

柴苓湯の高酸素負荷ラット網膜血管新生への影響

小菅正太郎¹⁾, 恩田 秀寿¹⁾, 竹中 康子¹⁾, 中西 孝子²⁾, 植田 俊彦¹⁾
 亀川 真季¹⁾, 塚原 正彦¹⁾, 安原 一²⁾, 小出 良平¹⁾

¹⁾昭和大学医学部眼科学教室, ²⁾昭和大学医学部第二薬理学教室

要 約

目 的：柴苓湯の網膜血管新生への効果を高酸素負荷ラットを用いて検討した。

方 法：血管新生モデルは Sprague-Dawley ラットを生直後から 12 日齢まで 80% 酸素負荷中で、13 日齢より大気中で飼育し作成した。6 日齢から 17 日齢まで 1 日 1 回、柴苓湯溶液 0.75 g/kg (0.75 g 群, n=9), 1.5 g/kg (1.5 g 群, n=13), または水 (水群, n=13) を各々 5 ml/kg で経口投与した。18 日齢で眼球を摘出し、網膜血管新生スコア (NV score) と総網膜面積に対する無血管野面積の割合 (% AVA) で血管新生を評価した。また、酸素負荷終了 0, 12, 24, 72 および 144 時間後の網膜血管内皮増殖因子 (VEGF) 濃度を測定した。

結 果：柴苓湯投与により、水群に比べ NV score および % AVA は減少した。重症例 (NV score \geq 9) は水群では 5 例、柴苓湯群では 1 例であり、柴苓湯により重症網膜血管新生が抑制された ($p=0.0185$)。また、網膜中 VEGF 濃度は、各群間にどの時点でも差がなかった。

結 論：柴苓湯は高酸素負荷ラットにおける網膜血管新生の重症化を抑制する可能性が示唆された。(日眼会誌 110 : 683-688, 2006)

キーワード：柴苓湯, 高酸素負荷, ラット, 網膜血管新生, VEGF

The Effect of Sairei-to on Oxygen-induced Retinal Neovascularization in the Neonatal Rat

Shotaro Kosuge¹⁾, Hidetoshi Onda¹⁾, Yasuko Takenaka¹⁾, Takako Nakanishi²⁾
 Toshihiko Ueda¹⁾, Maki Kamegawa¹⁾, Masahiko Tsukahara¹⁾
 Hajime Yasuhara²⁾ and Ryohei Koide¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine

²⁾Department of Pharmacology, Showa University School of Medicine

Abstract

Purpose : To study the effect of Sairei-to (ST), a Japanese traditional medicine, on oxygen-induced retinopathy (OIR) in rats.

Methods : OIR was induced by maintaining Sprague-Dawley neonatal rats in 80% oxygen for 12 days. The rats were treated once daily with oral administration of 0.75 g/kg (n=9), 1.5 g/kg (n=13) of ST in water, or water alone (WA, n=13) at 5 mL/kg body weight from day 6 to day 17. On day 18, retinal samples were collected. Retinal neovascularization (NV) was assessed by the NV score, and by the percentage of avascular area (% AVA), using a method previously reported. The number of severe retinal NV cases (NV \geq 9) was compared. The retinal vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations were measured with an immunoassay kit, at

0, 12, 24, 72 and 144 hours after oxygenation.

Results : NV score and % AVA decreased in the ST treated group compared to the WA group. However, severe NV was seen in five cases of WA and in one case of the ST treated group. Thus severe NV was inhibited significantly by ST treatment ($p=0.0185$). Retinal VEGF did not differ between groups at any time points.

Conclusion : These data suggest that severe NV in OIR is inhibited by ST treatment.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 110 : 683-688, 2006)

Key words : Sairei-to, Oxygen-induced retinopathy (OIR), Rat, Retinal neovascularization, VEGF

別刷請求先 : 142-0088 東京都品川区旗の台 1-5-8 昭和大学医学部眼科学教室 小菅正太郎
 (平成 17 年 11 月 7 日受付, 平成 18 年 2 月 17 日改訂受理) E-mail : kosuge@med.showa-u.ac.jp

Reprint requests to : Shotaro Kosuge, M. D. Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine,
 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-0088, Japan

(Received November 7, 2005 and accepted in revised form February 17, 2006)

