

黄柏抽出物の抗炎症効果

内山 務,^{a)}上川 浩,^{b)}荻田 善一^{a)}

^{a)}富山医科薬科大学和漢薬研究所病態生化学部門, ^{b)}株式会社広貫堂・研究開発部

Anti-inflammatory effect of extract from Phellodendri Cortex

Tsutomu UCHIYAMA,^{*a)} Hiroshi KAMIKAWA^{b)} and Zen-ichi OGITA^{a)}

^{a)}Department of Pathogenic-Biochemistry, Research Institute for Oriental Medicines, Toyama Medical and Pharmaceutical University

^{b)}Research Laboratory, Kokando Co., Ltd.

(Received September 18, 1989. Accepted December 4, 1989.)

Abstract

In Chinese medicine, Phellodendri Cortex [*Phellodendron amurense* RUPRECHT], containing berberine as a major component with such pharmacological activities, such as an anti-cholera toxin effect, anti-inflammatory effect, and a stimulative effect of bile secretion or bilirubin discharge has been used as a stomachic. We have reported on the anti-ulcer activity of the berberine-free fraction in this plant. In the present study, we also found anti-inflammatory activity in the same fraction. This fraction showed a strong inhibitory effect on hind paw edema induced by carrageenin in rats as well as a significant inhibitory effect on acetic acid-induced vascular permeability in mice, carboxymethyl cellulose-induced leukocyte emigration in rats and granulation tissue formation (fertile egg method). Interestingly this berberine-free fraction showed trypsin inhibitory activity and oxygen radical scavenging activity.

Key words *Phellodendron amurense* RUPRECHT, Phellodendri Cortex, anti-inflammatory effect, trypsin inhibitor, superoxide dismutase.

Abbreviation Phellodendri Cortex, 黄柏.

緒 言

黄柏 (Phellodendri Cortex) はミカン科 (Rutaceae) に属するキハダ (*Phellodendron amurense* RUPRECHT) の、コルク層を除いた樹皮を乾燥したもので東洋医学において古くから苦味健胃薬及び整腸薬、消炎性収斂薬として胃腸炎、腹痛、黄疸、下痢などの症状に用いられてきた。黄柏の主成分は黄連と同様、berberine であり、黄柏の薬理作用は主として主成分である berberine の薬理作用 (抗菌作用^{1,2)} 及び抗コレラ毒素作用^{3,4)} 血圧降下作用⁵⁾ 抗炎症作用⁶⁾ 胆汁分泌⁷⁾ ビリルビン排出促進作用⁸⁾ など) によるものであると考えられ、berberine 以外の成分の薬理作用についてはあまり明らかにされていない。

すでに我々は黄柏から berberine を除いた分画が、各種実験胃潰瘍に対して有効な抗潰瘍効果を示すことを明らかにした⁹⁾。本研究の目的は、黄柏に含まれる berberine 以外の成分の抗炎症作用について検討することにある。実験は carrageenin 浮腫モデル及び、血管透過性亢進反応及び白血球遊走反応、肉芽形成反応による *in vivo* モデルに対する作用について検討した。また、作用機序解明のため serine proteases である trypsin 及び thiol proteases である papain の活性に及ぼす影響及び活性酸素捕捉作用について検討したので、それらの結果についても報告する。

材料と方法

(1) 実験動物: 体重約 200 g の Wistar/ST 系の

*〒930-01 富山市杉谷2630
Sugitani 2630, Toyama 930-01, Japan

雄性ラット及び体重約 20 g の ddY 系雄性マウスを日本エスエルシー株式会社より、受精後 9 日目の白色レグホン種の受精卵を富山県経済農業連合会より購入し、各実験に用いた。ラット及びマウスは数日間飼育した後、また受精鶏卵は 1 日間 37℃ でふ卵した後、各実験に供した。

(2) 飼料の調製：黄柏を methanol で加熱抽出し、濾過した。その残留物に同一操作をくり返し行うことにより、methanol 可溶性成分 (berberine 等) を除去した。得られた抽出残渣を乾燥した後、50% acetonitrile で室温において数回抽出し、得られた抽出液の溶媒を留去し、そのうちの水溶性分画 (収率 2.0%、残存 berberine 濃度 1.0% 以下) を試料として用いた。

