

イソプレニル化合物の新規薬物送達法の開発に関する研究

赤穂 菜美

福岡大学薬学部創剤学教室、814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

**Water-soluble Prodrugs for γ -Tocotrienol and Ubiquinol-10
as Novel Drug Delivery Systems**

NAMI AKAHO

Department of Drug Design and Drug Delivery,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,
8-19-1 Nanakuma, Johnan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan**Abstract**

2R- γ -tocotrienol (γ -T3) is currently receiving attention because it has beneficial effects not observed with α -tocopherol, the commonly used form of Vitamin E. Ubiquinol-10 (UqH-10), the two-electron reduced form of ubiquinone-10 (Uq-10), is the only lipid-soluble antioxidant synthesized endogenously that is capable of recycling other antioxidants like tocopherol. Therapeutic formulation of γ -T3 and UqH-10 is difficult because they are insoluble in water and readily oxidized by atmospheric oxygen, properties that limit their therapeutic application and complicate their bioavailability. To achieve effective delivery of γ -T3 and UqH-10, we synthesized *N,N*-dimethylaminoacetate esters of γ -T3 and UqH-10, and evaluated their use as hydrophilic prodrugs for γ -T3 and UqH-10 *in vitro* and *in vivo*. *2R*- γ -Tocotrienyl *N,N*-dimethylaminoacetate hydrochloride (γ -T3DMG) and ubiquinol-10 *N,N*-dimethylaminoacetate hydrochloride (UqH-10DMGs) were obtained as hydrosoluble solid compounds and converted to each parent drug by esterases in rat and human liver. Intravenous administration of γ -T3DMG in rats led to a rapid increase in γ -T3 levels in the plasma, liver, heart, and kidney. The bioavailability (plasma level) following intravenous administration was $82.5 \pm 13.4\%$ and $100 \pm 11.3\%$ for γ -T3DMG and γ -T3 in surfactant, respectively; availability in the liver was $213 \pm 47.6\%$ and $100 \pm 4.8\%$ for γ -T3DMG and γ -T3 in surfactant, respectively. Furthermore, the systemic availability of γ -T3 metabolite

2,7,8-trimethyl-2*S*-(β -carboxyethyl)-6-hydroxychroman (*S*- γ -CEHC) was 78.6% and 47.1% for γ -T3DMG and γ -T3 in surfactant, respectively. AUC values of UqH-10 following oral administration of UqH-10DMGs were higher than those of Uq-10 in fasting state rats. In addition, AUC values of UqH-10 after UqH-10DMGs administration were less influenced by the flow of bile than those of Uq-10. Based on these results, we identified γ -T3DMG as the most promising water-soluble prodrug of γ -T3 and two-step prodrug of *S*- γ -CEHC, and UqH-10DMGs as a useful water-soluble prodrug of UqH-10.

【緒言】

最近、イソプレニル化合物は生体組織の構成成分としてだけでなく、シグナル伝達など多彩な生理現象に関与することが明らかになってきている。長い間 vitamin E (VE) 同族体の中で α -tocopherol (α -Toc) だけが注目され、他の同族体は無視されてきたが [1, 2]、最近 α -Toc にはみられない独自のコレステロール低下作用 [3-7] やがん細胞増殖抑制作用 [8-10] が、分子内にイソプレニル側鎖を有する VE 同族体の一つである 2*R*- γ -Tocotrienol (γ -T3) において報告されている。更に γ -T3 は 2,7,8-trimethyl-2*S*-(β -carboxyethyl)-6-hydroxy-chroman (*S*- γ -CEHC) に体内で代謝されること [11]、*S*- γ -CEHC は尿毒症患者尿から単離されたナトリウム利尿因子 LLU- α と同一化合物であり [12]、cyclooxygenase-2 (COX-2) が触媒するアラキドン酸酸化を阻害することが報告され [13, 14]、 γ -T3 とその代謝物 *S*- γ -CEHC は新たな治療薬として期待されている。 γ -T3 と同様に分子内にイソプレニル側鎖を有する Ubiquinone-10 (Uq-10, coenzyme-Q10) はミトコンドリア呼吸鎖においてエネルギー産生に関わる物質として知られているが [15]、最近の研究では Uq-10 の 2 電子還元体 ubiquinol-10 (UqH-10) が VE のリサイクルに大きく関与し、優れた内因性の抗酸化剤として機能することが明らかにされ [16, 17]、レドックス制御による疾患の予防・治療薬として大きな期待が寄せられている。

