

鶏胚における黄体ホルモンの催心奇形性に関する研究

東京女子医科大学産科婦人科学教室（主任：大内広子教授）

大学院生 三 輪 治 子

The Teratogenic Effect of Progesterone on the Cardiovascular System of Chick Embryo

Haruko MIWA

Department of Obstetrics and gynecology Tokyo Women's Medical College, Tokyo

(Director: Prof. Hiroko Oouchi)

概要 鶏胚発生初期 (Somite 12—18, 32—40h 頃) に有窓法により黄体ホルモンを注入し、心奇形の発生頻度につき対照群と比較検討した。

実験方法は、受精卵について卵白のアルブミンを一定量（注入量と同量）除去し、その卵白欠損部に薬物を注入し、Incubator に保存し、10日目まで発育した卵につき、心奇形の有無を実体顕微鏡下に検索した。

使用薬剤は、持続性黄体ホルモン 1 ml 中にカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン 125mg とプロゲステロン 20mg との混合したもので、その 0.1—0.02ml すなわち 14.5mg より 2.9mg と注入量を変えて観察した。

対照群は、無処置群、アルブミン除去群、生食水注入群、卵胞ホルモン注入群、および黄体ホルモンの溶媒である油剤注入群などである。

実験成績は、黄体ホルモン 0.1ml (14.5mg) 注入群では50%、0.05ml (7.3mg) 注入群では20%、0.025ml (3.6mg) 注入群では21%、0.02ml (2.9mg) 注入群では23%に心奇形の発生をみた。これら心奇形の種類は、心室中隔欠損が13例中7例 (54%) を占め、心房中隔欠損と大血管転位が2例ずつであり、その他2例は両大血管右室起始と共に心室中隔欠損をともなっていた。

対照群では、無処置群、アルブミン除去群、生食水注入群、卵胞ホルモン注入群では心奇形の発生はみとめられていないが、油剤注入群で観察できた9例中1例に心室中隔欠損をみとめた。死亡例を除いた観察例と心奇形との関係については、黄体ホルモン注入群と対照群とでの心奇形発生率は危険率1%以下で有意差がみとめられている。

以上の事実より、その機序については今後の研究にまたねばならないが、黄体ホルモンが催奇性、特に心奇形の発生に関与することは推察できる。

Synopsis The effects of the progesterone on the development of cardiovascular system in chick embryo were studied.

32—40 hours after incubation (estimate age between 12 to 18 somites) the white leghorn eggs were injected with progesterone 0.1 to 0.02 ml (14.5 to 2.9 mg) in the albumin and then they were returned to incubator. The only surviving embryo were dissected and examined when they were more than 10 days old.

In experimental group; 20 to 50% had cardiovascular malformation: ventricular septal defect 7 (53%), double outlet right ventricle 2, atrial septal defect 2, anomalies of great vessels with ventricular septal defect 2.

The incidence of cardiovascular malformations in this experimental group is significantly higher than those in the control group.

緒 言

先天性心疾患の発生はいわゆる奇形発生の原理と同じ過程において成立すると考えられるが、その一部の単一遺伝子病に伴う家族内発症例や、染色体異常に伴う先天性心疾患の成因は解明されて

いるものの、その他は、原因論として遺伝と環境の両要因が関与する、Multifactorial inheritance with threshold character にもとづくものが大多数を占めていると言われている。

さて、産科領域において、避妊、流早産予防の

目的などで、黄体ホルモンを使用する機会が多く、この黄体ホルモンは心大血管系における催奇性が予想され、また報告されている (Edith et al. 1973, Nora et al. 1973). しかし、高尾ら (1973) の報告によれば、流産防止剤が心奇形性に対する易罹病性のしきいに対し、有意に作用しているとは言えないとの事である。実験的催心奇形性の報告はまだ著者らの調査でも見当らず、その決定的な結論には至っていないが、人において黄体ホルモンの催心奇形性を論証するについて、動物実験の立場からは、代表的哺乳動物であるラット、マウス、兎あるいは霊長類 (猿) の使用がより望ましいと思われるが、形態形成初期心の診断と操作の簡便さから、哺乳動物実験に対する前段階として鶏胚を用い有窓法により実験を行ない、黄体ホルモンの催心奇形性につき立証できたので報告する。

実験目的

鶏胚発生初期 (Somite 12—18, 32—40h 頃) に有窓法により黄体ホルモンを注入し、心奇形の発生頻度につき対照群と比較検討した。

実験方法

受精後3日以内で、10℃以下にて保存された白色レグホン卵を千葉県の新所 (岩井市中里) から求め、入手後直ちに Incubator (38℃) で孵卵を開始した。

