

人参養栄湯に関する薬理学的基礎研究

第一報：人参養栄湯のフリーラジカル消去作用

江頭 亨*, 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 1. Free radical scavenging activity of Ninjin-yoei-to

Toru EGASHIRA*, Fusako TAKAYAMA and Yasumitsu YAMANAKA

Department of Pharmacology, Oita Medical University

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

Abstract

We examined the scavenging action of Ninjin-yoei-to on superoxide, hydroxyl radical, DPPH radical and alkyl radicals stimulated by t-BuOOH using electron spin resonance (ESR) spectrometry. Ninjin-yoei-to at concentrations of 5 to 0.002mg/ml scavenged superoxide, hydroxyl radical and DPPH radicals dose-dependently. These radical scavenging effects with Ninjin-yoei-to were in the following order: DPPH radicals > superoxide > hydroxyl radical. It also scavenged the hydroxyl radical in the free hepatocytes and homogenate of brain in rats induced by t-BuOOH dose-dependently, but did not scavenge the alkyl radicals.

These results indicate that Ninjin-yoei-to has a high scavenging activity for active oxygen species.

Key words Free radical, Ninjin-yoei-to (Ren-Shen-Yang-Rong-Tang), DPPH radical, Superoxide, Hydroxyl radical.

Abbreviations DPPH, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; t-BuOOH, tert-butylhydroperoxide; HBSS, Hank's balanced salt solution-Ca²⁺, Mg²⁺ free; PMA, phorbol myristate acetate; SOD, superoxide dismutase; XOD, xanthine oxidase; DMPO, 5,5-dimethyl-pyrroline-1-oxide; HEPES, 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethane sulfonic acid; DETAPAC, diethylene triamine penta acetic acid; O₂⁻, superoxide; •OH, hydroxyl radical; ¹O₂, singlet oxygen; LOOH, lipid hydroperoxide; LOO•, lipid peroxy radical; LO•, lipid alkoxyl radical.

緒 言

フリーラジカルによる障害の生体内標的分子として、脂質、核酸、酵素、蛋白質などがあるが、特にすべての細胞膜の脂質に局在する不飽和脂肪酸はフリーラジカルにより攻撃され、脂質過酸化連鎖反応を介して過酸化脂質を生成する。この生成された過酸化脂質による直接的あるいは間接的な作用がフリーラジカルによる生体膜障

害の一因と考えられている。この生体内のフリーラジカルには生成系と消去系とがあるが、そのバランスが崩れたとき、生体膜をはじめとする種々の生体内分子が障害を受け、種々の病態を引き起こすものと思われる。最近、このフリーラジカルが関与していると考えられている病態に対して、種々の抗酸化剤やラジカルスカベンジャーの投与が検討され、それなりの効果を得ている。しかし、西洋薬には有効性の限界や副作用の問題等があり、漢方薬の使用が見直されてきている。

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

近年、漢方薬の有効性や安全性は長年にわたる臨床試験により確認されているが、現代科学的手法によっても実証されねばならない。そこで、薬理学的に有効性の同定や作用機序の解明がなされ、徐々にではあるが、多彩な生物活性の存在が明らかにされつつある。その中で、種々の疾患、発癌、老化などの病因の一つとして考えられているフリーラジカルに対する漢方薬による消去作用および産生抑制作用が、漢方薬に含有しているサポニン¹⁾、タンニン²⁾、フラボノイド³⁾、グリチルリチン⁴⁾などに見出されている。また、その作用を利用して、これら疾患に対して漢方薬の効果も検討されつつある。⁵⁾

今回用いた人参養栄湯 (TJ-108) は、術後・病後の体力回復、疲労倦怠、食欲不振などの自覚症状に対して効果を有し、経験的に用いられてきた薬剤である。しかし、この効果は薬理学的には判明していない。そこで、人参養栄湯の効能・効果の作用の一因にフリーラジカルの消去および脂質過酸化の抑制作用の可能性が推測されることから、今回、 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ネートに $t\text{-BuOOH}$ を加えて派生するラジカルに対する人参養栄湯の効果を *in vitro* で検討した。また、人参養栄湯のラジカル消去の強さの比較対照薬として、抗酸化物質として知られている ascorbic acid を用いた。

