薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (6) 407-413 (1990)

小柴胡湯及びその成分による脂質過酸化反応抑制

宮原正信,^{*,a} 巽 義男^b

高知医科大学医学部生物学教室,^a 鐘紡株式会社漢方研究所^b

Suppression of Lipid Peroxidation by Sho-saiko-to and Its Components in Rat Liver Subcellular Membranes

Masanobu MIYAHARA^{*,a} and Yoshio TATSUMI^b

Department of Medical Biology, Kochi Medical School,^a Nankoku-shi, Kochi 781-51, Japan and Kampo (Traditional Chinese Medicine) Research Laboratory, Kanebo Co. Ltd.,^b Miyakojima-ku, Osaka 534, Japan

(Received January 8, 1990)

In order to elucidate anti-inflammatory action of Sho-saiko-to, its components were analyzed and purified by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC), and their effects on lipid peroxidation were compared with those of Sho-saiko-to in guinea pig neutrophils, rat liver mitochondria and microsomes. The results obtained were as follows:

1) Sho-saiko-to gave no effect on arachidonate- and PMA (phorbol 13-myristate 12-acetate)-induced NADPH-O_2^- generation in neutrophils though it gave a weak LPS-like effect on the cells. No inhibition of reduced nicotinamido adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidation was shown in liver microsomes. However, it markedly inhibited iron-induced lipid peroxidation in microsomes and mitochondria.

2) The active components to suppress lipid peroxidation could be concentrated in a lipid-soluble fraction from the Sho-saiko-to solution. The ED_{50} values to give 50% inhibition of the mitochondrial lipid peroxidation were 160 ng/mg prot, and 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot, for the lipid-soluble fraction and Sho-saiko-to, respectively.

3) The components in the lipid-soluble fraction were further separated by TLC and HPLC, and their inhibitory effects on the lipid peroxidation were examined. The active components were baicalein, ginsenoside Rf and baicalin, of which ED_{50} values were 0.2, 0.2 and 1 nmol/mg prot, respectively. Glycyrrhizin and its derivatives, ginsenoside (except ginsenoside Rf), and saikosaponins gave no effect in the concentration examined.

4) From these results anti-inflammatory action of Sho-saiko-to was discussed.

Keywords—Sho-saiko-to; flavonoid; lipid peroxidation; biomembrane

緒 言

小柴胡湯には、免疫機能亢進,¹⁾ 抗腫瘍作用,^{2,3)} 解熱消炎作用^{4,5)}等の薬効があると報告されている。しかし、これらの作用を理解するための手がかりとなる同剤の生理化学的作用に関する基礎研究はあまり報告がなく、しかも同剤中にはサイコサポニン、バイカリンなど多数の成分が含まれていることが作用のメカニズムを理解しにくくしている。しかし、例えば、腎炎の慢性期に至る過程でしばしば併発する感染症に対する炎症性渗出液の分泌抑制,⁴⁾ 毛細血管における透過性の抑制,^{5,6)} 急性あるいは慢性肝炎における血清トランスアミナーゼ値の低下,⁷⁾ 四塩化炭素肝障害やアルコール性肝炎における過酸化脂質量の減少,⁸⁾ 血小板でのリボキシゲナーゼ活性の阻害⁹⁾などに関する報告は、同剤中に生体膜系の生理化学的機能の変化を制御する成分が含まれていることを示唆する。

このような観点から、本研究は小柴胡湯の生体膜系の生理活性化学的機能に対する作用と消炎作用の関係について解析することを目的とした。そのために小柴胡湯中の水溶性画分、脂溶性画分、及び脂溶性画分に含まれる

主要成分の膜機能に対する作用を比較検討した。膜機能に対する作用の解析には、各種の炎症性組織障害に重要な役割を果たすといわれている生体膜系での脂質過酸化反応^{10,11)}に対する作用を調べた。

