

成熟去勢雌ラットに対する漢方薬補中益気湯の骨 ならびにステロイドホルモンへの影響

左雨 秀治,*^{a)}坂本 忍,^{a)}三田村 匡,^{a)}篠田 壽^{b)}

^{a)}東京医科歯科大学難治疾患研究所機能・調節疾患研究部門 (形質発現)

^{b)}東北大学歯学部歯科薬理学教室

Effects of the Kampo medicine Hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang) on the bone mass and serum levels of steroid hormones in ovariectomized adult rats

Shuji SASSA,*^{a)} Shinobu SAKAMOTO,^{a)} Tadasu MITAMURA,^{a)} Hisashi SHINODA^{b)}

^{a)}Department of Functional Genomics, Division of Functional Disorder Research, Medical Research Institute,
Tokyo Medical and Dental University, ^{b)}Department of Pharmacology, School of Dentistry, Tohoku University

(Received March 18, 1999. Accepted May 19, 1999.)

Abstract

Kampo medicines Hochu-ekki-to (HET) has been used at the convalescent stage after diseases or surgery, and for the treatment of patients with tuberculosis, appetite loss and gastroparesis. Recently, it was reported that HET cured bone loss induced with the absorption disorder of calcium from the gastrointestinal tracts in the gastrectomized patients.

In the present study, we investigated the effects of HET on the bone mineral density in the senior ovariectomized rats. Sprague-Dawley female rats were castrated at the age of 9 weeks and given HET (50 mg/100 g of body weight/day : Tsumura Co., Tokyo) suspended in distilled water by gastric tubes from the age of 35 weeks for 8 weeks. Control animals were given distilled water alone as a control vehicle. Oral administration of HET led to the increase of serum alkaline phosphatase activity which indicated the activity of bone metabolism, and significantly augmented the serum levels of progesterone (P₄) and estradiol (E₂) despite the ovariectomized rats. In fact, the bone mineral density was significantly enhanced in the whole and metaphysis of tibia.

These findings may indicate that HET augments the bone mineral density, which is influenced by elevated serum estradiol levels, and are led by the activation of aromatization on dehydroepiandrosterone sulfate, that is metabolized from progesterone, of which synthesis is accelerated in adrenal.

Key words Hochu-ekki-to, Osteoporosis and Kampo, Osteoporosis and Hochu-ekki-to, Bone Mineral Density and Hochu-ekki-to.

Abbreviations Hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang), 補中益気湯; ALP, Alkaline phosphatase; BMD, Bone Mineral Density; Cr, Creatinine; CT, Calcitonin; DHEA-S, Dehydroepiandrosterone sulfate; E₂, Estradiol; P₄, Progesterone.

緒 言

近年、高齢化社会に成りつつある日本でも高齢者の Quality of Life が問題となっており、特に婦人の閉経期以降における骨のリモデリングのアンバランスによって起こる骨粗鬆症は、大きな社会問題で、未だ決定的な治療法は見つかっていない。我々は、西洋医学から東洋医学へ視点を変えて、漢方薬による骨粗鬆症への効果について骨量と骨関連ホルモン値に関して検討することにした。使用する漢方薬は、消化機能の衰え、四肢の倦怠感が著しい虚弱体質の人に用いられる補中益気湯で、近年胃の切除による骨粗鬆症の患者にこの漢方薬を投与した結果、骨量の減少を抑制あるいは骨量を増加させるという報告¹⁾が見られる。しかし、去勢や老齢ラットを骨粗鬆症モデルとした骨量への研究報告は見られない。そこで、9週齢の成熟雌ラットの両側卵巣を摘出して26週間放置したラットの骨粗鬆症モデルを作成し、補中益気湯の作用を骨量と血中ホルモン、血中カルシウムやアルカリフォスファターゼ値等の点から影響を考察した。なお、補中益気湯の一般的な効能は、病後や術後の体力増強、食欲不振、子宮下垂、陰萎や半身不随等の治療薬となっている。

