

新たに創案された富山オリジナルブランド配置薬処方の 活性酸素種消去活性および神経細胞保護作用の検討

関矢 信康,^{a)} 後藤 博三,^{b)} 古田 一史,^{a)} 谿 忠人,^{c,d)} 嶋田 豊^{a,d)}

^{a)}富山医科薬科大学医学部和漢診療学講座, ^{b)}富山医科薬科大学和漢薬研究所漢方診断学部門,

^{c)}富山医科薬科大学和漢薬研究所和漢薬製剤開発部門, ^{d)}富山医科薬科大学 21 世紀 COE プログラム

Evaluation of Toyama original brand formulation about scavenging effect for reactive oxygen species and protective activity on nitric oxide donor-induced neuronal death

Nobuyasu SEKIYA,^{*a)} Hirozo GOTO,^{b)} Kazufumi KOUTA,^{a)} Tadato TANI,^{c,d)} and Yutaka SHIMADA^{a,d)}

^{a)}Department of Japanese Oriental Medicine, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan. ^{b)}Department of Kampo Diagnostics, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan. ^{c)}Division of Kampo-Pharmaceutics, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan. ^{d)}21st Century COE Program, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan. (Received May 27, 2004. Accepted August 11, 2004.)

The present study was performed to evaluate Toyama original brand formulation A and B about the scavenging activity for superoxide anion and hydroxyl radical by using electron spin resonance method and protective activity against nitric oxide (NO) donor-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. As a result, both formulation A and B showed strong radical scavenging effects. It appeared that *Corydalis turtschaninovii* Besser forma *yanhuso* Y.H.CHOU et C.C.HSU and *Magnolia obovata* THUNBERG which were not contained in prescription B, had strong scavenging activities for superoxide anion and hydroxyl radical with the analysis for constituents of the formulations. Furthermore, both formulation A and B had protective effects against NO donor-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. The protective effect of formulation A was somewhat stronger than that of formulation B. *Corydalis turtschaninovii* and *Magnolia obovata* also had protective activities against NO-mediated neuronal death. From these findings, Toyama original brand formulation A may be more useful than formulation B for maintaining and improving health.

Key words Toyama original brand formulation, nitric oxide donor, neuronal death, superoxide anion, hydroxyl radical.

緒 言

現在、活性酸素種は生体膜の障害をもたらすことによって虚血、炎症、老化を促進させると考えられている。実際に、赤血球膜中のビタミンEの低下が活性酸素種による赤血球の溶血に対する脆弱性を増すことが示されている¹⁾。さらに、 α -tocopherolを含めた幾つかの抗酸化物質が活性酸素種を捕捉することによって赤血球の溶血に抑制的に働くことが示されている²⁾。こうした観点からは虚血、炎症、老化を予防し進展を抑制していくためには、活性酸素種の制御が不可欠の課題であるといえる。

また、近年の研究により、脳虚血による神経細胞死の過程におけるグルタミン酸などの興奮性神経伝達物質および一酸化窒素(NO)の関与が明らかになってきた。即ち、脳梗塞や一過性の脳虚血の状態では、過剰なグルタミン酸が脳内に放出され、これが神経細胞のNMDA受容体などのグルタミ

ン酸受容体を過剰に刺激し、カルシウムの多量の細胞内流入を生じ、これが複数のカスケードを介して神経細胞を死に導くと考えられている^{3,4)}。この過程において神経細胞に存在するカルシウム依存性の神経型NO合成酵素(nNOS)が活性化し、多量のNOラジカル(NO \cdot)が発生し、これが神経細胞を傷害することも知られている^{3,5,6)}。さらに、脳虚血によって誘導されたある種のサイトカインがグリア細胞に作用し、誘導型NO合成酵素(iNOS)の活性化によって生ずるNOラジカルの関与も知られている⁷⁾。

活性酸素種による障害は生活習慣病の基礎的病変である。これには飽食と運動不足という生活習慣の見直しに加えて、予防的な治療(self-medication)が必要である。現在、生活習慣病の進展予防の重要性が指摘されながら、国民には浸透していない状況である。その一因として、境界域の生活習慣病を有する人々に対して、西洋医学的には食事や運動療法の指導しか方法がなく長期的な経過観察や管理が十分でない点があげられる。そこで、配置薬(置き薬)など一般

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: s114@ms.toyama-mpu.ac.jp

用生薬製剤による予防的な治療に期待が寄せられている。

我々は生活習慣病や動脈硬化症の進展予防とストレスなどの増悪因子の改善を目的として、富山県薬業連合会と富山県と共同で富山オリジナルブランド配置薬の開発を進めてきた。本処方では滋養強壯の基本薬である薬用人参⁸⁾と動悸息切れに用いられる牛黄⁹⁾を主薬として、以下の生薬から創案された。免疫賦活化作用を有する黄耆¹⁰⁾などの生活習慣病に対する抵抗力を高める生薬、血小板凝集抑制作用を有する当帰¹¹⁾、血管拡張作用を有する芍薬¹²⁾など動脈硬化の進展予防効果が期待される生薬、さらに抗不安作用を有する厚朴¹³⁾、鎮静作用を有する川芎¹⁴⁾など、ストレスをはじめとする生活習慣病の増悪因子を改善する生薬である。これらの生薬は、十全大補湯、補中益気湯、当帰湯、八味地黄丸などの構成生薬と薬理作用に関する研究報告を考慮して選抜した。

