

## 人參養榮湯に関する薬理学的基礎研究 第二報：人參養榮湯長期投与による生体内フリーラジカル および過酸化脂質の動態

江頭 亨\*, 池辺 あや, 井上 美幸, 大山 美雪, 成合美穂子,  
成迫 久美, 田中さおり, 高山 房子, 山中 康光

大分医科大学薬理学教室

### Studies on pharmacological properties of Ninjin-yoei-to Report 2. Effects of long-term treatment with Ninjin-yoei-to on free radicals and lipid peroxidation in mouse

Toru EGASHIRA\*, Aya IKEBE, Miyuki INOUE, Miyuki OHYAMA, Mihoko NARIAI,  
Kumi NARISAKO, Saori TANAKA, Fusako TAKAYAMA and Yasumitsu YAMANAKA

*Department of Pharmacology, Oita Medical University*

*(Received February 22, 1999. Accepted May 6, 1999.)*

#### Abstract

Ninjin-yoei-to was administered to mice orally for 5 weeks, and the effects on free radical and lipid peroxidation were investigated. In this study, we investigated the changes with leukocytes priming and lipid peroxidation by measuring the luminol-enhanced CL. Administration of Ninjin-yoei-to showed suppressive action on CL from leukocytes stimulated PMA. While, it was increased significantly a lipid peroxidation of plasma, brain and liver compared with that of control.

The effects of Ninjin-yoei-to at concentration of 1 to 0.001 mg/ml on CL from leukocytes stimulated PMA and lipid peroxidation of mouse plasma, brain and liver homogenate were investigated, in vitro. The CL from leukocytes stimulated PMA and lipid peroxidation of mouse plasma, brain homogenate were inhibited by the addition of Ninjin-yoei-to, the suppressive effect was also dependent on the concentration. These results suggest that the suppressive effect on the CL from leukocytes stimulated PMA by Ninjin-yoei-to is at least in part due to its radical trapping action and inhibition of superoxide production.

**Key words** Ninjin-yoei-to (Ren-Shen-Yang-Rong-Tang), Free radical, Lipid peroxidation,  $O_2^-$ , Chemiluminescence.

**Abbreviations** t-BuOOH, tert-butylhydroperoxide; HBSS, Hank's balanced salt solution- $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  free; PMA, phorbol myristate acetate; CL, Chemiluminescence;  $O_2^-$ , superoxide;  $\cdot OH$ , hydroxyl radical.

\*〒879-5593 大分県大分郡挾間町医大が丘1-1  
1-1, Idaigaoka, Hasama-machi, Oita 879-5593, Japan

## 結 言

近年、種々の疾患の病因の一つとして活性酸素種やフリーラジカルが関与していると考えられているが、生体には活性酸素種やフリーラジカルを消去し、また、それから派生する過酸化脂質反応を抑制する種々のシステムが備わっており、酸化ストレスから生体を保護している。これら抗酸化システムと同じか類似の作用を有する薬物を用いて、生体の抗酸化能を強化し、疾病の予防・治療の可能性が進められている。その一つの可能性として漢方薬が検討され、漢方薬にもこれらラジカルに対する消去作用や産生抑制作用を有するとの報告が多くなされている。漢方製剤のうち靈黄参<sup>1)</sup>、四逆散<sup>2)</sup>、統命湯<sup>3)</sup>および小柴胡湯合桂枝加芍薬湯<sup>4)</sup>等はその作用が強いとの報告があるが、その製剤に混合されている生薬のうち牛黄に含まれるビリルビン<sup>1)</sup>、大黄、芍薬に含まれるタンニン<sup>5)</sup>また、黄芩、甘草、麻黄に含まれるフラボノイド<sup>6)</sup>は強いラジカル消去作用を有している。また、これら生薬に含まれるフラボノイド<sup>7)</sup>、グリチルリチン<sup>8)</sup>およびサイコサポニン<sup>9)</sup>は活性酸素産生を抑制する成分として知られている。漢方薬はこの両作用により過酸化脂質反応を抑制し、酸化ストレスから生体を保護しているものと思われる。