材料と方法

- (1) **漢方薬**：今回使用した漢方薬は、補中益気湯 (TJ-41) (Lot No.260041010) のエキスを末で(株)ツムラより供与されたものである。なお、補中益気湯の構成生薬ならびに構成比は、黄耆 (4.0 g)、蒼朮 (4.0 g)、人參 (4.0 g)、当歸 (3.0 g)、柴胡 (2.0 g)、大棗 (2.0 g)、陳皮 (2.0 g)、甘草 (1.5 g)、升麻 (1.0 g)、生姜 (0.5 g) の10種類である。なお、ヒトには、1日7.5 g (5.0 gのエキスを末含有) 投薬される。
- (2) **動物実験**：生後7週齢の Sprague-Dawley 系雌ラット40匹を購入し、2週間予備飼育して実験に供した。生後9週齢で32匹のラットの両側卵巣を摘出し、26週間放置して骨粗鬆症モデルラットとして投与実験を行った。残り8匹のラットは、正常な対照群 (Normal-Control 群) として無処置である。32匹の骨粗鬆症モデルラットは補中益気湯を投与する群 (T 群)、エチニルエストラジオールを投与する群 (E 群)、補中益気湯とエチニルエストラジオールを同時投与する群 (T+E 群) ならびに蒸留水を投与する対照群 (OVX-Control 群) の4群各8匹ずつに分けた。投与方法は、ラット用経口ゾンデを用いて経口投与した。それぞれの試料の投与量は、補

中益気湯エキス末 50 mg/100 g 体重 (ヒト投与量の5倍)、エチニルエストラジオール 10 μ g/100 g 体重とし、Normal ならびに OVX-Control 群は、蒸留水 0.5 ml/100 g 体重とした。投与期間は、連日投与で8週間行った。

投与8週間目には、ラットを1匹ずつ代謝ケージに移して24時間尿の採取を行った。採取した尿量を測定し、少量のトルエンを加えて4°Cで保存した。最終投与24時間後にエーテル麻酔下で心臓穿刺により2.5mlの血液を採取し、ヘパリンを添加し3,000 rpm, 4°Cで20分間遠心分離した後、血清をホルモンおよび生化学の定量時まで-30°Cで保存した。なお、エーテル麻酔による血中ホルモンへの影響が出ないように各ラット5分以内に採血を終了した。採血後ラットを屠殺し、子宮、副腎ならびに脾臓の湿重量の測定を行った。さらに、骨量の測定用に両後肢脛骨を採取し、骨量測定時まで99.5%アルコールに固定して保存した。ラットの飼育は、室温23 $\pm$ 1°C、湿度50 $\pm$ 10%、1日14時間(6:00~20:00)照明下で固形飼料と水は自由に摂取させた。

(3) **ホルモンの定量**：血中プロゲステロン (P_4) およびエストラジオール (E_2) の測定には、日本 DPC コーポレーション販売による 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とを使用し、測定内再現性の変動係数は、 P_4 が7.2%、 E_2 では4.8%であった。また、血中デヒドロエピアンドロステロン-サルフェート (DHEA-S) およびカルシトニン (CT) の測定には、三菱化学社製 DHEA-サルフェート RIA「ミツビシ」とカルシトニン RIA「ミツビシ」キットを使用し、測定内再現性の変動係数は、DHEA-S が3.0%、CT が2.8%であった。

(4) **生化学定量**：血中カルシウム (Ca)、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) ならびに血中および尿中クレアチニン (Cr) の測定には、(株)和光純薬工業製の「カルシウム C-テストワコー」、「アルカリ性ホスファ B-テストワコー」ならびに「クレアチニン-テストワコー」キットを用い、比色法により値を求めた。

(5) **骨量の定量**：採取した後肢脛骨を軟X線レントゲン撮影装置 Softex-40 を使用して標準の指標と共に X 線

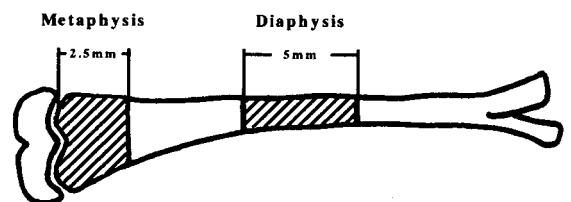


Fig. 1 Bone mineral density analyses of tibial metaphysis and diaphysis parts.

