

益母草の一成分 stachydrine によるマウスの 乳癌および子宮腺筋症の抑制

安田 光孝^{a)} 稲富 秀夫^{b)} 阪本 忍^{c)} 長澤 弘^{*a)}

^{a)}明治大学農学部実験動物学研究室, ^{b)}明治大学農学部天然物有機化学研究室, ^{c)}東京医科歯科大学難治疾患研究所

Inhibition by stachydrine of the development of mammary tumours and uterine adenomyosis in mice

Mitsutaka YASUDA^{a)} Hideo INATOMI^{b)} Shinobu SAKAMOTO^{c)} and Hiroshi NAGASAWA^{*a)}

^{a)}Experimental Animal Research Laboratory, Meiji University, ^{b)}Laboratory of Natural Products Chemistry, Meiji University, ^{c)}Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

(Received September 27, 1995. Accepted December 22, 1995.)

Abstract

Effects of stachydrine, a component of motherwort (*Leonurus sibiricus* L.), on spontaneous mammary tumours and uterine adenomyosis in SHN virgin mice were studied. Free access as drinking water to stachydrine at the concentration of 1×10^{-5} % showed no effects on the incidence of mammary tumours, however, 1×10^{-4} % inhibited the incidence. No adenomyosis appeared in the experimental mice given stachydrine, whereas 5 out of 8 mice (62.5 %) developed the lesion in the control. These findings are in good accord with those in motherwort and indicates that stachydrine is a major pharmaceutically effective component of motherwort.

Key words mice, motherwort (*Leonurus sibiricus* L.), stachydrine, uterine adenomyosis.

緒 言

我々の研究室では主として乳腺および女性性器を対象として生薬を含む天然生理活性物質の作用およびその機序について検討を行っている¹⁻¹⁰⁾が、その一環として益母草 (*Leonurus sibiricus* L.) がマウスの乳癌および子宮腺筋症の発生を顕著に抑制することを明らかにした。⁶⁾ 益母草の作用としては、その機序は不明ながら、婦人病、止血、利尿および眼病などに薬効を示すことが知られており、また益母草の一成分の leonurine は子宮の運動および緊張性の増加や利尿作用を呈することが報告されている。¹¹⁾ しかし、益母草の成分の一つである stachydrine についての報告は見られない。本実験は stachydrine のマウスの乳癌および子宮腺筋症に対する影響を検討したものである。

材料と方法

試料：市販益母草 5 kg (花期地上部細切乾物) を 60 % methanol を用い、室温で抽出を繰り返し、約 50 l の抽出液を得た。抽出液は減圧下で約 1 l に濃縮し、イオン交換樹脂を用いて常法によりアミノ酸およびその誘導体を酸性、中性、塩基性に 3 分画した。各分画を化学的に検討した結果、中性画分にドラーゲンドルフ試薬陽性のスポットを検出した。現在、日本産益母草の中性部からドラーゲンドルフ試薬陽性スポットの報告はまだ見られないので単離する目的で次の操作を行った。すなわち、中性部をまずセルロースカラムクロマトグラフィー (90 × 2) を用い、展開溶媒として MeOH : NH₃ : CHCl₃ (10 : 1.5 : 13.5) で各 20 ml ずつ分取し、10 分画を得た。各分画をセルロース薄層クロマトグラフィーで検討し、第 4

*〒214-71 川崎市多摩区東三田 1-1-1
1-1-1 Higashimita, Tamaku, Kawasaki 214-71, Japan

分画中に目的のドラーゲンドルフ試薬陽性スポットが確認された。しかし、この第4分画中には不純物として leucine, isoleucine, valine などが混在したので、さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (40×5) を用い、BuOH : AcOH : H₂O (4 : 1 : 2) を展開溶媒として、1 ml ずつ分取、1366~1496 ml 分画中に目的の物質が検出され、この分画を減圧下で濃縮乾固して得られた固形物を alcohol と ether を用いて再結晶したところ吸湿性の無色針状晶 12.1 mg が得られた。この結晶は機器分析の結果から stachydrine が予測されたので proline をメチル化して stachydrine に誘導し機器分析の結果と比較したところ完全に一致したので単離した結晶は stachydrine と同定した。実験には L-proline から誘導して化学合成した stachydrine を用いた。本物質を水道水に溶かして試料とした。

