

東邦大学審査学位論文（博士）

博士学位論文

医療用漢方製剤の
抗酸化活性に関する研究

2018 年度

東邦大学大学院 薬学研究科

佐藤直子

略号一覧

AAPH : 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride

ATP : Adenosine triphosphate

AUC : Area under the blood concentration-time curve

BAP : Biological antioxidant potential

BHA : Butylated hydroxyanisole

CDDP : Cisplatin

CMV : Cytomegalovirus

COPD : Chronic obstructive pulmonary disease

CYP2E1 : Cytochrome P450 2E1

DCFH-DA : 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate

D-MEM : Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

DNA : Deoxyribonucleic acid

DPPH : 2,2-Diphenyl-1 (2,4,6-trinitrophenyl) hydrazino radical

EC₅₀ : Half maximal (50%) effective concentration

ET : Electron transfer

FBS : Fetal bovine serum

HAT : Hydrogen atom transfer

HepG2 : Human hepatocellular carcinoma cell lines

iNOS : inducible nitric oxide synthase

MAP : Mitogen-activated Protein

ORAC : Oxygen radical absorbance capacity

QOL : Quality of Life

ROS : Reactive oxygen species

SOD : Superoxide dismutase

TE : Trolox Equivalent

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

WST-1 : 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2*H*-tetrazolium, monosodium salt

目次

序論.....	1
本論.....	6
第1章 医療用漢方製剤147処方の抗酸化活性の <i>in vitro</i> 評価.....	6
第1節 活性酸素吸収能評価試験 (AAPH法).....	10
第2節 DPPHラジカル捕捉活性測定試験 (DPPH法).....	17
第3節 スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性測定試験 (SOD法).....	19
第4節 小括.....	22
第2章 選抜した医療用漢方製剤の細胞および動物レベルの抗酸化活性評価.....	25
第1節 DCFH-DAを用いた細胞内酸化ストレスに対する抗酸化活性評価.....	28
第2節 マウスにおける血清抗酸化力値 (BAP) の評価.....	32
第3節 小括.....	33
第3章 通導散の構成生薬の抗酸化活性評価.....	36
第1節 通導散構成生薬の <i>in vitro</i> 抗酸化活性.....	38
第2節 通導散構成生薬のマウスBAP値に与える影響.....	39
第3節 小括.....	41
結論.....	46
実験の部.....	50
謝辞.....	62
参考文献.....	63

序論

現在、社会環境や生活環境の変化に伴い、生活習慣病や慢性疾患、高齢化に伴う疾患が増加しており、疾病構造に変化が認められている。厚生労働省が3年ごとに実施している「患者調査」の平成26(2014)年調査によると、総患者数の上位は、悪性腫瘍、生活習慣病(高血圧、糖尿病、高脂血症)、心疾患、脳血管障害が占めており、また糖尿病や精神疾患(気分障害、うつ病、神経症性疾患)、アルツハイマー病(1999年から2014年で約18倍)が高い増加率を示している(図1)¹⁾。厚生労働省が重点的に対策に取り組むべき疾患として指定している5大疾病、すなわち精神疾患、糖尿病、がん、脳卒中、虚血性心疾患は、発症原因として酸化ストレスが深く関与していることが知られている²⁾。その他に酸化ストレスは、老化、胃潰瘍、COPD、パーキンソン病、シミ・ソバカス、白内障等の疾患に関わっているとされる³⁾。

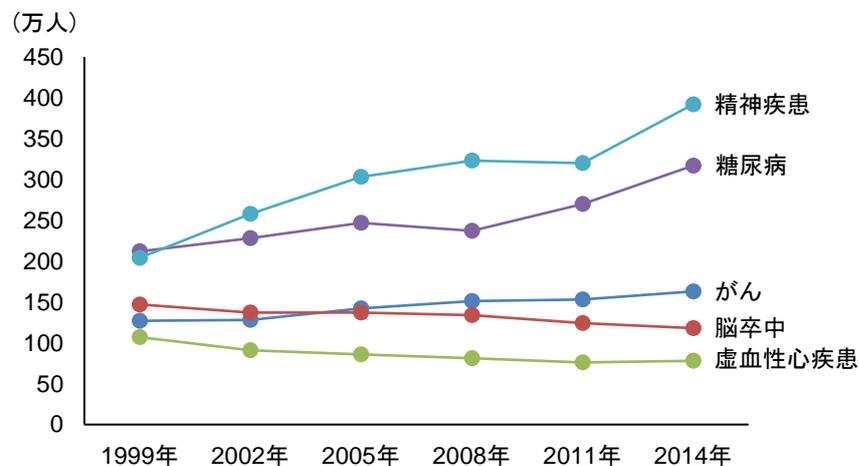


図1 5大疾病患者数の推移

酸化ストレスは生体内で発生する活性酸素種の生成と抗酸化反応のバランスが崩れ、酸化促進物質が優勢になった状態と定義される。活性酸素種(ROS)であるスーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカル、過酸化水素、一重項酸素は、生体内で免疫システムによる防御機構や細胞内シグナル伝達系において重要な役割を果たしている。生体内において

ROS の生成と消去のバランスは SOD などの抗酸化酵素群およびビタミン E などの低分子抗酸化物質などにより調整されている⁴。一方、加齢による機能低下や生活習慣の乱れ、化学物質、電磁波などにより活性酸素産生系が増大することで、防御機構を上回る量の活性酸素種が生体内で生じ、活性酸素が過剰となり酸化ストレス状態となる⁵。

過剰な活性酸素は生体内では DNA、脂質、蛋白質などの標的分子に傷害をもたらし、様々な疾患の病態形成の一因となることが報告されている⁶。例えば糖尿病の発症要因の一つとして、活性酸素が細胞内のミトコンドリアを傷害することによるインスリン分泌量の低下が報告されている。さらに、活性酸素が細胞、遺伝子を傷害することで引き起こされる突然変異が発がんの原因として、脂肪質の酸化による皮膚の保湿機能の低下がアトピー性皮膚炎の原因として、過酸化脂質の生成による血管壁への付着が動脈硬化の原因として報告されている⁷。生体防御機構のみでは過剰な ROS を対処できない場合に組織障害が疾患として現れるため、過剰な ROS の除去はこれら疾患の予防および治療に重要なアプローチとなる。

現代医学において、抗酸化作用を主作用とする医薬品はエダラボンのみであり、脳梗塞後の活性酸素増加による神経症状や筋萎縮性側索硬化症に対して認可されている⁸。その他、エダラボンは心血管疾患、糖尿病、パーキンソン病、炎症性疾患に対する治療効果も検討されている。しかし、エダラボンはネフローゼ症候群、播種性血管内凝固症候群、劇症肝炎等の重大な副作用を引き起こすことが報告され、急性腎不全による死亡例もあり、課題が残されている⁹。

一方、漢方薬の有効性の立証やエビデンスの構築が集積され始め、医療機関における漢方薬の利用が増加している¹⁰。さらに「現代病」と言われる精神疾患や慢性疾患、食習慣に関わるメタボリックシンドロームや多臓器にわたる疾患、診断のつかない様々な症状や健康問題を有する患者が増加し、漢方薬による治療を希望する患者も増加している。漢方医学は現代医学とは異なった考え方に基づいた医学体系であり、原因不明の病気や不定愁訴など、

現代医学では不得意とする領域において漢方薬の役割が注目されている。また漢方薬は複数の生薬を組み合わせた多成分系であり、マルチサイトに効果を発揮することから医療経済学的にも期待されている。さらに、多成分系である漢方薬の作用機序も解明されつつあり、新たな臨床応用の側面も見出されている。

特に酸化ストレスに深くかかわる疾患領域では漢方薬が有効な場合があり、5大疾病領域における医療用漢方製剤の使用例も報告されている。認知症の周辺症状に、抑肝散^{11,12,13}や抑肝散加陳皮半夏¹⁴、釣藤散¹⁵、糖尿病合併症に八味地黄丸¹⁶や牛車腎気丸¹⁷、白虎加人参湯¹⁸、がん化学療法合併症に半夏瀉心湯¹⁹や十全大補湯²⁰、補中益気湯²¹、脳血管障害後遺症に黄連解毒湯²²や五苓散²³、三黄瀉心湯²³、代謝異常疾患に防風通聖散²⁴や防己黄耆湯²⁵、桂枝茯苓丸²⁶などが使用されている。

現在、148処方の漢方薬は医療用漢方製剤として薬価基準に収載されており、日本の国民健康保険に適用され、日常診療の中で一般の現代薬と同様に利用されている²⁷。東邦大学では2005年医療センター大森病院に東洋医学科が設置され、医療センター佐倉病院では2008年に漢方科が開設された。2012年より全診療科の外来患者数を制限しているが、漢方科を受診する患者数は増え続けている(図2)²⁸。その要因として、疾病構造の変化による漢方薬の需要が増えたことや、2001年に策定された文部科学省の医学教育モデル・コア・カリキュラムに「和漢薬(漢方薬)の特徴や使用の現状について概説できる」が盛り込まれ、医学部で漢方を学んだ医師による、漢方薬の処方件数の増加が考えられる。さらに2016年に改訂された医学教育モデル・コア・カリキュラムでは、「漢方医学の特徴や、主な和漢薬(漢方薬)の適応、薬理作用を概説できる」と文言が修正され、より進んだ内容になっており²⁹、漢方診療の重要性が増していることがうかがえる。

一方、現行の薬学教育のモデル・コアカリキュラムにおいては、「漢方の考え方、疾患概念、代表的な漢方薬の適応、副作用や注意事項などに関する基本的事項を修得する」ことが挙げられている³⁰。すなわち、薬剤師においても、漢方医学における診断法、体質や病態の

捉え方、治療法について理解し、現代医療で使用される漢方薬の役割や、漢方薬の副作用、使用上の注意点について修得することは必至である。

このような状況下において、大学病院は専門分化された臓器別診療を得意とする一方で、漢方科は総合診療科としての役割を持っており、全人的医療の実践が可能となる。また大学病院において、最先端の現代医学的な治療や検査を行うことに加え、漢方医学が現代医学を補完することによって、両者が融合した統合医療の提供が可能となる。

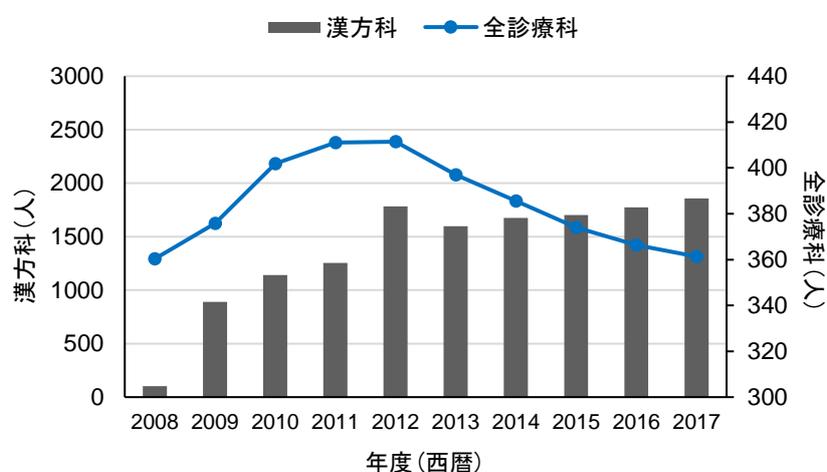


図 2 東邦大学医療センター佐倉病院外来患者数の推移

このような背景から、統合医療に対応できる漢方薬をさらに有効利用するためには科学的エビデンスの提供が必要となる。現在、保険適応されている医療用漢方製剤は、当時、長年の使用経験のある漢方薬であることから、有効性・安全性に問題が無いとされ、臨床データ無しで承認されたものである。現行の承認制度では、新規申請には通常の医薬品と同様に臨床データが必要であり、今後新しい医療用漢方製剤が承認されることは困難であるため、148 処方薬をさらに有効利用するために科学的エビデンスの集積が重要課題と考えられる。

以上の経緯より本研究では、酸化ストレス疾患の薬物治療に漢方薬を相補的に活用することにより患者の QOL 向上を目指して、保険適応されている医療用漢方製剤のうち外用剤

の紫雲膏を除く 147 処方の中から、優れた抗酸化活性を有する処方を見出すことを目的とした。

第 1 章では、医療用漢方製剤 147 処方に関して、網羅的な *in vitro* 抗酸化活性スクリーニング (活性酸素吸収能評価試験、DPPH ラジカル捕捉活性測定試験、スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性測定試験) を行うことで高い抗酸化活性を有する漢方製剤を選抜した。

第 2 章では、選抜した高い *in vitro* 抗酸化活性を示した漢方製剤について、細胞および動物レベルでの抗酸化作用を評価した。細胞実験には Hep-G2 細胞を用いて、細胞透過性で活性酸素感受性の蛍光プローブである DCFH-DA を用いて抗酸化活性を測定した。また動物実験ではマウスを用いて、漢方製剤の連続経口投与により血液中の抗酸化力に与える影響を測定した。

第 3 章では、最も強い抗酸化作用を示した漢方製剤に関して、漢方処方を構成する生薬の抗酸化活性の寄与度を *in vitro* および *in vivo* での抗酸化活性試験により解析した。

本論

第1章 医療用漢方製剤 147 処方の抗酸化活性の *in vitro* 評価

本章では外用剤の紫雲膏を除く 147 処方の経口医療用漢方製剤に関して、3 種の *in vitro* 抗酸化活性試験、すなわち、活性酸素吸収能評価試験 (APPH 法)、DPPH ラジカル捕捉活性測定試験 (DPPH 法)、スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性測定試験 (SOD 法)を用いてスクリーニングを行った。

代表的な活性酸素種として、スーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素などが知られる⁵。食品等の抗酸化作用の評価において、有機ラジカル捕捉能やスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性の測定が広く行われている。

有機ラジカルに対する抗酸化能の測定法は、HAT (hydrogen atom transfer : 水素原子供与)あるいは ET (electron transfer : 電子供与) 反応を反応機構とする二種のタイプに大別される。HAT 反応に基づく測定法の多数はアゾ化合物の熱分解により生じるペルオキシドラジカルとの競合的な反応様式によるもので、AAPH 法が代表的である。AAPH 法は生体成分の過酸化反応に関与する脂質ペルオキシドラジカルを模したラジカル種を用いた水系における生理的 pH での反応であることから生体での酸化反応に近い測定系である^{31,32}。

ET 反応に基づく測定法では DPPH 法が代表的である。吸光度を測定するのみで抗酸化能を評価できる非常に簡便な方法であるため、最も広く用いられている測定法の一つである³²。しかしこれら 2 種の測定系ではラジカル捕捉活性を示す化合物に差異が生じることが知られている。

AAPH 法は HAT 機構に基づくことから、カロテノイド等の主に一重項酸素に作用する抗酸化物質を検出できない点が挙げられる。また、DPPH 法ではフラボノイドやフェニルプロパノイドの中で、オルトジフェノール構造やオルトトリフェノール構造を有さない化合物は DPPH 捕捉能を有さないことが報告されている³²。

一方、SOD は生体内で発生する ROS の基になるスーパーオキシドアニオンラジカルを過酸化水素と酸素に不均化する。スーパーオキシドアニオンラジカルの酸化力は比較的弱いですが、最終産物であるヒドロキシルラジカルおよび一重項酸素の酸化力は非常に強力であることから、SOD は酸化ストレスに対する第一防御ラインを担う抗酸化酵素となる。赤ワインや緑茶に含まれる抗酸化物質は SOD 様作用を示すことでスーパーオキシドアニオンラジカルを捕捉することから、SOD 活性は一つの重要な抗酸化活性の指標となる³³。

以上より、原理が異なる評価系を用いた場合、測定値が必ずしも一致しない事例があることから、食品等の抗酸化活性評価においては異なる反応原理を用いた 2 種以上の評価法により測定することが望ましいと考えられている。そのため本研究において、多成分系から構成される漢方製剤の抗酸化活性を網羅的に評価するために、異なる測定原理を有する 3 種の試験、AAPH 法、DPPH 法、SOD 法を用いて、経口医療用漢方製剤 147 処方の抗酸化活性の *in vitro* 評価を行うことにした。

本研究において使用した経口医療用漢方製剤は、50 音順に番号をふり、表 1 に示した。漢方製剤間の抗酸化活性を比較するために、各漢方製剤の臨床用量を考慮して、各々の添付文書に定めた投与量を基準として一日使用量を 1 Unit (U) として、各製剤試料を調製した。