γ -T3 と UqH-10 は、どちらも分子内に疎水性のイソプレニル基とフェノール性水酸基を有する脂溶性物質であり、水に全く溶解せず酸化に対して不安定な化合物である。これらの物理化学的性質が様々な投与形態における bioavailability の確保において障害となっている。また、 γ -CEHC は酸化に対して不安定な化合物であり生物学的半減期が極めて短いため、それ自身を投与して bioavailability を確保することは困難である。このような背景から、著者はこれらのイソプレニル側鎖を有する化合物の薬物送達上の問題を克服し、bioavailability を確保できる製剤の開発を企図して本研究を遂行した。まず第 1 編では、 γ -T3 の bioavailability 確保を可能にする γ -T3 の水溶性 prodrug を新規開発し、この prodrug が γ -CEHC の two-step prodrug として機能することを明らかにした。更に第 2 編では、UqH-10 の経口投与における bioavailability を確保可能にする UqH-10 の水溶性 prodrug の新規開発を行った。

1. γ -T3 の水溶性プロドラッグの開発

本編では γ -T3 の静脈内投与可能な水溶性 prodrug の開発を目的とし、 γ -T3 のカチオン性解離基を有する誘導体とアニオン性解離基を有する誘導体の合成を行い、*in vitro* での評価から prodrug 候補を探索した。さらに、prodrug 候補のラット体内動態を明らかにし、*in vivo* で注射剤としての有用性を明らかにした。

γ -T3 の代謝物である 2,7,8-trimethyl-S2-(β -carboxyethyl)-6-hydroxychroman (*S*- γ -CEHC) は γ -T3 と同様に酸化に対して不安定であり、生物学的半減期が非常に短いため、*S*- γ -CEHC 自身を用いて十分な bioavailability を確保することは困難である。*S*- γ -CEHC の bioavailability を確保する戦略として、 γ -T3 を体内に効率よく送達することでその代謝物 *S*- γ -CEHC の bioavailability を確保する方法が考えられる。したがって、 γ -T3 の prodrug には *S*- γ -CEHC の two-step prodrug としての機能が期待できる。そこで γ -T3 の水溶性 prodrug 候補化合物について、*S*- γ -CEHC の新規送達法 (two-step prodrug) としての有用性を、ラットを用いて *in vivo* で評価した。

