

Compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に対する 黄連解毒湯エキスの抑制効果. 半夏瀉心湯, 六君子湯および胃苓湯エキスとの比較検討

小林 隆^{a)} 尾辻 和彦^{b)} 太田 好次^{*a)} 永田 稔^{c)} 石黒伊三雄^{a)}

^{a)}藤田保健衛生大学医学部生化学教室, ^{b)}藤田保健衛生大学医学部内科学教室, ^{c)}藤田保健衛生大学病院薬剤部

Comparison of preventive effect on the progression of compound 48/80-induced gastric mucosal lesions between Oren-gedoku-to extract and Hange-shashin-to, Rikkunshi-to or Irei-to extract

Takashi KOBAYASHI^{a)} Kazuhiko OTSUJI^{b)} Yoshiji OHTA^{*a)} Minoru NAGATA^{c)} and Isao ISHIGURO^{a)}

^{a)}Department of Biochemistry, School of Medicine, Fujita Health University

^{b)}Department of Internal Medicine, School of Medicine, Fujita Health University

^{c)}Department of Pharmacy, Fujita Health University Hospital

(Received March 23, 1994. Accepted July 15, 1994.)

Abstract

We attempted to clarify the preventive effect of orally administered Oren-gedoku-to (OGT) extract on the progression of gastric mucosal lesions in rats with a single compound 48/80 injection in comparison with that of orally administered Hange-shashin-to (HST), Rikkunshi-to (RT) or Irei-to (IT) extract. When OGT, HST, RT or IT extract was given rats at a dose equivalent to fifth each one dosage for adult persons 30 min after compound 48/80 injection in which apparent gastric mucosal lesions occurred, progressed mucosal lesions found at 3 h after the compound 48/80 injection were prevented by the administration of OGT, HST or RT extract but not by that of IT extract: OGT extract showed a stronger prevention than did HST or RT extract. The administration of OGT extract prevented increases in the content of lipid peroxide (LPO) and the activities of xanthine oxidase (XOD) and myeloperoxidase (MPO), an index of neutrophils, and a decrease in Se-glutathione peroxidase activity following the lesion progression. The administration of HST, RT or IT extract showed a weaker preventive effect on those changes following the lesion progression than did that of OGT extract. In addition, the activity of OGT extract to scavenge O_2^- and $\cdot OH$ *in vitro* was much stronger than those of other extracts. *In vitro* XOD activity in gastric mucosal tissues of rats injected with compound 48/80 was inhibited by OGT extract only, while *in vitro* MPO activity in the same tissue was more strongly inhibited by OGT and HST extracts than by RT and IT extracts. OGT extract had no effect on gastric mucosal superoxide dismutase and catalase activities *in vivo* and *in vitro*.

These results strongly suggest that OGT extract administered orally after the appearance of compound 48/80-induced gastric mucosal lesions can prevent the progression of the mucosal lesion in rats by scavenging oxygen radicals produced via XOD and infiltrated neutrophils in the mucosa and by inhibiting stimulated XOD and MPO activities and lipid peroxidation via oxygen radicals produced in the tissue.

*〒 470-11 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98
1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi
470-11, Japan

Key words Oren-gedoku-to, Hange-shashin-to, Rikkunshi-to, Irei-to, compound 48/80, gastric mucosal lesions (rat), antioxidative effect.

Abbreviations AP, allopurinol; CAT, catalase; Cyt. c, cytochrome c; DX, deferoxamine; DMTU, dimethylthiourea; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GSH-px, glutathione peroxidase; LPO, lipid peroxide; MDA, malondialdehyde; MPO, myeloperoxidase; SOD, superoxide dismutase; TMB, tetramethylbenzidine; TBA, 2-thiobarbituric acid; XOD, xanthine oxidase; HST, Hange-shashin-to (Ban-Xai-Xie-Xin-Tang) 半夏瀉心湯; IT, Irei-to (Wei-Ling-Tang) 胃苓湯; OGT, Oren-gedoku-to (Hunag-Lian-Jie-Du-Tang) 黃連解毒湯; RT, Rikkunshi-to (Liu-Jun-Zi-Tang) 六君子湯.

緒 言

黄連解毒湯 (OGT) エキスは、出血を伴う胃十二指腸潰瘍や胃炎の治療薬として臨床において用いられている。^{1,2)}

最近著者ら³⁾は、compound 48/80 (肥満細胞の脱顆粒薬) を 1 回投与したラットにおける胃粘膜障害の進行が OGT エキスの経口投与で抑制されることを明らかにした。また著者ら³⁾は、この compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に伴ってその胃粘膜組織で過酸化脂質 (LPO) 量が増加し、過酸化水素 (H_2O_2) と脂質ヒドロパーオキシドの消去酵素である Se 含有グルタチオンパーオキシダーゼ⁴⁾ (Se-GSH-px) の活性が低下し、またスーパーオキシドアニオン (O_2^-) と H_2O_2 を生成するキサンチン酸化酵素⁵⁾ (XOD) および好中球の指標で、 Cl^- の存在下で H_2O_2 を介して ClO^- の生成に関与するミエロパーオキシダーゼ⁶⁾ (MPO) の活性が上昇することを認め、これらの変動が胃粘膜障害発症後の OGT エキスの経口投与で抑制されることを報告した。しかも、OGT エキスは *in vitro* において、 O_2^- とヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) 消去作用⁷⁾、脂質過酸化抑制作用⁸⁾、XOD と MPO 活性に対する阻害作用^{3,9)}などを示すことが知られている。これらのことから、OGT エキスの compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に対する抑制効果は、その活性酸素消去作用と活性酸素生成系に対する阻害作用によることが推察されている。³⁾

臨床では、OGT エキスと共に半夏瀉心湯 (HST)、六君子湯 (RT) エキスなどは胃十二指腸潰瘍、胃炎などの治療に、また胃苓湯 (IT) エキスは胃腸炎の治療に用いられている。^{1,2)}しかし、これらの漢方薬原末エキスの *in vitro* でのラット胃粘膜組織のフリーラジカル惹起脂質過酸化反応に対する抑制効果は OGT エキスよりも弱いことが知られている。⁸⁾

そこで、compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に対する OGT エキスの抑制効果を明確にする目的で、著者らは compound 48/80 を 1 回投与したラットに胃粘膜障

害が発症した時点で OGT, HST, RT および IT エキスを経口投与し、胃粘膜障害の進行とそれに伴う胃粘膜組織の LPO 量および活性酸素の消去と生成に関与する酵素の活性の変動に対する抑制効果を調べ、OGT エキスの胃粘膜障害抑制効果を HST, RT および IT エキスの場合と比較検討した。また、これらのエキスの O_2^- と $\cdot OH$ 消去活性および compound 48/80 投与ラット胃粘膜組織の XOD と MPO 活性に対する阻害効果を *in vitro* において比較検討した。

材料と方法

(1) **実験動物**：日本エスエルシー社 (浜松) より購入し、オリエンタル酵母社 (東京) 製の固形飼料 MF で 1 週間飼育した 7 週齢の雄性 Wistar 系ラット (体重 200 g 前後) を実験に用いた。

