

7種の中国産生薬のマウスの乳腺発育 および子宮腺筋症に対する影響

呉 国娟,^{a,b)} 南雲 暁子,^{a)} 安田 光孝,^{a)} 山本 和俊,^{c)} 坂本 忍,^{d)}
守 隆夫,^{e)} 稲富 秀夫,^{f)} 白 式連,^{a,b)} 長澤 弘^{a)}

^{a)}明治大学農学部実験動物学研究室 ^{b)}中国延辺農学院獣医系生理・薬理学教研室

^{c)}早稲田大学教育学部生物学教室 ^{d)}東京医科歯科大学難治疾患研究所内分泌部門

^{e)}東京大学理学部動物学教室 ^{f)}明治大学農学部天然物有機化学研究室

Effects of 7 Chinese natural products on normal and preneoplastic mammary gland growth and uterine adenomyosis in SHN virgin mice

Guojuan WU,^{a,b)} Akiko NAGUMO,^{a)} Mitutaka YASUDA,^{a)} Kazutoshi YAMAMOTO,^{c)}
Shinobu SAKAMOTO,^{d)} Takao MORI,^{e)} Hideo INATOMI,^{f)} Shilian BAI^{a,b)} and Hiroshi NAGASAWA^{a)}

^{a)}Experimental Animal Research Laboratory, Meiji University

^{b)}Department of Veterinary Medicine, Yan Bian Agricultural College of China

^{c)}Department of Biology, School of Education, Waseda University

^{d)}Department of Endocrinology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

^{e)}Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo

^{f)}Laboratory of Natural Products Chemistry, Meiji University

(Received February 7, 1994. Accepted March 7, 1994.)

Abstract

We examined the effects of 7 Chinese natural products (Table I) on normal and preneoplastic mammary gland growth, uterine adenomyosis and some related parameters in virgin SHN mice as a possible step to evaluate the roles and the mechanisms of these agents, which are widely used in China as the components of herbal medicines for chemoprevention of the disorders of mammary gland and female genital tracts.

The formation and the growth of preneoplastic hyperplastic alveolar nodule (HAN) and those of adenomyosis were apparently inhibited by the free access of 0.5 % solutions for 10 weeks of Muo yo (*Commiphora myrrha*) and all agents examined except Jiang can (*Bombyx batraticatus*), respectively. There were slight relationships between the suppressive effects of the agents and their effects on endocrine systems (estrous cycle, structures of adrenals and ovaries and serum prolactin level) or nutrition and metabolism (food and water intakes, urinary component levels and serum free fatty acid level).

Guan mu tong (*Caulis aristolochiae manshuriensis*) markedly reduced body weight and the experiment was terminated at 9 weeks. The treatment also resulted in the disappearance of ovarian corpora lutea and suppression of both normal and preneoplastic mammary gland growth and uterine adenomyosis.

Key words Chinese natural products, mouse, mammary gland, uterus.

Abbreviations TS, thymidylate synthetase ; TK, thymidine kinase ; HAN, hyperplastic alveolar nodules ; E/ME, estrus/metestrus ; EGF, epidermal growth factor.

*〒214 川崎市多摩区東三田 1-1-1
1-1-1 Higashimita, Tama-Ku, Kawasaki, Kanagawa 214,
Japan

緒 言

現在、化学合成薬品の、副作用を含む種々の薬害および薬効の限界が指摘されていることもあって、いわゆる漢方製剤の効用が再認識されている。しかし、これら漢方薬はもっぱら長い間の経験に基づいてのみ処方されてきたもので、その作用および作用機序は不明なところが多い。漢方薬の構成成分としての生薬の有効性とその作用機序を明らかにすることによって、漢方薬のより有効な処方が可能となり、またそれに伴って医薬品としての評価も可能となる。このような観点から、われわれは生薬を含むいくつかの天然生理活性物質について、主として、乳腺及び女性性器に対する作用とその機序について検討している。¹⁻¹⁰⁾

本研究はその一環として、中国薬典において乳腺の発育あるいは泌乳性の増強、乳腺および子宮疾患の予防、治療に有効とされている7種の生薬の乳腺の発育と子宮内膜疾患の一種である腺筋症に対する影響、およびそれに関連するいくつかのパラメータを検討したものである。