今回用いた人參養榮湯 (TJ-108) は、*in vitro* で  $O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 、DPPH ラジカルや脳や肝臓を *t*-BuOOH で刺激したときに発生するフリーラジカルを消去する作用を示す<sup>10)</sup>ことから、人參養榮湯の長期投与で、生体内フリーラジカルや脂質過酸化反応を抑制する可能性が考えられる。そこで、今回、人參養榮湯をマウスに長期投与し、フリーラジカルや脂質過酸化物の動態について *in vivo* および *in vitro* で検討した。

## 材料と方法

(1) 試料：人參養榮湯エキス (TJ-108) は株式会社ツムラから供与された。人參養榮湯の乾燥粉末エキスは12種の生薬を精製水により加熱抽出し、スプレー・ドライ法により乾燥エキスとしたものである。乾燥エキスの構成生薬は、黄耆 1.5 g、遠志 2.0 g、甘草 1.0 g、桂皮 2.5 g、五味子 1.0 g、地黄 4.0 g、芍薬 2.0 g、白朮 4.0 g、陳皮 2.0 g、当帰 4.0 g、人參 3.0 g および茯苓 4.0 g である。本実験において人參養榮湯は 1 mM リン酸緩衝液、pH7.4 で溶解・懸濁、希釈して用いた。

(2) 試薬：HBSS (ギブコ社)、PMA、*t*-BuOOH (以上シグマ社)、luminol (和光純薬)。その他特記ないものに

については市販の特級試薬を各々用いた。

(3) 動物および漢方薬投与：実験動物として ddY 系雄性マウス (7 週齢, 32.5-33.5 g) を餌および水は自由に摂取させ、室温  $22 \pm 2^\circ C$ 、湿度  $50 \pm 5\%$ 、照明 6~18 時で 5 週間飼育した。1 群 5 匹とし、対照としてオリエンタル酵母 MF を飼料とした通常食餌群と人參養榮湯を 0.5 % 含有したオリエンタル酵母 MF を飼料とした人參養榮湯混餌群を作製した。

(4) 化学発光 (chemiluminescence, CL) 測定：過酸化脂質は準安定な化合物であることから、*t*-BuOOH などのラジカル種の添加により誘発される連鎖反応で活性酸素種を生ずる。また、活性酸素種によりルミノールが酸化され生成する励起アミノフタロイルが発光する。そこで、フォトンカウンター (LB953 ベルトールド社) でこのルミノール酸化発光による化学発光 (CL) 量を測定することで、試料中の活性酸素種の産生量および過酸化脂質のトータル量の評価を行った。

### 4-1) 白血球活性酸素産生能<sup>11)</sup>

全血および試薬の希釈にはすべて HBSS を用いた。マウスの新鮮血 20  $\mu l$  に HBSS 980  $\mu l$  を加え 50 倍希釈全血試料とし、ただちに活性酸素産生能測定を行なった。専用 tube 中に 50 倍希釈全血試料 150  $\mu l$ 、300  $\mu g/ml$  ルミノール 30  $\mu l$  および HBSS 20  $\mu l$  を取り、 $37^\circ C$  で 5 min プレインキュベート後、0.075  $\mu g/ml$  PMA 100  $\mu l$  を添加した。プレインキュベートの間および PMA 添加直後から 60 min 後まで CL をカウントした。PMA 添加後の発光値から添加前の値を差し引くことにより真の発光値を求め、これを積算して白血球からの活性酸素発生量として CL counts/60min/tube として数値で表した。

### 4-2) 血漿中脂質過酸化<sup>11)</sup>

血漿および試薬の希釈にはすべて 120 mM KCl-30 mM リン酸緩衝液、pH7.4 を用いた。マウスの新鮮血 100  $\mu l$  に 120 mM KCl-30 mM リン酸緩衝液、900  $\mu l$  を加え、20 min 放置後遠心分離 (2,000 rpm, 20 min) し、上清を測定用血漿試薬とした。専用 tube 中に血漿試料 200  $\mu l$ 、300  $\mu g/ml$  のルミノール 10  $\mu l$  をとり、 $37^\circ C$  で 5 min プレインキュベート後、1 mM *t*-BuOOH (100  $\mu l$ ) を添加した。プレインキュベートの間および *t*-BuOOH 添加直後から 60 min 後まで CL をカウントした。*t*-BuOOH 添加後の発光値から添加前の値を差し引くことにより真の発光値を求め、これを積算して試料中の脂質過酸化を数値化し、CL counts/60 min/tube で表記した。

