

骨粗鬆症モデルラット骨量に対する生薬升麻を含む 漢方製剤の効果

左雨 秀治,^{a)}坂本 忍,^{a)}三田村 匡,^{a)}遠藤 衆,^{b)}菊地 尚,^{c)}篠田 壽^{c)}

東京医科歯科大学 ^{a)}難治疾患研究所形質発現, ^{b)}動物実験施設,

^{c)}東北大学歯学部歯科薬理学教室

Effects of Kampo medicines which contain the medical plant “Shoma” on the bone mass in osteoporosis model rats

Shuji SASSA,^{*a)} Shinobu SAKAMOTO,^{a)} Tadasu MITAMURA,^{a)}
Shu ENDO,^{b)} Takashi KIKUCHI,^{c)} Hisashi SHINODA^{c)}

^{a)}Department of Functional Genomics Medical Research Institute,

^{b)}Animal Research Center, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

^{c)}Department of Pharmacology, School of Dentistry, Tohoku University

(Received December 1, 2000. Accepted March 13, 2001.)

Abstract

Since the methanol extract of Shoma (*Cimicifugae Rhizome*) has been known to reduce the enhanced resorption of bone, we investigated the effect of Otsuji-to (OT; *Yi-Zi-Tang*) and Shoma-kakkon-to (SKT; *Sheng-Ma-Ge-Gen-Tang*) including “Shoma” as a component, on bone mass in ovariectomized rats. Female Sprague-Dawley rats were ovariectomized at 9 weeks of age and divided into 5 groups of 8 rats each at 44 weeks of age; i.e. 1) ovariectomized control rats (OVX-Control), 2) ovariectomized, OT-treated rats (OVX-OT), 3) ovariectomized, SKT-treated rats (OVX-SKT), 4) ovariectomized, 17 α -ethynylestradiol-treated rats (OVX-E) and 5) normal control rats (Normal-Control). Ovariectomy significantly reduced the bone mineral density (BMD) of the whole tibia ($p < 0.05$). Eight-week treatment with E or OT enhanced the BMD of the metaphysis of tibia compared with that in the OVX-Control group ($p < 0.05$). Plasma alkaline phosphatase (ALP) activity and calcium concentration in OVX-OT or OVX-SKT groups were elevated compared with those in the OVX-Control group ($p < 0.005$). In contrast, plasma ALP activity in the OVX-E group was reduced compared with that in the OVX-Control group ($p < 0.005$), though the plasma calcium concentration was increased ($p < 0.005$). In conclusion, it is suggested that OT-treatment augments tibial BMD *via* a mechanism different from that of E.

Key words Shoma, Otsuji-to, Shoma-kakkon-to, BMD.

Abbreviations Shoma (*Cimicifugae Rhizome*), 升麻; Otsuji-to (*Yi-Zi-Tang*), 乙字湯; Shoma-kakkon-to (*Sheng-Ma-Ge-Gen-Tang*), 升麻葛根湯; BMD, bone mineral density; E₂, estradiol; ALP, alkaline phosphatase.

緒 言

近年、骨粗鬆症が認識されるに従い高齢者の Quality of Life が問題となっており、特に婦人の閉経期以後に起こるエストロゲンの急激な減少に伴い骨からの Ca 吸収

*〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45
1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8510, Japan

が活性化され、骨形成より骨吸収が優位となり骨のリモデリング・バランスが骨吸収の方へ傾き骨量の減少を引き起こし、最終的に骨粗鬆症へと導くのである。この骨量の減少を如何に予防するかが大きなテーマとなっている。一般的には、西洋医学のエストロゲンとプロゲステロンを用いたホルモン補充療法がFirst Choiceとなっているが、出血や子宮癌などの問題が完全に解決されてはいない。その他にも活性型ビタミンD₃や骨吸収抑制剤であるビスフォスホネートなど様々な治療薬が開発されているが、それぞれ一長一短があり決定的な治療薬が見つかっていない。