実 験 の 部

薬品 小柴胡湯は鐘紡(株)漢方研究所で調製したエキス粉末を用いた。 β -Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADPH), シトクロム c (type VI), ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン (FMLP), アラキドン酸, ホルボル 12-ミリスレート 13-アセテート (PMA), パラクアトはシグマ社製 (St. Louis, U.S.A.) のものを用いた。FMLP 及び PMA は使用濃度の 1000 倍液をジメチルスルホキシドで作製し、 -20°C に貯蔵したものを使用直前更に 10 倍に反応液でうすめて用いた。アラキドン酸や小柴胡湯成分及びフラボノイド誘導体は、エチルアルコールに溶解して用いた。

細胞及び生体膜系の調製 ミトコンドリアはウィスター系ラット (体重 250—300 g, 雄) の肝より Hogeboom-Schneider 法¹²⁾で単離した。ミクロソームは、同ラットの肝を氷冷した 0.15 M KCl-500 μM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-5 mM Tris Hepes, pH 7.4 で灌流し、血液をほぼ完全に流去した後、上記灌流液でホモジナイズし 10000 $\times g$, 10 分遠心した上清を更に 100000 $\times g$, 60 分遠心して得られた沈渣を用いた。好中球は、モルモット (体重 550—600 g, 雄) の腹腔に滅菌した 2% カゼイン液 (0.9% NaCl, 5 mM Tris-HCl pH 7.4 を含む) を注射し、15 時間後の腹腔渗出液から常法¹³⁾に従い調製した。

生体膜系等の機能の測定 好中球による O_2^- 生成は 2 ml の Krebs-Ringer 液, pH 7.4 に好中球 (3—5 $\times 10^6$ cells) を懸濁し、1.5 mM NaN_3 存在下にクラーク型酸素電極を用いて、各種刺激剤による酸素消費の増大から測定した。¹⁴⁾ 肝ミクロソームによる脂質過酸化反応は 2 ml の 0.15 M KCl-10 mM *N*-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfate (Hepes), pH 7.4 (25°C) にミクロソーム (2—3 mg prot) を添加し、検体を添加した後、200 μM NADPH, 250 μM adenosine diphosphate (ADP), 5 μM FeCl_3 等を添加することによって開始する NADPH の酸化 (ΔA_{340}) を測定した。なお、NADPH 依存性のバナデートによる酸素消費は上記と同様クラーク型酸素電極を用いて測定した。¹⁵⁾ 又、ミトコンドリアによる過酸化反応は 2 ml の 0.15 M KCl-5 mM Hepes, pH 7.4 (25°C) にミトコンドリア (0.8—1.0 mg prot) を添加し、検体を添加後、 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ により生成するマロンデアルデヒド (MDA) を thiobarbituric acid 法¹⁶⁾を用い測定した。その生成量は分子吸光係数 $\Delta A_{532}=1.52\times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて算出した。

小柴胡湯成分の分離分析 2 g の小柴胡湯エキス粉末を 200 ml の 0.1 M NaK-リン酸緩衝液, pH 7.4 に溶かし、これに 4 l のクロロホルム-メタノール混液 (2:1, v/v) を加えて、室温で 8 時間攪拌抽出後、4000 $\times g$, 30 分遠心後のクロロホルム層につき、 4°C でクロロホルム画分の 10 倍容の 0.05% NaCl を重層して 8 時間放置後、水層を除くという操作を 3 回繰り返して (Folch 法による脂質の精製) 水溶性成分を取り除いた。回収したクロロホルム画分は窒素ガスを吹きつけて溶媒を除去し、脂質画分とした。¹⁷⁾ この画分中の成分の分析は塩基性シリカゲル H プレートを用いて薄層クロマトグラフ法 (TLC) で行った。¹⁸⁻²¹⁾ 各脂質成分は更にそのスポット部分をかきとり、クロロホルム-メタノール混液 (2:1, v/v) で抽出した。またそれらの各成分の定量は YMC ODS A-312 カラムを用いる高速液体クロマトグラフ法により、目的とする各成分に応じて Na_2PO_4 溶液と CH_3CN 又は水の混合比をかえ分離、定量した。²²⁻²⁵⁾ 表示された結果は、別々に 2—5 回調製した各種の膜系を用いた実験結果である。