材料と方法

(1) 試料：Table Iに示す7種の生薬を用いた。いずれもその乾物500 gあたり60℃の温水1ℓで10回抽出した後、粘度のきわめて高いシロップ状になるまで減圧濃縮したもの5 gを水道水1ℓに溶かして試料とした。

(2) 動物：乳癌および子宮腺筋症早期高発系のSHN

雌マウス¹¹⁾を用い、3カ月齢より10週間、実験群には試料を、対照群には水道水を自由摂取させた。

ただし、後にも述べるように関木通を与えられたマウスでは体重の減少が著しいため9週齢で実験を中止、供試した。測定したいいくつかのパラメータを参考までに結果に示した。

実験期間中、マウスは床敷（クリンチップ：日本クレア、東京）を敷いたアルミ製ケージ（14×28×13 cm）に4匹ずつ収容し、週2回床敷交換を行ない、室温21-22℃、相対湿度60-70%、換気回数16回/時間、14時間照明（5：00-19：00）の無窓動物室で飼育し、飼料として市販の固形飼料（ラボMRブリーダー：日本農産、横浜）を自由に与えた。

(3) 体重の変化：実験開始日より毎週1回体重を測定し、実験期間中の変化率で示した。

(4) 摂餌・摂水量：実験開始日より2-5週目の4日間における給餌器および給水器の重量差より推定した。

(5) 発情周期：最終2週間、毎朝（8：30-9：30）膣スメアーにより発情周期を調べた。

(6) 尿成分：最終週において、直接採尿法^{12, 13)}によって尿を採取し、¹H-NMR¹⁴⁾で分析した。

(7) 血清 prolactin (PRL) レベル：エーテル軽麻酔下で頸動脈切断採血し、室温に6時間、4℃に一晩置き、4℃で20分間遠沈（3000 rpm）後、血清は-20℃に保存した。PRLはラジオイムノアッセイ法¹⁵⁾によって測定した。

(8) 血清遊離脂肪酸レベル：上記保存血清の一部を用い、acyl CoA法（NEFA C-test：和光純薬、大阪）により測定した。

Table I Natural products used.

Name (abbreviation)	Scientific name	Japanese	Chinese	Part	Place of product
瓜 蒞 (Gl)	<i>Trichosanthes Kirilowii</i>	Karonin	Gua lou	Seed	中国 雲南
僵 蚕 (Jc)	<i>Bombyx batryticatus</i>	Kyosan	Jiang can	Whole body	中国 広東
水 蛭 (Sz)	<i>Hirudo nipponia</i>	Hiru	Shui zhi	Whole body	中国 東北
乳 香 (Rx)	<i>Pistacia lentiscus</i>	Nyuko	Ru xiang	Milk	中国 海南島
没 药 (My)	<i>Commiphora myrrha</i>	Motsuyaku	Muo yo	Sap	中国 雲南
小通草 (Xtc)	<i>Medulla stachyuri</i>	Kotsuso	Xiao ton cao	Caulis	中国 東北
関木通 (Gmt)	<i>Caulis aristolochiae manshuriensis</i>	Kanmokutsu	Guan mu tong	Caulis	中国 東北

(9) 乳腺の発育

1) 形態的観察：ホルマウント標本を作成し、10倍下で鏡検した。乳腺発育の指標としては、乳腺胞の形成度と乳管の発育度を用いた。乳腺胞の形成は1-7に rating¹⁶⁾し、また乳管の先端を直線で結び、その面積をコンピュータ付画像解析装置(ヒアス、モデル LA-525, 東京)で測定した。同時に乳腺の前癌症状である HAN の数と面積も測定した。

2) DNA 合成系酵素 (TS, TK) 活性：供試時、 -80°C に保存した両側そけい部乳腺組織を用い、TS, TK 活性をそれぞれ Dunlap *et al.*¹⁷⁾ および Taylor *et al.*¹⁸⁾ の方法によって測定した。