そこで、我々は、漢方薬によって骨粗鬆症を予防並びに治療ができないかと考え、Li, JXらの生薬升麻には、卵巣摘出ラットでの実験で升麻のメタノール抽出エキスに骨吸収亢進に対する顕著な抑制効果を報告¹⁾していることに着目し、生薬升麻を含む2種類の漢方薬乙字湯と升麻葛根湯を用いて卵巣摘出後長期間経過した骨粗鬆症モデルラットの骨量に対する作用を検討した。動物を用いた骨粗鬆症と漢方薬に関する研究は、日高らや金子らの報告^{2,3)}があるが、我々もこれまでも加味逍遙散や補中益気湯などの漢方薬を用いた研究を報告した^{4,6)}。他に生薬升麻を含む補中益気湯の骨に対する作用については、鈴木らの報告がある⁷⁾。また、乙字湯の一般的な効能はキレ痔やイボ痔の治療薬として用いられ、升麻葛根湯の効能は、感冒の初期や皮膚炎の治療薬として用いられる。

材料と方法

(1) 漢方薬：使用した漢方薬は、乙字湯 (Lot. No. 260003010) 並びに升麻葛根湯 (Lot. No. 280101010) のエキス末で (株) ツムラより供与されたものである。この2種類の漢方薬の構成生薬並びに構成比は、乙字湯では当帰 (6.0 g)、柴胡 (5.0 g)、黄芩 (3.0 g)、甘草 (2.0 g)、升麻 (1.0 g)、並びに大黄 (0.5 g)、の6種類で4.0 gのエキス末が得られる。一方、升麻葛根湯では葛根 (5.0 g)、芍薬 (3.0 g)、升麻 (2.0 g)、甘草 (1.5 g) 並びに生姜 (0.5 g)、の5種類で2.25 gのエキス末が得られ、ヒトの場合は、これを1日2～3回に分けて投与される。なお、各漢方薬エキス末は、各漢方生薬を細かく切断し、熱水抽出・濃縮を行い成分が損なわれないように噴霧乾燥法により得られた各漢方薬の抽出成分粉末である。

(2) 動物実験：生後7週令のSprague-Dawley系雌ラット56匹を購入し、2週間予備飼育後実験に供した。生後9週令で40匹のラットの両側卵巣を摘出し、35週間放置して骨粗鬆症モデルラットを作製した。無処置

ラット16匹は、実験開始時の正常対照群 (NS-Cont群) と実験終了時の正常対照群 (N-Cont群) とした。40匹の骨粗鬆症モデルラットは、乙字湯を投与する群 (OVX-OT群)、升麻葛根湯を投与する群 (OVX-SKT群)、17 α -エチニルエストラジオールを投与する群 (OVX-E群) 並びに去勢のみの実験開始時の去勢無処置対照群 (OVXS-Cont群) と実験終了時の去勢無処置対照群 (OVX-Cont群) の5群に分け各群8匹ずつとした。それぞれの試料の投与量は、漢方薬エキス末は、ヒト投与量の5倍量とし、乙字湯エキス末 40 mg/100 g 体重、升麻葛根湯エキス末 22.5 mg/100 g 体重とし、17 α -エチニルエストラジオールは 30 μ g/100 g 体重、正常無処置ラット並びにOVX無処置ラットには、蒸留水 0.5 ml/100 g 体重をそれぞれの割合でラット用経口ゾンデを用いて8週間連日投与した。8週間目の最終投与の24時間後に、エーテル麻酔下で心臓穿刺によって3 mlの血液を採取し、遠心分離した後血漿を-30°Cで保存した。採血後、ラットを屠殺し子宮、副腎並びに脾臓を摘出して、各臓器の湿重量を測定した。さらに、骨量を測定するために、両後肢脛骨を採取し、99.5%エタノールに固定して骨量測定まで保存した。ラットの飼育は、室温23 $\pm$ 1°C、湿度50 $\pm$ 10%、1日14時間照明 (6:00 $\pm$ 20:00) 下で固形飼料 (CE-2: 日本クレア) と水は自由に摂取させた。

(3) 骨量の測定：篠田らの小動物骨塩量の測定法⁸⁾に従い採取後エタノール固定した左後肢脛骨を軟X線レントゲン撮影装置 (Softex-40) を使用し、標準指標 (歯科用アパタイト) とともにX線撮影を行いフィルムを現像後、骨の画像をコンピュータにより解析を行い、各脛骨の骨密度の定量を行った。解析部位は、ラット後肢脛骨の近位端から遠位端までの脛骨全体と脛骨近位端の骨幹端 (metaphysis) 3 mmの部分解析 (Fig. 1) を行った。



Fig. 1 Bone mineral density analysis of tibial metaphysis part.

