

漢方薬のリン酸カルシウム沈殿物形成と トロンビン活性に対する抑制効果

日高 三郎,*^{a)} 中島 薫,^{b)} 劉 勝彦^{b)}

^{a)}福岡歯科大学・口腔生化学, ^{b)}株式会社ツムラ

Inhibitory effects of Kampo medicines on both the formation of calcium phosphate precipitates and thrombin activity

Saburo HIDAKA,*^{a)} Kaoru NAKAJIMA^{b)} and Sheng Yan LIU^{b)}

^{a)}Department of Oral Biochemistry, Fukuoka Dental College, ^{b)}Tsumura & Co.

(Received March 27, 1995. Accepted May 15, 1995.)

Abstract

The effects of Kampo medicines and herbs on both the formation of calcium phosphate precipitates and thrombin activity were studied. Rikko-san, its herbal constituents (Asiasari Radix, Cimicifugae Rhizoma, Saposhnikovia Radix, Glycyrrhizae Radix and Gentianae Scabrae Radix), Hachimi-jio-gan, Dai-saiko-to, Oren-gedoku-to, Shimbu-to, San'o-shashin-to, Gorei-san, Boi-ogi-to, Eppi-ka-jutsu-to, Inchinko-to and Kyuki-kyogai-to inhibited both the formation of calcium phosphate precipitates and thrombin activity. There was a strong correlation between the inhibition on the rate of hydroxyapatite transformation and that in the thrombin activity. There was a strong correlation between the inhibition to the rate of hydroxyapatite transformation and the polyphenol contents. These results suggest that the polyphenols (tannins) contained in Kampo medicines and herbs are an effective substance for both reactions.

Key words Kampo medicines, herbs, calcium phosphate precipitation, thrombin activity, polyphenols.

緒 言

異所性石灰化症と称される疾患, すなわち尿路結石症, 腎結石症, 進行性骨化筋炎症, 歯石症, 唾石症などではカルシウムを含む結石が見られ, その診断と治療は重要である¹⁾。従来, ピロリン酸と類似した化学構造のジホスホネートが種々の異所性石灰化症の進行を阻止することが報告されている^{2, 3)}。漢方製剤はこれら化学合成治療薬と違って, 副作用の発生頻度が低いことで今日再評価を受けている⁶⁾。

ハイドロキシアパタイト (HAP) 形成に先行して無定形リン酸カルシウム (ACP) 形成が起きることが知られている^{7, 9)}。この ACP から HAP への転換反応は自働触媒

的であり, ピロリン酸, ATP, 無機イオンなどの溶液環境に影響を受ける⁷⁾。一般に, *in vitro* リン酸カルシウム沈殿物形成に対する抑制因子の効果は, HAP への転換反応を誘導するのに要する時間 (induction time) の延長か, HAP 結晶成長の速度の減少を見ることによって測ることができる^{8, 9)}。

瘀血症¹⁰⁾には血液凝固系の変動がその病態生理に関与すると言われており, 漢方薬と生薬が血液凝固系に与える影響については, 駆瘀血剤,¹¹⁾ 止血剤と腎臓疾患治療剤¹²⁾ および生薬単味¹³⁾の血液凝固と線溶系に対する阻害作用が報告されている。

これまで我々は漢方薬の口腔内石灰化に対する予防・治療薬としての可能性を探る目的で漢方薬のリン酸カルシウム形成に対する影響を研究してきた。^{14, 15)} この論文

*〒814 01 福岡市早良区田村2丁目15番1号
2-15 1, Tamura, Sawara-ku, Fukuoka, 814 01, Japan

では立効散とその構成生薬および循環器系・腎臓疾患用並びに止血剤としての漢方薬のリン酸カルシウム沈殿物形成に対する抑制効果とトロンビン活性に対する抑制効果を比較したところ、両方の抑制効果が相関することを見出したので、その結果を報告する。