(3) 抗炎症作用：

①ラット carrageenin 足蹠浮腫¹⁰⁾

体重約 200 g の Wistar/ST 系雄性ラットの右後肢足蹠皮下に、起炎物質として試験前日に調製した 1% λ -carrageenin (和光純薬工業) 生理食塩水溶液 0.1 ml を注入し、浮腫を起こさせた。起炎剤注入前と注入後の足蹠容積を浸水法により測定し、浮腫率を求めた。腹腔内投与試験において、試料は 5% アラビアゴムに懸濁または溶解して、carrageenin 注入の 1 時間前に投与し、注入後 1 時間おきに 5 時間後までの足蹠容積を測定した。陽性コントロールとして phenylbutazone (Sigma) を用いた。経皮投与試験においては、試料を親水性の軟膏基剤に 2% の濃度で配合し、あらかじめ脱毛した足蹠に 1 時間おきに一定量ずつ塗布した。塗布開始 3 時間後に起炎剤を注入、浮腫率が最大となる 3 時間後の足蹠容積のみを測定した。比較薬として methyl salicylate (東京化成工業) を用いた。

②マウス酢酸誘発血管透過性亢進¹¹⁾

ddY 系雄性マウス (体重約 20 g) に 1.0% Evans blue 10 ml/kg を尾静脈内投与し、その直後に 0.6% acetic acid 0.25 ml/マウスを腹腔内投与した。色素の注入 30 分後に頸椎を脱臼し開腹した後、生理食塩水 10 ml で腹腔内を洗浄し、洗液に蒸留水を加えて全量を 20 ml とした。この洗液を 2,500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の色素量を 610 nm における吸光度により測定した。試料は 5% アラビアゴムに懸濁または溶解して、色素注入 30 分前に皮下投与した。陽性コントロールとして aspirin (岩城製薬) を用いた。

③ラット carboxymethyl cellulose (CMC) - pouch 法による白血球遊走¹²⁾

体重約 200 g の Wistar/ST 系雄性ラットの背部

皮下に空気 5 ml を注入し、17 時間後ここに 2% CMC-Na (関東化学) の生理食塩水溶液を注入した。6 時間後に CMC 囊の内液を 0.1 ml 採取し、白血球数の算定に用いた。遊走白血球の算定は 0.05% Brilliant Cresyl Blue の生理食塩水溶液 3.0 ml に囊内液 0.1 ml を加え、混和染色し、Bürker-Türk 血球計算盤を用いることにより行った。試料は投与の当日に CMC 溶液に溶解ないし懸濁し、さらに投与の直前に streptomycin sulfate (明治製薬) 及び penicillin-G (200,000 units, Sigma) をそれぞれ CMC 溶液 1.0 ml 当たり 0.1 mg となるように加え実験に用いた。また、陽性コントロールとして phenylbutazone を用いた。

④受精鶏卵法による肉芽形成¹³⁾

受精鶏卵は産卵 10 日後の白色レグホン種のものをを用いた。胚の位置を中心にして一辺 2 cm の正三角形に卵殻を破り、さらに卵殻膜を切除した。次に、卵黄を避けて漿尿膜上に、試料を 5% アラビアゴム溶液に懸濁または溶解した溶液 15.0 μ l をしみこませた直径 10 mm の濾紙ディスクを挿入し、開殻した部分を密閉した。処置後 4 日間 37℃ にてふ卵した後、開殻し肉芽付着濾紙ディスクを取り出した。別の濾紙上で余分の水分を除いた後 55℃ にて一晚放置した。乾燥肉芽重量は、乾燥肉芽付着濾紙ディスク重量から、あらかじめ測定しておいた乾燥濾紙ディスク重量を差し引いて算出した。陽性コントロールとして phenylbutazone を用いた。