(4) 血中ホルモンの定量：血中プロゲステロン (P₄) およびエストラジオール (E₂) の測定には、日本DPCコーポレーション社製のDPCプロゲステロンキットと

DPC エストラジオール二抗体キットを使用して測定した。なお、各キットの測定内再現性のCV値は、 P_4 が7.2%で E_2 が4.8%であった。

(5) 生化学的定量：測定物質は、血中アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 並びにカルシウム (Ca) 値で、(株)和光純薬工業製のアルカリ性ホスファ B-テストワコー並びにカルシウム C-テストワコーの各キットを用い、比色法により測定した。

(6) 統計学的解析：測定結果の平均値は、 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ で表記し、統計学的解析は Smirnov's 棄却検定法による Student's t-test あるいは Cochran-cox test を用いて行った。

結 果

1. 骨量の定量

左後肢脛骨全体の骨密度 (BMD: bone mineral density) は、Fig. 2 の如く実験開始時の NS-Cont 群に対して OVXS-Cont 群で減少傾向は見られたが有意な差は認められなかった。しかし、実験終了時での N-Cont 群に対して OVX-Cont 群で有意 ($p < 0.05$) な減少が認められた。骨粗鬆症モデルラットに漢方薬並びにエストロゲンを投与した各群は、OVX-Cont 群との比較では、OVX-OT 群、OVX-SKT 群並びに OVX-E 群とも高値

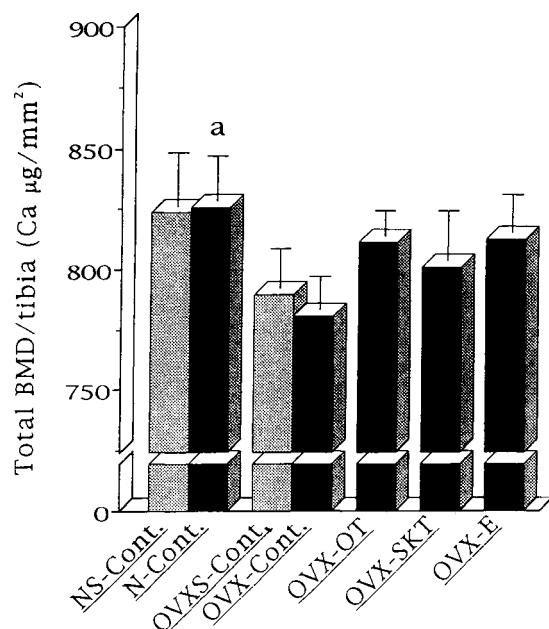


Fig. 2 Effects of Kampo medicines and 17α -ethynylestradiol on whole tibia BMD in ovariectomized adult rats. OVX-OT: Otsuji-to group, OVX-SKT: Shomakakkon-to group, OVX-E: 17α -ethynylestradiol group. Significantly different from OVX-Cont. group. a: $p < 0.05$.

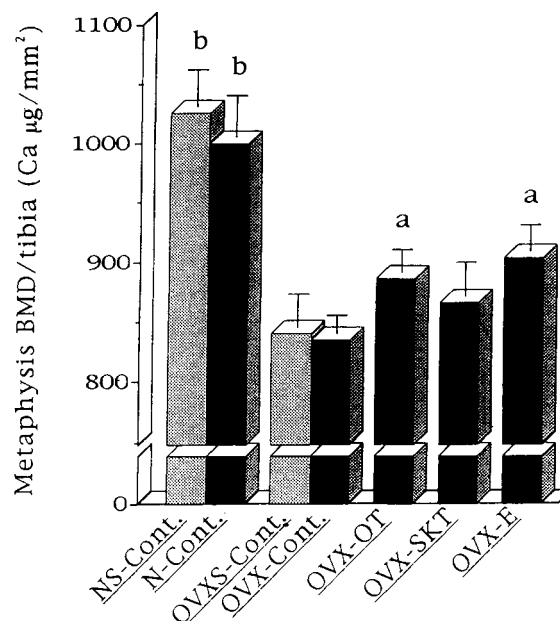


Fig. 3 Effects of Kampo medicines and 17α -ethynylestradiol on metaphysis BMD of tibia in ovariectomized adult rats. OVX-OT: Otsuji-to group, OVX-SKT: Shomakakkon-to group, OVX-E: 17α -ethynylestradiol group. Significantly different from OVXS-Cont. group and OVX-Cont. group. a: $p < 0.05$, b: $p < 0.005$.