鶏胚心の一对の原基が完全に融合し、Straight tube から右心の心 Loop を形成する時期に相当する、孵卵後32—40時間頃に受精卵か否かをCandle法により明かりに透過して確認し、実験に供した。

これら受精卵について、卵白の部分から一定量 (注入量と同量) のアルブミンを除去しその欠損部内に薬物を注入した。ついで、薬物注入群と対照群とを共に Incubator (38℃) に保存し、その後10日間は毎日 Candle 法により鶏胚の生存を確認し、10日目まで発育せる卵につき心奇形の発生の有無を検討した。すなわち、10日目に実体顕微鏡下で胸部切開を行ない、心臓を切開し、心尖部を露出し、Micropipet を用い拍動している心臓に

2.5% グルタル液を注入し、心腔を拡張固定し検索した。

使用薬剤は持続性黄体ホルモン 1 ml 中にカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン 125mg と、プロゲステロン 20mg との混合したもので、その 0.1—0.02ml, すなわち、14.5mg より 2.9mg と注入量を変えて観察した。

対照群は、無処置群、アルブミン除去群、生食水注入群、卵胞ホルモン (Estril) 注入群および黄体ホルモンの溶媒として用いられるゴマ油注入群などである。

実験成績

黄体ホルモン注入群 (表1) は濃度を一定とし注入量を変化し、0.1—0.02ml について観察した。

表1 黄体ホルモン投与時の心奇形発生数

黄体ホルモン濃度	例数	観察数/死亡数	心奇形発生数
14.5 mg/ml	12	4/8	2
7.3	18	5/13	1
3.6	50	33/17	7
2.9	24	13/11	3
計	104	55/49	13

黄体ホルモン 0.1ml (14.5mg) 注入群では12例中8例が死亡し、生存し観察できた4例中2例 (50%) に心奇形が発生した。0.05ml (7.3mg) 注入群では18例中13例が死亡し、生存し観察できた5例中1例 (20%) に心奇形が発生した。更に注入量を減少し、0.025ml (3.6mg) 注入群では50例中17例が死亡し、観察できた33例中7例 (21%) に心奇形が発生している。また、0.02ml (2.9mg) 注入群でも24例中11例が死亡し、観察できた13例中3例 (23%) に心奇形が発生した。

対照群 (表2) では、無処置群とは何ら処置せず注入群と共に孵卵を行なつたものであるが、死亡例もなく、心奇形も認められていない。アルブミン 0.025ml 除去のみを行なつた群では、27例中10例死亡しているが、観察した17例では心奇形の発生はみえていない。アルブミン 0.025ml 除去し、つ

表2 対照群の心奇形発生数

	例 数	観察数/死亡数	心奇形発生数
無処置群	20	20/ 0	0
アルブミン除去群 (0.025ml)	27	17/10	0
生食水注入群 (0.025ml)	16	12/ 4	0
エストリール注入群 (0.025ml)	20	17/ 3	0
油剤注入群 (0.02—0.03ml)	18	9/ 9	1

いで、生食水 0.025ml 注入した群では16例中4例死亡し、観察できた12例では心奇形は認めなかった。卵胞ホルモン (Estril) 0.025ml (0.25 mg) 注入群20例では、3例が死亡したが観察できた17例では心奇形をみとめていない。黄体ホルモンの溶媒の基剤であると考えられるゴマ油を0.02—0.03ml 注入し検索した群では18例中9例が死亡しており、観察できた9例中1例に心室中隔欠損を認めている。

観察例における黄体ホルモン注入群と、対照群とでの心奇形発生率は、危険率1%以下で有意差が認められた。

なお、心奇形の種類は (表3), 心室中隔欠損が

表3 心奇形の種類

黄体ホルモン 注 入 群	心奇形/ 観察数	心奇形の種類			
		心房中 隔欠損	心室中 隔欠損	大血管 転位	その他
14.5 mg/ml	2/ 4		1		1
7.3	1/ 5			1	
3.6	7/33	2	3	1	1
2.9	3/13		3		
油剤注入群	1/ 9		1		
計	14/64	2	8	2	2