材料と方法

(1) **試料**：人参養栄湯エキスは株式会社ツムラから供与された。人参養栄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, 人参 3.0 g および茯苓 4.0 g である。本実験において人参養栄湯は 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, $t\text{-BuOOH}$, 牛赤血球 SOD, cytochrome c, hypoxanthine, XOD, trypsin inhibitor (以上シグマ社), DMPO (ラボテック社), 牛肝臓 catalase (ペーリンガー・マンハイム山之内), collagenase, DPPH, ascorbic acid (以上和光純薬), ペントバルビタール (ダイナボット社), ヘパリン (マリオン・メレル・ダウ社), HEPES, DETAPAC (同仁化学), trypanblue (メルク社) および特記ないものについては市販の特級試薬を各々用いた。

(3) **遊離肝細胞の作製**：実験動物として Wistar 系雄性ラットを餌および水は自由に摂取させ、室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿

度 $50 \pm 5\%$, 照明 6~18 時で一週間飼育したもの (8 週齢, 体重 240~270 g) を用いた。ペントバルビタール (30 mg/kg) で麻酔後, ヘパリン (200 unit) を静注し, 開腹した。門脈から前灌流液 (HBSS-10 mM HEPES, 5 mM ビルビン酸, 0.5 mM EGTA, pH7.4) を 37°C で 100 ml 灌流し, 次に collagenase を含む灌流液 (0.05 % collagenase, 0.05 mg/ml trypsin inhibitor, 5 mM Ca^{2+} -Hanks-10mM HEPES, pH7.4) を 10 min 灌流した。灌流処置した肝臓を肝細胞洗浄液 (前灌流液) 中で肝細胞を分散させ, 300 mesh のナイロンフィルターでろ過した。ろ液を $40 \times g$ で 1 min 遠心した。沈渣を肝細胞洗浄液に分散し, 再度遠心した。この過程を 3 度くりかえした。得られた肝細胞液は, 一部を trypanblue 排除テストにて 90 % 以上の肝細胞の生存を確認後, 実験に用いた。

(4) **O_2^- の測定**：1.25 mM hypoxanthine $20 \mu\text{l}$ および 4.8 mM DETAPAC $20 \mu\text{l}$ を試験管にとり, これに 1 mM リン酸緩衝液 pH7.4, 人参養栄湯または対照薬としての ascorbic acid $20 \mu\text{l}$, 1.43 M DMPO $20 \mu\text{l}$, 0.25 unit/ml XOD $20 \mu\text{l}$ を加え, XOD 添加撹拌 40 sec 後, 試料を扁平セルにとり, electron spin resonance (ESR) spectrometer を用い, magnetic field 335.1 ± 5 mT, Mn 566, field modulation 0.79×0.1 , time constance 0.03 sec, sweep time 1 min, power 10, gain $\times 500$ の条件で室温測定した。

(5) **$\cdot OH$ の測定**：0.5mM FeSO_4 -DETAPAC-1 mM リン酸緩衝液, pH7.4 ($20 \mu\text{l}$) を試験管にとり, これに 1 mM リン酸緩衝液 pH7.4, 人参養栄湯または対照薬としての ascorbic acid $20 \mu\text{l}$, 0.46M DMPO $20 \mu\text{l}$ および 0.5 mM H_2O_2 $20 \mu\text{l}$ を加え, H_2O_2 添加撹拌 50 sec 後, ESR spectrometer を用い, magnetic field 335.0 ± 5 mT, Mn 632, field modulation 0.79×0.1 , time constance 0.1 sec, sweep time 2 min, power 4, gain $\times 1000$ の条件で室温測定した。

(6) **DPPH ラジカルの測定**：50 μM DPPH をエタノールに溶解し, その 50 μl に 1 mM リン酸緩衝液 pH7.4, 人参養栄湯または対照薬としての ascorbic acid $50 \mu\text{l}$ を加え, 撹拌後, 扁平セルにとり ESR spectrometer を用い, magnetic field 339.6 ± 10 mT, Mn 553, field modulation 0.79×0.1 , time constance 0.3 sec, sweep time 3 min, power 10, gain $\times 1000$ の条件で室温測定した。

(7) **ラット遊離肝細胞および脳ホモジネートから派生するラジカルの測定**：肝細胞の 1 % 浮遊液に 1 mM リン酸緩衝液 pH7.4, 人参養栄湯または対照薬としての ascorbic acid $20 \mu\text{l}$ および 5 mM $t\text{-BuOOH}$ ($16 \mu\text{l}$) を加え (total $80 \mu\text{l}$) 15min, 37°C で incubate した。これに 4