撮影を行い、撮影したフィルムを画像解析装置によって各脛骨の骨量定量を行った。解析部位は、Fig. 1 に示す様に脛骨全体および骨幹端 (Metaphysis) 2.5 mm と骨幹部 (Diaphysis) 5 mm の部分解析を行った。

(6) 統計学的解析：測定結果の平均値は、mean±S.E.M. で表し、統計学的解析は、smirnoff's 棄却検定による student's *t*-test あるいは cochran-cox test を用いて行った。

結 果

1. 脛骨の骨量

後肢の脛骨全体の Bone Mineral Density (BMD) は、Fig. 2 に示す如く OVX-Control 群が $753.8 \pm 11.0 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ であるのに対して T 群は $793.1 \pm 13.8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, E 群では $788.8 \pm 8.1 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, T+E 群は $794.8 \pm 14.8 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ならびに Normal-Control 群では $803.4 \pm 13.3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ となり、T, E, T+E 群ならびに Normal-Control 群で OVX により低下した骨密度が有意 ($p < 0.05$) な高値を示した。

部分解析の骨幹端の BMD は、Fig. 3 に示すように OVX-Control 群では $853.2 \pm 13.3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ であるのに対して T 群が $911.0 \pm 22.1 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, E 群が $983.7 \pm 22.9 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, T+E 群が $928.5 \pm 16.7 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ならびに Normal-Control 群が $1067.4 \pm 24.1 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ となり、OVX-Control 群に比して各群で OVX により低下した骨密度が有意 (T; $p < 0.05$, E, T+E; $p < 0.01$, Normal-Control; $p < 0.001$) な高値を示した。

もう一方の骨幹部の BMD は、Fig. 4 に示す如く OVX-

Control 群が $705.7 \pm 8.9 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ であるのに対して T 群は $730.3 \pm 16.7 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, E 群では $728.3 \pm 14.6 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, T+E 群では $728.9 \pm 14.1 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ならびに Normal-Control 群で $694.5 \pm 9.0 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ となり各群間に有意な差は認められなかった。

2. ホルモンの定量

血中 P_4 は、Fig. 5 に示すように OVX-Control 群が $3.63 \pm 0.46 \text{ ng/ml}$ であるのに対して T 群では $7.33 \pm 0.67 \text{ ng/ml}$, E 群では $6.05 \pm 0.75 \text{ ng/ml}$, T+E 群では $4.95 \pm 0.59 \text{ ng/ml}$ ならびに Normal-Control 群で $21.74 \pm 7.78 \text{ ng/ml}$ を示し、OVX-Control 群に比して T 群, E 群および Normal-Control 群で有意 (T, Normal-Control;

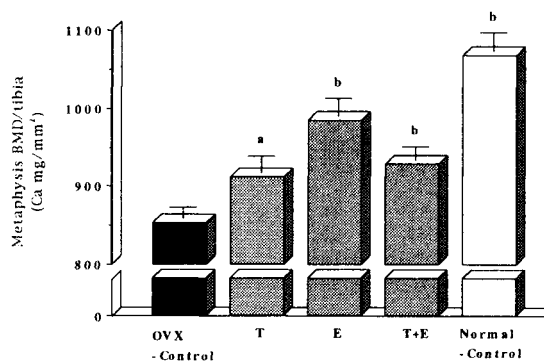


Fig. 3 Effect of Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol on metaphysis BMD of tibia in ovariectomized adult rats. T: Hochu-ekki-to group, E: 17α -ethynylestradiol group, T+E: Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol group. Significantly different from OVX-Control group: ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$.

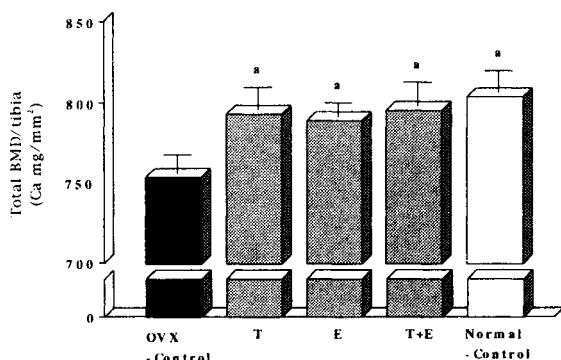


Fig. 2 Effect of Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol on whole tibia BMD in ovariectomized adult rats. T: Hochu-ekki-to group, E: 17α -ethynylestradiol group, T+E: Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol group. Significantly different from OVX-Control group: ^a $p < 0.05$.