I 緒 言

近年、周産期医療は目覚ましい発達をとげ、低出生体重児の死亡率は減少し、出生体重 500 g 未満、在胎週数 23 週未満児でさえ生存可能になってきている¹⁾。それに伴い未熟児網膜症の全体の発生率は減少しているものの、低出生体重児においては未熟児網膜症の発症が非常に高率である²⁾との報告があり、小児失明の大きな原因となっていることは確かである。また、未熟児網膜症の発症メカニズムには未だ不明な点があり、治療法についても完全には確立されているわけではない。

高酸素負荷網膜血管新生モデルは未熟児網膜症に類似した眼底像を示し、未熟児網膜症、糖尿病網膜症などの眼内血管新生性疾患の研究に用いられている³⁾⁴⁾。また、南ら⁵⁾はこのモデルにおける緑茶抽出物による血管新生の抑制を報告し、治療薬の探求にも有用なモデルである。

柴苓湯は、消炎作用を有する小柴胡湯と利尿作用を有する五苓散の合剤である。柴苓湯は網膜静脈閉塞症などによる黄斑浮腫^{6)~8)}や、ネフローゼなどの腎疾患の治療に用いられている^{9)~11)}。ラットの腎臓¹²⁾、脳組織¹³⁾、網膜¹⁴⁾のホモジネートを用いた実験ではフリーラジカルスカベンジ効果を示した。また、リノール酸ヒドロパーオキシド(LHP)投与により誘導されるウサギ角膜血管新生モデルでは、柴苓湯経口摂取による角膜血管新生の抑制を報告している¹⁵⁾。そこで、今回は柴苓湯投与による網膜血管新生への効果を、高酸素負荷網膜血管新生モデルを用い検討を行った。

II 実験方法

1. 実験動物と高酸素負荷網膜血管新生モデル作成方法

Sprague-Dawley ラット(日本クレア)を用いた。複数の母親ラットから産まれた新生児ラットをランダムに抽出し、80% 酸素負荷群(n=35)または大気下飼育群(n=32)に分けた。著者らが以前から行っている標準的な手順⁴⁾¹⁶⁾に従い、新生児ラットを、生後直後から 12 日齢までは、1 日を 80% 酸素下 20.5 時間、大気下 0.5 時間とそれに続く 3 時間で徐々に 80% 酸素負荷に戻す周期で飼育し、その後 13 日齢から、大気中で 18 日齢まで飼育した。なお、実験動物の取り扱いは「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号)に基づいて行った。

2. 柴苓湯の投与方法

柴苓湯(株式会社ツムラ)投与は、濃度を 2 種類に分けて 0.75 g/kg(0.75 g 群, n=9)もしくは 1.5 g/kg(1.5 g 群, n=13)、そして対照として精製水(水群, n=13)を、おのおの 5 ml/kg で、6 日齢から 17 日齢まで経口で行った。

表 1 血管新生スコア(NV score)の基準

点数(各象限)	血管新生の特徴
0	観察されず
1	5 個未満の glomerular buds
2	5 個以上の glomerular buds または frond
3	短い隆起(short ridge)*
4	長い隆起(long ridge)*

*新生血管の隆起が 1 象限の半分以内を短い隆起(short ridge)とし、それ以上を長い隆起(long ridge)とした。

3. 網膜血管新生の解析方法

生後 18 日齢ラットに、ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル[®], 共立製薬株式会社, 東京)64.8 mg/ml を腹腔内投与し、ラットを屠殺し、眼球を摘出、0.1 mM Cacodylate buffer(Sigma, MO, USA)で調整した 4% パラホルムアルデヒド(Polyscience, PA, USA)で固定した。固定した眼球から網膜だけを摘出した後に、ADPase 染色で網膜血管を染色した。網膜を上下左右の 4 象限に分割切開後、血管新生スコア(NV score)を算定し、その後、網膜展開標本を作製した⁴⁾。NV score は、網膜の各象限で Hasebe ら¹⁶⁾の基準(表 1)によって評価し、4 象限を合計した。さらに NV score による重症度を、血管新生なし(NV score=0~2)、軽症(3~5)、中等症(6~8)、重症(9 以上)の 4 段階に分類した。

無血管野面積は、網膜展開標本をデジタル処理し、NIH image ソフト(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)で無血管野および総網膜面積を測定し、無血管野に対する総網膜面積の百分率を無血管野面積(%AVA)とした⁵⁾¹⁶⁾。