材料と方法

(1) 試薬および薬物：N-2-hydroxyethylpiperazine-N' 2-ethane sulfonic acid sodium salt (Hepes) とトロンビンはシグマ社 (Mo., U.S.A.) のものを、1-hydroxy-ethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) は東京化成工業 (東京) のものを使用した。歯科疾患治療用である立効散とその5種類の構成生薬¹⁶⁾ 細辛 (Asiasari Radix), 升麻 (Cimicifugae Rhizoma), 防風 (Saposhnikovia Radix), 甘草 (Glycyrrhizae Radix), 竜胆 (Gentianae Scabrae Radix) の水抽出乾燥エキス, 循環器系疾患の効能がある, 八味地黄丸, 大柴胡湯, 黄連解毒湯, 真武湯, 三黄瀉心湯, さらに腎臓疾患の効能がある, 五苓散, 防己黃耆湯, 越婢加朮湯, 茵陳蒿湯および止血の効能がある, 芍薬膠艾湯のエキス製剤 (賦形剤含有) は, (株) ツムラ (東京) を用いた。タンニン酸 (没食子より得られるタンニン) およびその他の試薬は片山化学 (大阪) より購入した。

(2) pH の測定：記録計を接続した pH メーター (F-7 型, 堀場) と pH 電極 (6028-10 T 型, 堀場) を用いた。反応液の用量は 2 ml, 温度は $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$, 反応液は攪拌し pH の変化を記録した。

(3) pH 変化による無定形リン酸カルシウム (ACP) 形成とハイドロキシアパタイト (HAP) への転換反応の測定：このことについては日高ら⁹⁾ が詳しく報告したので、ここでは簡単に記述する。100 mM の硝酸カルシウムと 100 mM のリン酸二水素カリウムのストック溶液を 2 mM の Hepes 緩衝液 (pH 7.4) で作製した。さらに、2 mM の Hepes 緩衝液 (pH 7.4) の 1.88 ml に、60 μl の 100 mM 硝酸カルシウム溶液を加え、次いで 60 μl の 100 mM リン酸二水素カリウム溶液を加えて反応を開始した。用いた濃度はカルシウム、リン酸ともに 3 mM であった。80 μl の 10 mg/ml 漢方薬と生薬 (最終濃度, 0.4 mg/ml (蒸留水); 製剤エキスの場合は含有される乾燥エキス量を用いた) および 0.1 mg/ml のタンニン酸を、リン酸を加える 5 分前に反応液に加えた。

In vitro の ACP 形成とその HAP への転換反応はカルシウム-リン酸混合物の pH を追跡することにより測定した。3 mM のカルシウムとリン酸を混合すると、反応には二つの明瞭なステップを生じ、第一のステップ

(ACP 形成) では急激な pH 低落在 2 分以内で生じ、その後 7-8 分経過して (ACP 安定期間), 第二の pH 低落在 (HAP への転換反応) を生じた。これら pH 低落カーブに対して接線を引くことによりそれぞれの初速度 (1 分当たりの pH 変化量) を求めた。この pH の初速度はカルシウム消費濃度 (ppm/min) に換算した。ACP 形成で 176 ppm/min, HAP 転換反応で 48 ppm/min であった⁹⁾。さらに、ACP 安定化に要する時間 (誘導時間; induction time) は Blumenthal *et al.*⁸⁾ の方法に従って決定した。

(4) トロンビン活性測定：トロンビン活性は合成基質 Tos-Arg-ME (TAME) を用いてアミダーゼ活性を測定した¹⁷⁾。反応液の組成は 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)/10 mM CaCl_2 /1 mM TAME であった。これにトロンビンを加え、 $23 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で 247 nm の吸光度の増加を測定し TAME の分子吸光係数より活性 (U/ml) を求めた。この条件で、漢方薬と生薬 (0.2 と 0.5 mg/ml; エキス製剤の場合は含有される乾燥エキス量を用いた) および HEBP (10-100 μM) と 0.1 mg/ml のタンニン酸を加えた時の酵素活性を測定した。

(5) 総ポリフェノール含量の測定：立効散とその構成生薬の総ポリフェノール含量はフォリン-キオカルト-試薬を用いて測定した¹⁸⁾。簡単に述べると、蒸留水 (1.0 ml), 0.71 M 炭酸ナトリウム (0.8 ml), サンプル (0.2 ml) を混合して、0.05 ml の 2 N フォリン-キオカルト-試薬を加え、 45°C で 15 分インキュベートした後、765 nm の吸光度を測定した。その際、タンニン酸を標準物質として用いた。

(6) 統計：本実験のデータは 3-5 回の実験から得られたものであり、 $\pm$ S.D. で表した。統計的検定は ANOVA と Scheffé's Test を用いて行なった。 $p < 0.05$ の時、有意差ありと見なした。

