

ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおける 八味地黄丸の効果

彰 一祐, 福井 光峰, 堀内 智英, 浅沼 悦子, 富野康日己*

順天堂大学医学部腎臓内科

Effects of Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan) on renal function in streptozotocin induced diabetic rats

Ichiyu SHOU, Mitsumine FUKUI, Tomohide HORIUCHI, Etsuko ASANUMA, Yasuhiko TOMINO*

*Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine,
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan.*

(Received October 15, 2002. Accepted January 17, 2003.)

Abstract

The effects of Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan) on the proteinuria, renal function and urinary excretion of nitric oxide were investigated in streptozotocin-induced diabetic nephropathic rats. In the diabetic rat model, urinary albumine excretion was higher, while urinary nitric oxide excretion was lower, compared to each in non-diabetic Sprague-Dawley rats. Administration of 0.8% Hachimi-jio-gan in the diet for 16 weeks to the diabetic rats resulted in decreasing urinary albumine excretion and increasing urinary nitric oxide excretion. Furthermore, the treatment decreased creatinine clearance and the ratio of renal glomerular tuft to Bowman's areas; the increments of which suggest glomerular pressure increase. These results suggested that Hachimi-jio-gan possesses renal protective activity, and may be an effective remedy for the treatment of early-stage of diabetic nephropathy and the suppression of its progression.

Key words Hachimi-jio-gan, diabetic rat, albuminuria, urinary nitric oxide excretion.

緒 言

現在, 末期腎不全から透析療法を受けている患者総数は22万人になろうとしているが, その原因の一つに糖尿病性腎症から腎不全に進行する症例が急激に増加していることがあげられる。糖尿病性腎症に対しては, 厚生労働省糖尿病調査研究班で臨床病期分類が提唱され, 病期にしたがった治療法のガイドラインが示されている。言われるまでもなく早期発見と早期治療が重要である。一方, 柴苓湯をはじめとする各種の漢方薬が, 腎炎やネフローゼ症候群患者に投与され, その効果が報告されている^{1,2,3)}。また, 腎機能に対しても幾つかの漢方薬が改善効果を示すという報告がなされ⁴⁾, 各動物実験モデルに

においても基礎的な検討がなされている^{5,6,7)}。漢方薬による糖尿病性腎症に対する基礎的・臨床的検討の報告^{8,9)}もあるが十分にはなされていない。今回, 私達はストレプトゾトシン (streptozotocin: STZ) 誘発糖尿病ラットを用い, 八味地黄丸の蛋白尿, 腎機能ならびに尿中 nitric oxide (NO) に対する影響を検討したので報告する。

材料と方法

材料

(1) 動物: 動物は, Sprague Dawley (SD) ラット (雄性, 8 週齢, 体重 220 g 前後) 30 匹を用いた。STZ 誘発糖尿病ラットは, STZ 45 mg/kg 体重を尾静脈から静脈

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: yasu@med.juntendo.ac.jp

Table I Compositions of the crude drugs that constitute Hachimi-jio-gan (TJ-7)

Constituent	Japanese name	ratio
Rhmanniae Radix	Jio	6.0
Corni Fructus	Sanshuyu	3.0
Dioscoreae Rhizoma	Sanyaku	3.0
Alismatis Rhizoma	Takusha	3.0
Hoelen	Bukuryo	3.0
Moutan Cortex	Botampi	2.5
Cinnamomi Cortex	Keihi	1.0
Aconiti Tuber	Bushi	0.5

内投与し作成した。空腹時血糖 (fasting blood glucose: FBG) が 300 mg/dl 以上を STZ 誘発糖尿病ラットとして使用した。

(2) 投与薬剤：株式会社ツムラより供与された八味地黄丸 (TJ-7) は、地黄、山茱萸、山薬、沢瀉、茯苓、牡丹皮、桂皮、附子など 8 種類の生薬で構成された乾燥エキス末である (Table I)。医療用製剤のヒト常用量は、7.5 g/日 (乾燥エキス末 4.0 g/日含有) である。この乾燥エキス末を 0.8% の濃度で混じた餌を 4 週間または 16 週間自由摂取にて経口投与した。

