Lithospermum の抗受孕作用に関する研究

昭和39年9月14日受付

信州大学医学部産婦人科学教室
(主任：岩井正二教授)
松浦敏男

Studies on the Anticonceptional Effect of Lithospermum

Toshio Matsuura
Departments of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine
Shinshu University
(Director: Prof. S. Iwai)

緒言

Lithospermum の根及び茎に Gonadotropin 抑制効果のある物質を含有することは Cranston (1945) により発見され，その浸出液を投与することにより動物の性周期は抑制され，受孕率は低下することを証明した。この作用機転について，Cranston (1945), Drasher ら (1946) はおそらく下垂体における Gonadotropin の産生を抑制するのであろうとし，わが国でも田原 (1956) は，性上位部に直接作用して機能的に Gonadotropin 産出を抑制するためで毒性，栄養障害及び Gonadotropin に対する直接拮抗によるものではないとしている。一方，Zahl (1948), Plunkett (1950) は血中を循環する Gonadotropin を直接不活化するためであるとし，Noble (1954), Loeser (1955), Draham ら (1955) は，in vitro に Lithospermum 浸出液と Gonadotropin とを直接作用せしめて動物に注射した際 Gonadotropin 作用のあらわれぬことより，後者の見解を支持し，Kemper ら (1958) も Lithospermum 抽出液が in vitro, in vivo で Gonadotropin 及び Thyreotropin の働きを遮断することを認め，その作用機序は前葉ホルモン自身の影響なしに下垂体からの分泌後に上記ホルモンを不活化するにあるとし，最近 Wernze (1962) も同様の見解を発表している。

以上の如く，Lithospermum の Gonadotropin 抑制効果の作用機転はなお明らかでないが，今日では血中循環 Gonadotropin に対する直接不活化作用を重視する考えが支配的のようである。当教室では，以前より Lithospermum の有効成分につき研究し，Lithospermum にはフマール酸，無水コハク酸及び Chinon 体が存在し，長期投与の際にみられる動物性腺・副性器の萎縮はフマール酸によるものであり (三浦 1959), in vitro での Gonadotropin 不活化物質は Chinon 体による (福沢 1958, 伊藤 1959) ことがわかつたが，Lithospermum の生体内抗 Gonadotropin 有効物質はなお不明であり，作用機転も明らかにされるには至つていない。そこで著者は，Lithospermum の Gonadotropin 抑制効果が果して血中循環 Gonadotropin の不活化のみによるものであるか否かを解明することを主眼として以下の研究を行い，いささか知見を得たのでここに報告する次第である。

第1章　抽出 Chinon 体を用いての実験

第1節　Lithosperm からの Chinon 体抽出法

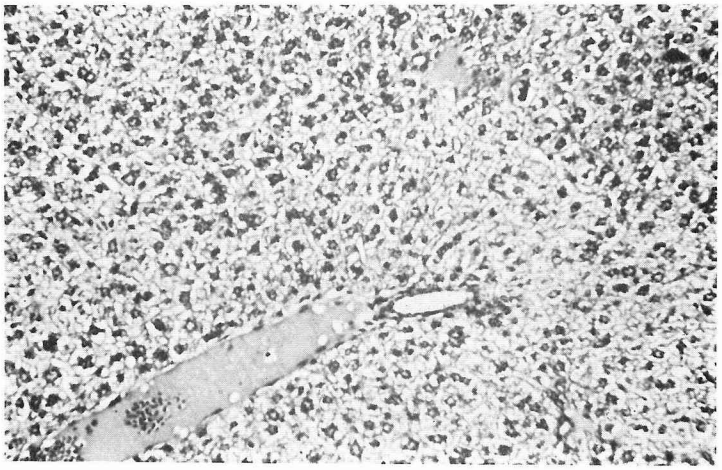
Lithosperm からの Chinon 体の分離抽出は次の抽出方法によつた。即ち，①Lithosperm 水浸エキスの無水アルコール溶液を減圧濃縮エキスとし，10% NaOH でアルカリ性とし，約1時間時々攪拌して加水分解し，稀塩酸を加えて酸性としたのち，分液ロートに入れて醋酸エチルで数十回醋酸エチル層が着色しなくなるまで抽出，苦硝で脱水後減圧濃縮する。②水浸エキスの無水アルコール不溶部は硫酸で加水分解し，可溶の部分について前同様の操作を行う。③同じく硫酸加水分解後の不溶析出部は更にエーテルで抽出して，その残渣について前同様に処理する。④上の操作で得られた醋酸エチル抽出エキス（約30mg）をとり，5 mℓ の無水醋酸に溶解し，濃硫酸1滴を加え30分水浴上に加温して反応を完結せしめる。⑤次に反応液を100 mℓ の冷水に注入して1夜冷却し，析出する褐色沈澱を吸引濾取し水で数回洗浄後 60°C で乾燥させる。

第2節　Chinon 体投与による諸臓器の組織学的変化

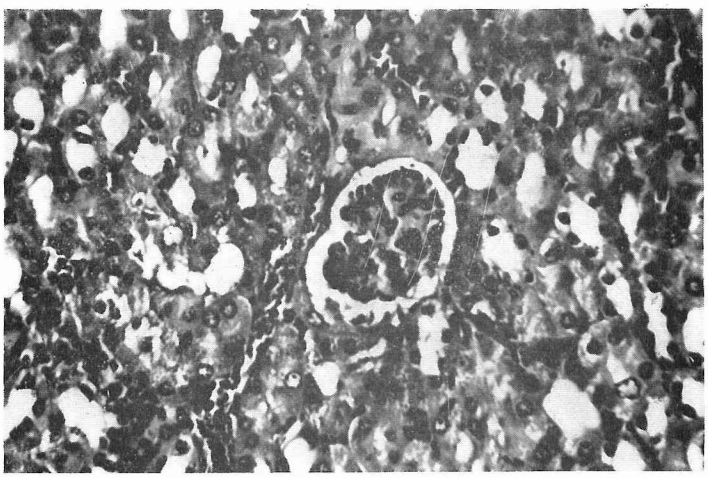
第1項　実験材料及び実験方法

生後40日，体重20 g 以上の ddN 系マウスを使用し，1群3疋に，Chinon 体1日1回5mg または 10mg 宛を3週間皮下または腹腔内投与し，投与完了日翌日屠殺