倍希釈 DMPO (2.3 M) を $20 \mu\text{l}$ 加え攪拌 55 sec 後, ESR spectrometer を用い, magnetic field $335.1 \pm 5 \text{ mT}$, Mn 553, field modulation 0.79×0.1 , time constance 0.1 sec, sweep time 2 min, power 20, gain $\times 1000$ の条件で室温測定した。一方, ラット脳の場合は, 肝臓の実験の場合と同様に, Wistar 系雄性ラットを餌および水は自由に摂取させ, 室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 5\%$, 照明 6~18 時で一週間飼育したもの (8 週齢, 体重 240~270 g) を用いた。ペントバルビタール (30 mg/kg) で麻酔後, 断頭致死させた。ただちに脳を摘出し, 0.32 M sucrose-20 mM Tris-acetate buffer, pH7.4 で 5% のホモジェネートを作製した。このホモジェネートに 1 mM リン酸緩衝液 pH7.4, 人參養榮湯または対照薬としての ascorbic acid 混液 (total $64 \mu\text{l}$) を 5 min, 37°C で incubate した。これに 4 倍希釈 DMPO (2.3 M) $20 \mu\text{l}$ および 5 mM t-BuOOH ($16 \mu\text{l}$) を加え攪拌 15 sec 後, ESR spectrometer を用い遊離肝細胞の場合と同条件で測定した。

(8) 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, 対照値に対する比較は一元配置分散分析法を用い, William's の多重比較検定を行い, 危険率 5% 未満を有意差ありとした。

結 果

1. O_2^- に対する効果

Hypoxanthine-xanthine oxidase 系で発生させた O_2^- をスピントラップ剤 DMPO で DMPO-OOH アダクトに変えて ESR spectrometer で得られるアダクトのシグナルを Fig. 1 (bottom) に示した。DMPO-OOH スピンアダクトは $a_N = 1.43 \text{ mT}$, $a_\beta^H = 1.15 \text{ mT}$, $a_\gamma^H = 0.13 \text{ mT}$ で典型的な ESR スペクトルが得られた。人參養榮湯 0.002 mg/ml 以下から濃度依存的かつ有意にこの O_2^- ラジカルを消去し, 2 mg/ml では約 90% 消去した (Fig. 1 top)。

2. $\cdot\text{OH}$ に対する効果

硫酸第一鉄-DETAPAC および H_2O_2 を用いた Fenton

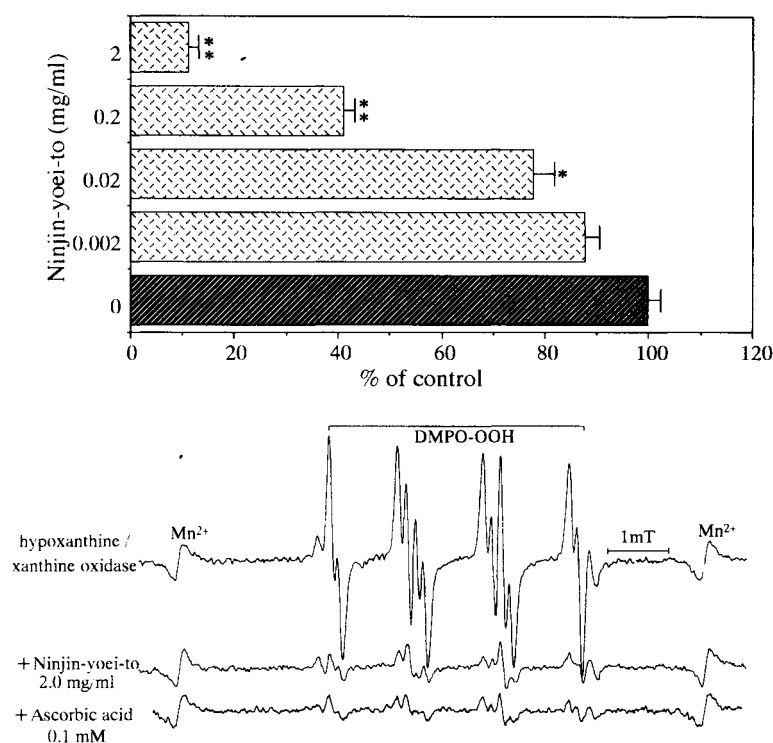


Fig. 1 Effect of Ninjin-yoei-to on superoxide anion.