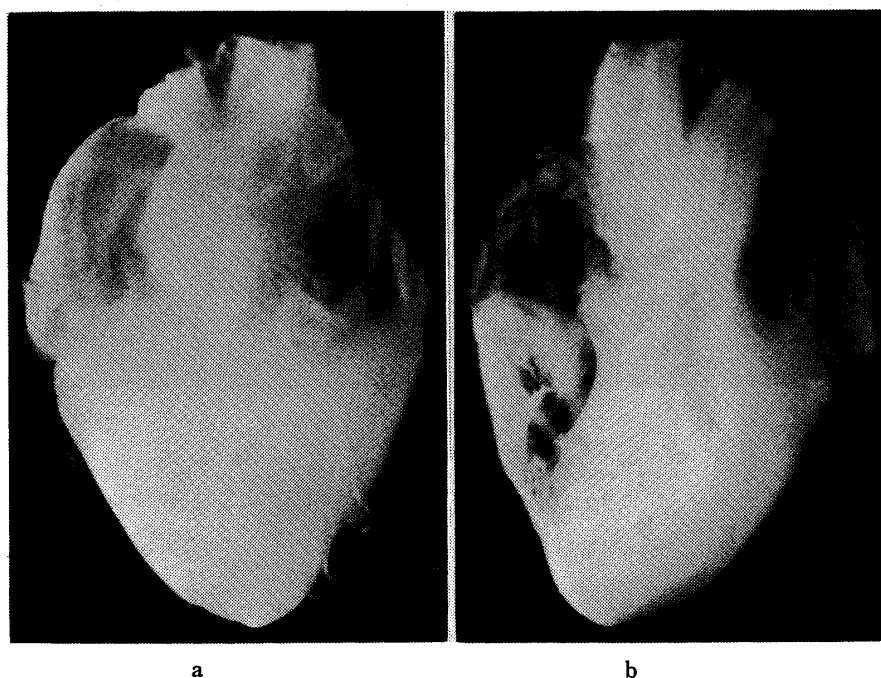
多く、13例中7例 (54%) を占め、心房中隔欠損と大血管転位は2例ずつであり、その他は、両大血管右室起始で共に心室中隔欠損を伴っていた。

図1 a.b は正常心であり、図2 a.b は黄体ホルモン 3.6mg 注入により発生した心室中隔欠損例であり、図3 a.b は黄体ホルモン 3.6mg 注入により発生した心房中隔欠損例である。

考 案

動物の先天性心・大血管異常については、Detweiler (1964) によれば、1,000に対しての異常発現をみると Wistar 系ラットでは21あるいはそれ以下、豚の屠殺年齢の時期では20—40、生後2週以前に死亡したか、あるいは屠殺された仔豚では12、約18—50mm 体長期の豚胎仔では2、犬で

写真1 正常心



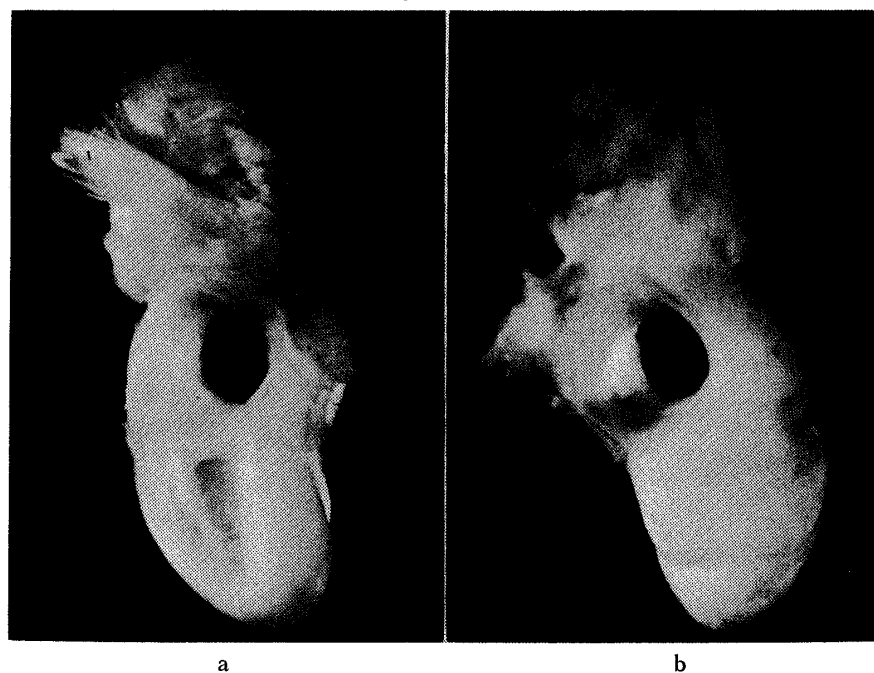
a

b

写真2 黄体ホルモン 3.6mg 注入により発生した心室中隔欠損例



写真3 黄体ホルモン 3.6mg 注入により発生した心房中隔欠損例



は5—6.8などと記載されている。すなわち、種によつて、あるいは同一種でも観察された時期の年齢差によつて発現頻度には差異がみられており、また、心奇形の型もその種によりその頻度が異なるようである。