動物：乳癌および子宮腺筋症早期高発系の SHN 雌マウス^{13, 15)} を用い、2カ月齢より13ヶ月間、実験群には試料を、対照群には水道水を自由摂取させた。なお試料の濃度は最初の10ヶ月間は 1×10^{-5} %、その後 1×10^{-4} % とした。

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°C、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 プリーダー：日本農産工業、横浜) を自由に与えた。

体重の変化：実験開始日より毎月1回体重を測定した。

摂餌・摂水量：実験開始日より毎月1回、4日間における各ケージの給餌器および給水器の重量差より推定し、それぞれ g/日/マウスで示した。

発情周期：3~4ヶ月齢の1ヶ月間、毎朝 (8 : 30~9 : 30) 膣スメアーにより調べた。

Glucose 耐性：10ヶ月齢において、未発癌個体を18時間絶食させたのち、エーテル軽麻酔下で尾部静脈から採血し、血糖値を Cauley *et al.*¹⁶⁾ の方法によって測定した。さらにその直後に体重 1 kg 当たり glucose 1 g を腹腔内注射し、30, 60, 120 分後の血糖値を測定した。

尿成分：7および10ヶ月齢の未発癌個体から直接採尿法^{17, 18)} によって1日3回 (朝, 昼, 夕)、3日間尿を採取し、¹H-NMR¹⁹⁾ により分析した。

乳癌の発生：3ヶ月齢より全ての個体を週1回触診によって調べ、最初に発生した癌の直径が約 10 mm に達した時、発生乳癌総数をチェックした後、エーテル軽麻酔下で頸動脈切斷、採血、供試した。

血清 prolactin レベル：供試時、採取した血液を室温に

6時間、4°C に一晩置き、4°C で20分間遠沈 (3000 rpm) 後、血清は -20°C に保存した。prolactin はラジオイムノアッセイ法²⁰⁾ によって測定した。

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。

乳腺の発育：(1) 形態的観察：片側胸部第三乳腺の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 rating²¹⁾ 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画像解析装置 (モデル LA-525, ピアス、東京) で測定した。同時に乳線の前癌症状である HAN の数と面積も測定した。

(2) DNA 合成律速酵素活性：供試時、-70°C に保存した両側そけい部乳線組織を用い、thymidylate synthetase (TS), thymidine kinase (TK) 活性をそれぞれ Dunlap *et al.*²²⁾ および Taylor *et al.*²³⁾ の方法によって測定した。

主要内分泌器官重量と組織学的検索：供試時に下垂体前葉、副腎、卵巣を摘出し、重量を測定した。また副腎および卵巣については、常法により組織学的検索を行なった。

子宮腺筋症：供試時、片側子宮角を摘出し、Bouin 液固定、paraffine 包埋、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 Nagasawa²⁴⁾ に従って検討した。他側の子宮は直ちに -70°C に保存し、DNA 合成律速酵素 (TS, TK) 活性の測定に用いた。

統計処理：乳癌および子宮腺筋症の発生率の群間の差は χ^2 -検定により、それ以外の測定値の有意性は Student's *t*-検定によった。

結 果

乳癌発生 (Fig. 1)

対照群、実験群とも実験開始5ヶ月日 (7ヶ月齢) より発癌し、10ヶ月日までは乳癌の発生率に群間に差は見られなかった。そこで投与量を10倍にしたところ、11~13ヶ月齢における対照群の発癌率は 17.6% であったのに対し、実験群のそれは 6.6% で、乳癌発生は有意に ($p < 0.05$) 抑制された。

1個体あたり発生乳癌数 (対照群、実験群とも 1.4 ± 0.2) および乳癌の一日当たり増殖率 (対照群 10.6 ± 1.5 %, 実験群 14.1 ± 2.0 %) には群間に全く差はみられなかった。

乳腺発育 (Table I)

Table I Mammary gland growth and DNA synthesizing enzyme activities in each group (Mean ± S.E.M.).