結 果

小柴胡湯及びその脂質画分の脂質過酸化反応に対する作用

Fig. 1 に、小柴胡湯の脂質画分と水溶性画分のミトコンドリア膜の脂質過酸化反応に対する作用を MDA 生成量で比較した結果を示す。

Fig. 1 に示されるように小柴胡湯は脂質過酸化反応を著明に抑制し、しかもその活性成分は脂質画分に強く濃縮されることが示された。各画分の脂質過酸化反応を 50% 阻害するのに要する濃度 (ED_{50} 値) を比較すると、脂質画分では約 67 ng/ml (160 ng/mg 蛋白), 小柴胡湯では 20 μg /ml (50 μg /mg 蛋白), 水溶性画分では 65 μg /ml (158 μg /mg 蛋白) であった。

脂質過酸化反応は大きく分けて、酸素ラジカルの生成反応とその後の過酸化反応の伝播と TBA 反応物質、例えば MDA などの生成というプロセスに分けられるが、小柴胡湯成分がどの段階に作用するかを検討した。Fig. 2 にラット肝ミクロソームを用いたときの NADPH オキシダーゼ (酸素ラジカルの生成反応) に対する小柴胡

Fig. 1. Suppression of Lipid Peroxidation by Sho-saiko-to, Its Lipid-Soluble Fraction and Water-Soluble Fraction

To 2 ml of the reaction medium containing 0.15 M KCl and 5 mM Hepes, pH 7.4, mitochondria (0.84 mg prot) and indicated amounts of Sho-saiko-to or its respective fraction were added successively, and allowed to stand for 1 min at 25°C. The reaction was carried out for 8 min by adding 10 μ M Fe^{2+} and stopped by adding 8% trichloroacetic acid in final concentration.

●, lipid soluble fraction; ○, original solution; △, H_2O soluble fraction.

Fig. 2. No Suppressive Effect of the Lipid-Soluble Fraction Derived from Sho-saiko-to on the Vanadate-Induced NADPH-Dependent O_2^- Generation in Rat Liver Microsomes

To 2 ml of the reaction medium containing 0.15 M KCl and 10 mM Hepes, pH 7.4, microsomes and other agents were added successively as indicated in the figure, and oxygen disappearance was recorded polarographically. RLMs, rat liver microsomes.

TABLE I. Effect of Sho-saiko-to on the Superoxide Generation in Guinea Pig Neutrophils

Sho-saiko-to ($\mu\text{g/ml}$)	O_2^- generation (nmol/min/ 10^7 cells)		
	Basal	FMLP	Arachidonate
0	3.2	27.0	33.1
18	3.7	21.9	30.8
38	3.9	20.2	30.3
75	4.5	20.2	30.1
150	5.1	20.2	31.0

The neutrophils (4×10^7 cells) were suspended in 2 ml of Ca^{2+} -Free Krebs-Ringer-Hepes, pH 7.4, at 37°C, and indicated amounts of Sho-saiko-to were added, allowed to stand for 5 min, and 25 nM FMLP and/or 50 μM arachidonate were added. O_2^- generation was recorded polarographically using a Clark oxygen electrode. Basal rate indicates O_2^- generation before stimulant addition. The data presents an exemplified result from 4 different experiments.

The standard errors from repeated assays of the same sample were 1.5% or less of presented numbers.

湯脂質画分の作用を示した。

Fig. 2 にみられるように小柴胡湯の脂質画分は終濃度 7.5 $\mu\text{g/ml}$ の量で上記の反応に何ら阻害作用

を示さなかった。また、小柴胡湯自体 (100 $\mu\text{g/ml}$) でも阻害作用はみられなかった。一方、同様な反応に関し、好中球における $\text{NADPH} \rightarrow \text{O}_2^-$ 反応に対する作用を検討した場合、25 nM FMLP によって誘起される O_2^- 生成は小柴胡湯の濃度に依存して阻害される傾向を示したが、50 μM アラキドン酸による O_2^- 生成にはほとんど影響

Fig. 3. Inhibition of Microsomal Lipid Peroxidation by Sho-saiko-to Lipid-Soluble Fraction

To 2 ml of the reaction medium containing 0.15 M KCl and 10 mM Hepes, pH 7.4, microsomes (2 mg prot), 400 μ M NADPH, 250 μ M ADP and indicated amounts of the lipid fraction were added successively, allowed to stand for 1 min, and the reaction was started by adding 5 μ M Fe^{3+} . The reaction was stopped by adding 0.5 ml of 40% TCA and MDA was assayed as described in the test. O_2^- generation was measured polarographically by recording O_2 disappearance from to reaction mixture and it was calculated from to linear state of the O_2 disappearance rate at 5 min of after Fe^{3+} addition.