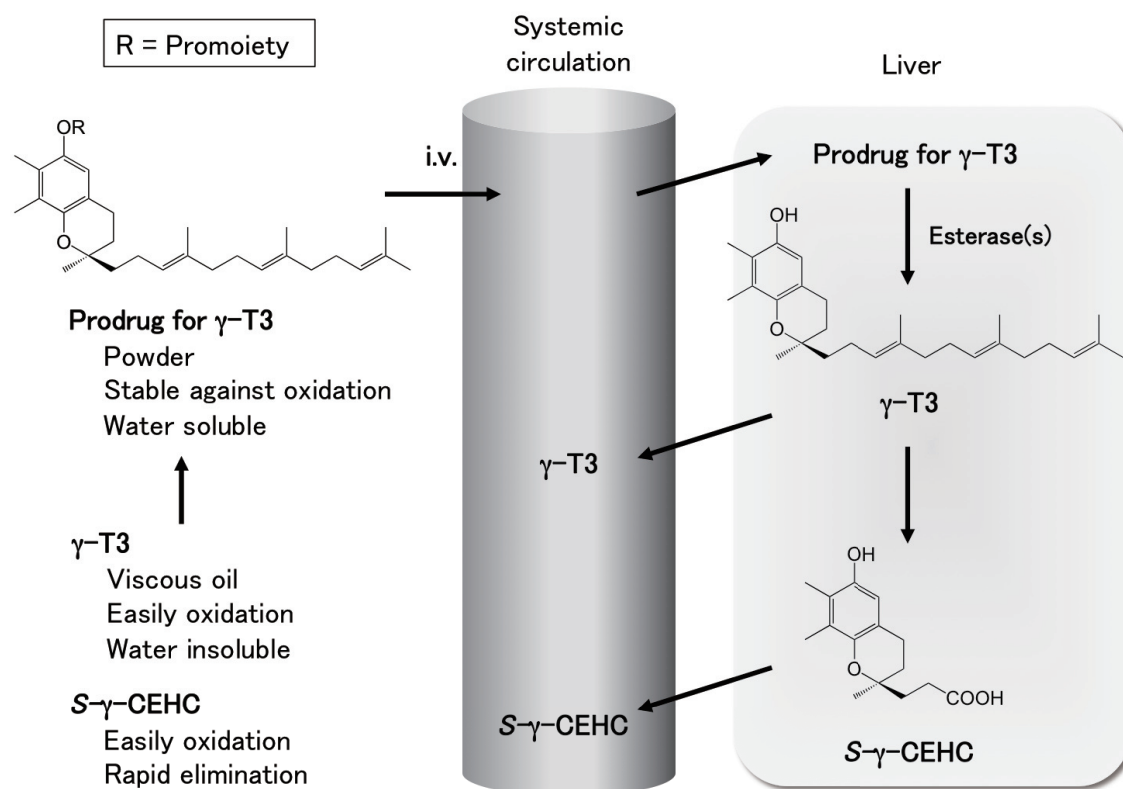


Fig. 1. Concept for drug delivery system for γ -T3 and *S*- γ -CEHC.

γ -T3 aminoalkylcarboxylic acid エステルの合成ならびに *in vitro* での評価

水溶性 prodrug 設計において、prodrug の修飾基 (promoiety) の選択が最も重要である。水溶性の障害になる疎水性基であるイソプレレン側鎖の炭素数は、 γ -T3 が 15 で UqH-10 は 50 であることから、まず水溶性の比較的高い γ -T3 を用いて promoiety の検討をおこなった。酸化されやすい水酸基を保護し親薬物への再変換に生体内エステラーゼを利用することを考慮して、 γ -T3 のクロマン環 6 位の水酸基にエステル結合で promoiety を導入した prodrug を設計し、Fig. 2 に示す誘導体を合成した。誘導体の水溶性 prodrug としての有用性を *in vitro* における水溶解性と親薬物への再変換性から評価した。

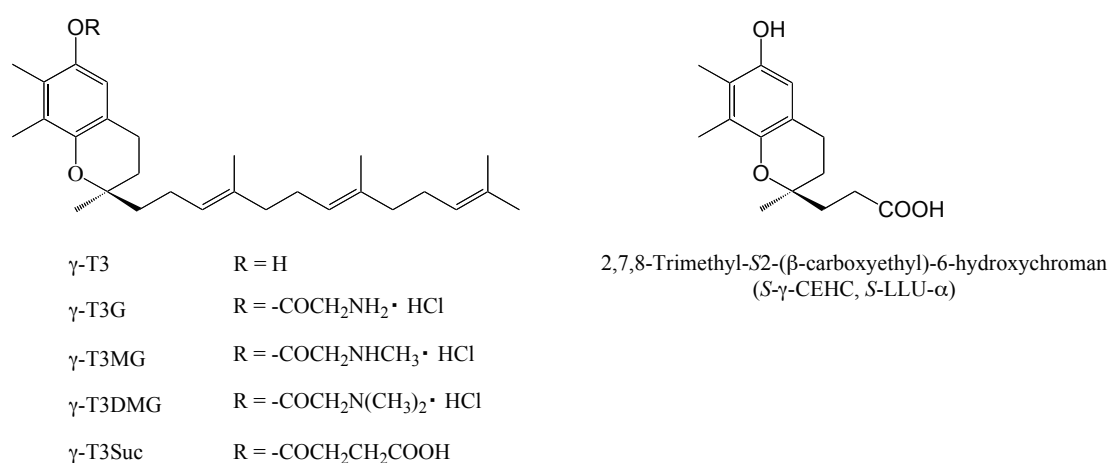


Fig. 2. Chemical structures of γ -T3, *S*- γ -CEHC, and 2*R*- γ -tocotrienol ester derivatives.

Aminoalkylcarboxylic acid 誘導体である γ -T3G、 γ -T3MG、 γ -T3DMG の塩酸塩は、結晶性の粉末であり、水に対していずれも 50 mM 以上の溶解度を示し水溶解性は格段に改善された。 γ -T3G、 γ -T3MG、 γ -T3DMG は、ラット及びヒト肝臓中のエステラーゼによって親薬物の γ -T3 に再変換され、 V_{\max}/K_m 値は γ -T3DMG \gg γ -T3MG $>$ γ -T3G \gg γ -T3Suc の順であった。また、ヒト血漿では加水分解は触媒されなかった。以上の結果より、 γ -T3DMG がヒト肝臓中酵素とラット肝臓中酵素の基質として優れており、かつ優れた再変換性を持つことが明らかになった。