(10) 乳腺における成長因子および癌遺伝子の免疫組織化学的検索：EGF, TGF α の染色は SAB 法¹⁹⁾ により、また *ras* の染色は間接法²⁰⁾ によった。発色剤には H_2O_2 を含む DAB 溶液を用い、すべて 100 倍下で検鏡し、染色

の程度を3段階(++, +, -)に分けた。

(11) 主要内分泌器官重量と組織的検索：供試時に下垂体前葉、副腎、卵巣、子宮を摘出、重量を測定した。また副腎および卵巣については組織学的検索を行なった。

(12) 子宮腺筋症：供試時片側子宮角を Bouin 液で固定、定法通り包埋し、6 μm の連続切片を作成、HE 染色し、腺筋症の発生と増殖の程度 (grade) を Mori and Nagasawa²¹⁾ に従って測定した。

(13) 統計処理：それぞれの実験群と対照群の間の測定値の差の有意性は Student-*t* 検定によった。

結 果

1. 乳腺発育

(1) 形態的観察 (Fig. 1)：正常乳腺の乳腺胞の形成度 (rating) において、没薬群は対照群より低い傾向を示し

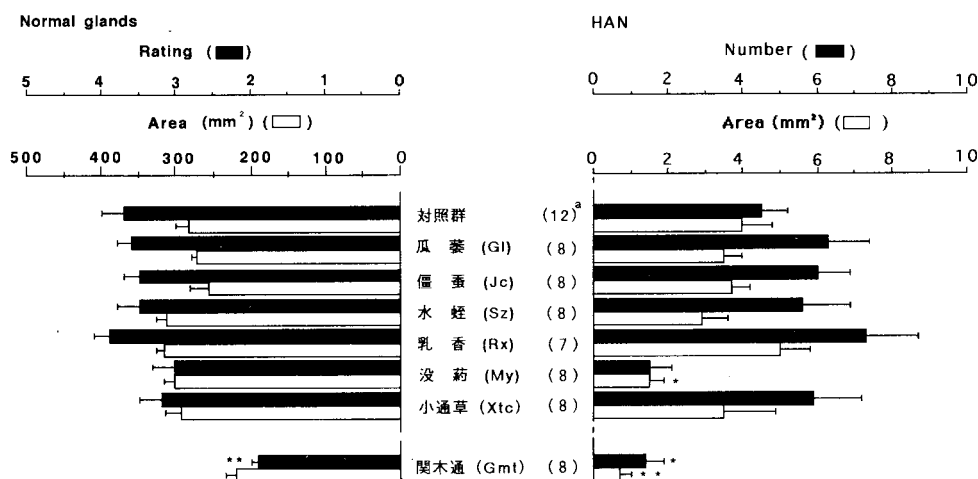


Fig. 1 Normal and preneoplastic mammary gland growth in each group (Mean $\pm$ SEM). ^aNumber of estimates. *or**Significantly higher than the control at $p < 0.05$ or 0.01 .

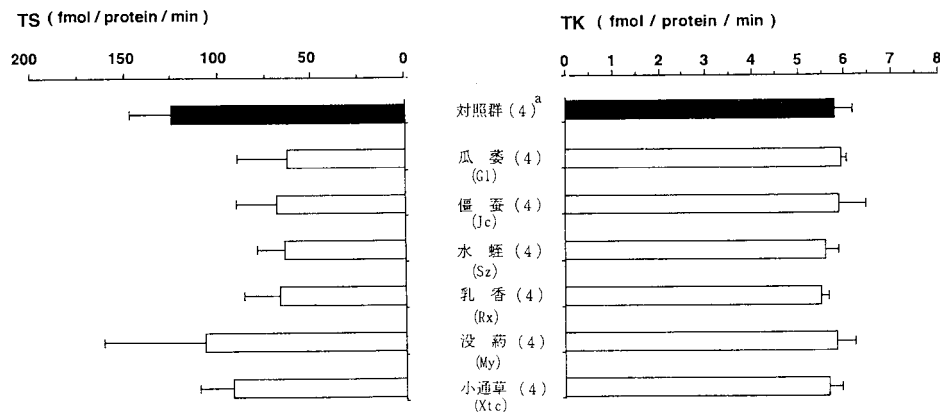


Fig. 2 Mammary DNA synthesizing enzyme activities in each group (Mean $\pm$ SEM). ^aNumber of estimates.