傾向を示したが、有意な差は認められなかった。

次に脛骨の近位骨幹端での部分解析では Fig. 3 のように実験開始時における BMD は NS-Cont 群に対して OVXS-Cont 群で有意 ($p < 0.005$) な低下が認められた。また、実験終了時においても BMD は、N-Cont 群に対して OVX-Cont 群で有意 ($p < 0.005$) な差が認められた。漢方薬並びにエストロゲンを投与した実験群の BMD は、OVX-Cont 群に比して OVX-OT 群と OVX-E 群とも有意 ($p < 0.05$) な高値を認めた。

2. 血中ホルモンの定量

血中 P_4 ならびに E_2 値は、Fig. 4 に示すように、血中 P_4 値は N-Cont 群に対して OVX-Cont 群で有意 ($p < 0.001$) に減少した。一方、漢方薬並びにエストロゲンを投与した各群は N-Cont 群に比して各群とも有意 ($p < 0.001$) な減少を認めた。さらに、OVX-Cont 群に対しては OVX-OT 群、OVX-SKT 群とも有意な差は認められなかったが、OVX-E 群では有意 ($p < 0.001$) な減少を認めた。次に血中 E_2 値であるが、N-Cont 群に対して OVX-Cont 群は有意 ($p < 0.005$) な減少を認めた。また、漢方薬並びにエストロゲンを投与した各群では、OVX-OT 群と OVX-SKT 群の両群とも、OVX-Cont 群に比して有意差を認めなかった。しかし、OVX-E 群は OVX-Cont 群と N-Cont 群に比して有意 ($p < 0.001$) な高値を

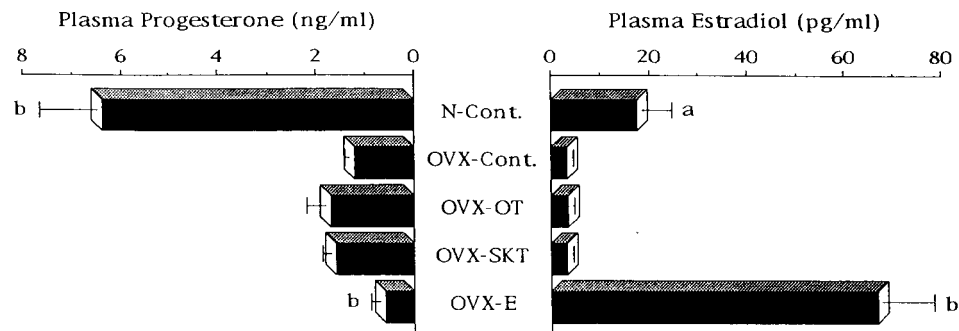


Fig. 4 Effects of Kampo medicines and 17 α -ethynylestradiol on plasma progesterone (P_4) and estradiol (E_2) levels in ovariectomized adult rats. OVX-OT : Otsuji-to group, OVX-SKT : Shoma-kakkon-to group, OVX-E : 17 α -ethynylestradiol group. Significantly different from OVX-Cont. group. a: $p < 0.005$, b: $p < 0.001$.

示し、N-Cont 群に比べ約 4 倍の高値を示した。

3. 生化学の定量並びに体重と各臓器の湿重量

血中 ALP 並びに Ca 値は、各臓器の湿重量とともに Table I に示した。血中 ALP 値は、N-Cont 群に対して OVX-Cont 群は有意な差は認められなかった。一方、漢方薬並びにエストロゲンを投与した各群の ALP 値は、OVX-OT 群と OVX-SKT 群とも N-Cont 群および OVX-Cont 群に対して有意 (OVX-OT 群: $p < 0.001$, $p < 0.01$. OVX-SKT 群: $p < 0.05$, $p < 0.01$) な高値を認めた。また、OVX-E 群は、N-Cont 群および OVX-Cont 群に対して有意 ($p < 0.05$) な低値を認めた。血中 Ca 値は、N-Cont 群に対して OVX-Cont 群では有意 ($p < 0.05$) な減少を認めた。一方、漢方薬とエストロゲンを投与した各群は、N-Cont 群に対して OVX-OT 群と OVX-SKT 群とも有意差は認められなかったが、OVX-E 群では有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた。また、OVX-Cont 群に対しては OVX-OT 群、OVX-SKT 群並びに OVX-E 群の三群とも有意 ($p < 0.05$) な増加を認めた。