	Mammary rating	Mammary area (mm ²)	No. of HAN	Area of HAN (mm ²)	TS ^a (fmol/mg protein/min)	TK
Cont	2.0 ± 0.2 (8) ^b	308 ± 17 (8)	13.6 ± 2.4 (8)	1.01 ± 0.11 (121)	524 ± 72 (6)	2.03 ± 0.30 (6)
Exp	2.9 ± 0.4 (9)	299 ± 15 (9)	17.8 ± 2.3 (9)	1.18 ± 0.06 (247)	916 ± 147* (6)	2.58 ± 0.31 (6)

^a TS : thymidylate synthetase, TK : thymidine kinase.
^b Number of estimates.
 * Significantly higher than the control at $p < 0.05$.

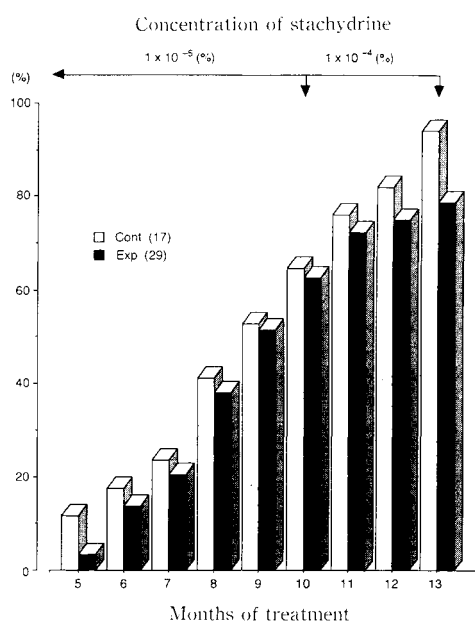


Fig. 1 Mammary tumour development in each group
 Number of mice examined is in the parentheses.

正常乳腺の乳腺胞の形成度 (rating) において実験群は対照群より高い傾向を示したが、乳管の発育の指標としての乳腺面積、および前癌症状である HAN の数と大きさには群間に明らかな差は認められなかった。

また TS 活性では実験群は対照群より有意に高い値を示したが、TK 活性には群間に差は認められなかった。

子宮腺筋症 (Table II)

対照群では 8 個体中 5 個体に子宮腺筋症が発生した (Fig. 2-A) のに対し、実験群ではその発生が全く認められなかった (Fig. 2-B)。

一方、TS、TK のいずれにも対照群と実験群との間に差は見られなかった。

主要内分泌器官重量と組織学的検索

Table II Incidence and grade of adenomyosis and DNA synthesizing enzyme activities in the uterus in each group (Mean ± S.E.M.).

	Incidence (%)	Grade					TS ^a (fmol/mg protein/min)	TK
		1	2	3	4	5		
Cont	62.5 (5/8) ^b	0	1	1	3	0	298 ± 55 (6) ^c	1.98 ± 0.14 (6)
Exp	0* (0/8)	0	0	0	0	0	309 ± 39 (6)	1.59 ± 0.18 (6)

^a TS : thymidylate synthetase, TK : thymidine kinase.
^b Number of mice with adenomyosis / Number of mice examined.
^c Number of estimates.
 * Significantly lower than the control at $p < 0.05$.

下垂体前葉、副腎、卵巢のいずれの重量にも群間に有意な差は認められなかった (Table III)。

組織学的検索において副腎には群間に違いはなかったが、対照群の卵巢では 10 ケ月齢以降の SHN マウスの特徴である退化像 (間質細胞の崩壊に伴うガラス質化: hyalinization) が多く見られた (Fig. 2-C)。一方、実験群ではこのような像は観察されず、退行の遅延が認められた (Fig. 2-D)。

尿成分 (Table IV)

統計的に有意ではないが実験群では対照群に比べて 7 ケ月齢における creatinine, taurine, citric acid の尿中レベルが高い傾向を示した。

10 ケ月齢では尿成分のレベルに群間に差は認められなかった。

発情周期 (Table III)