Upper: The ESR signal intensity of DMPO-OOH in the hypoxanthine/xanthine oxidase combination without any radical scavenger was taken as 100% control. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5 determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

Lower: ESR spectra detected in hypoxanthine/xanthine oxidase combinations without and with Ninjin-yoei-to or ascorbic acid.

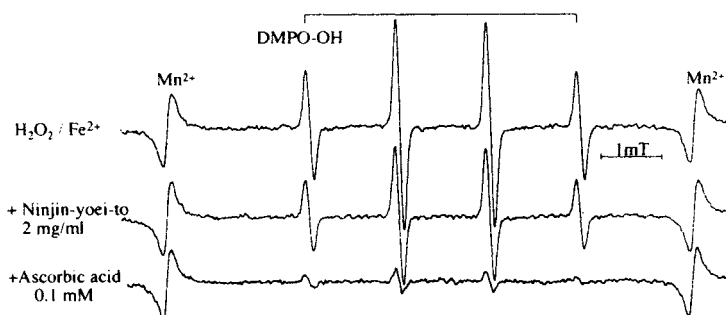
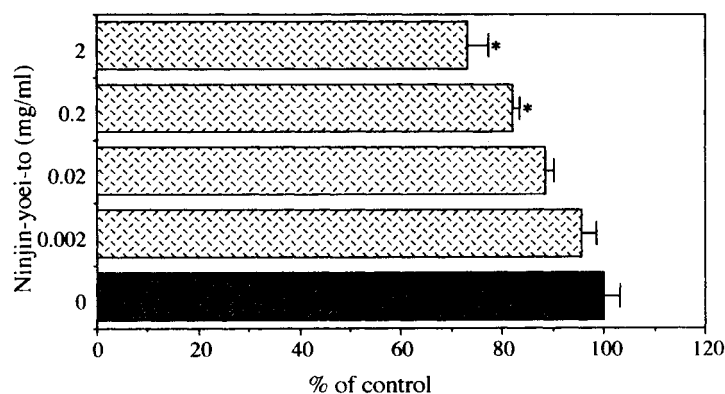


Fig. 2 Effect of Ninjin yoei-to on hydroxyl radicals

Upper: The ESR signal intensity of DMPO-OH in the H_2O_2/Fe^{2+} system without any radical scavenger was taken as 100 % control. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5 determinations. * $p < 0.05$ vs. control.

Lower: ESR spectra detected in H_2O_2/Fe^{2+} combinations without and with Ninjin yoei-to or ascorbic acid.

反応で発生した $\cdot OH$ をスピントラップ剤DMPOでDMPO-OHアダクトに変えてESR spectrometerで得られるアダクトのシグナルをFig. 2 (bottom)に示した。DMPO-OH スピンアダクトは($a_N = a_H = 1.49$ mT) 1:2:2:1の典型的なESRスペクトルが得られた。人參養榮湯は0.002 mg/mlから濃度依存的にこの $\cdot OH$ を消去したが、その消去活性は弱く、2 mg/mlの高濃度でも約30 %の消去活性しか示さなかった(Fig. 2 top)。

3. DPPH ラジカルに対する効果

DPPH エタノール溶液をESR spectrometerで測定すると、DPPH ラジカルの典型的な5本のシグナルが検出される(Fig. 3, bottom)。人參養榮湯は低濃度0.005 mg/mlでも約15 %のDPPH ラジカル消去活性を示した。また、濃度依存的に著明にラジカル消去活性を示し、0.5 mg/mlでは、ほとんどDPPH ラジカルを消去した(Fig. 3, top)。

4. 遊離肝細胞から惹起されるラジカルに対する効果

遊離肝細胞に5mM t-BuOOHを加え、そこから派生

するラジカルをスピントラップ剤DMPOで捕捉し、ESR spectrometerで測定すると、アルキルラジカルや $\cdot OH$ が検出された(Fig. 4, bottom)。人參養榮湯は0.001 mg/mlから濃度依存的にt-BuOOH刺激で遊離肝細胞から派生する $\cdot OH$ を消去したが、特に人參養榮湯1 mg/mlで著明であった(Fig. 4, top)。しかし、アルキルラジカルの消去は人參養榮湯のすべての濃度で見られなかった。