●, MDA generation; ○, O_2 consumption.

を与えなかった (Table I). また、データには示さないが、PMA による O_2^- 生成もほとんど影響を受けなかった。

これらの結果は、小柴胡湯及びその脂質成分の脂質過酸化反応の阻害は、活性酸素の生成反応の抑制によるのではなく、過酸化反応の伝播から MDA 生成反応に至るプロセスを阻害することを示唆した。Fig. 3 は、小柴胡湯脂質画分が、肝ミクロソームにおける NADPH-P 450 reductase の反応に関連した過酸化反応 (ラジカル反応) を濃度依存的に阻害することを示した。また、図には示さないが、同脂質画分は 380 μ g/ml prot までの濃度範囲において NADPH₂ の酸化を抑制しなかった。

脂質画分の成分分析及び成分の作用

Fig. 4 は脂質画分中の成分を TLC で分析した結果を示す。

脂質画分中にはリン脂質はほとんど含まれておらず (プレート A), 大部分は中性脂質であることが示された (プレート B, C, D). 小柴胡湯脂質成分中には、原点とその付近に展開するバicalein やバicalin ばかりでなく、他のフラボノイドが多量に含

Fig. 4. Thin-Layer Chromatographic Profile of Sho-saiko-to Lipid-Soluble Fraction

Plate A, developed by CHCl_3 - CH_3OH -acetic acid- H_2O (65: 25: 7: 3, v/v); plates B, C and D, developed by petroleum ether-ether-acetic acid (82: 18: 1, v/v); plates A and B, phosphomolybdate spray; plate C, α -naphthol- H_2SO_4 spray; Plate D, *p*-anisaldehyde- H_2SO_4 spray; sample 1, liquiritin (3 μ g); sample 2, baicalein (5 μ g); sample 3, lipid-soluble fraction from Sho-saiko-to (285 μ g); sample 4, baicalin (5 μ g).

Fig. 5. Inhibition of Mitochondrial Lipid Peroxidation by Baicalein (Flavonoid) Fraction and the Non-baicalein Fraction Separated from Sho-saiko-to Lipid-Soluble Fraction

The components of Sho-saiko-to lipid-soluble fraction prepared in a similar procedure as to that shown in plate B in Fig. 4 were roughly divided into two sub-fractions, to baicalein fraction (0 to 0.05 in R_f values) and non-baicalein fraction (0.06 or more in the value). The subfractions were scraped off, extracted with CHCl_3 -methanol (2: 1, v/v), washed with 0.05% NaCl, dried up and examined by dissolving known amounts of ethanol.

○, original lipid fract., ●, flavonoid fract., ▲, non flavonoid f.

まれていることが示された。一方、 R_f 値が 0.3—0.7 の物質は、UV-吸収がないこと及び p -アニスアルデヒドによる陽性の呈色反応から、ステロール、トリテルペン類あるいは高級脂肪酸類であることが推定された。そこで、TLC による分離パターンにおいて原点付近に存在するバイカレイン類（フラボノイド類）と R_f 値が 0.06 以上の物質の 2 つの subfraction にわけ、両者の脂質過酸化反応抑制作用を Fig. 1 と同様な方法で検討した (Fig. 5)。

Fig. 5 から明らかなように TLC で分別する前の脂質画分には、Fig. 1 に示されるのと同様に Fe^{2+} による MDA 生成抑制作用があり、同時に R_f 値 0.06 以下の subfraction にも抑制作用があるが、 R_f 値 0.06 以上の物質は抑制作用が極めて弱いことが示された。一方、脂質画分を HPLC で分析した結果では、全体の約 4.3% がバイカレインであったが、バイカリンやリクイリチン、グリチルリチン、サイコサポニン等はいずれも全脂質画分の 0.1% 以下であり、小柴胡湯中に多量に含まれると考えられる上記物質は、クロロホルム-メタノール抽出画分には移行していないことが示された。したがって、