たが、乳管の発育 (area) にはすべての実験群と対照群の間に明らかな差は認められなかった。

また、前癌症状である HAN の数およびその成長速度の指標としての面積は、没薬投与により明らかに抑制されたが、それ以外の実験群ではいずれも対照群との間に差は認められなかった。

一方、関木通投与群では、正常乳腺および HAN のいずれも顕著に抑制された。

(2) DNA 合成系酵素活性 (Fig. 2): TS 活性では没薬と小通草群を除いた実験群が対照群より低い傾向を示したが、TK 活性においては群間に差は見られなかった。

2. 乳腺における成長因子および癌遺伝子の免疫組織化学的検索 (Table II)

乳腺における $TGF\alpha$ の染色が乳香と小通草によって若干抑えられたが、有意な差は見られなかった。EGF においては瓜蒌および僵蚕を除いた実験群では対照群より染色度は低かった。

3. 子宮腺筋症 (Table III)

僵蚕を除くすべての実験群では、腺筋症の形成は明らかに抑制された。とくに水蛭と乳香では腺筋症の発生は全く見られなかった。

4. 尿成分 (Table IV)

瓜蒌、水蛭、没薬、小通草群と対照群の間には差は見られなかった。僵蚕および乳香群におけるいくつかの尿成分は対照群より有意に高かった。

5. 発情周期 (Fig. 3)

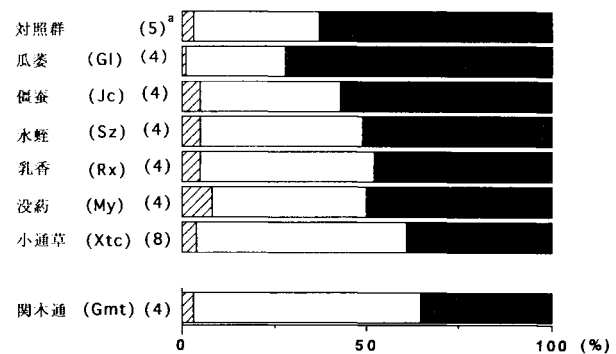


Fig. 3 The pattern of estrous cycle in each group. Each stage represents the percentage of the total period examined (15 days), ▨ proestrus, ▤ estrus/metestrus, ■ diestrus. ^aNumber of mice examined.

Table II Immunohistochemical staining of oncoproteins.

Group		対照群 (7) ^a	瓜蒌 (Gl) (4)	僵蚕 (Jc) (4)	水蛭 (Sz) (4)	乳香 (Rx) (4)	没薬 (My) (6)	小通草 (Xtc) (4)	関木通 (Gmt) (4)
EGF	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	5	4	4	0	1	0	1	0
	—	2	0	0	4	3	6	3	4
$TGF\alpha$	++	1	0	2	0	0	0	0	0
	+	6	4	2	3	1	5	1	4
	—	0	0	0	1	3	1	3	0
ras	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	—	7	4	4	4	4	6	4	6

^aNumber of estimates.

++ Positive staining, + positive staining but less marked than ++, — not-clear staining.

Table III Incidence and grade of uterine adenomyosis in each group.

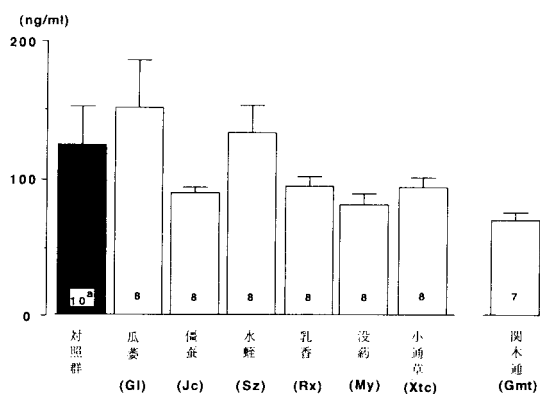
Group	対照群 (12) ^a	瓜蒌 (Gl) (8)	僵蚕 (Jc) (8)	水蛭 (Sz) (8)	乳香 (Rx) (8)	没薬 (My) (8)	小通草 (Xtc) (8)	関木通 (Gmt) (8)
Grade 1	5	1	1	0	0	1	1	1
Grade 2	1	0	2	0	0	0	0	0
Incidence (%)	50.0	12.5	37.5	0*	0*	12.5	12.5	12.5

^aNumber of mice examined.