5. 脳ホモジェネートから惹起されるラジカルに対する効果

脳ホモジェネートに5 mM t-BuOOHを加え、そこから派生するラジカルをスピントラップ剤DMPOで捕捉し、ESR spectrometerで測定すると、遊離肝細胞に比較して顕著なアルキルラジカルや $\cdot OH$ が検出された(Fig. 5, bottom)。この脳ホモジェネートに人參養榮湯を添加し、同様にt-BuOOH刺激によるラジカル派生に対する効果を検討したところ、0.0001 mg/mlではほとんど影響はなかったが、人參養榮湯0.001 mg/mlで有意なラ

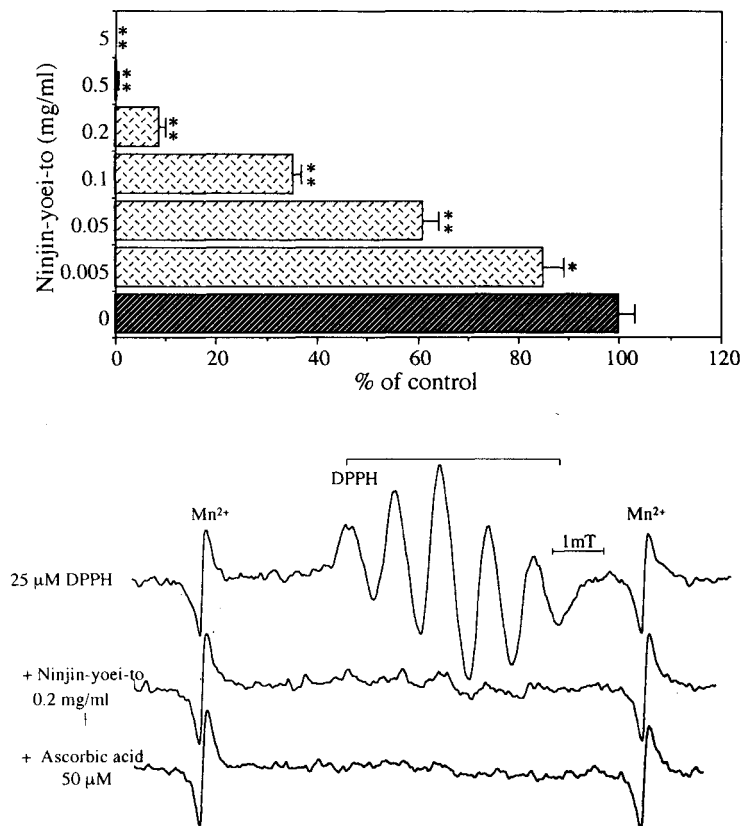


Fig. 3 Effect of Ninjin-yoei-to on DPPH radicals

Upper: The ESR signal intensity of DPPH radicals without Ninjin-yoei-to was taken as 100 % control. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5 determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

Lower: ESR spectra detected in DPPH solutions (25 μ M) with and without Ninjin-yoei-to or ascorbic acid.

ジカル消去作用が見られた。しかし、0.01 mg/ml 以上の高濃度 (0.1 mg/ml) ではかえってラジカル消去作用の減弱が見られ、1 mg/ml では対照と同等のラジカルが検出され、人参栄養湯の影響は見られなかった (Fig. 5, top)。一方、アルキルラジカルの消去は人参栄養湯のすべての濃度で見られなかった。

考 察

最近、漢方薬による活性酸素の消去および産生抑制作用についての報告があり、特に活性酸素の消去活性が in vitro で検討されている。タンニンを含む大黃、芍薬は活性酸素消去活性が強く⁶⁾、黄芩、甘草、麻黄に含まれるフラボノイドも同様の作用を有している³⁾。漢方薬にはこれらの他に多くの成分が含まれていることから、未知のラジカル消去物質の検索も続けられている。また、