方法

(1) 群構成：動物は、6 群に群分けした。すなわち、非糖尿病ラット (正常対照) 群 (SD, n=10), STZ 誘発糖尿病ラット群 (SD+DM, n=10), STZ 誘発糖尿病ラット八味地黄丸投与群 (SD+DM+TJ-7, n=10) の 3 群に分け、各群はさらにそれぞれ 4 週間および 16 週間観察の 2 群に分けた。

(2) 臨床検査：観察期間終了後 (4 週・16 週後)、屠殺前日から絶食にてメタボリックケージ内で 24 時間蓄尿を行い、試料となる尿は -80°C にて保存した。屠殺日に、体重測定後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下 (50mg/kg, ip) に腹部大動脈より EDTA 含有採血ののち放血致死させて、腎臓を採取した。尿試料は、Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical Co., MI, USA) を用いたグリース反応法^{10,11)} により Nitrate + Nitrite ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-; \text{NO}_x$) を、ELISA 法¹²⁾ により尿中アルブミン (Alb) 排泄量を測定し、体重にて補正した。また、Jaffe 法¹³⁾ により尿中クレアチニン (Cr) 値を測定し、クレアチニンクリアランス (Ccr)/体重比の算出に用いた。血液試料からは、空腹時血糖 (FBG) 値、血清クレアチニン (s-Cr) 値を測定した。

(3) 病理組織学的検討：採取した腎臓は、重量を計測後直ちに 10% ホルマリン溶液にて固定し、HE 染色および PAS 染色を行い、光学顕微鏡にて各検体につき総計 50 個の糸球体を観察した。semiautomatic image analysis system (IBAS; Carl Zeiss Co., Oberkochen, Germany) により糸球体面積 (GT; glomerular tuft areas) およびボーマン嚢面積 (BW; Bowman's areas) を計測し^{14,15)}、同時に糸球体/ボーマン嚢面積比 (GT/BW) を計算した。

(4) 統計学的処理：それぞれの測定結果は、平均値 ± 標準誤差 (mean ± SE) で表した。群間の比較は one-way analysis of variance (ANOVA) により解析し、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

Table II Laboratory data

		FBG (mg/dl)	Body weight (g)	Ccr/BW (ml/min/kg)
<4weeks>				
SD	(n=5)	128 ± 5.50**	282 ± 4.77**	3.78 ± 0.30**
SD+DM	(n=5)	385 ± 14.7	236 ± 7.48	5.42 ± 0.48
SD+DM+TJ-7	(n=5)	387 ± 9.78	237 ± 3.58	5.44 ± 0.86
<16weeks>				
SD	(n=5)	119 ± 2.72**	392 ± 3.79**	3.86 ± 0.70**
SD+DM	(n=5)	404 ± 8.03	221 ± 4.46	6.33 ± 1.34
SD+DM+TJ-7	(n=5)	381 ± 13.4**	250 ± 3.06**	5.79 ± 1.53**

Results are means ± S.E.

** $p < 0.01$ vs SD+DM

SD: untreated Sprague Dawley rat

SD+DM: streptozotocin induced diabetic rat

SD+DM+TJ-7: streptozotocin induced diabetic rat administrated with Hachimi-jio-gan (TJ-7)

FBG: fasting blood glucose

Ccr: creatinine clearance

BW: body weight

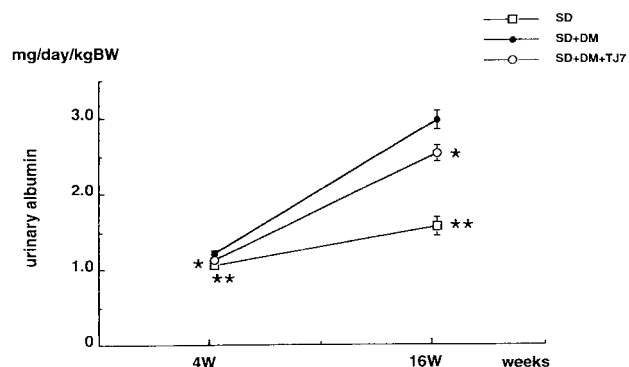


Fig. 1 Alteration of urinary albumin excretion during the administration with 0.8% Hachimi-jio-gan in the diet.