(4) Trypsin 阻害活性測定法¹⁴⁾

Trypsin (Difco, 20.0 μ g/ml) 及び試料をそれぞれ 1/15 M phosphate buffer (pH 7.6) に溶解し、37℃ で 10 分間保温した後、1.0% casein を加えて 37℃ で 30 分間保温した。つぎに 0.8 M trichloroacetic acid (TCA) を加え、37℃ で 20 分間保温し、3000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。得られた上清に 0.4 M sodium carbonate 及び 1.0 N phenol 試薬を加え 37℃ で 30 分間保温した後、660 nm における吸光度を測定し、trypsin 活性に対する阻害活性を求めた。本条件下で 1 分間に生成する TCA 可溶性物質が tyrosine の 1.0 μ g 当量に相当する呈色を示す場合の trypsin 活性を 1 単位 (U) と定義し、1 分間に trypsin 活性を 1 単位だけ抑制する trypsin 活性阻害度を 1 阻害単位 (IU) と定義した。

(5) Papain 阻害活性測定法¹⁴⁾

Papain (Merck, 50 μ g/ml) 及び試料をそれぞれ 1/15 M phosphate buffer (pH 6.0) に溶解し、trypsin の場合と同様にして papain 活性に対する

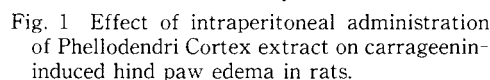
(6) 活性酸素捕捉作用

(7) 統計学的処理

結果

(1) ラット carrageenin 足趾浮腫に対する影響：
 炭柏抽出分画は 10.0 mg/kg の腹腔内投与によって carrageenin 浮腫抑制傾向を示し、20.0 mg/kg では同用量の phenylbutazone よりも弱いものの、強い抑制作用を示した。また、0.2 mg/kg の berberine sulfate は carrageenin 浮腫に対し抑制作用を示さなかった (Fig.1)。また経皮投与によっても、本分画 (2.0%) は carrageenin 浮腫を有意に抑制したが (抑制率17.6%), 2.0% berberine sulfate よりも比較薬として用いた 2.0% methyl salicylate よりも抑制作用は弱かった。

(2) 血管透過性亢進に対する影響：黄柏抽出分画は 40.0 mg/kg の皮下投与で酢酸刺激による腹腔内への色素漏出を有意に促進したが（抑制率 -33.0%），200.0 mg/kg の皮下投与では逆に有意に抑制した（抑制率 34.0 %）。陽性コントロールとして用いた aspirin（40.0 mg/kg）も有意な抑制作用を示し、その抑制率は 26.0 % であったが、berberine sulfate（4.0 mg/kg）は有意な促進作用



Data are presented as mean $\pm$ S.E. $\circ$: control, $\triangle$: phenylbutazone (20.0 mg/kg), $\blacktriangle$: Phellodendri Cortex (10.0 mg/kg), $\blacktriangle$: Phellodendri Cortex (20.0 mg/kg), $\bullet$: berberine sulfate (0.2 mg/kg). Significantly different from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Treatment	Dose (%)	n	Swelling (%) (Mean $\pm$ S.E.)	Inhibition (%)
Control	2.0	9	83.5 $\pm$ 5.1	
Phellodendri Cortex	2.0	11	68.6 $\pm$ 5.7*	17.6
Berberine sulfate	2.0	10	72.8 $\pm$ 5.3	12.8
Methyl salicylate	2.0	10	71.7 $\pm$ 5.8	14.1

Treatment	Dose (mg/kg)	n	Dye leakage	
			Mean (μ g) $\pm$ S.E.	Inhibition (%)
Control		12	27.7 $\pm$ 2.0	
Phellodendri Cortex	40.0	8	36.9 $\pm$ 3.5*	-33.0
	200.0	7	18.3 $\pm$ 3.5*	34.0
	4.0	8	38.6 $\pm$ 3.2**	-39.3
Aspirin	40.0	10	20.5 $\pm$ 3.0*	26.0

Significantly different from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

を示した（抑制率--39.3%）（Table II）。

(3) 白血球遊走に対する影響：ラット背部皮下に作成したCMC嚢内に被検体を局所投与して、白血球遊走に対する影響を検討した。その結果、黄柏抽出分画は20.0 mg/pouch及び100.0 mg/pouchの

投与により白血球遊走を有意に抑制した（抑制率29.8%, 60.9%）。また、berberine sulfate (2.0 mg/pouch) 及び陽性コントロールとして用いたphenylbutazone (20.0 mg/pouch) も有意な抑制作用を示した（抑制率は39.7%, 46.8%）（Table

Table III Effect of Phellodendri Cortex extract on CMC-induced leukocyte emigration in rats.