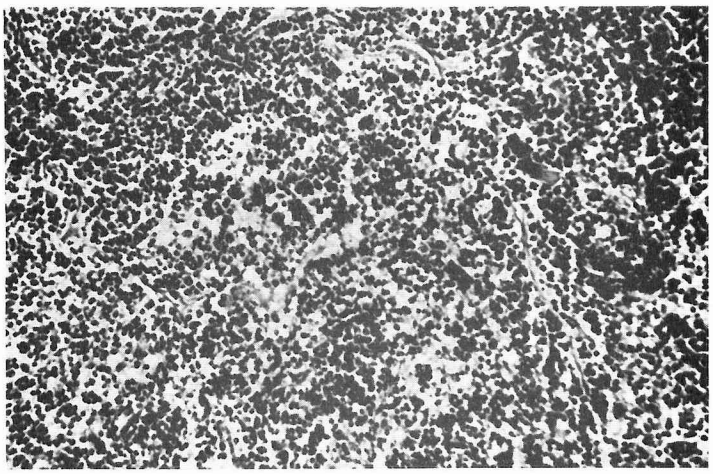
第1図 肝

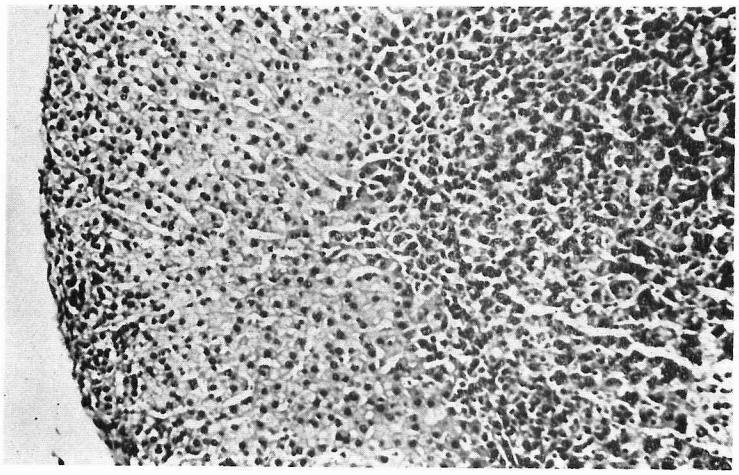


第2図 腎

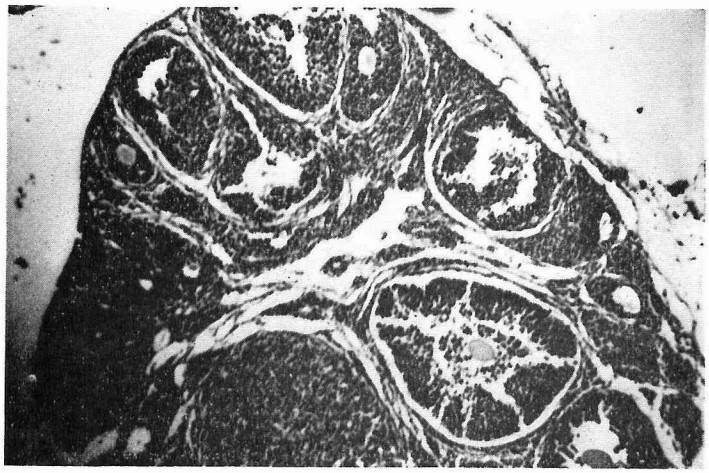


第3図 脾

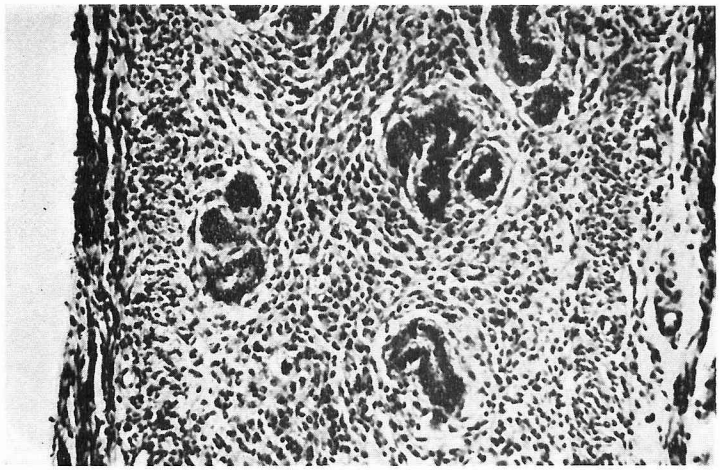




第4図　副　腎



第5図　卵　巣



第6図　子　宮

して肝・腎・脾・副腎・卵巣・子宮の組織学的変化について観察した。

第2項　実験成績

各臓器の組織学的所見は次の如くである。

肝：5 mg 皮下注射群には肝に多少のうつ血を認めるが軽度である。また一部肝細胞に空泡変性を認めるが著明でない。

10mg皮下注射群では肝細胞胞体にかなり多くの空泡産生を認め，血行静止もみられる（第1図)。

10mg腹腔内注射群では空泡変性が著明にみられ，部分的に壊死巣を認める。また肝細胞索は乱れ，溷濁腫張を示す部分もある。

腎：5 mg 皮下注射群では腎糸球体に軽度の充血と腫大の傾向を認めるが，著明な変化ではない。全般的に腎血量の増加傾向はあるがうつ血腎とまでは云えない変化である。また尿細管上皮には異常を認めない。

10mg皮下注射群には腎のうつ血がみられるが，糸球体は着変を示さない。一部に細尿管上皮の軽度の腫張を認める（第2図)。

10mg腹腔内注射群は糸球体には着変は認められないが，尿細管上皮の溷濁腫張は前群より強度である。

脾：5 mg 皮下注射群の脾所見は対照とほとんど変らない。

10mg皮下注射群ではうつ血が著明で，濾胞は縮小の傾向がみられる。

10mg腹腔内注射群も前群と同様にうつ血と濾胞の消失をみる（第3図)。

副腎：5 mg 皮下注射群は正常対照群とほとんど差異がない。

10mg皮下注射群では皮質，髄質ともに腫大し，特に髄質の肥大が著明である。また皮質細胞胞体の一部に空泡化を認める。

10mg腹腔内注射群は髄質の肥大は前群より強く，皮質では網状層の肥大（第4図)，束状層の空泡変性をみる。

卵巣：5 mg 皮下注射群では軽度に充血，腫大傾向を示し，出血卵胞は認められない。

10mg皮下注射群及び10mg腹腔内注射群（第5図）でも前群とほとんど同様の所見を示す。

子宮：5 mg 皮下注射群，10mg皮下注射群ともに腺組織は管腔状で蛇行せず，分泌像を欠如していた。筋組織には変性，壊死像等認むべき変化はない。

10mg腹腔内注射群も前2群とほぼ同様の所見で，内膜肥厚はあるが分泌像は欠如する（第6図)。

以上各臓器の組織学的変化を一括すると第1表の如くである。即ち，Chinon 体の10mg 皮下注射，特に10mg腹腔内注射では，諸臓器の組織学的変化から，その毒性が認められるが，5 mg 皮下注射では，3週間連日投与にても著しい病変はみられない。

第1表　Chinon 体投与マウス諸臓器の組織学的変化（3週間連日投与）

投与量	肝	腎	脾	副腎	卵巣	子宮
5 mg (皮下)	多少のうつ血	うつ血	変化なし	変化なし	多少の腫大	変化なし
10 mg (皮下)	空泡	うつ血	うつ血	髄質腫大	多少の腫大	変化なし
10 mg (腹腔内)	肝細胞壊死	溷濁腫張	うつ血	髄質腫大著し	多少の腫大	内膜やや肥厚

第3節　試験管内 Gonadotropin 不活化作用

Lithospermum より抽出した Chinon 体に，in vitro で Gonadotropin を強力に不活化する作用のあることは，既に伊藤 (1959) が Mainini 反応を用いてこれを立証しているが，著者は更に Friedman 反応によつて本作用を追試した。

第1項　実験方法

先ず予備実験を行い，Friedman 反応にて，24時間後排卵を確実に起させる PUG の最小量は，第2表の如く 50Iu であることを知つたので，Chinon 体の不活化最小量を決定するため，0.5mg，1mg，2mg，5mgを使用し，夫々を PUG 100 Iu に混合，37°C，2時間後 Friedman 反応を実施して24時間後の排卵の状態を観察した。

第2表　PUG 各単位による Friedman 反応

PUG (Iu)	Friedman 反応	
5	−	−
10	−	−
25	+	−
50	+	+
100	+	+

第2項　実験成績

成績は第3表の如く，in vitro で PUG 100 Iu を

第3表　Chinon 体の試験管内 PUG (100 Iu) 不活化作用

Chinon 体 (mg)	0.5	1	2	3	5
Friedman 反応	+	+	−	−	−
	+	−	−	−	−

不活化するに要する Chinon 体の量は 2mg であり，本物質に強力な Gonadotropin 不活化作用のあることが確認された。

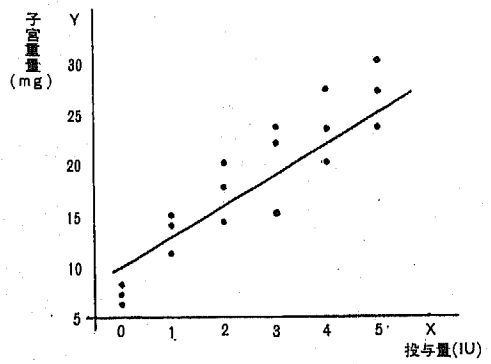
第4節　生体内 Gonadotropin 不活化作用

Lithospermum の抗 Gonadotropin 作用機序として，その直接的 gonadotropin 不活化作用が今日多くの学者により重視されていることは先きに述べた通りである。そこで，Lithospermum の Gonadotropin に対する不活化有効物質として Lithospermum から抽出した本 Chinon 体が，動物体内でも Gonadotropin に不活化作用を示すか否かをみるため次の実験を行つた。

第1項　実験方法

成熟家兎（体重2.0～2.1kg）を使用し，一側の耳静脈より PUG 100 Iu を静注し，直ちに他側の耳静脈より Chinon 体 3mg，5mg 及び 10mg を夫々静注して24時間後の排卵の有無を観察する一方，別の成熟家兎に，排卵のないことを確めた後 Gonadotropin 200 Iu を静注し，他側の耳静脈より Chinon 体 10mg を静注，注射直後，1時間，4時間，7時間及び24時間後に頸静脈から5mℓ採血し，遠沈 2500 r.p.m. にて血清を採取，この血清を6等分して，1日1回3日間6～8g の未熟マウス1群2疋に皮下注射し，4日目にガスにて屠殺し，摘出した子宮を濾紙で乾燥後 Torsionsbalance で秤量し，予め作成した標準直線から血中 Gonadotropin 量を測定した。なお標準直線は第7図の如く，Gonadotropin 5Iu までの投与量では，子宮重量の増加にほぼ直線である。

第7図　Gonadotropin 投与量（X）上の子宮重量（Y）の回帰曲線



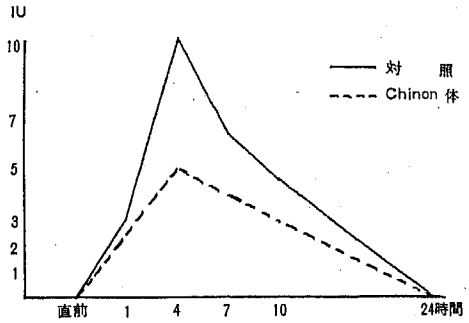
第2項　実験成績

PUG（100 Iu）同時注射による Friedman 反応の成績は第4表の如く，注射後各時間毎の血中 Gonadotropin 量の推移は第8図，またその際の摘出子宮は第9図の如くである。即ち，5mg 以上同時注射では Friedman 反応陰性であり，また注射後各時間毎の血中 Gonadotropin 量の推移をみると，概むね注射後4時間目にピークがみられ，24時間目には注射前の状態に還えるが，その量は対照にくらべてやや少い。

第4表　PUG（100 Iu）同時注射の Friedman 反応

投与量	Friedman 反応	
3 mg	+	+
5 mg	−	−
10 mg	−	−

第8図　血中 Gonadotropin の推移



以上より，in vitro にて Gonadotropin 不活化作用を示す Chinon 体は，同時注射により血中もで或る程度 Gonadotropin を不活化する作用を示すと考えられる。