### 4-3) 脳および肝組織中脂質過酸化<sup>11)</sup>

50 mg 肝および脳湿重量/ml 120 mM KCl-30 mM リン酸緩衝液のホモジェネートをテフロンホモジェナイザーで調整後、遠心分離 (600 g, 20 min) し、得られた上

清 (200  $\mu$ l) をそれぞれ測定試料とした。測定条件は血漿試料と同じ方法で行なった。30 min 間の積算値を試料蛋白量で補正した値 (CL counts/30 min/mg protein) を脂質過酸化量として表記した。

(5) 蛋白量測定：脳および肝ホモジェネート上清の蛋白量は Lowry らの方法<sup>12)</sup>で測定した。

(6) 統計処理：それぞれの測定結果は平均値 $\pm$ 標準偏差 (mean $\pm$ S.D.) で示し、各群間の平均値の有意差検定は Student's *t*-test により行ない、危険率 5% 未満を有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 人參養榮湯投与による体重変化

オリエンタル酵母 MF を飼料とした通常食餌群と人參養榮湯を 0.5% 含有したオリエンタル酵母 MF を飼料とした人參養榮湯混餌群のマウスの体重変化を 5 週間測定した (Fig. 1)。1 週目までは通常食餌群と人參養榮湯混餌群ともに体重の増加が見られたが、両群間では体重の差は見られなかった。2 週目以降も体重の増加が見られたが、通常食餌群の体重増加は軽微であった。一方、人參養榮湯混餌群では 2 週目以降も体重の増加がみられた。しかし、通常食餌群と人參養榮湯混餌群間での体重の増加量には有意差はみられなかった。

### 2. 人參養榮湯長期投与による生体内フリーラジカルの発生および過酸化脂質含量の変動

#### 2-1) PMA 刺激による活性酸素産生能

新鮮血を試料とし、PMA 刺激による活性酸素産生能をルミノールの酸化発光量から測定した。通常食餌群では、5 週間をとおして、 $2.2 \times 10^5$  counts/30 min/tube 前

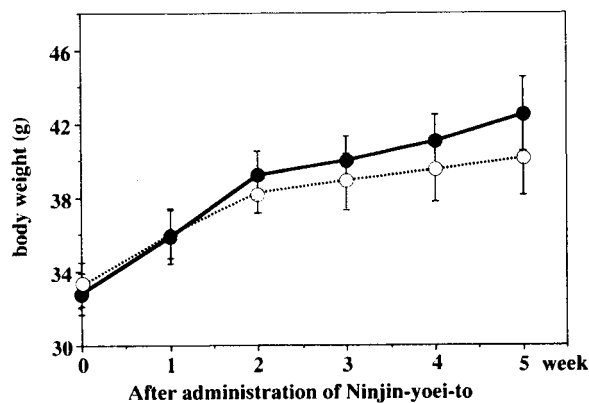


Fig. 1 Effect of Ninjin-yoei-to on body weight of mouse. Ninjin-yoei-to was administered for 5 weeks per oral.  $\circ$  : control,  $\bullet$  : Ninjin-yoei-to

後を示し著明な変動は見られなかった。一方、人參養榮湯混餌群では、投与 1 週目で対照群に比べ活性酸素産生能は有意に減少し、この低下は 5 週目まで持続した (Fig. 2)。

#### 2-2) t-BuOOH 刺激による血漿の過酸化脂質

通常食餌群の血漿中の化学発光量は、飼育期間中に漸次増加して行った。一方、人參養榮湯混餌群でも、同様に飼育期間中に漸次増加したが、投与 1 週目ですでに対照群に比べ増加しており、各週の値は通常食餌群の値に比較して有意に増加していた (Fig. 3)。すなわち、血漿中

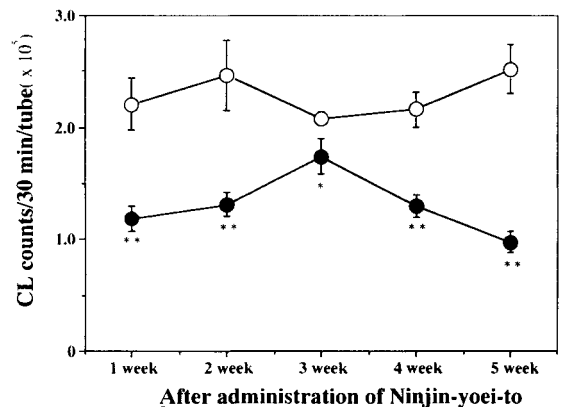


Fig. 2 Effect of Ninjin-yoei-to administration on PMA stimulated chemiluminescence in leukocytes in the blood sample.