結 果

1. リン酸カルシウム沈殿物形成抑制

Table I に示すように、立効散とその5種類の構成生薬は ACP 形成に対しては何ら抑制効果を示さなかったが、HAP への転換反応を 19-70 % 抑制し、誘導時間 (Induction time) を 1.6-5.9 倍遅延させた。タンニン酸は、HAP への転換反応を 27 % 抑制し、誘導時間を 12.8 倍遅延させた。一方、循環器疾患に効能がある、八味地黄丸、大柴胡湯、黄連解毒湯、真武湯、三黄瀉心湯は HAP への転換能を 30-61 % 抑制し、誘導時間を 2.6-13 倍遅延させた。また、腎臓疾患に効能がある、五苓散、防己黃耆湯、越婢加朮湯、茵陳蒿湯および止血に効能がある芍薬膠艾湯は HAP への転換能を 16-40 % 抑制

Table I Effects of Rikko-san, its herbal constituents and tannic acid on the amorphous calcium phosphate (ACP) formation and hydroxyapatite (HAP) transformation.

Concentration used (mg/ml)		Ca ²⁺ Consumption (ppm/min)		Induction time (min)
		ACP	HAP	
None	0	123±12	13.0 ±1.3	14.8±1.5
Rikko-san	0.4	133±5.0	5.46±0.31*	60.2±4.8*
Asiasari Radix	0.4	119±9.3	5.85±0.35*	45.1±2.8*
Cimicifugae Rhizoma	0.4	131±8.5	3.90±0.2*	87.1±7.5*
Saposhnikovia Radix	0.4	125±6.6	10.4 ±0.83*	23.3±2.0*
Glycyrrhizae Radix	0.4	130±5.0	4.68±0.30*	40.3±3.1*
Gentianae Scabrae Radix	0.4	131±6.2	9.62±0.70*	39.3±3.0*
Tannic acid	0.1	120±6.5	9.49±0.75*	189 ±15*

The ACP formation and HAP transformation were measured by the pH drop method. Final concentrations of 3 mM calcium and 3 mM phosphate were used. Rikko-san or its constituents was added to the reaction mixture 5 min before the addition of 3 mM phosphate. The final volume of the assay solution, which contains 2 mM Hepes (pH 7.4) was 2 ml. The reaction mixture was stirred at 37±0.1°C. Values were presented as the rate of consumption of calcium (ppm/min).

* Indicates a significant difference ($p<0.05$).

Table II Effects of Kampo medicines for the diseases of circulating system, kidney diseases, and bleeding on the ACP formation and HAP transformation.

Concentration used (mg/ml)		Ca ²⁺ Consumption (ppm/min)		Induction time (min)
		ACP	HAP	
None	0	123 ±12	13.0 ±1.3	14.8±1.5
Hachimi-jio-gan	0.4	137 ±11	9.01±1.0*	47.1±4.5*
Dai-saiko-to	0.4	113 ±12	9.13±1.0*	51.5±4.8*
Oren-gedoku-to	0.4	117 ±11	5.07±0.44*	188 ±12*
Shimbu-to	0.4	133 ±12	7.81±0.67*	38.5±3.6*
San'o-shashin-to	0.4	138 ±12	5.01±0.45*	68.1±5.9*
Gorei-san	0.4	134 ±13	8.58±0.77*	46.3±3.9*
Boi-ogi-to	0.4	127 ±11	9.69±0.87*	31.8±2.7*
Eppi-ka-jutsu-to	0.4	123 ±11	8.63±0.75*	37.0±3.1*
Inchinko-to	0.4	88.8±8.0*	7.67±0.56*	140 ±11*
Kyuki-kyogai-to	0.4	88.8±8.1*	10.9 ±1.0*	44.4±3.5*

Experimental conditions were the same as those shown in Table I.

*Indicates a significant difference ($p<0.05$).