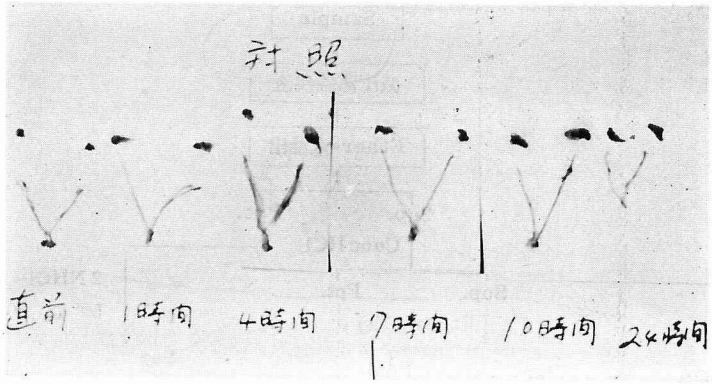
第5節　ラツテ性周期に対する影響

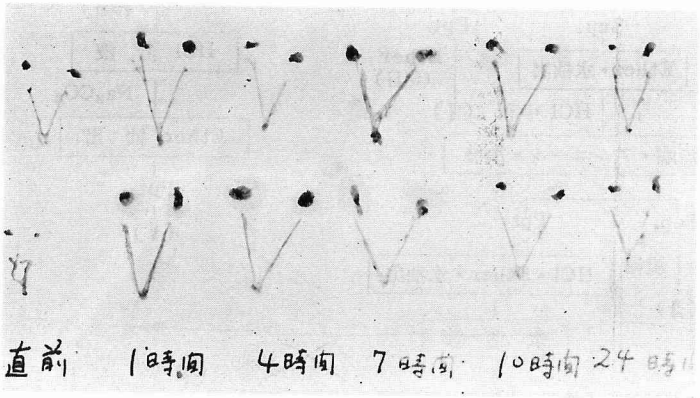
Lithospermum の作用が血中 Gonadotropin への直接作用によるものとすれば，その有効物質 Chinon 体の投与により，性周期は多少とも攪乱されることが予想されるが，従来教室の福沢（1958），伊藤（1959）が Lithospermum からの Gonadotropin 不活化抽出物質を以て行つた実験では，性周期に及ぼす影響はみられていない。著者は非投与ラツテ，Lithospermum 水性エキス投与ラツテを対照とし，Chinon 体のラツテ性周期に対する影響を実験した。

第1項　実験方法

Chinon 体は 40mg 及び 60mg，水性エキスは 25mg 及び 50mg を1回量として，1日1回10日間ラツテ（体重200～220g）に皮下注射し，注射開始前10日から終了後4日まで毎日一定時刻（午後12時～1時の間）に膣

第9図　摘出子宮（上：対照，下：Chinon 体同時注射）





脂膏を採取し，メタノール固定後 Giemsa 染色を施し，水洗，乾燥して鏡検した。

性周期の分類は Long-Evans に従い次の4期に分類した。①発情間期：粘液と白血球と少数の有核上皮細胞　②発情前期：有核上皮細胞と少数の白血球　③発情期：角化細胞のみ　④発情後期：多数の白血球と有核上皮細胞と少数の角化細胞

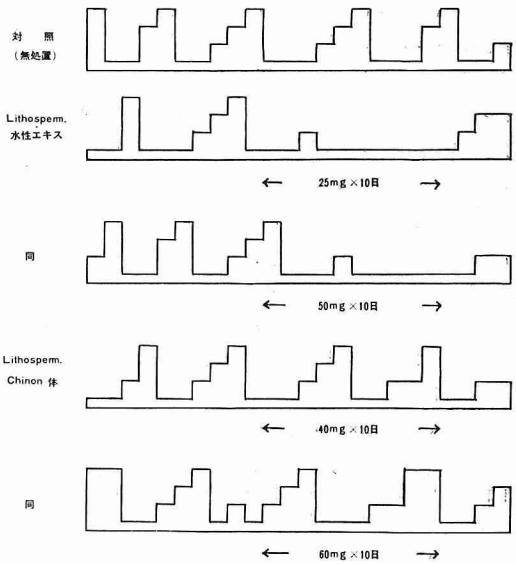
第2項　実験成績

発情期，発情前期，発情間期，発情後期を順次段階別に図示すると成績は第10図の通りで，Lithospermum 水性エキスでは25mgで性周期を抑制するに対して，in vitro の gonadotropin 不活化作用の強い抽出物質 Chinon 体では 60mg でもその抑制効果は認められない。

第6節　抽出 Chinon 体の分析

使用した Chinon 体には Gonadotropin 不活化作用はあるが性周期に対する抑制作用はないことがわかつたが，Lithospermum からの粗抽出物であるので，更にこれを化学的に分析して有効分劃を把握するため本実験を行つた。

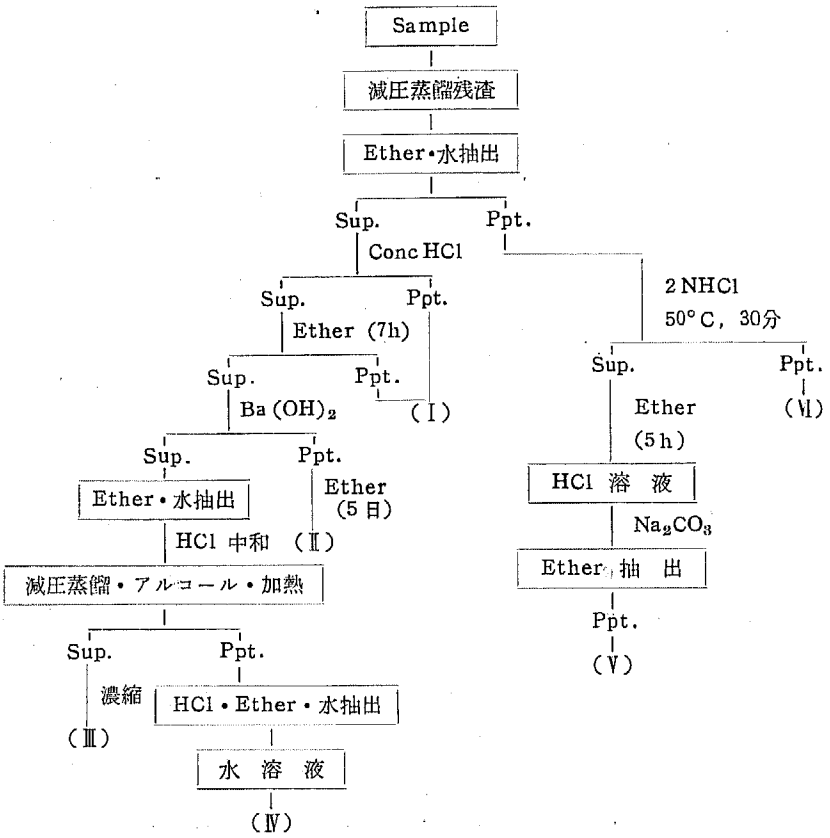
第10図　ラツテ性周期に対する影響



第2項　実験方法

検体を減圧蒸餾後溶解度により分析を進めた。

第11図　抽出 Chinon 体の分析



第2項　実験成績

第11図の如く，分析の結果（Ⅰ）塩分解より生じた酸類やフエノール類（Ⅱ）酸の Ba 塩（Ⅲ）アシドのピクラート（Ⅳ）糖・スルフオン酸（Ⅴ）高分子アミン・アミノアントラキノン（Ⅵ）酸・フエノール類の6分劃を得た。（Ⅴ）（Ⅵ）は塩化第Ⅱ鉄溶液（5%）を1滴加へると青色呈す。

これらの分劃のうち何れに Gonadotropin 不活化作用を有するかをみるため，夫々の分劃を PUG 100 Iu に混合して 37°C，2時間おき Friedman 反応によつて排卵の有無を検した。成績は第5表の如く，分劃Ⅴ，Ⅵにその作用のあることを認めた。

第7節　小　括

Lithospermum から抽出した Chinon 体を用いて実験した結果次の成績を得た。

(1) 体重20g以上の ddN 系マウスに本抽出物質を3週間投与して肝，腎，脾，副腎，卵巣，子宮等諸臓器の組織学的変化を観察した結果，10mg皮下注射，特に10mg腹腔内注射群において，諸臓器のうつ血と，肝には空泡産生乃至肝細胞壊死，腎には溷濁腫張，副腎には髄質の腫大等の変化を認めたが，5mg 皮下注射群では，肝，腎に多少のうつ血あるほかは著しい病変は認められない。

(2) 抽出 Chinon 体は in vitro で強力な Gonadtropin 不活化作用を示すが，動物に gonadotropin と別の部位に同時注射した場合，Friedman 反応及びマウス子宮重量法による血中 Gonadotropin の定量から，in vivo でも或る程度 gonadotropin 不活化作用を有すると考えられる。

(3) 本抽出物質は Lithospermum の in vitro における Gonadotropin 不活化有効物質と考えられるが，本物質によつてはラツテ性周期の抑制効果は認められず，従つて Lithospermum があらわす性周期抑制の原因を体内 Gonadotropin に対する直接作用に

第5表　Chinon 体各分劃の Gonadotropin 不活化作用（Friedman 反応）

混合量＼分劃	Ⅱ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ
0.5 ml	+	+	+	+	−	−
1.0 ml	+	+	+	+	−	−

求めることは理解し難い。

(4) 抽出 Chinon 体を更に溶解度により分析した結果，in vitro に gonadotropin 不活化作用を示す分劃を得たが，これらは高分子アミン・アミノアンラキノン（分劃Ⅴ）及び酸・フエノール類（分劃Ⅵ）に属すると考えられる。

第2章 Chymotrypsin を用いての実験

Chymotrypsin はその Enzym 作用によつて in vitro で Proteohormon の Gonadotropin 活性を破壊することが知られている (Roland 1959)。そこで Chymotrypsin を用いて，in vitro, in vivo の Gonadotropin 不活化作用，性周期及びマウス受孕に対する影響について実験を行つた。

第1節 試験管内 Gonadotropin 不活化作用

第1項 実験方法

Chymotrypsin は持田製薬のキモターゼを使用した。その 1000 HUM, 2000 HUM, 5000 HUM を夫々 PUG 100 Iu に混合し，37°C, 2時間放置後家兎に静注し，24時間後に排卵の有無を観察した。

