibitory effect of *in vitro* testosterone 5 α -reductase activity was measured according to the method in legend of Table 1.

Table 3 Inhibitory Effects of 50% Ethanol Extract Solutions from Crude Drugs Used for Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia on *In Vitro* Testosterone 5 α -Reductase Activity

Samples			Inhibition
Japanese name	Botanical origin	Parts used	(%)
海金砂	<i>Lygodium japonicum</i> (THUNB.) SW.	Spore	68.3
牡丹皮	<i>Paeonia suffruticosa</i> ANDR.	Cortex of root	52.7
桂皮	<i>Cinnamomum cassia</i> BLUME	Cortex	38.4
赤芍	<i>Paeonia lactiflora</i> PARRAS	Root	14.2
紅花	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	Flower	9.9
党参	<i>Codonopsis pilosula</i> NANNF.	Root	8.1
沢瀉	<i>Alisma orientale</i> JUZEP CZUC	Tuber	6.1
天台烏藥	<i>Lindera strychnifolia</i> F. VILLARS	Root	4.0
菖蓄	<i>Polygonum aviculare</i> L.	Whole plant body	2.5
桃仁	<i>Prunus persica</i> BATSCH.	Seed	2.1
木通	<i>Akebia quinata</i> DECNE.	Wood	1.4
瞿麥	<i>Dianthus chinensis</i> L.	Whole plant body	0.4
知母	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> BUNGE	Rhizome	-0.3
升麻	<i>Cimicifuga simplex</i> WORMSK.	Rhizome	-1.1
陳皮	<i>Citrus unshiu</i> MARKOVICH	Peel of fruit	-1.6
白朮	<i>Atractylodes japonica</i> KOIDZUMI	Rhizome	-1.8
枳殼	<i>Citris aurantium</i> L.	Fruit	-2.0
王不留行	<i>Vaccaria pyramidata</i> MEDIC.	Seed	-2.0
山藥	<i>Dioscorea japonica</i> THUMB.	Rhizome	-8.9
黃耆	<i>Astragalus membranaceus</i> BUNGE	Root	-10.3
桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. DC.	Root	-10.4
車前草	<i>Plantago asiatica</i> L.	Whole plant body	-13.8

Inhibitory effect of *in vitro* testosterone 5 α -reductase activity was measured according to the method in legend of Table 1.

Table 4 Inhibitory Effects of 50% Ethanol Extract Solutions from Crude Drugs Used for Treatment of Dandruff or Tonic, and Crude Drugs Selected at Random on *In Vitro* Testosterone 5 α -Reductase Activity

Samples			Inhibition
Japanese name	Botanical origin	Parts used	(%)
山茱萸	<i>Cornus officinalis</i> SIEB. et ZUCC.	Fruit	90.3
五味子	<i>Schisandra chinensis</i> BAILLON	Fruit	85.9
鷄血藤	<i>Spatholobus suberectus</i> DUNN	Vine	58.4
補骨脂	<i>Sporalea corylifolia</i> L.	Fruit	57.1
吳茱萸	<i>Evodia officinalis</i> (DODE) HUANG.	Fruit	25.9
海帶	<i>Zostera marina</i> L.	Whole plant body	15.2
覆盆子	<i>Rubus chingii</i> HU	Fruit	14.4
益智仁	<i>Alpinia oxyphylla</i> MIQ.	Fruit	12.8
枇杷葉	<i>Eriobotrya japonica</i> (THUNB.) LINDL.	Leaf	10.2
玄參	<i>Scrophilaria ningpoensis</i> HEMSLL.	Root	6.2
杜仲	<i>Sophora japonica</i> L.	Cortex	5.3
地膚子	<i>Kochia scoparia</i> (L.) SCHMIDT.	Fruit	5.1
百部根	<i>Semona japonica</i> (BL.) MIQ.	Tuber	3.9
石斛	<i>Dendrobium nobile</i> LINDL.	Stem	3.7
蓮子	<i>Nelumbo mucifera</i> GAERTN.	Fruit or seed	2.8
冬瓜仁	<i>Benin casa hispida</i> (THUNB.) COGN.	Seed	2.5
菟絲子	<i>Cuscuta shinensis</i> LAM.	Root	2.3
莪朮	<i>Curcuma zedoaria</i> ROCS.	Rhizome	1.6
石菖蒲	<i>Acorus gramineus</i> SOLAND.	Rhizome	0.9
白花蛇舌草	<i>Oldenlandia diffusa</i> (WILLD.) ROXB.	Whole plant body	0.3
茅根	<i>Miscanthus sinensis</i> L.	Root	0.1
三稜	<i>Sparganum stoloniferum</i> BUCH.-HAM.	Tuber	-1.3
沙參	<i>Glehnia littoralis</i> F. SCHMIDT.	Root	-1.6
玉竹	<i>Polygonatum odoratum</i> (MILL.) DRUCE	Rhizome	-1.9
胡芦巴	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Seed	-1.9
枸杞子	<i>Lycium chinense</i> MILL.	Fruit	-2.1
貝母	<i>Senecio scandens</i> BUCH.-HAM.	Seed	-2.3
川統斷	<i>Dipsacus asper</i> WALL.	Root	-2.4
蒲公英	<i>Taraxacum mongolicum</i> HAND.-MAZZ.	Root	-2.5
仙茅	<i>Curculigo orchioides</i> GAEDTN.	Rhizome	-2.9
天花粉	<i>Trichosanthes kirilowii</i> MAXIM.	Root	-5.1

Inhibitory effect of *in vitro* testosterone 5 α -reductase activity was measured according to the method in legend of Table 1.