At week 4 and week 16 of administration period, urine samples were collected for 24 hours from all animals in an individual metabolic cage without food. Amounts of albumin in the urine samples were measured by the method of Jaffe.

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of five rats.

SD : untreated Sprague Dawley rat

SD+DM : streptozotocin induced diabetic rat

SD+DM+TJ-7 : streptozotocin induced diabetic rat administrated with Hachimi-jio-gan (TJ-7)

* $p<0.05$ compared with SD + DM

** $p<0.01$ compared with SD + DM

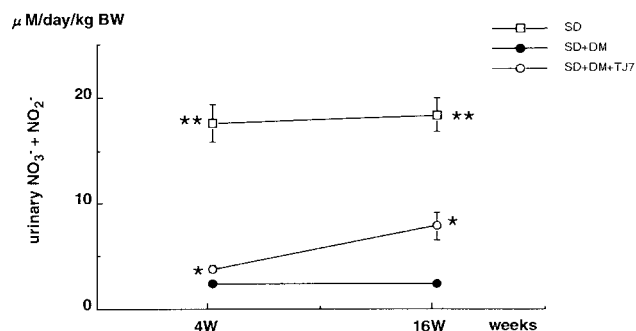


Fig. 2 Alteration of urinary NOx excretion during the administration with 0.8% Hachimi-jio-gan in the diet.

At week 4 and week 16 of administration period, urine samples were collected for 24 hours from all animals in an individual metabolic cage without food. Amounts of nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) in the urine samples were measured using with colorimetric assay kit (Cayman Chemical Co., MI, USA).

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of five rats.

SD : untreated Sprague Dawley rat

SD+DM : streptozotocin induced diabetic rat

SD+DM+TJ-7 : streptozotocin induced diabetic rat administrated with Hachimi-jio-gan (TJ-7)

* $p<0.05$ as compared with SD + DM

** $p<0.01$ as compared with SD + DM

結 果

1. 臨床検査

空腹時血糖値 (FBG), 体重およびクレアチニンクリアランス (Ccr) の結果は, Table II に示した。FBG, 体重, Ccr/BW の値は八味地黄丸の投与により 16 週目には正常群の値にまでは至らないものの, 非投与糖尿病群に比べ有意に改善していた ($p<0.01$)。一方, 糖尿病群の 24 時間尿量 (4 週目; 31.2 ± 1.9 ml, 16 週目; 92.0

± 2.6 ml) は非糖尿病群 (4 週目; 8.2 ± 0.7 ml, 16 週目; 14.2 ± 1.4 ml) に比べ有意に増加していたが (ともに, $p<0.01$), 糖尿病ラットの八味地黄丸投与群 (4 週目; 28.8 ± 2.4 ml, 16 週目; 91.0 ± 3.3 ml) と非投与群の間には有意差は認められなかった。尿中アルブミン排泄量は, 糖尿病ラットではともに経時的に増加していたが, 16 週目における八味地黄丸投与群 (2.46 ± 0.11 mg/day/kgBW) では非投与糖尿病群 (2.90 ± 0.12 mg/day/kgBW) に比べ有意に低下した ($p<0.05$, Fig. 1)。また, 尿中 NOx の 1 日排泄量は Fig. 2 に示すように, 4 週目の非投与糖

Table III Measurement of glomerular tuft and Bowman's areas by light microscopy

		BW ($\times 1000 \mu\text{m}^2$)	GT ($\times 1000 \mu\text{m}^2$)	GT/BW (%)
<4weeks>				
SD	(n=5)	$9.04 \pm 0.30^*$	$7.15 \pm 0.26^*$	$78.79 \pm 0.65^*$
SD+DM	(n=5)	10.17 ± 0.17	8.48 ± 0.14	83.41 ± 0.72
SD+DM+TJ-7	(n=5)	10.02 ± 0.24	8.25 ± 0.20	82.40 ± 0.74
<16weeks>				
SD	(n=5)	$8.60 \pm 0.22^*$	$6.92 \pm 0.19^*$	$80.50 \pm 0.91^{**}$
SD+DM	(n=5)	10.41 ± 0.10	8.57 ± 0.10	83.13 ± 0.48
SD+DM+TJ-7	(n=5)	$9.52 \pm 0.17^*$	$7.64 \pm 0.15^*$	$80.08 \pm 0.82^*$

Results are means $\pm$ S.E.