Ninjin-yoei-to was administered for 5 weeks per oral.

$\circ$  : control,  $\bullet$  : Ninjin-yoei-to

\* $p < 0.05$  vs control, \*\* $p < 0.01$  vs control

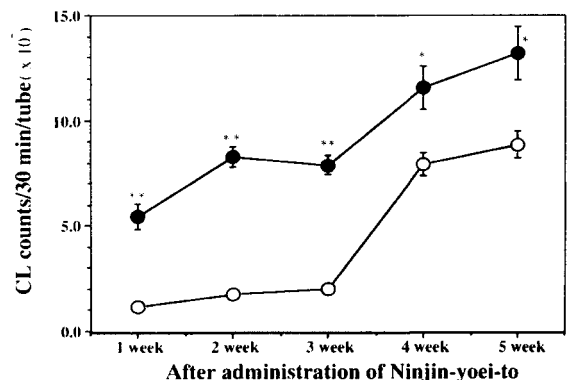


Fig. 3 Effect of Ninjin-yoei-to administration on t-BuOOH stimulated chemiluminescence in plasma.

Ninjin-yoei-to was administered for 5 weeks per oral.

$\circ$  : control,  $\bullet$  : Ninjin-yoei-to

\* $p < 0.05$  vs control, \*\* $p < 0.01$  vs control

の過酸化脂質量は通常食餌群に比べて人參養榮湯で増加していた。

### 2-3) t-BuOOH 刺激による脳組織中の過酸化脂質

通常食餌群の脳ホモジェネートでは、5週間をとおして、 $5.0 \times 10^7$  counts/30 min/mg protein 前後の化学発光値を示し著明な変動は見られなかった。一方、人參養榮湯混餌群では、人參養榮湯の投与期間中、化学発光の増加傾向が見られ、特に2週および4週目では対照群に比べ有意に増加していた (Fig. 4)。すなわち、人參養榮湯の投与期間中は脳組織の過酸化脂質量は通常食餌群に比べて増加していた。

### 2-4) t-BuOOH 刺激による肝組織中の過酸化脂質

脳の過酸化脂質の場合と同様に、通常食餌群の肝ホモジェネートでは、5週間をとおして、 $4.0 \times 10^6$  counts/30 min/mg protein 前後の化学発光値を示したが著明な変動は見られなかった。一方、人參養榮湯混餌群では、投与1週目で対照群に比べ有意に増加し、5週間を通して通常食餌群に比較して化学発光値の著明な増加が見られ、肝組織の過酸化脂質量は通常食餌群に比べて増加していた (Fig. 5)。

## 3. 活性酸素産生能および脂質過酸化に対する人參養榮湯の効果 (in vitro)

### 3-1) PMA 刺激によるマウス血中の活性酸素産生に対する人參養榮湯の効果

Fig. 6 (left) に全血を PMA で刺激した場合の典型的な化学発光検出のパターンを示した。この全血に種々濃度の人參養榮湯を加え、同様に PMA で刺激した場合、

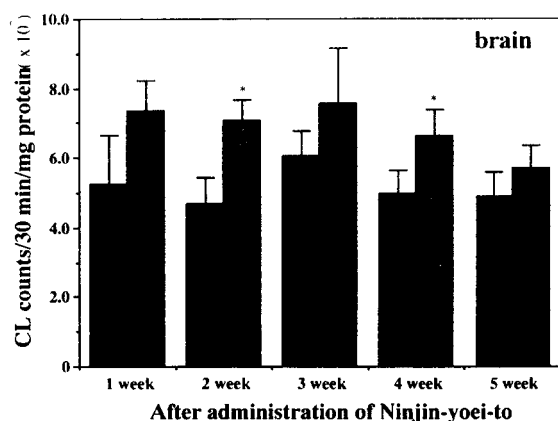


Fig. 4 Effect of Ninjin-yoei-to on the levels of lipid peroxide in homogenate in mouse brain.