(2) **試薬**：OGT, HST, RT および IT エキスは、(株) ツムラ (東京) より供与されたエキスを原末を用いた。Compound 48/80, テトラメチルベンチジン (TMB), キサンチン, デフェロキサミン (DX), 馬心臓チトクローム c (Cyt. c), 牛赤血球スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) および牛肝臓カタラーゼ (CAT) はシグマ社 (St. Louis, MO) 製を、酵母グルタチオン還元酵素と牛乳 XOD はベーリンガーマンハイム社 (東京) 製を、2-チオバルビツール酸 (TBA), アロプリノール (AP), ジメチルチオ尿素 (DMTU) およびその他の試薬は和光純薬工業社 (大阪) 製を使用した。

(3) **実験方法**：Compound 48/80 投与による胃粘膜障害の作製は、既報^{3,9)}に述べたように、蒸留水に溶解した compound 48/80 (0.75 mg/kg 体重) を 1 夜絶食させたラットに 1 回腹腔内投与して惹起させた。Compound 48/80 非投与群 (対照群) には、同量の蒸留水を腹腔内投与した。OGT, HST, RT および IT エキスは蒸留水に懸濁し、ラットにそれぞれ体重 1 kg 当たり 0.5, 1.5, 1.34 および 1.42 g を compound 48/80 投与 30 分後に経口投与した。各漢方薬原末エキスの投与量は、成人の 1 回投与量の 5 分の 1 に相当した。また SOD, CAT, DMTU, AP,

DX などの投与は、compound 48/80 投与後 30 分の時点において次のように行った。生理食塩水に溶解した牛赤血球 SOD と牛肝臓カタラーゼは、体重 1 kg 当りそれぞれ 10 万単位および 18 万単位を腹腔内投与した。0.5 % カルボキシメチルセルロースに溶解させた DMTU は、体重 1 kg 当たり 500 mg を経口投与した。NaOH 溶液 (pH 10.8) に溶解させた AP は、体重 1 kg 当たり 100 mg を経口投与した。生理食塩水で溶解させた DX は、体重 1 kg 当たり 120 mg を腹腔内投与した。各対照群は、同量の蒸留水を経口投与あるいは同量の生理食塩水を腹腔内投与した。これらのラットは胃を摘出する compound 48/80 投与後 3 時間の時点までは絶食させ、水のみを自由摂取させた。胃の摘出はエーテル麻酔下で行った。

胃粘膜障害の程度の判定は次のように行った。即ち、胃の摘出時に胃内に 0.9 % NaCl 10 ml を注入し、その後胃は摘出した。その胃は 10 % ホルマリン液に 10 分間浸した後、大弯に沿って開き、腺胃部の浮腫を調べると共に、その腺胃部で出血斑を伴う粘膜の障害部位の面積 (mm²) を測定した。胃粘膜障害は浮腫と障害部位の面積から 0~VII のグレイドに分類し、このグレイド分類を用いて表した。グレイド 0 は浮腫および出血斑が認められない胃粘膜、グレイド I は浮腫のみが認められる胃粘膜、グレイド II は障害部位の面積が 1~10 mm² の胃粘膜、グレイド III は障害部位の面積が 11~20 mm² の胃粘膜、グレイド IV は障害部位の面積が 21~30 mm² の胃粘膜、グレイド V は障害部位の面積が 31~40 mm² の胃粘膜、グレイド VI は障害部位の面積が 41~50 mm² の胃粘膜、またグレイド VII は障害部位の面積が 51 mm² 以上である胃粘膜とした。

胃粘膜は摘出した胃からハサミで切り離し、LPO、SOD、カタラーゼ、Se-GSH-px、XOD および MPO の測定に用いた。LPO の測定には、冷 20 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で 10 % ホモジネートとした胃粘膜組織を用いた。SOD、カタラーゼ、Se-GSH-px および MPO 活性の測定には、冷 50 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で胃粘膜組織を 10 % ホモジネートとし、それを 4°C で遠心分離 (10,000×g, 20 分) して得られた上清を同緩衝液に対して 4°C で 24 時間透析を行って調製した試料を用いた。また、XOD 活性の測定には、冷 0.25 M シュクロースで胃粘膜組織を 10 % ホモジネートとし、それを 4°C で遠心 (10,000×g, 20 分) して得られた上清を同溶液に対して 4°C で 24 時間透析を行って調製した試料を用いた。

LPO の測定は Ohkawa ら¹⁰⁾ の TBA 法で行い、その量はマロンジアルデヒド (MDA) 量として表した。

SOD 活性の測定は、Oyanagui¹¹⁾ の XOD-亜硝酸法で

行った。その活性は、37°C における胃粘膜試料の O₂⁻ 消去活性に相当する牛赤血球 SOD の量として表した。

CAT 活性の測定は、Bergmeyer¹²⁾ の方法で行った。その活性は、37°C において 1 分間に 1 μmole の H₂O₂ を分解する酵素量を 1 単位 (U) として表した。

Se-GSH-px 活性の測定は、Hochstein & Utely¹³⁾ の方法で行った。その活性は、37°C での H₂O₂ の分解に伴うグルタチオンの還元型から酸化型への変化をグルタチオン還元酵素を介する NADPH の酸化により調べ、1 分間に 1 μmole の NADP⁺ を生成する酵素量を 1 単位 (U) として表した。

MPO 活性の測定は、Suzuki ら¹⁴⁾ の方法で行った。その活性は、37°C において 1 分間に TMB が酸化されて生ずる生成物の 655 nm における吸光度を 1.0 だけ増加させる酵素量を 1 単位 (U) として表した。

XOD 活性は Hashimoto¹⁵⁾ の方法で測定し、キサンチンを基質として用いた。本酵素活性は、30°C において 1 分間に 1 μmole の尿素を生成する酵素量を 1 単位 (U) として表した。

なお、測定した全ての酵素活性は組織 1 g 当たりで表した。

In vitro における XOD と MPO 活性に対する各漢方薬原末エキスの影響に関する実験は、上述の両酵素活性の測定法を用いて行った。両酵素活性の測定には、compound 48/80 投与後 3 時間のラット胃粘膜組織から上述の方法で調製した酵素溶液を用いた。

In vitro における SOD、CAT および Se-GSH-px の活性に対する OGT エキスの影響に関する実験は、上述のこれらの酵素活性の測定法を用いて行った。これらの酵素活性の測定には、compound 48/80 非投与ラットの胃粘膜組織からの上述の方法で調製した酵素溶液を用いた。OGT エキス添加時の SOD 活性は、その O₂⁻ 消去活性から反応系に添加した OGT エキスによる O₂⁻ 消去活性を差し引いてもとめた。なお用いた濃度の OGT エキスは、各酵素活性の測定系そのものには影響しなかった。

In vitro での各漢方薬原末エキスの O₂⁻ 消去活性の測定は、Forman & Fridovich¹⁶⁾ のキサンチン-XOD 系で生成する O₂⁻ による Cyt. c の還元に対する阻害を調べる方法で行った。O₂⁻ の測定は、1.0 mM EDTA、0.1 mM キサンチン、20 mU の XOD、10 μM Cyt. c および 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) より成る反応系 (全量 1.0 ml) を用い、25°C での O₂⁻ による Cyt. c の還元を 550 nm における吸光度の 1 分間当たりの増加によって調べる方法で行った。用いた濃度の漢方薬原末エキ스는、本測定に用いた牛赤血球 XOD の活性を阻害しなかった。