*Significantly lower than the control at $p < 0.05$ (χ^2 -test).

Table IV Urinary component levels and serum free fatty acid level in each group (Mean $\pm$ SEM).

	Urinary components ^a								Serum free fatty acid level (μEq/ml)
	Urea	Allantoin	Creatinine	Creatine	Taurine	Betaine	Citric acid	Lactic acid	
对照群 (4) ^b	70.60 ±9.21	3.66 ±0.34	1.31 ±0.22	1.60 ±0.04	2.69 ±0.40	12.23 ±1.50	7.58 ±0.96	0.80 ±0.05	3.16 ±0.24 (6)
瓜 萎 (4) (Gl)	65.15 ±10.06	3.27 ±0.65	1.66 ±0.25	1.99 ±0.44	3.74 ±0.93	11.63 ±2.26	8.21 ±1.54	0.33 ±0.33	2.89 ±0.05 (4)
僵 蚕 (4) (Jc)	97.81 ±17.13	7.19 * ±0.93	2.69 * 0.49	3.93 ** ±0.41	3.60 ±0.60	16.97 ±1.51	15.21 * ±2.75	1.93 * ±0.32	2.96 ±0.12 (4)
水 蛭 (4) (Sz)	61.50 ±20.15	4.33 ±1.07	1.62 ±0.39	1.78 ±0.48	2.98 ±0.95	10.37 ±2.27	9.26 ±2.86	0.76 ±0.08	2.62 ±0.12 (4)
乳 香 (4) (Rx)	77.90 ±18.55	6.95 ** ±0.51	2.38 * ±0.27	4.35 ±1.57	5.73 * ±0.63	15.01 ±0.79	13.89 * ±1.78	1.66 * ±0.28	2.97 ±0.23 (4)
没 药 (3) (My)	80.71 ±12.85	5.18 ±0.67	1.66 ±0.23	1.64 ±0.26	3.56 ±0.77	12.31 ±1.81	11.00 ±2.06	1.32 ±0.38	2.94 ±0.14 (4)
小通草 (3) (Xtc)	53.69 ±7.10	4.58 ±0.73	1.47 ±0.07	1.80 ±0.35	3.11 ±0.90	10.20 ±1.53	7.21 ±1.45	0.78 ±0.23	3.52 ±0.33 (4)

^aThe intensity of the signals relative to DSS.^bNumber of estimates is in the parentheses.*or ** Significantly higher than the control at $p < 0.05$ or 0.01 .Fig. 4 Serum prolactin level in each group (Mean $\pm$ SEM). ^aNumber of estimates.

小通草と関木通群において、発情期/発情後期が対照群より長い傾向を示した。他の実験群ではいずれも対照群との間に発情周期の型において明らかな違いは見られなかった。

6. 血清 PRL レベル (Fig. 4) および遊離脂肪酸レベル (Table IV)

対照群といずれの実験群の間にも明らかな差は認められなかった。

7. 主な内分泌器官重量と組織学的検索 (Table V)

内分泌器官重量において群間に差は見られなかった。組織学的には小通草投与マウスの卵巣では黄体形成の抑制が認められた。

Table V Endocrine organ weights in each group (mg) (Mean $\pm$ SEM).