* $p<0.01$ vs SD+DM

** $p<0.05$ vs SD+DM

SD: untreated Sprague Dawley rat

SD+DM: streptozotocin induced diabetic rat

SD+DM+TJ-7: streptozotocin induced diabetic rat administrated with Hachimi-jio-gan (TJ-7)

BW: Bowman's areas

GT: glomerular tuft areas

尿病群 ($1.90 \pm 0.13 \mu\text{M/day/kgBW}$) では正常群 ($17.10 \pm 1.79 \mu\text{M/day/kgBW}$) に比べ有意に低下していた ($p < 0.01$)。八味地黄丸の投与では、4週目の時点 ($3.26 \pm 0.40 \mu\text{M/day/kgBW}$) で非投与糖尿病群 ($1.90 \pm 0.13 \mu\text{M/day/kgBW}$) に比べすでに有意に高値を示していた ($p < 0.05$)。16週目では八味地黄丸投与群の尿中 NO_x の1日排泄量 ($7.39 \pm 1.31 \mu\text{M/day/kgBW}$) は、非投与糖尿病群 ($1.92 \pm 0.23 \mu\text{M/day/kgBW}$) に比べさらに有意に増加した ($p < 0.01$)。一方、非投与糖尿病群では改善がみられず、観察期間中低値 (4週目; $1.90 \pm 0.13 \mu\text{M/day/kgBW}$, 16週目; $1.92 \pm 0.23 \mu\text{M/day/kgBW}$) のままであった。

2. 病理組織学的検討

病理組織学的検討結果は、Table III に示した。非投与糖尿病群における糸球体面積 (GT) は正常群に比べ、4週、16週共に有意に増大していたが ($p < 0.01$)、八味地黄丸投与糖尿病群では、正常対照群の値まで低下しなかったものの、16週目 ($7.64 \pm 0.15 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) には非投与糖尿病群 ($8.57 \pm 0.10 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) に対し有意な差をもって低下していた ($p < 0.01$) (Table III)。また、糸球体/ Bowman 嚢面積比 (GT/BW) にも同様の傾向がみられ、16週目の八味地黄丸投与糖尿病群の GT/BW ($80.08 \pm 0.82\%$) は、正常対照群 ($80.50 \pm 0.91\%$) の値にまで低下した ($p < 0.01$)。

考 察

糖尿病性腎症をはじめとする慢性腎不全は、最終的には糸球体の荒廃 (糸球体硬化) による排泄能の低下あるいは廃絶という病態に至る。その最初のプロセスとして、糸球体内圧の上昇による糸球体内皮細胞の障害や糸球体の肥大が考えられている^{16,17)}。一方、糖尿病の慢性合併症である細小血管症 (microangiopathy) の発症における NO の動態についてはいまだ不明な点が多い。糖尿病ラットでは尿中への NO_x 排泄が増加しており、その NO の産生増加が糖尿病性ラット腎でみられる過剰濾過・糸球体内圧の上昇に関連しているとする報告がある^{18,19)}。一方では、同モデルでの NO の産生低下も報告されている^{20,21)}。糖尿病モデルにおいては、血管内皮依存性の血管拡張能が減弱しており、また NO の合成阻害により蛋白尿や過剰濾過、糸球体硬化を生じることから、NO の産生低下が糖尿病性腎症の発症に関連すると考えられている。糖尿病性腎症において NO が減少する機序として、①ポリオール代謝の亢進に伴う NO 合成酵素 (NOS) 活性の低下と活性酸素の増加、②NO 阻害作用を有する終末糖化産物 (AGE) の増加、③プロテイン