そして、ラットやマウスを用いて心・大血管系の異常を作成した実験は Vit. A 欠乏, Azo dyes, Hypoxia, X-ray 照射などの実験があり、薬剤の影響については、Trypanblue, Thalidomide, Actinomycin D, 家兎の抗腎血清などによる報告があ

る。これらの実験では、心奇形発生率は20—40%である。

さて、本実験で使用した鶏胚の正常心形態発生についてみると、鶏胚が孵化までに要する時日はほぼ21日と定まっており、そのうち前半の10日間に鶏胚心は形態発生上著明な変化を示すのである。鶏胚の発生段階は主として Hamilton & Hambarger (1952) により分類され、孵化までの過程が46段階になつている。鶏胚心の形成が始まるのはIV Somite (Stage 8) 頃であり、心の形成が終了するのは Stage 34 (8日目) と言われている。そして、Goff (1959) によれば鶏での心奇形は2,449例で0.680%であり、Marshall (1951) は18—20日孵卵して死亡した400例で121例(32%)に心血管系の1—2の奇形をみとめている。また、交配実験で、Siller (1958) は褐色レグホン卵の心室中隔欠損の発生頻度につき、近交系の6系統で観察し、系統によつて差のある各組合せの交叉交配実験を行ない、その発生頻度は減少したと述べている。著者の使用した白色レグホン卵はいわゆる新種であつて、石川 (1975) の実験と同じ施設からのもので、石川は8%に発生したそうであるが、本実験の対照群では心奇形の発生をみとめていない。

孵卵温度による影響について Romanoff (1935) は274例を33.5—40.5℃に4—21日間孵卵した結果では、212に奇形がみられ、心奇形は10.8%であつたとし低温の影響を述べているが、De la Cruz (1966) は Newcastle 病および Fowl pox で免疫された白色レグホン卵で実験を行い、高温で孵卵(39.4℃)した場合の心異常発生率は2.8%(対照3.8%)で特に変化をみとめていないが、低温(35.8℃)での場合には35%の高率で心異常がみられ、それらは主に心室中隔欠損で、その原因を心の発育遅延としている。本実験では孵卵温度38℃であり、温度による影響は考えられない。

酸素欠乏による異常発生の実験研究は、すでに古くからフランスで鶏胚を用いて行なわれているが、Becher (1939) は鶏胚の低圧処理によつて中枢神経系および心原基の異常をみている。Rübsa-

amen (1952) は孵化の第1日および第2日に酸素欠乏状態をおこさせ、前者では無脳症、脊椎裂および心脱出などを、後者では四肢奇形および心室中隔欠損などの形成をみとめている。さらに Shel-long (1954) は白色レグホン卵の24, 36, 48, 60および70時間孵化の最初の5時間を各々3—4%の低酸素状態に呈し実験を行なつているが、検索された164体のうち24体に心・大血管異常を認め、それらは、大動脈と鰓弓動脈系異常が15例で、そのうち6例には心室中隔欠損との合併があり、心房および心室中隔欠損は15例にみとめられた。大動脈弓の異常では上膊動脈および鎖骨下動脈の異常、左肺動脈および動脈管欠損、肺動脈幹欠損、右背側大動脈の発育不全 Coarctation などで、心の異常は心室中隔欠損が主で、これには2つの型がみられている。48時間以前の処置群では、左第IV大動脈弓残存がみられたのに反し、それ以後の時期での処置群にはこの異常は全くみられていない。36時間の処置群では動脈の異常、60時間の処置群では心室中隔欠損がそれぞれ多くみられたことから、処理の時期によつて発現する異常の型が異なつていたと述べている。Grabowski (1958) は白色レグホン卵孵化の18時間—9日目に各群とも6時間減酸素で処理し、954体を検索したが、129体に各臓器異常がみられ、大血管異常は7体、心異常は4体であつたという。本実験では Hypoxia の状態にはおいていない。

また、X線照射は多くの報告があり、高率に心奇形(77%)の発生をみているが、本実験とは関係がないので省略する。

次に心奇形を作成する実験方法について考察すると、著者の行なつた有窓法により鶏胚の心・大血管の血流を器械的に変化させる方法がある。Stephan (1952) は鶏胚に用い、微細な針金で大動脈弓を結紮することによつて、Rychter (1962) は孵卵第4日目の鶏胚動脈弓の第II, IV, VI対および心臓管などを小さな Metal clip により結紮することにより、Gessner (1966) は白色レグホン卵(19—20 Stage)を用いて細い勾配をつけた針金を心臓管の球幹部に挿入、右前方に挙上すると