表 1 使用医療用漢方製剤一覧

No.	漢方製剤名	No.	漢方製剤名	No.	漢方製剤名
1	安中散	34	桂枝加苓朮附湯	67	芍薬甘草湯
2	胃苓湯	35	桂枝湯	68	芍薬甘草附子湯
3	茵陳蒿湯	36	桂枝人参湯	69	十全大補湯
4	茵陳五苓散	37	桂枝茯苓丸	70	十味敗毒湯
5	温経湯	38	桂枝茯苓丸加薏苡仁	71	潤腸湯
6	温清飲	39	桂芍知母湯	72	小建中湯
7	越婢加朮湯	40	啓脾湯	73	小柴胡湯
8	黄耆建中湯	41	桂麻各半湯	74	小柴胡湯加桔梗石膏
9	黄芩湯	42	香蘇散	75	小青竜湯
10	黄連解毒湯	43	五虎湯	76	小半夏加茯苓湯
11	黄連湯	44	五積散	77	消風散
12	乙字湯	45	牛車腎気丸	78	升麻葛根湯
13	葛根加朮附湯	46	呉茱萸湯	79	四苓湯
14	葛根湯	47	五淋散	80	辛夷清肺湯
15	葛根湯加川芎辛夷	48	五苓散	81	参蘇飲
16	加味帰脾湯	49	柴陷湯	82	神秘湯
17	加味逍遙散	50	柴胡加竜骨牡蛎湯	83	真武湯
18	甘草湯	51	柴胡桂枝乾姜湯	84	清上防風湯
19	甘麦大棗湯	52	柴胡桂枝湯	85	清暑益気湯
20	桔梗石膏	53	柴胡清肝湯	86	清心蓮子飲
21	桔梗湯	54	柴朴湯	87	清肺湯
22	帰脾湯	55	柴苓湯	88	川芎茶調散
23	芎帰膠艾湯	56	三黄瀉心湯	89	疎経活血湯
24	芎帰調血飲	57	酸棗仁湯	90	大黄甘草湯
25	九味檳榔湯	58	三物黄芩湯	91	大黄牡丹皮湯
26	荊芥連翹湯	59	滋陰降火湯	92	大建中湯
27	桂枝加黄耆湯	60	滋陰至宝湯	93	大柴胡湯
28	桂枝加葛根湯	61	四逆散	94	大柴胡湯去大黄
29	桂枝加厚朴杏仁湯	62	四君子湯	95	大承気湯
30	桂枝加芍薬大黄湯	63	梔子柏皮湯	96	大防風湯
31	桂枝加芍薬湯	64	七物降下湯	97	竹茹温胆湯
32	桂枝加朮附湯	65	四物湯	98	治打撲一方
33	桂枝加竜骨牡蛎湯	66	炙甘草湯	99	治頭瘡一方

表 1 使用医療用漢方製剤一覧 つづき

No.	漢方製剤名	No.	漢方製剤名	No.	漢方製剤名
100	調胃承気湯	116	人参湯	132	麻黄湯
101	釣藤散	117	人参養栄湯	133	麻黄附子細辛湯
102	腸癰湯	118	排膿散及湯	134	麻杏甘石湯
103	猪苓湯	119	麦門冬湯	135	麻杏薏甘湯
104	猪苓湯合四物湯	120	八味地黄丸	136	麻子仁丸
105	通導散	121	半夏厚朴湯	137	木防已湯
106	桃核承気湯	122	半夏瀉心湯	138	薏苡仁湯
107	当帰飲子	123	半夏白朮天麻湯	139	抑肝散
108	当帰建中湯	124	白虎加人参湯	140	抑肝散加陳皮半夏
109	当帰四逆加呉茱萸生姜湯	125	茯苓飲	141	六君子湯
110	当帰芍薬散	126	茯苓飲合半夏厚朴湯	142	立効散
111	当帰芍薬散加附子	127	附子理中湯	143	竜胆瀉肝湯
112	当帰湯	128	平胃散	144	苓甘姜味辛夏仁湯
113	二朮湯	129	防已黄耆湯	145	苓姜朮甘湯
114	二陳湯	130	防風通聖散	146	苓桂朮甘湯
115	女神散	131	補中益気湯	147	六味丸

第1節 活性酸素吸収能評価試験 (AAPH 法)

AAPH 法は、ラジカル生成源である AAPH の熱分解により生じるペルオキシドラジカルの捕捉活性を測定する方法である。AAPH より発生したペルオキシドラジカルが蛍光物質であるフルオレセインを分解する原理を用いて、抗酸化物質の存在下での蛍光強度減少の抑制を、抗酸化活性として評価した。実験では蛍光強度を経時的に測定し、蛍光強度の軸 (縦軸)、時間軸 (横軸) をプロットしたグラフの曲線下面積 (AUC) を算出した。標準物質である Trolox [(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid] の AUC と測定試料の AUC を比較することで、漢方製剤の抗酸化活性を Trolox 当量 (Trolox Equivalent : TE) として算出した (図 3)^{34,35}。

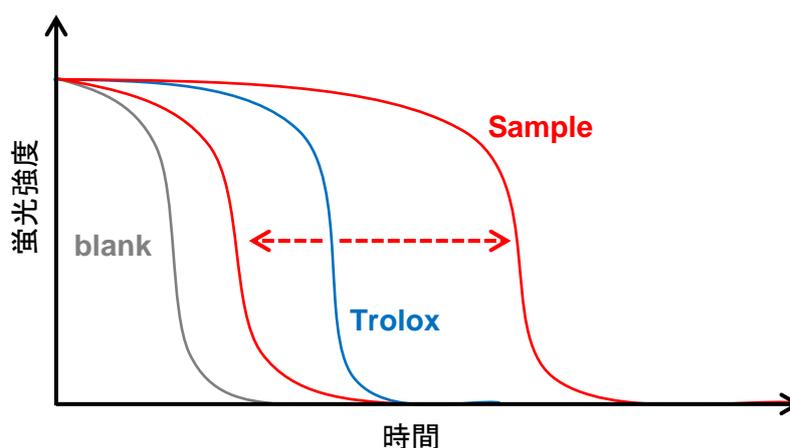


図 3 AAPH 法における AUC の算出

本実験では医療用漢方製剤 147 処方について、最終濃度 155.6 nUnit/mL における Trolox 当量を算出した。表 2 には 147 全処方の Trolox 当量を示し、表 3 には活性強度の高かった上位 10 処方を示した。このうち通導散が最も高い Trolox 当量 (28,660 $\mu\text{M TE/Unit}$) を示し、次いで麻子仁丸 (13,409 $\mu\text{M TE/Unit}$)、大柴胡湯 (11,567 $\mu\text{M TE/Unit}$)、大承気湯 (9,498 $\mu\text{M TE/Unit}$)、防風通聖散 (8,306 $\mu\text{M TE/Unit}$) の順に高い Trolox 当量を示した。

表 2 医療用漢方製剤 147 処方の *in vitro* ラジカル捕捉活性

No.	漢方製剤名	AAPH		DPPH (%)		SOD (%)	
		Trolox 当量	100	50	83.3	41.6	
		($\mu\text{M TE/Unit}$)	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	
1	安中散 ^c	1384 ± 13	30.4 ± 1.7		70.7 ± 8.3		
2	胃苓湯 ^f	2864 ± 131	63.4 ± 1.6		78.6 ± 1.8		
3	茵陳蒿湯 ^a	4277 ± 277	90.3 ± 0.7	59.1 ± 1.0	87.6 ± 3.6		
4	茵陳五苓散 ^f	3512 ± 125	71.5 ± 1.0		89.5 ± 1.4		
5	溫經湯 ^c	4247 ± 71	90.3 ± 2.6	39.6 ± 3.1	92.1 ± 1.0	81.1 ± 3.3	
6	溫清飲 ^c	6991 ± 119	92.6 ± 1.6	76.8 ± 0.8	97.5 ± 3.8	83.9 ± 8.0	
7	越婢加朮湯 ^c	2579 ± 120	79.9 ± 1.4		91.3 ± 0.5	76.4 ± 2.4	
8	黃耆建中湯 ^f	2965 ± 20	91.1 ± 0.6	54.4 ± 0.7	87.3 ± 1.6		
9	黃芩湯 ^d	2353 ± 97	94.3 ± 0.6	66.9 ± 0.9	94.8 ± 2.5	72.0 ± 1.8	
10	黃連解毒湯 ^a	4034 ± 130	46.4 ± 1.6		73.1 ± 3.7		
11	黃連湯 ^a	1069 ± 75	39.8 ± 1.1		71.2 ± 2.7		
12	乙字湯 ^c	6255 ± 79	91.6 ± 1.4	73.3 ± 0.8	95.7 ± 2.0	90.2 ± 0.8	
13	葛根加朮附湯 ^d	5713 ± 242	93.2 ± 1.6	61.4 ± 0.3	89.1 ± 0.3		
14	葛根湯 ^c	6596 ± 288	91.4 ± 0.1	61.1 ± 0.8	93.1 ± 7.0	87.3 ± 0.3	
15	葛根湯加川芎辛夷 ^a	5594 ± 82	92.2 ± 0.5	56.3 ± 0.3	96.3 ± 3.5	92.9 ± 0.9	
16	加味帰脾湯 ^a	2165 ± 149	48.7 ± 1.2		50.0 ± 4.7		
17	加味逍遙散 ^c	1429 ± 24	91.4 ± 2.2	54.3 ± 0.5	78.0 ± 1.3		
18	甘草湯 ^b	654 ± 119	15.7 ± 2.0		25.5 ± 5.8		
19	甘麦大棗湯 ^c	1792 ± 41	31.6 ± 1.7		66.0 ± 4.9		
20	桔梗石膏 ^c	0 ± 30	4.1 ± 1.4		0.0 ± 0.0		
21	桔梗湯 ^f	745 ± 200	6.5 ± 1.5		0.0 ± 0.0		
22	帰脾湯 ^f	837 ± 34	22.4 ± 0.7		46.5 ± 5.5		
23	芎帰膠艾湯 ^c	4622 ± 2	98.1 ± 0.4	74.7 ± 1.5	94.9 ± 0.8	90.4 ± 1.7	
24	芎帰調血飲 ^e	2578 ± 4	66.7 ± 1.0		71.5 ± 3.4		
25	九味檳榔湯 ^c	7560 ± 153	92.1 ± 0.5	90.1 ± 0.6	100.0 ± 1.7	93.5 ± 3.2	
26	荊芥連翹湯 ^a	5622 ± 99	91.3 ± 0.3	59.8 ± 1.2	88.6 ± 2.2		
27	桂枝加黃耆湯 ^g	1285 ± 51	77.0 ± 2.7		91.3 ± 1.5	66.6 ± 0.7	
28	桂枝加葛根湯 ^g	2676 ± 99	77.0 ± 0.9		100.0 ± 7.0	61.4 ± 4.6	
29	桂枝加厚朴杏仁湯 ^g	1803 ± 12	92.5 ± 0.7	51.8 ± 0.8	99.7 ± 8.6	77.7 ± 0.8	
30	桂枝加芍薬大黃湯 ^f	3573 ± 167	93.0 ± 0.9	91.7 ± 0.1	86.0 ± 0.5		
31	桂枝加芍薬湯 ^c	4842 ± 588	91.1 ± 0.0	51.4 ± 0.0	94.6 ± 1.3	79.6 ± 1.3	

表 2 医療用漢方製剤 147 処方の *in vitro* ラジカル捕捉活性 つづき

No.	漢方製剤名	AAPH		DPPH (%)		SOD (%)	
		Trolox 当量	100	50	83.3	41.6	
		($\mu\text{M TE/Unit}$)	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	
32	桂枝加朮附湯 ^c	2981 ± 49	90.6 ± 0.8	52.6 ± 0.6	87.0 ± 7.7		
33	桂枝加竜骨牡蛎湯 ^c	0 ± 78	76.6 ± 1.2		84.0 ± 2.2		
34	桂枝加苓朮附湯 ^a	3285 ± 9	91.4 ± 0.5	50.5 ± 1.2	98.3 ± 2.1	84.8 ± 1.0	
35	桂枝湯 ^c	3080 ± 253	91.7 ± 0.6	52.4 ± 1.2	94.0 ± 0.8	71.9 ± 3.6	
36	桂枝人参湯 ^f	912 ± 126	33.3 ± 0.7		45.8 ± 12.3		
37	桂枝茯苓丸 ^c	887 ± 102	92.0 ± 0.9	76.4 ± 1.5	94.2 ± 2.2	92.3 ± 1.2	
38	桂枝茯苓丸加薏苡仁 ^f	926 ± 238	90.6 ± 1.1	47.7 ± 4.4	92.8 ± 2.7	70.2 ± 2.8	
39	桂芍知母湯 ^d	3691 ± 111	93.6 ± 2.7	61.6 ± 1.9	96.1 ± 3.4	85.1 ± 1.6	
40	啓脾湯 ^f	481 ± 144	35.7 ± 2.9		11.4 ± 3.5		
41	桂麻各半湯 ^g	2154 ± 139	93.5 ± 0.4	53.8 ± 1.2	99.0 ± 3.6	88.6 ± 1.4	
42	香蘇散 ^c	3179 ± 207	53.7 ± 0.8		71.0 ± 2.8		
43	五虎湯 ^b	1942 ± 271	45.0 ± 0.9		84.1 ± 0.2		
44	五積散 ^c	3497 ± 26	68.5 ± 2.4		80.5 ± 1.7		
45	牛車腎気丸 ^f	1929 ± 177	63.2 ± 1.4		82.7 ± 2.0		
46	呉茱萸湯 ^c	2079 ± 123	87.3 ± 1.5		82.6 ± 1.7		
47	五淋散 ^f	5943 ± 265	92.8 ± 0.3	53.4 ± 0.9	93.5 ± 0.8	78.5 ± 1.8	
48	五苓散 ^c	1006 ± 27	21.6 ± 1.7		66.9 ± 6.9		
49	柴陷湯 ^c	5577 ± 183	78.2 ± 3.8		97.0 ± 1.6	72.8 ± 3.7	
50	柴胡加竜骨牡蛎湯 ^f	3113 ± 108	62.6 ± 0.4		86.3 ± 0.8		
51	柴胡桂枝乾姜湯 ^c	5335 ± 484	91.4 ± 0.4	52.2 ± 0.4	86.8 ± 3.2		
52	柴胡桂枝湯 ^c	2926 ± 184	91.7 ± 0.2	44.4 ± 0.4	84.4 ± 2.9		
53	柴胡清肝湯 ^c	8117 ± 80	91.1 ± 1.8	61.2 ± 0.9	93.8 ± 1.0	87.7 ± 1.8	
54	柴朴湯 ^f	4246 ± 90	95.0 ± 1.1	59.7 ± 1.4	92.0 ± 1.0	80.8 ± 3.0	
54	柴苓湯 ^f	3629 ± 40	85.0 ± 1.5		91.7 ± 1.7	75.1 ± 2.9	
56	三黄瀉心湯 ^c	2286 ± 302	43.1 ± 1.4		83.1 ± 3.3		
57	酸棗仁湯 ^a	905 ± 37	36.8 ± 0.7		10.9 ± 1.6		
58	三物黄芩湯 ^f	2403 ± 133	86.4 ± 0.0		91.1 ± 1.8	79.2 ± 1.8	
59	滋陰降火湯 ^f	1662 ± 167	49.5 ± 2.6		70.2 ± 1.5		
60	滋陰至宝湯 ^f	2962 ± 117	76.4 ± 3.0		74.5 ± 2.1		
61	四逆散 ^f	1109 ± 70	37.1 ± 0.9		52.5 ± 14.5		
62	四君子湯 ^f	1040 ± 42	13.5 ± 0.9		58.3 ± 4.9		

表 2 医療用漢方製剤 147 処方の *in vitro* ラジカル捕捉活性 つづき

No.	漢方製剤名	AAPH		DPPH (%)		SOD (%)	
		Trolox 当量	100	50	83.3	41.6	
		($\mu\text{M TE/Unit}$)	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	
63	梔子柏皮湯 ^c	1091 ± 52	34.1 ± 0.5		48.5 ± 8.4		
64	七物降下湯 ^a	3896 ± 32	75.0 ± 0.1		93.0 ± 0.4	71.1 ± 6.0	
65	四物湯 ^c	1329 ± 101	54.1 ± 0.5		87.9 ± 0.3		
66	炙甘草湯 ^c	2262 ± 33	59.7 ± 1.2		78.6 ± 0.2		
67	芍薬甘草湯 ^c	1044 ± 84	88.0 ± 1.0		94.1 ± 1.5	79.0 ± 1.1	
68	芍薬甘草附子湯 ^d	1966 ± 188	91.5 ± 0.1	49.2 ± 1.0	94.0 ± 3.5	86.4 ± 1.6	
69	十全大補湯 ^c	2813 ± 122	82.1 ± 2.4		79.8 ± 4.4		
70	十味敗毒湯 ^a	2314 ± 19	60.0 ± 0.2		76.7 ± 18.7		
71	潤腸湯 ^f	4674 ± 229	94.2 ± 0.7	81.0 ± 1.4	94.0 ± 2.0	87.9 ± 2.6	
72	小建中湯 ^c	1607 ± 20	91.5 ± 1.2	49.7 ± 2.8	87.7 ± 3.0		
73	小柴胡湯 ^c	4646 ± 55	87.0 ± 1.3		80.4 ± 1.0		
74	小柴胡湯加桔梗石膏 ^f	2699 ± 207	62.6 ± 2.0		86.5 ± 1.8		
75	小青竜湯 ^c	3229 ± 100	87.9 ± 1.9		86.2 ± 2.2		
76	小半夏加茯苓湯 ^c	829 ± 19	4.6 ± 1.8		57.5 ± 0.8		
77	消風散 ^c	2214 ± 48	71.2 ± 1.4		91.3 ± 5.2	67.4 ± 1.0	
78	升麻葛根湯 ^f	5295 ± 95	80.6 ± 3.4		86.2 ± 0.3		
79	四苓湯 ^a	498 ± 103	6.7 ± 1.0		10.1 ± 10.2		
80	辛夷清肺湯 ^a	5119 ± 1	94.3 ± 1.3	74.2 ± 0.2	88.9 ± 2.3		
81	参蘇飲 ^f	2124 ± 73	41.8 ± 1.0		70.2 ± 2.4		
82	神秘湯 ^c	5237 ± 77	88.5 ± 1.8		92.4 ± 0.2	82.1 ± 2.5	
83	真武湯 ^c	0 ± 76	44.7 ± 0.6		63.0 ± 1.0		
84	清上防風湯 ^a	4995 ± 168	92.4 ± 0.4	53.6 ± 0.3	96.0 ± 1.3	77.0 ± 1.4	
85	清暑益気湯 ^f	1396 ± 195	25.5 ± 1.4		46.6 ± 1.2		
86	清心蓮子飲 ^f	4483 ± 259	93.0 ± 0.7	46.4 ± 1.0	85.7 ± 3.0		
87	清肺湯 ^f	3741 ± 124	64.5 ± 0.7		74.9 ± 2.0		
88	川芎茶調散 ^f	1972 ± 241	90.7 ± 0.5	63.3 ± 0.8	95.9 ± 1.7	85.5 ± 1.9	
89	疎経活血湯 ^f	2602 ± 57	43.4 ± 2.1		67.4 ± 12.7		
90	大黃甘草湯 ^a	5426 ± 105	92.6 ± 0.2	69.6 ± 0.5	94.9 ± 1.7	84.7 ± 1.5	
91	大黃牡丹皮湯 ^c	3563 ± 291	90.8 ± 0.8	63.8 ± 0.5	91.8 ± 4.3	78.4 ± 0.4	
92	大建中湯 ^c	741 ± 35	35.2 ± 1.8		45.2 ± 1.6		
93	大柴胡湯 ^c	11567 ± 61	90.3 ± 2.1	92.4 ± 0.5	96.0 ± 4.3	96.9 ± 1.9	