既に我々は、富山オリジナルブランド配置薬処方AおよびBが、高脂血症・高血圧合併モデルラットの血管収縮を抑制し中性脂肪を低下すること、自然発症糖尿病モデルラットにおいて脂質代謝を改善しフィブリノーゲンを低下することを報告した¹⁵⁾。このことから、処方A・Bは血流改善作用を有し、高脂血症、高血圧、糖尿病などの生活習慣病に伴う血管合併症の進展抑制に有用な薬剤である可能性が示唆された。これらの病態の発症進展には活性酸素種が関与することが知られているため、今回は *in vitro* の実験系で、処方A・Bおよび構成生薬の活性酸素種消去活性を electron spin resonance (ESR) 法を用いて検討した。さらに、虚血性の中脳神経障害に対する処方A・Bおよび構成生薬の効果を検討する目的で、*in vitro* の実験として培養神経細胞を用いてNO供給体 (NO donor) によって誘導される神経細胞死に対する保護作用を検討した。

材料と方法

処方AとBの構成生薬の規格と組成比は前報¹⁵⁾と同じである。即ち、富山オリジナルブランド処方A (以下、処方A) は、以下の11種類の生薬末およびエキスを含む。人参 (*Panax ginseng* C.A.MEYER の根、中国産、30% EtOH 抽出エキス 545.5 mg)、牛黄 (*Bos taurus* L. var. *domesticus* GMELIN の胆石、ブラジル産、日本薬局方 JPXIV 規格、生薬末 5 mg)、延胡索 (*Corydalis turtchaninovii* Besser forma *yanhuso* Y.H.CHOU et C.C.HSU の塊茎、中国産、30% EtOH 抽出エキス 60 mg)、蛇床子 (*Cnidium monnieri* Cuss. の果実、中国産、30% EtOH 抽出エキス 30 mg)、オキソアミヂン末 (日本産ニンニク *Allium sativum* L. 抽出成分 100 mg)、厚朴 (*Magnolia obovata* THUNBERG の樹皮、日本産、JPXIV 規格、生薬末 90 mg)、当帰 (*Angelica acutiloba* KITAGAWA の種子を中国で栽培した根、JPXIV 規格、生薬末 200 mg)、芍薬 (*Paeonia lactiflora* PALLAS の根、中国産、JPXIV 規格、生薬末、200 mg)、川芎 *Cnidium officinale* MAKINO の根茎、日本北海道産、JPXIV

規格、生薬末、200 mg)、桂皮 (*Cinnamomum cassia* BLUME の樹皮、中国産、JPXIV 規格、生薬末、200 mg)、黄耆 (*Astragalus membranaceus* BUNGE の根、中国産、生薬末、200 mg) の総量 1830.5 mg がヒト 1 日量である。この 11 味の処方Aから厚朴と延胡索を除いたものを、富山オリジナルブランド処方B (以下、処方B) とした。

1. エキスの作成

処方A末および処方B末それぞれ 100 g を 500 ml の水で 50 分間、100°C で加熱溶出し、さらに溶出液を凍結乾燥して処方Aエキスおよび処方Bエキスを作成した。エキス収率は、処方A 44.5%、処方B 42.9% であった。人参、牛黄、延胡索、蛇床子、オキソアミヂン (ニンニクの主成分) については、エキスまたは成分をそのまま使用した。厚朴末、当帰末、芍薬末、川芎末、桂皮末、黄耆末については、前述と同じ方法で、500 ml の水で 50 分間、100°C で加熱溶出し、さらに溶出液を凍結乾燥してエキスを作成した。エキス収率は、厚朴 (11.4%)、当帰 (36.6%)、芍薬 (4.1%)、川芎 (37.8%)、桂皮 (6.4%)、黄耆 (29.8%) であった。

2. 活性酸素種消去活性の検討

Superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) は様々な刺激によって生体内に生じ、活性酸素種の中で最も上流に位置しており、それ自体の反応性は低いものの遷移金属とともに Fenton 反応により hydroxyl radical ($HO\cdot$) を生ずる。また、hydroxyl radical は活性酸素種の中で最も反応性に富み、連鎖的な脂質過酸化反応を引き起こし生体に有害な作用を及ぼすことが知られている。

今回の実験では、上述のエキスないしは成分を純水で適量に稀釈して実験に供した。そして、hypoxanthine (HPX)-xanthine oxidase (XOD) の反応系により superoxide anion を発生させ¹⁶⁾、また Fenton 反応により hydroxyl radical を発生させ¹⁷⁾、処方A・Bおよび構成生薬の両活性酸素種に対する消去活性を ESR 法によって検討した¹⁸⁾。