4. 血管内皮増殖因子(VEGF)濃度の測定

酸素負荷終了後 0, 12 時間(12 日齢), 24 時間(13 日齢), 72 時間(15 日齢)および 144 時間(18 日齢)に、ラット(各時間, 各群とも n=3~4)をペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル[®], 共立製薬株式会社, 東京)64.8 mg/ml 腹腔内投与により屠殺し、速やかに網膜を摘出し、液体窒素にて凍結し、実験まで -70°C で冷凍保存した。試料に 100 μ l の蒸留水を加えたのち、20 W, 5 秒間、超音波(Branson SONIFIER Cell Disruptor 200, Branson, MI, USA)処理を行い、3000 rpm にて 10 分間遠心操作後、その上清をサンプルとした。Quantikine immuneoassay kit(R&D systems inc, MN, USA)を用いて、網膜中 VEGF 濃度を測定した。蛋白量は Lowry 法で測定した¹⁷⁾。また、薬物を投与し大気中で飼育したラットも酸素負荷群と同時刻に屠殺し、同様の方法で網膜中 VEGF 濃度の測定を行い、対照とした。

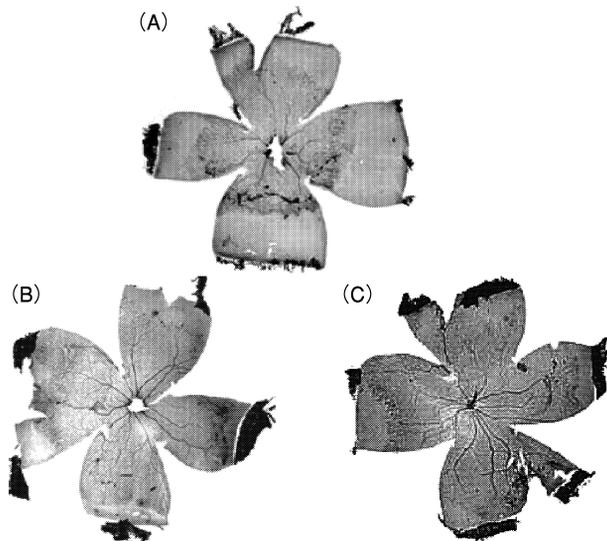


図 1 網膜展開標本例.

血管新生スコア(表 1)に従った網膜血管新生スコア(NV score)と無血管野に対する総網膜面積の割合(%AVA)を示した.

- (A) 水群: NV score 11, %AVA 41.8
- (B) 0.75 g 群: NV score 5, %AVA 21.1
- (C) 1.5 g 群: NV score 11, %AVA 13.0

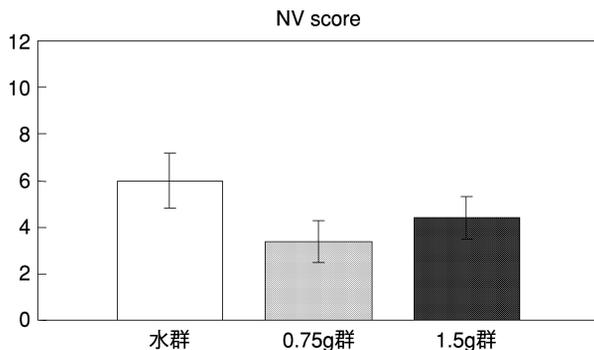


図 2 柴苓湯投与による NV score への影響.

平均 NV score は、水群(n=13)6.0±1.2, 0.75 g 群(n=9)3.4±0.9, 1.5 g 群(n=13)4.4±0.9 となり、柴苓湯投与により NV score は減少したが、有意差はなかった.

5. 統計解析

統計学的解析は Student's t-test および Fisher's exact probability test を用いた. また、すべてのデータは平均値±標準誤差(mean±SE)で表し、危険率 5% 未満を有意とした.