in vivo でも漢方薬の有効性を活性酸素の消去活性から推測する報告も多い^{7,8)}。

今回、 O_2^- 、 $\cdot OH$ および DPPH ラジカルに対する人参栄養湯のラジカル消去効果を in vitro で検討し、その効果を比較し、Fig. 6 に示した。Fig. 6 からわかるように、人参栄養湯は DPPH ラジカルを著明に消去し、つぎに O_2^- 、 $\cdot OH$ の順であった。漢方薬には種々の活性酸素種を消去する物質が含まれている事は知られている。 β -カロチンは 1O_2 の消去剤として働き⁹⁾、フラボノイドは 1O_2 、 $\cdot OH$ 、 O_2^- や H_2O_2 の消去作用があり、特に $\cdot OH$ や O_2^- を直接捕捉する¹⁰⁾。タンニンはアスコルビン酸ラジカルの消去作用があるが、 O_2^- の消去作用も強い^{6,11)}。また、サポニン類も強い O_2^- 消去作用を有している¹⁾。今回検討した人参栄養湯にはフラボノイドやサポニンを含んだ甘草、人参および陳皮、タンニンを含んだ桂皮や芍薬およびカロチノイドを含有した陳皮がエキス成分として含

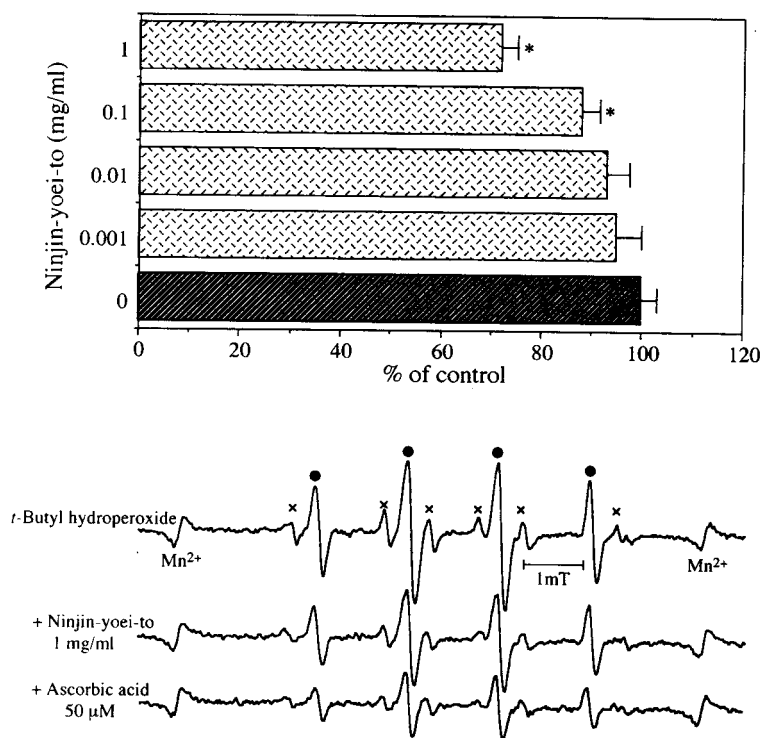


Fig. 4 Effect of Ninjin-yoei-to on DMPO-OH formation in free hepatocytes exposed to *t*-BuOOH

Upper: The generation of hydroxyl radicals induced by *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) without any radical scavenger was taken as 100 % control. Each value represents the mean±S.D. of 5 determinations. **p*<0.05 vs. control.

Lower: ESR spectra detected in the isolated hepatocytes exposed to *t*-BuOOH with and without Ninjin-yoei-to (1 mg/ml) or ascorbic acid. Spin adducts of hydroxyl radicals (●) and carbon centered radicals (×).

まれている。このことより、人参養栄湯には O_2^- および $\cdot OH$ を消去する作用が強く認められたものと思われる。一方、ビタミン E は脂溶性ビタミンで植物界に広く分布し、大豆油、トウモロコシ油などに多く含まれている。このビタミン E 活性をもつ最も強いものとして、 α -トコフェロールがあるが、その生理的意義の重要性は抗酸化作用である。 α -トコフェロールが脂肪酸のペルオキシラジカルに水素を供与してラジカル連鎖反応を止め、自身は安定なラジカルを生成しやすくなっている。¹²⁾ また、 α -トコフェロールが反応系中でペルオキシラジカルを捕捉し、それ自身ラジカルになっても、そこにビタミン C があるとそれによって還元され、 α -トコフェロールは再生され、さらにラジカル連鎖反応を止める。¹³⁾ このことにより、ビタミン E には強い DPPH ラジカル消去作用があることが知られている。今回用いた人参養栄湯にも強い DPPH ラジカル消去作用が認められたが、人参養栄湯の構成生薬中にビタミン E を多く含むものが存在