次に体重および各臓器の湿重量について見ると Table I のように、体重では正常無処置の各群に比して卵摘を行った OVX の各群が有意 ($p < 0.01$) な増加を示した。また、各群での実験開始時と終了時の体重を比較すると OVX-E 群でのみ大きな変化が見られ、有意 ($p < 0.05$) な体重減少が認められた。各臓器の湿重量で副腎は、N-Cont 群に対して OVX-Cont 群は有意 ($p < 0.005$) な減少を認めた。漢方薬やエストロゲンを投与した実験群は、OVX-Cont 群に比して OVX-OT 群と OVX-SKT 群は有意 ($p < 0.001$) な減少をしたままであった。しかし、OVX-E 群の副腎湿重量は、N-Cont 群の湿重量の平均値まで回復し、OVX-Cont 群、OVX-OT 群並びに OVX-SKT 群の各群に対して有意 ($p < 0.001$) な増加を認めた。また、子宮湿重量は、N-Cont 群に対して OVX-Cont 群で有意 ($p < 0.001$) な減少を認めた。漢方薬やエストロゲンを投与した各群は、OVX-Cont 群に比して OVX-OT 群と OVX-SKT 群とも有意差は認めなかったが、OVX-E 群は有意 ($p < 0.001$) な増加を認め、子宮

Table I Effects of Kampo medicines and 17 α -ethynylestradiol in ovariectomized adult rats on body weight, organ wet weight and plasma composition.

Group	N-Cont.	OVX-Cont.	OVX-OT	OVX-SKT	OVX-E
Body weight start (g)	349.3 $\pm$ 14.4	369.7 $\pm$ 24.9	366.7 $\pm$ 7.9	364.0 $\pm$ 12.2	370.7 $\pm$ 20.2
Body weight end (g)	346.3 $\pm$ 16.0	368.7 $\pm$ 25.2	372.7 $\pm$ 7.3	361.0 $\pm$ 12.8	331.7 $\pm$ 6.6 ^a
adrenal (mg/100 g B.W.)	22.9 $\pm$ 1.4 ^b	15.6 $\pm$ 1.0	15.4 $\pm$ 0.4	17.6 $\pm$ 0.7	24.7 $\pm$ 1.5 ^c
uterus (mg/100 g B.W.)	176.8 $\pm$ 16.1 ^c	22.2 $\pm$ 1.6	18.0 $\pm$ 3.6	19.5 $\pm$ 0.8	149.0 $\pm$ 14.7 ^c
spleen (mg/100 g B.W.)	171.5 $\pm$ 17.3	158.1 $\pm$ 14.3	153.1 $\pm$ 11.5	174.7 $\pm$ 6.1	154.5 $\pm$ 7.3
serum ALP (IU/l)	109.7 $\pm$ 8.9	114.3 $\pm$ 11.7	254.8 $\pm$ 26.9 ^a	155.2 $\pm$ 20.0 ^a	84.5 $\pm$ 6.5 ^a
serum Ca (mg/dl)	10.94 $\pm$ 0.29 ^a	10.32 $\pm$ 0.15	10.88 $\pm$ 0.21 ^a	11.38 $\pm$ 0.38 ^a	12.17 $\pm$ 0.25 ^a

OVX-OT : Otsuji-to group, OVX-SKT : Shoma-kakkon-to group and 17 α -ethynylestradiol group. Data represent means $\pm$ S.E.M.

Significantly different from OVX-Cont. group. a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$, c: $p < 0.001$.