γ -T3DMG の prodrug としての *in vivo* における評価

γ -T3DMG は高い水溶解性を示し、かつヒトの肝臓中 carboxyl esterase の優れた基質であることから、注射剤に適した水溶性 prodrug の条件を満たしていると考えられる。そこで γ -T3DMG について、prodrug としての有用性をラットを用いた *in vivo* の系で評価した。

静脈内投与後の速度論パラメータを Table 1 に示す。静脈内投与により、血漿、肝臓、心臓及び腎臓の γ -T3 レベルは上昇した。静脈内投与後の γ -T3 の血漿 bioavailability は、 γ -T3DMG 投与時は $82.5 \pm 13.4\%$ 、 γ -T3 投与時は $100 \pm 11.3\%$ であり、肝臓 bioavailability は、 γ -T3DMG 投与時は $213 \pm 47.6\%$ 、 γ -T3 投与時は $100 \pm 4.8\%$ であった。よって γ -T3DMG は静脈内投与後、速やかに血漿中から肝臓に移行し γ -T3 に再変換されることが明らかになり *in vivo* において prodrug として機能することが明らかになった。

Table 1 Pharmacokinetic Parameters in Plasma and Liver after the i.v. Administration of γ -T3 and γ -T3DMG in the Rats^{a)}

	γ -T3		γ -T3DMG	
	Plasma	Liver	Plasma	Liver
For γ -T3DMG				
C_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ or g^{-1})			0.171 ± 0.066	0.217 ± 0.099
T_{\max} (h)			0.25	0.25
AUC ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$ or g^{-1})			0.051 ± 0.016	0.456 ± 0.026
MRT (h)			0.29 ± 0.02	2.19 ± 0.10
For γ -T3				
C_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ or g^{-1})	0.175 ± 0.041	0.529 ± 0.047	0.078 ± 0.011	0.549 ± 0.150
T_{\max} (h)	0.25	0.5	0.25	0.25
AUC ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$ or g^{-1})	0.097 ± 0.011	0.563 ± 0.027	0.080 ± 0.013	1.20 ± 0.268
MRT (h)	2.00 ± 0.27	1.89 ± 0.12	2.28 ± 0.33	3.22 ± 0.67
F (%)	100 ± 11.3		82.5 ± 13.4	
F_{Liver} (%)	100 ± 4.8		213 ± 47.6	
Selective advantage	1.0		4.1	

^{a)} The values are the mean and S.D. of three rats at a dose of 25 mg/kg equivalent for γ -T3.

γ -T3DMG の γ -CEHC の two-step prodrug としての評価

S- γ -CEHC は *R*- γ -CEHC に比較してナトリウム利尿作用が 20 倍高く、 γ -T3 のクロマン 2 位炭素の 2*R* 体はエピマー化しないで *S*- γ -CEHC に効率よく代謝されることが報告されていることから [18]、2*R* 体である γ -T3 の bioavailability を確保できる γ -T3DMG は *S*- γ -CEHC の two-step prodrug として機能することが期待できる。そこで、 γ -T3DMG、界面活性剤で可溶化した γ -T3 及び γ -CEHC のラセミ体を投与後の血漿中 *S*- γ -CEHC 動態を検討した。 γ -T3DMG 投与群では血漿中 *S*- γ -CEHC レベルが速やかに上昇し、投与後約 1 時間で C_{\max} に達した。また、 γ -T3DMG 投与群の *S*- γ -CEHC の平均滞留時間 (*MRT*) は、ラセミ γ -CEHC 投与群の約 7 倍となり、長時間、血漿中 *S*- γ -CEHC レベルを維持できることが明らかになった。 γ -T3DMG、 γ -T3、ラセミ γ -CEHC 投与後の *S*- γ -CEHC の相対的 bioavailability は、それぞれ 78.6%、47.1%、100% となり、 γ -T3DMG は *S*- γ -CEHC の two-step prodrug として機能することが明らかになった (Table 2)。

Table 2 Pharmacokinetic parameters for *S*- γ -CEHC after the i.v. administration of γ -T3 and γ -T3DMG in the rats ^{a)}

	γ -T3	γ -T3DMG	racemic γ -CEHC ^{b)}
Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	61	61	3.8
C_{\max} ($\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$)	17.3 ± 2.79	19.2 ± 2.98	12.1 ± 1.42
T_{\max} (h)	1.0	1.0	0.003
<i>AUC</i> ($\text{nmol}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$)	60.0 ± 18.4	100 ± 14.7	7.93 ± 4.34
<i>MRT</i> (h)	6.80 ± 0.47	6.64 ± 0.50	1.00
<i>F</i> (%)	47.1	78.6	100

^{a)} γ -CEHC was not soluble in distilled water for injection, thus, γ -CEHC was solubilized with water containing 33% polyethylene glycol and used for i.v. administration. The low water solubility of γ -CEHC compelled us to adopt a low dose of it for the disposition study.