表 2 医療用漢方製剤 147 処方の *in vitro* ラジカル捕捉活性 つづき

No.	漢方製剤名	AAPH	DPPH (%)		SOD (%)	
		Trolox 当量	100	50	83.3	41.6
		($\mu\text{M TE/Unit}$)	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$	$\mu\text{Unit/mL}$
94	大柴胡湯去大黃 ^c	5769 ± 121	94.1 ± 0.9	82.9 ± 0.5	100.0 ± 1.4	91.1 ± 0.9
95	大承気湯 ^a	9498 ± 158	91.0 ± 0.2	71.2 ± 0.4	96.3 ± 1.4	79.3 ± 1.3
96	大防風湯 ^f	3759 ± 213	58.8 ± 1.4		77.8 ± 4.5	
97	竹筴温胆湯 ^f	3444 ± 178	33.5 ± 0.7		45.7 ± 7.0	
98	治打撲一方 ^f	6853 ± 38	92.9 ± 0.3	89.7 ± 0.8	97.9 ± 1.6	92.7 ± 1.7
99	治頭瘡一方 ^f	5680 ± 413	86.2 ± 1.4		95.2 ± 1.1	77.1 ± 1.2
100	調胃承気湯 ^f	4314 ± 98	91.2 ± 0.3	83.0 ± 0.1	98.3 ± 1.8	89.1 ± 0.3
101	釣藤散 ^f	2505 ± 83	47.2 ± 0.7		79.4 ± 5.8	
102	腸癰湯 ^c	278 ± 46	62.1 ± 0.3		87.1 ± 1.4	
103	猪苓湯 ^c	0 ± 15	7.4 ± 1.7		56.8 ± 5.3	
104	猪苓湯合四物湯 ^f	774 ± 69	44.4 ± 0.8		76.2 ± 2.3	
105	通導散 ^c	28660 ± 355	90.2 ± 2.2	92.0 ± 1.2	100.0 ± 3.8	92.6 ± 0.7
106	桃核承気湯 ^c	6678 ± 261	91.8 ± 1.0	89.1 ± 0.2	99.0 ± 1.8	95.4 ± 2.4
107	当帰飲子 ^f	2589 ± 174	54.5 ± 1.2		76.2 ± 1.4	
108	当帰建中湯 ^f	2367 ± 46	65.0 ± 1.9		86.8 ± 1.1	
109	当帰四逆加呉茱萸生姜湯 ^f	2882 ± 34	91.0 ± 0.9	48.9 ± 0.2	92.6 ± 4.5	79.4 ± 0.8
110	当帰芍薬散 ^c	211 ± 167	90.8 ± 0.4	39.2 ± 0.6	84.7 ± 6.5	
111	当帰芍薬散加附子湯 ^a	1890 ± 20	94.4 ± 1.1	55.7 ± 1.0	89.3 ± 0.8	
112	当帰湯 ^f	2354 ± 54	80.2 ± 1.7		84.1 ± 0.2	
113	二朮湯 ^f	3485 ± 104	85.4 ± 1.7		89.1 ± 1.3	
114	二陳湯 ^f	1237 ± 112	14.1 ± 0.7		43.9 ± 7.3	
115	女神散 ^f	3339 ± 16	92.9 ± 1.3	62.1 ± 0.4	98.1 ± 2.9	84.8 ± 0.6
116	人参湯 ^f	222 ± 12	22.0 ± 1.4		3.2 ± 1.4	
117	人参養栄湯 ^c	2895 ± 77	81.7 ± 1.9		84.3 ± 2.9	
118	排膿散及湯 ^a	3314 ± 93	62.6 ± 1.9		81.4 ± 2.2	
119	麦門冬湯 ^c	11 ± 72	35.7 ± 1.8		37.2 ± 10.3	
120	八味地黄丸 ^a	1450 ± 124	85.4 ± 2.2		88.9 ± 3.1	
121	半夏厚朴湯 ^c	3770 ± 22	91.6 ± 0.9	53.0 ± 0.8	81.5 ± 3.1	
122	半夏瀉心湯 ^c	3000 ± 25	66.6 ± 0.6		80.0 ± 3.0	
123	半夏白朮天麻湯 ^c	2022 ± 186	37.1 ± 2.3		25.6 ± 0.4	
124	白虎加人参湯 ^c	1310 ± 63	23.8 ± 11.0		67.3 ± 10.6	

表 2 医療用漢方製剤 147 処方の *in vitro* ラジカル捕捉活性 つづき

No.	漢方製剤名	AAPH		DPPH (%)		SOD (%)	
		Trolox 当量	100	50	83.3	41.6	
		(μ M TE/Unit)	μ Unit/mL	μ Unit/mL	μ Unit/mL	μ Unit/mL	
125	茯苓飲 ^c	2545 \pm 75	34.3 \pm 0.5		57.3 \pm 7.0		
126	茯苓飲合半夏厚朴湯 ^f	2759 \pm 135	70.1 \pm 2.2		83.7 \pm 2.8		
127	附子理中湯 ^d	1931 \pm 252	52.6 \pm 0.6		52.2 \pm 3.3		
128	平胃散 ^a	3091 \pm 198	65.3 \pm 2.1		69.2 \pm 1.5		
129	防己黃耆湯 ^a	1419 \pm 47	52.7 \pm 1.3		84.0 \pm 2.1		
130	防風通聖散 ^a	8306 \pm 29	92.8 \pm 0.3	82.1 \pm 0.5	98.8 \pm 0.7	88.7 \pm 1.3	
131	補中益氣湯 ^c	3059 \pm 60	52.2 \pm 2.5		72.1 \pm 2.2		
132	麻黃湯 ^c	478 \pm 79	69.2 \pm 0.7		81.0 \pm 1.0		
133	麻黃附子細辛湯 ^a	797 \pm 1202	40.6 \pm 1.3		94.8 \pm 4.3	44.7 \pm 4.9	
134	麻杏甘石湯 ^c	4150 \pm 333	45.3 \pm 1.5		87.9 \pm 2.9		
135	麻杏薤甘湯 ^c	399 \pm 1	32.4 \pm 0.2		55.3 \pm 5.4		
136	麻子仁丸 ^a	13409 \pm 244	92.6 \pm 0.3	92.5 \pm 0.6	48.8 \pm 2.6		
137	木防己湯 ^c	1758 \pm 306	51.9 \pm 1.5		85.7 \pm 2.9		
138	薏苡仁湯 ^f	5398 \pm 165	90.6 \pm 0.6	50.6 \pm 0.7	89.3 \pm 3.3		
139	抑肝散 ^a	3381 \pm 326	75.8 \pm 4.6		79.2 \pm 7.8		
140	抑肝散加陳皮半夏 ^c	3559 \pm 103	93.0 \pm 3.4	46.7 \pm 0.9	86.6 \pm 0.3		
141	六君子湯 ^c	2258 \pm 117	26.3 \pm 0.4		69.4 \pm 6.4		
142	立効散 ^f	3090 \pm 2	65.6 \pm 1.0		78.7 \pm 1.8		
143	竜胆瀉肝湯 ^c	6466 \pm 33	90.8 \pm 1.6	64.3 \pm 0.6	92.0 \pm 0.4	89.8 \pm 0.3	
144	苓甘姜味辛夏仁湯 ^a	1899 \pm 0	32.9 \pm 0.7		69.8 \pm 4.6		
145	苓姜朮甘湯 ^a	1776 \pm 116	18.9 \pm 1.4		15.8 \pm 11.1		
146	苓桂朮甘湯 ^a	465 \pm 58	45.1 \pm 0.2		79.7 \pm 3.7		
147	六味丸 ^f	309 \pm 77	64.5 \pm 0.6		80.3 \pm 2.1		

Data represent the means of triplicate \pm SD of each group, n = 3.

^a 大杉製薬株式会社 (Osaka, Japan). ^b クラシエ薬品株式会社 (Tokyo, Japan). ^c 小太郎漢方製薬株式会社 (Osaka, Japan). ^d 三和生薬株式会社 (Tochigi, Japan). ^e 太虎精堂製薬株式会社 (Hyogo, Japan). ^f 株式会社ツムラ (Tokyo, Japan). ^g 株式会社東洋薬行 (Osaka, Japan).

表 3 上位 10 処方 of Trolox 当量 ($\mu\text{M TE/Unit}$)

漢方製剤名	Trolox 当量 ^a
通導散	28660 \pm 355
麻子仁丸	13409 \pm 244
大柴胡湯	11567 \pm 61
大承氣湯	9498 \pm 158
防風通聖散	8306 \pm 29
柴胡清肝湯	8117 \pm 76
九味檳榔湯	7560 \pm 153
温清飲	6991 \pm 118
治打撲一方	6853 \pm 38
桃核承氣湯	6678 \pm 26

^a \pm SD, n = 3.

第2節 DPPH ラジカル捕捉活性測定試験 (DPPH 法)

DPPH 法は、人工有機ラジカルである DPPH ラジカルを用いた化学反応による測定試験であり、抗酸化活性評価の一次スクリーニングとして汎用されている。DPPH は生体内に存在するラジカル種では無く、生体環境を反映した測定系とは言い難い点があるが、様々な化合物の抗酸化活性を簡便に測定できる長所が挙げられる³⁶。DPPH は濃紫色を呈する安定なラジカルであり、抗酸化物質の存在下で一電子が還元され無色の非ラジカル体に変化する (図 4)。

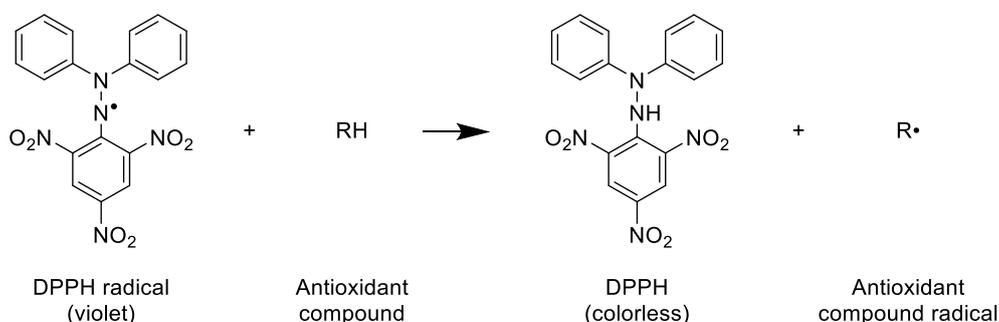


図 4 DPPH ラジカル捕捉活性測定原理

本実験では医療用漢方製剤 147 処方について、まず最終濃度 100 $\mu\text{U/mL}$ における DPPH ラジカル捕捉活性の 515 nm における吸光度を測定することで算出した。ポジティブコントロールに、酸化防止剤として食品添加物に用いられるブチルヒドロキシアニソール (BHA) を用いた。その結果、147 処方のうち 53 処方が 90% 以上の DPPH ラジカル捕捉活性を示した (表 2)。そこで、これら 53 処方に関して最終濃度 50 $\mu\text{U/mL}$ における DPPH ラジカル捕捉活性を測定した結果、麻子仁丸 (92.5%)、大柴胡湯 (92.4%)、通導散 (92.0%)、桂枝加芍薬大黃湯 (91.7%)、九味檳榔湯 (90.1%) の 5 処方が 90% 以上の DPPH ラジカル捕捉活性を示した (表 2)。

これら 5 処方間の活性強度を比較するために、最終濃度 10 $\mu\text{U/mL}$ から 100 $\mu\text{U/mL}$ までの各濃度における DPPH ラジカル捕捉活性を測定し、ロジスティック回帰分析を用いて 5 処方それぞれの EC_{50} 値を算出した (図 5)。その結果、麻子仁丸 (23.2 $\mu\text{Unit/mL}$)、通導散 (23.2 $\mu\text{Unit/mL}$)、大柴胡湯 (23.9 $\mu\text{Unit/mL}$)、桂枝加芍薬大黄湯 (25.2 $\mu\text{Unit/mL}$)、九味檳榔湯 (26.9 $\mu\text{Unit/mL}$) の順に高い DPPH ラジカル捕捉活性を示した (表 4)。

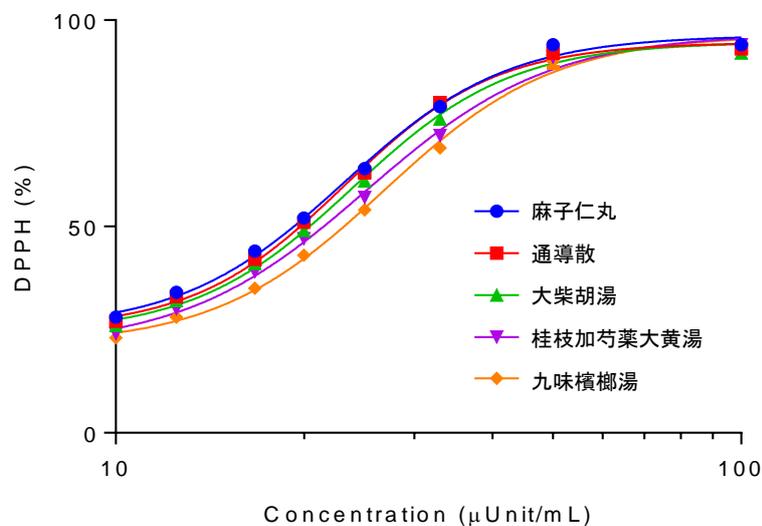


図 5 上位 5 処方の DPPH ラジカル捕捉活性—用量反応曲線

表 4 上位 5 処方の DPPH ラジカル捕捉活性 (EC_{50} 値)

漢方製剤名	EC_{50} ^a
麻子仁丸	23.2 \pm 0.9 $\mu\text{Unit/mL}$
通導散	23.2 \pm 0.6 $\mu\text{Unit/mL}$
大柴胡湯	23.9 \pm 1.1 $\mu\text{Unit/mL}$
桂枝加芍薬大黄湯	25.2 \pm 1.1 $\mu\text{Unit/mL}$
九味檳榔湯	26.9 \pm 0.9 $\mu\text{Unit/mL}$
BHA ^b	26.7 \pm 1.3 μM

^a \pm SD, n = 3. ^b Butylhydroxyanisole (positive control).

第3節 スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性測定試験 (SOD 法)

SOD 法はキサンチンから生成されるスーパーオキシドアニオンラジカルに対して捕捉活性を示す、テトラゾリウム塩 WST-1 を実験に使用した³⁷。キサンチンから生成されるスーパーオキシドアニオンラジカルと、テトラゾリウム塩 WST-1 が反応することで、ホルマザン色素が形成されることを測定原理とする。抗酸化物質の存在下ではホルマザンの生成量が減少するため、450 nm における吸光度を測定することで SOD 様活性を算出した³³ (図 6)。

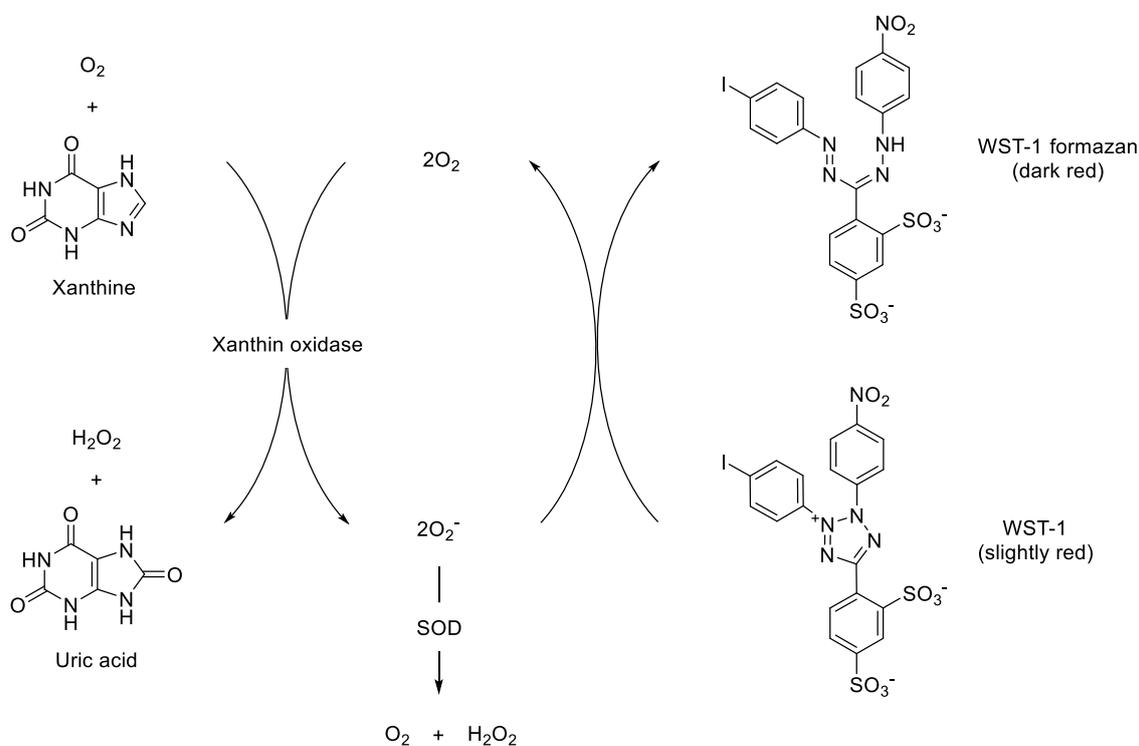


図 6 スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性測定原理「WST-1 法」

本実験では医療用漢方製剤 147 処方について、まず、最終濃度 $83.3 \mu\text{Unit/mL}$ における SOD 様活性を算出した。ポジティブコントロールとして DPPH 法と同様に BHA を用いた。その結果、147 処方のうち 48 処方が 90%以上のスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活