湿重量を回復していた。一方、脾臓湿重量は、各群間で大きな差は認められなかった。

考 察

脛骨全体の骨密度について検討すると去勢した OVXS-Cont 群が大幅な骨密度の減少が認められず NS-Cont 群に対して減少傾向は認められたが有意 ($p < 0.118$) な差は認められなかった。しかし、実験終了時での OVX-Cont 群と N-Cont 群との間には有意 ($p < 0.05$) な差が認められた。去勢による BMD の減少率は、去勢後の 26 週では我々のこれまでの結果では平均 6.2 % であったが、今回の結果では減少率が 5.4 % と少なかった。原因としては、ケージ当たりの飼育匹数がこれまでの 4 匹から 3 匹へと減少したため、運動スペースと食事の摂取量が増えたことに起因しているのではないかと推察された。また、漢方薬およびエストロゲンを投与した各群とも有意な差は認められなかった。一方、脛骨近位部骨幹端の部分解析での BMD は、正常無処置の N-Cont 群に対して去勢無処置の OVX-Cont 群で有意な減少を認めた。この部位は、脛骨の中で海綿骨の最も豊富な部分で BMD の増減に大きく影響する部分である。去勢後に漢方薬を投与した各群の中で OVX-SKT 群では OVX-OT 群ほどの BMD の増加が認められず増加傾向 ($p < 0.34$) を認めたのみであったが、OVX-OT 群は、OVX-Cont 群に比して有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた。また、エストロゲンを投与した OVX-E 群の BMD は、OVX-Cont 群に比して 6.9 % 増の有意 ($p < 0.05$) な増加を認め、N-Cont 群の BMD の 90.5 % まで回復した。次に、血中ホルモン値を見ると P_4 値は去勢により有意に低下した。また、漢方薬を投与した OVX-OT 群と OVX-SKT 群は、OVX-Cont 群に比してそれぞれ 4.1 % と 3.2 % の増加を示したが有意な差は認められなかった。しかし、エストロゲンを投与した OVX-E 群では、50.8 % 減少で有意な差を認めた。これは、エストロゲンの投与により視床下部-下垂体前葉-副腎-性腺系への負のフィードバックが働き下垂体前葉からのゴナドトロピンの放出が抑制されると共に副腎にも作用してステロイドの放出が抑制されることに起因していると推察された。血中 E_2 値も去勢により有意な減少が認められたが、漢方薬投与による影響は認められなかった。また、エストロゲンを投与した OVX-E 群では OVX-Cont 群の 20 倍以上の高値を示し、N-Cont 群に比較しても 5 倍以上の高値を認めた。我々の従来行ってきた八味地黄丸・加味逍遙散・補中益気湯による骨の研究では、BMD が有意な増加を認めた場合は、血中 P_4 と E_2 値が OVX-

Cont 群に対して有意な増加を示した^{4,6)}。しかし、乙字湯を投与した OVX-OT 群では、脛骨の BMD で有意な増加が認められたにも関わらず血中 P_4 と E_2 値は有意な増加が認められなかった。これは、ステロイドホルモンの増加に伴う骨量増加の作用機序とは異なり、たとえば、Ducy P. らの報告⁹⁾に見られるような、脳内に存在するレプチンの活性化による脳中枢系を介して骨形成を亢進する可能性も推察される。この点の解明は今後の課題にしたい。次に血中 ALP と Ca 値から検討すると血中 ALP 値は去勢により上昇が見られたがエストロゲンである 17α -エチニルエストラジオールの投与により有意な減少が認められた。これは、エストロゲンにより破骨細胞の骨吸収が抑えられるため ALP 値が減少したものと推察され、山本らの報告¹⁰⁾とも一致する。一方、漢方薬を投与した OVX-OT 群、OVX-SKT 群ともに OVX-Cont 群に比して ALP 値が有意に増加したことは、骨代謝回転が盛んになったことを示唆するものと推察された。また、血中 Ca 値が去勢後長期間経過すると N-Cont 群に比して有意な低下が認められた。去勢直後では骨の骨代謝回転は、全体的に高回転となり血中 Ca 値は一時的に高くなることもあるが長期間経過すると骨代謝回転は、低回転となり血中 Ca 値もやがて低下するものと推察された。漢方薬を投与した OVX-OT 群と OVX-SKT 群が OVX-Cont 群に比して高値を示したことは、この低回転の骨代謝が高回転へと転換したことを意味しているかもしれない。この点エストロゲンの投与による骨吸収の抑制により骨量が増加する経路とは、明らかに違う作用機序により骨密度が増加促進したものと推察される。今回、生薬升麻の配合量が少ない乙字湯で骨量への効果が発揮されたが、これは補中益気湯でも生薬升麻が 1 g しか含まれていないにも関わらずやはり骨量を有意に増やす結果⁵⁾が得られており単なる配合量が反映されるのではなく、各生薬の組み合わせが重要なのではないかと推察された。以上の結果から、生薬升麻を含む漢方製剤で升麻葛根湯は、骨粗鬆症モデルラットの脛骨の骨密度を有意に増加することは出来なかったが、乙字湯においては骨密度を有意に増加させた。なお、乙字湯による脛骨の骨密度の増加作用機序はエストロゲンによる作用機序とは血中 P_4 や E_2 値から異なることが示唆された。