^{b)} from Ref. [19].

2. UqH-10 の水溶性プロドラッグの開発

UqH-10 は、Uq-10 の二電子還元体であり、ヒト体循環中では 95%が UqH-10 として存在している。従って臨床や健康食品に用いられている Uq-10 は UqH-10 の prodrug とみなすことができる。また Uq-10 の経口投与における bioavailability は、胆汁分泌の影響を大きく受けることが報告されており、食事による胆汁分泌の影響を受けにくい製剤の開発が望まれている。

そこで本編では、UqH-10 の酸化に対する安定性と薬物送達上の問題を同時に克服できる戦略として UqH-10 の水溶性 prodrug を開発し、それらの化合物の性質を *in vitro* および *in vivo* において検討し、prodrug としての可能性を評価した。

UqH-10 *N,N*-dimethylglycine エステルの合成ならびに *in vitro* での評価

γ -T3 の水溶性 prodrug の開発において、*N,N*-dimethylglycine 残基が水溶性 prodrug の promoiety として優れていたため、UqH-10 の *N,N*-dimethylglycine ester 3 種類 (1-mono, 4-mono, 1,4-bis) (Fig. 3) を合成し、*in vitro* での水溶解性と親薬物 UqH-10 への再変換性から有用性を評価した。

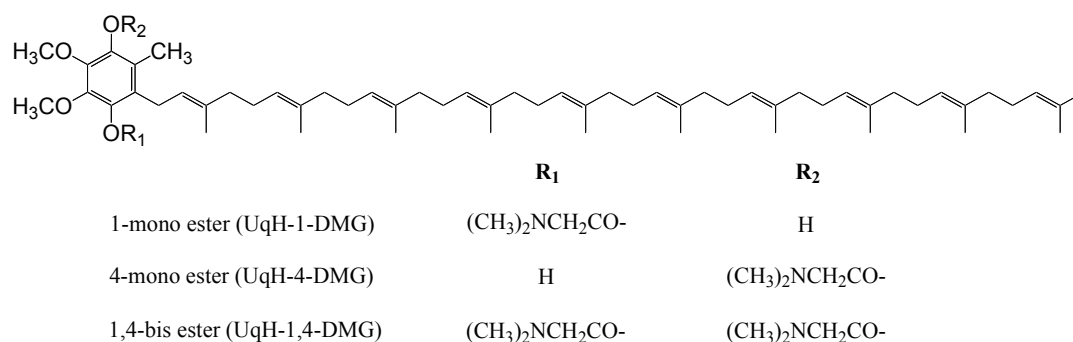


Fig. 3. Chemical structures of UqH-1-DMG, UqH-4-DMG and UqH-1,4-DMG

UqH-10 の 3 種の誘導体は Uq-10 に比して、いずれも高融点の白色粉末であった。UqH-10 誘導体は全て水溶性であり、水溶解性及び融点は *N,N*-dimethylglycine の導入部位と数によって異なり、水溶解性は UqH-1,4-DMG > UqH-1-DMG > UqH-4-DMG となった、特に UqH-1,4-DMG は高い水溶解性を示し、溶解度は 5 mM 以上であった。また UqH-10 誘導体はラット肝臓及びヒト肝臓中のエステラーゼにより親薬物の UqH-10 に再変換されることが明らかになった。以上の結果より、UqH-10 誘導体が UqH-10 の水溶性 prodrug として機能できることが示唆された。

UqH-10 誘導体の prodrug としての *in vivo* における評価

脂溶性化合物は消化管内での溶解速度が極めて遅いため、経口投与における bioavailability が低く、また食事の種類や摂食時間など胆汁分泌に及ぼす因子の影響により bioavailability は大きく変動する。そこで、胆汁分泌が経口投与における UqH-10 誘導体の吸収性に及ぼす影響を評価するために、絶食ラットと 2 時間/日の摂食コントロールにより胆汁分泌にリズムをつけた摂食コントロールラットを用いる系を確立した。