1) Superoxide anion に対する消去活性

2 mM HPX (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 μ l に、純水 50 μ l、5.5 mM diethylenetriamine-*N, N, N', N'', N'''*-pentaacetic acid (DETPAC; Wako, Osaka, Japan) 35 μ l、スピントラップ剤として 8.9 M 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO; LABOTEC, Tokyo, Japan) 15 μ l、0.4 U/ml XOD (Roche, Indianapolis, IN, USA) 50 μ l を添加し、扁平型の石英セルに移し、フリーラジカルモニター (JES-FR30, JEOL, Tokyo, Japan) にて XOD 添加 1 分後の superoxide anion の ESR シグナルを記録した。各記録時間は 1 分間とした。シグナル強度は内部標準である Mn のシグナルに対する比で表示した。純水 50 μ l を用いた場合のシグナル強度をコントロールとし、純水の代わりに処方AおよびB、あるいは生薬エキスを純水にて 0.2, 2.0, 20 mg/ml に調製したものを 50 μ l 添加して得られた ESR のシグナル強度から抑制率を算出した。さらに 50% の消去活性を示す濃度である IC₅₀ を算出した。代表的なラジカルスカベンジャー

である L-ascorbic acid (Wako, Osaka, Japan) を対照薬として用いた。

2) Hydroxyl radical に対する消去活性

1mM FeSO₄-DETPAC 75 μ l に、純水 50 μ l, 0.89M DMPO 20 μ l, 0.1mM H₂O₂ 75 μ l を添加し、セルに移し、フリーラジカルモニターにて H₂O₂ 添加1分後の hydroxyl radical の ESR シグナルを記録した。各記録時間は1分間とした。純水 50 μ l を用いた場合のシグナル強度をコントロールとし、純水の代わりに処方 A・B, あるいは生薬エキスを純水にて 0.2, 2.0, 20 mg/ml に調製したものを 50 μ l 添加して得られた ESR のシグナル強度から、抑制率と 50% の消去活性を示す濃度である IC₅₀ を算出した。また、L-ascorbic acid を対照薬として用いた。

3. NO 誘発性の神経細胞死抑制作用の検討

小脳顆粒細胞の培養は、既報¹⁹⁻²¹⁾と同じ方法で行った。即ち、8日齢のウィスターラットの小脳を摘出し、poly-L-lysine (Sigma) でコーティングした 35mm culture dish の中で、培地には 10% fetal bovine serum (Sigma) と 25mM KCl を含む basal Eagle medium (Sigma) を用いて 6×10^5 cells/ml (2 ml/dish) の密度で小脳顆粒細胞を撒布し、5% CO₂, 37°C の条件で加湿されたインキュベーターで培養した。グリア細胞の増殖を抑制するため、培養18時間後に cytosine arabinoside (10 μ M) (Sigma) を添加した。それ以降は培地を交換せず、培養8日目に神経細胞死抑制作用の検討を行った。なお、動物の取り扱いに関しては富山医科薬科大学動物実験委員会の承認を得た。

神経細胞死抑制作用の検討のため、上述のエキスあるいは成分を Locke's solution (mM: NaCl 154, KCl 5.6, Mg 1.2, NaHCO₃ 3.6, HEPES 5.0, CaCl₂ 2.3, glucose 5.6, pH 7.4) で適量に希釈して実験に供した。NO 供給体 (NO donor) は sodium nitroprusside (SNP) (Sigma) を用いた。

細胞生存率の評価は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 法を用い、既報¹⁹⁻²¹⁾

のごとく行った。目的濃度 (10, 30, 100 μ M) の100倍で各エキスまたは成分を Locke's solution (vehicle) に溶解し、これらを 35mm culture dish 中に培養したラット小脳顆粒細胞に培地の 1/100 量添加した。Vehicle 及び control には Locke's solution のみを添加した。10分後に、目的濃度 (30 μ M) の100倍で Locke's solution に溶解した SNP を培地の 1/100 量添加した。Vehicle には Locke's solution のみを添加した。24時間インキュベートした後、MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) 500 μ g/ml を添加し、さらに 30分間インキュベートした後、培養小脳顆粒細胞を 0.04N HCl を含む isopropanol で溶解し、吸光度 (570 nm) を測定した。そして、Vehicle に対するパーセントで細胞生存率を表示した。

4. 統計処理

各測定値は平均値 (mean) \pm 標準誤差 (S.E.) で表記した。有意差検定には one way ANOVA を用い、post hoc test として Dunnett's test を行い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

結果

1. 活性酸素種消去活性の検討

Fig. 1 に示したように処方 A, 処方 B, L-ascorbic acid のすべてに superoxide anion, hydroxyl radical のいずれに対しても消去活性が見られた。また、superoxide anion に対する IC₅₀ (mg/ml) は処方 A が 1.43, 処方 B が 1.00, L-ascorbic acid が 0.34 であり、hydroxyl radical に対する IC₅₀ (mg/ml) は処方 A が 4.01, 処方 B が 3.89, L-ascorbic acid が 0.10 であった。