し、誘導時間を2.1–9.5倍遅延させた (Table II)。また芍婦膠艾湯と茵陳蒿湯はACP形成を有意に抑制した (Table II)。なお、漢方製剤の賦形剤である乳糖は実験に用いた条件では0.2–1.6 mg/mlの範囲で含まれていたが、乳糖5.0 mg/mlでも何らリン酸カルシウム沈殿物

形成反応に影響を与えなかった。

2. トロンビン活性阻害

Table IIIに示すように、立効散とその構成生薬はトロンビン活性を、0.2 mg/mlの濃度の時17–59%, 0.5 mg/mlの濃度の時39–92%阻害した。その阻害の強さは升

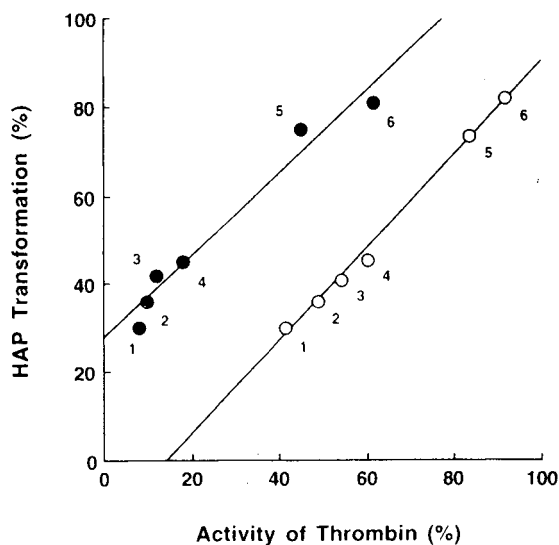


Fig. 1 Correlation between HAP transformation (%) (ordinate) and activity of thrombin (%) (abscissa) at concentrations of 0.2 mg/ml (○) and 0.5 mg/ml (●) of Rikko-san and its herbal constituents: 1; Cimicifugae Rhizoma, 2; Glycyrrhizae Radix, 3; Rikko-san, 4; Asiasari Radix, 5; Gentianae Scabrae Radix, 6; Saposhnikovia Radix.

Table III Inhibition of Rikko-san, its herbal constituents, HEBP, and tannic acid on the activity of thrombin.

	Concentration used	Thrombin activity (U/ml)
None	0 mg/ml	1.8 ± 0.05
Rikko-san	0.2 mg/ml	0.95 ± 0.05*
	0.5 mg/ml	0.22 ± 0.01*
Asiasari Radix	0.2 mg/ml	1.1 ± 0.05*
	0.5 mg/ml	0.31 ± 0.02*
Cimicifugae Rhizoma	0.2 mg/ml	0.73 ± 0.04*
	0.5 mg/ml	0.15 ± 0.01*
Saposhnikovia Radix	0.2 mg/ml	1.6 ± 0.05*
	0.5 mg/ml	1.1 ± 0.04*
Glycyrrhizae Radix	0.2 mg/ml	0.88 ± 0.04*
	0.5 mg/ml	0.18 ± 0.01*
Gentianae Scabrae Radix	0.2 mg/ml	1.5 ± 0.05*
	0.5 mg/ml	0.81 ± 0.04*
HEBP ^a	10 μM	1.8 ± 0.05
	100 μM	1.8 ± 0.05
Tannic acid	0.1 mg/ml	0.24 ± 0.01*

Enzyme assays were conducted at 23 ± 0.1°C using 50mM Tris-HCl (pH 8.5)/10 mM CaCl₂/1 mM TAME. By measuring the change of optical density per min at 247 nm, thrombin activity (U/ml) was determined from the molar extinction coefficient of TAME.

^aAbbreviation of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate.

*Indicates a significant difference ($p < 0.05$).

麻, 甘草, 立効散, 細辛, 竜胆, 防風の順であった。この阻害効果は Fig. 1 に示したように HAP への転換能との間に, 0.2 mg/ml の時, 一次関数的関係, $Y[\text{HAP への転換能 (\%)}] = 1.1X[\text{トロンビン活性 (\%)}] + 15.5$ を示していた ($r=0.99$)。0.5 mg/ml の時は, $Y = 0.94X + 27$ ($r=0.98$) であった。また, HEBP は 100 μM でもトロンビン活性を全く阻害しなかったが, タンニン酸 (0.1 mg/ml) はトロンビン活性を約 90 % 阻害した (Table III)。Table IV に示すように, 循環器疾患に効能がある漢方薬はトロンビン活性を 46–75 % 阻害した。腎臓疾患と止血作用に効能がある漢方薬は 33–56 % の阻害を示した。これらの漢方薬でも HAP 転換能とトロンビン活性の間には強い相関が見られた ($Y = 1.1X + 10.9$ ($r = 0.98$)). なお, 賦形剤である乳糖 (5.0 mg/ml) はトロンビン活性を阻害しなかった。