Ninjin-yoei-to was administered for 5 weeks per oral. The levels of lipid peroxide was expressed as the t-BuOOH stimulated chemiluminescence values.

■ : control, ▨ : Ninjin-yoei-to

\* $p < 0.05$  vs control

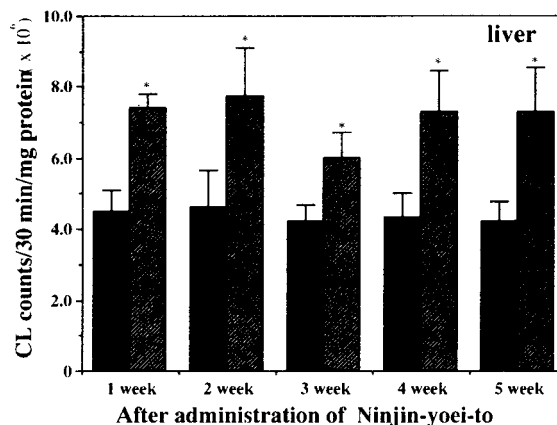


Fig. 5 Effect of Ninjin-yoei-to on the levels of lipid peroxide in homogenate in mouse liver.

Ninjin-yoei-to was administered for 5 weeks per oral. The levels of lipid peroxide was expressed as the t-BuOOH stimulated chemiluminescence values.

■ : control, ▨ : Ninjin-yoei-to

\* $p < 0.05$  vs control

0.1mg/ml より高濃度で化学発光の抑制がみられ、1 mg/ml 添加では約 50 % の抑制であった。

### 3-2) t-BuOOH 刺激によるマウス血漿中の脂質過酸化に対する人參養榮湯の効果

血漿を t-BuOOH で刺激した場合の典型的な化学発光検出のパターンを Fig. 6 (right) に示した。この血漿に 0.001~1 mg/ml 濃度の人參養榮湯を加え、同様に t-BuOOH で刺激した場合、0.01 mg/ml 濃度の人參養榮湯でもわずかな化学発光の抑制がみられたが、0.1 mg/ml 濃度で約 80 % の、1 mg/ml 濃度でほとんど完全な抑制が見られた。

### 3-3) t-BuOOH 刺激によるマウス脳ホモジェネートの脂質過酸化に対する人參養榮湯の効果

脳組織のホモジェネートの上清を t-BuOOH で刺激すると、Fig. 7 (left) に見られるような著明な化学発光がみられた。この脳組織のホモジェネートの上清に人參養榮湯を加え同様に t-BuOOH で刺激すると、その発光は加えた人參養榮湯の濃度に依存して抑制が見られ (0.001~1 mg/ml)、人參養榮湯 1 mg/ml では 90 % 以上の抑制が見られた。

### 3-4) t-BuOOH 刺激によるマウス肝ホモジェネートの脂質過酸化に対する人參養榮湯の効果

肝組織のホモジェネートの上清を t-BuOOH で刺激すると、Fig. 7 (right) に見られるような化学発光がみられたが、脳組織に比べ低値であった。この肝組織のホモジェネートの上清に人參養榮湯を加え同様に t-BuOOH で刺激すると、その発光は加えた人參養榮湯の 0.001

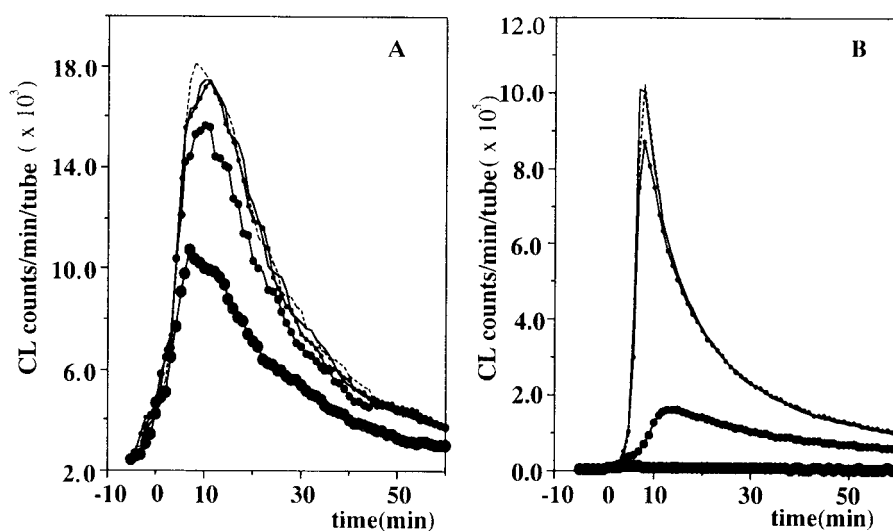


Fig. 6 Effects of Ninjin-yoei-to addition on chemiluminescence in the blood sample.