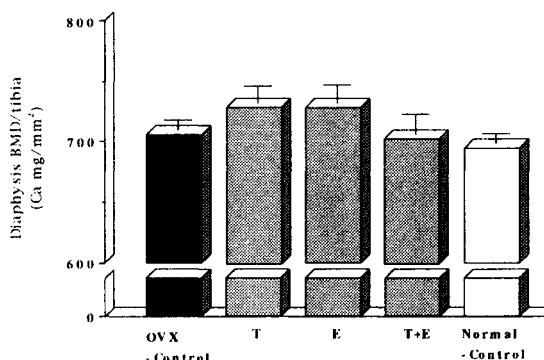


Fig. 4 Effect of Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol on diaphysis BMD of tibia in ovariectomized adult rats. T: Hochu-ekki-to group, E: 17α -ethynylestradiol group, T+E: Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol group.

$p < 0.001$, E; $p < 0.05$) な増加が認められた。

血中 DHEA-S は, Fig. 6 に示すように OVX-Control 群が 3.87 ± 0.64 ng/ml であるのに対して T 群では 5.20 ± 0.34 ng/ml, E 群で 8.12 ± 0.30 ng/ml, T+E 群では 6.72 ± 0.30 ng/ml ならびに Normal-Control 群で 10.47 ± 0.89 ng/ml となり OVX-Control 群に比して E 群, T+E 群および Normal-Control 群で有意 (E, Nor-

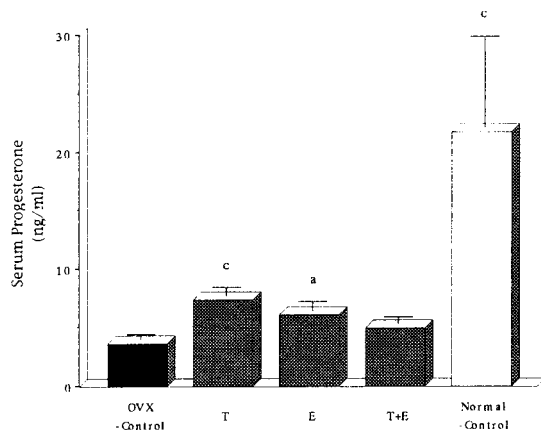


Fig. 5 Effect of Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol on serum progesterone (P_4) levels in ovariectomized adult rats.

T: Hochu-ekki-to group, E: 17α -ethynylestradiol group, T+E: Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol group. Significantly different from OVX-Control group: $^a p < 0.05$, $^c p < 0.001$.

mal-Control; $p < 0.001$, T+E; $p < 0.01$) な増加が認められ, T 群においても有意な差は認められなかったが, 増加傾向 ($p < 0.15$) を示した。

血中 E_2 は, Fig. 7 に示す如く OVX-Control 群が 0.60 ± 0.15 pg/ml であるのに対して T 群では 1.94 ± 0.32 pg/ml, E 群で 17.72 ± 1.94 pg/ml, T+E 群では 17.88 ± 1.92 pg/ml ならびに Normal-Control 群では $27.77 \pm$

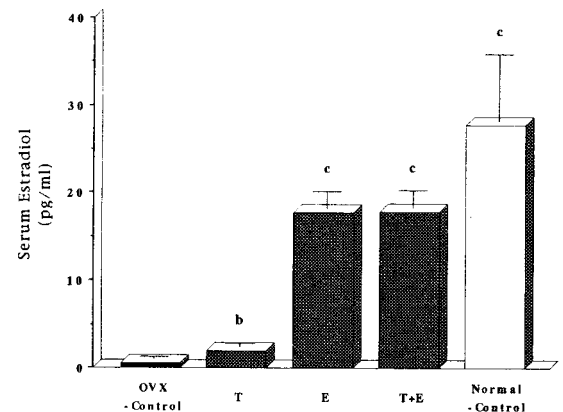


Fig. 7 Effect of Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol on serum estradiol (E_2) levels in ovariectomized adult rats.

T: Hochu-ekki-to group, E: 17α -ethynylestradiol group, T+E: Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol group. Significantly different from OVX-Control group: $^b p < 0.01$, $^c p < 0.001$.