第2項 実験成績

成績は第6表の如く，in vitro で PUG 100 Iu を不活化するに要するキモターゼは 2000 HuM である。

第6表 キモターゼの試験管内 Gonadotropin (100 Iu) 不活化作用

キモターゼ (HUM)	1000	2000	5000
Friedman 反応	＋	－	－
	＋	－	－

第2節 生体内 Gonadotropin 不活化作用

第1項 実験方法

前章 Chinon 体を用いての実験と同様に，家兎の一側耳静脈に PuG 100 Iu を静注後直ちに他側耳静脈にキモターゼの 3000 HuM, 5000 HuM, 10000 HuM を静注し，24時間後に排卵の有無を検した。また3週間以上隔離した別の成熟家兎に Gonadotropin 200 Iu を静注し，その直後他側耳静脈にキモターゼ 2000 HuM を注射して，注射直前，注射後1時間，4時間，7時間，10時間及び24時間に頸静脈から採血し分離した血清中の Gonadotropin 量をマウス子宮重量法によつて測定し，その推移を観察した。

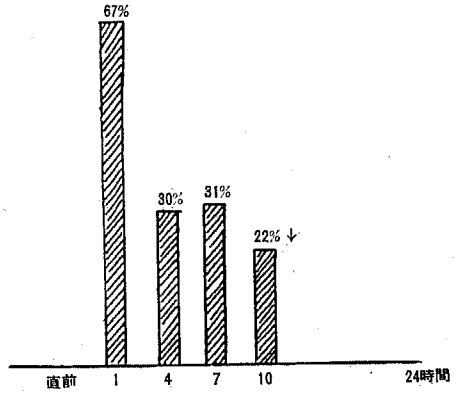
第2項 実験成績

PuG (100 Iu) 同時注射による Friedman 反応の成績は第7表の通りで，キモターゼ 10000 HuM 同時注射家兎における Friedman 反応は陰性を示し，血中 Gonadotropin 量の推移（対照を100とした場合の比率）は第11図の如く，キモターゼ同時注射1時間後67%，4時間後30%，7時間後31%となり，10時間後にはマウス子宮重量にほとんど増大を認めなかつたが22%以下と推定される。即ちキモターゼは同時に投与された Gonadotropin を血中にて或る程度不活化すると考えられる。

第7表 PuG (100 Iu) 同時注射の Friedman 反応

投与量	Friedman 反応	
3000 HuM	＋	＋
5000 HuM	＋	＋
10000 HuM	－	－

第11図 血中 Gonadotropin 量の推移（対照を100とした場合の比率）



第3節 マウス受孕に対する影響

前実験にて Chymotrypsin が in vitro 及び in vivo にて投与 Gonadotropin を不活化する作用を有することを知り得たので，Chymotrypsin の Gonadotropin に対するこの直接作用が，Lithosperm と同様マウス受孕を低下せしめるか否かをみるため次の実験を行つた。

第1項 実験方法

体重20g以上の ddN 系マウスにて，膣開口により発情を認めたものを選んで使用した。飼料は魚粉16%を含む固形飼料と緑餌を与え，時々煮干などを与えた。繁殖ケージは18×20×20cmのものを使用した。交尾は♀：♂＝3：1の割で繁殖ケージに入れ，体重変化を指標として2週間の受孕率を観察した。1群♀の3疋中1疋は無処置対照，1疋は生理食塩水 (0.5ml)，他の1疋は Chymotrypsin（キモターゼ0.5ml）を交尾前1週間と交尾期間中2週間皮下注射したが，キモターゼの1回投与量は5群に 2000 HuM，他の5群に

は 5000 HuM とした。

第2項　実験成績

キモターゼ 2000 HuM 投与群の受孕有無の成績は第8表の如く，5000 HuM 投与群の成績は第9表の通りで，2000 HuM 投与群のうちケージ番号3，4，5000 HuM 投与群のケージ番号 7，10 は投与マウスのみに受孕をみなかつたが，両群共受孕率無処置マウス $^4/_5$，生理食塩水注射マウス $^3/_5$，キモターゼ注射マウス $^2/_5$ の成績は推計学的に有意でなく，抗受孕作用を肯定することはできない。

第8表　キモターゼのマウス受孕に対する影響 (2000 HuM)

ケージ番号 / マウス	1	2	3	4	5
無処置	－	＋	＋	＋	＋
生理食塩水	－	－	＋	＋	＋
キモターゼ (2000 HuM)	－	＋	－	－	＋

第9表　キモターゼのマウス受孕に対する影響 (5000 HuM)

ケージ番号 / マウス	6	7	8	9	10
無処置	＋	＋	－	＋	＋
生理食塩水	－	＋	－	＋	＋
キモターゼ (5000 HuM)	＋	－	－	＋	－

第4節　ラツテ性周期に対する影響

第1項　実験方法

キモターゼ 2000 HuM，5000 HuM，10000 HuM を毎日ラツテに皮子注射し，注射期間の10日間と注射前10日間及び注射終了後4日間毎日一定時刻にマツチ棒の先きに脱脂綿をまいて膣脂膏を採取し，メタノール固定後 Giemsa 染色し，水洗，乾燥し鏡検した。

第2項　実験成績

成績を順次発情期，発情前期，発情間期，発情後期の段階により図示すると第12図の如くで，2000 HuM，5000 HuM，10000 HuM 注射の何れのラツテにも性周期に対する抑制効果は認められなかつた。

第5節　小　括

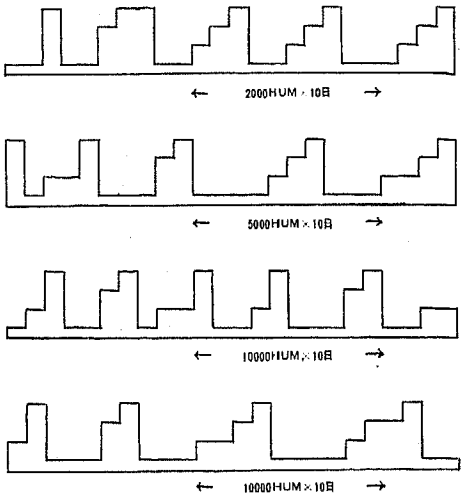
in vitro にて Lithospermum Chinon 体と同じく Gonadotropin に対して不活化作用を示すといわれる Chymotrypsin（キモターゼ）を用いて実験し，次の成績を得た。

(1) 家兎に Friedman 反応を確実に惹起する PuG 100 Iu を Chymotrypsin 2000 HuM と in vitro で 37°C，2時間作用せしめると Friedman 反応は陽性とならない。即ち Chymotrypsin に Gonadotropin 不活化作用のあることを確認した。

(2) PuG 100 Iu を Chymotrypsin 10000 HuM と同時に家兎に注射すれば Fniedman 反応は陽性とならず，Chymotrypsin を注射した場合，同時に投与された Gonadotropin の血中量は対照家兎のそれより低い。以上の成績から，大量の Chymotrypsin は in vivo においても，外から投与された Gonadotropin を或る程度不活化する作用があると考えられる。

(3) しかし，Chymotrypsin のマウス受孕に対する影響及びラツテ性周期に対する影響は殆んど認められず，このことは，Lithospermum の性周期抑制作用が Gonadotropin への直接作用のみによるものでないことを示唆しているものといえよう。

第12図　Chymotrypsin のラツテ性周期に対する影響



第3章　Lithospermum 水性エキスを用いての実験

第1節　Lithospermum 水性エキスの毒性

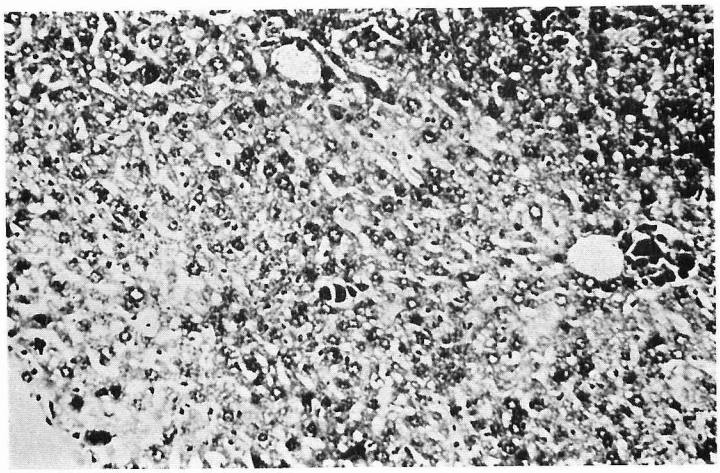
第1項　実験方法

体重20g 以上の ddN 系マウスを使用し，Lithospermum 水性エキス1回量10mg，20mg，30mg 及び 50mg を3疋宛に1日1回3週間皮下，腹腔内，経口投与した場合の局所の変化，体重の増減，元気さ及び10～30mg 皮下注射群について肝・腎・脾・副腎・卵巣・子宮等諸臓器の組織学的変化を観察した。