Left (A): chemiluminescence from leukocytes stimulated by PMA.

Right (B): chemiluminescence from plasma stimulated by t-BuOOH.

----- : no addition, — : 0.001 mg/ml, ---- : 0.01 mg/ml,

—○— : 0.1 mg/ml, —●— : 1 mg/ml

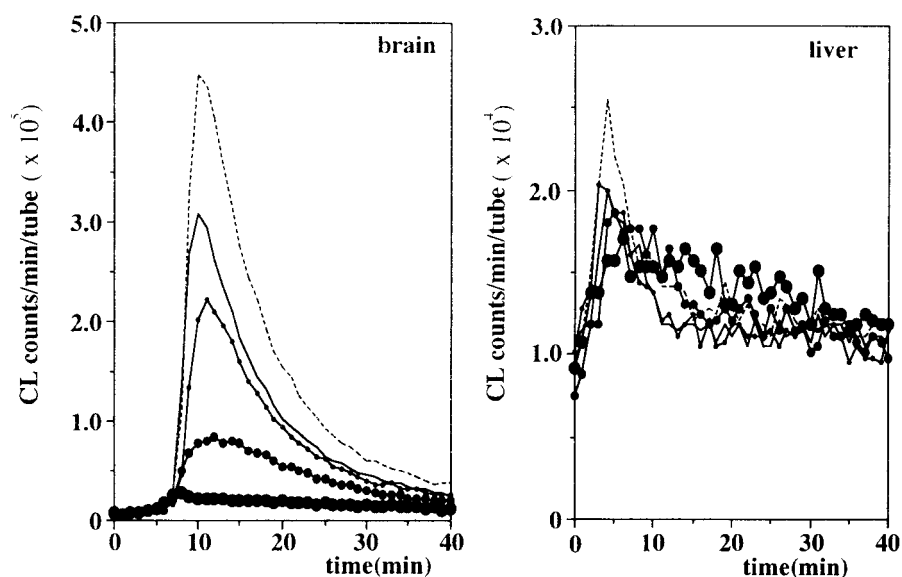


Fig. 7 Effects of Ninjin-yoei-to addition on lipid peroxidation in homogenate of mouse brain and liver.

The result of lipid peroxidation was expressed as the t-BuOOH stimulated chemiluminescence values. Left : brain, Right : liver