個々の構成生薬のうち人参, 牛黄, 延胡索, 蛇床子, オキソアミジン (ニンニクの主成分) の消去活性を Fig. 2 に示した。2.0 mg/ml 以下の濃度で、人参, 延胡索, 蛇床子に superoxide anion に対する消去活性がみられた (Fig. 2a)。IC₅₀ (mg/ml) はそれぞれ人参 5.24, 牛黄 53.37, 延胡索 2.17, 蛇床子 0.83, オキソアミジン 73.24 であった。同様に 2.0

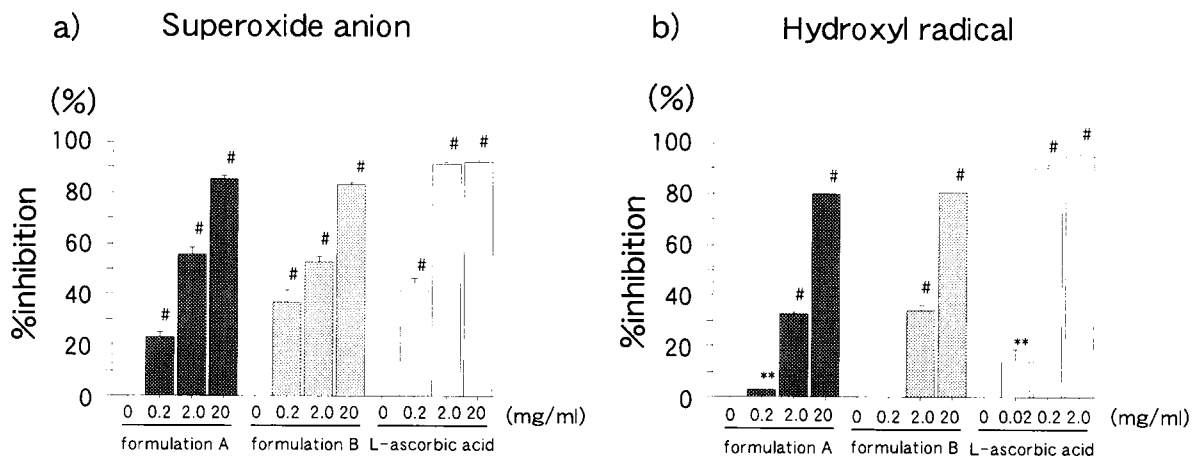


Fig. 1 Reactive oxygen species scavenging activities of formulation A, formulation B and L-ascorbic acid. a) superoxide anion, b) hydroxyl radical. Values are mean \pm S.E., n=3. ** $p < 0.01$, # $p < 0.0001$ compared with control.

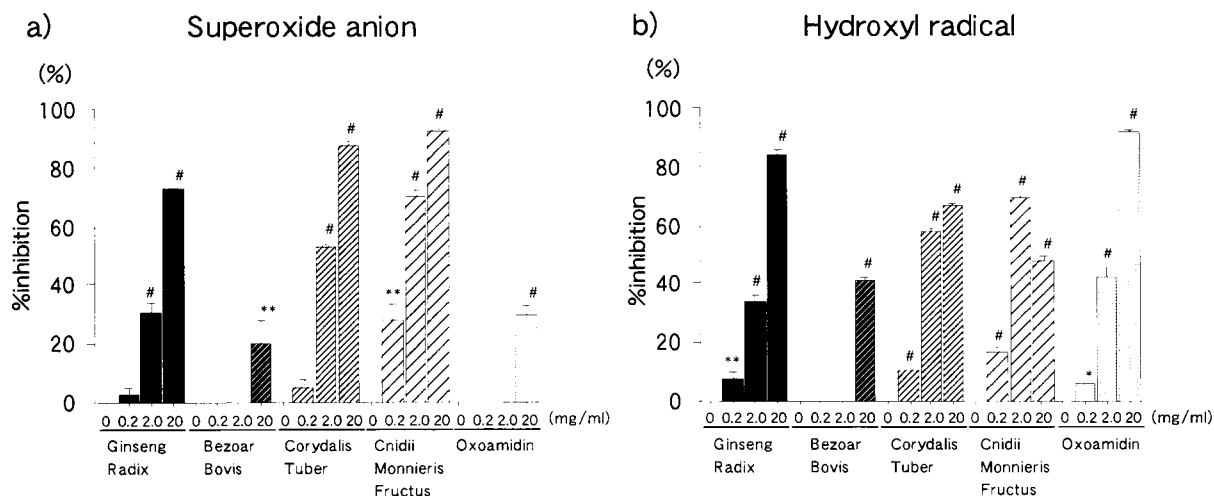


Fig. 2 Reactive oxygen species scavenging activities of constituent herb extracts or ingredients (1). a) superoxide anion, b) hydroxyl radical. Values are mean \pm S.E., n=3. * p <0.05, ** p <0.01, # p <0.0001 compared with control.