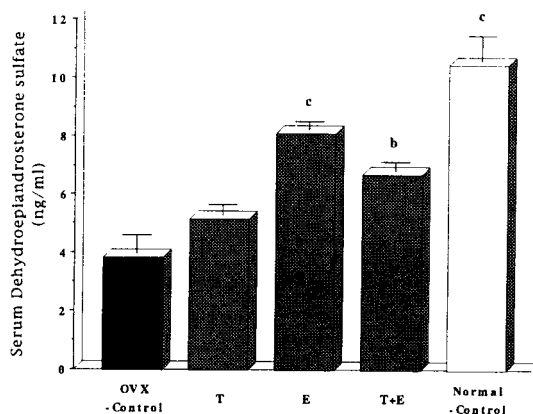


Fig. 6 Effect of Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol on serum dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) levels in ovariectomized adult rats.

T: Hochu-ekki-to group, E: 17α -ethynylestradiol group, T+E: Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol group. Significantly different from OVX-Control group: $^b p < 0.01$, $^c p < 0.001$.

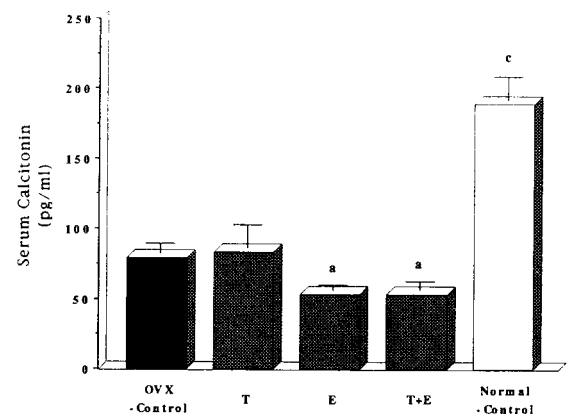


Fig. 8 Effect of Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol on serum calcitonin (CT) levels in ovariectomized adult rats.

T: Hochu-ekki-to group, E: 17α -ethynylestradiol group, T+E: Hochu-ekki-to and 17α -ethynylestradiol group. Significantly different from OVX-Control group: $^a p < 0.05$, $^c p < 0.001$.

Table I Effect of Hochu-ekki-to and 17 α -ethynylestradiol in ovariectomized adult rats on body weight, organ weight and serum composition and urinary creatinine.

Group	OVX-Control	T	T+E	E	Normal-Control
Body weight (g)	300.0 $\pm$ 6.4	310.3 $\pm$ 8.9	296.5 $\pm$ 7.2	297.1 $\pm$ 11.6	280.6 $\pm$ 5.4
adrenal (mg/100 g B.W.)	16.2 $\pm$ 0.3	17.7 $\pm$ 0.8	17.6 $\pm$ 0.9	15.9 $\pm$ 1.6	23.2 $\pm$ 0.9
uterus (mg/100 g B.W.)	26.3 $\pm$ 0.8	27.3 $\pm$ 1.0	123.3 $\pm$ 9.5 ^c	150.2 $\pm$ 14.3 ^c	204.6 $\pm$ 14.6 ^c
spleen (mg/100 g B.W.)	203.9 $\pm$ 7.9	205.4 $\pm$ 14.3	205.6 $\pm$ 9.9	192.7 $\pm$ 7.6	188.9 $\pm$ 9.4
serum ALP (IU/l)	105.4 $\pm$ 3.5	146.5 $\pm$ 9.6 ^a	124.3 $\pm$ 9.9	156.8 $\pm$ 18.0 ^a	115.0 $\pm$ 11.4
serum Ca (mg/dl)	9.76 $\pm$ 0.08	9.83 $\pm$ 0.16	10.09 $\pm$ 0.14	10.37 $\pm$ 0.13 ^b	10.90 $\pm$ 0.26 ^b
urine Cr (mg/24 h)	5.50 $\pm$ 1.18	7.94 $\pm$ 0.36	9.66 $\pm$ 0.71 ^b	8.75 $\pm$ 0.39 ^a	9.16 $\pm$ 0.52 ^a

T : Hochu-ekki-to group, E : 17 α -ethynylestradiol group, T+E : Hochu-ekki-to and 17 α -ethynylestradiol group.