各周期の長さには群間に有意な差は認められなかったが、実験群ではそのばらつき (標準誤差) の大きいことからもうかがえるように、発情後期もしくは発情間期の持続する個体が認められた。

Glucose 耐性 (Fig. 3)

glucose 注射後 30 分の血糖値の上昇率は実験群では

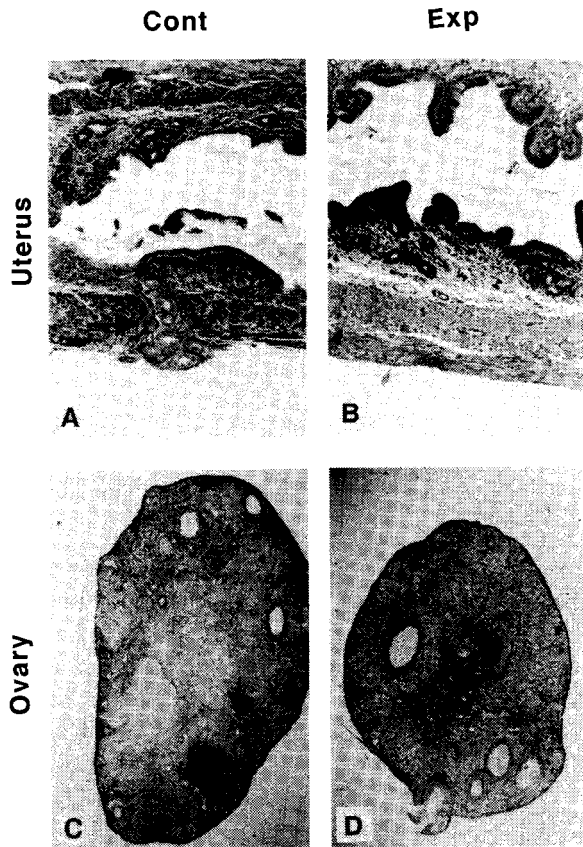


Fig. 2 Representative histological features of uterus ($\times 100$) and ovary ($\times 40$) in each group (HE staining). Arrows in A and C indicate the glandular invasion into muscle layer (Grade 4) and the hyalinization, respectively.

Table III Oestrous cycle, endocrine organ weights and serum levels of prolactin and free fatty acid in each group (Mean \pm S.E.M.).

	Cont	Exp
Oestrous cycle (%) ^a	6 ^b	10
Pro-oestrus	3.8 \pm 1.6	2.8 \pm 0.9
Oestrus/metoestrus	36.0 \pm 4.0	39.4 \pm 12.6
Dioestrus	63.5 \pm 3.2	57.8 \pm 12.4
Endocrine organ weight (mg)	11 ^b	17
Anterior pituitary	2.2 \pm 0.3	2.2 \pm 0.2
Adrenals	10.7 \pm 0.4	10.9 \pm 0.4
Ovaries	22.7 \pm 1.7	22.9 \pm 1.3
Serum prolactin level (ng/ml)	4 ^b	4
229 \pm 44		162 \pm 12
Serum free fatty acid level (μ Eq/ml)	8 ^b	10
1.35 \pm 0.23		1.70 \pm 0.26

^a Length of each stage is expressed in terms of the percentage of the total length examined (30 days).

^b Number of estimates.

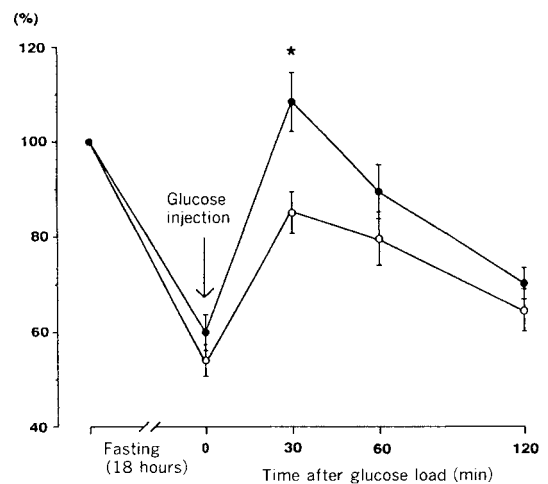


Fig. 3 Percent change of blood glucose level in each group (Mean \pm S.E.M.). Level at full feeding (Mean \pm S.E.M.): Control (\circ): 104 \pm 4 mg/dl (n=5), Exp (\bullet): 119 \pm 7 mg/dl (n=6).