In vitro での各漢方薬原末エキスの・OH 消去活性は、Halliwell ら¹⁷⁾ の Fe^{2+} -EDTA と H_2O_2 との反応で生成する・OH によってデオキシリボースが分解されて生ずる MDA を TBA 法で調べる方法で行った。・OH の測定は、1.42 mM H_2O_2 、20 μM FeCl_3 、0.1 mM EDTA、0.1 mM アスコルビン酸および 1.0 mM デオキシリボースおよび 10 mM KH_2PO_4 -KOH 緩衝液 (pH 7.4) より成る反応系 (1.0 ml) を用い、37°C、1 時間の加温で・OH によってデオキシリボースが分解して生ずる MDA を調べる方法で行った。この反応で生成した MDA の測定は、反応溶液 1.0 ml に 0.3 % TBA、1.4 % トリクロール酢酸および 0.1 % ブチルヒドロキシトルエンより成る TBA 溶液 2.0 ml を加え、95°C で 30 分間加熱し、生じた赤色色素を 532 nm において比色定量することによって行った。用いた濃度の漢方薬エキスは、本測定における TBA 反応に影響を与えなかった。

なお *in vitro* における実験に用いた各漢方薬原末エキスは蒸留水で懸濁し、各測定の反応系に添加した。

各群間での胃粘膜障害の有意差の検定は、Mann-Whitney 検定法を用いて行い、危険率 5 % 以下を有意とした。即ち、有意差は各群間で胃粘膜障害度のグレードの順序関係を調べ、その統計量に基づいて検定した。胃粘膜組織の LPO、SOD、CAT、Se-GSH-px、MPO、XOD などの測定値は平均 $\pm$ S.D. で表した。これらの測定での有意差の検定は Student's *t*-test を用いて行い、危険率 5 % 以下を有意とした。また、*in vitro* の実験での結果は 3 回の測定の平均値で表した。

結 果

1. Compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に対する OGT, HST, RT および IT エキス経口投与並びに各種活性酸素消去剤, XOD 阻害剤および鉄キレート剤投与の影響

Compound 48/80 投与後 30 分ではグレード I~III の胃粘膜障害が全体の 80 % を占め、またその投与後 3 時間ではグレード V~VII の胃粘膜障害が全体の 90 % を占め、胃粘膜障害は進行していた (Fig. 1)。この胃粘膜障害の発症がみられる compound 48/80 投与後 30 分に OGT, HST, RT および IT エキスを経口投与し、compound 48/80 投与後 3 時間の時点で胃粘膜障害を調べると、Table I に示す結果が得られた。OGT エキス投与群ではグレード I~III の胃粘膜障害が全体の 82 % を占め、この胃粘膜障害は compound 48/80 投与後 30 分の時点と同程度で、胃粘膜障害の進行はほぼ完全に抑制されていた。また、HST と RT エキス投与群において胃粘膜障害の進行は有意に抑制されていたが、HST エキス投与群ではグレード V 以上の胃粘膜障害が全体の 37 % を占め、また RT エキス投与群ではグレード V 以上の胃粘膜障害が全体の 40 % を占め、両エキスを投与群の胃粘膜障害の進行に対する抑制効果は OGT エキスの場合よりも弱かった。IT 投与群ではグレード V~VII の胃粘膜障害が全体の 50 % を占め、胃粘膜障害の進行に対する有意な抑制効果は認められなかった。本 compound 48/80 惹

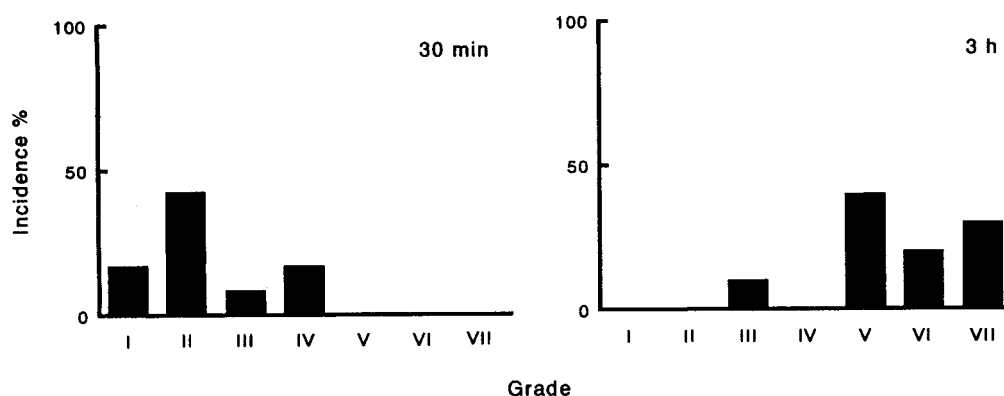


Fig. 1 Gastric mucosal lesions of rats at 30 min and 3 h after compound 48/80 injection. Gastric mucosal lesions were checked 30 min and 3 h after compound 48/80 injection as described in Materials and Methods. The number of rats used was 12-15.

起胃粘膜障害の進行に対する O_2^- を消去する SOD,¹⁸⁾ H_2O_2 を分解するカタラーゼおよび $\cdot OH$ を消去する DMTU¹⁹⁾ などの活性酸素消去剤, XOD 阻害剤である AP²⁰⁾ および鉄キレート剤である DX²¹⁾ の影響について調べると, これらの投与によって胃粘膜障害の進行は有意に抑制された (Table I)。

2. Compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織の LPO 量と Se-GSH-px 活性に及ぼす OGT, HST, RT お

よび IT エキス経口投与の影響

Compound 48/80 投与後 30 分と 3 時間における胃粘膜組織の LPO 量はそれぞれ対照群の 1.14 および 1.84 倍で, compound 48/80 投与により有意に増加していた (Fig. 2A)。この compound 48/80 投与後 3 時間での胃粘膜組織の LPO 量の増加はその投与後 30 分における OGT, HST, RT および IT エキスの経口投与で有意に抑制されたが, その抑制効果は OGT エキスで最も強く,

Table I Effects of oral administration of OGT, HST, RT or IT and treatments of various oxygen radical scavengers, AP (XOD inhibitor), and DX (iron-chelator) on the progression of gastric mucosal lesions in rats with a single compound 48/80 injection.

Group	n	Lesion index (%)							P-value (Vs C48/80)
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
Compound 48/80 (C48/80)	6	0	0	0	40	10	0	50	—
C48/80+OGT	11	18	36	28	9	9	0	0	<0.01
C48/80+HST	11	9	18	0	36	9	28	0	<0.05
C48/80+RT	10	10	20	30	0	20	10	10	<0.05
C48/80+IT	10	10	10	10	20	20	20	10	N.S.
C48/80+SOD	7	0	29	43	28	0	0	0	<0.01
C48/80+CAT	8	0	37	13	50	0	0	0	<0.01
C48/80+DMTU	6	0	0	40	60	0	0	0	<0.05
C48/80+AP	6	0	16	50	34	0	0	0	<0.01
C48/80+DX	8	0	0	37	38	25	0	0	<0.05

N.S., not significant.