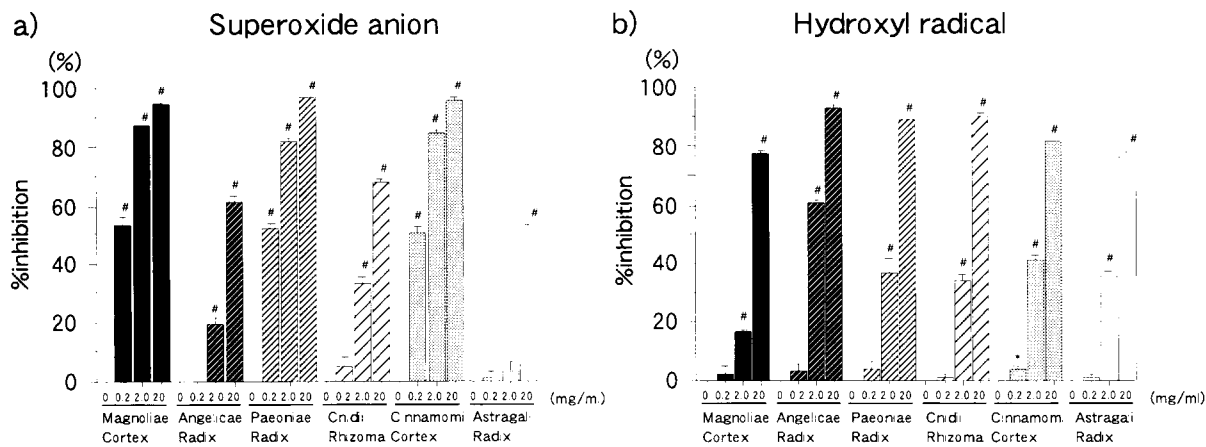


Fig. 3 Reactive oxygen species scavenging activities of constituent herb extracts (2). a) superoxide anion, b) hydroxyl radical. Values are mean \pm S.E., n=3. * p <0.05, # p <0.0001 compared with control.

mg/ml 以下の濃度で、人參、延胡索、蛇床子、オキソアミチンに hydroxyl radical に対する消去活性がみられ (Fig. 2b), IC_{50} (mg/ml) はそれぞれ人參 3.17, 牛黄 38.68, 延胡索 2.85, 蛇床子 2.62, オキソアミチン 2.35であった。

残る構成生薬の厚朴、当帰、芍薬、川芎、桂皮、黄耆の活性酸素種の消去活性を Fig. 3 に示した。2.0 mg/ml 以下の濃度で、厚朴、当帰、芍薬、川芎、桂皮に superoxide anion に対する消去活性がみられた (Fig. 3a)。 IC_{50} (mg/ml) はそれぞれ厚朴 0.12, 当帰 9.46, 芍薬 0.14, 川芎 5.65, 桂皮 0.16, 黄耆 19.88 であった。Fig. 3b に示したように 2.0 mg/ml 以下の濃度で、厚朴、当帰、芍薬、川芎、桂皮、黄耆のすべてに hydroxyl radical に対する消去活性がみられた。 IC_{50} (mg/ml) はそれぞれ厚朴 5.41, 当帰 1.79, 芍薬 2.87, 川芎 3.11, 桂皮 3.17, 黄耆 4.23 であった。

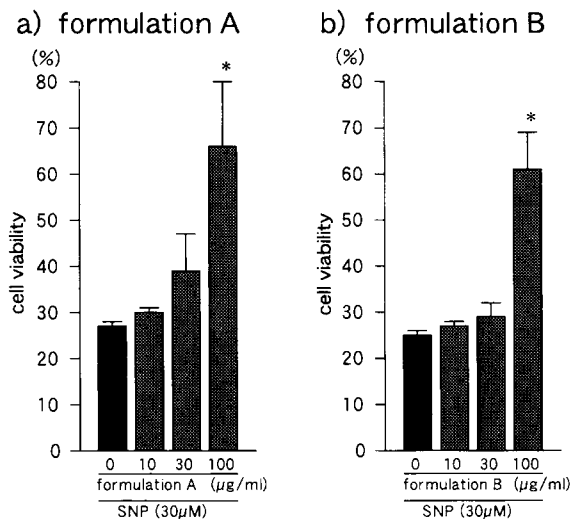


Fig. 4 Effects of formulation A and B against SNP-induced neuronal death evaluated by MTT assay in cultured cerebellar granule cells. a) formulation A, b) formulation B. Values are mean \pm S.E., n=3. * p <0.05 compared with control.