脂質過酸化反応を抑制する物質（バイカレインを含む）は TLC でほとんど原点付近に展開する画分であることが明らかとなった。しかし、バイカレインは全脂質画分中のわずか 4.3% であり、この原点画分には、バイカレイン以外の物質が多量に含まれていることが示唆された。そこで小柴胡湯成分中どの成分が脂質過酸化反応を抑制するかを解析した (Table II)。

ラット肝ミトコンドリアを用いて Fe^{2+} による MDA 生成量を比較したとき、バイカレインには特に著明な抑制作用がみられ、またジンセノシド Rf にも強い抑制作用があった。しかし、膜安定化作用をもつ²⁰⁾と報告されているサイコサポニンやその他カンゾウ成分、ジンセノシド Rf 以外のニンジンサポニンには検討した濃度範囲

TABLE II. Effect of Sho-saiko-to Components on Fe^{2+} -Induced Lipid Peroxidation in Rat Liver Mitochondria

	MDA Formation (nmol/mg/ prot/5 min) mean $\pm$ S.D. ($n=4$ to 6)
Control	4.1 $\pm$ 0.2
Saikosaponin a	4.1 $\pm$ 0.1
Saikosaponin b ₁	3.0 $\pm$ 0.1
Saikosaponin b ₂	3.7 $\pm$ 0.2
Baicalin	0.2 $\pm$ 0.2
Liquiritin	3.8 $\pm$ 0.1
Isoliquiritin	2.6 $\pm$ 0.2
Glycyrrhetic acid	3.8 $\pm$ 0.2
Ginsenoside Rb ₁	3.9 $\pm$ 0.3
Ginsenoside Rc	4.1 $\pm$ 0.2
Ginsenoside Re	3.9 $\pm$ 0.1
Ginsenoside Rf	0.4 $\pm$ 0.2
Ginsenoside Rg ₁	3.2 $\pm$ 0.2

To 2 ml of mitochondrial suspension (0.5 mg prot/ml) 0.8 μ g of respective component were added as ethanol solution, allowed to stand for 1 min and then 10 μ M Fe^{2+} were added. The reaction was carried out further 5 min and stopped by adding trichloroacetic acid.

Fig. 6. Inhibition of Mitochondrial Lipid Peroxidation by Sho-saiko-to Components

The reaction was carried out using mitochondria (2 mg prot) in a similar manner as to that shown in Fig. 1. MDA formation in the control was 4.2 nmol/5 min/mg prot.

○, baicalin; ●, baicalein; △, ginsenoside Rf; □, ginsenoside Rb₁.

で抑制作用はみられなかった。以上のことから小柴胡湯による脂質過酸化反応の抑制は主にバイカレインやジンセノシド Rf が関与することが示唆された。そこでこれらの抑制作用をもつ成分が生体膜構成要素に対しどのようなモル比で抑制作用を示すかを更に検討した。

Fig. 6 に示すように、バイカレインやジンセノシド Rf は蛋白質当たりほぼ等しいモル比でしかも極めて低濃度で強い抑制作用を示した。それに対し小柴胡湯成分中、多量に含まれているバイカリンの抑制活性はバイカレインのそれに比較して約 1/5 で、ジンセノシド Rb₁ には検討した濃度範囲では全く抑制作用はみられなかった。