性を示した (表 2)。さらにこれら 48 処方に関して最終濃度 41.6 $\mu\text{Unit/mL}$ における SOD 様活性を測定した結果、大柴胡湯 (96.9%)、桃核承気湯 (95.4%)、九味檳榔湯 (93.5%)、葛根湯加川芎辛夷 (92.9%)、治打撲一方 (92.7%)、通導散 (92.6%)、桂枝茯苓丸 (92.3%)、大柴胡湯去大黄 (91.1%)、芍帰膠艾湯 (90.4%)、乙字湯 (90.2%) の 10 処方が 90% 以上のスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性を示した (表 2)。これら 10 処方間の活性強度を比較するために、最終濃度 0.42 $\mu\text{U/mL}$ から 83.3 $\mu\text{U/mL}$ までの各濃度におけるスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性を測定し、ロジスティック回帰分析を用いて 10 処方それぞれの EC_{50} 値を算出した。その結果、大柴胡湯 (6.2 $\mu\text{Unit/mL}$)、通導散 (6.3 $\mu\text{Unit/mL}$)、桃核承気湯 (6.3 $\mu\text{Unit/mL}$)、治打撲一方 (6.8 $\mu\text{Unit/mL}$)、九味檳榔湯 (14.3 $\mu\text{Unit/mL}$) の順に高いスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性を示した (図 7、表 5)。

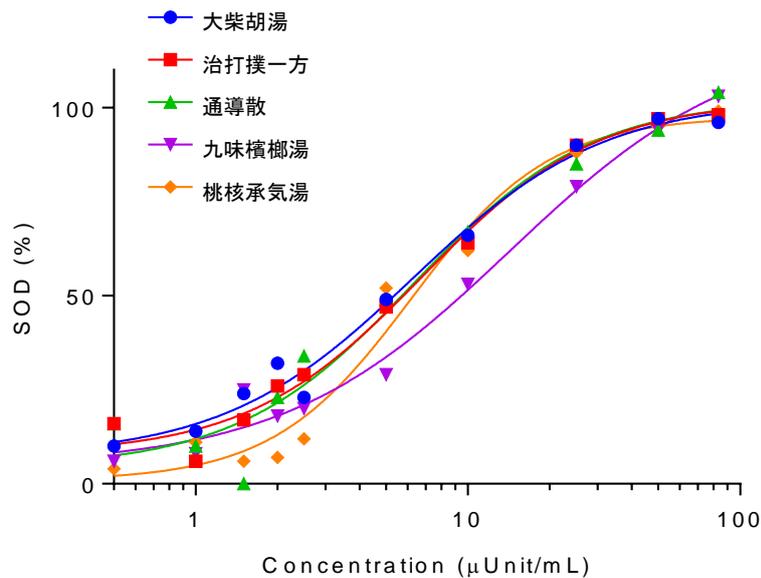


図 7 上位 5 処方のスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性-用量反応曲線

表 5 上位 5 処方のスーパーオキシドアニオンラジカル
捕捉活性 (EC₅₀ 値)

漢方製剤名	EC ₅₀ ^a
大柴胡湯	6.2 ± 1.1 μUnit/mL
通導散	6.3 ± 1.9 μUnit/mL
桃核承気湯	6.3 ± 1.1 μUnit/mL
治打撲一方	6.8 ± 1.1 μUnit/mL
九味檳榔湯	14.3 ± 4.5 μUnit/mL
BHA ^b	17.0 ± 1.0 μM

^a ± SD, n = 3. ^b Butylhydroxyanisole (positive control).

第4節 小括

異なる測定原理を有する3種の試験、AAPH法、DPPH法、SOD法を用いて、経口医療用漢方製剤147処方の網羅的な*in vitro*抗酸化活性評価を行った。それぞれの試験において高い活性を示した上位5処方を表6に示した。AAPH法では通導散が、DPPH法では麻子仁丸が、SOD法では大柴胡湯が最も高い抗酸化活性を示した。

表6 上位5処方の*in vitro*抗酸化活性

AAPH		DPPH		SOD	
漢方製剤名	Trolox 当量 ($\mu\text{M TE/Unit}$)	漢方製剤名	EC_{50} ($\mu\text{Unit/mL}$)	漢方製剤名	EC_{50} ($\mu\text{Unit/mL}$)
通導散	28660 \pm 355	麻子仁丸	23.2 \pm 0.9	大柴胡湯	6.2 \pm 1.1
麻子仁丸	13409 \pm 244	通導散	23.2 \pm 0.6	通導散	6.3 \pm 1.9
大柴胡湯	11567 \pm 61	大柴胡湯	23.9 \pm 1.1	桃核承気湯	6.3 \pm 1.1
大承気湯	9498 \pm 158	桂枝加芍薬 大黃湯	25.2 \pm 1.1	治打撲一方	6.8 \pm 1.1
防風通聖散	8306 \pm 29	九味檳榔湯	26.9 \pm 0.9	九味檳榔湯	14.3 \pm 4.5

Data represent the means of triplicate \pm SD of each group, n = 3.

それぞれの抗酸化活性の評価試験において高い抗酸化活性を示した上位5処方の構成生薬を解析した結果、大黃が共通した構成生薬であった(表7)。大黃は、鎮痛、解熱、抗炎症、抗血管新生、抗腫瘍活性などの生物活性を有し、漢方では緩下または消炎性駆瘀血剤として用いられる。大黃の含有成分として、主要成分であるアントラキノンに酸化ストレスに関連した内皮細胞傷害に対する保護効果³⁸や、センノサイドAにヒドロキシラジカル捕捉能³⁹、またスチルベノイドに肝細胞におけるMAPキナーゼの活性化を介した抗酸化作用の発現が報告されている⁴⁰。本研究において大黃を含有しない漢方製剤の抗酸化活性は低い傾向にあったことから、大黃は漢方製剤の抗酸化活性の発現に強く関与する生薬であることが示唆された。

表 7 表 6 漢方製剤の構成生薬

漢方製剤名	構成生薬							
通導散	大黄	甘草	枳実	厚朴			芒硝	当帰、陳皮、木通、蘇木、紅花
大柴胡湯	大黄		枳実		芍薬	生姜		黄芩、大棗、柴胡、半夏
麻子仁丸	大黄	甘草	枳実	厚朴	芍薬			麻子仁、杏仁
九味檳榔湯	大黄	甘草		厚朴		生姜	桂皮	檳榔子、橘皮、蘇葉、木香、呉茱萸、茯苓
治打撲一方	大黄	甘草					桂皮	川芎、川骨、丁子、檳榔
桂枝加芍薬 大黄湯	大黄	甘草			芍薬	生姜	桂皮	大棗
桃核承気湯	大黄						桂皮	芒硝 桃仁
大承気湯	大黄		枳実	厚朴			芒硝	
防風通聖散	大黄	甘草			芍薬	生姜	芒硝	当帰、黄芩、川芎、桔梗、石膏、白朮、荊芥、麻黄、薄荷、防風、山梔子、連翹、滑石

一方、大柴胡湯および通導散は3種の試験全てにおいて、高い抗酸化活性を示した。抗炎症作用を示す漢方処方、大黄の他に、柴胡と黄芩を含む処方に分類される。柴胡と黄芩を含む漢方処方、内毒素血症において肝細胞をフリーラジカルから保護する作用を示したことが報告されている⁴¹。

小柴胡湯に関する抗酸化作用として、用量依存的なスーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシルラジカル、DPPH ラジカルの捕捉活性が報告されており⁴²、さらに大柴胡湯に関しては、遺伝性高コレステロール血症のウサギに対して、大動脈内の動脈硬化の発症を抑制する効果が報告されている⁴³。大柴胡湯の動脈硬化に対する予防作用は高い抗酸化作用に起因するとされ、柴胡、黄芩、大黄が本活性に強く寄与する可能性が示唆されている。

通導散および麻子仁丸は、大黄に加えて筋緊張を緩和する作用を示す厚朴を共通して含有している。漢方処方のORAC試験を用いた抗酸化作用の評価において、厚朴を含む処方に高いTrolox当量が算出された報告がある⁴⁴。厚朴の含有成分であるmagnololとhonokiolは、RAW264.7細胞を用いた実験においてiNOSとTNF- α の産生を抑制し、さらにこれら化合物はラットを用いた実験においても、ヒドロキシルラジカルの除去による脂質過酸化の

抑制効果により、肝障害を予防する作用を示すことが報告されている⁴⁵。

In vitro における漢方製剤 147 処方の抗酸化活性評価から通導散、麻子仁丸、大柴胡湯に最も高い活性が認められた。これら処方の抗酸化活性には共通して大黄が関与し、さらに柴胡と黄芩、または厚朴が加味されることで強力な抗酸化活性を有する可能性が示唆された。

第2章 選抜した医療用漢方製剤の細胞および動物レベルの抗酸化活性評価

医療用漢方製剤 147 処方の *in vitro* 抗酸化活性評価から高い活性を示す漢方処方として通導散、麻子仁丸、大柴胡湯を見出した。本章ではこれら 3 種の処方について、細胞および動物レベルでの抗酸化活性をさらに評価した。

様々な抗酸化活性の評価法の中で培養細胞を用いた評価系は、より生体内に近い状態で抗酸化物質の作用を評価することが可能となる。通導散、大柴胡湯および麻子仁丸について、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞を用いて、ROS 蛍光プローブである 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて抗酸化活性を評価した⁴⁶。すなわち、マイクロプレートベースで細胞内抗酸化活性を評価するために、ラジカルと反応することで発光する DCFH-DA を細胞内に取り込ませ、その蛍光強度から漢方処方の抗酸化活性を測定した (図 8)。

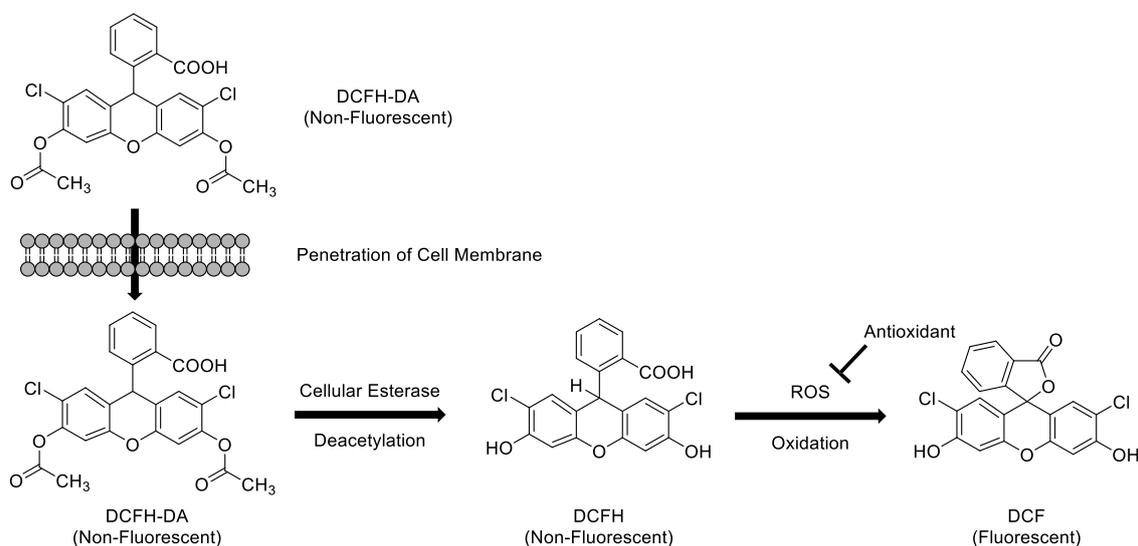
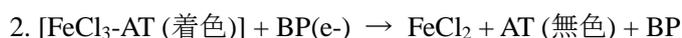
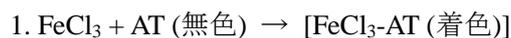


図 8 ROS 蛍光プローブ DCFH-DA を用いた細胞内抗酸化活性の測定原理

DCFH-DA は脂溶性が高く容易に細胞内に取り込まれるが、DCFH-DA は細胞内のエステラーゼによって脱アセチル化され、非蛍光型の DCFH に変換される。変換された DCFH は水溶性が高いため、細胞膜を透過せずに細胞内に滞留する。DCFH を取り込ませた細胞に ROS として過酸化水素を添加することで DCFH は酸化され、蛍光性の DCF に変化する。そのため、DCF 由来の蛍光強度を測定することにより細胞内の酸化ストレスレベルを解析することが可能となる。実験では、HepG2 細胞と通導散、大柴胡湯、麻子仁丸それぞれを共培養した後に、培地を取り除くことで、細胞内に取り込まれない化学成分を除去した。その後、DCFH-DA を添加、続いて過酸化水素を添加し、添加後から 50 分までの蛍光強度変化を共焦点顕微鏡により解析した。過酸化水素による蛍光強度の増強に対する抑制作用を抗酸化活性として評価した。

さらに本実験では、通導散、大柴胡湯および麻子仁丸に関してマウスを用いた抗酸化活性の評価を行った。Free Radical Elective Evaluator (FREE) は血液中の活性酸素やフリーラジカルレベル、または血液抗酸化力を解析することが可能となるシステムである。血液抗酸化力の判定には Biological Anti-oxidant Potential test (BAP テスト) が構築されており、血液中の抗酸化物質が活性酸素やフリーラジカルに電子供与し酸化反応を停止する還元能力を測定することで抗酸化力が数値化される⁴⁷。実際に BAP テストでは、反応試薬中に存在する色素結合三価鉄が血清中の還元性物質によって二価鉄に還元されることで無色に変化する原理を利用する。この色調変化の度合いは血清中の抗酸化物質に比例するため、505 nm における吸光度を測定することで、血清により還元された二価鉄イオンの量として BAP 値 ($\mu\text{Eq/L}$) が算出される。反応式は下の示す通りである。



AT : チオシアン酸塩、BP : 血漿分子

本実験では通導散、大柴胡湯および麻子仁丸をマウスに1日2回、2日間連続で経口投与し、漢方処方投与がマウス血清抗酸化力に与える影響を、ポジティブコントロールとして用いたアスコルビン酸の作用と比較検討した。

第1節 DCFH-DA を用いた細胞内酸化ストレスに対する抗酸化活性評価

第1項 医療用漢方製剤の HepG2 細胞に対する毒性試験

細胞内の抗酸化試験を行う前に、まず、医療用漢方製剤の HepG2 細胞に対する細胞毒性を WST-1 assay を用いて検討した。ポジティブコントロールとして、Cisplatin (CDDP) を使用した。漢方製剤については、各添加濃度における HepG2 細胞の生存率を解析した。

表 8 には医療用漢方製剤 147 処方について、添加濃度 0~10 $\mu\text{U}/\text{mL}$ までの HepG2 細胞の細胞生存率を示した。その結果、通導散 (105)、大柴胡湯 (93)、麻子仁丸 (136) はいずれも 10 $\mu\text{U}/\text{mL}$ の濃度においても明らかな細胞毒性は認められなかった。そのため、上記三種の医療用漢方製剤の細胞内抗酸化試験において、HepG2 細胞への漢方製剤の添加濃度を 10 $\mu\text{U}/\text{mL}$ として、実験を行った。