----- : no addition, — : 0.001 mg/ml, ---- : 0.01 mg/ml,

—○— : 0.1 mg/ml, —●— : 1 mg/ml

mg/ml 以上の濃度で抑制されたが、濃度依存的ではなく、また、脳組織で見られた様な強い抑制は認められなかった。

## 考 察

マウスに人參養榮湯を5週間連続的に経口投与したところ、血漿、肝臓および脳の脂質過酸化物の含量は有意に増加した。特に血漿の脂質過酸化物は投与期間中増加し続けた。一般に脂質過酸化は多価不飽和脂肪酸を多く含むリン脂質で構成されている生体膜で起こりやすい反応である。脂質過酸化反応は、生体膜障害をきたすなんらかの原因により、まず不飽和脂肪酸から脂質ラジカルが生成され、これが酸素と反応して脂質ペルオキシラジカルとなり、また、これが他の不飽和脂肪酸を攻撃して過酸化脂質となるとともに、新たに脂質ラジカルを生成する。この連鎖反応により膜機能障害が加速度的に生じていくものと考えられている。今回我々は、この過酸化脂質を測定する方法として、t-BuOOH で惹起させる反応を用いた。<sup>11)</sup> 生体の脂質過酸化反応もフリーラジカルにより惹起されることが知られている。そこで、組織や細胞膜中の過酸化物に t-BuOOH を反応させると、 $O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 、 $^1O_2$  および LOOH 由来の  $LOO\cdot$  や  $LO\cdot$  などの活性酸素種が発生することから、この活性酸素種とルミノールとを共存させ化学発光を測定することでその組織や細胞膜の脂質過酸化物の含量すなわち酸化ストレスの状態を把握することができる。一般にラジカル消去および産生抑制作用を持つ漢方薬は過酸化脂質を抑制するとの報告が多い。<sup>13) 16)</sup> しかし、今回脂質過酸化に対する人參養榮湯の効果を検討したところ、in vitro では血漿、肝臓および脳の脂質過酸化を著明に抑制したが、人參養榮湯を長期投与した場合には、血漿、肝臓および脳の過酸化脂質の著明な増加がみられた。この相反する効果の機序は不明であるが、漢方薬の長期投与では、フリーラジカル産生の増加がおこるかもしれない。実際、漢方薬の投与で免疫系の賦活やサイトカインの産生が増強され、このサイトカインによって、食細胞からの  $O_2^-$  産生が増加するとの報告がある。<sup>17) 18)</sup> また、人參養榮湯の構成生薬に含まれるフラボノイド類はアスコルビン酸と同様に鉄や銅などの金属イオンが存在すると過酸化反応を促進させるとの報告もある。<sup>13)</sup> 今回の場合にも人參養榮湯の長期投与で、フリーラジカル産生が増加し、その結果脂質過酸化反応が亢進し、過酸化脂質が増加したとも考えられるが、更なる詳細な検討が必要と思われる。

一方、PMA 刺激による好中球などの白血球から活性酸素種として  $O_2^-$  や  $\cdot OH$  が生成され、それらとルミノール

との酸化発光による化学発光法で活性酸素産生量を測定することが出来る。<sup>11)</sup> この方法を用いて、全血からの活性酸素種の産生能に対する人參養榮湯の長期投与の影響を検討したところ、マウスの全血からの活性酸素種の産生能は、人參養榮湯投与一週目から抑制され、投与期間中も持続した。また、in vitro の実験でも著明に活性酸素種の産生能を抑制した。近年、好中球やマクロファージは NADPH oxidase 系を介して活性酸素を産生し、各種の病態に関与することが報告されているが、漢方薬にはこの活性酸素種の産生能を抑制する成分が存在することが知られている。黄芩・甘草・麻黄・紅花・桑白皮に含まれるフラボノイド<sup>7)</sup>、甘草の主成分であるグリチルリチン<sup>8)</sup>、柴胡の主成分であるサイコサポニン<sup>9)</sup> は好中球やマクロファージからの活性酸素の産生を抑制する作用を持つ。このことは、人參養榮湯投与による全血からの活性酸素種の発生の抑制効果は、人參養榮湯に含まれるフラボノイド、グリチルリチンおよびサイコサポニンによる活性酸素産生抑制作用によるものと思われる。また、我々はこの人參養榮湯が  $O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 、DPPH ラジカルおよびラット遊離肝細胞および脳ホモジェネートに t-BuOOH を加えて派生するラジカルに対して強い消去作用を有することをすでに認めている<sup>10)</sup> 事からも示唆される。

今回、検討した人參養榮湯は、術後・病後の体力の回復、疲労倦怠、食欲不振などの自覚症状に効果がある漢方薬として知られているが、この漢方薬には活性酸素種の産生の抑制や消去を担う成分が数多く含まれており、今回の実験でもその作用が証明された。この事は、人參養榮湯は術後・病後の弱った身体に対して、抗酸化能を強化、回復させる作用を有している可能性が考えられる。

## 結 論

人參養榮湯 (TJ-108) による生体内フリーラジカルおよび過酸化脂質の動態について検討した。人參養榮湯5週間投与マウスの血液を PMA で刺激し、派生する活性酸素産生能は、対照群に比べ抑制された。

t-BuOOH 刺激による血漿中の脂質過酸化反応は対照群と比較して増加した。また、肝臓および脳中の脂質過酸化反応も血漿中のそれと同様に、対照に比較して有意に増加した。一方、in vitro で活性酸素産生能および脂質過酸化反応に対する人參養榮湯の効果を検討した。PMA 刺激による全血中の活性酸素産生能に対して、1 mg/ml 添加では約 50 % の抑制であった。血漿、脳および肝臓ホモジェネートを t-BuOOH で刺激した場合、典型的な化学発光検出のパターンを示した。この各試料に 0.001~1 mg/ml 濃度の人參養榮湯を加えたところ、血漿