考 察

小柴胡湯の適応とされる炎症性疾患には共通して脂質過酸化反応の亢進が強く関与することが最近特に注目されてきている。本研究はラット肝から調製したミトコンドリアやミクロソームを用いた *in vitro* 系において、小柴胡湯自体に脂質過酸化反応の抑制作用があり、その作用は小柴胡湯の脂質画分中に抽出されるバイカレインや脂質画分中には抽出されてこないジンセノシド Rf あるいはバイカリンによることを明らかにした。そこで小柴胡湯中の成分についてその作用を比較するとサイコサポニンやグリチルリチン類、あるいはジンセノシドの大部分には抑制作用はなくバイカレインとジンセノシド Rf には強い抑制作用があった (Table II)。バイカレインやジンセノシド Rf の ED₅₀ 値は 0.2 nmol/mg prot, バイカリンのそれは 1 nmol/mg prot であり、脂質画分と比較すると極めて低い値を示した (Fig. 6)。ミトコンドリア膜には約 330 nmol/mg prot のリン脂質が含まれている²⁷⁾が、脂質過酸化反応はモル比で約 1/1650 量のバイカレインで抑制されることは、それが単なるリン脂質膜の構造的障壁或いは電子伝達阻害剤として働くのではなく、ビタミン E 等と同じように一種のラジカルスカベンジャーとして作用する可能性を示唆した。この ED₅₀ 値は同様な系を用いて測定した他の生薬成分、例えばセファランチンの 30 nmol/mg prot,²⁸⁾ グリチルリチンの約 200 nmol/mg prot,²⁹⁾ と比較すると極めて小さい。また、バイカレインやジンセノシド Rf 等がほかの生薬成分 (例えばセファランチン、グリチルリチン等) に比べて脂質過酸化反応を極めて強く抑制することは、動物実験で報告されている四塩化炭素肝障害やアルコール性肝炎にみられる脂肪肝において小柴胡湯投与が過酸化脂質の貯留を抑制するという結果をよく説明している。一方、膜安定化作用を持つ物質は一般的に脂質過酸化反応を抑制することが知られており、小柴胡湯に含まれているサイコサポニン類も、 10^{-7} — 10^{-6} M の濃度範囲で膜安定化作用があると報告されている²⁶⁾が、Table II に示されるように、これらには約 5.5×10^{-7} M で脂質過酸化反応の抑制はみられなかった。

小柴胡湯の抗炎症作用のメカニズムとしては生体内でステロイド合成の促進,³⁰⁾ あるいは遺伝子レベルでのリポコルチン合成促進作用による³¹⁾等と提唱されている。本研究は、小柴胡湯及びその成分であるバイカレイン等がより直接的な作用として、実質細胞の内膜系が脂質過酸化反応によって障害されるのを防御する作用をもつことを示唆した。バイカレイン (30 nm) にはラット血小板ホモゲネートのリポキゲナーゼ活性を阻害して 12-HETE の合成を抑制する作用があると報告されている。⁹⁾ 小柴胡湯には約 4% のバイカリンが含まれ、消化吸収の過程あるいは末梢組織で糖鎖が外れるとバイカレインになりうることを考えあわせると、小柴胡湯には炎症反応の起因として働く 12-HETE の合成を抑制すると共に、毛細血管の透過性亢進抑制作用があり、かつ好中球が産生する活性酸素により誘導される脂質過酸化反応、ひいてはそれに伴う膜系の構造と機能の障害をも抑制することが示唆される。

一方、小柴胡湯には免疫機能の賦活作用があるが単球 (マクロファージ) と同様に食食能を持つ好中球において小柴胡湯には *in vitro* で添加濃度に対応して活性酸素生成を促進する作用があることが示された (Table I)。このことは小柴胡湯にわずかではあるが LPS 様作用があることを示唆した。しかし、脂肪酸によって誘導される respiratory burst には小柴胡湯は何の影響も与えないことから、炎症部位で殺菌作用を発現する好中球の活性酸素分子の生成には影響しないことが示唆された。なお FMLP による respiratory burst は濃度を増加していった場合最大 50% の阻害しか示さなかった。このことは小柴胡湯が FMLP のレセプター部位に特異的に作用しているとは考えにくく、小柴胡湯成分中の膜親和性を持つ物質 (Fig. 4, Table II) による膜構造の非特異的な修飾作用によると考えられる。バイカレインと同様な作用がジンセノシド Rf にあることを示したが、同じ 20 S プロトパナキサトリオール (IV) であるジンセノシド Re や Rg₁ には抑制作用がみられないことについては理由が不明である。結論として、各種の炎症性組織障害の根底に脂質過酸化反応が関与する病態に対し、小柴胡湯及び