Data represent means $\pm$ S.E.M. Significantly different from OVX-Control group : ^a p <0.05, ^b p <0.01, ^c p <0.001.

7.66 pg/ml となり, OVX-Control 群に比して各群とも有意 (T ; p <0.01, E, T+E ; p <0.001) な差を認めた。

血中 CT は, Fig. 8 に示すように OVX-Control 群が 79.3 $\pm$ 7.3 pg/ml であるのに対して T 群では 83.3 $\pm$ 16.5 pg/ml, E 群で 53.0 $\pm$ 4.1 pg/ml, T+E 群では 53.1 $\pm$ 6.7 pg/ml ならびに Normal-Control 群では 189.4 $\pm$ 16.6 pg/ml となり OVX-Control 群に比して E 群と T+E 群で有意 (p <0.01) な減少が認められた。しかし, T 群とは差が認められなかった。

3. 生化学定量

血中の ALP は, Table I に示すように OVX-Control 群が 105.4 $\pm$ 3.5 IU/l であるのに対して T 群では 146.5 $\pm$ 9.6 IU/l, E 群で 156.8 $\pm$ 18.0 IU/l, T+E 群では 124.3 $\pm$ 9.9 IU/l ならびに Normal-Control 群では 115.0 $\pm$ 11.4 IU/l となり OVX-Control 群に比して各群とも増加傾向を示し, T 群と E 群では有意 (p <0.05) な増加が認められた。

血中 Ca も ALP 同様 Table I に示す通り, OVX-Control 群が 9.76 $\pm$ 0.08 mg/dl であるのに対して T 群では 9.83 $\pm$ 0.16 mg/dl, E 群で 10.37 $\pm$ 0.13 mg/dl, T+E 群では 10.09 $\pm$ 0.14 mg/dl ならびに Normal-Control 群では 10.90 $\pm$ 0.26 mg/dl となり OVX-Control 群に比して高値傾向を示し, E 群および Normal-Control 群では有意 (E, Normal-Control ; p <0.01) な高値が認められた。

次に尿中 Cr であるが, これも Table I に示したように OVX-Control 群が 5.50 $\pm$ 1.18 mg/24hr であるのに対して T 群では 7.94 $\pm$ 0.36 mg/24 hr, E 群で 8.75 $\pm$ 0.39 mg/24 hr, E+T 群では 9.66 $\pm$ 0.71 mg/24 hr ならびに Normal-Control 群では 9.16 $\pm$ 0.52 mg/24hr となり各群とも高値傾向を示し, E 群, E+T 群および Normal-Control 群では有意 (E, Normal-Control ; p <0.05, T+

E ; p <0.01) な高値が認められた。なお, 各臓器の湿重量は, Table I に示すように Normal-Control 群以外での各実験群間に有意な差は認められなかった。

考 察

補中益気湯を投与した T 群の後肢脛骨全体の BMD は, OVX-Control 群に比較して, 有意差のあった Normal-Control 群 (6.6 % 増) や E 群 (4.6 % 増) ならびに T+E 群 (5.4 % 増) と同等の 5.2 % 増の BMD を示した。また, 部分解析では, 補中益気湯を投与した T 群は OVX-Control 群と比較して骨幹端で 6.8 % 増加の BMD で有意な高値が得られたことは, 骨量の減少の大きい部分での差なので信頼性が高いと推察される。卵巣摘出ではないが, 胃全摘出ラットを用いた骨吸収障害に対する補中益気湯の作用について鈴木等が行った研究では, 破骨細胞による骨吸収を抑制し, 骨形成亢進が認められたと報告²⁾している。また, 骨幹部での BMD は T 群が Normal-Control 群や他の投与群よりも 3.6 % 増加の高値傾向が見られたが, その作用機序については不明である。ただ, これまで種々の漢方薬 (温経湯, 加味逍遙散, 八味地黄丸など) を用いた骨量研究においても骨幹部で対照群に比較して BMD が高値傾向を認めた漢方薬が多いという印象を得ている。血中ステロイドホルモンについて検討すると補中益気湯を投与した T 群で P₄ および E₂ 値が OVX-Control 群に比して有意に高値を示したことは, 投与した補中益気湯が副腎に働き P₄ の分泌を活発にし, P₄ から DHEA-S に代謝され, さらにアロマターゼの活発化によりエストロゲンへの代謝が促進され, E₂ 値が卵巣が欠如しているにも関わらずに有意な高値を示したと推察された。このアロマターゼの活