3. 総ポリフェノール含量とリン酸カルシウム沈殿物形成抑制能との相関

Table V に示したように, 立効散とその 5 種類の構成生薬は 1.7–10.3 % (w/w) の範囲でポリフェノールを含有していた。升麻が最多で 10.3 %, 防風が最少で升麻の 1/6 であった。その含有量の順序は升麻 > 甘草 > 立効散 > 細辛 > 竜胆 > 防風であった。リン酸カルシウム沈殿物形成抑制能 (%) は Table I より計算すると, 升麻 70, 甘草 64, 立効散 58, 細辛 55, 竜胆 26, 防風 20 であり, これらの値はそれぞれのポリフェノール含量とよく相関していた ($r=0.82$)。

Table IV Inhibition of Kampo medicines for the diseases of circulating system, kidney diseases, and bleeding on the activity of thrombin.

	Concentration used	Thrombin activity (U/ml)
None	0	1.8 ± 0.05
Hachimi-jio-gan	0.5	0.95 ± 0.04*
Dai-saiko-to	0.5	0.96 ± 0.05*
Oren-gedoku-to	0.5	0.46 ± 0.04*
Shimbu-to	0.5	0.80 ± 0.04*
San'o-shashin-to	0.5	0.45 ± 0.03*
Gorei-san	0.5	0.90 ± 0.04*
Boi-ogi-to	0.5	1.0 ± 0.05*
Eppi-ka-jutsu-to	0.5	0.90 ± 0.04*
Inchinko-to	0.5	0.79 ± 0.04*
Kyuki-kyogai-to	0.5	1.2 ± 0.05*

Experimental condition were the same as those shown in Table III.

*Indicates a significant difference ($p < 0.05$).

考 察

リン酸カルシウム沈殿物形成抑制のより直接的な指標となるのは、ACP 形成ステップに続く Induction time と HAP への転換反応のステップである。⁹⁾ ACP 形成に関しては用いた生薬、漢方薬のうち茵陳蒿湯と芍薬膠艾湯が ACP 形成を抑制していたが、これは強いキレート作用のためであろうと考えられる。¹⁵⁾

トロンボプラスチンの作用によりプロトロンビンから生成するトロンビンは血液凝固最終段階のフィブリノーゲンのフィブリンへの転換反応を触媒する酵素である。¹⁹⁾ 立効散とその構成生薬、循環器疾患と腎臓疾患並びに止血に効能がある漢方薬はこのトロンビン活性を阻害した (Table III, IV)。さらに、このトロンビン活性阻害能は HAP への転換阻止能 (Table I, II) と強い相関関係にあった (Fig. 1)。このことは、I) これら両者の機構が類似し、共通の物質が関与していることを示唆するとともに、II) 漢方薬と生薬が両反応に同時に阻害効果を示すことを意味している。I) に関しては、この両者の反応に対して考えられる有効な物質としては、ポリフェノール含量との相関関係より (Fig. 1, Table V)、ポリフェノール化合物 (その中でもタンニン類) であろう。²⁰⁾ ポリフェノール、タンニン類およびその分解産物は酵素活性を抑制することが知られている。^{21, 22)} 実際に、タンニン酸はリン酸カルシウム沈殿物形成とトロンビン活性の両方を抑制した (Table I, III)。ただし、リン酸カルシウム沈殿物形成抑制能との相関係数は 0.82 なので (結果の項 3 参照)、ポリフェノールだけでなく別の物質 (例えば、蛋白質) が関係している可能性がある。その阻害メカニズムにつき、カルシウムイオンはプロトロンビンの安定化に関与