Group	No. of mice	Anterior pituitary	Adrenals	Ovaries
対照群	12	2.2 $\pm$ 0.1	11.6 $\pm$ 0.5	21.4 $\pm$ 0.8
瓜 萎 (Gl)	8	2.6 $\pm$ 0.1	11.6 $\pm$ 0.4	21.8 $\pm$ 1.2
僵 蚕 (Jc)	8	2.2 $\pm$ 0.1	11.4 $\pm$ 0.4	21.8 $\pm$ 0.9
水 蛭 (Sz)	8	2.0 $\pm$ 0.2	11.5 $\pm$ 0.4	20.0 $\pm$ 0.7
乳 香 (Rx)	8	2.4 $\pm$ 0.1	12.7 $\pm$ 0.5	22.2 $\pm$ 0.9
没 药 (My)	8	2.2 $\pm$ 0.1	12.3 $\pm$ 0.4	22.8 $\pm$ 1.0
小通草 (Xtc)	8	2.6 $\pm$ 0.2	13.8 $\pm$ 0.7	22.1 $\pm$ 0.9
関木通 (Gmt)	8	1.8 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 0.5	13.3 $\pm$ 0.6**

** Significantly lower than the control at $p < 0.01$.

関木通群では、卵巣重量が対照群より有意に低かった。また卵巣の多くは黄体を欠いていた。

8. 体重 (Table VI)

関木通投与群では対照群より、体重の減少が著しかったが、他の実験群では顕著な変化を示さず、対照群との間に差は見られなかった。

9. 摂餌・摂水量

摂餌量には群間に差は見られなかったが、摂水量において、僵蚕、乳香、没药、関木通群では対照群より低い傾向を示した (データは示さず)。

Table VI Body weight change in each group (Mean±SEM).

Group		Body weight change		
		Initial (g)	Final (g)	Change (%)
対照群	(12) ^a	26.1±0.4	28.4±0.3	8.7±1.2
瓜 蒌 (Gl)	(8)	25.7±0.2	27.9±0.4	8.8±1.2
僵 蚕 (Jc)	(8)	25.5±0.2	27.8±0.2	8.9±0.7
水 蛭 (Sz)	(8)	25.5±0.5	27.4±0.3	7.7±1.2
乳 香 (Rx)	(8)	25.8±0.7	27.7±0.5	7.5±2.0
没 药 (My)	(8)	25.9±0.6	28.5±0.7	9.9±1.4
小通草 (Xtc)	(8)	26.4±0.1	28.8±0.4	9.1±0.9
関木通 (Gmt)	(8)	26.2±0.3	23.5±0.5**	-8.7±1.4**

^a Number of estimates.** Significantly smaller than the control at $p < 0.01$.

考 察

本実験の結果、乳腺の前癌症状の一つである HAN の形成および増殖は没薬により、また子宮腺筋症のそれらは僵蚕を除くすべての生薬によって抑制されることが明らかとなった。とくに水蛭および乳香投与群では腺筋症の発生は全く認められなかった。一方、これら生薬の乳腺や子宮に対する作用と、乳腺および子宮にとって重要な内分泌機能 (estrogen, progesterone 分泌の指標としての発情周期の型や副腎、卵巢の形態、血中 PRL レベル

など) および栄養摂取、代謝 (摂餌・摂水量、尿成分および血中遊離脂肪酸レベルなど) に対するこれら生薬の影響との間には一定の関連は見出せなかった (Table VII)。我々がこれまで検討した生薬および関連物質の乳腺あるいは子宮に対する影響には、内分泌機能を介さないものがほとんどであった。^{3, 5, 8, 22, 23)} これらの結果および本実験の結果から、生薬の内分泌依存器官の疾患に対する効果にはホルモン分泌を介さない作用の大きいことが示唆された。

没薬は、正常乳腺および HAN の形成、増殖を明らかに抑制した。このことは、中国の伝統的な乳癌治療剤としての没薬²⁴⁾ の効果を裏付けるものである。しかし一方、本薬投与によって乳腺の DNA 合成酵素 (TS, TK) 活性は影響されなかった。このことは、乳腺の乳腺胞や HAN の形成度などが細胞のこれまでの変化の結果であるのに対して、DNA 合成はその時点における細胞の動的状態の指標であって、両者は必ずしも一致しないのがふつうである。^{25, 26)}

関木通は、臨床的に乳腺発育および泌乳増強に有効とされているが、本実験では、本薬による正常乳腺、HAN、および子宮腺筋症の明らかな抑制が見られた。この結果は体重の低下による可能性も否定出来ないが、小通草の場合と同様に性周期における発情期/発情後期の延長、および卵巢における黄体の喪失 (減衰) など、きわめて興味ある知見が得られた。本薬の乳腺および子宮に対する薬効については別途検討中である。

Table VII Summary of effects of 7 natural products on each parameter.