および脳の化学発光は濃度依存的に抑制がみられた。人参養栄湯は *in vitro* では、フリーラジカルの産生や脂質過酸化反応を抑制するが、長期に投与された場合は、生体の脂質過酸化反応を亢進させた。この相違は不明である。人参養栄湯は活性酸素種の産生の抑制や消去する作用を有しており、術後・病後などの弱った身体の抗酸化能を強化、回復させる可能性をもった漢方薬であると思われる。

### References

- 1) Morishita, S., *et al.* : Pharmacological effects of Reiousan on experimental hepatic injuries and hepatic functions. *Folia Pharmacol. Jpn.* **93**, 261-270, 1989.
- 2) Yoshikawa, T. and Takahashi, S. : Function of Wakan-yaku. In Free radical and Wakan-yaku. (Eds. by Okuda, T. and Yoshikawa, T.) Kokusai Isho Shupan, Tokyo, pp.33-41, 1990.
- 3) Goto, K., *et al.* : Protective effect of Zokumyou to on transit ischemia in gerbil cerebral cortex. In KAMPO (Eds. Ohtsuka, Kumagaya, A. and Takagi H.) Excerpta Medica, Tokyo, pp.234-240, 1987.
- 4) Hiramatsu, M., *et al.* : Effect of Shosai ko-to-go-keishi-kashakuyaku-to on monoamine contents and lipid peroxidation in aged rat brains. *Bull. Jpn. Neurochem. Soc.* **24**, 106-108, 1985.
- 5) Okuda, T., Fujita, Y., Yoshida, T. and T. Hatano. : Suppression of active oxygens by natural products. polyphenols and tannins. *Free Rad. Clin. Med.* **4**, 19-30, 1990.
- 6) Bors, W. and Saran, M. : Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Rad. Res. Comm.* **2**, 289-294, 1987.
- 7) Blackburn, Jr W.D., Hech, L.W. and Wallace, R.W. : The bioflavonoid quercetin inhibits neutrophil degranulation, superoxide production, and the phosphorylation of specific neutrophil proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 1229-1236, 1987.
- 8) Suzuki, H., *et al.* : Effect of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on production of  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  by macrophages. *IGAKU NO AYUMI* **124**, 109-111, 1983.
- 9) Aoyagi, K. and Narita, M. : Renal failure and active oxygen radical. *Free Rad. Clin. Med.* **4**, 129-134, 1990.
- 10) Egashira, T., Takayama, F. and Yamanaka, Y. : Studies on pharmacological properties of Ninjin-yoei-to. Report I. Free radical scavenging activity of Ninjin-yoei-to. *J. Trad. Med.* **16**, 108-115, 1999.
- 11) Takayama, F., Egashira, T. and Yamanaka, Y. : Assay for oxidative stress injury by detection of luminole-enhanced chemiluminescence in a freshly obtained blood sample : a study to follow the time course of oxidative injury. *Folia Pharmacol. Jpn.* **111**, 177-186, 1998.
- 12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951.
- 13) Kimura, Y., *et al.* : Studies on Scutellariae Radix. IV. Effects on lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 2308-2312, 1981.
- 14) Okuda, T., *et al.* : Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 1625-1631, 1983.
- 15) Kiso, Y., Tohkin, M., Hikono, H., Ikeya, Y. and Taguchi, H. : Mechanism of antihepatotoxic activity of Wuweizisu C and Gomisin A. *Planta Medica* **331-334**, 1985.
- 16) Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S. and Takemoto, T. : Effects of crude saponins of *Gynostemma pentaphyllum* on lipid metabolism. *Shoyakugaku Zasshi* **37**, 272-275, 1983.
- 17) Yohikawa, T., *et al.* : Augmentative effect of OK-432 and/or *Nocardia rubra* cell wall skeleton on superoxide generation from polymorphonuclear leukocytes. *Jpn. J. Clin. Immun.* **12**, 608-614, 1989.
- 18) Onji, M., *et al.* : Effects of Sho-saiko-to on soluble type interleukin-2 receptor (sIL-2R) production by monocytes. *Kampo Immunol.* **3**, 46-56, 1990.