絶食ラットにおける UqH-10 誘導体投与群の AUC は Uq-10 投与群の AUC に比べて増加し、UqH-1-DMG > UqH-4-DMG > UqH-1,4-DMG >> Uq-10 となった (Fig. 4)。以上の結果より、UqH-10 誘導体は胆汁分泌の低い状態において UqH-10 の高い bioavailability を確保できる水溶性 prodrug として機能できることが明らかになった。

また、経口投与製剤としては、吸収効率が胆汁分泌の影響を受けにくいことが望ましい。絶食ラット UqH-10 誘導体および Uq-10 の消化管吸収に及ぼす胆汁分泌の影響を、絶食ラットと摂食コントロールラットを用いる系で検討したところ、Uq-10 の吸収は胆汁分泌が少ない絶食ラットでは極めて少なく、摂食コントロールラットでは高くなるが、UqH-10 誘導体は絶食ラットにおいても高い吸収性を示し、Uq-10 経口投与群の AUC に比べ絶食-摂食間の変動が少なく、胆汁分泌による影響を受けにくいことが明らかになった (Table 3)。以上の結果より 3 種の UqH-10 誘導体は経口投与により bioavailability を確保できる UqH-10 の水溶性 prodrug として機能できることが明らかになった。

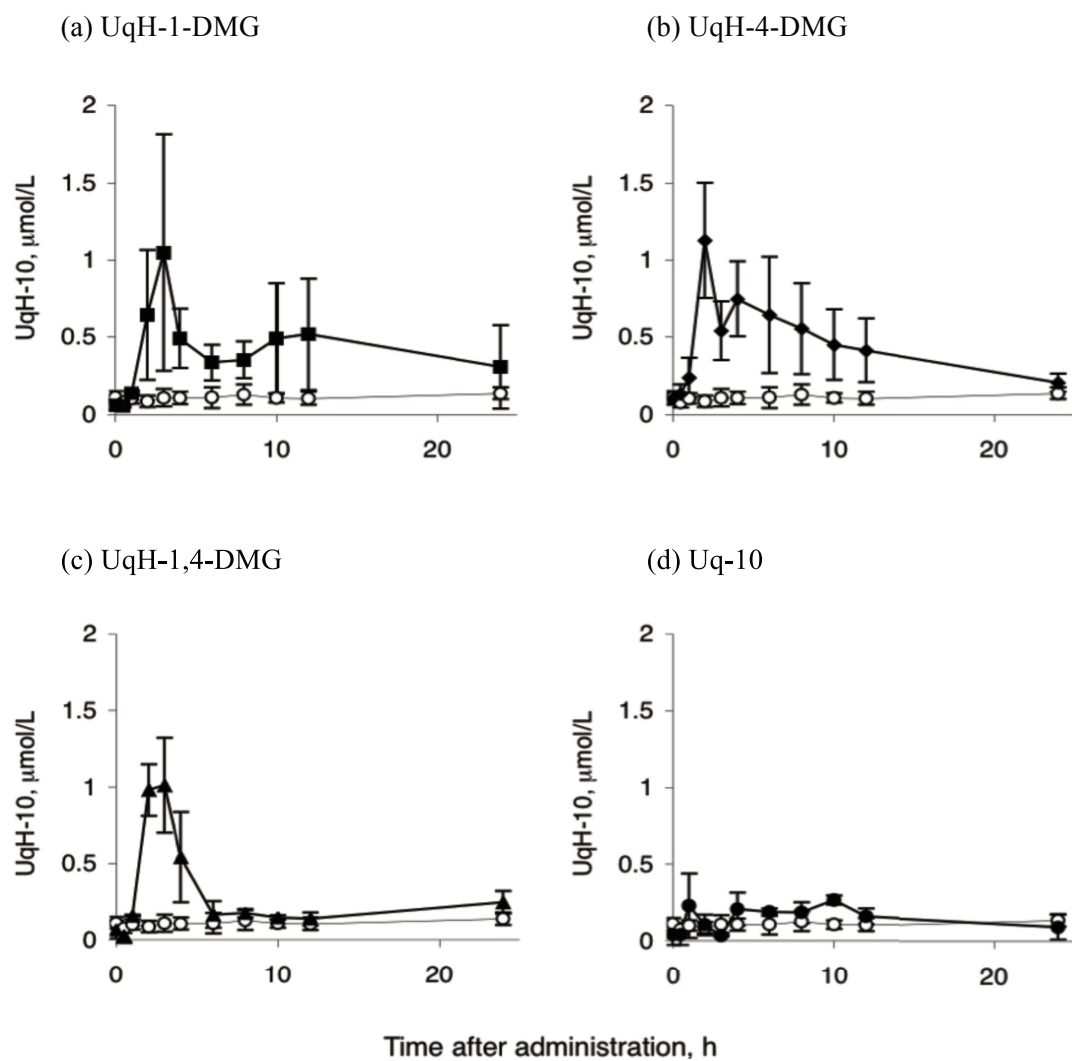


Fig. 4. Mean plasma concentration of UqH-10 after the p.o. administration of UqH-1-DMG, UqH-4-DMG, UqH-1,4-DMG and Uq-10 in the fasting state rats. Key : (■) UqH-1-DMG; (◆) UqH-4-DMG; (▲) UqH-1,4-DMG; (●) Uq-10; (○) Control. Each point represents mean \pm SD of three rats.

Table 3. Pharmacokinetic parameters for UqH-10 after p.o. administration of UqH-1-DMG, UqH-4-DMG, UqH-1,4-DMG and Uq-10 in the fasting state rats and feeding-controlled rats.

	UqH-1-DMG	UqH-4-DMG	UqH-1,4-DMG	Uq-10
in fasting state				
Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	40.5	40.5	40.5	40.5