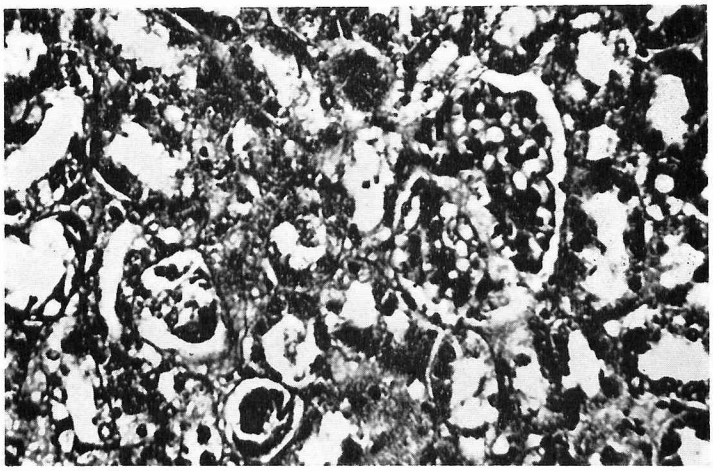
第2項　実験成績

先ず局所，体重，元気さの変化は第9表の如くである。本表から，皮下注射では20mg，腹腔内注射では

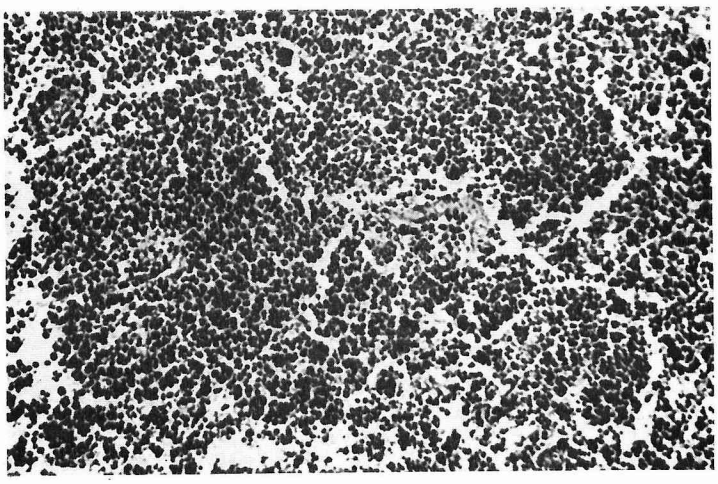
第13図　肝

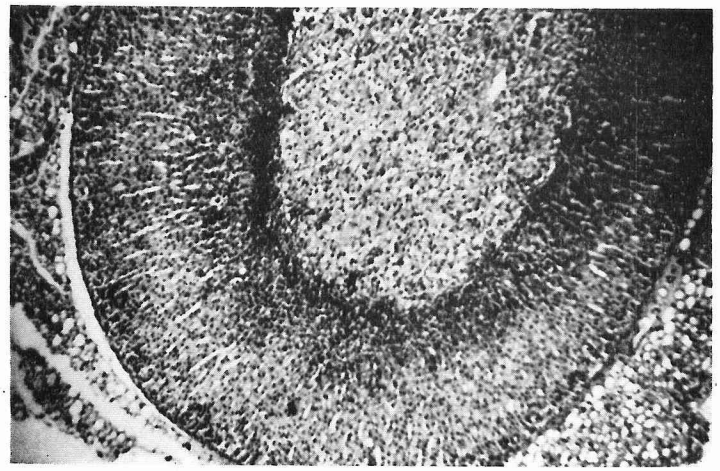


第14図　腎

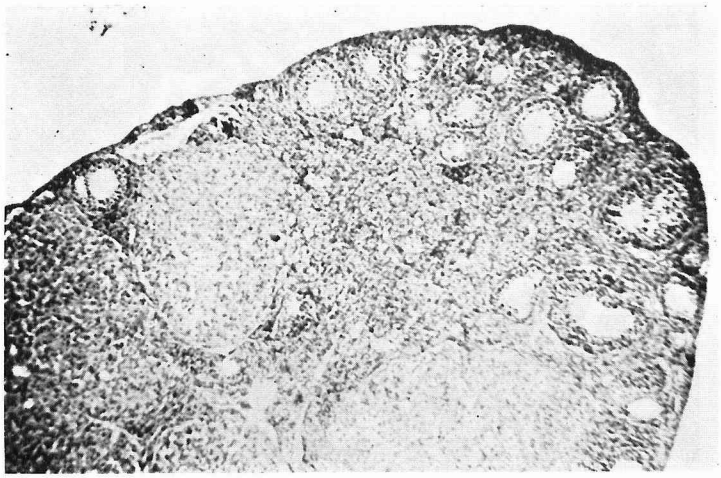


第15図　脾

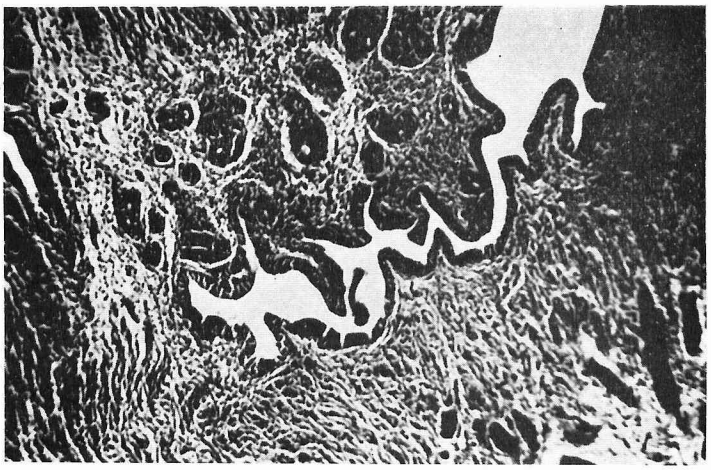




第16図　副　腎



第17図　卵　巣



第18図　子　宮

第9表　Lithospermum 水性エキスの毒性

投与法	所見 ＼ 1回量	10mg	20mg	30mg	50mg
皮下	局所			脱毛14日	脱毛14日 潰瘍16日
	体重	25→26g	25→25g	24→23g	23→26g
	元気さ	良	良	やや元気なし	元気なし 立毛
腹腔内	体重	24→25g	24→25g		
	元気さ	良	元気なし 立毛	3/3死 (4日)	3/3日 (1死)
経口	体重		24→27g	26→28g	
	元気さ		良	良	3/3死 (3日)

10mg，経口投与では30mgが3週間投与にても一般状態には殆んど影響なき量であろうと考えられる。

次に諸臓器の組織学的変化を列挙すると次の通りである。

肝：10mg及び20mg皮下注射群では殆んど正常肝と差異を認めないが，30mg皮下注射群では中心性うつ血と多数の Kupfer 氏細胞を認める。壊死巣はないが一部の肝細胞核は淡染性の傾向を示すものがあり，胞体は空泡変性が認められ（第13図），且つび慢性に起つている部分がある。即ち03mg投与群では多少の肝障害を認める。

腎：10mg投与群では著明な変化はない。20mg投与群では，細尿管及びその上皮細胞には著変はないが腎糸球体の一部に蹄係の空泡，軽度の充血を示すものがあり，そのため Bowmann 氏嚢はやや拡張する（第14図）。30mg 投与群では糸球体及び尿細管上皮核の消失しているものがあり，ネフローゼにみられる細尿管上皮の濁腫腫張を思わせる像がみられる。

脾：10mg投与群では多少の脾のうつ血を認めるが，濾胞はなお明瞭に認められる。20mg投与群では，やはり多少のうつ血脾の像がみられ，濾胞はやや不明瞭の傾向を示す。Megakariozyten は多少減少している。30mg投与群もほぼ20mg投与群の像と似て，軽度のうつ血脾の状態を示す。しかし全体を通じ脾には大した変化はみられない（第15図）。

副腎：10mg投与群は，髄質，皮質共に軽度の肥大がみられ，また皮質網状層では充血がみられる。20mg投与群では特に髄質の肥大が目立ち，また10mg投与群と同様に皮質網状層の充血が認められる（第16図）。30mg投与群では20mg投与群の所見とほぼ同じである。一般に副腎では，各群を通じ髄質の肥大があるほかは大した病変はないといつてよい。

卵巣：10mg投与群では全体に卵巣の肥大があり，卵胞上皮，卵子等には変化なく，閉鎖黄体にも異常を認めない。成熟卵胞はあるが少く，出血卵胞はない（第17図）。20mg 投与群では成熟卵胞は認められず，卵胞はやや萎縮性である。閉鎖黄体は異常を認めない。30mg投与群の卵巣所見は20mg投与群のそれとほぼ同様であるが萎縮性がやや強いように思われる。

子宮：10mg投与群では内膜腺に軽度の増殖あり，分泌像はなく，全般的に著変を認めない。20mg投与群では内膜の増殖はやや強く，肥厚しているものもあるが，腺構造は長管腔状で上皮細胞は分泌像を欠く（第18図）。30mg投与群も分泌像は認められなかつた。

以上各臓器の組織学的変化を一括すると第10表の如く，10mg投与では諸臓器に殆んど著変を認めないが，30mg投与ではかなり著明な変化をあらわす。20～30mg，3週間投与で卵巣に萎縮性変化がみられたことは注目される。

第10表　Lithospermum 水性エキス投与マウス諸臓器の組織学的変化（3週間連日投与）

投与量（皮下）	肝	腎	脾	副腎	卵巣	子宮
10 mg	変化なし	変化なし	多少のうつ血	多少の肥大	変化なし	変化なし
20 mg	うつ血	Bowman氏嚢拡張	うつ血	髄質腫大	卵胞萎縮性	変化なし
30 mg	うつ血	ネフローゼ様	うつ血	髄質腫大	萎縮性	変化なし

第2節　試験管内 Gonadotropin 不活化作用

Lithospermum 水性エキスがその成分中に Chinon 体を含有するところから，in vitro に Gonadotropin を不活化する作用をもつことは明らかであるが，その量的関係をみるため実験を行つた。

第1項　実験方法

Lithospermum 水性エキスの10mg，20mg，30mg，50mg及び100mgを夫々 PuG 100 Iu に混合し，37°C，2時間後 Friedman 反応により排卵の有無をみた。