表 8 医療用漢方製剤 147 処方 of 細胞毒性試験

No	細胞生存率 (%)				No	細胞生存率 (%)				No	細胞生存率 (%)			
	濃度 (μU/mL)					濃度 (μU/mL)					濃度 (μU/mL)			
	0	0.1	1	10		0	0.1	1	10		0	0.1	1	10
1	100.0	146.5	153.9	185.9	51	100.0	121.1	138.6	144.9	101	100.0	100.8	114.9	101.1
2	100.0	111.1	119.3	122.5	52	100.0	126.7	140.0	135.6	102	100.0	85.8	103.6	56.1
3	100.0	96.2	101.7	166.6	53	100.0	90.9	92.0	100.8	103	100.0	97.0	120.6	113.2
4	100.0	156.5	135.6	136.8	54	100.0	95.7	112.6	88.2	104	100.0	111.0	123.1	98.0
5	100.0	77.4	84.2	85.4	55	100.0	135.5	123.4	128.6	105	100.0	86.2	69.2	90.1
6	100.0	106.4	138.2	189.1	56	100.0	104.5	98.8	98.3	106	100.0	115.8	91.5	100.9
7	100.0	112.3	103.9	200.6	57	100.0	100.4	109.2	80.2	107	100.0	131.2	100.5	92.5
8	100.0	90.1	84.7	76.0	58	100.0	123.0	132.2	129.9	108	100.0	89.1	116.5	133.0
9	100.0	172.3	150.0	155.4	59	100.0	102.9	92.5	97.3	109	100.0	102.6	93.4	101.6
10	100.0	76.2	82.5	125.7	60	100.0	105.4	98.0	97.2	110	100.0	89.7	96.3	90.6
11	100.0	143.2	153.9	161.8	61	100.0	92.6	67.1	46.0	111	100.0	106.9	79.2	52.4
12	100.0	76.9	110.5	118.3	62	100.0	88.9	94.4	113.9	112	100.0	97.0	109.1	111.1
13	100.0	76.0	100.6	130.5	63	100.0	111.3	117.6	111.2	113	100.0	125.5	186.2	116.6
14	100.0	87.1	107.5	135.0	64	100.0	142.0	135.4	116.0	114	100.0	109.8	121.2	117.6
15	100.0	102.8	163.7	204.0	65	100.0	99.4	95.9	77.1	115	100.0	110.7	128.1	143.9
16	100.0	105.7	102.4	96.7	66	100.0	112.4	110.6	95.3	116	100.0	66.5	69.5	92.7
17	100.0	126.7	129.7	77.1	67	100.0	101.4	104.7	123.5	117	100.0	116.1	111.9	129.8
18	100.0	87.1	110.4	91.1	68	100.0	56.4	90.5	85.9	118	100.0	138.3	121.0	125.1
19	100.0	92.7	92.7	99.7	69	100.0	88.8	91.9	91.9	119	100.0	101.2	164.0	206.5
20	100.0	91.9	93.6	106.8	70	100.0	123.5	128.3	151.4	120	100.0	74.3	92.1	122.2
21	100.0	113.1	103.7	111.9	71	100.0	100.2	108.8	80.0	121	100.0	39.1	24.8	35.2
22	100.0	107.6	104.7	110.9	72	100.0	105.8	115.3	73.7	122	100.0	42.2	90.1	113.6
23	100.0	121.7	123.1	151.7	73	100.0	84.3	73.1	141.0	123	100.0	99.4	91.5	87.1
24	100.0	129.9	138.0	138.1	74	100.0	87.9	82.9	120.7	124	100.0	118.4	115.3	114.4
25	100.0	103.6	98.5	85.0	75	100.0	106.0	154.6	163.9	125	100.0	113.8	103.5	105.9
26	100.0	106.9	105.2	109.9	76	100.0	132.6	152.2	84.3	126	100.0	116.1	109.7	121.9
27	100.0	142.8	116.4	82.4	77	100.0	101.3	121.4	175.0	127	100.0	84.8	117.0	123.8
28	100.0	104.8	79.2	103.7	78	100.0	91.4	83.1	79.9	128	100.0	129.0	143.3	126.8
29	100.0	135.9	145.8	186.6	79	100.0	122.7	130.0	131.6	129	100.0	107.3	137.0	177.6
30	100.0	107.7	105.3	173.8	80	100.0	116.4	99.2	122.7	130	100.0	104.3	113.8	100.3
31	100.0	116.2	139.7	162.0	81	100.0	109.5	103.5	119.6	131	100.0	104.6	101.1	103.7
32	100.0	87.4	124.7	98.5	82	100.0	95.0	82.8	64.3	132	100.0	102.2	97.9	93.5
33	100.0	108.6	129.3	122.4	83	100.0	91.0	118.5	104.9	133	100.0	79.6	85.8	99.3
34	100.0	131.3	128.9	75.5	84	100.0	91.3	98.9	112.7	134	100.0	108.0	84.1	94.9
35	100.0	141.8	116.1	114.9	85	100.0	106.9	100.5	122.5	135	100.0	141.7	146.3	148.5
36	100.0	89.7	88.4	69.5	86	100.0	90.8	93.4	98.1	136	100.0	147.3	211.4	326.9
37	100.0	113.1	161.1	212.1	87	100.0	85.1	127.3	142.6	137	100.0	99.8	110.1	99.3
38	100.0	128.0	176.3	189.1	88	100.0	88.5	115.2	173.0	138	100.0	137.9	145.8	127.7
39	100.0	29.2	57.3	74.6	89	100.0	166.1	172.2	148.1	139	100.0	207.0	190.4	119.9
40	100.0	98.7	106.9	78.9	90	100.0	111.0	105.5	91.5	140	100.0	98.4	88.3	79.9
41	100.0	108.1	87.8	94.6	91	100.0	85.1	96.8	127.2	141	100.0	91.4	100.3	108.6
42	100.0	116.0	128.1	158.7	92	100.0	104.0	88.6	88.2	142	100.0	91.0	118.7	98.9
43	100.0	97.9	101.2	93.9	93	100.0	62.8	92.2	130.9	143	100.0	116.5	116.5	177.2
44	100.0	106.9	111.2	100.0	94	100.0	117.5	130.9	116.0	144	100.0	120.2	105.8	113.1
45	100.0	108.7	97.7	127.0	95	100.0	113.4	95.5	127.6	145	100.0	118.2	106.4	105.7
46	100.0	118.8	70.8	120.6	96	100.0	84.1	77.7	75.2	146	100.0	88.4	97.1	87.8
47	100.0	121.0	125.5	100.4	97	100.0	122.8	151.7	266.1	147	100.0	117.1	168.5	108.9
48	100.0	43.1	54.0	59.2	98	100.0	97.3	97.8	126.5	濃度 (mM)				
49	100.0	86.1	99.7	126.5	99	100.0	107.2	115.2	126.1	0	0.1	1	10	
50	100.0	93.6	50.6	75.0	100	100.0	94.3	119.1	130.0	CDDP	100.0	52.7	46.5	7.2

第2項 HepG2細胞を用いた通導散、大柴胡湯、麻子仁丸の抗酸化活性評価

通導散、大柴胡湯および麻子仁丸のHepG2細胞に対する抗酸化活性は、各処方の最終濃度を10 μ Unit/mLとして評価した。過酸化水素の添加直後から50分までのHepG2細胞の共焦点顕微鏡画像を図9Aに示した。コントロール群では過酸化水素添加後からの経時的な増強が観察された。一方、通導散、大柴胡湯および麻子仁丸を前処理した細胞では、経時的な蛍光強度の増強が抑制された。

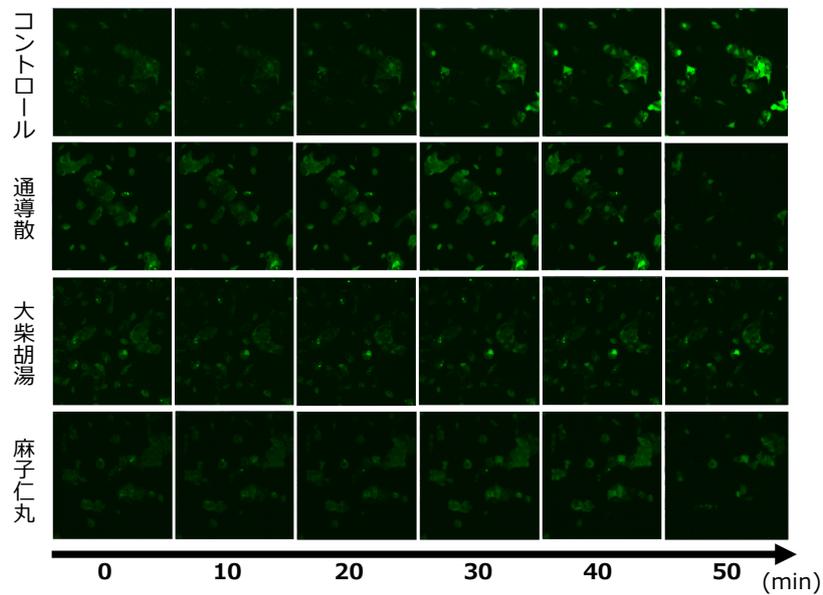


図 9A 通導散、大柴胡湯、麻子仁丸を前処理した HepG2 細胞の蛍光顕微鏡画像

共焦点顕微鏡画像を画像処理ソフト (ImageJ) を用いて蛍光強度を数値化し、過酸化水素の添加直後からの強度変化を図 9B に示した。コントロール群では過酸化水素添加後、30 分以降から、蛍光強度比の増強が認められたが、3 種の漢方製剤を添加した細胞では、コントロール群と比較して 30 分以降の増強が有意に抑制された。50 分後の通導散と麻子仁丸を添加した細胞において、減少がみられたのは、活性酸素の産生抑制もしくはスカベンジャー作用によるものと考えられる。

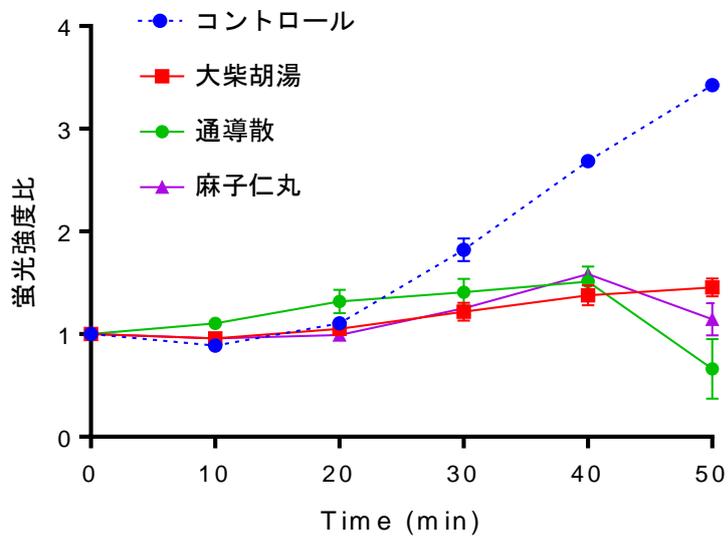


図 9B 蛍光強度比の経時的変化 (n = 3)

第2節 マウスにおける血清抗酸化力値 (BAP) の評価

BAP の測定は、各群 9 匹のマウスを用いて行った。通導散、大柴胡湯および麻子仁丸のヒト 1 日服用量は 12 g であることから、ヒト体重 60 kg を想定したヒト投与量を 0.2 g/kg とし、さらにマウスに対するヒト等価係数 12.3 を乗じ⁴⁸、マウスに対する各漢方処方投与量を 2.5 g/kg と決定した。ポジティブコントロールとして用いたアスコルビン酸および通導散、大柴胡湯および麻子仁丸を 2.5 g/kg の投与量で 1 日 2 回、2 日間連続投与し、最終投与の 30 分後に採血した。血清中の BAP 値を測定した結果、アスコルビン酸投与群 (3731 μM) において、vehicle 群 (2649 μM) と比較して有意な BAP 値の上昇が観察された。一方、各漢方処方投与群では、大柴胡湯 (2827 μM)、麻子仁丸 (2736 μM) 投与群で BAP 値の有意な上昇は認められなかったが、通導散 (2952 $\mu\text{mol/L}$) 投与群において BAP 値が有意に上昇した (図 10)。

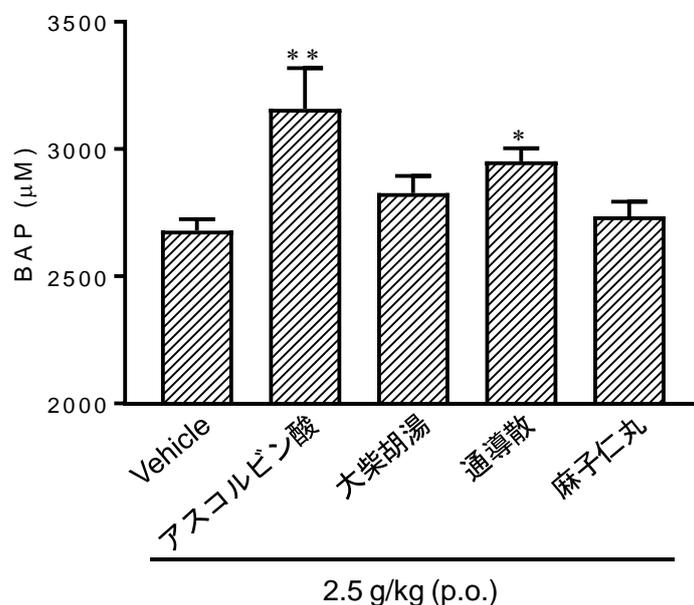


図 10 大柴胡湯、通導散、麻子仁丸投与後のマウス血清 BAP 値 (n = 9) 平均値 \pm SD (n = 9). ** $p < 0.01$. * $p < 0.05$ vs. vehicle (Dunnett test).

第3節 小括

HepG2 細胞を用いて通導散、大柴胡湯および麻子仁丸の細胞レベルでの抗酸化活性の発現を解析した結果、これら3種の処方を前処理した細胞では過酸化水素の添加によるDCF由来の蛍光増加が有意に抑制されたことから、各処方中に含有される抗酸化成分が細胞内に取り込まれることで、過酸化水素が消去されたことが示唆された。本結果より、*in vitro*において高い抗酸化活性を示した通導散、大柴胡湯および麻子仁丸は、より生体に近い状態での細胞実験においても高い抗酸化活性を有することが明らかとなった。

そこでこれら3処方をマウスに経口投与することによる、血液抗酸化力 (BAP) に与える影響を解析した。その結果、通導散投与群においてアスコルビン酸投与群とともに、有意にBAP値が上昇した。通導散はHepG2細胞に対して抗酸化活性を示し、さらにマウスの血清抗酸化力を上昇させたことから、通導散に含有される抗酸化物質は*in vivo*においても直接血中に移行し作用を発現する可能性が示唆された。

漢方処方の投与によるBAP値の変化を動物実験レベルで解析した報告例は少ないが、駆瘀血作用を有する桃核承気湯および桂枝茯苓丸をラットに経口投与することで血清BAP値がvehicle群と比較して1.1倍増加した結果が報告されている⁴⁹。さらに赤血球浮遊液の流動性は抗酸化力との間に負の相関が認められていることから、漢方薬の抗酸化作用が赤血球の変形能あるいは粘着性に影響することで、血栓症や塞栓症などの誘因である血液流動性の低下を予防する可能性が示唆されている。

通導散は、『万病回春』(1587年)を出典とする処方である。『万病回春』は龔廷賢によって編纂され、明代を代表する医学全書である。日本ではちょうど天正年間という近世日本医学黎明期に成立したため、直ちにわが国に伝来し、江戸時代の医師たちに最も広く愛読された中国医書の一つである。以来後世派の一大典拠として評価され、江戸時代の漢方に大きな影響を与えた。現在も本書を出典とする頻用処方はいくつかある。

現在の医療用漢方製剤の中で、本書を出典とする処方数は『金匱要略』『傷寒論』に次いで第3位である。

通導散は、『万病回春』の折傷門において、「跌撲、損傷きわめて重く、大小便通ぜず、すなわち瘀血散ぜず、肚腹膨脹し、心腹を上り攻め、悶乱して、死に至らんとする者を治す。先ず此の薬を服して、死血、瘀血を打ち下し、然して後に方に損を補う薬を服すべし。酒飲を用うべからず。愈通ぜず。亦、人の虚実を量りて用う。利するを以て度となす。惟だ孕婦、小児は服することなかれ。」と記載されている (図 11)⁵⁰。すなわち、打撲・捻挫などによる外傷性瘀血を原因とした急性症状・慢性症状共に、瀉下・利尿により駆瘀血を図る処方であるが、現在では外傷によらない気滞瘀血に対しても奏効する処方とされる。

一方、通導散の保険適応症は比較的体力があるものの便秘、月経不順、月経痛、更年期障害、腰痛、便秘、打撲、高血圧の随伴症状 (頭痛、めまい、肩こり) である²⁷。酸化ストレスによる血行動態の不良状態は漢方医学的に瘀血状態であり、血液流動性の低下はこれら疾患の原因となる。通導散の強い駆瘀血作用には、高い抗酸化活性と血清抗酸化力の上昇作用が関与する可能性が示唆された。

〔英雄丸〕乳香、沒藥、蜜陀僧、自然銅、二錢、紅、津、地龍、即蚯蚓、乾、花椒、各等、木鱉子、去殼、右爲細末、煉蜜爲丸、如彈子大、每一丸、以酒化下、或臨刑方用、打不覺痛、任打血不浸心、妙不可言。

●折傷

折傷者、多有瘀血凝滯也、宜先用童便、黃酒各一鍾、和而溫服、最能散瘀、消滯神效。

〔通導散〕治跌撲傷損極重、大小便不通、乃瘀血不散、肚腹膨脹、上攻心腹、悶亂至死者、先服此藥、打下死血瘀血、然後方可服補損藥、不可用酒飲、愈不通矣、亦量人虛實而用。

大黃、芒硝、枳殼、各一錢、川厚朴、當歸、陳皮、木通、紅花、蘇木、各一錢、甘草、五分、右剉一劑、水煎熱服、以利爲度、惟孕婦小兒勿服。

〔麥牛散〕治跌傷骨折、用藥一釐、黃酒調下、如重車行十里之候、其骨接之有聲、初跌之時、整調如舊、對住綿衣蓋之、勿令見風、方服藥、休移動、端午製、忌婦人雞犬等物。

珠珀、土鱉、一個、新瓦、碎、巴豆、去殼、半夏、一個、生用、乳香、分、沒藥、分、自然銅、火燒七次、醋淬、右爲細末、每服一釐、黃酒送下、不可多用、多則補得高起患處。

〔天靈散〕天靈蓋、用柴火燒存性爲末、每二錢、黃酒服效。

〔接骨效方〕山柃、五分、生爲末、飛羅麵、三錢、薑汁調和、搽患處一夜、皮肉青黑、是其驗也。

圖 11 『万病回春』折傷門

第3章 通導散の構成生薬の抗酸化活性評価

医療用漢方製剤 147 処方に関して網羅的な *in vitro* 抗酸化活性スクリーニングから、高い活性を示す漢方処方として通導散、麻子仁丸、大柴胡湯を見出した。次にこれら 3 処方に関して、細胞および動物レベルでの抗酸化作用の発現を解析した結果、3 処方全てが細胞内酸化ストレスに対する抗酸化活性を示した。さらにマウスを用いた抗酸化作用の評価では、通導散のみが血清抗酸化力を上昇させたことから、最も高い抗酸化活性を示す漢方処方として通導散を見出した。