Treatment	Dose (mg/pouch)	n	Count of leukocyte/ml of pouch fluid ($\times 10^7$ /ml)	Inhibition (%)
Control		8	6.15 $\pm$ 0.53	
Phellodendri Cortex	20.0	6	4.31 $\pm$ 0.40*	29.8
	100.0	10	2.40 $\pm$ 0.36**	60.9
Berberine sulfate	2.0	7	3.71 $\pm$ 0.35**	39.7
Phenylbutazone	20.0	8	3.27 $\pm$ 0.32**	46.8

Each value represents mean $\pm$ S.E.

Significantly different from control at * p <0.05, ** p <0.01.

Table IV Effect of Phellodendri Cortex extract on granulation tissue formation (fertile egg method).

Treatment	Dose (μ g/disk)	n	Granulation tissue Dry weight (mg)	Inhibition (%)
Control		9	9.4 $\pm$ 0.7	
Phellodendri Cortex	100	10	6.0 $\pm$ 0.5**	36.2
	1000	6	3.3 $\pm$ 0.4**	64.9
Berberine sulfate	10	8	6.4 $\pm$ 0.4**	31.9
Phenylbutazone	500	6	6.5 $\pm$ 0.9*	30.9

Each value represents mean $\pm$ S.E.

Significantly different from control at * p <0.05, ** p <0.01.

Table V Inhibitory activity Phellodendri Cortex extract and soybean trypsin inhibitor on hydrolysis of casein by trypsin *in vitro*.

Drug	Conc.	n	Optical density (Mean $\pm$ S.E.)	Inhibition (%)
Control		8	0.463 $\pm$ 0.003	
Phellodendri Cortex	0.031 mg/ml	4	0.464 $\pm$ 0.003	0.0
	0.063	4	0.462 $\pm$ 0.003	0.3
	0.125	4	0.452 $\pm$ 0.004	2.3
	0.250	4	0.424 $\pm$ 0.005	8.4
	0.500	4	0.344 $\pm$ 0.009	25.7
	0.750	4	0.195 $\pm$ 0.001	57.9
	1.000	4	0.099 $\pm$ 0.009	78.7
Control		8	0.416 $\pm$ 0.003	
Soybean trypsin inhibitor	0.10 μ g/ml	4	0.408 $\pm$ 0.002	1.9
	0.20	4	0.400 $\pm$ 0.002	3.7
	1.00	4	0.333 $\pm$ 0.000	19.9
	2.00	4	0.269 $\pm$ 0.002	35.3
	4.00	4	0.117 $\pm$ 0.001	72.0
	6.00	4	0.064 $\pm$ 0.000	84.6
	8.00	4	0.053 $\pm$ 0.001	87.4
	10.00	4	0.048 $\pm$ 0.000	88.6

Table VI Inhibitory activity Phellodendri Cortex extract, superoxide dismutase, soybean trypsin inhibitor, bovine serum albumin on superoxide anion production by xanthine oxidase system.

Drug	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	n	Optical density	Inhibition (%)
Control		3	0.181	
Phellodendri Cortex	10.0	3	0.130	28.5
	100.0	3	0.060	66.9
Control		3	0.216	
Superoxide dismutase	0.5	3	0.167	22.6
	1.0	3	0.134	37.9
	5.0	3	0.055	74.7
	10.0	3	0.031	85.6
Control		3	0.213	
Soybean trypsin inhibitor	0.1	3	0.213	-0.2
	1.0	3	0.214	-0.6
	10.0	3	0.213	-0.2
	100.0	3	0.212	0.5
Control		3	0.149	
Bovine serum albumin	10.0	3	0.149	-0.6
	100.0	3	0.143	3.5