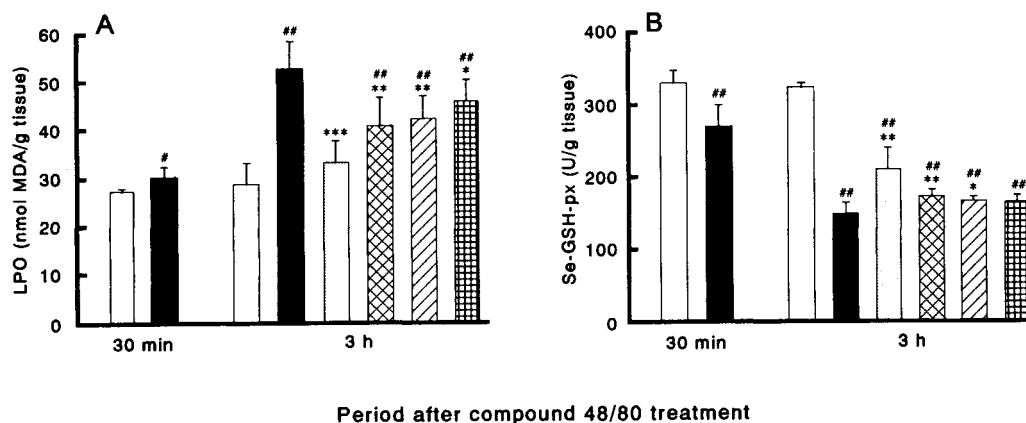


Fig. 2 Effect of post-oral administration of OGT, HST, RT or IT extract on gastric mucosal LPO content (A) and Se-GSH-px activity (B) in rats injected with compound 48/80. OGT, HST, RT or IT extract was administered to rats 30 min after compound 48/80 injection. Gastric mucosal LPO content and Se-GSH-px activity were checked 3 h after the compound 48/80 injection as described in Materials and Methods. □, control group; ■, compound 48/80 injected group; ▨, compound 48/80-injected and OGT extract-treated group; ▩, compound 48/80-injected and HST extract-treated group; ▪, compound 48/80-injected and RT extract-treated group; ▫, compound 48/80-injected and IT extract-treated group. Each value is a mean $\pm$ S.D. (n=5-10). Vs control: #, $p < 0.01$; ##, $p < 0.001$, Vs compound 48/80: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

次いで HST, RT, IT エキスの順であった (Fig. 2A)。また, compound 48/80 投与後 30 分と 3 時間における胃粘膜組織の Se-GSH-px 活性はそれぞれ対照群の 81 および 46% で, compound 48/80 投与によって有意に低下した (Fig. 2B)。この compound 48/80 投与後 3 時間での胃粘膜組織の Se-GSH-px 活性の低下はその投与後 30 分における OGT, HS および RT エキスの経口投与で有意に抑制されたが, IT エキス投与では抑制されなかった (Fig. 2B)。しかも, この酵素活性の低下に対して OGT エキスは最も強い抑制効果を示し, また HST と RT エキス投与でみられたその抑制効果は僅かであった (Fig. 2B)。

3. Compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織の XOD と MPO 活性に及ぼす OGT, HST, RT および IT エキス経口投与の影響

Compound 48/80 投与後 30 分と 3 時間における胃粘膜組織の XOD 活性は, それぞれ対照群の 1.42 および 3.43 倍で, compound 48/80 投与によって有意に上昇していた (Fig. 3A)。この compound 48/80 投与後 3 時間での胃粘膜組織の XOD 活性の上昇はその投与後 30 分での OGT エキスの経口投与によって有意に抑制され, その活性値はほぼ対照群のレベルであった (Fig. 3A)。しかし, compound 48/80 投与後 30 分での HST, RT および IT エキスの経口投与は compound 48/80 投与後 3 時間における胃粘膜組織の XOD 活性の上昇に対して有意な抑制効果を示さなかった (Fig. 3A)。また, compound

48/80 投与後 30 分と 3 時間における胃粘膜組織の MPO 活性は, それぞれ対照群の 1.66 および 2.85 倍で, compound 48/80 投与によって有意に上昇していた (Fig. 3B)。この compound 48/80 投与後 3 時間での MPO 活性の上昇はその投与後 30 分における OGT, HST, RT および IT エキスの経口投与によって有意に抑制され, その抑制効果は OGT エキスで最も強く, 次いで HST, RT, IT エキスの順であった (Fig. 3B)。

4. Compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織の SOD と CAT 活性に及ぼす OGT エキス経口投与の影響

Compound 48/80 投与 3 時間後の胃粘膜組織の SOD と CAT 活性は対照群と同レベルであり, またその投与群と対照群の胃粘膜組織の両酵素活性は OGT エキス経口投与で変動しなかった (Fig. 4)。

5. *In vitro* における OGT, HST, RT および IT エキスの O_2^- と $\cdot OH$ の消去活性

OGT, HST, RT および IT エキスの O_2^- 消去活性をキサンチン-XOD 系で生成する O_2^- による Cyt. c の還元に対する阻害によって調べると, OGT, HST および RT エキスは 0.5 mg/ml までの添加濃度で明らかな O_2^- 消去活性を示し, その活性は OGT エキスが最も強く, 次いで HST, RT の順であったが, IT エキスは 0.5 mg/ml の添加濃度でも O_2^- 消去活性を示さなかった (Fig. 5A)。しかも OGT と HST エキスは, それぞれ 0.25 および 0.5 mg/ml の添加濃度で O_2^- を完全に消去した (Fig. 5A)。また, OGT, HST, RT および IT エ

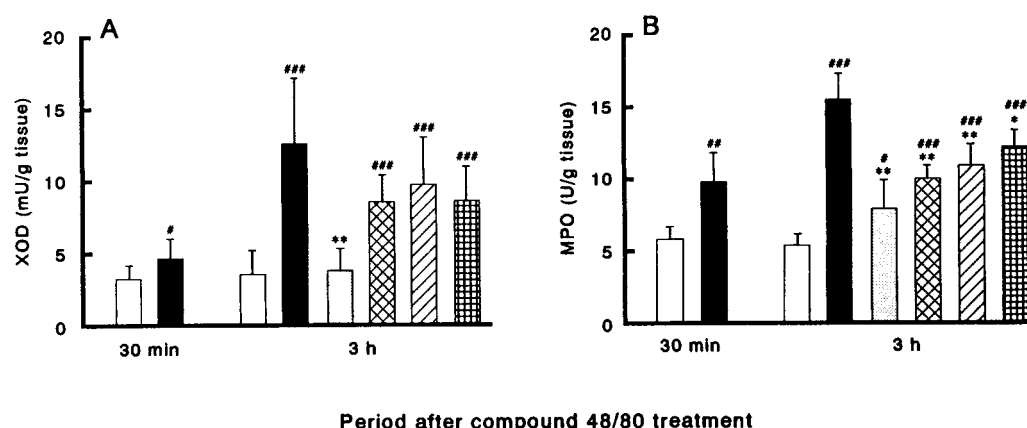


Fig. 3 Effect of post-oral administration of OGT, HST, RT or IT extract on gastric mucosal XOD (A) and MPO (B) activities in rats injected with compound 48/80. OGT, HST, RT or IT extract was administered to rats 30 min after compound 48/80 injection, Gastric mucosal XOD and MPO activities were measured 3 h after the compound 48/80 injection as described in Materials and Methods. □, control group; ■, compound 48/80-injected group; ▨, compound 48/80-injected and OGT-treated group; ▩, compound 48/80-injected and HST extract-treated group; ▪, compound 48/80-injected and RT extract-treated group; ▫, compound 48/80-injected and IT extract-treated group. Each value is a mean $\pm$ S. D. (n=5-10), Vs control: #, $p < 0.01$; ##, $p < 0.001$. Vs compound 48/80: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