III 結 果

生後直後から通常の大気中で飼育したすべてのラット(n=32)には、生後 18 日で無血管野は全象限で観察できず、鋸状縁まで正常な血管形成を認めた. それに対し、80% 酸素負荷し飼育した全ラット(n=35)の網膜では、いずれかの象限で必ず無血管野が残存していた(図

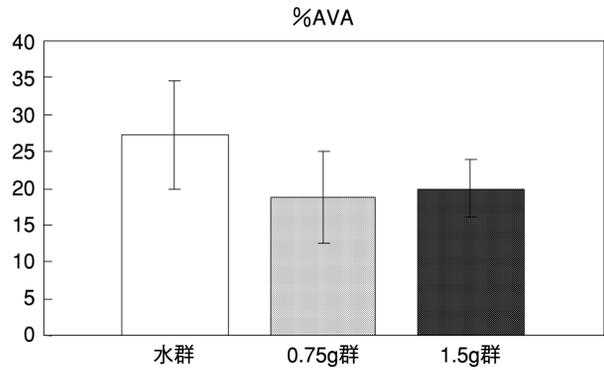


図 3 柴苓湯投与による %AVA への影響.

0.75 g 群(n=9), 1.5 g 群(n=13)と水群(n=13, 27.2±7.4)を比較し、%AVA はそれぞれ、0.75 g 群 18.8±6.3, 1.5 g 群 20.1±3.8 であった. ともに減少傾向は認められたが有意差はなかった.

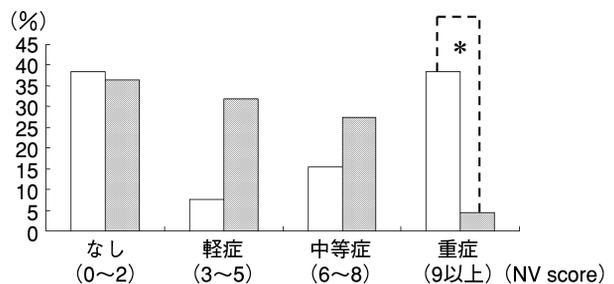


図 4 網膜血管新生スコア(NV score)の重症度別発生頻度.

□: 水群, ■: 柴苓湯投与群

柴苓湯投与群(n=22)は水群(n=13)に比べ、重症例が有意に少なかった(*p=0.0185).

1). 特に柴苓湯投与に対する対照として水を経口投与した場合、血管の成長が停止し、無血管野との境界に新生血管が観察された. 通常はこのように無血管野の広い象限では血管新生が増殖、重症化する傾向があった. さらに、この水群では、視神経乳頭部から全く血管成長の無い象限もあったが、すべての場合を除外することなく統計計算した.

これらをまとめると各群の平均 NV score は、水群(n=13) 6.0±1.2, 0.75 g 群(n=9) 3.4±0.9, 1.5 g 群(n=13) 4.4±0.9 であった(図 2). また、%AVA はそれぞれ、水群 27.2±7.4, 0.75 g 群 18.8±6.3, 1.5 g 群 20.1±3.8 であった(図 3). 柴苓湯の投与量に依存して新生血管の発育を抑制し、また無血管野を減少させることはなかったが、水群に比べて柴苓湯群では新生血管発育を抑制し、無血管野を減少させている傾向があった. しかし、いずれも統計学的な有意差はなかった.

NV score の重症度別発生頻度は、水群(n=13)と柴苓湯投与群(n=22)に分け比較検討をし、その結果を図 4 に示した. 水群では血管新生なし例 5 例(38.5%), 軽症例 1 例(7.7%), 中等症例 2 例(15.4%), 重症例 5 例