するものの、トロンビン活性には関与しないので、²³⁾ 漢方薬と生薬に見られるカルシウムに対するキレート作用は、¹⁰⁾ この場合は無関係と思われる。II) に関しては、抜歯後の疼痛に適用される立効散¹⁶⁾ は口に入れてゆっくり服用され、口中に比較的滞留が長いので、口腔内石灰化 (歯石形成、エナメル質再石灰化) と抜歯後の出血の両方に効果があるかもしれない。循環器疾患に効能がある漢方薬に関しては血管への石灰化沈着物の抑制と凝血阻止の効果が考えられ、4 種類の腎臓疾患に効能がある漢方薬に関しても結石と出血阻止の効果が考えられる。しかし、循環器疾患に効能がある漢方薬と 4 種類の腎臓疾患に効能がある漢方薬に関しては、今回の *in vitro* リン酸カルシウム沈殿物形成抑制とトロンビン活性に対する阻害効果 (Table II, IV) が直接薬効を反映しないと考えられる。止血に効能がある芍薬膠艾湯は両反応に対し最も弱い抑制効果を示した (Table II, IV)。芍薬膠艾湯による止血作用はトロンビン活性の阻害にはよらないのかも知れない。異所性石灰化症の治療薬として用いられる HEBP^{2, 5)} は *in vitro* リン酸カルシウム沈殿物形成を抑制することが知られている。^{9, 14, 15)} しかし、トロンビン活性を全く阻害しなかった (Table III)。合成化合物の医薬品は一薬一効能であるが、草根木皮の漢方薬は一薬多効能であると言われている。⁶⁾ 本研究で明かとなったように石灰化 (リン酸カルシウム沈殿物形成) と血液凝固 (トロンビン活性) の両方に漢方薬と生薬は抑制的であるのは、この一薬多効能の好例であろう。

結 論

立効散とその構成生薬、循環器・腎臓疾患並びに止血に効能がある漢方薬に強いリン酸カルシウム沈殿物形成抑制とトロンビン活性阻害があることが見出された。このことから、これら漢方薬と生薬が石灰化と血液凝固の反応に対し同時に抑制的に作用する可能性が示唆される。

References

- 1) Daculsi, G., Pouëzat, J., Péru, L., Maugars, Y. and LeGeros, R.Z.: Ectopic calcifications. In "Calcification in Biological Systems" (Ed. by Bonucci, E.), CRC Press, Boca Raton, pp.365-397, 1992.
- 2) Fleisch, H., Russell, R.G.G., Bisaz, S., Muhlbauer, R.C. and Williams, D.A.: The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals *in vitro* and aortic and kidney calcification *in vivo*. *Eur. J. Clin. Invest.* **1**, 12-18, 1970.
- 3) Baumann, J. M., Bisaz, S., Fleisch, H. and Wacker, M.: Biochemical and clinical effects of ethane-1-hydroxy-1, 1'-diphosphonate in calcium nephrolithiasis. *Clin. Sci. Mol. Med.* **54**, 509-516, 1978.

Table V Total polyphenol contents of Rikko-san and its herbal constituents.

Rikko-san and its herbal Constituents	Total polyphenol(g) per 1.0 g-sample	Inhibition to the rate of HAP transformation(%)
Rikko-san	0.049±0.004	58
Asiasari Radix	0.031±0.002	55
Cimicifugae Rhizoma	0.103±0.009	70
Saposhinkoviae Radix	0.017±0.002	20
Glycyrrhizae Radix	0.060±0.005	64
Gentianae Scabrae Radix	0.023±0.002	26

Values were presented as the amounts (g) per 1.0 g-sample using tannic acid as a standard. Inhibition to the rate of HAP transformation (%) was calculated from the data in Table I.