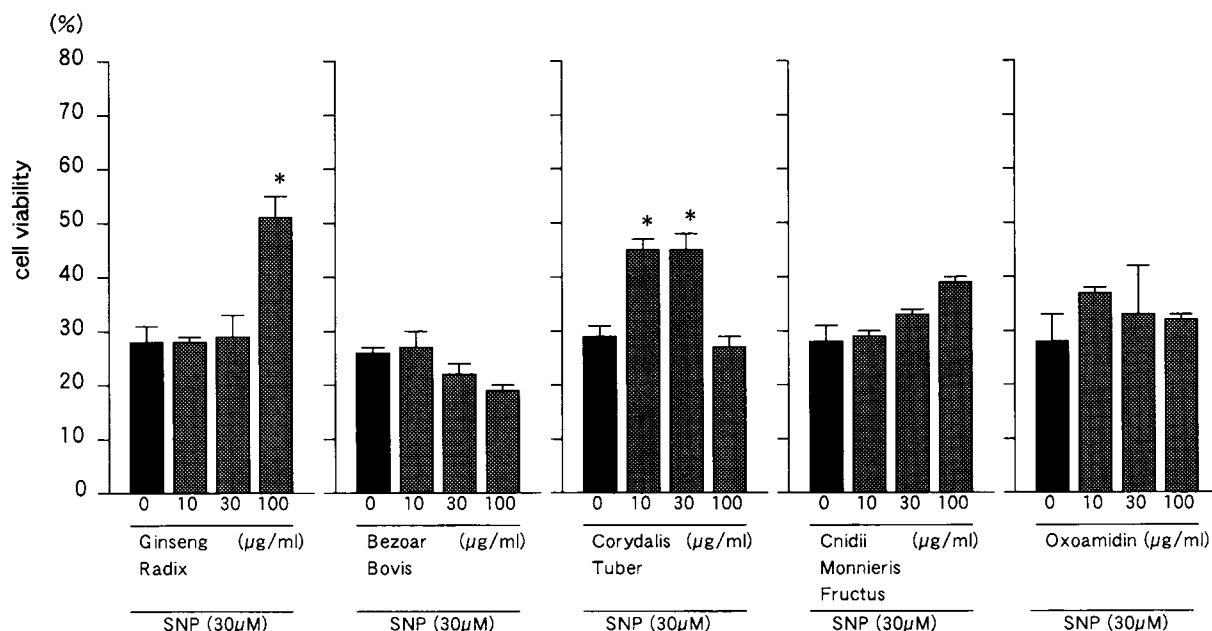


Fig. 5 Effects of constituent herb extracts or ingredients against SNP-induced neuronal death evaluated by MTT assay in cultured cerebellar granule cells (1). Values are mean \pm S.E., n=3. * p <0.05 compared with control.

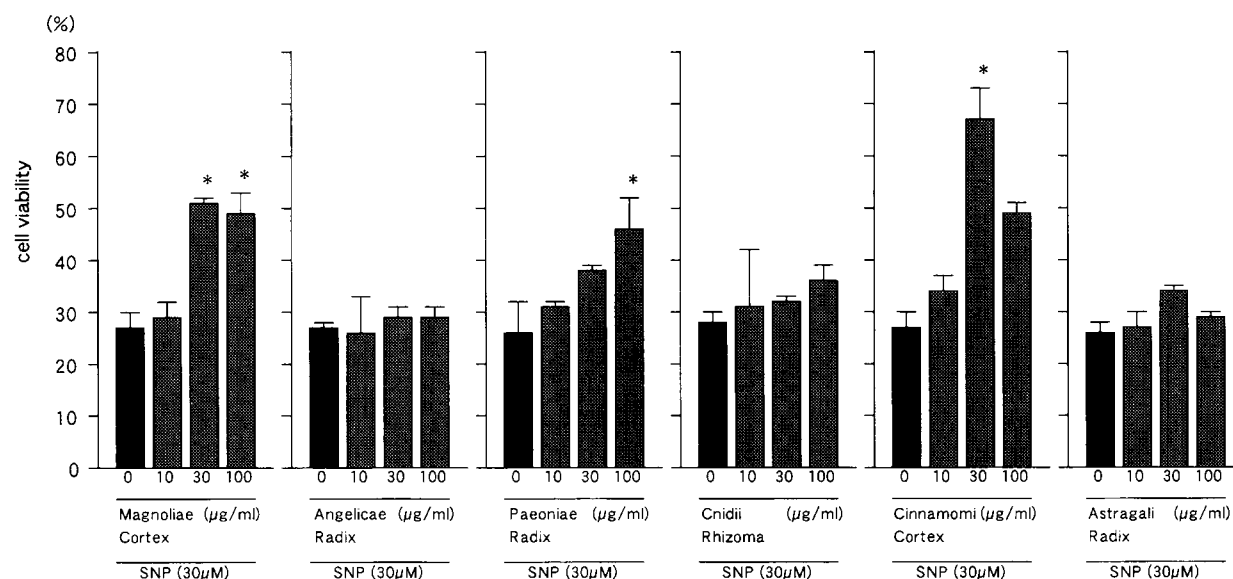


Fig. 6 Effects of constituent herb extracts against SNP-induced neuronal death evaluated by MTT assay in cultured cerebellar granule cells (2). Values are mean \pm S.E., n=3. * p <0.05 compared with control.