するために、DPPH ラジカルを強く消去したものと思われる。今後、人参養栄湯の構成成分中のビタミン E 含量など、栄養化学的分析の研究が必要であろう。

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。組織や細胞膜中の過酸化物質に *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し、この活性酸素種とルミノールとを共存させ、発生する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や酸化ストレスの状態を把握することができる。¹⁴⁾ 今回、遊離肝細胞および脳ホモジェネートに *t*-BuOOH を反応させ、スピントラップ剤として DMPO を用いた場合、アルキルラジカルや $\cdot OH$ が検出され、遊離肝細胞および脳ホモジェネートを *t*-BuOOH で刺激するとラジカル種が発生することが確認できた。このラジカルに対して、人参養栄湯は $\cdot OH$ を消去したが、アルキルラジカルの消去作用は認められなかった。また、遊離肝細胞

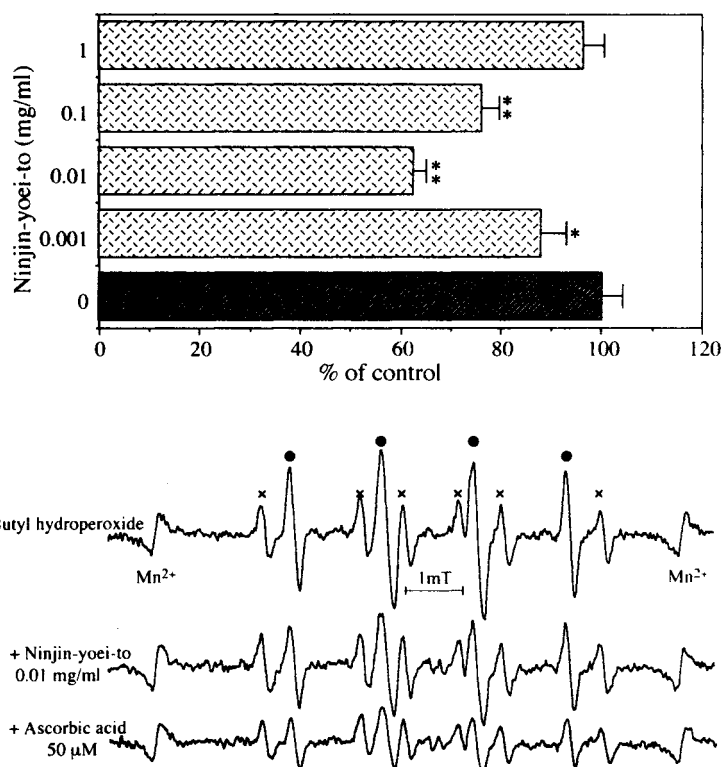


Fig. 5 Effect of Ninjin-yoei-to on DMPO-OH formation in brain homogenate exposed to *t*-BuOOH

Upper: The generation of hydroxyl radicals induced *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) without any radical scavenger was taken as 100 % control. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5 determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control (ANOVA with Dunett's multiple comparison).

Lower: ESR spectra detected in the brain homogenate exposed to *t*-BuOOH with and without Ninjin-yoei-to or ascorbic acid. Spin adducts of hydroxyl radicals (●) and carbon centered radicals (×).