通導散は当帰 (*Angelicae Acutilobae Radix*)、大黄 (*Rhei Rhizoma*)、芒硝 (無水硫酸ナトリウム) (*Sal Mirabilis*)、枳実 (*Aurantii Fructus Immaturus*)、厚朴 (*Magnoliae Cortex*)、陳皮 (*Citri Unshiu Pericarpium*)、木通 (*Akebiae Caulis*)、紅花 (*Carthami Flos*)、蘇木 (*Sappan Lignum*)、甘草 (*Glycyrrhizae Radix*) の 10 種類の生薬により構成される漢方薬である (図 12)。本章では、通導散の抗酸化活性に寄与する構成生薬の解析を目的とした。

通導散の煎じ液は実用漢方処方集⁵¹ (表 9) に従って調製した。構成生薬については通導散構成生薬の総量である 24 g を使用し、通導散と同様に、500 mL の精製水で 45 分間煎じることで調製した。これらの抗酸化活性に関して AAPH 法、DPPH 法、SOD 法を用いて比較検討した。さらに、AAPH 法、DPPH 法、SOD 法において高い抗酸化活性を示した構成生薬について、通導散の血清抗酸化力の上昇作用への寄与度を *in vivo* 試験により評価した。

表 9 通導散の構成生薬重量 (g)

構成生薬	当帰	大黄	芒硝	枳実	厚朴	陳皮	木通	紅花	蘇木	甘草
重量 (g)	3	3	3.5	2.5	2	2	2	2	2	2



当归



大黄



芒硝



枳实



厚朴



陳皮



木通



紅花



蘇木



甘草

図 12 通導散の構成生薬

第 1 節 通導散構成生薬の *in vitro* 抗酸化活性

AAPH 法では、通導散および構成生薬 10 種の各煎じ液のペルオキシドラジカル捕捉活性を Trolox 当量として算出した。また DPPH 法、SOD 法では、各煎じ液の用量反応曲線を作成し、ラジカル捕捉活性における EC₅₀ を算出した (表 10)。その結果、AAPH 法における通導散のペルオキシドラジカル捕捉活性と比較して、枳実、蘇木、大黄、紅花の 4 種の生薬に高い活性が認められた。一方、DPPH 法における通導散の DPPH 捕捉活性 (EC₅₀: 531 µg/mL) と比較して、大黄 (EC₅₀: 139 µg/mL)、蘇木 (EC₅₀: 200 µg/mL) に高い DPPH 捕捉活性が認められた。SOD 法におけるスーパーオキシドラジカル捕捉活性も同様に、通導散の SOD 活性 (EC₅₀: 81 µg/mL) と比較して、大黄 (EC₅₀: 26 µg/mL)、蘇木 (EC₅₀: 37 µg/mL) に高い SOD 活性が認められた。また、木通 (EC₅₀: 90 µg/mL) は通導散と同様な SOD 活性を示した。

表 10 通導散構成生薬の *in vitro* 抗酸化活性

	AAPH (Trolox 当量)	DPPH EC ₅₀ (µg/mL)	SOD EC ₅₀ (µg/mL)
通導散	13474 ± 1275	531 ± 34	81 ± 8.0
枳実 (Aurantii Fructus Immaturus)	29382 ± 2497	1009 ± 98	188 ± 14
蘇木 (Sappan Lignum)	23708 ± 262	200 ± 46	37 ± 1.7
大黄 (Rhei Rhizoma)	19684 ± 1213	139 ± 46	26 ± 0.6
紅花 (Carthami Flos)	13518 ± 1401	697 ± 59	285 ± 37
厚朴 (Magnoliae Cortex)	7354 ± 549	788 ± 61	131 ± 18
木通 (Akebiae Caulis)	5299 ± 196	971 ± 60	90 ± 20
陳皮 (Citri Unshiu Pericarpium)	4868 ± 489	2333 ± 150	571 ± 65
当帰 (Angelicae Acutilobae Radix)	3215 ± 371	1966 ± 119	497 ± 63
甘草 (Glycyrrhizae Radix)	2098 ± 818	3353 ± 786	915 ± 111
芒硝 (Sal Mirabillis)	—	—	4954 ± 3079

Data represent the means of triplicate ± SD of each group. AAPH data expressed as µM trolox equivalents (n = 3).

第2節 通導散構成生薬のマウス BAP 値に与える影響

BAP の測定は、各群 3 匹のマウスを用いて行った。第二章で用いた通導散エキス製剤中に含有される水製乾燥エキス重量 (6.5 g)、および通導散煎じ液を凍結乾燥することで得られた凍結乾燥粉末重量 (8.1 g) から、枳実、蘇木、大黄、紅花の凍結乾燥粉末として 1.6 g/kg の用量で各々マウスに経口投与した。アスコルビン酸 (2.5 g/kg)、通導散エキス製剤 (2.5 g/kg) および枳実、蘇木、大黄、紅花エキス (1.6 g/kg) を 1 日 2 回、2 日間連続投与し、最終投与の 30 分後に採血した。血清中の BAP 値は、アスコルビン酸 (4051 μM) および通導散 (3471 μM) 投与群において vehicle 群 (3151 μM) と比較して有意な上昇が確認された。一方、各生薬エキス投与群では、枳実 (3479 μM) および紅花 (3470 μM) エキス投与群において BAP 値が有意に上昇した (図 13)。

BAP 値が高いほど抗酸化力が高いことを示しており、ヒトにおける BAP 値として、健康日本人男性の平均値は 2,124 $\mu\text{Eq/L}$ 、女性では 2,151 $\mu\text{Eq/L}$ であり、1,800 以下では抗酸化力がやや弱く、1,600 以下ではかなり弱いとされている⁵²。

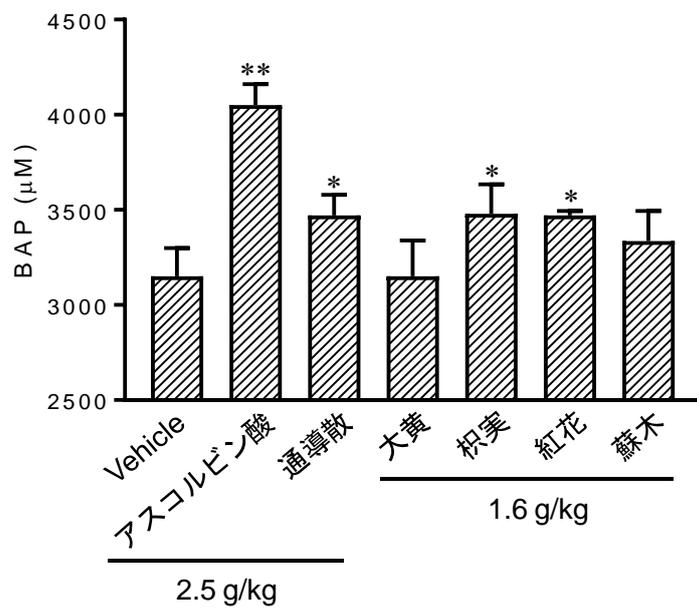


図 13 大黄、枳実、紅花、蘇木投与後のマウス血清 BAP 値 (n = 3)
 平均値 ± SD (n = 3). ** $p < 0.01$. * $p < 0.05$ vs. vehicle (Dunnett test).

第3節 小括

経口医療用漢方製剤 147 処方の *in vitro* 抗酸化活性評価において、通導散は AAPH 法において 147 処方中で最も高い抗酸化活性を示し、DPPH 法および SOD 法では 147 処方中で 2 番目に高い抗酸化活性を示した。そこで本章では、通導散の抗酸化活性に寄与する構成生薬の解析を行った。その結果、AAPH 法による通導散のペルオキシドラジカル捕捉活性は、2 番目に高い活性を示した麻子仁丸と比較して、約 2 倍の Trolox 当量を示した。通導散の構成生薬のペルオキシドラジカル捕捉活性は、大黄および蘇木の他に、枳実、紅花が高い作用を示した。厚朴を構成生薬とする漢方処方が高い Trolox 当量を示すことが既に報告されているが⁵³、通導散の顕著なペルオキシドラジカル捕捉活性には、大黄、蘇木、枳実、紅花が強く寄与することが明らかとなった。

一方、DPPH 法および SOD 法において、大黄抽出エキスが最も高い抗酸化活性を示し、次に蘇木が大黄に匹敵する作用を示した。経口医療用漢方製剤 147 処方の *in vitro* 抗酸化活性評価において、活性強度の高い上位 5 処方には共通して大黄が構成生薬として含まれる。本実験結果から、DPPH 法および SOD 法における高い抗酸化活性には大黄が関与していることが示唆された。また、大黄に匹敵する作用を示した蘇木が通導散に含まれることで、より高い抗酸化活性を示したことが明らかとなった。

次にこれら 4 種の生薬エキスに関して、マウスへの経口投与による血清 BAP 値に与える影響を解析した。その結果、枳実、紅花エキス投与群において有意な BAP 値の上昇作用が観察された。通導散の血清抗酸化力の上昇作用には枳実、紅花が強く寄与していることが明らかとなり、またこれら生薬中の抗酸化活性成分が直接血中に移行し、効果を発現している可能性が示唆された。

気・血・水の概念は漢方医学の 1 つの特徴であり、生体内を「気」「血」「水」の 3 種の流体が巡行して生命活動を行っており、これらのいずれか 1 つでも巡行が滞ったり、あるいは不足が生じたりすると疾病が生じる。通導散の構成生薬は、「血」に働く大黄、紅花、蘇木、

当帰、「気」に働く枳実、厚朴、陳皮、「水」に働く木通、芒硝、そして全体を調整する甘草に薬効分類される。通導散構成生薬のペルオキシドラジカル捕捉活性の結果から、「血」に働く大黄、紅花、蘇木、「気」に作用する枳実が、通導散の抗酸化活性に強く寄与することが明らかとなった (図 14)。

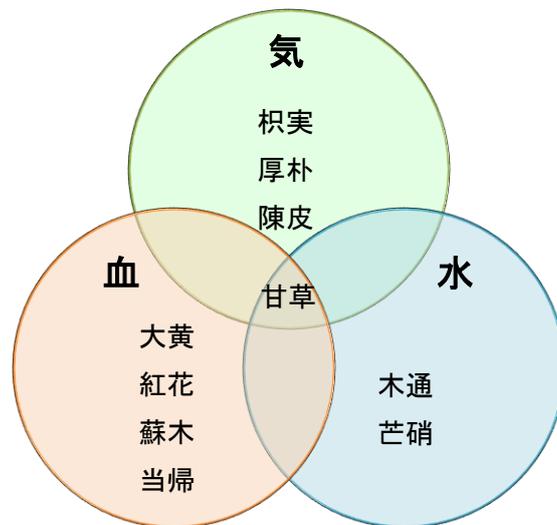


図 14 通導散 構成生薬の気血水による分類

通導散は、大承気湯 (大黄・芒硝・枳実・厚朴) の要素を含み、大承気湯に当帰、紅花、甘草、蘇木、陳皮、木通が加味された駆瘀血剤である。大承気湯は『傷寒論』『金匱要略』(3世紀)を出典とする処方であり、体力の充実した便秘症に用いられる処方であり、AAPH法において147処方中で4番目に高い抗酸化活性を示した処方である。大承気湯の抗酸化活性は、大黄の他に、枳実の寄与が重要であることが示唆された。大黄は強い瀉下作用のみならず、駆瘀血や清熱に働き、炎症の強い瘀血(血熱)を鎮める働きがある。また枳実は、気をめぐらし、つかえを除く働きがあり、気の流れの失調(気滞、気鬱)を改善する理気薬の代表的な生薬であり、大黄との組み合わせで、気滞によって食物が消化されずに停滞して起こる腹部膨満感のある便秘に効果があるとされている。

大承気湯の構成生薬である芒硝は、大黄と同様に代表的な瀉下薬であるが、作用は大黄と異なり、便を軟化し、排便を促進する。大黄とよく合方され、大黄+芒硝の組み合わせは承気湯類の基本構成とされる。もう一つの構成生薬である厚朴は、枳実と同様に理気薬であり、枳実+大黄+厚朴の組み合わせで、厚朴は腹満を、枳実は食滞を除き、ともに下気して膨満を散らし、大黄でそれを瀉下する作用があるとされる。

通導散は、AAPH法において最も高い抗酸化活性を示したが、大承気湯の構成生薬以外では、紅花および蘇木が強いペルオキシドラジカル捕捉活性を示した。紅花は婦人科疾患に繁用され、駆瘀血、止痛に働き、月経を促す作用を有し、蘇木は消腫、止痛の作用を有する。

通導散と同じ出典である『万病回春』の腹痛門には、大承気湯に当帰、紅花、甘草が加味された加味承気湯という処方があり、「瘀血、内に停まり、胸腹脹痛し、或いは大便通ぜざる等の症を治す。」とある⁵⁰。通導散は、この加味承気湯にさらに駆瘀血作用を有する蘇木を加えた処方、加味承気湯は通導散に変化する途中とみなせる (図 15)。

駆瘀血作用は、動脈の血管を拡張して血流を良くして瘀血を除く活血作用、静脈系の血流を改善して瘀血を除く化瘀作用、内出血を吸収して瘀血を除く破血作用に分類される。化瘀作用を有する大黄は、DPPH法およびSOD法において高い抗酸化活性を示し、破血作用を有する紅花、蘇木は、強いペルオキシドラジカル捕捉活性を示した。一方、活血作用を有する当帰は、高い抗酸化活性を示さなかった。活血作用を有する生薬は、瘀血を除く効果は弱く、補助的に配合されることが多いため、駆瘀血作用のうち、化瘀作用および破血作用が抗酸化活性と関連することが示唆された。

加味承気湯は紅花、当帰の配合により、大承気湯に瘀血を有する場合に用いられる。また当帰は血を補う補血作用のほか、血行をよくして血をめぐらせる活血作用があり、処方の効果を増強させる働きがある。また、潤腸作用も有していることから、排便作用にも寄与していると考えられる。さらに大承気湯に加味された甘草は、諸薬の調和のために配合される生薬であるが、大承気湯の瀉下作用による腹痛緩和の目的で配合されている。

通導散は、加味承氣湯に破血作用を有する蘇木がさらに加味された強い駆瘀血剤である。陳皮は、枳実、厚朴と同様に理気薬であるが、脾胃の気をめぐらせる作用があるため、打撲・捻挫などによる腹満感・食欲低下などに対して配合されていると考えられる。木通は、瘀血に伴う水滯を改善する作用がある (表 11)。

通導散や桃核承氣湯等、駆瘀血作用を示す処方の中でも特に強い作用を示す処方には大黄が構成生薬として含まれ、本研究から強い駆瘀血作用の発現には大黄の高い抗酸化活性が寄与している可能性が考えられた。さらに通導散は、長期経過した陳旧性の瘀血症にも有効とされる⁵⁴。これには内出血の吸収により瘀血を除く破血薬に分類される紅花、蘇木の寄与が推定されるが、紅花、蘇木の高い抗酸化活性が通導散の薬効に重要となることが本研究から示唆された。

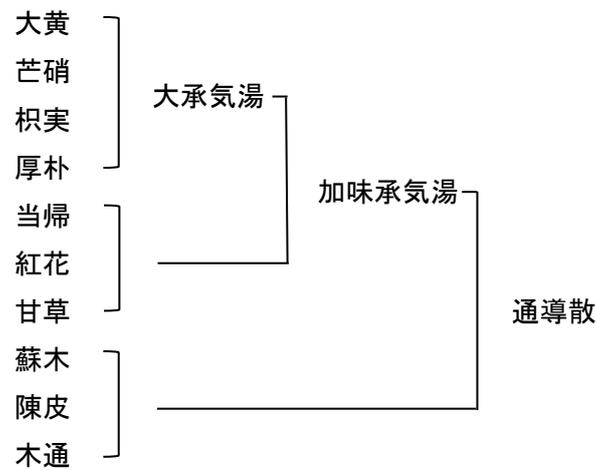


図 15 通導散：駆瘀血薬に理気薬・下剤を組み合わせた方剤

表 11 通導散構成生薬の薬能・薬効

生薬名	薬能	薬効
大黄	血	瀉下、駆瘀血、清熱
芒硝	水	瀉下、軟化
枳実	気	理気
厚朴	気	理気
当帰	血	活血、補血、潤腸通便
紅花	血	駆瘀血、止痛、調経
甘草	気・血・水	調和
蘇木	血	駆瘀血、消腫、止痛
陳皮	気	理気、健脾
木通	水	利水

結論

現在、148 処方の漢方薬が医療用漢方製剤として臨床応用されており、これら処方の適応症には酸化ストレスが関わる疾患が多く含まれる。そこで本研究では、医療用漢方製剤の抗酸化活性と酸化ストレス関連疾患の関係に着目し、酸化ストレス疾患の薬物治療に漢方薬を相補的に活用することによる患者の QOL 向上を目指して、優れた抗酸化活性を有する医療用漢方製剤を見出すことを研究目的とした。

まず第 1 章では、医療用漢方製剤 147 処方に関して網羅的な *in vitro* 抗酸化活性スクリーニングを行った。その結果、活性酸素吸収能評価試験では通導散が、DPPH ラジカル捕捉活性測定試験では麻子仁丸が、スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性測定試験では大柴胡湯が最も高い抗酸化活性を示した。

次に第 2 章では、*in vitro* 抗酸化活性試験より選抜した通導散、麻子仁丸、大柴胡湯に関して、細胞および動物レベルでの抗酸化作用の発現を解析した。その結果、これら 3 処方全てが細胞内酸化ストレスに対する抗酸化活性を示し、さらにマウスを用いた抗酸化作用の評価では、2 日間の連続経口投与により通導散のみが血清抗酸化力を上昇させた。