III)。

(4) 肉芽形成に及ぼす影響：受精鶏卵法による肉芽の形成に対する黄柏抽出分画の影響を検討した結果、100 $\mu\text{g/disk}$ 及び 1000 $\mu\text{g/disk}$ の用量で肉芽形成を有意に抑制した（抑制率36.2%，64.9%）。また、berberine sulfate (10 $\mu\text{g/disk}$) 及び陽性コントロールとして用いた phenylbutazone (500 $\mu\text{g/disk}$) も有意な抑制作用を示した（抑制率31.9%，30.9%）(Table IV)。

2. Trypsin 阻害活性

黄柏抽出分画の trypsin の活性に及ぼす影響を検討した結果、黄柏抽出分画は濃度依存的に trypsin 活性を抑制し（50%阻害量は 0.69 mg/ml）、その阻害活性は 0.025 IU/mg で、soybean trypsin inhibitor (SBTI type I-a, Sigma, 6.25 IU/mg) の約 1/250 であった (Table V)。

3. Papain 阻害活性

黄柏抽出分画は papain の活性に対し 15 mg/ml まで影響を与えなかった。

4. 活性酸素捕捉作用

黄柏抽出分画は 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 及び 100 $\mu\text{g/ml}$ で対照群に対し活性酸素量をそれぞれ28.5%及び66.9%減少させた。比活性は8.96 U/mg であり superoxide dismutase (SOD, type I from bovine blood, Sigma, 189.75 U/mg) の約 1/20 の強さであった。

本分画の活性酸素捕捉作用が単に高分子物質によ

る非特異的作用である可能性があるため、bovine serum albumin (BSA, Sigma) についても検討を行った。その結果、BSA は 100 $\mu\text{g/ml}$ でも活性酸素捕捉作用を示さなかった。

また、macrophage を用いた実験によって、種々の serine proteases が細胞における活性酸素の産生を抑制することが明らかにされている。そこで活性酸素捕捉作用を SBTI について検討した結果、100 $\mu\text{g/ml}$ でも活性酸素捕捉作用は認められなかった (Table VI)。

考 察

黄柏は苦味健胃薬として重要な生薬であるが、外用薬として炎症に対しても用いられてきた。そこで今回、我々は黄柏抽出分画の急性炎症反応モデルに対する影響を検討した。Carrageenin 足蹠浮腫に対する本分画の影響を検討したところ、腹腔内投与によって強い抑制作用を示したが、本分画に残存する berberine に相当する量の berberine sulfate は抑制作用を示さなかった。また、経皮投与によっても berberine sulfate の抑制作用は弱く、同用量の本分画のみが有意な抑制作用を示した。これらのことから本分画に含まれる berberine 以外の成分が carrageenin 足蹠浮腫を抑制することが示唆された。そこで、本分画の急性炎症に対する効果をより詳細

に検討するため、急性炎症の経過（第一期：血管透過性亢進，第二期：白血球遊走，第三期：肉芽形成）における各段階に対する影響を、それぞれに対するモデル実験により検討した。その結果、本分画はマウス酢酸誘発血管透過性亢進モデルに対して高濃度で有意な抑制作用を示し、ラット CMC-pouch 法による白血球遊走モデルに対しても強い抑制作用を示した。さらに、受精鶏卵法による肉芽形成モデルを用いた実験では本分画（100 $\mu\text{g}/\text{disk}$ ）の5倍量（500 $\mu\text{g}/\text{disk}$ ）の phenylbutazone と同等の抑制作用が認められた。一方、残存 berberine 相当量の berberine sulfate は、血管透過性を亢進させた。また、白血球遊走及び肉芽形成を有意に抑制したが、本分画の示す抑制作用に比較して明らかに弱いものであった。以上の実験結果により、本分画に含まれる berberine 以外の成分が急性炎症の発症過程の3つの段階それぞれに対して抑制効果を及ぼすことが示唆された。