C_{max} ($\mu\text{mol/L}$)	1.05 ± 0.766	1.13 ± 0.372	1.01 ± 0.310	0.265 ± 0.0296
T_{max} (h)	3	2	3	10
AUC ($\mu\text{mol h/L}$)	8.95 ± 4.06	8.08 ± 3.51	4.73 ± 2.87	2.97 ± 1.83
MRT (h)	9.98 ± 3.46	8.69 ± 0.394	8.67 ± 2.08	10.1 ± 3.31
in feeding-controlled				
Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	40.5	40.5	40.5	40.5
C_{max} ($\mu\text{mol/L}$)	2.67 ± 1.22	3.32 ± 0.751	2.70 ± 1.49	2.21 ± 0.881
T_{max} (h)	4	3	12	4
AUC ($\mu\text{mol h/L}$)	38.0 ± 16.9	40.9 ± 9.62	41.6 ± 15.5	38.0 ± 4.33
MRT (h)	11.3 ± 1.54	9.94 ± 0.511	11.7 ± 0.607	13.0 ± 0.279
F (%)	424	506	880	1279

The values are the mean and S.D. of three rats.

【総括】

薬物療法における最大の目的は、作用部位における薬物の bioavailability を確保することである。本研究は、 γ -T3、 S - γ -CEHC および UqH-10 の薬物送達上の問題を克服し治療効率を改善する目的で、prodrug 化による新規薬物送達法の開発を試みた。その結果、 γ -T3 および UqH-10 のフェノール性水酸基に promoiety として *N,N*-dimethylglycine を導入した誘導体は、水溶解化および酸化に対する安定化が可能であり、また生体内に効率よく親薬物を供給できる水溶性 prodrug として機能できることが明らかになった。さらに γ -T3DMG は S - γ -CEHC の two-step prodrug として機能できることが明らかになった。

【謝辞】

終わりに臨み、本研究の機会をいただき、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部創剤学教室 加留部 善晴 教授ならびに高田 二郎 教授に衷心より感謝の意を表します。

併せて、本論文を査読して頂き、貴重な御意見、御校閲を賜りました福岡大学薬学部臨床薬物治療学教室 中島 学 教授ならびに同大学機器分析学教室 藤岡 稔大 教授に深く感謝致します。