2. 神経細胞死抑制作用の検討

SNP (30 μ M) の24時間添加によって生ずる神経細胞死を、処方A (100 μ g/ml) は有意に抑制し、処方B (100 μ g/ml) も有意に抑制した (Fig. 4a, b)。個々の生薬または成分のうち人參、牛黄、延胡索、蛇床子、オキソアミジンについては、人參 (100 μ g/ml) と延胡索 (10, 30 μ g/ml) が SNP (30 μ M) 24時間添加によって生ずる神経細胞死を有意に抑制した (Fig. 5)。厚朴、当歸、芍薬、川芎、桂皮、黄耆については、厚朴 (30, 100 μ g/ml)、芍薬 (100 μ g/ml)、桂皮 (30 μ g/ml) が SNP (30 μ M) 24時間添加によって生ずる神経細胞死を有意に抑制した (Fig. 6)。

考 察

富山オリジナルブランド処方A・Bおよびその構成生薬のうちいくつかは、活性酸素種に対する強い消去能を有することが明らかとなった。*in vivo*での効果については今後さらに検討を重ねる必要があるが、芍薬の抗酸化作用を有する成分である epigallocatechin、桂皮の抗酸化作用を有する成分である procyanidin B-2 や procyanidin B-3 が血中に移行することが確認されている^{22,23}。このことから、処方A・Bが *in vivo*においても抗酸化活性を発揮するものと考えられる。

脳虚血による神経細胞死の過程における NO の関与が知られている^{3,5-7)}。今回の実験において、処方 A および処方 B は 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、SNP (30mM, 24時間) 添加によって生ずる神経細胞死を抑制した。我々は、今回と同じ条件で SNP 誘導神経細胞死に対する釣藤鈎エキスおよび桂枝茯苓丸エキスの抑制効果を報告したが、いずれも 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で効果を認めている^{20,21)}。桂枝茯苓丸の無症候性脳梗塞の精神症状に対する臨床的有効性²⁴⁾、および *in vivo* の実験系において一過性脳虚血モデルに対する釣藤鈎の遅発性神経細胞死抑制作用²⁵⁾が報告されていることより、処方 A および処方 B も脳血管障害に対して有効である可能性が考えられる。

活性酸素種の神経毒性に関しては、hydroxyl radical 以外にも、NO ラジカルと superoxide anion との反応によって生ずる peroxynitrate anion (ONOO⁻) が強い傷害性を有することが知られている²⁶⁾。このことは、活性酸素種による神経障害を予防するためには、superoxide anion を消去することの重要性を示している。今回の検討では、処方 A・B ともに hydroxyl radical のみならず superoxide anion に対しても消去活性を有することが明らかとなったが、この作用が peroxynitrate anion の発生を抑制することにより、神経保護作用に関与したものと考えられる。

処方 A と処方 B の構成生薬の違いは、処方 A のみに延胡索と厚朴が含まれていることである。今回の検討では、NO donor 誘導神経細胞死に対する保護作用は、処方 A が処方 B よりも若干強いようであった。これには、個々の構成生薬の検討において、人参、芍薬、桂皮の他に処方 A のみに含まれる延胡索と厚朴にも NO donor 誘導神経細胞死に対する保護作用がみられたことが関与していると考えられる。このことより、神経細胞保護作用および活性酸素種による生体膜障害の予防の観点からは、延胡索と厚朴が含まれている処方 A の方が処方 B よりも好ましい製剤であることが示唆される。

今回の研究によって明らかにされた富山オリジナルブランド処方 A・B の活性酸素種消去活性は、脂質過酸化の抑制、血管内皮細胞の保護作用を介した動脈硬化症の発症進展抑制、脳循環障害に伴う神経細胞障害の抑制に有効である可能性が示唆される。さらには、今後発展していくであろう抗加齢医学の分野においても実用化が期待される処方であると考えられる。

結 論

現代の生活習慣病の予防を目指して創案された新和漢薬処方 (富山オリジナルブランド配置薬) の作用を検討した。ESR 法を用いて処方 A・B の活性酸素種に対する消去活性を検討したところ、ともに superoxide anion および hydroxyl radical に対する強い消去活性を有することが明らかとなった。さらに、処方 A・B はともに *in vitro* の培養神経細胞において NO donor (SNP) によって誘導される神経細胞死を抑制することが明らかとなった。また個々の生薬の検討において、処方 A のみに含まれている延胡索と厚朴に強

い活性酸素種消去活性と NO 誘発性神経細胞死に対する抑制効果がみられたことより、抗酸化作用および神経細胞保護作用の観点からは処方 A が処方 B よりも好ましい製剤である可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は、富山県薬業連合会受託研究費・富山オリジナルブランド配置薬の開発研究補助金によるものであり、ここに深謝する。