最後に第 3 章では、最も高い抗酸化作用を示した通導散に関して、抗酸化活性の発現に寄与する構成生薬の解析を行った。*In vitro* 抗酸化活性評価において、大黄、枳実、蘇木、紅花が高い抗酸化活性を示した。さらにこれらの生薬の中で枳実、紅花がマウスの血清抗酸化力を上昇させた。以上の結果から、大黄、枳実、蘇木、紅花が通導散の抗酸化活性に強く寄与していることが明らかとなり、枳実、紅花に含有される抗酸化活性成分は血中への移行性が高いことが示唆された。

これまでに我々は、麻子仁丸がインスリン抵抗性を改善するプロテインチロシンホスファターゼ阻害作用を示すことを報告している。この麻子仁丸の結果に基づき、糖尿病患者を対象とした臨床研究が医療センター大森病院東洋医学科、佐倉病院漢方科において開始された⁵⁵。糖尿病の発症要因として、活性酸素が細胞内のミトコンドリアを傷害することによ

るインスリン分泌量の低下が報告されており、本研究における麻子仁丸の高い抗酸化活性は、糖尿病への臨床応用にさらに繋がる結果であると考えられる。

大柴胡湯は臨床において肝機能障害に利用される。大柴胡湯に関して、四塩化炭素誘発の肝障害モデルラットに対する改善作用が報告されている⁵⁶。四塩化炭素は体内でチトクロム P450、主に CYP2E1 によりラジカルを産生し、発生したラジカルが急性肝障害を誘発する。そのため、大柴胡湯の肝機能障害改善作用は、抗酸化活性を機序とする可能性が示唆されている。本研究から得られた大柴胡湯の高い抗酸化活性は、大柴胡湯の肝機能障害改善作用を支持する結果であると考えられる。

通導散は、AAPH 法において顕著なペルオキシドラジカル捕捉活性を示し、さらに強力な抗酸化活性は動物実験においても維持しており、マウスの血清抗酸化力を有意に上昇させた。*In vitro* から *in vivo* まで高い抗酸化活性を示した処方であるが、臨床での使用頻度は比較的 low、臨床および基礎科学的なエビデンスの報告が少ない処方である。

通導散は気滞瘀血を改善する処方である。瘀血の病態の基本概念は、血がスムーズに循環しないことによる「血滞」、血が脈外、すなわち血管外に流失することによる「出血、紫斑」、腫塊が形成されることによる「腫瘍・血塊・変形」である。これらを現代医学的病態に置換すると、動脈硬化性血管病変である脳卒中や虚血性心疾患、打撲や外傷に伴う全身または局所的血管病変、静脈瘤や子宮筋腫、がん、変形性関節症として解釈される。これらの病態に対して、駆瘀血剤に分類される漢方薬が処方される。

代表的な駆瘀血剤である、四物湯、桃核承気湯、大黄牡丹皮湯、通導散、桂枝茯苓丸、当归芍薬散、加味逍遥散、温経湯について陰陽・虚实の観点から、各処方の位置付けをプロットした (図 16)。実証に用いられる漢方製剤は強い駆瘀血作用を示し、一方、虚証に用いられる漢方製剤の駆瘀血作用は緩やかになる。

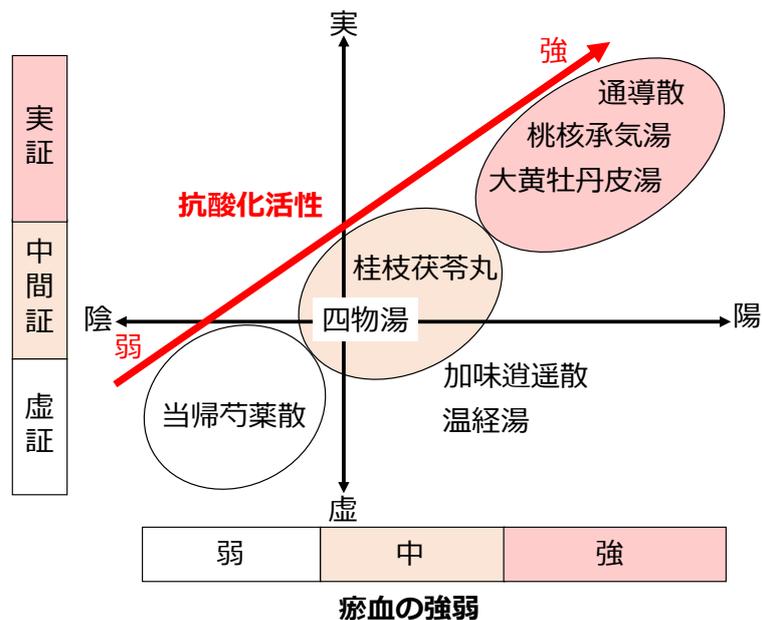


図 16 陰陽、虚実の2次元座標における駆瘀血剤群の位置と抗酸化活性値との関係

さらに、本研究で得られたこれら駆瘀血剤の抗酸化活性の強度を図 16 に重ね合わせた結果、強い駆瘀血作用を示す処方ほど、その抗酸化活性は高くなり、駆瘀血作用と抗酸化活性に正の相関が認められた。長年の経験により、駆瘀血剤が虚証から実証まで分類されていたが、本研究から駆瘀血作用と抗酸化作用に相関関係があることを見出し、駆瘀血剤としての作用強弱を科学的に立証するエビデンスを得た。

現在、添付文書に記載されている通導散の適応疾患は、月経障害、打撲傷、高血圧の随伴症状に限られているが、脳卒中や腎疾患、糖尿病に対しても、臨床応用がなされている。本研究において、通導散が強い抗酸化作用を示す駆瘀血剤であることを明らかにした。脳卒中や腎疾患、糖尿病は、その発症原因として酸化ストレスが深く関わっていることが知られており、駆瘀血作用と抗酸化作用の関連が示唆される。酸化ストレスに関連するとされる、外傷による炎症、また免疫系の異常による慢性炎症（自己免疫疾患）、ホルモン分泌の異常、がん、動脈硬化症、高脂血症等は、瘀血と判断できるためと考えられる。

炎症反応は、物理的・化学的・生物学的侵襲などの外来因子による組織障害や、自己組織に由来する、いわゆる自己抗原に対する免疫反応によっても引き起こされる。炎症時に関わる活性酸素の産生は、炎症巣に浸潤してくる好中球やマクロファージからのもの、血管内皮細胞のキサンチンオキシダーゼによるもの、ホスホリパーゼ A2 活性化に始まるアラキドン酸代謝過程によるもの、あるいは細胞内ミトコンドリアによるものなどがある。産生される活性酸素が過度になると酸化ストレスを増強させ、炎症を増大させる。このように炎症と酸化ストレスは密接な関わりを持っている。

医療用漢方製剤は既に保険適応されており、即時の臨床応用が可能である。病院薬剤師として医師および患者へ漢方薬の適切な情報提供に努めるとともに、本研究の結果が通導散のエビデンスの 1 つとなり、さらなる適応疾患の拡大のための臨床研究につながることを期待される。さらに現在患者数の増加している生活習慣病や心疾患、脳血管障害などの酸化ストレス疾患の薬物治療に対して補完的に活用されることにより、患者の QOL 向上につながるものと考えている。

実験の部

第1章 医療用漢方製剤 147 処方の抗酸化活性の *in vitro* 評価

第1節 活性酸素吸収能評価試験 (AAPH 法)

1-1-1 機器

- ・マルチモードプレートリーダー

EnSpire™マルチモードモデル : PerkinElmer Co., Ltd., Yokohama, Japan

1-1-2 試薬

- ・ Potassium phosphate dibasic (purity $\geq 98.0\%$) : Sigma-Aldrich Co., LLC., St Louis, MO, USA
- ・ Potassium phosphate monobasic (purity $\geq 99\%$) : Sigma-Aldrich Co., LLC., St Louis, MO, USA
- ・ Fluorescein sodium salt : Sigma-Aldrich Co., LLC., St Louis, MO, USA
- ・ Trolox : (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (purity $\geq 98\%$) : Calbiochem Co., San Diego, CA, USA
- ・ AAPH (purity $\geq 97\%$) : Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan

1-1-3 サンプル試料

1-1-3-1 使用医療用漢方製剤

本研究では株式会社ツムラ (Tokyo, Japan)、小太郎漢方製薬株式会社 (Osaka, Japan)、大杉製薬株式会社 (Osaka, Japan)、クラシエ薬品株式会社 (Tokyo, Japan)、三和生薬株式会社 (Tochigi, Japan)、太虎精堂製薬株式会社 (Hyogo, Japan) および株式会社東洋薬行 (Osaka, Japan) より製造される日本の健康保険制度に適用されている全 147 種類の経口医療用漢方薬を使用した。

なお、漢方製剤と No の相関は表 1 に示す通りである。

1-1-3-2 サンプル試料の調製

添付文書記載の一日使用量を 1 Unit (U) と定義した。1 Unit の 1/1,000 量を秤量し、精製水 1 mL に溶解又は懸濁後、室温下にて超音波処理 15 分間、vortex mixer による攪拌 5 分間の後、遠心分離を 15 分間 (12,000 rpm) 行い、上清液又はこれの精製水希釈液をサンプル試料とした。

1-1-4 予製試薬の調製

・アッセイバッファー：75 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)

A. 75 mM potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4 , FW 174.18) 6.53 g を 500 mL の精製水に溶解した。

B. 75 mM potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4 , FW 136.09) 5.10 g を 500 mL の精製水に溶解した。

A に B を加えて、pH を 7.4 に調整した。

・Fluorescein (FL) 溶液

FL stock solution #1 (1.2 mM)

Fluorescein sodium salt ($C_{20}H_{10}Na_2O_5$, FW 376.28) 90 mg を 200 mL のアッセイバッファーに溶解した。

FL stock solution #2 (6.0 μ M)

FL stock solution #1 50 μ L にアッセイバッファー10 mL を加えた。

・Trolox 溶液

Trolox stock solution (500 μ M)

Trolox ($C_{14}H_{18}O_4$, FW 250.29) 100 mg をアッセイバッファー200 mL に溶解し (2 mM)、25 mL を取り、100 mL のメスフラスコで 100 mL まで定容した。100 μ L ずつ分注し、 -30°C で保存した。

1-1-5 活性測定法

AAPH 法による抗酸化活性評価は、Dejian らの方法^{57,58}を改変して行った。Trolox stock solution (500 μM) (100 μL /本) に 900 μL のアッセイバッファー (室温か 37°C) を加えた後 (50 μM)、アッセイバッファーで順次希釈し 25、12.5、6.25 μM とした。96 well プレーットの外周の well には 295 μL の精製水を加えた。外周を除く well に Blank (アッセイバッファー) または各濃度の Trolox 溶液、精製水にて 1,000 倍希釈したサンプル溶液 35 μL を分注した。FL stock solution #2 (470 μL) に予め温めていたアッセイバッファー 25 mL を加えた FL working solution (115 μL) を、外周を除く各 well に添加後、蛍光強度を測定し ($f_{0\text{min}}$)、37°Cにて 10 min インキュベートした。この間に AAPH 129 mg を秤量し、予め 37°Cに加熱したアッセイバッファー 15 mL に溶解し AAPH 溶液とした (8.6 mg/mL, 31.7 mM)。AAPH 溶液 75 μL を、外周を除く各 well に添加し、2 分毎に蛍光強度を測定した ($f_{2\text{min}} \sim f_{90\text{min}}$)。

1-1-6 活性率の算出

縦軸を蛍光強度、横軸を時間としたグラフを作成し、このグラフより AUC を算出した。標準物質である Trolox と試料の AUC の相対的な値を求め、Trolox 当量として算出した。

1)得られた各 well での蛍光強度測定結果より、各サンプルの AUC を算出した。

$$\text{AUC} = (0.5 \times f_{8\text{min}} + f_{10\text{min}} + f_{12\text{min}} + \dots + f_{88\text{min}} + 0.5 \times f_{90\text{min}}) / f_{0\text{min}} \times 2$$

$f_{8\text{min}}$: 測定開始 8 分後の蛍光強度

2)得られた AUC より netAUC を算出した。

$$\text{netAUC}_{\text{Trolox}} = \text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$$

$$\text{netAUC}_{\text{sample}} = \text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$$

3)各 Trolox 溶液の netAUC を X 軸に、各 Trolox 溶液の濃度 (μM) を Y 軸にプロットしたグラフより、二次回帰式 ($y = ax^2 + bx + c$) を算出した。この回帰式より、Trolox 当量を算出した。

$$\text{Trolox 当量 } (\mu\text{M TE/g}) = \frac{[a \times (\text{netAUC}_{\text{sample}})^2 + (\text{netAUC}_{\text{sample}}) + c] \times V \times d}{W}$$

V : サンプル原液の溶液量 (mL)

D : サンプル原液の希釈倍率

W : サンプル重量 (mg)

第2節 DPPH ラジカル捕捉活性測定試験 (DPPH 法)

1-2-1 機器

- ・ 吸光プレートリーダー

ImmunoMini NJ-2300 microplate reader : Biotec Co., Ltd., Tokyo, Japan

- ・ 恒温振とう培養機

Deep Well Maximizer : Taitec Co., Ltd., Saitama, Japan

1-2-2 試薬

- ・ BHA (purity ≥ 98%) : Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan

- ・ DPPH (purity : 95%) : Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan

1-2-3 サンプル試料

実験の部第1章、第1節参照。

1-2-4 活性測定法

安定な有機ラジカルである DPPH ラジカルと抗酸化剤との反応による DPPH ラジカルの吸光度 (515 nm) の低下を吸光プレートリーダーにより測定することで、ラジカル捕捉活性を評価した。

サンプル溶液 (1 mUnit/mL or 0.5 mUnit/mL) 10 μL と、DPPH 溶液 (0.15 mM) 90 μL を混合

し、96 well プレートに入れ、1 分間、室温、暗所で混合し、30 分間、室温、暗所で反応させた。吸光度 (プレートリーダー) 測定装置を用いて 515 nm における吸光度を測定した。サンプルを添加しないものをコントロール、DPPH を添加しないものをブランクとした。DPPH は MeOH で溶解し、BHA は DMSO で溶解した。

1-2-5 活性率の算出

サンプル試料とコントロールを比較して吸光度の増大抑制を以下の式を用いて算出した。

$$\text{DPPH ラジカル捕捉活性率 (\%)} = 1 - \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100$$

A_s : 試料の吸光度

A_b : ブランクの吸光度

A_c : コントロールの吸光度

サンプル最終濃度 10 $\mu\text{U/mL}$ から 100 $\mu\text{U/mL}$ の濃度範囲において、段階的に濃度を設定し、各濃度における活性率を用い、ロジスティック回帰分析を用いて 50% 効果濃度 (EC_{50}) を求めた。またポジティブコントロールは BHA を用いた。

第3節 スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性測定試験 (SOD 法)

1-3-1 機器

- ・ 吸光プレートリーダー

ImmunoMini NJ-2300 microplate reader : Biotec Co., Ltd., Tokyo, Japan

- ・ 恒温振とう培養機

Deep Well Maximizer : Taitec Co., Ltd., Saitama, Japan

1-3-2 試薬

- ・ BHA (purity $\geq 98\%$) : Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan

・ SOD assay kit-WST : Dojindo Molecular Technology Inc., Kumamoto, Japan

1-3-3 サンプル試料

実験の部第1章、第1節参照。

1-3-4 活性測定法

SOD 法による抗酸化活性評価は、SOD assay kit-WST を用いた。サンプル溶液を 20 μL 、WST working solution 200 μL を 96 well プレートに加え、60 秒間マイクロプレートミキサーによって攪拌させ、Enzyme working solution と Dilution buffer を各サンプルに 20 μL ずつ 96 well プレート (最終容量 : 240 μL) に加えた。20 分間攪拌させながら 37°Cにてインキュベーション後、WST-1 を 450 nm 吸光度にて測定した。今回の実験では BHA をポジティブコントロールとして使用し、 EC_{50} : 17.0 (\pm 1.0) μM を示した。

1-3-5 活性率の算出

スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性はポジティブコントロールに対するスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性率を下記式にて算出した。

$$\text{スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性率 (\%)} = \left[1 - \frac{(A-B)}{(C-D)} \right] \times 100$$

A = WST working solution + Enzyme working solution + buffer + sample

B = WST working solution + buffer + sample (sample blank)

C = WST working solution + Enzyme working solution + buffer + 溶解液

D = WST working solution + buffer + 溶解液 (positive control blank)

サンプル最終濃度 0.42 $\mu\text{U/mL}$ から 83.3 $\mu\text{U/mL}$ の濃度範囲において、段階的に濃度を設定し、各濃度における活性率を用い、ロジスティック回帰分析から 50% 効果濃度 (EC_{50}) を求めた。またポジティブコントロールは BHA を用いた。

第2章 選抜した医療用漢方製剤の細胞および動物レベルの抗酸化活性評価

第1節 DCFH-DA を用いた細胞内酸化ストレスに対する抗酸化活性評価

2-1-1 医療用漢方製剤の HepG2 細胞に対する毒性試験

2-1-1-1 機器

- ・マイクロプレートリーダー

MPR-A4i II : Tosoh Co., Ltd., Tokyo, Japan

- ・マイクロプレートミキサー

MPX-96 : Scinics Co., Ltd., Tokyo, Japan

2-1-1-2 試薬

- ・Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System : Takara Bio Inc., Shiga, Japan

- ・D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine, Phenol Red and Sodium Pyruvate : Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan

- ・FBS : SAFC Biosciences, Inc., Lenexa, KS, USA

- ・Cisplatin : *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) : Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan

2-1-1-3 サンプル試料

実験の部第1章、第1節参照。

2-1-1-4 細胞及び培養方法

HepG2 細胞は JCRB Cell Bank (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank/National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Tokyo, Japan) より購入し、D-MEM+10%FBS 培地を用い、5%CO₂ 存在下、水蒸気飽和で 37℃にて培養した。