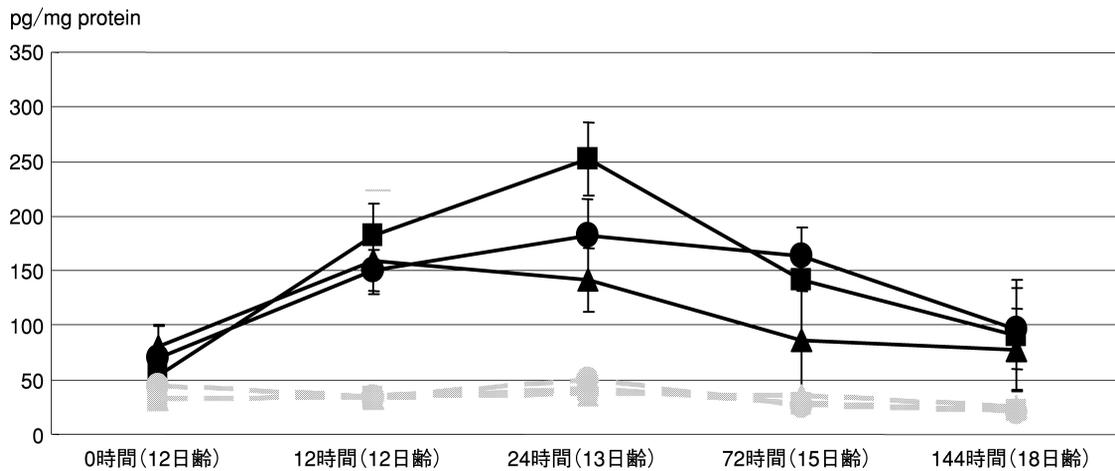


図5 網膜中血管内皮増殖因子(VEGF)濃度の経時変化。

大気中で飼育した水群を○, 0.75g群を■, 1.5g群を▲,

酸素負荷した水群を●, 0.75g群を■, 1.5g群を▲で示した。

大気中で飼育したラットは、いずれの時点でも網膜中 VEGF 濃度の上昇を認めなかった。柴苓湯投与群は、いずれの時点でも、水群と比較し有意差はなかった (Mean±SE, n=3-4)。

(38.5%)であり、柴苓湯投与群では、それぞれ8例(36.4%), 7例(31.9%), 6例(27.3%), 1例(4.5%)であった。重症例の発生は柴苓湯投与群で水群と比較して、有意に低かった(p=0.0185, Fisher's exact probability test)。

次に、経時的な網膜中 VEGF 濃度を調べた(図5)。いずれの場合もラットを大気中に出した直後では約50~80 pg/mg proteinであった。その後、大気中で飼育していたラットはいずれの時点でも網膜中 VEGF 濃度は変化しなかった。一方、酸素負荷で飼育したラットの網膜中 VEGF 濃度は、水群、0.75g群、1.5g群ともに酸素負荷終了直後よりしだいに上昇し、24時間後では水群 182.5±28.9, 0.75g群 252.8±33.4, 1.5g群 141.7±5.1 pg/mg protein でピークに達し、その後徐々に減少した。網膜中 VEGF は、24時間をピークとした経時的な変化があったものの、柴苓湯投与群と水群とを比較しても、いずれの時点でも統計学的な有意差はなかった。

IV 考 按

高酸素負荷網膜血管新生モデルは未熟児網膜症をはじめとする網膜血管新生病のモデルとして有用であり、それらの病因や治療法解明のために多くの研究で使用されてきた^{3)~5)16)}。これまでに考えられているこの新生血管発症のメカニズムは、高酸素負荷による酸素ストレス¹⁸⁾によって、またはひきつづき大気中環境にさらされるといふ相対的低酸素によって生じると考えられている。酸素ストレスによって nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) を介して^{19)~21)}、一方、相対的低酸素によって hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) を介して²²⁾²³⁾ VEGF が up-regulate され血管内皮が増殖するためと説明され

ている。

少なくとも生後直後から大気中で飼育した32匹では、全例正常に網膜血管が発育した。しかし、高酸素下で飼育した35匹では、投与薬によって程度に差はあるものの、成長している網膜血管の先端部では、その周辺側に無血管野を伴った新生血管を認めた。

柴苓湯は小柴胡湯と五苓散の合剤であり、利尿作用、抗炎症作用、抗酸化作用、血管透過性抑制作用、抗アレルギー作用、抗凝固作用などを示す漢方薬である。臨床では、ネフローゼなどの腎疾患^{9)~11)}、慢性関節リウマチの治療²⁴⁾²⁵⁾に用いられ、眼科領域でも、網膜静脈閉塞症などによる黄斑浮腫の改善^{6)~8)}やブドウ膜炎における消炎²⁶⁾を目的として、すでに幅広く投与されている。また、N-butyl-N-nitrosamine (BNN) 誘発ラット膀胱腫瘍の細胞増殖抑制作用が報告された²⁷⁾²⁸⁾ことから、抗腫瘍作用への期待も持たれている。

今回の実験で、柴苓湯投与群では水投与群に比べ、統計学的に差は無かったものの新生血管(NV score)を抑制し、かつ無血管野(%AVA)を減少させる傾向があった。しかし、対照として精製水を投与した群では視神経乳頭部から全く血管成長の無い象限、つまりNV scoreが0でかつ%AVAが100%の場合もあった。Doreyら²⁹⁾は、%AVAとNV scoreには正の相関があり、%AVAが大きいほどNV scoreも上昇すると報告している。しかし本実験では、%AVAが大きくともNV scoreは上昇しなかった例もあり、解析結果に影響を与えた可能性もある。