性を促進する漢方薬に含まれる生薬について検討すると生薬の甘草はエストロゲン様作用などがあるとされているが、我々³⁾や太田等⁴⁾の研究ではアロマターゼの活性化は認められなかった。その他の生薬の中でアロマターゼの活性化に関連がある生薬は、黄耆と升麻が考えられ、前者は、雌ラットの性周期の発情を惹起するという報告⁵⁾があり、後者の升麻にはステロイドの β -sitosterolや視床下部・下垂体に作用する isoferulic acid が含まれており、一方あるいは両方の生薬が DHEA-S からエストロゲンへの芳香化酵素のアロマターゼ活性を亢進したのではないかと推察された。なお、各生薬の視床下部・下垂体-性腺系への作用については、今後の研究で解明したい。また、CT 値に対する補中益気湯の影響は認められなかったが、エチニルエストラジオールでの有意な抑制作用が認められた。

血中 ALP 値は、OVX により Normal-Control 群に比して抑制傾向を示したが、補中益気湯あるいはエチニルエストラジオールの単独ならびに併用投与により有意な増加が認められたことは、骨代謝が促進されている証明であり、尿中 Cr 値が OVX により減少したものが、補中益気湯あるいはエチニルエストラジオールの単独、併用投与により増加が認められたことも骨代謝促進のひとつの指標である。以上の結果、補中益気湯やエチニルエストラジオールの単独・併用投与により長期去勢雌ラットの低回転の骨代謝を亢進し、骨塩量の増加が骨吸収有意の状態から骨形成有意へと改善している証明である。つまり、補中益気湯やエチニルエストラジオールは、骨代謝を促進して骨塩量を増加させることが示唆された。

結 語

補中益気湯が胃切除患者の骨障害に対して有効であるという報告からヒントを得て、骨粗鬆症患者に対しても有効ではないだろうかと考え、卵巣摘出ラットを長期間

放置した骨粗鬆症モデルラットを用いて骨量や内分泌動態の観点から検討を加えた。

補中益気湯の投与により血中 ALP 値が有意な増加を示したことは、骨代謝マーカーの観点から観ると骨の代謝の亢進を示唆している。また、卵巣がないにも関わらず血中 P_4 さらには E_2 値に有意な増加を認めたことは、ステロイド合成臓器である副腎での P_4 合成から DHEA-S への代謝が考えられ、さらに、アロマターゼ活性の亢進により E_2 が有意に増加したものと推察された。これらのステロイドの増加がラット後肢脛骨の骨塩量の骨幹端での有意な増加に導き、脛骨全体でも増加へと導いたものと推察された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、試料の御提供を頂いた(株)ツムラに深く感謝致します。また、この研究に御協力頂いた動物施設の関係者に感謝致します。

References

- 1) Suzuki, Y., Kasiwagi, H., Takaoka, T., Aoki, T. : I setujogo kotushougai ni taisuru chiryo (胃切除後骨障害に対する治療). *Gendai Iryogaku* (現代医療学) **10** (2), 205-209, 1995.
- 2) Suzuki, Y., Takaoka, T., Kasiwagi, H., Aoki, T. : I zentekigo kotsushougai model ni taisuru TJ-41 no jikkenteki kento (胃全摘後骨障害モデルに対する TJ-41 の実験的検討). *Prog. Med.* **16** (5), 1514-1516, 1996.
- 3) Sassa, S., Kato, T., Sakamoto, S. : Effects of Glycyrrhizin on Steroid Hormones and Calcium Metabolism in the Ovariectomized Adult Female Rat. *Folia Endocrinol.* **73** (4), 521-528, 1997.
- 4) Ota, H., Fukushima, M., Maki, M. : Stimulatory Action of Shakuyaku on Aromatase Activity in Cultured Rat Follicles. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* **41** (5), 525-529, 1989.
- 5) Nagasawa, M., Takahashi, T. : Kanyaku Ougi no kenkyu (漢薬黄耆の研究). *Igakuchunouzasshi* (医学中央雑誌) **73**, 589-594, 1941.