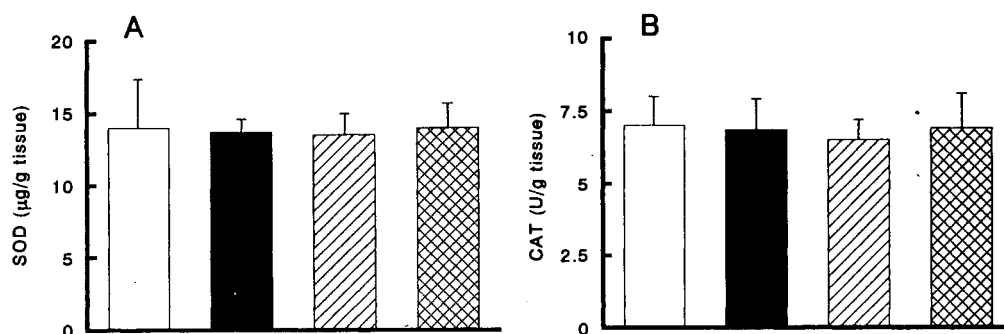


Fig. 4 Effect of post-oral administration of OGT extract on gastric mucosal SOD (A) and CAT (B) activities in rats injected with compound 48/80, OGT extract was administered to rats 30 min after compound 48/80 injection. Gastric mucosal SOD and CAT activities were measured 3 h after the compound 48/80 injection as described in Materials and Methods. □, control group; ■, OGT-treated group; ▨, compound 48/80-injected group; ▩, compound 48/80-injected and OGT-treated group. Each value is a mean $\pm$ S. D. (n=5-10).

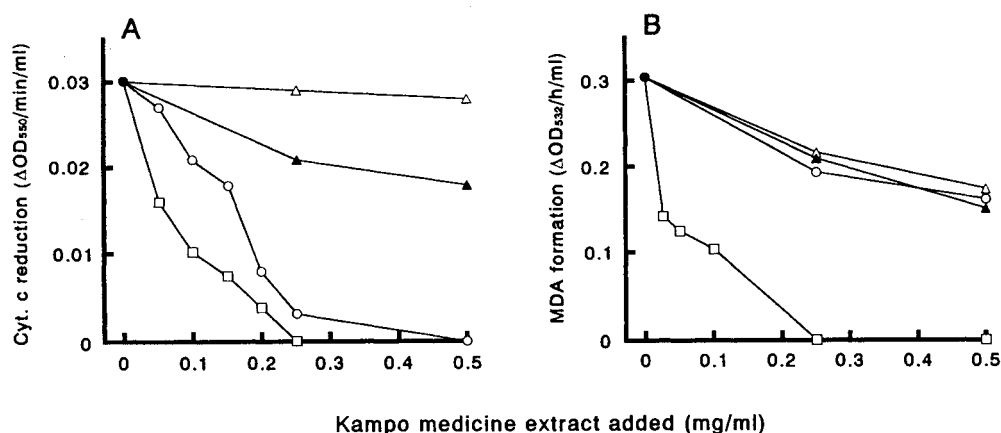


Fig. 5 Activity of OGT, HST, RT or IT extract to scavenge O_2^- (A) and $\cdot OH$ (B) *in vitro*. The activity of OGT, HST, RT or IT extract to scavenge O_2^- and $\cdot OH$ was determined based on their inhibitory effect on Cyt. c reduction via O_2^- generated by the xanthine-XOD system and on MDA formation following deoxyribose degradation via $\cdot OH$ generated in the Fe^{2+} -EDTA- H_2O_2 system, respectively, as described in Materials and Methods. Indicated concentrations of each extract were added to each assay mixture. □, OGT extract; ○, HST extract; ▲, RT extract; △, IT extract. Each value is a mean with three determinations.

キスの $\cdot OH$ 消去活性を Fe^{2+} -EDTA系で生成する $\cdot OH$ によるデオキシリボースの分解に伴うMDAの生成に対する阻害で調べると、Fig. 5Bに示す結果が得られた。OGT, HST, RTおよびITエキスは全て $\cdot OH$ 消去活性を示したが、OGTエキスは0.25 mg/mlの添加濃度で $\cdot OH$ によるデオキシリボースの分解を完全に阻害したのに対し、HST, RTおよびITエキスは共に0.5 mg/mlの添加濃度においても $\cdot OH$ によるデオキシリボースの分解を約40%しか阻害しなかった。なお、本実験での O_2^- によるCyt. cの還元は O_2^- の消去剤であるSOD¹⁸⁾ (10 $\mu g/ml$)の添加で、また $\cdot OH$ によるデオキシリボ-

ースの分解はその消去剤であるDMTU¹⁹⁾ (1.0 mM)の添加で完全に抑制された。

6. *In vitro*における胃粘膜組織のXODとMPO活性に対するOGT, HST, RTおよびITエキスの影響

Compound 48/80投与後3時間のラット胃粘膜組織を用い、その組織のXODとMPO活性に対するOGT, HST, RTおよびITエキス添加の影響を調べると、Fig. 6に示す結果が得られた。OGTエキスは0.1 mg/mlの添加濃度ではXOD活性を阻害しなかったが、それ以上の添加濃度でその活性を阻害したのに対し、HST, RTおよびITエキスは0.5 mg/mlの添加濃度においても

XOD 活性に対する阻害効果を示さなかった (Fig. 6A)。また, OGT, HST, RT および IT エキスは 0.01 mg/ml の添加濃度で全て MPO 活性を阻害し, しかもそれらの阻害効果は添加濃度に依存していた (Fig. 6B)。OGT と HST エキスは MPO 活性を同程度に阻害し, 両エキスの阻害効果は RT や IT エキスよりも強かった (Fig. 6B)。また, RT と IT エキスの MPO 活性に対する阻害効果には差が認められなかった (Fig. 6B)。なお, 本実験での胃粘膜組織の XOD 活性はその阻害剤である AP²⁰⁾ (1.0 mM) の添加で, また胃粘膜組織の MPO 活性はその阻害剤であるアジ化ナトリウム²²⁾ (1.0 mM) の添加で完全に抑制された。