	Mammary gland		HAN		TS	TK	Adeno-myosis	Body weight	Food intake	Water intake	Estrus/Metestrus	Ovarian corpora lutea	Serum PRL	Urinary components	Serum free fatty acid
	End-bud	Duct	No	Size											
瓜 蒌 (Gl)	— ^a	—	—	—	↓	—	↓	—	—	—	—	—	—	—	—
僵 蚕 (Jc)	—	—	—	—	↓	—	—	—	—	↓	—	—	—	↑	—
水 蛭 (Sz)	—	—	—	—	↓	—	↓	—	—	—	—	—	—	—	—
乳 香 (Rx)	—	—	—	—	↓	—	↓	—	—	↓	—	—	—	↑	—
没 药 (My)	↓	—	↓	↓	—	—	↓	—	—	↓	—	—	—	—	—
小通草 (Xtc)	—	—	—	—	—	—	↓	—	—	↓	↑	↓	—	—	—
関木通 (Gmt)	↓	↓	↓	↓	—	—	↓	↓	—	↓	↑	↓	—	—	—

^a—No change, ↑ or ↓ : increase or decrease significantly, and ↑ or ↓ : increase or decrease, while not statistically significant, in comparison with the control.

謝 辞

研究に御協力頂いた水野雅子、長谷川美千子、横山秀徳の諸氏に深謝します。

本研究は 1993 年度明治大学国際交流基金事業(共同研究) によった。

References

- 1) 長澤 弘, 小林佑志, 大林立子, 稲富秀夫: 植物由来天然生理活性物質のマウスの乳腺発育に対する影響. 日本畜産学会報 **60**, 783-787, 1989.
- 2) Nagasawa, H., Konishi, R., Sakagami, N. and Inatomi, H.: Effect of chronic ingestion of anthranilic acid on mammary gland growth in SHN mice. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **1**, 139-142, 1988.
- 3) Nagasawa, H., Konishi, R., Sakagami, N., Inatomi, H. and Yamamoto, K.: Effect of chronic ingestion of anthranilic acid on lactation in mice. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **2**, 23-26, 1989.
- 4) Nagasawa, H., Onoyama, T., Suzuki, M., Hibino, A., Segawa, T. and Inatomi, H.: Effect of motherwort (*Leonurus sibiricus* L) on preneoplastic and neoplastic mammary gland growth in multiparous GR/A mice. *Anticancer Res.* **10**, 1019-1024, 1990.
- 5) Nagasawa, H., Konishi, R., Sensui, N., Yamamoto, K. and Ben-Amotz, A.: Inhibition by beta-carotene-rich algae *Dunaliella* of spontaneous mammary tumorigenesis in mice. *Anticancer Res.* **9**, 71-76, 1989.
- 6) Nagasawa, H., Suzuki, M., Inatomi, H. and Mori, T.: Further study on the effect of motherwort (*Leonurus sibiricus* L) on preneoplastic and neoplastic mammary growth in multiparous GR/A mice. *Anticancer Res.* **12**, 141-144, 1992.
- 7) Nagasawa, H., Fujii, Y., Kageyama, Y., Segawa, T. and Ben-Amotz, A.: Suppression by beta-carotene-rich algae *Dunaliella bardawil* of the progression, but not the development, of spontaneous mammary tumour in SHN virgin mice. *Anticancer Res.* **12**, 993-996, 1991.
- 8) Nagasawa, H., Sakamoto, S., Mori, T., Wu, G., Piao, H., Li, Y., Li, Y., Bai, S., Jin, C., Yamamuro, Y., Sensui, N. and Suzuki, A.: Effects of some natural products as components of Chinese herbal medicine on mammary gland growth and function in mice. *In Vivo* **6**, 135-140, 1992.
- 9) Nagasawa, H., Iwai, Y., Iwai, M., Suzuki, A. and Imai, S.: Suppression by a pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb et Zucc of mammary tumour virus in milk of mice. *Anticancer Res.* **12**, 845-848, 1992.
- 10) Nagasawa, H., Sakamoto, S. and Sawaki, K.: Inhibitory effects of lignin-related pine cone extract on cell proliferating enzyme activity of spontaneous mammary tumours in mice. *Anticancer Res.* **12**, 501-504, 1992.