*Significantly higher than the control at $p < 0.05$.

Table IV Urinary component levels in each group (Mean \pm S.E.M.).

	Number of estimates	Urea	Allantoin	Creatinine	Creatine	Taurine	Betaine	Citric acid	Lactic acid
7 months									
Cont	3	269 \pm 38	7.61 \pm 0.90	2.54 \pm 0.17	1.77 \pm 0.44	2.50 \pm 0.70	23.7 \pm 2.7	13.8 \pm 1.8	1.28 \pm 0.27
Ext	5	253 \pm 30	9.93 \pm 1.20	3.44 \pm 0.33	1.96 \pm 0.39	6.54 \pm 1.40	28.4 \pm 5.0	19.1 \pm 3.0	1.79 \pm 0.24
10 months									
Cont	6	194 \pm 35	8.46 \pm 0.90	2.67 \pm 0.25	1.41 \pm 0.34	3.12 \pm 1.33	15.6 \pm 0.7	15.5 \pm 1.8	4.51 \pm 1.31
Exp	4	205 \pm 31	10.10 \pm 2.10	2.73 \pm 0.32	1.68 \pm 0.36	2.14 \pm 0.49	17.7 \pm 2.1	21.0 \pm 4.4	3.61 \pm 0.93

Each component was estimated as the intensity of the signal relative to that of DSS (5 mm/l).

る影響は認められなかった。

考 察

本実験において stachydrine は $1 \times 10^{-4}\%$ の濃度で乳癌の発生を抑制した。また実験群においては子宮腺筋症の発生は全く認められなかった。これらの結果は、益母草における結果 (Table V)^{1,6)} とよく一致し、stachydrine が益母草の主要な有効成分であることを示すものである。

prolactin や estrogen が、実験的に乳癌、および子宮腺筋症の発生・増殖に重要なホルモンであることは周知のところである。²⁵⁾ したがって本実験においてみられた stachydrine 投与による prolactin の血中レベルの低下、発情後期および間期の持続などが上記疾患の抑制の一因と考えられた。また実験群においては卵巣の退行の遅延が認められた。乳癌および子宮腺筋症発生能と、老化現象の一つとしての卵巣のガラス質化を伴う退行との間には平行関係のある²⁶⁾ ところから、実験群における乳癌や子宮腺筋症の発生の低下が stachydrine による老化の遅延によることも示唆される。