キナーゼ C の活性化の亢進に伴う NOS 活性の抑制などが考えられている。

本研究における糖尿病ラット群の尿中 NO_x 排泄量は、非糖尿病ラット群の値に比べ有意に低下していたが、八味地黄丸の投与によりその低下が有意に抑制された。Suzuki らは、八味地黄丸に牛膝と車前子を加えた処方である牛車腎気丸に NO 合成促進作用があることを報告している²²⁾ が、機序については明らかにされていない。八味地黄丸の構成生薬である桂皮が活性酸素生成抑制作用^{23,24)} を、地黄が SOD 様活性作用²⁵⁾ をもつことと関連しているのではと考えられるが推測の域を出ず、今後さらなる検討を要すると思われる。

本研究では、八味地黄丸の投与により、STZ 誘発糖尿病ラットの空腹時血糖値 (FBG) と尿中アルブミン排泄量は低下し、糸球体過剰濾過の指標となるクレアチニンクリアランス (Ccr)、糸球体/Bowman 嚢面積比 (GT/BW) 及び糸球体肥大の指標となる糸球体面積 (GT) においても有意な改善効果が認められた。また、八味地黄丸の投与により、尿中 NO_x 排泄量も有意に増加した。八味地黄丸に含まれる生薬、地黄・山茱萸・茯苓には血糖降下作用^{26,27,28)} が、地黄・牡丹皮にはアンジオテンシン変換酵素阻害作用^{29,30)}、さらに、茯苓には腎障害改善作用^{31,32)} のあることがよく知られている。Kimura らは、慢性腎不全モデルである腎全摘ラットに柴苓湯を投与し、輸出細動脈の有意な拡張と尿蛋白の有意な減少を認め、組織障害が軽減することを報告している³³⁾。柴苓湯の構成生薬のうち、沢瀉・茯苓・桂皮は八味地黄丸の構成生薬の一部でもある。さらに、Hirawa らは食塩感受性高血圧モデルラット (Dahl) において、八味地黄丸が血圧上昇を抑制して、プロスタグランジン E_2 の尿中排泄量と糸球体濾過量を増加させ、糸球体硬化や腎動脈障害を改善することを報告している³⁴⁾。

以上のことから、八味地黄丸には腎保護作用および NO 合成促進作用があることが示唆される。したがって、八味地黄丸は、糖尿病性腎症の早期治療と進展の防止に有用であると考えられ、臨床効果の検討が望まれる。