急性炎症において、kallikrein, plasmin 等の血漿由来 serine proteases が、血管拡張及び毛細血管の透過性を亢進させ、白血球の遊走を間接的に促す血中生理活性 peptide である kinin の遊離に関与する酵素であり、soybean trypsin inhibitor (SBTI) 等の serine protease inhibitors は kinin の遊離を抑制することが知られており、これらの inhibitors は抗炎症作用を示すことが明らかにされてきた。^{16,17)} また、細胞由来の proteases である thiol proteases は組織あるいは血漿蛋白質に働き、炎症化学因子の生成に関与し、炎症の過程で重要な働きを担っていることが知られている。そこで我々はこの黄柏抽出分画の抗炎症作用の機序を明らかにするために、これらの proteases に対する作用を検討する目的で serine protease として trypsin を、thiol protease として papain を選び、それぞれの酵素活性に対する作用について検討した。その結果、trypsin 活性に対しては用量依存的な抑制作用を示したものの、papain 活性に対しては影響を及ぼさないことが明らかとなった。このことから、berberine 以外の黄柏抽出成分の示す抗炎症作用の作用機序は、serine proteases に対する阻害作用によってもたらされている可能性が示唆された。

また最近、活性酵素が炎症の強力な mediator として働き、血管透過性の亢進及び白血球の遊走を引き起こすことが明らかにされつつあり、このことから活性酸素捕捉能を持つ superoxide dismutase (SOD) の抗炎症作用が検討され、リュウマチに対して試験的に治療に用いられている。また、種々の

serine protease inhibitors も活性酸素の産生を抑制することが知られている。¹⁸⁾ 今回、我々は本分画が活性酸素捕捉作用を示し、その比活性は牛の血液より精製された SOD の約 1/20 の強さであることを明らかにした。SBTI 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を反応系に加えても活性酸素捕捉作用は認められなかったことから、本分画の示す活性酸素捕捉作用は serine protease inhibitor としての作用によるものではなく、それ以外の作用機序に基づいていることが示唆された。一方、SOD の阻害剤である diethyldithiocarbamate (DDC) によって胃粘膜の内因性 prostaglandin E_2 量の低下がもたらされ、そのために胃潰瘍が形成されることが知られている。^{19,20)} また、aspirin, indomethacin 等の非 steroid 系抗炎症薬によって引き起こされる胃粘膜損傷は、胃粘膜における prostaglandin E_2 合成阻害が原因であると考えられている。さらに我々は本分画が prostaglandin E_2 様の cytoprotection 作用を示すことを明らかにしてきており、⁹⁾ SOD の投与によりラット胃粘膜 prostaglandin E_2 量が増加することが明らかにされている。²⁰⁾ これらのことから本分画が SOD と同様に内因性 prostaglandin E_2 量を増加させるのではないかと考えられる。

以上のように、本分画が非 steroid 系抗炎症薬と同様またはそれ以上の強力な抗炎症作用を示すにもかかわらず、それらの副作用である胃粘膜損傷を引き起こさないばかりでなくその発生を抑制するということは、本分画を内服により用いた場合大きな利点となることが予測される。生薬に含まれる、薬理作用を持つ物質を単離することを非常に重要なことであるが、生薬抽出エキ스는多数の物質の混合物であり、含有成分が他の含有成分と複合体を形成することによってはじめて薬理作用を持つ場合も考えられ、あるいは特定の薬理作用を持つ物質が同時に含有されている他の物質によって胃における分解から保護され、小腸における吸収率を高めるなど複合系薬物の効用がもたらされている可能性がある。ここに単一物質を薬物として用いる場合との大きな相違点があると考えられる。したがって、我々は成分を単離しその薬理作用を検討することから研究を始める従来の方法によるのではなく、ある程度精製した粗分画を用いて薬理作用を検討した。

従来から黄柏は黄連と同様に種々の薬理作用を示す berberine の抽出原料として重要な生薬として用いられてきた。しかし、berberine 以外の成分も有効な抗潰瘍作用を示し、⁹⁾ また本研究によって強力な抗炎症作用をも示すことが明らかになった。興味

あることには、この分画の作用機序の1つとしてSOD様作用及びserine protease inhibitorとしての作用のことが示唆された。特に、強力な炎症惹起因子であり、さらに胃潰瘍、糖尿病、癌など種々の疾患の発生病理に密接に関連していると考えられている活性酸素を捕捉する作用を本分画が示したことは非常に重要である。以上のことから、和漢薬方剤について berberine 以外の薬理作用についても今後検討することが多くの方剤に含まれている黄柏の薬理学的存在意義を考える上でも重要なことであると考えられる。