さらに本実験において、いくつかの尿成分の排泄の促進が認められた。この結果は、益母草 (Table V)¹⁾ の他、

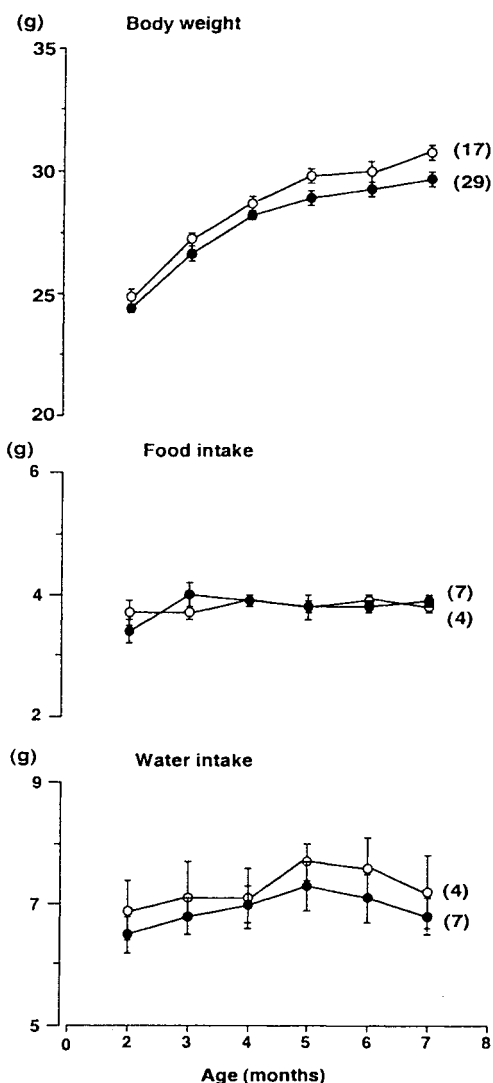


Fig. 4 Body weight change and food and water intake in each group (Mean ± S.E.M.) ○ : Cont. ● : Exp. Number of mice or cages examined is in the parentheses.

対照群に比べて有意に高い値を示した。その他の時期の値には群間に差は見られなかった。

血清 prolactin レベルおよび血清遊離脂肪酸 (NEFA) レベル (Table III)

prolactin レベルは統計的に有意ではないが、対照群に比べて、実験群では低い傾向を示した。

NEFA レベルには群間に差は見られなかった。

体重、摂餌・摂水量 (Fig. 4)

いずれも対照群と実験群との間に差はなく、投与によ

Table V Summary of the effects of motherwort (*Leonurus sibiricus* L.)^{a)} and stachydrine on mammary glands and others.

	Motherwort	Stachydrine
Mammary glands		
End bud formation	→ ^{b)}	↗
Duct growth	→	→
Preneoplastic IAN		
Development	↓	→
Growth	→	→
Uterine adenomyosis	↓	↓
Excretion of urinary component	↑	↑
Endocrine organ weights	→	→ ^{c)}
Serum prolactin level	→	↘
Oestrous cycle	→	→ ^{d)}
Glucose tolerance	↑	↓

^{a)} From References #4-6

^{b)} ↑ increase, ↓ decrease, ↗ partial increase, ↘ partial decrease, → no change.

^{c)} Ovarian hyalinization was retarded.

^{d)} Partial prolongation of metoestrus and/or dioestrus.

乳癌抑制作用のある *Dunaliella bardawil*,⁸⁾ *Iomblicine*,²⁷⁾ 関本通,²⁸⁾ その他の生薬²⁹⁾ に見られるところで、物質代謝の促進がこれら疾患の抑制に寄与していると考えられる。

一方、益母草は glucose 投与 30 分における血中レベルの上昇を有意に抑えた¹⁾ のに対し、stachydrine では逆に对照群より高い値を示すなど、益母草と stachydrine では、乳腺や子宮疾患に対する作用、関連パラメータに対する影響、およびその程度に若干の違いがみられた (Table V)。また本実験で乳癌発生に無効であった stachydrine の濃度 ($1 \times 10^{-5}\%$) は、われわれの先の実験^{1, 6)} で用いられた益母草中に含まれる濃度にほぼ相当する量であった。このことは乳癌抑制に対して益母草中の他の成分も関与していることを示唆するものである。これらの問題に関してはさらなる検討が必要である。

体重の変化、摂餌・摂水量および内分泌臓器重量などには実験群と对照群に違いが認められなかったことから、 $1 \times 10^{-4}\%$ 程度での stachydrine の毒性は無いと考えられた。

なお本実験において子宮腺筋症は実験群で完全に抑制されたにもかかわらず、DNA 合成律速酵素活性には群間に差は見られなかった。これは前者が長期間にわたる子宮の変化の結果であるのに対し、後者は測定時における動的状況を示すもので両者がかならずとも一致しないことはよく知られているところである。^{29, 30)}