第2項　実験成績

成績は第11表の如く，in vitro で PuG 100 Iu を不活化するに要する最小量は50mgである。

第11表　Lithospermum 性エキスの試験管内 PuG (100 Iu) 不活化作用

水性エキス (mg)	10	20	30	50	100
Friedman 反応	+ +	+ +	+ −	− −	− −

第3節　生体内 Gonadotropin 不活化作用

第1項　実験方法

成熟家兎を使用し，一方の耳静脈より PuG 100 Iu を静注し，直ちに他方の耳静脈より Lithospermum 水性エキス50mgまたは100mgを静注して24時間の排卵の有無を観察した。

第2項　実験成績

成績は第12表の如く，Friedman 反応により Lithospermum 水性エキス100mgは Chinon 体，Chymotrypsin 同様 in vivo においても Gonadotropin (PuG 100 Iu) を不活化する。

第12表　PuG (100 Iu) 同時注射の Friedman 反応

投与量	Friedman 反応	
50 mg	+	+
100 mg	−	−

これを in vitro の不活化所要量と比較すると，in vivo の実験では Lithospermum 水性エキス及び Chinon 体は2～2.5倍，Chymotrypsin は約5倍の所要量である。これは Chinon 体と Chymotrypsin との作用の相違によるものと考えられる。

第4節　マウス受孕に対する影響

これまでの実験の結果からは，Lithospermum の性周期抑制乃至抗受孕作用が末梢 Gonadotropin に対する直接不活作用によるものとは考え難い。

Lithospermum 水性エキスがラツテ性周期を抑制することは第1章第5節の実験成績からも明らかであるので，ここには同じく Lithospermum 水性エキスを用いてマウス受孕に対する影響について実験した。

第1項　実験方法

体重20g以上の ddN 系マウスを♀：♂＝3：1の割で繁殖ケージにいれ，2週間の交尾期間と前1週間に Lithospermum 水性エキスを毎日1回皮下には10mg，20mg，腹腔内には10mg，経口的には10mg，20mg，30mgを夫々投与して受孕率，産仔数を観察した。なお皮下注射群及び腹腔内注射群には対照として生理食塩水 (0.5mℓ) の皮下・腹腔内注射群をおき，別に無処置対照群をおいて夫々の受孕率と産仔数を観察し，Lithospermum 投与群と比較した。

第2項　実験成績

成績は第13表の如く，無処置対照15疋中12疋 (80%) 妊娠，平均産仔数5.8疋に対し，生理食塩水0.5mℓ皮下注射群では15疋中8疋 (53.3%) の妊娠，平均4.3疋の産仔数を示し，その腹腔内注射群では15疋中

第13表　Lithospermum 水性エキス投与のマウス受孕率及び産仔数に対する影響

投与法 / 1回量	皮下	腹腔内	経口
10 mg	1/15 (6.6%) 4/1 (4疋)	0/15	3/15 (20%) 16/3 (5.3疋)
20 mg	0/15	／	0/15
30 mg	／	／	0/15
対照 (食塩水)	8/15 (53.3%) 35/8 (4.3疋)	9/15 (60%) 46/9 (5.1疋)	／
対照 (無処置)	12/15 (80%) 69/12 (5.8疋)		

9疋 (60%) の妊娠，平均5.1疋の産仔数を示した。即ち皮下または腹腔内注射そのものが受孕率に影響することがわかる。Lithospermum 水性エキスを投与した場合は，1回量10mg投与において，皮下注射群では15疋中1疋 (6.6%) 妊娠，平均産仔数4疋，腹腔内注射群15疋では妊娠せるものなく，経口投与群では15疋中3疋 (20%) 妊娠，平均産仔数5.3%を示し，1回20mg投与においては皮下注射群，経口投与群とも夫々15疋中妊娠はみられず，1回30mg経口投与群の15疋にも妊娠したものはみられなかつた。以上のうち，観察期間中すべてのマウスに一般状態の変化のみられなかつた10mg投与のマウスについて対照マウスと産仔数及び受孕率を比較検討すると，両者の間に妊娠マウスの産仔数には有意差はないが，投与群の受孕率は対照群に比し明らかに低い。

なお，これらのマウスについて，3週間の休養後，非投与のまま再び同一条件にて交尾させた場合の受孕率及び産仔数は第14表の如く，既往に Lithospermum

第14表　3週間休養後の受孕率及び産仔数

マウス群	受孕率	産仔数
既往皮下注射マウス (10mg)	13/15 (86.6%)	88/13 (6.7疋)
〃 (20mg)	11/14 (78.5%)	56/11 (5.1疋)
既往腹腔内注射マウス (10mg)	11/14 (78.5%)	58/11 (5.3疋)
既往経口投与マウス (10mg)	10/14 (71.4%)	58/10 (5.8疋)
〃 (20mg)	8/14 (57.1%)	57/8 (7.1疋)
〃 (30mg)	6/14 (42.9%)	26/6 (4.3疋)
既往生食水注射マウス (皮下)	13/15 (86.6%)	79/13 (6.0疋)
〃 (腹腔内)	8/13 (61.5%)	64/8 (8.0疋)
無処置マウス	12/14 (85.7%)	96/12 (8.1疋)

水性エキス20mg及び30mgを経口投与したマウス群を除き，何れも70%以上の受孕率を示すまでに回復し，投与による受孕率の低下は或る程度可逆的な現象と考えられる。

第5節 Lithospermum の性周期抑制有効成分の抽出

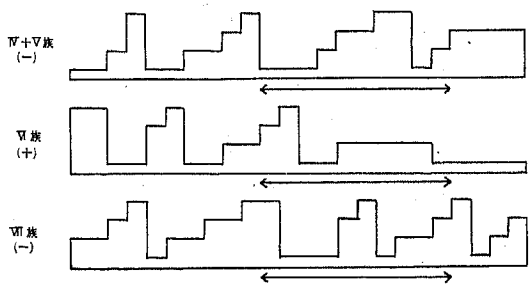
以上の実験から，Lithospermum 水性エキスの性周期抑制乃至抗受孕作用が末梢 Gonadotropin に対する直接的不活化によるものではなく，in vitro にて Gonadotropin を不活化する物質以外の成分に原因することが考えられるので，著者はその有効成分が化学的にいかなる性質をもつものであるかを究明せんとして本実験を行つた。

第1項 溶解度による分析と有効分劃の決定

Lithospermum の水性エキスを溶解度から分析処理し，各段階で得られる分劃についてラッテ性周期に対する抑制効果の有無を確認し，有効分劃を決定した。

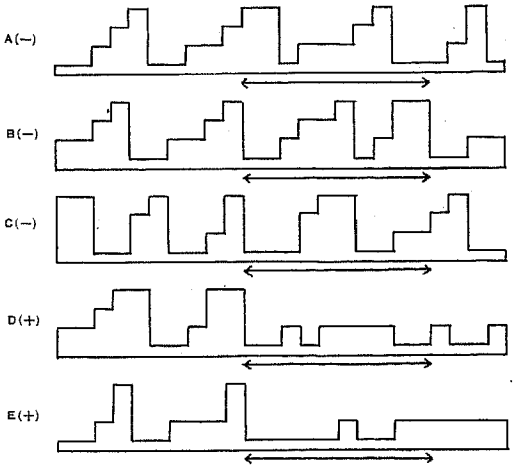
先ず Sample 50mℓ に4倍量の Ethyl Ether を加え，5分間振盪後 Eher 層と水層とに分け，水層は遠心沈澱により上層と沈澱とに分けた。これら Ether 層（第Ⅳ，Ⅴ族），水層上層（第Ⅵ族），沈澱物（第Ⅶ族）について性周期抑制効果をみた成績は第19図の如く，第Ⅵ族の水層上層に抑制効果を認めた。

第19図　分劃の性周期抑制効果（その1）



次にこの上層に 6NHCl を加え pH 0.2 とすると沈澱を生じる。これを遠沈で集め A とする。上清は Ether で6〜8時間抽出し，Ether 可溶成分をBとする。Ether で抽出されない水層の部分は約50mℓ であつたが，これに5g の Ba $(OH)_2$ を加えると再び上層と沈澱とに分けられる。この上層（褐色）を C とし，沈澱を D とする。D を約20mℓ の水に浮遊させ，Ether で3日間抽出し，その水層の Ba を H_2SO_4 で落し，濾過した濾液をEとする。以上のA，B，C，D，Eについてラッテ性周期への影響を調べた結果は第20図の如く，D，Eに抑制効果を認めた。これらは