したがって、本モデルによって軽度な病変に対する薬効を調べるのは難しいと考えられる。そこで重症な病変に絞って、少なくともいずれかの象限に隆起病変(Ridge)の有無に注目すると、柴苓湯投与群には隆起病変

が少なく有意に水投与群に多く認められた。これをより定量的に調べるために NV score が 9 以上を重症例とすると、柴苓湯投与群では統計学的にも有意に少なかった。そこでこのメカニズムを調べるために血管新生に強く関与している VEGF 濃度を経時的に測定した。網膜中 VEGF 濃度は、柴苓湯を投与した群でも対照として水を投与した群でも差が無く、高濃度酸素負荷終了後からしばらく上昇し、24 時間後で最大値を示した(図 5)。しかし、柴苓湯の投与は網膜中 VEGF には影響を与えなかった。今回の結果からは、柴苓湯が VEGF の発現以外で網膜血管新生抑制のメカニズムに関与しているのではないと思われる。特に酸化ストレスと網膜症の重症化との関連とで、血小板由来増殖因子(PDGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)、色素上皮由来因子(PEDF)、インスリン様成長因子(IGF-1)などが報告されている^{30)~32)}。また、柴苓湯の抗酸化作用¹⁴⁾を介した血管新生の過程での、マトリックスメタロプロテアーゼ活性⁵⁾に影響している可能性も考えられる。今回の結果から VEGF との関連を明らかにすることはできなかったものの、さらに天然物の複合体の作用機序を調べるには、想定される機序を順に調べる必要があるだろう。

今回、高酸素負荷ラット網膜血管新生モデルに対し、柴苓湯投与による網膜血管新生への影響を検討した。NV score, %AVA に減少傾向があり、さらに重症網膜症に対して明らかに柴苓湯は抑制効果を示した。しかし、このメカニズムに網膜中 VEGF の関与は無いと考える。

稿を終えるにあたり、本実験中、多大なる協力をしていただいた、昭和大学眼科学教室研究補助員 小沢江美氏に深謝申し上げます。

文 献

- 堀内 勁, 猪谷泰史, 大野 勉, 加部一彦, 中村 敬, 中村 肇: わが国の主要医療施設におけるハイリスク新生児医療の現状(2001年1月)と新生児期死亡率(2000年1~12月). 日小児会誌 106: 603-613, 2002.
- Chiang MF, Arons RR, Flynn JT, Starren JB: Incidence of retinopathy of prematurity from 1996 to 2000. Ophthalmology 111: 1317-1325, 2004.
- Smith LEH, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, Amato RD, Sullivan R, et al: Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 101-111, 1994.
- Reynaud X, Dorey CK: Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 3169-3177, 1994.
- Minami M, Hasebe Y, Nakanishi-Ueda T, Iwai S, Ueda T, Dorey CK, et al: Inhibition of oxygen-induced retinal neovascularization in the neonatal rat by green tea extract. J Clin Biochem Nutr 33: 23-31, 2003.
- 小柳 宏, 松橋正和, 周藤憲司, 河本道次: 柴苓湯による糖尿病黄斑浮腫の治療. 眼臨 87: 535-537, 1993.
- 広川博之, 太田勲男, 引地泰一, 野見山豪, 今野優, 大西通広, 他: 黄斑浮腫に対する柴苓湯の使用経験. 眼臨 88: 570-573, 1994.
- 岩下憲四郎, 山岸和矢, 弓削堅志, 高橋 愛, 福井智恵子, 津村晶子: 網膜静脈分枝閉塞症の黄斑浮腫に対する柴苓湯の効果. 臨眼 54: 1247-1251, 2000.
- 服部智久, 鈴木良雄: 活性酸素消去作用を有する漢方方剤と生薬成分の抗腎炎効果に関する基礎検討. 腎とフリーラジカル研究会: 腎とフリーラジカル第6集. 東京医学社, 東京, 59-63, 2002.
- Shibasaki T, Nakano H, Kodama K, Ohno I, Matsuda H, Matsumoto H, et al: Effect of sairei-to in relapsed patients with primary nephrotic syndrome. Curr Ther Res 49: 475-482, 1991.
- Kimura K, Ogawa S, Tojo A, Nanba S, Matsuo-ka H, Sugimoto T: Effects of a Japanese medicinal plant on the rat subtotal nephrectomy model: Evaluation of its effect by microvascular casts. Am J Chin Med 18: 167-174, 1990.
- 佐中 孜, 小俣正子, 小俣百世, 樋口千恵子, 二瓶 宏: 腎とフリーラジカル. 現代東洋医学 14: 447-456, 1993.
- Liu J, Wang X, Yokoi I, Suh M-S, Mori A: Sairei-to(TJ-114) inhibits tissue Peroxidation, scavenges free radicals, and protects against free radical-induced damage to deoxyribose and amino acids. J Act Oxyg Free Red 4: 565-576, 1993.
- Ueda T, Ueda To, Armstrong D: Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye. Ophthalmic Res 28: 184-192, 1996.
- 植田孝子, 植田俊彦, Donald Armstrong, 荒井裕一郎, 高野 裕, 北代礼司, 他: ウサギ角膜血管新生モデルにおける柴苓湯, 五苓散, 小柴胡湯の効果. あたらしい眼科 15: 1303-1307, 1998.
- Hasebe Y, Thomson LR, Dorey CK: Pentoxifylline inhibition of vasculogenesis in the neonatal rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 41: 2774-2778, 2000.
- Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Bio Chem 193: 265-275, 1951.
- Penn JS, Thum LA, Naash MI: Oxygen-induced retinopathy in the rat. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 1836-1845, 1992.
- Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, et al: Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. J