謝 辞

八味地黄丸をご供与いただいた株式会社ツムラに深謝いたします。

*〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1

順天堂大学医学部腎臓内科 富野康日己

References

- 1) Tojyo, S., Yoshitoshi, Y., Nagasawa, T., Narita, K., Miyahara, T., Nishiyama, K., Hatano, Mi. and Honda, N.: Clinical effect of Kampo medicine extract granules for ethical use; Sairei-to (TJ-114), in chronic glomerulonephritis and nephrotic syndrome (The first report)-A multi-center open study. *Jin-to-Toseki*, **31**, 613-625, 1991. (in Japanese)
- 2) Shibata, M., Suzuki, Y., Yamamoto, J., Mizutani, H., Maeda, K., Morozumi, K., Kato, K., Futenma, A., Niimura, I., Sugiyama, B., Okazaki, Y., Nakamura, T., Yamazaki, N., Tamaki, S., Tsuruta, Y., Iwata, J., Okura, Y., Ohashi, H., Shimomura, A.: Clinical effect of Kampo medicine extract granules for ethical use; Saiko-karyukotsu-borei-to (TJ-12), Gosha-jinki-gan (TJ-107), Sairei-to (TJ-114), in chronic glomerulonephritis (including nephrotic syndrome). *Jin-to-Toseki*, **31**, 779-787, 1991. (in Japanese)
- 3) Yoshikawa, N. and Ito, H.: Traditional Chinese medicine for childhood nephrotic syndrome. *Gendai Toyoigaku*, **12** (3), 24-27, 1991. (in Japanese)
- 4) Goto, H., Shimada, Y., Shintani, T., Shibahara, N. and Terasawa, K.: A report of three cases of diabetic nephropathy satisfactorily treated with traditional herbal medicine. *J. Trad. Med.*, **17** (5), 198-204, 2000.
- 5) Nagasawa, T., Suzuki, J., Suzuki, S., Kawasaki, Y. and Suzuki, H.: Traditional Chinese medicine (Boujiougi-to) reduces urinary protein excretion in rats with puromycin-aminonucleoside-induced nephrosis. *Nihon Shonikagakkai Zasshi*, **105** (6), 681-688, 2001. (in Japanese, Abstr. in English)
- 6) Yokozawa, T., Mo, Z.-L., Wu, X.-Q. and Oura H.: The actions of various prescriptions on rats with experimental renal failure. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*, **4**, 164-171, 1987.
- 7) Yokozawa, T., Wu, X.-Q., Lee, T.-W. and Oura, H.: Onpi-to administration increase renal function in rats with renal failure. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*, **5**, 179-183, 1988.
- 8) Nagasawa, T., Yokozawa, T. and Terasawa, K.: A study of Kampo medicines in a diabetic nephropathy model. *J. Trad. Med.*, **18**, 161-168, 2001.
- 9) Tsuda, K., Morimoto, M., Tsukada, H. and Seino, Y.: Effects of Saireito on urinary albumin secretions in diabetic patients. *Jin-to-Toseki*, **45**, 335-339, 1998. (in Japanese)
- 10) Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R.: Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**, 131-138, 1982.
- 11) Nims, R.W., Darbyshire, J.F., Saavedra, J.E., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G.W., Grisham, M.B., Laval, F. and Cook, J.A.: Colorimetric methods for the determination of nitric oxide concentration in neutral aqueous solution. *Methods*, **7**, 448-454, 1995.
- 12) Glenn, R. and Choen, M.P.: Improved competitive enzyme linked immunoassay (ELISA) for albuminuria. *Clin. Chim. Acta*, **179**, 229-238, 1989.
- 13) Bonsnes, R.W. and Taussky, H.H.: On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. *J. Biol. Chem.*, **158**, 581-591, 1945.
- 14) Shirato, I., Sakai, T., Fukui, M., Tomino, Y., Koide, H.: Widening of a capillary neck and alteration of extracellular matrix ultrastructure in diabetic rat glomerulus as revealed by computer morphometry and improved tissue processing. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, **423**, 121-129, 1993.
- 15) Kaneko, S., Takizawa, H., Takeda, M., Shou, I. and Tomino, Y.: Effects of the antihypertensive drug nifedipine on albuminuria and renal histopathology in young spontaneously hypertensive rats with diabetes. *Gen. Pharmacol.*, **33** (5), 363-367, 1999.
- 16) Brenner, B.M.: Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am. J. Physiol.*, **249**, F324-F337, 1985.
- 17) Fogo, A., Hawkins, E.P., Berry, P.L., Glick, A.D., Chiang, M.L., Macdonell, R.C. and Ichikawa, I.: Glomerular hypertrophy in minimal change disease predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis. *Kidney Int.*, **38**, 115-123, 1990.
- 18) Sugimoto, H., Shikata, K., Matsuda, M., Kushiro, M., Hayashi, Y., Hiragushi, K., Wada, J. and Makino, H.: Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (eNOS) in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy. *Diabetologia*, **41**, 1426-1434, 1998.
- 19) Choi, K.C., Lee, S.C., Kim, S.W., Kim, N.H., Lee, J.-U. and Kang, Y.J.: Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor. J. Int. Med.*, **14**, 32-41, 1999.
- 20) Pieper, M.G. and Dondlinger A. L.: Plasma and vascular tissue arginine are decreased in diabetes: Acute arginine supplementation restores endothelium-dependent relaxation by augmenting cGMP production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 684-691, 1997.
- 21) Keynan, S., Hirshberg, B., Levin-L.N., Wexler, I.D., Dahan, R., Reinhartz, E., Ovadia, H., Wollman, Y., Chernihovskiy, T., Iaina, A. and Raz, I.: Renal nitric oxide production during the early phase of experimental diabetes mellitus. *Kid. Internat.*, **58**, 740-747, 2000.
- 22) Suzuki, Y., Goto, K., Ishige, A., Komatsu, Y. and Kamei, J.: Effects of Gosha-jinki-gan, a Kampo medicine, on peripheral tissue blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **20**, 321-328, 1998.
- 23) Toda, S., Ohnishi, M. and Kimura, M.: Inhibitory effects of aromatic herbs on generation of active oxygen. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*, **8**, 55-58, 1991. (in Japanese, Abstr. in English)
- 24) Imamichi, T., Nakamura, T., Hayashi, K., Kaneko, K. and Koyama, J.: Different effects of cinnamic acid on the O₂⁻ generation by guinea pig macrophages stimulated with a chemotactic peptide and immune complex. *J. Pharmacobio. Dyn.*, **13**, 344-352, 1990.
- 25) Fukuda, T. and Kitada, Y.: Reactive oxygen species scavenging effect of crude drug. *Fragnance J.*, **23**, 75-81, 1995. (in Japanese)
- 26) Yamahara, J., Mibu, H., Sawada, T., Fujimura, H., Takino, S., Yoshikawa, M. and Kitagawa, I.: Biologically active principles of crude drugs. Antidiabetic principles of Corni Frucus in experimental diabetes induced by streptozotocin. *Yakugaku Zasshi*, **101** (1), 86-90, 1981. (in Japanese, Abstr. in English)
- 27) Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T.: Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Med.*, **55**, 117-122, 1989.
- 28) Kitagawa, I., Nishimura, T., Furubayashi, A. and Yoshioka, I.: On the constituents of rhizome of *Rehmannia glutinosa* Libosch. forma *hueichingensis* Hisao. *Yakugaku Zasshi*, **91** (5), 593-596, 1971. (in Japanese, Abstr. in English)
- 29) Inokuchi, J., Okabe, H., Yamauchi, T. and Nagamatsu, S.: Shouyaku chuni fukumareru Angiotensin Converting Enzyme (ACE) kassei sogai busshitsu (生薬に含まれる Angiotensin