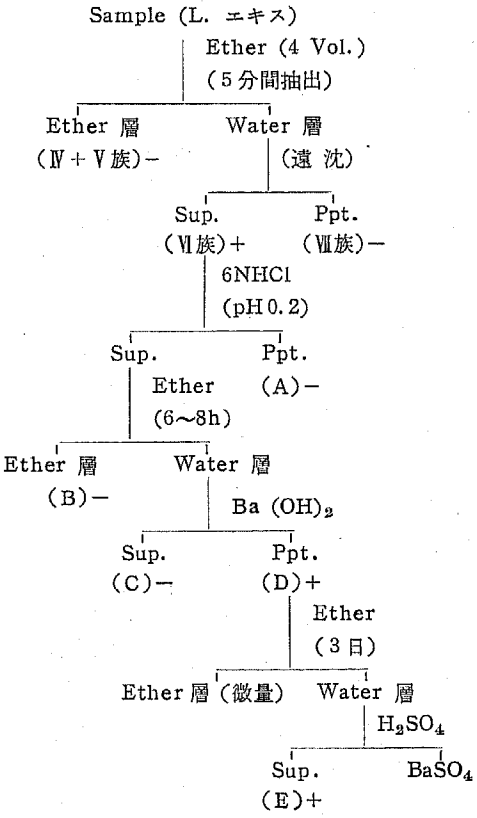
第20図　分劃の性周期抑制効果（その2）



Ba $(OH)_2$ にて沈澱するところから，一応酸性化合物と考えられる。

以上の分析経過を図示すると第21図の如くである。

第21図　溶解度による分析と有効分劃



第2項 有機溶媒による有効分劃の抽出

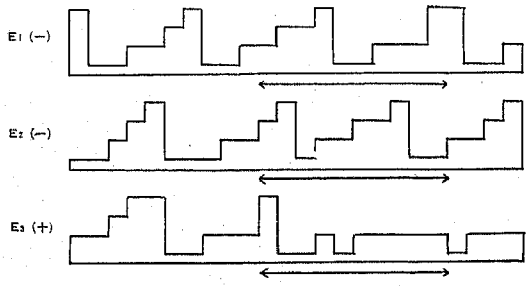
前項の実験にて性周期抑制効果の認められたE劃分

から出発して，更に有機溶媒にて有効分劃の精製抽出を行つた。

先ずEをNaOHにてpH5.0～6.0に調節し，これに3倍量のChloroformを加えて振盪しChloroform層と水層とに分ける。Chloroform層は減圧にてChloroformを除き，水に溶解後pH7.2とし，等張とするためNaClを加えた。これをE_1とする。水層には更に3倍量のEthyl Acetateを加えて充分振盪して分液漏斗でEthyl Acetate層と水層とに分け（3回繰返えす），集めたEthyl Acetate層は減圧してEthyl Acetateを蒸発させ，水に溶解してpHと滲透圧を調節する。これをE_2とする。水層はPyridinを加えると結晶性の沈澱（塩と思われる）を生じるが，これをE_3とする。

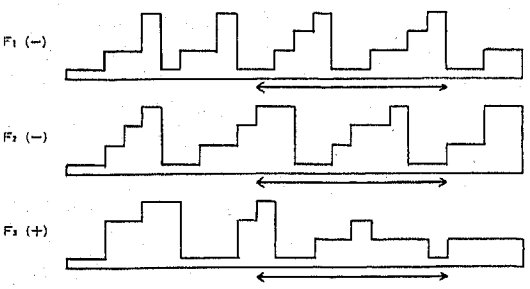
以上のE_1，E_2，E_3諸分劃について，E_3はPyridinを取除き，ラッテ性周期に対する影響を検すると第22図の如く，E_1及びE_2によつては特に影響は認められないが，E_3には抑制効果があると判断される。

第22図　分劃の性周期抑制効果（その3）



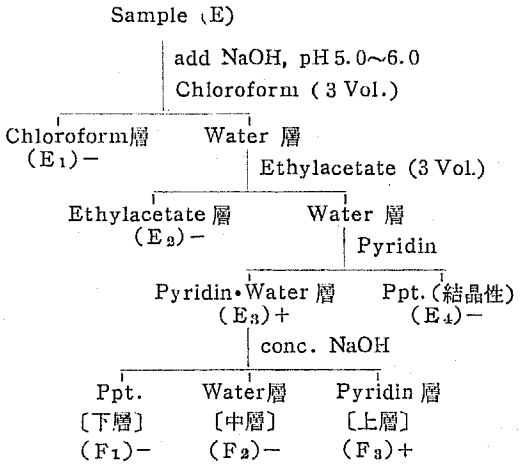
E_3にNaOHを加えると，下層に沈澱（F_1），中層に水層（F_2），上層にPyridin層（F_3）の3層に分かれる。F_3は鮮紅色，透明で，HClにて中和すると黄褐色となる。F_1，F_2，F_3の各層から減圧蒸発にてPyridinを除き，各分劃について性周期への影響をみると第23図の如く，F_3に性周期に対する抑制効果を認めた。

第23図　分劃の性周期抑制効果（その4）



以上の抽出経過を図示すると第24図の如くである。

第24図　有機溶媒による有効分劃の抽出



第3項　薄層クロマトグラフイーと抽出物の化学的性状

Lithospermum水性エキス中の性周期抑制成分としてF_3を得たので，これを薄層クロマトグラフイー（Thine layer chromatography）にかけて，更に化学的性状を追究した。

溶媒としてトルエン：ギサンエチール：ギサン（5：4：1）を用い，固定層にシリカゲルGを用いて約1時間室温で展開後アニスアルデヒドとH_2SO_4の混合物を噴霧，100°Cにて発色させた（第25図）。

本物質（F_3）は，$FeCl_3$にて黄～褐色を示し，Iodeにて黄色を呈し，また紫外線にて発光が認められる。即ち，Phenol性水酸基をもつものと考えられ，またNを含むもののようである。何れにしてもPyridinにて抽出される有機物であることは確実であると思われる。なお本物質は，in vitroにてPuG不活化作用を示さず，家兎Estrogen前処置銅塩排卵実験で，一部家兎に排卵抑制を認めた。

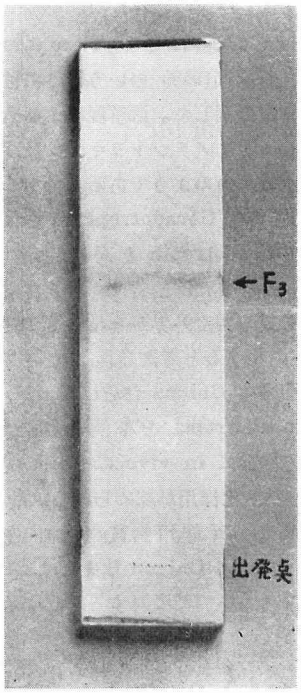
第6節　小　括

Lithospermum水性エキスを用いての実験を小括すると次の如くである。

(1) 体重20g以上のddN系マウスにLithospermum水性エキスを3週間投与して一般状態を観察したが，皮下注射では1回20mg，腹腔内注射では10mg，経口投与では30mgまでは一般状態に殆んど影響が認められなかつた。

(2) また3週間皮下注射したマウスの肝，腎，脾，副腎，卵巣，子宮等諸臓器の組織学的変化を観察するに，1回20～30mg注射にて卵巣に萎縮性変化がみられ

第25図　薄層クロマトグラフイー展開



たほか．30mg注射では肝・脾のうつ血，腎のネフローゼ様変化と副腎に髄質腫大等かなり著明な変化がみられたが，10mg皮下注射では諸臓器に著変は認められなかつた。

(3) 大量の Lithospermum 水性エキスは，Chinon 体と同様に in vitro にて Gonadotropin を不活化し，Gonadotropin と同時注射の場合 in vivo にても不活化するが，これはエキス中に含まれる Chinon 体の直接作用によるものと考えられる。

(4) Lithospermum 水性エキスは，皮下，腹腔内，または経口的連続投与により，一般状態を損うことなく雌マウスの受孕率を低下せしめるが，3週間の休養後には，無処置マウスに近い受孕率を示すようになり，その変化は或る程度可逆的である。

(5) Lithospermum の性周期抑制乃至抗受孕作用に関与する有効成分の化学的性質を追究するため，Lithospermum 水性エキスを溶解度により分析し且つ有機溶媒による抽出と薄層クロマトグラフイーを試みた結果，その有効成分は Pyridin にて抽出される Phenol 性水酸基をもつ有機物と考えられる。

(6) しかも本物質には in vitro の Gonadotropin 不活化作用は認められず，一部の家兎に銅塩排卵の抑制を認めた。従つてこの点からも，Lithospermum の抗受孕作用は Gonadotropin に対する直接作用が主因であるとは考え難い。

第4節　総括並びに考按

先ず Lithospermum 水性エキス及びこれから抽出した Chinon 体の毒性についてみると，Lithospermum 水性エキスの毒性については，猿橋 (1960) はカエル及びマウスに対する毒性は非常に少く，致死量は500mg/10g以上と推定され，大量投与時の中毒症状は麻痺状態が主であるが，ウサギの利尿に対しては50mg/kg の静脈注射で尿排出量の低下がみられると述べている。著者の実験でも，マウスに Lithosdermum 水性エキスを3週間投与しても，皮下泳射では1回20mg，腹腔内注射では10mg，経口投与では30mgまでは一般状態への影響は殆んどみられない。また諸臓器の組織学的検索でも，10mg皮下注射群では著変は認められず，20～30mg注射群の卵巣には萎縮性変化が認められた。Chinon 体投与マウスでは，5mg皮下注射群にては肝・腎に軽度のうつ血を認めた以外に著しい病変は認められなかつた。

さて Lithospermum 浸出液にマウスの性周期を抑制する作用のあることは Drasher ら (1946) が初めて実験し，猿橋 (1960) は，ラッテに50mg/100gを皮下注射し明らかな発情期の抑制を認めたが，去勢雌ラッテに Estradiol を注射してあらわれる発情期は抑制されなかつたと述べている。しかし Lithospermum の有効成分は未だ不明であり，従つて性周期を抑制する作用機序も明らかにされていない。1946年 Drasher らは，Lithospermum をマウスに経口投与することにより性周期が持続的に静止期になる理由として，実験期間中マウス体重に減少がみられないこと及び Lithospermum 抽出液にステロイド作用を認めないところから，下垂体抑制作用によるのであろうと報じ，1949年 Cranston らは，下垂体摘除未熟マウスを用い，Lithospermum を20%含む食餌で1週間飼育したマウスの下垂体抽出液を注射した群，Lithospermum を含まない食餌で飼育したマウスの下垂体抽出液を注射した群及び非注射群の3群に分けて比較したところ，第2群では子宮及び膣が第1群より79%，第3群より95%大きいことを認めた。Drasher (1950) は FSH を正常に保ちながら，特異的に LH の分泌を抑制するとし，投与を中止すると3～5日で早期排卵を起すと述べ，Cranston (1950) は，下垂体に不可逆性の変化や組織学的損傷を与えることなく，なんらかの方法で Gonadotropin の産生を抑制すると述べている。田原 (1956) も，性上位部に直接作用して機能的に Gonadotropin 殊に LH の産生を抑制するものであろうとし，フマール酸に密接な関係がある