7. *In vitro* における胃粘膜組織の SOD, CAT およ

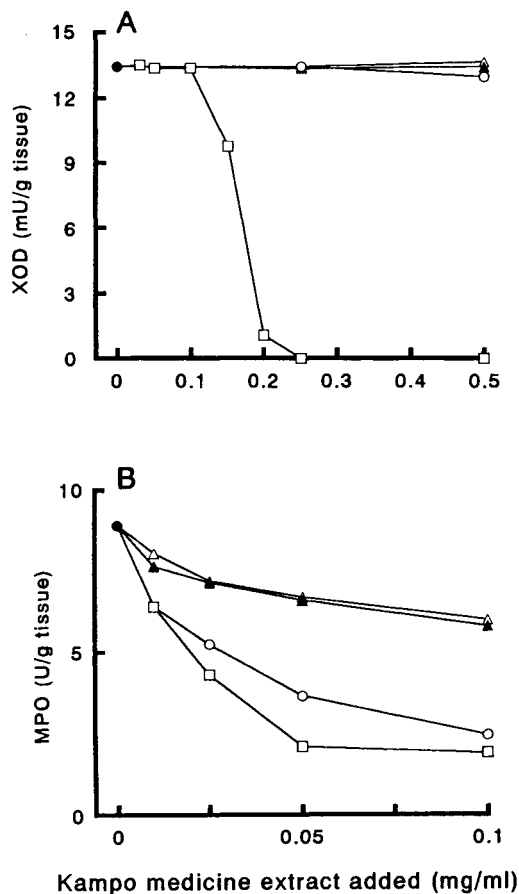


Fig. 6 Effect of OGT, HST, RT or IT extract on *in vitro* XOD (A) and MPO (B) activities in gastric mucosal tissues from rats injected with compound 48/80. Gastric mucosal tissues of rats sacrificed 3 h after compound 48/80 injection were used for XOD and MPO assays as described in Materials and Methods. Indicated concentrations of OGT, HST, RT, and IT extracts were added to each assay mixture. □, OGT extract; ○, HST extract; ▲, RT extract; △, IT extract. Each value is a mean with determinations.

び Se-GSH-px 活性に対する OGT エキスの影響

Compound 48/80 非投与ラットの胃粘膜組織を用い, その組織の SOD, CAT および Se-GST-px 活性に対する OGT エキス添加の影響を調べると, Fig. 7 に示す結果が得られた。OGT エキスを反応系に 10 μ g/ml から 50

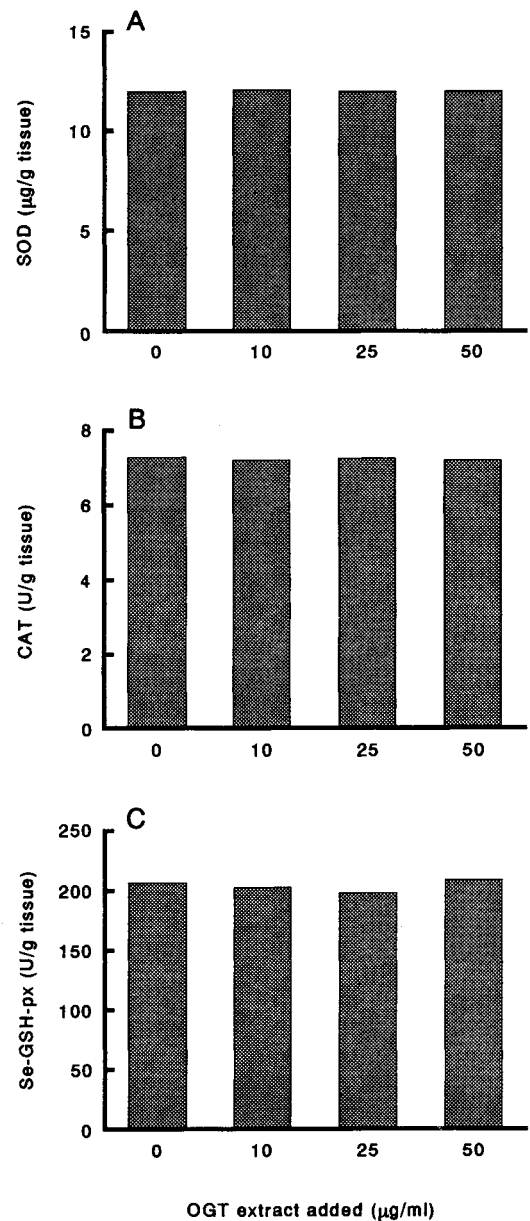


Fig. 7 Effect of OGT extract on *in vitro* SOD (A), CAT (B), and Se-GSH-px (C) activities in gastric mucosal tissues from untreated rats. Gastric mucosal tissues of untreated rats were used for XOD, CAT, and Se-GSH-px assays as described in Materials and Methods. Indicated concentrations of OGT extract were added to each assay mixture. Each value is a mean with three determinations.

$\mu\text{g/ml}$ を添加して胃粘膜組織の SOD, CAT および Se-GSH-px 活性の測定を行っても、これらの酵素活性に変動は認められなかった。

考 察

OGT エキスの compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に対する抑制効果を明確にする目的で、著者らは compound 48/80 を 1 回投与したラットに胃粘膜障害発症後の時点で OGT エキスおよび OGT エキスと共に胃潰瘍や胃炎の治療に用いられている HST, RT, IT などのエキス^{1,2)} についてそれぞれ成人の 1 回投与量の 5 分の 1 に相当する量の経口投与を行い、胃粘膜障害が最も悪化した時点において胃粘膜障害の進行に対する抑制効果を調べた。

Compound 48/80 を 1 回投与したラットでは、その投与後 30 分で軽度な胃粘膜障害が認められ、またその障害は投与後 3 時間で悪化しており、既報^{3,9)} で示したと同様な胃粘膜障害の進行がみられた。この胃粘膜障害の進行は既報³⁾ で示したと同様に OGT エキス経口投与によって抑制されたが、OGT エキスばかりでなく、HST と RT エキスの経口投与によっても抑制されることが明らかとなった。しかし、この compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に対して HST と RT エキス投与は OGT エキス投与よりも弱い抑制効果を示した。また、IT エキス投与はこの胃粘膜障害の進行に対する有意な抑制効果を示さなかった。本研究と同量の compound 48/80 を投与したラットでは、肥満細胞から遊出したセロトニン血中レベルはその投与後 30 分で最も高くなり、また血管透過性の亢進はこの時点でみられることが報告されている^{23,24)}。しかも、前報³⁾ において、著者らは OGT エキスを前および同時投与した compound 48/80 投与ラットにおいて、compound 48/80 投与 30 分の時点で胃粘膜障害が抑制されないことを認めている。これらのことから、本研究において compound 48/80 投与 30 分後に経口投与された漢方薬原末エキスは、compound 48/80 投与による肥満細胞からのセロトニンの遊出や血管透過性の亢進を阻害していないと考えられる。

本研究において、既報³⁾ で示したと同様に compound 48/80 投与後 30 分の時点での胃粘膜組織では明らかな LPO の増量、 H_2O_2 と脂質ハイドロパーオキシドの消去酵素である Se-GSH-px⁷⁾ の活性低下および O_2^- と H_2O_2 の生成に関与する XOD⁵⁾ と好中球の指標で、 Cl^- の存在下で H_2O_2 を介して ClO^- の生成に関与する MPO⁶⁾ の活性上昇が認められ、またその投与後 3 時間の胃粘膜組織では LPO の増量、Se-GSH-px の活性低下、