2-1-1-5 実験方法

細胞毒性試験は、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System のマニュアルに従って行った。96 well プレートに HepG2 細胞 (20×10^4 cells/mL) を $100 \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ播種し、4 時間インキュベートした。各漢方サンプルを 0、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 $10^{-2} \mu\text{U}/\text{mL}$ 、Cisplatin を 0、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1 mM となるように添加し、2 日間インキュベートした。培養後、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System $10 \mu\text{L}$ 及び D-MEM 培地 $90 \mu\text{L}$ を混和して加え、30 分インキュベートした。その後、プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定した。

2-1-2 HepG2 細胞を用いた通導散、大柴胡湯、麻子仁丸の抗酸化活性評価

2-1-2-1 機器

- ・共焦点レーザースキャン顕微鏡

LSM 510 META : Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany

2-1-2-2 試薬

- ・D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine, Phenol Red and Sodium Pyruvate : Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
- ・D-MEM (High Glucose) without L-Glutamine and Phenol Red : Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
- ・ H_2O_2 : Hydrogen Peroxide (30%) : Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan
- ・DCFH-DA (purity $\geq 95\%$) : Ceyman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA

2-1-2-3 サンプル試料

実験の部第 1 章、第 1 節参照。

2-1-2-4 細胞及び培養方法

実験の部第2章、第1節参照。

2-1-2-5 実験方法

DCFH-DA を用いた細胞内抗酸化活性の評価は、Higai らの方法¹⁹を改変して行った。

蛍光顕微鏡用 35 mm dish に HepG2 細胞 (20×10^4 cells/mL) を 100 μ L/well ずつ播種し 4 時間インキュベートした。Blank を除く dish にサンプル溶液を 10 μ U/mL となるように添加し 2 時間インキュベートした。DCFH-DA 2.4 mg を DMSO 1 mL に溶解した後、D-MEM (without L-Glutamine and Phenol Red) にて 1,000 倍希釈し DCFH-DA 溶液 (50 μ M) とした。培地を取り除いた後、DCFH-DA 溶液を 100 μ L 加え、30 分間インキュベートした。H₂O₂ を 1 mM となるように添加し、共焦点レーザースキャン顕微鏡にて経時的な解析を行った (0、5、10、20、30、45、60 分)。さらに画像処理ソフト (ImageJ) を用いて、各漢方製剤添加群の経時的な蛍光強度の比を算出した。

第2節 マウスにおける血清抗酸化力値 (BAP) の評価

2-2-1 機器

- ・フリーラジカル解析装置

FREE Carrio Duo : Diacron International s.r.l., Grosseto, Italy

2-2-2 試薬

- ・L(+)-Ascorbic Acid : Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan
- ・Dormicum Injection : Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan
- ・Domitor : Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd., Fukushima, Japan
- ・Vetorphale : Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan

2-2-3 サンプル試料

実験の部第1章、第1節参照。

2-2-4 実験動物

ICR系5週齢雄性マウスを日本クレア株式会社より購入し、実験の前に温度 $23\pm 4^{\circ}\text{C}$ 、湿度50~60%、12時間毎の明暗サイクルで、6匹/ゲージ、自由摂食・飲水で1週間飼育した。実験は、東邦大学薬学部実験倫理委員会による東邦大学薬学部における動物実験に関する指針に準じて行った。

2-2-5 実験方法

マウスを5群に分け、vehicle群には精製水、ポジティブコントロール群にはアスコルビン酸 (2.5 g/kg)、および漢方処方投与群 (2.5 g/kg) に1日2回、2日間連続で経口投与した。最終投与から30分後にDormicum/Domitor/Vetorphale混合麻酔およびエーテル麻酔下で採血した。採取した血液は 4°C にて18時間静置し、遠心機 (Centrifuge 5415R : Eppendorf AG, Hamburg, Germany) を用いて 4°C 、15分間、3,000 rpmの条件で遠心することで血清を分離した。得られた血清は測定まで 4°C にて保存した。測定には、フリーラジカル解析装置を使用した。

第3章 通導散の構成生薬の抗酸化活性評価

第1節 通導散構成生薬の *in vitro* 抗酸化活性

3-1-1 サンプル試料

3-1-1-1 使用医療用漢方製剤

実験の部第1章、第1節参照。

3-1-1-2 使用生薬

- ・当帰 (*Angelicae Acutilobae Radix*) : 日本薬局方トウキ 当帰 (大和種・刻), 中国産, Lot.008015004, 株式会社栃本天海堂 (Osaka, Japan)
- ・大黄 (*Rhei Rhizoma*) : 日本薬局方ダイオウ 大黄 (雅黄・刻), 中国産, Lot.007013004, 株式会社栃本天海堂 (Osaka, Japan)
- ・芒硝 (無水硫酸ナトリウム) (*Sal Mirabilis*) : 日本薬局方硫酸マグネシウム水和物, Lot.C00500, 日医工株式会社 (Toyama, Japan)
- ・枳実 (*Aurantii Fructus Immaturus*) : 日本薬局方キジツ 枳実 (代代・刻), 中国産, Lot.002414003, 株式会社栃本天海堂 (Osaka, Japan)
- ・厚朴 (*Magnoliae Cortex*) : 日本薬局方コウボク 厚朴 (日本産・刻), 日本産, Lot.003613002, 株式会社栃本天海堂 (Osaka, Japan)
- ・陳皮 (*Citri Unshiu Pericarpium*) : 日本薬局方チンピ^o 陳皮 (刻), 中国産, Lot.007811003, 株式会社栃本天海堂 (Osaka, Japan)
- ・木通 (*Akebiae Caulis*) : 日本薬局方モクツウ, 日本産, Lot.010405001, 株式会社栃本天海堂 (Osaka, Japan)
- ・紅花 (*Carthami Flos*) : 日本薬局方コウカ, 中国産, Lot.84F1067, 株式会社ウチダ和漢薬 (Tokyo, Japan)
- ・蘇木 (*Sappan Lignum*) : 日本薬局方ソボク, 中国産, Lot.023517002, 株式会社栃本天海堂 (Osaka, Japan)
- ・甘草 (*Glycyrrhizae Radix*) : 日本薬局方カンゾウ 甘草 (西北・刻), 中国産, Lot.002014007, 株式会社栃本天海堂 (Osaka, Japan)

3-1-2 通導散、通導散構成生薬の煎じ液の調製および実験方法

通導散、または各構成生薬 24 g を煎じ器 (HMJ3-1000W : Hario Co., Ltd., Tokyo, Japan) に

入れ、500 mL の精製水を注ぎ 45 分間煎じた。吸引ろ過後 400 mL までメスアップし、原液とした。作成した原液を 2.5 倍希釈した溶液を DPPH 法および SOD 法で、2500 倍希釈した溶液を AAPH 法で測定試料とした。以降の操作は、実験の部第 1 章を参照。

第 2 節 通導散構成生薬のマウス BAP 値に与える影響

3-2-1 サンプル試料

実験の部第 3 章、第 1 節参照。

3-2-2 実験動物

ICR 系 5 週齢雄性マウスを日本クレア株式会社より購入し、実験の前に温度 $23 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50~60%、12 時間毎の明暗サイクルで、4 匹/ゲージ、自由摂食・飲水で 1 週間飼育した。実験は、東邦大学薬学部実験倫理委員会による東邦大学薬学部における動物実験に関する指針に準じて行った。

3-2-3 サンプル試料の調製および実験方法

大黃、枳実、紅花、蘇木の熱水抽出液を凍結乾燥した。凍結乾燥粉末を精製水に溶解し、マウスに 1.6 g/kg の投与量で 1 日 2 回、2 日間連続で経口投与した。以降の操作は、実験の部第 2 章、第 2 節を参照。

謝辞

本研究の機会を与えてくださるとともに、終始懇切丁寧なご指導を賜りました東邦大学薬学部生薬学教室 小池一男教授に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、適確なご助言、ご指導を賜りました東邦大学薬学部医療薬学教育センター臨床薬効解析学研究室 加藤裕芳教授に心より感謝申し上げます。

大学院入学に際し、ご理解、ご協力をいただくとともに、本論文の作成にあたり、ご指導を賜りました東邦大学薬学部医療薬学教育センター臨床薬剤学研究室（前東邦大学医療センター佐倉病院薬剤部長）真坂互教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、細部にわたり熱心にご指導くださいました東邦大学薬学部生薬学教室 李巍准教授、竹元裕明講師に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、細胞実験に多大なご支援を賜りました東邦大学薬学部病態生化学研究室 檜貝孝慈准教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、ご助言、ご協力をいただきました東邦大学医療センター佐倉病院薬剤部 小野田稔久博士、井上記念病院薬剤部 佐々木辰憲博士に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、漢方医療についての専門的指導をいただきました東邦大学医療センター佐倉病院糖尿病・内分泌・代謝センター 大平征宏講師、永和堂薬局 松永樹浩先生に深く感謝いたします。

実験動物であるマウスを管理、飼育していただきました東邦大学薬学部動物センターの皆さまに御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、実験を共有し、ご助力をいただきました、竹内未央氏、中村愛氏、徳蔵絵美氏、東福真理菜氏、赤羽智恵氏、上野佳成子氏、小松加奈氏、栗山典子氏に感謝いたします。

また日々の生活を支え、応援してくれた家族に深く感謝いたします。

最後になりましたが、生薬学教室の益々の発展をお祈り申し上げます。

参考文献

- 1) Ministry of Health, Labour and Welfare. "Patient Survey":
〈<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/10syoubu/index.html>〉, cited 1 Dec., 2018.
- 2) Matsuda M., Shimomura I., *Obes. Res. Clin. Pract.*, **7**, e330-341 (2013).
- 3) Berlett S. B., Stadtman R. E., *J. Biol. Chem.*, **272**, 20313-20316 (1997).
- 4) Dröge W., *Physiol. Rev.*, **82**, 47-95 (2002).
- 5) Finkel T., Niggli H. J., *Nature*, **408**, 239-247 (2000).
- 6) Matsuzawa A., Saegusa K., Noguchi T., Sadamitsu C., Nishitoh H., Nagai S., Koyasu S.,
Matsumoto K., Takeda K., Ichijo H., *Nat. Immunol.*, **6**, 587-592 (2005).
- 7) Thannickal V. J., Fanburg B. L., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **279**, 1005-1028 (2000).
- 8) Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. "RADICUT®Inj.30mg":
〈http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/1190401A1023_3_08/〉, cited 1 Dec., 2018.
- 9) Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation. "RADICUT®":
〈<https://medical.mt-pharma.co.jp/di/product/rct/>〉, cited 1 Dec., 2018.
- 10) The Japan Society for Oriental Medicine. "Evidence Reports of Kampo Treatment 2016":
〈<http://www.jsom.or.jp/medical/ebm/er/index.html>〉, cited 1 Dec., 2018.
- 11) Iwasaki K., *J. Clin. Psychiatry*, **66**, 248-252 (2005).
- 12) Matsunaga S., Kishi T., Iwata N., *J. Alzheimers Dis.*, **54**, 635-643 (2016).
- 13) Matsuda Y., *Hum. Psychopharmacol.*, **28**, 80-86 (2013).
- 14) Fujita H., Yoshida M., Yomoda S., Itomura M., *Psychiatry*, **23**, 130-138 (2013).
- 15) Terasawa K., Shimada Y., Kita T., Yamamoto T., Tosa H., Tanaka N., Saito Y., Kanaki E., Goto

- S., Mizushima N., Fujioka M., Takase S., Seki H., Kimura I., Ogawa T., Nakamura S., Araki G., Maruyama I., Maruyama Y., Takanori S., *Phytomedicine*, **4**, 15-22 (1997).
- 16) Hirabayashi M., Fujinuma H., *Therapeutic Research*, **13**, 1671-1675 (1992).
- 17) Sakamoto N., Sato Y., Goto Y., Ikeda Y., Takahashi A., Yano S., Takeda R., Baba S., Kaneko T., Mimura G., Tanaka T., *J. Japan Diab. Soc.*, **30**, 729-737 (1987).
- 18) Sakatani N., Ito S., Zheng W., *Kampo Medicine*, **45**, 615-618 (1995).
- 19) Mori K., Kondo T., Kamiyama Y., Kano Y., Tominaga K., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **51**, 403-406 (2003).
- 20) Fujiwara M., Koumoto Y., *Recent Progress of Kampo Medicine in Obstetrics and Gynecology*, **15**, 86-89 (1998).
- 21) Mori K., Saito Y., Tominaga K., *Biotherapy*, **6**, 624-627 (1992).
- 22) Otomo E., Tohgi H., Kogure H., *Geriatric Medicine*, **29**, 121-151 (1991).
- 23) Kimoto H., *J. Trad. Med.*, **20**, 68-73 (2003).
- 24) Hioki C., Yoshimoto K., Yoshida T., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **31**, 614-619 (2004).
- 25) Oda T., Haneda K., Isobe M., Hirayama T., Komiya Y., Karube K., Saito F, Inoue T., *The Yamagata Journal of Medicine*, **39**, 108-111 (2005).
- 26) Namiki T., *The Uehara Memorial Foundation Research Report*, **21**, 60-63 (2007).
- 27) Japan Kampo Manufacturers Association. "Kampo Medicines for Prescription 2016 -Informations on Package Inserts of 148 Formulations-":
〈https://www.nikkankyo.org/seihin/info_pi/all.pdf〉, cited 1 Dec., 2018.
- 28) Toho University Sakura Medical Center, Annual Report, Vol.17(2008)~Vol.26(2017).
- 29) Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology. "The Model Core Curriculum

- for Medical Education.":
- <http://www.mext.go.jp/component/b_menu/shingi/toushin/___icsFiles/afieldfile/2017/06/28/1383961_01.pdf>, cited 1 Dec., 2018.
- 30) Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology. "The Model Core Curriculum for Pharmaceutical Education.":
- <http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/chousa/koutou/058/gijiroku/___icsFiles/afieldfile/2014/11/10/1352956_2.pdf>, cited 1 Dec., 2018.
- 31) Prior L. R., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B., Jacob R., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3273-33279 (2003).
- 32) Dudonné S., Vitrac X., Coutière P., Woillez M., Mérillon M. J., *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1768-1774 (2009).
- 33) Ukeda H., Kawana D., Maeda S., Sawamura M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 485-488 (1999).
- 34) Cao G., Alessio M. H., Cutler G. R., *Free Radic. Biol. Med.*, **14**, 303-311 (1993).
- 35) Prior L. R., Wu X., Schaichi K., *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302 (2005).
- 36) Kedare B. S., Singh P. R., *J. Food Sci. Technol.*, **48**, 412-422 (2011).
- 37) Liu L., Li W., Sasaki T., Asada Y., Koike K., *J. Nat. Med.*, **64**, 496-499 (2010).
- 38) Zhong F. X., Huang D. G., Luo T., Deng Y. Z., Hu N. J., *Mol. Med. Rep.*, **5**, 1261-1266 (2012).
- 39) Yamane T., Tashiro S., Yamane K., *The Japanese Journal of Ultraviolet Rays*, **16**, 29-36 (1997).
- 40) Dong Z. G., Lee I. Y., Jeong H. J., Zhao Y. H., Jeon R., Lee J. H., Ryu H. J., *Phytother. Res.*, **29**, 1605-1609 (2015).
- 41) Sakaguchi S., Tsutsumi E., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 782-786 (1993).

- 42) Egashira T., Takayama F., Yamanaka Y., Komatsu Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **80**, 379-382 (1999).
- 43) Iizuka A., Iijima T. O., Yoshie F., Makino B., Amagaya S., Komatsu Y., Kondo K., Matsumoto A., Itakura H., *J. Ethnopharmacol.*, **63**, 209-218 (1998).
- 44) Son J. H., Lee J. H., Yun-Choi S. H., Ryu H. J., *Planta. Med.*, **66**, 469-471 (2000).
- 45) Chiu H. J., Ho T. C., Wei H. Y., Lui Y. W., Hong Y. C., *Life Sci.*, **61**, 1961-1971 (1997).
- 46) Higai K., Satake M., Nishioka H., Azuma Y., Matsumoto K., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1780**, 307-314 (2008).
- 47) Brkljača N. B., Gotić J., Šuran J., Brozić D., Klobučar K., Bojanić K., Vrbanac Z., *BMC Vet. Res.*, **14**, 216 (2018).
- 48) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), "Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers," July 2005.
- 49) Ishikawa S., Kubo T., Sunagawa M., Tawaratsumia Y., Sato T., Ishino S., Hisamitsu T., *Journal of the Japan Society for Oriental Medicine*, **62**, 337-346 (2011).
- 50) Matsuda K., "Manbyokaishun kaisetsu," Sogensha Inc., Osaka, 1989, pp. 955-958.
- 51) Fujihira K., Yamada K., "Jitsuyo Kampo Shohoshu," 3rd ed., ed. by The Japan Kampo Medicine Association, Jiho Inc., Tokyo, 2014, pp. 318.
- 52) Pasquini A., Luchetti E., Marchetti V., Cardini G., Iorio L. E., *Vet. Res. Commun.*, **32**, 137-143 (2007).
- 53) Nishimura K., Osawa T., Watanabe K., *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, **2011**, 7pages (2011).
- 54) Fukutomi T., Yamagata Y., "Kampo 123 Shoho Rinsho Kaisetsu", Medical Yukon Publishing

Co., Ltd., Kyoto, 2016, pp. 124-152.

55) Onoda T., Li W., Higai K., Koike K., *BMC Complement Altern Med.*, **14**, 64 (2014).

56) Ohta Y., Sasaki E., Nishida K., Kobayashi T., Nagata M., Ishiguro I., *Am. J. Chin. Med.*, **13**, 53-64 (1995).

57) Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan A. J., Deemer K. E., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1815-1821 (2002).

58) Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan A. J., Prior L. R., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4437-4444 (2002).