- 11) Nagasawa, H., Konishi, R., Naito, T., Ohmiya, S. and Mori, T.: Relationship between mammary tumourigenesis and uterine adenomyosis in four strains of mice. *In Vivo* **1**, 237-238, 1987.
- 12) 長澤 弘, 西山秀俊: マウス直接採尿法, 三盛社, 大阪, pp. 32-33, 1992.
- 13) Fujii, Y., Nagumo, A., Hasegawa, A. and Nagasawa, H.: Changes of urinary component level during pregnancy and lactation in mice. *J. Reprod. Dev.* **39**, 187-191, 1993.
- 14) Nagasawa, H., Fujii, Y., Nishiyama, H., Goto, Y. and Inatomi, H.: ¹H-NMR Spectroscopy of urinary components of SHN mice in the course of spontaneous mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.* **12**, 993-996, 1992.
- 15) Yamamoto, K. and Kikuyama, S.: Radioimmunoassay of prolactin in plasma of bullfrog tadpoles. *Endocrinol. Japon.* **29**, 159-167, 1982.
- 16) Nagasawa, H., Yanai, R., Nakajima, Y., Namiki, H., Kikuyama, H. and Shiota, K.: Inhibitory effects of potassium thiocyanate on normal and neoplastic mammary development in female mice. *Eur. J. Cancer* **16**, 473-480, 1980.
- 17) Dunlap, R.B., Harding, N.G.L. and Huennekens, F.M.: Thymidylate synthetase from amethopterin-resistant *Lactobacillus casei*. *Biochemistry* **10**, 88-97, 1971.
- 18) Taylor, A.T., Stafford, M.A. and Jones, O.W.: Properties of thymidine kinase partially purified from human fetal and adult tissue. *J. Biol. Chem.* **247**, 1930-1935, 1972.
- 19) Mori, T., Goto, Y., Sakamoto, S. and Nagasawa, H.: Histological characteristics and immunohistochemical EGF staining of pregnancy-dependent mammary tumors of GR/A mice. *Acta Histochem. Cytochem.* **25**, 603-608, 1992.
- 20) Nagasawa, H. and Goto, Y.: Effects of tumor necrosis factor on pregnancy-dependent mammary tumors in GR/A mice. *Zool. Sci.* **10**, 679-684, 1993.
- 21) Mori, T. and Nagasawa, H.: Multiple endocrine syndrome in SHN mice: Mammary tumors and uterine adenomyosis. In: Comparative Aspects of Tumor Development. Kaiser, H.E. (ed), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 121-130, 1989.
- 22) Nagasawa, H., Fujii, Y., Yamamoto, K., Konishi, R. and Ben-Amotz, A.: No deleterious side-effects on mammary growth and endocrine parameters of chronic ingestion of beta-carotene-rich alga *Dunaliella bardawil* in virgin mice in comparison with synthetic all-trans beta-carotene. *Cancer J.* **2**, 391-394, 1989.
- 23) Nagasawa, H., Suzuki, M., Inatomi, H., Hibino, A., Yamamoto, Y. and Sensui, N.: Restoration by motherwort (*Leonurus sibiricus* L) of lactation suppressed by pregnancy-dependent mammary tumors in GR/A mice. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **4**, 15-19, 1991.
- 24) 周国平: 癌症秘方・偏方大全, 中国医薬科技出版社, 北京, pp. 330-406, 1992.
- 25) Nagasawa, H. and Yanai, R.: Some discrepancies between the use of DNA synthesis and wholemount preparations as indices of mammary gland response to pituitary mammotrophin. *J. Endocrinol.* **97**, 303-304, 1975.
- 26) Nagasawa, H.: Cause of species difference in mammary tumorigenesis: Significance of mammary gland DNA synthesis. *Med. Hypoth.* **5**, 499-510, 1979.