- Clin Invest 98 : 1667—1675, 1996.
- 20) **Li Y, Zhang W, Mantell LL, Kazzaz JA, Fein AM, Horowitz S** : Nuclear factor-kappaB is activated by hyperoxia but does not protect from cell death. *J Biol Chem* 272 : 20646—20649, 1997.
 - 21) **Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Sclabas GM, Peng B, Uwagawa T, et al** : NF- κ B and AP-1 connection : Mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* 24 : 7806—7819, 2004.
 - 22) **Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, et al** : Hypoxia inducible factor-1 alpha is increased in ischemic retina : temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 182—189, 1999.
 - 23) **Brafman A, Mett I, Shafir M, Gottlieb H, Damari G, Gozlan-Kelner S, et al** : Inhibition of oxygen-induced retinopathy in RTP 801-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 3796—3805, 2004.
 - 24) **Yamashiki M, Nishimura A, Watanabe J, Nakano T, Kosaka Y** : Effects of the herbal medicine “Sai-rei-to” on *in vitro* interferon-gamma production of peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Lab Immunol* 38 : 153—161, 1992.
 - 25) **Yamashiki M, Nishimura A, Kimura M, Hashimoto H, Watanebe J, Kosaka Y** : Effects of herbal medicine “Sai-rei-to”(TJ-114) on *in vitro* interleukin-1 receptor antagonist production in peripheral blood mononuclear cells. *Curr Ther Res* 54 : 232—240, 1993.
 - 26) **Yano H, Hiraki S, Hayasaka S** : Effects of Kakkon-to and Sairei-to on experimental elevation of aqueous flare in pigmented rabbits. *Jpn J Ophthalmol* 43 : 279—284, 1999.
 - 27) **Hagiwara A, Sano M, Tanaka H, Kawabe M, Tamano S, Kadota T, et al** : Lack of enhancing effect of two kampo medicines, Sho-saiko-to(TJ-9) and Sairei-to(TJ-114), on rat urinary bladder carcinogenesis initiated with N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) Nitrosamine. *Teratog Carcinog Mutagen* 22 : 41—50, 2002.
 - 28) **村橋 勲, 迎圭一郎, 石田俊光, 松本真一** : ラットの実験的膀胱腫瘍に対する柴苓湯の効果について. *基礎と臨床* 28 : 3839—3840, 1994.
 - 29) **Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak HF, Brown LF** : Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol* 114 : 1210—1217, 1996.
 - 30) **Pfeiffer A, Schatz H** : Diabetic microvascular complications and growth factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103 : 7—14, 1995.
 - 31) **Paques M, Massin P, Gaudric A** : Growth factors and diabetic retinopathy. *Diabetes Metab* 23 : 125—130, 1997.
 - 32) **Chiarelli F, Santilli F, Mohn A** : Role of growth factors in the development of diabetic complications. *Horm Res* 53 : 53—67, 2000.
-