本研究に際し多大なる御助言、御協力を賜りました武蔵野大学薬学部 今井 一洋 教授ならびに東邦大学薬学部 福島 健 教授に厚く御礼申し上げます。

終始懇切な御助言、御協力を賜りました福岡大学薬学部創剤学教室 松永 和久 准教授、日高 亮司 修士、山崎 暁彦 修士に心から感謝致します。

研究上の同士でありました福井 亨昌 博士をはじめ、種々の形で本研究に御協力いただいた福岡大学薬学部創剤学教室の皆様には深く感謝致します。

最後に、本研究に尊い命を提供して頂いた実験動物諸霊に感謝致します。

【引用文献】

1. Bieri JG and McKenna MC (1981) Expressing dietary values for fat-soluble vitamins: changes in concepts and terminology. *Am J Clin Nutr* 34: 289-295.
2. Weimann BJ and Weiser H (1991) Functions of vitamin E in reproduction and in prostacyclin and immunoglobulin synthesis in rats. *Am J Clin Nutr* 53: 1056S-1060S.
3. Qureshi AA, Qureshi N, Wright JJ, Shen Z, Kramer G, Gapor A, Chong YH, DeWitt G, Ong A and Peterson DM (1991) Lowering of serum cholesterol in hypercholesterolemic humans by tocotrienols (palmvitee). *Am J Clin Nutr* 53: 1021S-1026S.
4. Qureshi AA, Bradlow BA, Brace L, Manganello J, Peterson DM, Pearce BC, Wright JJ, Gapor A and Elson CE (1995) Response of hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. *Lipids* 30: 1171-1177.
5. Qureshi AA, Bradlow BA, Salser WA and Brace LD (1997) Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk parameters of hypercholesterolemic human. *Nutr Biochem* 8: 290-298.
6. Parker RA, Pearce BC, Clark RW, Gordon DA and Wright JJ (1993) Tocotrienols regulate cholesterol production in mammalian cells by post-transcriptional suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem* 268: 11230-11238.
7. Raederstorff D, Elste V, Aebischer C and Weber P (2002) Effect of either γ -tocotrienol or a

- tocotrienol mixture on the plasma lipid profile in hamsters. *Ann. Nutr Metab* 46: 17-23.
8. Guthrie N, Gapor A, Chambers AF and Carroll KK (1997) Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and -positive MCF-7 human breast cancer cells by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination. *J Nutr* 127: 544S-558S.
 9. Nesaretnam K, Ambra R, Selvaduray KR, Radhakrishnan A, Reimann K, Razak G, and Virgili F (2004) Tocotrienol-rich fraction from palm oil affects gene expression in tumors resulting from MCF-7 cell inoculation in athymic mice. *Lipids*. 39; 459-467.
 10. Shah SJ and Sylvester PW (2005) γ -Tocotrienol inhibits neoplastic mammary epithelial cell proliferation by decreasing Akt and nuclear factor kB activity. *Exp Biol Med* 230: 235-241.
 11. Lodge JK, Ridington J, Leonard S, Vaule H and Traber MG (2001) α - and γ -Tocotrienols are metabolized to carboxyethyl-hydroxychroman derivatives and excreted in human urine. *Lipids* 36: 43-48.
 12. Murray ED Jr, Wechter WJ, Kantoci D, Wang W-H, Pharm T, Quiggle DD, Gibson KM, Leipold D and Anner BM (1997) Endogenous natriuretic factors 7: Biospecificity of a natriuretic γ -tocopherol metabolite LLU- α . *J Pharmacol Exp Ther* 282: 657-662.
 13. Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche C and Ames BN (2000) γ -Tocopherol and its major metabolite, in contrast to α -tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11494-11499.
 14. Grammas P, Hamdheydari L, Benaksas EJ, Mou S, Pye QN, Wechter WJ, Floyd RA, Stewart C and Hensley K (2004) Anti-inflammatory effects of tocopherol metabolites. *Biochem Biophys Res Comm* 319: 1047-52.
 15. Mitchell P (1975) Protonmotive redox mechanism of the cytochrome *b-c₁* complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett.* 56: 1-6.
 16. Frei B, Kim MC and Ames BN. (1990) Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Aca. Sci U S A.* 87: 4879-4883.
 17. Maguire JJ, Wilson DS and Packer L. (1989) Mitochondrial electron transport-linked tocopheroxyl radical reduction. *J Biol Chem.* 264 (36): 21462-21465.
 18. Hattori A, Fukushima T, Hamamura K, Kato M and Imai K (2001) A fluorimetric, column-switching HPLC and its application to an elimination study of LLU- α enantiomers in rat plasma. *Biomed Chromatogr* 15: 95-99.
 19. Takata J, Hidaka R, Yamasaki A, Hattori A, Fukushima T, Tanabe M, Matsunaga K, Karube Y and Imai K (2002) Novel *d*- γ -tocopherol derivative as a prodrug for *d*- γ -tocopherol and a two-step prodrug for *S*- γ -CEHC. *J Lipid Res* 43: 2196-2204.