文 献

- 1) 浮田忠之進, 田村とみ江, 水野伝一: アルカロイド・ペルベリン塩酸塩の抗菌性に就いて, ペニシリン **2**, 534-537, 1949.
- 2) Amin, A. H., Subbaiah, T. V. and Abbasi, K. M.: Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Can. J. Microbiol.* **15**, 1067-1076, 1968.
- 3) Dutta, N. K., Marker, P. H. and Rao, N. R.: Berberine in toxin-induced experimental cholera. *Br. J. Pharmacol.* **44**, 153-159, 1972.
- 4) Sabir, M., Akhter, M. H. and Bhide, N. K.: Antagonism of cholera toxin by berberine in the gastrointestinal tract of adult rats. *Indian J. Med. Res.* **65**, 305-313, 1977.
- 5) Suzuki, S.: Action of berberine upon circulation. *Tohoku J. Exp. Med.* **36**, 134-145, 1939.
- 6) 藤村 一, 沢田徳之助, 後藤 実: 生薬ならびに植物成分の抗炎症スクリーニング, 薬学雑誌 **90**, 782-783, 1970.
- 7) Oshiba, S., Ueno, H., Mihara, H. and Okamoto, S.: Effect of berberine on bile secretion. *Nihon Univ. J. Med.* **16**, 69-79, 1974.
- 8) Chan, M. Y.: The effect of berberine on bilirubin excretion in the rat. *Comp. Med. East West* **5**, 161-168, 1977.
- 9) 内山 務, 上川 浩, 荻田善一: 黄柏抽出物の抗潰瘍効果, 薬学雑誌 **109**, 672-676, 1989.
- 10) 藤村 一: 薬効の評価(1), "医薬品開発基礎講座 V," 地人書館, 東京, pp. 239-282, 1971.
- 11) Whittle, B. A.: The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *Br. J. Pharmacol.* **22**, 246-253, 1964.
- 12) 石川 浩, 新延信吉, 鶴藤 承: 抗炎症薬の作用形式の研究(第1報), Carboxymethyl cellulose 養法による抗炎症作用の定量的解析, 薬学雑誌 **88**, 1472-1477, 1968.
- 13) D'arcy, P. F. and Howard, E. M.: A new anti-inflammatory test. Utilizing the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **29**, 378-387, 1967.
- 14) Anson, M. L.: The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **22**, 79-89, 1938.
- 15) Oyanagi, Y.: Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **142**, 290-296, 1984.
- 16) Nakagawa, H., Watanabe, K., Shuto, K. and Tsurufuji, S.: Anti-inflammatory effect of proteinase inhibitors on carrageenin-induced inflammation in rats. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1191-1195, 1983.
- 17) Nakagawa, H., Shuto, K., Isaji, M., Watanabe, K. and Tsurufuji, S.: Proteinase inhibitors suppress the formation of granulation tissue in the carrageenin-induced inflammation. *J. Pharmacobio Dyn.* **4**, 429-435, 1981.
- 18) Kitagawa, S., Takaku, F., Sakamoto, S.: Evidence that proteases are involved in superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and monocyte. *J. Clin. Invest.* **65**, 74-81, 1980.
- 19) 荻野景規, 岡 伸爾, 松田和也, 松浦伸二郎, 由村俊二, 坂井田功, 岡崎幸紀, 竹本忠良: ラット胃粘膜における superoxide dismutase に関する研究(第1報) —阻害剤ジエチルジチオカルバメートの影響について—, 日本消化器病学会雑誌 **84**, 205-209, 1987.
- 20) 松浦伸二郎, 荻野景規, 山本一成, 岡 伸爾, 由村俊二, 佐々木敏行, 岡崎幸紀, 竹本忠良: Superoxide dismutase のラット胃粘膜 prostaglandin E₂ に及ぼす影響, 炎症 **7**, 197-198, 1987.