その成分は、ラジカルスカベンジャーとして作用し、障害の軽減作用を示すことが示唆された。

引用文献

- 1) T. Kawakita, A. Yamada, Y. Kumazawa, K. Nomoto, *Immunopharmacol.*, **8**, 561 (1986).
- 2) 村田 勇, 広野禎介, 代謝, **10**, 601 (1973).
- 3) T. Oka, K. Fujikawa-Yamamoto, Z. Zong, M. Yamasaki, S. Odajima, I. Kitagawa, H. Abe, S. Arichi, *Cancer Res.*, **47**, 3863 (1987).
- 4) 坂口 弘, 代謝, **10**, 702 (1973).
- 5) 山本昌弘, 代謝, **10**, 695 (1973).
- 6) 江田昭英, 坂井公子, 日薬理誌, **62**, 39 (1966).
- 7) 岡 博, 藤原研司, 林 茂樹, 太田裕彦, 尾形逸郎, 田中直見, 佐藤 譲, 高築勝義, 与芝 真, 岡 裕爾, 三宅和彦, 鳥居正男, 堺 隆弘, 織田敏次, 肝胆脾, **9**, 825 (1984).
- 8) 阿部博子, 有地 滋, 和漢医薬学会誌, **2**, 71 (1985).
- 9) K. Sekiya, H. Okuda, S. Arichi, *Biochim. Biophys. Acta*, **713**, 68 (1982).
- 10) 永田親義, 吉川敏一, “過酸化脂質と生体,” 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編, 学会出版センター, 東京, 1987, pp. 255—313.
- 11) 宮原正信, 生化学, **61**, 525 (1989).
- 12) G. H. Hogeboom, “Methods in Enzymol,” S. P. Colowick, N. O. Kaplan, eds., Vol. 1, Acad. Press, New York, 1955, pp. 16—19.
- 13) M. Miyahara, S. Watanabe, E. Okimasu, K. Utsumi, *Biochim. Biophys. Acta*, **929**, 253 (1987).
- 14) M. Miyahara, E. Okimasu, H. Uchida, E. F. Sato, M. Yamamoto, K. Utsumi, *Biochim. Biophys. Acta*, **971**, 46 (1988).
- 15) P. Hochstein, L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 388 (1963).
- 16) F. E. Hunter, J. M. Gebicki, P. E. Hoffsten, J. Weinstein, A. Scott, *J. Biol. Chem.*, **238**, 828 (1963).
- 17) M. Miyahara, H. Enzan, N. Shiraishi, M. Kawase, M. Yamamoto, H. Hara, K. Utsumi, *Biochim. Biophys. Acta*, **714**, 505 (1982).
- 18) M. Miyahara, Y. Nishihara, Y. Moromizato, K. Utsumi, *Biochim. Biophys. Acta*, **641**, 232 (1981).
- 19) H. P. Kaufman, Z. Makus, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **62**, 1014 (1960).
- 20) J. L. Bryson, T. J. Mitschell, *Nature (London)*, **167**, 864 (1951).
- 21) E. Stahl, V. Kaltenbach, *J. Chromatogr.*, **5**, 351 (1961).
- 22) 山路 昭, 前田義美, 大石雅子, 廣谷芳彦, 紀氏汎恵, 平岡栄一, 米田該典, 薬誌, **104**, 812 (1984).
- 23) K. Sagara, Y. Ito, T. Oshima, M. Kawaura, T. Misaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5364 (1985).
- 24) 富森 毅, 神 久徳, 宮一論起範, 豊福信吾, 難波恒雄, 薬誌, **105**, 148 (1985).
- 25) 原田正敏 (編), “繁用生薬の成分定量—天然薬物分析データ集,” 廣川書店, 東京, 1989.
- 26) 阿部博子, 有地 滋, 小田島肅夫, 和漢薬シンポジウム, **15**, 216 (1982).
- 27) A. Colbeau, J. Nachbauer, P. M. Vignais, *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 462 (1971).
- 28) 白石則之, 医学と生物学, **98**, 141 (1979).
- 29) 内海耕慥, 白石則之, 沖増英治, 森本保子, 渡辺定博, 諸見里安紀, 佐々木順三, 肝とグリチルリチンシンボ記録, 1983, p. 104.
- 30) 前田利男, 漢方医学, **11** (2), 24 (1987).
- 31) 大倉靖史, 溝口靖紘, 申 東桓, 森澤成司, 漢方医学, **11** (2), 20 (1987).