謝 辞

御協力と御教示を頂いた守隆夫 (東京大学大学院理学系研究科) および山本和俊 (早稲田大学教育学部) の両氏に感謝する。

References

- 1) Nagasawa, H. *et al.* : Shokubutsu yurai temen seiri kassei busshitsu no mausu nyuusen hatsuiku ni taisuru eikyou. *Nihon chikusan gakkai hou* **60**, 783-787, 1989.
長澤 弘, 小林祐志, 大林立子, 稲富秀夫 : 植物由来天然生体活性物質のマウス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., 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.
- 6) Nagasawa, H., Inatomi, H., Suzuki, M., Yamamuro, Y., Sensui, N. : Inhibition by motherwort (*Leonurus sibiricus* L.) of precancerous mammary hyperplastic alveolar nodules in mice. *Syoyakugaku Zasshi* **44**, 176-178, 1990.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Kimura, Y. *et al.* : "Saishin wakan yakuyou shokubutsu." Hirokawayashoten, Tokyo, pp. 72-73, 1961.
木村雄四郎, 何米達夫 : 最新和漢薬用植物. 廣川書店, 東京, pp. 72-73, 1961.
- 12) 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.
- 13) Nagasawa, H., Yanai, R., Taniguchi, H., Tokuzen, R., Nakahara, W. : Two way selection of a stock of Swiss albino mice for mammary tumorigenesis : Establishment of two new strains (SHN and SLN). *J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 425-430, 1976.
- 14) Staata, J. : Standard nomenclature for inbred strains of mice, 8th listing. *Cancer Res.* **45**, 945-977, 1985.
- 15) Nagasawa, H., Konishi, R., Naito, T., Ohmiya, S. and Mori, T. : Relationship between mammary tumorigenesis and uterine adenomyosis in four strains of mice. *In Vivo* **1**, 237-238, 1987.
- 16) Cauley, L.P., Spear, F.E., Kendall, R. : Ultramicrochemical analysis of blood glucose with glucose oxidase. *Am J Clin Pathol* **32**, 195-200, 1959.
- 17) Nagasawa, H. *et al.* : "Mausu chokusetsu sainyou hou." Sanseisha, Osaka, pp. 32-33, 1992.
長澤 弘, 西山秀俊 : マウス直接採尿法. 三盛社, 大阪, pp. 32-33, 1992.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Yamamoto, K. and Kikuyama, S. : Radioimmunoassay of prolactin in plasma of bullfrog tapoles. *Endocrinol. Japon.* **29**, 159-167, 1982.

- 21) 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. *Europ. J. Cancer* **16**, 473-480, 1980.
- 22) Dunlap, R.B., Harding, N.G.L. and Huennekens, F.M.: Thymidylate synthetase from amethopterin resistant *Lactobacillus casei*. *Biochemistry* **10**, 88-97, 1971.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) Nagasawa, H.: Hormones and experimental mammary tumorigenesis. In: "Hormone Related Tumors." Nagasawa, H. & Abe, K. (eds), Jpn. Sci. Soc. Press/Springer Verlag, Tokyo/Berlin, pp. 137-163, 1981.
- 26) Nagasawa, H. *et al.*: Mausuo no karei ni tomonau ransou, nyuusen oyobi shikyuuu no keitaiteki henka ni tsuite. *Meidai nouken honkoku* **89**, 1-8, 1991.
長澤 弘, 小清水石一, 内藤 健, 大林立子, 守 隆夫: マウスの加齢に伴う卵巣, 乳腺および子宮の形態的变化について. 明大農研報告 **89**, 1-8, 1991.
- 27) Nagasawa, H., Sawaki, K., Fujii, Y., Kobayashi, M., Segawa, T., Suzuki, R. and Inatomi, H.: Inhibition by lombricine from earth worm (*Lumbricus terrestris*) of the growth of spontaneous mammary tumours in SHN mice. *Anticancer Res.* **11**, 1061-1064, 1991.
- 28) Nagasawa, H., Yasuda, M. and Wu, G.: Pattern of urinary components of virgin mice given Guan Mu Tong (*Caulis aris-tolochiae manshuricensis*) as drinking water. *Journal of Traditional Medicines* **12**, 86-88, 1995.
- 29) Nagasawa, H., Yanai, R.: Some discrepancies between the use of DNA and whole mount preparations as indices of mammary gland response to pituitary mammotrophin. *J. Endocrinol.* **67**, 303-304, 1975.
- 30) Nagasawa, H.: Cause of species difference in mammary tumorigenesis. Significance of mammary gland DNA synthesis. *Med Hypoth.* **5**, 499-510, 1979.