- 4) Ressel, J.M., Smith, R., Bishop, M.C., Price, D.A. and Squire, C. M.: Treatment of myositis ossificans progressiva with a diphosphonate. *Lancet* **1**, 10 12, 1972.
- 5) Francis, M.J.D. and Briner, W.W.: The effect of phosphonates on dental enamel *in vitro* and calculus formations *in vivo*. *Calcif. Tissue Int.* **11**, 1 9, 1973.
- 6) Terasawa, K.: Oketsushou no byouri to chiryou. Touyou igaku nyuumon, (Nihon touyou igakkai Kanshuu). Yomiuri shimbunsha, Tokyo, pp.107-127, 1990.
宇澤捷年: 癆血症の病理と治療, 東洋医学入門, (日本東洋医学会監修), 読売新聞社, 東京, pp.107-127, 1990.
- 7) Fleisch, H., Russell, R.G.G. and Termine, J.D.: Influence of pyrophosphate on the transformation of amorphous to crystalline calcium phosphate. *Calcif. Tissue Int.* **2**, 49 59, 1968.
- 8) Blumenthal, A.W., Betts, F. and Posner, A.S.: Nucleotide stabilization of amorphous calcium phosphate. *Mat. Res. Bull.* **10**, 1055-1060, 1975.
- 9) Hidaka, S., Abe, K., Niina, M. and Liu, S.Y.: *In vitro* rinsan karusiumu chindenbutsu keisei yokusei ni tsuite. I. Kampo yaku, Rikko san to daeki no eikyou. *Shikisosi* **34**, 266 273, 1992.
日高三郎, 阿部公生, 薮名正明, 劉勝彦: *In vitro* リン酸カルシウム沈殿物形成抑制について, I. 漢方薬, 立効散と唾液の影響, 歯基礎誌 **34**, 266 273, 1992.
- 10) Nagahama, Y.: Touyou igaku gaisetsu. Sougensha, Osaka, pp.82 90, 1977.
長濱善夫: 東洋医学概説, 創元社, 大阪, pp.82 90, 1977.
- 11) Terasawa, K., Kimura, M., Sakuragawa, N., Uchiyama, H., Toriizuka, K., Ueno, M. and Horikoshi, I.: Kuoketsuzai no gyouko・senyou kei ni oyobosu eikyou. *Yakugaku zasshi* **103**, 313 318, 1983.
宇澤捷年, 木村昌行, 櫻川信男, 内山祐子, 鳥居塚和生, 土野雅晴, 堀越 勇: 癆瘵血剤の凝固・線溶系に及ぼす影響, 薬学雑誌 **103**, 313 318, 1983.
- 12) Sakuragawa, N., Yuasa, K., Takahashi, K., Kondo, S., Niwa, M., Miyata, Y. and Yokata, T.: Wakanyaku (tokuni shiketsuzai oyobi jinshikkan chiryoza) no gyoketsugakuteki kentou. *Saishin igaku* **38**, 1184 1188, 1983.
櫻川信男, 湯浅和典, 高橋 重, 近藤信一, 丹羽正弘, 宮田好美, 横田 力: 和漢薬 (特に止血薬および腎疾患治療剤) の凝血学的検討, 最新医学 **38**, 1184 1188, 1983.
- 13) Sakuragawa, N., Yuasa, K., Kondo, S. and Niwa, M.: Wakan-shouyaku no ketsueki gyokoteki kenkyuu: Tokuni Gaiyou to Sanshishi ni tsuite. *Saishin igaku* **38**, 1889 1893, 1983.
櫻川信男, 湯浅和典, 近藤信一, 丹羽正弘: 和漢生薬の血液凝固的研究: 特に艾葉と山梔子について, 最新医学 **38**, 1889 1893, 1983.
- 14) Hidaka, S., Abe, K. and Liu, S.Y.: A new method for the study of the formation and transformation of calcium phosphate precipitates: Effects of several chemical agents and Chinese folk medicines. *Archs Oral Biol.* **36**, 49-54, 1991.
- 15) Hidaka, S., Abe, K., Takeuchi, Y. and Liu, S.Y.: Inhibition of the formation of oral calcium phosphate precipitates: beneficial effects of Chinese traditional (Kampo) medicines. *J. Periodont. Res.* **28**, 27 34, 1993.
- 16) Tsumura Kampo seizai ekisu karyuu (iryuu you) sougou katarogu. Tsumura (Tokyo), 1990.
ツムラ漢方製剤エキス顆粒 (医療用) 総合カタログ, ツムラ (東京), 1990.
- 17) Walsh, K.A.: Esteropeptidase (Trypsin like esteropeptidase). In "Method in Enzymology" Vol. 19, pp.41 43, 1977.
- 18) Hoff, J.E. and Singleton, K.I.: A method for determination of tannins in foods by means of immobilized protein. *J. Fd. Sci.* **42**, 1566 1569, 1977.
- 19) Bando, M., Matsushima, A., Hirano, J. and Inada, Y.: Thrombin catalyzed conversion of fibrinogen to fibrin. *J. Biochem. (Tokyo)* **71**, 897-899, 1972.
- 20) Hidaka, S., Okamoto, Y., Abe, K., Suckawa, M. and Liu, S.Y.: Effective fractions of a Chinese traditional (Kampo) medicine, Rikko-san and its herbal constituents on the formation of calcium phosphate precipitates. *J. Trad. Med.* **11**, 106 113, 1994.
- 21) Kashket, S., Paolino, V.J., Lewis, D.A. and van Houte, J.: *In vitro* inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. *Archs Oral Biol.* **30**, 821-826, 1985.
- 22) Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T.: Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Medica* **55**, 117 122, 1989.
- 23) Silverberg, S.A.: Proteolysis of prothrombin by thrombin. Determination of kinetic parameters, and demonstration and characterization of an unusual inhibition by Ca^{2+} ions. *J. Biol. Chem.* **254**, 88 94, 1979.