と考えている。

以上は中枢作用説であるが，これに対し末梢作用説を称えるものもある。1948年 Zahl は，Lithospermum 食餌で飼育したマウスの組織学的検討によつて，その作用は下垂体に対するものではなく末梢に働くと述べた。1954年 Noble らは，Lithospermum に in vitro で種々の Gonadotropin を不活化する水溶性物質が含まれることを認め，福沢 (1958) は Lithospermum 抽出エキスを無水アルコール及び硫酸で処理して生じた析出物から，エーテル抽出並びに昇華法で Gonadotropin を in vitro に不活化する粗結晶を得，更にこれから A，B2種の物質を分離，A の主成分はフマール酸，Bは無水コハク酸であることを認めたが，不活化作用はフマール酸或はコハク酸以外のAに微量に含まれる Chinon 体と関係ある物質であろうと述べ，伊藤 (1959) は Lithospermum から抽出した Chinon 体に in vitro で Gonadotropin を不活化する作用のあることを確認した。本物質には性周期に対する影響は証明されなかつたが，Rosen ら (1955) は in vitro に Gonadotropin を不活化する 2, 6-dimethyl-hydroquinone 及び Hydroquinone の1日10㎎投与によつてラツテ性周期は抑制されるとし，継続投与によりその作用は減退すると述べている。その後西独 Münster 大学の Kemper & Loeser (1958) は，4000疋の動物を使用しての大規模な実験を行い，Lithospermum 水性エキスを Gonadotropin と混じて incubate し，それを未熟ラツテとモルモットに投与して検討した結果，この物質の有効成分は Gonadotropin，甲状腺刺激ホルモン等を下垂体前葉からの分泌後に不活性化すると思われる所見を得てこれを強調した。最近 Wernze (1962) はこの説に呼応し，実験的突眼反応を応用した EPS 試験にても Lithospermum 凍結乾燥エキスに抗 Thyreotropin 作用のあることを証明できると発表している。

このような末梢作用説に対して，岩崎 (1957) は Lithospermum 粗エキスを Gonadotropin と混合 incubate してガマに注射すると排精は起らないが，粗エキスと Gonadotropin とを時間を経て別々に注射すれば排精が起ることを認め，生体内における作用機序として in vitro の Gonadotropin 不活化作用をそのまま当てはめるわけにはいかないとし，前記福沢 (1958) も同様の意見を述べている。

著者が企てた本研究の主目的も，Lithospermum の性周期乃至受孕抑制作用にその直接的抗 Gonadotropin 作用が主な原因をなすものか否かを解明せんとすることにあるので，以下その成績をべつ見しつつ考察を加えてみたい。

先ず Lithospermum の in vitro における不活化有効物質が，伊藤 (1959) のいうように抽出 Chinon 体にあることを確認した。溶解度により分析すると，高分子アミン・アミノアントラキノン及び酸・フエノール類に属するもののようである。抽出 Chinon 体は in vitro で強力な Gonadotropin 不活化作用を示すが，動物に Gonadotropin と同時注射した場合，Friedmam 反応または幼若マウス子宮重量法から，in vivo でも或る程度外界から投与された Gonadotropin を不活化すると考えられる。Chymotrypsin にも，作用機序は Chinon 体とは異るが，やはり in vitro で Gonadotropin を不活化する作用があり，Chinon 体と同様に in vivo にても或る程度の Gonadotropin 不活化作用が認められる。即ち in vitro の抗 Gonadotropin 作用物質の生体内作用は否定し得ないが，ラツテに Chinon 体または Chymotrypsis を投与しても性周期に対する影響は殆んどみられず，Chymotrypsin 投与マウスの受孕率を検しても対照マウスのそれと有意差は認められない。このことは，性周期乃至受孕抑制作用が Gonadotropin への直接作用のみによるものではないことを示唆するものである。一方 Lithospermum 水性エキスは，前二者より in vitro の Gonadotropin 不活化作用は弱いにもかかわらず，皮下，腹腔内または経口的連続投与により，一般状態を損うことなく雌マウスの受孕率を低下せしめる。しかもこの低下は可逆的である。そこで著者は，Lithospermum の性周期抑制乃至抗受孕作用に関与する有効成分の化学的性質を追究した結果，その有効成分は Pyridin にて抽出される Phenol 性水酸基をもつ有機化合物であると想像される。しかも本物質はラツテ性周期を抑制するばかりでなく，一部家兎に銅塩排卵に対する抑制作用を認め，従来の実験方法にて in vitro では Gonadotropin を不活化しないことを確め得た。即ち，Lithospermum の所謂抗受孕作用には，先きに福沢・伊藤により抽出された Chinon 体の如き in vitro の Gonadotropin 不活化物質が主因となるものではないと断定せざるを得ない。そしてその作用機序は向中枢性と想像されるが，作用機序の決定は今後の研究に俟ちたい。

結　論

(1) Lithospermum から抽出した Chinon 体を，マウスに3週間1回5㎎皮下注射しても諸臓器に著しい病変はみられないが，1回10㎎の皮下または腹腔内注射では毒性が認められた。

(2) 抽出 Chinon 体は in vitro で強力な Gonadotropin 不活化作用のあることを確認したが，in vivo でも或る程度 Gonadotropin 不活化作用を示す。しかし，Chinon 体にはラツテ性周期に対する抑制効果は認められない。なお使用 Chinon 体の高分子アミン・アミノアントラキノン及び酸・フエノール類分劃に抗 Gonadotropin 作用を認めた。

(3) Chymotrypsin も，その Enzym 作用により in vitro で Gonadotropin を不活化し，in vivo でも同時投与 Gonadotropin を或る程度不活化する。しかし Chymotrypsin にはマウス受孕及びラツテ性周期に対する影響は認められない。

(4) Lithospermum 水性エキスをマウスに3週間投与するに，皮下注射では1回20mg，腹腔内注射では10mg，経口投与では30mgまでは一般状態に殆んど影響なく，皮下注射群における諸臓器の組織学的検索から，1回10mg投与では各臓器に著変は認められないが，30mg投与群には諸種の病的変化を認めた。なお20～30mg投与群にて卵巣に萎縮性変化がみられた。

(5) Lithospermum 水性エキスは in vitro で Gonadotropin を不活化するが，これはその中に含まれる Chinon 体によるものと考えられ，また本エキスは，皮下，腹腔内または経口的連続投与により一般状態を損うことなくマウスの受孕率を低下せしめる。その受孕率の低下は可逆的である。

(6) 性周期抑制乃至抗受孕作用に関与する Lithospermum 水性エキス中の有効成分は，Pyridin にて抽出される Phenol 性水酸基をもつ有機物と考えられるが，本物質には in vitro の Gonadotropin 不活化作用はなく，家兎銅塩排卵を抑制する。以上の成績から，Lithospermum の抗受孕作用は Gonadotropin に対する直接作用が主因ではなく，むしろ向中枢作用によると考えるべきである。

猶，本論文の要旨は第30回日本産婦人科学会関東聯合地方部会に於いて発表した。

稿を終るに臨み御指導御校閲を賜つた恩師岩井正二教授に感謝し，また絶えず御指導御鞭撻を賜つた石井次男講師に深甚なる謝意を表します。又実験に際し種々御指導御便宜を賜つた本学生化学教室藤村教授，桜井助教授，須沢学士並びに組織学的所見につき御指導を頂いた塩沢博士に対し衷心より感謝の意を表します。

文　献

①Berkow, S. G., Rosenfeld, P. A. & Berkow, L. H.; Obst. & Gyn., 20: 324, 1962. ②Bourrillon, R., Got, R. & Narcy, R.; Acta Endocrinol. 31: 553, 1959. ③Cranston, E. M.; J. Pharnacol. & Exp. Therap. 83: 130, 1945. ④Cranston, E. M., Kucera, C. R. & Bettner, J. J.; Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 75: 779, 1950. ⑤Cranston, E. M. & Robinson, G. A.; Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 70: 66, 1949. ⑥Drasher, M. L.; Endocrinol. 47: 339, 1950. ⑦Drasher, M. L. & Zahl, P. A.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 63: 66, 1946. ⑧福沢芳章：日産婦誌 10: 1183, 1958 ⑨Graham, R. C. B. & Nable, R. L.; Endocrinol. 56: 239, 1955. ⑩石井次男，福沢芳章：日不妊誌 2: 4, 1957 ⑪伊藤寛治：信州医誌 8: 2284, 1959 ⑫岩井正二，石井次男：産と婦 22: 473, 1955 ⑬岩崎寛和：日内分泌会誌 33: 232, 1957 ⑭Kemper, F. & Loeser, A.; Acta Endocrinol. 29: 525, 1958. ⑮Loeser, A & Mikulicz, K.; Klin. Wschr. 33: 1017, 1955. ⑯松本清一：産婦治療 6: 284, 1963. ⑰三浦良治：信州医誌 8: 2305, 1959. ⑱Noble, R. L, E. R. Plunkett & Graham, R. C. B.; Endocrinol. 10: 212, 1954. ⑲Plunkett, E. R., R. V. Colpitts & Noble, R. L.; Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 73: 311, 1950. ⑳Rosen, F. & Millman, N.; Endocrinol. 57: 466, 1955. ㉑猿橋泰：信州医誌 9: 230, 1960. ㉒Wernze, H.; Klin. Wschr. 40: 262, 1962. ㉓Zahl, P. A.; Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 67: 405, 1948.