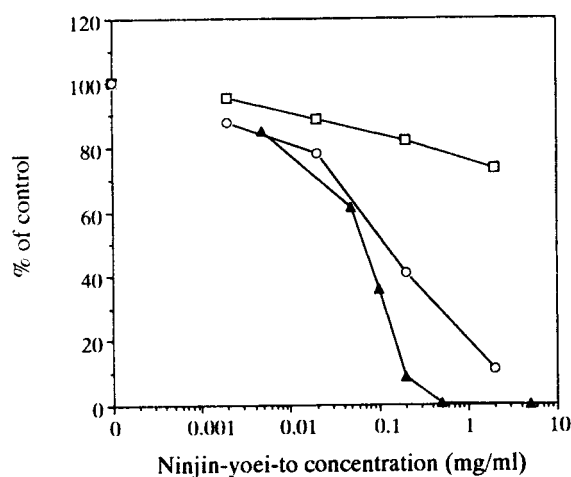


Fig. 6 Free radical scavenging activity of Ninjin-yoei-to in vitro

○—○ : superoxide, □—□ : hydroxyl radical, ▲—▲ : DPPH radical

を用いた場合、人參養榮湯の・OH消去作用は濃度依存性であったが、脳ホモジェネートでは、高濃度で・OH消去作用は認められなかった。この理由は不明であるが、漢方薬には濃度依存性が見られないこともあることや、今回用いた遊離肝細胞と脳ホモジェネートでは試料の作製条件が異なることが考えられる。また、肝臓と脳の細胞膜の脂質中に局在し、フリーラジカルにより攻撃され、過酸化を受けやすい多価不飽和脂肪酸を持つリン脂質（フォスファチジルコリンやフォスファチジルエタノールアミン）の含量に相違があることや細胞内には内因性抗酸化物質であるビタミンC、ビタミンE、グルタチオンなどが存在し、それらと漢方薬との反応でさらに相違した抗酸化物質が生成したり、またそれらの含量に相違があることから、人參養榮湯の・OH消去作用が相違したものと考えられる¹⁵⁾。

今回の検討の成績から、人參養榮湯には O_2^- ・OHお

よび DPPH ラジカルを強く消去し、遊離肝細胞や脳ホモジェネートから派生するラジカルをも消去することが判明した。このことより人參養榮湯のもつこれら効能の作用機序にフリーラジカル消去作用が関与していることが示唆された。

結 論

人參養榮湯の効能・効果の作用機序の解明の一助として、 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 を加えて派生するフリーラジカルに対する人參養榮湯の効果を in vitro で検討した。人參養榮湯は 0.002 mg/ml から濃度依存的にこれらのラジカルを消去したが、その強さは DPPH ラジカル $> O_2^- > \cdot OH$ の順であった。一方、遊離肝細胞および脳ホモジェネートに 1 mM t-BuOOH を加え、そこから派生するラジカルをスピントラップ剤 DMPO で捕捉し、ESR spectrometer で測定すると、アルキルラジカルや $\cdot OH$ が検出された。人參養榮湯は 0.001 mg/ml から濃度依存的にこの系で派生する $\cdot OH$ を消去したが、アルキルラジカルの消去は見られなかった。また、このフリーラジカル消去作用は抗酸化剤として知られている ascorbic acid ほどではないが、かなり強いフリーラジカル消去能を有しており、人參養榮湯の効能・効果の作用の一因にフリーラジカル消去作用が関与している可能性がある。

References

- 1) Aoyagi, K. and Narita, M.: Free radicals in renal disease. *Free Rad. Clin. Med.* **4**, 129-134, 1990.
- 2) Hatano, T., *et al.*: Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016-2021, 1989.
- 3) Bors, W. and Saran, M.: Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Rad. Res. Comms.* **2**, 289-294, 1987.
- 4) 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.
- 5) Free radical and Wakan-yaku. (Eds. by Okuda, T. and Yoshikawa, T.) Kokusai Isho Shupan, Tokyo, 1990.
- 6) 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.
- 7) Hiramatsu, M., Edamatsu, R., Kata, H. and Mori, A.: Inhibitory effect of Tsumura Sho-saiko-to-go-keishi-ka-shakuyaku-to (TJ-960) on Iron-induced Epileptic Discharges in rats. *Clin. Report* **21**, 4895-4901, 1987.
- 8) Uchiyama, T., Kamikawa, H. and Ogita, Z.: Anti-ulcer effect of extract from phellodentri cortex. *YAKUGAKU ZASSHI* **109**, 672-676, 1989.
- 9) Larson, R.A.: The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 769-978, 1988.
- 10) Husain, S.R., Cillard, J. and Cillard, P.: Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem.* **26**, 2489-2491, 1987.
- 11) Fujita, Y., *et al.*: Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. I. Inhibition mechanism of tannins on Cu (II)-catalyzed autoxidation of ascorbic acid. *YAKUGAKU ZASSHI* **107**, 17-22, 1987.
- 12) Burton, G.W., Le Page, Y., Gabe, E.J. and Ingold, K.U.: Antioxidant activity of vitamin E and related phenols. Importance of stereoelectric factors. *J. Amer. Chem. Soc.* **102**, 7791-7792, 1980.
- 13) Niki, E.: Interaction of ascorbate and α -tocopherol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **498**, 186-198, 1982.
- 14) 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.
- 15) Miyazawa, T., Suzuki, T., Fujimoto, K. and Yasuda, K.: Chemiluminescent simultaneous determination of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidyl ethanolamine hydroperoxide in the liver and brain of the rat. *J. Lipid Res.* **33**, 1051-1059, 1992.