- Converting Enzyme (ACE) 活性阻害物質). Proceedings of 104th Nihon Yakugakkai, 130, 1984. (in Japanese)
- 30) Yamahara, J., Murakami, H., Kunitomo, K., Sawada, T. and Fujimura, H.: Koketsuatsu ni yuukouna shouyaku oyobi kampo hozai (II) Oren-gedoku-to oyobi sanshishi no Angiotensin henkan kouso sogai sayou seibun (高血圧に有効な生薬及び漢方方剤 (II) 黄連解毒湯及び山梔子のAngiotensin変換酵素阻害作用成分): Proceedings of 31st annual meeting of Nihon Shouyaku gakkai, 22, 1984. (in Japanese)
 - 31) Hattori, T., Nagamatsu, T., Ito, M., Suzuki, Y.: Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine, and its mechanism (1) : Effects on original type anti-GBM nephritis in rats and platelet in rats and platelet aggregation. *Jpn. J. Pharmacol.*, **50**, 477-485, 1989.
 - 32) Sugiyama, K., Yokota, M., Ueda, H. and Ichio, Y.: Protective effects of Kampo medicines against cis-diammine-dichloroplatinum (II) - induced nephrotoxicity and bone marrow toxicity in mice. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*, **10**, 76-85, 1993.
 - 33) Kimura, K., Ogawa, S., Tojo, A., Nanba, S., Matsuoka, H. and Sugimoto, T.: Effects of a Japanese medicinal plant on the rat subtotal nephrectomy model:evaluation of its effect by microvascular casts. *Am. J. Chin. Med.*, **18**, 167-174, 1990.
 - 34) Hirawa, N., Uehara, Y., Kawabata, S., Numabe, A., Takeda, H., Nagoshi, H., Gomi, T., Ikeda, T. and Omata, M.: Hachimi-jio-gan extract protects the kidney from hypertensive injury in Dahl salt-sensitive rat. *Am. J. Chin. Med.*, **24**, 241-254, 1996.