XOD と MPO の活性上昇などの亢進が認められた。胃粘膜組織でのこれらの変動は全て OGT エキス経口投与によって抑制され、既報³⁾ で示したと同様の結果が得られた。この compound 48/80 投与ラット胃粘膜組織における LPO の増量、Se-GSH-px の活性低下および MPO の活性上昇の亢進は、OGT エキス経口投与の場合に比べて弱いが HST, RT および IT エキス経口投与によっても抑制された。また、それらの抑制効果はこれらの 3 種の漢方薬原末エキスのうちでは HST エキスが最も強く、次いで RT エキスで、IT エキスが最も弱かった。しかし、HST, RT および IT エキスの経口投与は、OGT エキス経口投与の場合とは異なり、compound 48/80 投与ラット胃粘膜組織の XOD の活性上昇の亢進に対して有意な抑制効果を示さなかった。これらの結果は、OGT, HST, RT および IT エキスの経口投与による compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に対する抑制効果とよく一致していた。これらのことから、compound 48/80 投与ラットでの胃粘膜障害の進行は、胃粘膜組織において活性化された XOD やその組織に浸潤した好中球を介して生成される O_2^- 、 H_2O_2 などの活性酸素あるいはこれらの生成した活性酸素を介して生成される LPO の関与によることが強く示唆される。また、*in vitro* において Se-GSH-px は H_2O_2 や H_2O_2 と二価金属の Fe^{2+} などの反応 (Fenton 反応) あるいは遷移金属の Fe などの共存下における O_2^- と H_2O_2 との反応 (Haber-Weiss 反応) で生じる $\cdot\text{OH}$ によって失活することが報告されている²⁵⁾ ので、compound 48/80 投与による胃粘膜組織の Se-GSH-px 活性の低下は活性化された XOD や浸潤した好中球を介して生成される O_2^- や $\cdot\text{OH}$ によることが考えられる。しかも本 compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行は、 O_2^- 消去酵素の SOD¹⁸⁾、 H_2O_2 分解酵素の CAT、 $\cdot\text{OH}$ 消去剤の DMTU¹⁹⁾、鉄キレート剤の DX²¹⁾ および XOD 阻害剤の AP²⁰⁾ の投与によって抑制された。これらのことから、compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行には、 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ などの活性酸素と活性化された XOD の関与が強く示唆される。従って、OGT, HST, RT, IT エキスなどの経口投与による compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に対する抑制効果は、それらの活性酸素消去作用や活性酸素生成系に対する阻害作用によると考えられる。

そこで、著者らは OGT, HST, RT および IT エキスについて活性酸素消去活性と活性酸素生成系に対する阻害効果を *in vitro* において比較検討した。既に著者ら⁸⁾ は OGT, HST, RT および IT エキスに関して、*in vitro* でのラット胃粘膜組織のフリーラジカル惹起脂質過酸化反応に対する抑制効果を調べ、OGT エキスが最も強い

抑制効果を示し、次いで HST エキスで、IT エキスが最も弱い抑制効果を示すことを明らかにしている。また、OGT エキスは *in vitro* において O_2^- 、 $\cdot OH$ などの活性酸素を消去することが知られている⁷⁾ ので、OGT, HST, RT および IT エキスの両活性酸素に対する消去活性を比較検討した。その結果、 O_2^- 消去活性は OGT エキスが最も強く、次いで HST, RT, IT エキスの順であり、また $\cdot OH$ 消去活性は OGT エキスが他の 3 種の漢方薬原末エキスを比べて非常に強いことが明らかとなった。この OGT エキスの O_2^- と $\cdot OH$ の消去作用は、次の 3 つの理由からこのエキスの調製に用いられている生薬の黄芩に含まれているフラボノイドに基づいている可能性が高いと考えられる。1) OGT エキスの調製に用いられている生薬（黄芩、黄連、黄柏、山梔子）のうちで黄芩の量が最も多い (35.5%)。2) 黄芩には抗酸化作用を示すフラボノイドが多く含まれている。²⁶⁾ 3) 黄芩に含まれている主なフラボノイドであるバイカレインは O_2^- と $\cdot OH$ を消去する作用を示すことが知られている。²⁷⁾ また、黄柏の水溶性分画には O_2^- 消去作用を示す成分が存在している²⁸⁾ ので、この成分も OGT エキスの O_2^- 消去作用に関与していると考えられる。一方、OGT, HST, RT および IT エキスの活性酸素生成系に対する阻害に関しては、既に OGT エキスが *in vitro* で compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織の XOD 活性を阻害することが知られている⁹⁾ ので、同様の胃粘膜組織を用いてこれらの漢方薬原末エキスの XOD 活性に対する阻害効果を調べた。その結果、XOD 活性に対する阻害効果は HST, RT, IT などのエキスでは認められなかった。また、OGT エキスは compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織の MPO 活性を *in vitro* で阻害することが知られている。³⁾ しかも、MPO は好中球によって促進される脂質過酸化反応に関与していることが示唆されている²⁹⁾ ので、compound 48/80 投与ラットの胃粘膜組織を用い、*in vitro* で OGT, HST, RT および IT エキスの MPO 活性に対する阻害効果を調べた。その結果、これらの漢方薬原末エキスは全て MPO 活性を阻害し、しかも HST エキスは OGT エキスと同程度の阻害効果を、また両エキスは RT や IT エキスよりも強い阻害効果を示した。このように、OGT, HST, RT および IT エキスの *in vitro* での活性酸素消去活性と活性酸素生成系に対する阻害および既報⁸⁾ の *in vitro* でのラット胃粘膜組織のフリーラジカル惹起脂質過酸化反応に対する抑制効果は、これらの漢方薬原末エキスの compound 48/80 投与ラットの胃粘膜障害の進行および胃粘膜組織の LPO 量と Se-GSH-px, XOD, MPO などの活性の変動に対する抑制効果とよく一致していた。なお、OGT エキスはその

経口投与で compound 48/80 投与および非投与ラットの胃粘膜組織の SOD と CAT 活性に影響を示さず、また *in vitro* でのラット胃粘膜組織の SOD, CAT および Se-GSH-px 活性にも影響しなかった。

以上のことより、compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に対する OGT エキスの経口投与による抑制効果は、既報³⁾ で述べたようにそのエキスの O_2^- 、 $\cdot OH$ などの活性酸素を消去する作用並びに活性化された XOD と浸潤した好中球による活性酸素の生成および脂質過酸化の亢進を阻害する作用に基づいていることが一層強く示唆された。特に、このエキスの胃粘膜障害の進行に対する抑制には $\cdot OH$ 消去作用と XOD 阻害作用が深く関わっていることが示唆された。また、HST や RT エキスは経口投与で compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行を抑制するが、両エキスの胃粘膜障害の進行に対する抑制効果は OGT エキスよりも弱く、しかも XOD 阻害作用を示さないことが明らかとなった。しかし、両エキスは OGT エキスに比べて弱い活性酸素消去作用や MPO 阻害作用を示し、また胃粘膜防御因子として重要な粘液を保持する作用を示すことが知られている。^{30, 31)} 従って、両エキスは活性酸素消去作用や MPO 阻害作用と共に、粘液保持作用により compound 48/80 惹起胃粘膜障害の進行に対して抑制効果を示している可能性が考えられる。