古来, “禿”の治療に用いられた生薬8種について50% ethanol抽出液の *in vitro* testosterone 5 α -reductase 活性阻害作用を検討した。その結果は Table 1 に示したごとく, 何首烏に57.4%の阻害率で5 α -reductase 活性を阻害する作用が見出された。次いで弟切草, 竹節人參にも阻害活性が認められた。何首烏には既に皮脂分泌抑制作用に基づく高脂肪食毛再生障害マウスにおける育毛作用が報告されているが¹³⁾, 今回その作用機序のひとつとして5 α -reductase 活性の阻害が証明された。市販の育毛剤に抗 androgen 作用を目的として配合されている玫瑰花は79.0%の阻害率を示した。陽性対照薬の ethinylestradiol に1 mMの用量で51.6%の阻害活性が見出された。

“熱傷”の治療に用いられた生薬14種については Table 2 に示したごとく, 楊梅皮に80.7%, 次いで拳參に58.2%の阻害率で5 α -reductase 活性を阻害する作用が見出された。丹參, 半枝蓮にも阻害活性が認められた。

“癩閉”の治療に用いられた生薬22種については Table 3 に示したごとく, 海金砂, 牡丹皮に5 α -reductase 活性の阻害作用が見出され, その阻害率はそれぞれ68.3, 52.7%であった。次いで桂皮, 赤芍にもその作用が認められた。

“屑”の改善や強壯薬として用いられた生薬および無作為に選択した生薬31種については Table 4 に示したごとく, 強壯薬として用いられた生薬である山茱萸, 五味子にそれぞれ90.3, 85.9%の強い阻害作用が見出された。次いで鶏血藤, 補骨脂にも阻害活性が認められた。

次に, Table 1 から4において強い5 α -reductase 活性阻害作用を示した生薬について IC₅₀ 値を比較するため50% ethanol エキスを調製し, 各生薬のエキス収率と IC₅₀ 値を Table 5 に示す。五味子は玫瑰花よりも強い5 α -reductase 活性阻害作用が認められた。

Table 5 IC₅₀ Values of Inhibitory Effects 50% Ethanol Extracts from Crude Drugs on *In Vitro* Testosterone 5 α -Reductase Activity

Samples	Yield of extract (%)	IC ₅₀ (mg/ml)
五味子	30.2	0.8
鶏血藤	11.4	1.3
拳參	11.2	1.4
海金砂	7.2	1.6
補骨脂	14.8	1.6
楊梅皮	20.4	1.7
山茱萸	40.7	2.8
牡丹皮	20.4	3.1
玫瑰花	16.3	1.3

以上の結果から, 古来より育毛を目的に使用され皮脂分泌抑制作用を有する何首烏, 火傷の治療に用いられた楊梅皮, 拳參, 前立腺肥大症の治療に用いられた海金砂, 牡丹皮, その他無作為に選択した山茱萸, 五味子, 鶏血藤, 補骨脂などの50% ethanol抽出液に5 α -reductase の活性を阻害する作用が見出され, さらに五味子, 山茱萸および楊梅皮には市販の育毛剤に抗 androgen 作用を目的に既に配合されている玫瑰花に勝る活性を認めた。これら生薬はDHTが誘発する男性型脱毛の治療に有効な育毛素材として応用できる可能性が示唆される。なお, 楊梅皮および海金砂の抗 androgen 活性に基づく *in vivo* 育毛効果と5 α -reductase 活性阻害作用成分については既に報告^{14,15)}している。

今回, 漢薬の本草学的考証, あるいは中医学・中薬学の学術雑誌から脱毛に関する項目を精査することにより選択された生薬の中から, 男性型脱毛に薬用利用できる可能性のある生薬が見出された。これら生薬の *in vivo* 育毛効果については今後の検討課題である。

References

- 1) Randall V. A., *Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab.*, **8**, 405–431 (1994).
- 2) Matsuzaki T. “Mouhatsu-wo-Kagaku-suru Hatsumou-to-Datsumou-no-Shikumi,” Iwanami Shoten, Tokyo, 1998, pp. 79–100.
- 3) Imai Y., *Protein Nucleic Acid Enzyme*, **10**, 170–180 (1965).
- 4) Nihon Seika Gakkai, “Kiso-Seikagaku-Jikkenhou 3, Tanpakushitu I” ed. by Okuda H., Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, 2001, pp. 15, 16.
- 5) Ibata Y., *Fragrance J.*, **92**, 78–83 (1988).
- 6) Hamilton J. B., *Amer. J. Anat.*, **71**, 451–480 (1942).
- 7) Imperato-McGinley J., Guerrero L., Gautier T., Peterson R. E., *Science*, **186**, 1213–1215 (1974).
- 8) Randall V. A., Thornton M. J., Hamada K., Redfern C. P. F., Nutbrown M., Ebling F. J. G., Messenger A. G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **642**, 355–375 (1991).
- 9) Randall V. A., *Clin. Endocrinol.*, **40**, 439–457 (1994).
- 10) Inui S., Fukuzato Y., Nakajima T., Yoshikawa K., Itami S., *FASEB J.*, **16**, 1967–1969 (2002).

- 11) Inui S., Itami S., *Fragrance J.*, **31**, 9–14 (2003).
- 12) Kobayashi N., Suzuki R., Koide C., Suzuki T., Matsuda H., Kubo M., *Yakugaku Zasshi*, **113**, 718–724 (1993).
- 13) Kubo M., Matsuda H., Fukui M., Nakai Y., *Yakugaku Zasshi*, **108**, 971–978 (1988).
- 14) Matsuda H., Yamazaki M., Matsuo K., Asanuma Y., Kubo M., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 259–263 (2001).
- 15) Matsuda H., Yamazaki M., Naruto S., Asanuma Y., Kubo M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 622–626 (2002).