References

- 1) Delmas-Beauvieux, M. S., Peuchant, E., Dumon, M. F., Receveur, M. C., Le Bras, M. and Clerc, M.: Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin. Biochem.* **28**, 163-169, 1995.
- 2) Miki, M., Tamai, H., Mino, M., Yamamoto, Y. and Niki, E.: Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol. *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 373-380, 1987.
- 3) Lipton, S.A. and Rosenburg, P.A.: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* **330**, 613-622, 1994.
- 4) Rothman, S.M. and Olney, J.W.: Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann. Neurol.* **19**, 105-111, 1986.
- 5) Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S. and Snyder, S.H.: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6368-6371, 1991.
- 6) Bolanos, J.P. and Almcida, A.: Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 415-436, 1999.
- 7) Nomura, Y. and Kitamura, Y.: Inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neurosci. Res.* **18**, 103-107, 1993.
- 8) Huang K.C.: The Pharmacology of Chinese Herbs. 2nd ed., CRC Press, Washington D.C., pp.17-44, 1999.
- 9) Kimura, M.: Pharmacological approach to Oriental preparations for combined therapy. *Proc. Sym. for WAKAN-YAKU* **6**, 106-116, 1972. (in Japanese)
- 10) Sugiura, H., Nishida, H., Inaba, R. and Iwata, H.: Effects of exercise in the growing stage in mice and of *Astragalus membranaceus* on immune functions. *Nippon Eiseigaku Zasshi* **47**, 1021-1031, 1993. (in Japanese)
- 11) Toriizuka, K., Nishiyama, P., Adachi, I., Kawashiri, N., Ueno, M., Terasawa, K. and Horikoshi, I.: Isolation of a platelet aggregation inhibitor from *Angelicae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 5011-5015, 1986.
- 12) Goto, H., Shimada, Y., Akechi, Y., Kohta, K., Hattori, M., and Terasawa, K.: Endothelium-dependent vasodilator effect of extract prepared from the roots of *Paenia lactiflora* on isolated rat aorta. *Planta Medica* **62**, 436-439, 1996.
- 13) Kuribara, H., Kishi, E., Hattori, N., Yuzurihara, M. and Maruyama, Y.: Application of the elevated plus-maze test in mice for evaluation of the content of honokiol in water extracts of magnolia. *Phytother. Res.* **13**, 593-596, 1999.
- 14) Kohno, S., Murakami, Y., Tohda, M., Matsumoto, K. and Watanabe, H.: Effects of Shimotsu-to and Shimotsu-to components on social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep and aggressive behavior in mice. *J. Trad. Med.* **13**, 428-429, 1996. (in Japanese)
- 15) Goto, H., Shimada, Y., Tani, T., Sekiya, N., Hikami, H., Sakai, S., Shibahara, N. and Terasawa, K.: Effects of a new original formulation containing crude drugs used for self-medication on the model animals

- of life-style related disease. *J. Trad. Med.* **21**, 199-204, 2004. (in Japanese)
- 16) Mitsuta, K., Mizuta, Y., Kohno, M., Hiramatsu, M. and Mori, A.: The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **63**, 187-191, 1990.
- 17) Kohno, M., Yamada, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y. and Yoshikawa, T.: Spin-trapping studies on the reaction of iron complexes with peroxides and the effects of water-soluble antioxidants. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **64**, 1447-1453, 1991.
- 18) Buettner, GR.: Spin trapping: ESR parameters of spin adduct. *Free. Radic. Biol. Med.* **3**, 259-303, 1987.
- 19) Shimada, Y., Goto, H., Kogure, T., Shibahara, N., Kita, T., Itoh, T. and Terasawa, K.: Extract prepared from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* prevents glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. *J. Trad. Med.* **15**, 141-146, 1998.
- 20) Shimada, Y., Yokoyama, K., Goto, H., Sakakibara, I., Sekiya, N., Mantani, N., Sakai, S. and Terasawa, K.: Protective effect of the hooks and stems of *Uncaria sinensis* against nitric oxide donor-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. *J. Trad. Med.* **19**, 15-20, 2002.
- 21) Shimada, Y., Yokoyama, K., Goto, H., Sekiya, N., Mantani, N., Tahara, E., Hikiami, H. and Terasawa, K.: Protective effect of Keishibukuryo-gan and its constituent medicinal plants against nitric oxide donor-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. *Phytomedicine* **10**, 404-410, 2004.
- 22) Zhang, A., Zhu, Q.Y., Luk, Y.S., Ho, K.Y., Fung, K.P. and Chen, Z.Y.: Inhibitory effects of Jasmin green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sci.* **61**, 383-394, 1997.
- 23) Tanaka, N., Sekiya, N., Hattori, M., Goto, H., Shibahara, N., Shimada, Y. and Terasawa, K.: Measurement of plasma procyanidin B-2 and procyanidin B-3 levels after oral administration in rat. *Phytomedicine* **10**, 122-126, 2003.
- 24) Goto, H., Shimada, Y., Mitsuma, T., Shintani, T., Nagasaka, K., Goto, S., Shibahara, N. and Terasawa, K.: Effect of Keishi-bukuryo-gan on asymptomatic cerebral infarction for short term. *J. Trad. Med.* **19**, 46-50, 2002.
- 25) Yokoyama, K., Shimada, Y., Hori, E., Sekiya, N., Goto, H., Sakakibara, I., Nishijo, H. and Terasawa, K.: Protective effects of Choto-san and hooks and stems of *Uncaria sinensis* against delayed neuronal death after transient forebrain ischemia in gerbil. *Phytomedicine*, **11**, 478-489, 2004.
- 26) Gross, S.S. and Wolin, M.S.: Nitric Oxide. Pathophysiological mechanisms. *Ann. Rev. Physiol.* **57**, 737-769, 1995.

*〒930-0194 富山市杉谷 2630

富山医科薬科大学医学部和漢診療学講座 関矢信康