結 論

1 回の compound 48/80 投与ラットでの胃粘膜障害の進行に対する OGT エキス経口投与による抑制効果を HST, RT および IT エキスの経口投与の場合と比較検討し、OGT エキスは他の漢方薬原末エキスよりも強い抑制効果を有し、また IT エキスは有意な抑制効果を示さないことが明らかとなった。しかも、この胃粘膜障害の進行に伴ってみられる胃粘膜組織の LPO の増量、Se-GSH-px の活性低下、MPO の活性上昇などの亢進に対する抑制効果は OGT エキス投与で最も強く、次いで HST, RT, IT エキス投与の順であったが、この胃粘膜障害に伴う胃粘膜組織の XOD の活性上昇の亢進は OGT エキス投与でのみ抑制された。*In vitro* で OGT, HST, RT および IT エキスの O_2^- と $\cdot OH$ の消去活性を調べた結果、 O_2^- 消去活性は OGT エキスが最も強く、次いで HST, RT, IT エキスの順であったが、 $\cdot OH$ 消去活性は OGT エキスが他の漢方薬原末エキスを比べて非常に強かった。*In vitro* で OGT, HST, RT および IT エキスのラット胃粘膜組織の XOD と MPO 活性に対する阻害を調べると、XOD 活性は OGT エキスでのみ阻害

されたのに対し、MPO 活性は OGT と HST エキスで同程度に阻害され、しかも両エキスの阻害効果は RT や IT エキスよりも強かった。また、OGT エキスは *in vitro* と *in vivo* においてラット胃粘膜組織の SOD と CAT 活性に対して影響を示さなかった。これらの結果から、compound 48/80 投与ラットでの胃粘膜障害の進行に対する OGT エキス経口投与による抑制は、このエキスの XOD 阻害作用、脂質過酸化抑制作用、MPO 阻害作用、活性酸素消去作用などに基づいていることが強く示唆された。

References

- 1) Kikutani, T.: Treatment of upper gastrointestinal disease by ethical Kampo drugs, applied to health insurance system. *Gendai Toyo Igaku* **10**, 48-54, 1989.
- 2) Satoh, H.: Chinese herbs and Kampo prescriptions used for treatment of gastro-intestinal diseases. *Igaku no Ayumi* **167**, 723-727, 1993.
- 3) Kobayashi, T., Otsuji, K., Ohta, Y., Nagata, M. and Ishiguro, I.: Preventive action of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) extract on compound 48/80-induced gastric mucosal lesions. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **10**, 222-230, 1993.
- 4) Lawrence, R.A. and Burk, R.F.: Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 952-958, 1976.
- 5) Porras, A. G., Olson, J. S. and Palmer, G.: The reaction of reduced xanthine oxidase with oxygen. Kinetics of peroxide and superoxide formation. *J. Biol. Chem.* **256**, 9096-9103, 1981.
- 6) Krawitz, J. E., Sharon, P. and Stenson, W. F.: Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* **87**, 1344-1350, 1984.
- 7) Yoshikawa, T., Takahashi, S., Naito, Y., Tanigawa, T., Ueda, S., Oyamada, H., Sugino, S. and Kondo, M.: Influences of traditional Chinese medicines on oxygen-derived free radicals. *Igaku no Ayumi* **152**, 741-742, 1990.
- 8) Kobayashi, T., Otsuji, K., Ohta, Y., Nagata, M. and Ishiguro, I.: Preventive effect of Oren-gedoku-to extract on *in vitro* lipid peroxidation in rat gastric mucosal tissues. *Igaku to Seibutsugaku* **126**, 61-65, 1993.
- 9) Otsuji, K., Kobayashi, T., Ohta, Y., Shinohara, R., Nagata, M. and Ishiguro, I.: Effect of the timing of oral administration of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) extract on its preventive action on compound 48/80-induced gastric mucosal lesions. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **9**, 229-235, 1992.
- 10) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358, 1979.
- 11) Oyanagui, Y.: Re-evaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **142**, 290-296, 1984.
- 12) Bergmeyer, H. U.: Zur Messung von Katalase - Aktivitäten. *Biochem. Z.* **327**, 255-258, 1955.
- 13) Hochstein, P. and Utley, H.: Hydrogen peroxide detoxication by glutathione peroxidase and catalase in rat liver homogenates. *Mol. Pharmacol.* **4**, 574-579, 1968.
- 14) Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T. and Fujikura, T.: Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.* **132**, 345-352, 1983.
- 15) Hashimoto, S.: A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Anal. Biochem.* **62**, 426-435, 1974.
- 16) Forman, H. J. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase: A comparison of rate constants. *Arch. Biochem. Biophys.* **158**, 396-400, 1973.
- 17) Halliwell, B., Gutteridge, M. C. and Aruoma, O. I.: The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* **165**, 215-219, 1987.
- 18) McCord, J. M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase. An enzymatic function of erythrocyte perin (hemocuperin). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055, 1969.
- 19) Fox, R. B.: Prevention of granulocyte-mediated oxidant lung injury in rats by a hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea. *J. Clin. Invest.* **74**, 1456-1464, 1984.
- 20) Massey, V., Komai, H. and Palmer, G.: On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines. *J. Biol. Chem.* **245**, 2837-2844, 1970.
- 21) Moeschlin, S. and Schnider, U.: Treatment of primary and secondary hemochromatosis and acute iron poisoning with a new potent iron-eliminating agent (desferrioxamine-B). *New Eng. J. Med.* **269**, 57-66, 1963.
- 22) Odajima, T. and Yamazaki, I.: Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood. IV. Some physicochemical properties. *Biochim. Biophys. Acta* **284**, 360-367, 1972.
- 23) Takeuchi, K., Ohtsuki, H. and Okabe, S.: Pathogenesis of compound 48/80-induced gastric lesions in rats. *Dig. Dis. Sci.* **31**, 392-400, 1986.
- 24) Takeuchi, K., Furukawa, O. and Nishiwaki, H.: Compound 48/80 jakki inenmaku sonsho. In "Jikken Kaiyo" (Eds. S. Nakazawa and M. Moriga), Igakutosho Shuppan, Tokyo, pp. 91-104, 1987.
- 25) Pigeolet, E., Corbister, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiles, C., Rase, M., Zachary, M.-D. and Remacle, J.: Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* **51**, 283-297, 1990.
- 26) Miyahara, M., Ohtaka, H., Katayama, H., Tatsumi, Y., Miyaichi, Y. and Tomimori, T.: Structure - activity relationship of flavonoids in suppressing rat liver lipid peroxidation. *Yakugaku Zasshi* **113**, 133-154, 1993.
- 27) Hamada, H., Niramatsu, M., Edamatsu, R. and Mori, A.: Free radical scavenging action of Baicalein. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 261-266, 1993.
- 28) Uchiyama, T., Kawakami, H. and Ogita, Z.: Anti-inflammatory effect of extract from Phellodendri Cortex. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **6**, 158-164, 1989.
- 29) Stelmaznska, T., Kukovetz, E., Egger, G. and Schaur, R. J.: Possible involvement of myeloperoxidase in lipid peroxidation. *Int. J. Biochem.* **24**, 121-128, 1992.
- 30) Ogata, Y., Ishihara, K., Komura, Y., Goso, Y., Kojima, Y., Ichikawa, T., Saigen, K. and Hotta, K.: Ratto etanoru kaiyo ni tomonau ineneki ryo hendo ni taisuru rikunshi-to no kouka. *Shindan to Chiryo* **80**, 1257-1261, 1992.
- 31) Ogata, Y., Ishihara, K., Goso, Y., Ichikawa, T., Saigen, K. and Hotta, K.: Effect of Hange-shashin-to (a traditional herbal medicine) on gastric mucin in relation with ethanol-induced injury in rats. *Yakuri to Chiryo* **21**, 1747-1751, 1993.