結 語

1. 生薬升麻を含む漢方製剤乙字湯と升麻葛根湯との骨粗鬆症モデルラットに対する骨密度の増加効果は升麻葛根湯では認められなかったが、乙字湯では脛骨の骨密度を有意に増加させた。

2. 乙字湯と升麻葛根湯は、血中 ALP と Ca 値を有意に増加させ、特に乙字湯で大きな増加を認めた。エストロゲンを投与すると、血中 ALP 値は減少するが、血中 Ca 値は増加を認めた。
3. 乙字湯は、エストロゲンとは異なる作用機序によって脛骨の骨密度を増加させることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、試料を提供して頂いた(株)ツムラに深く感謝致します。また、この研究にご協力頂いた関係者に感謝致します。

References

- 1) Li, J.X., Li, H.Y., Miyahara, T., Kadota, S., Wu, Y.W., Seto, H., Kakishita, M., Namba, T. : Anti-Osteoporotic activity of traditional medicine - Active constituents of Cimicifugae Rhizome. *J. Trad. Med.* **12**, 316-317, 1995.
- 2) Hidaka, S., Okamoto, Y., Nakajima, K., Suekawa, M., Liu, S.Y. : Preventive effects of traditional Chinese (Kampo) medicines on experimental osteoporosis induced by ovariectomy in rats. *Calcif. Tissue Int.* **61**, 239-246, 1997.
- 3) Kaneko, H., Koyama, T., Aso, T., Aoki, K. : GnRH agonist ni yoru rat no kotsuryo gensho ni taisuru Hachimi-jio-gan no yokuseikouka (GnRH agonist によるラット骨量減少に対する八味地黄丸の抑制効果). *Sanfujinka Kampo Kenkyu no Ayumi* (産婦人科漢方研究のあゆみ) **12**, 29-36, 1995.
- 4) Sassa, S., Kumai, A., Kato, T., Okamoto, R. : Ranso tekishutsu rat wo mochiita Tsumura Kamishyoyo-san no naibunpitsugakuteki kento (卵巣摘出ラットを用いたツムラ加味逍遙散の内分泌学的検討). *Sanfujinka Kampo Kenkyu no Ayumi* (産婦人科漢方研究のあゆみ). **7**, 26-30, 1990.
- 5) Sassa, S., Sakamoto, S., Mitamura, T., Shinoda, H. : Effect of the Kampo medicine Hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang) on the bone mass and serum levels of steroid hormone in ovariectomized adult rats. *J. Trad. Med.* **16**, 129-134, 1999.
- 6) Sassa, S., Kumai, A., Chou, K., Okamoto, R., Shinoda, H. : Kyosei mesu rat no Rouka-model ni taisuru Hachimi-jio-gan (TJ-7) no koukakento (去勢メスラットの老化モデルに対する八味地黄丸 (TJ-7) の効果検討). *Sanfujinka Kampo Kenkyu no Ayumi* (産婦人科漢方研究のあゆみ). **10**, 46-53, 1993.
- 7) Suzuki, Y., Kashiwagi, H., Takaoka, T., Aoki, T. : I setsujo-go kotsu shogai ni taisuru chiryou (胃切除後骨障害に対する治療). *Gendai Iryo-gaku* (現代医療学). **10**(2), 205-209, 1995.
- 8) Shinoda, H., Shoji, K., Suzufuji, K. : Simple and rapid determination of bone mineral content in small experimental animals. *Tohoku University Dental Journal* **13**, 122-129, 1994.
- 9) Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., Karsenty, G. : Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay : A central control of bone mass. *Cell*. **100**, 197-207, 2000.
- 10) Yamamoto, Y., Kurabayashi, T., Tojo, Y., Yahata, T., Honda, A., Morita, M., Tanaka, K. : Effects of progestins on the metabolism of cancellous bone in aged oophorectomized rats. *Bone*. **22**, 533-537, 1998.