いう方法で, Harh et al. (1973) は Nylon 糸を左房および左室に挿入することによつて, 心奇形の作成に成功している. 他方 Dehann et al. (1959) は鶏胚の1—3体節期に前腸間の組織を中央線で切断すると左右別個に心臓 (Cardia bifida) が形成され, かつ, それぞれ搏動がみられたと記載している. この一連の実験は器械的操作により血流の方向を変化させれば心奇形の発生するということを立証したものである. また, これらと目的は同じであるが, 有窓法をおこなわず外的因子の遠心力負荷による石川 (1975) の実験がある. すなわち, 鶏胚発生初期 (Somite 12—18, 32—40h 頃, 心は右側に Loop を形成する) に鶏胚心に回転数1分間78にし時計方向に回転させたところ, 37例が孵化後10日目まで生存し, そのうち20例 (42%) に心奇形の発生をみている. この実験は, 鶏胚自体に直接操作を加えず, 外的因子のみで心奇形発生をみた臨床的にちかい実験である.

つぎに薬剤による催心奇性について考察する. まず, 注入する物質の影響であるが, 生食水の影響は Clegg (1964) によれば0.05ml では死亡は0であるが, 0.10ml では5%, 0.15ml では20%, 0.2ml では25%が死亡するといひ, 生食水でも0.05ml が限度という. 黄体ホルモンなどは油剤を溶媒としているが, 油剤の影響は, Smith (1970) は Corn oil 0.05ml で13.8%, 0.1ml で72.2%の死亡率であるといひ, Newcomer et al. (1952) は Meneral oil 0.05ml で10%の死亡率であるとし, Lakshmi (1967) は Sesam oil (これは本実験での黄体ホルモンの溶媒の一種であるが) 0.05ml 注入例で孵化4日目で3%, 8日目, 12日目で24%の死亡をみたという. 本実験での対照群をみると, まず, 卵白を除去しているが, このアルブミン除去のみでも死亡例が出ており, これらの操作は確かに鶏胚に物理的に影響し, 発育を阻止するのかも知れない. また, 本実験の対照群での注入量は0.02~0.03ml であるが, 油剤注入群では死亡例が多くなつている. そこで, さきの実験と同じく, 油剤それ自体, 鶏胚の発育を阻止する作用があると思われるし, また, 1例心奇

形の発生をみている. そこで注入量について考えてみると, 0.05—0.1ml 注入群では高率に25—37%が死亡している事は先人の実験の成績と合致するものであらう.

Karnofsky et al. (1946) は, 鶏胚に色々な PGA-Antagonist (PGA pteroylglutamic acid), Folic acid を投与し, 血管の異常を作成している. また, 奇形について有名な Thalidomide による兎, ラッテを用いての実験があるが, Thalidomide の鶏胚での実験は Stanzhewskaya (1966) によれば卵黄内に注入し, 20—30%に奇形をみ, 15—22%は下肢の奇形であつたという. Trypan blue の鶏胚での実験は Stephan (1961) は鶏胚に蒸溜水ないしは生食水で溶解した0.01—0.05mg の Trypan blue で処置を行ない, 大動脈分岐異常をみとめている. この原因については, Beck et al. (1967) によれば, 母体からの栄養が Trypan blue 処置によつて細胞内の消化機能障害を惹起し, Visceral yolk sac の Lysosomal enzyme 活性を抑制することによつて催奇性効果を表わすと考えられている.

その他の薬剤注入実験では Ruch et al. (1962) は, 鶏胚の孵卵第1—3日目に Been venom を1/5—2/5 ml を29例に注射し, 17例に心・大血管異常をみとめている. Licata et al. (1962) は新生児鶏の心筋から作つた抗心血清を72時間孵卵した鶏卵に0.05ml を1回胎芽外体腔経由で注射して, 胸腰椎屈曲と合併した心脱出40%, 心房拡張を合併した心発育不全, 心室中隔欠損, および, 1例の部分的な大血管転位をみとめている. De la Cruz et al. (1963) は尿膜水で白色レグホン卵61体を処理して心異常を30体 (49.2%) にみており, Ruch et al. (1965) は Cyclophosphamide 0.1mg を卵白内に注入して奇形43%, 死亡30%と報告し, その心奇形では Cardiac malposition 48%, Arterial intervention 48%, Cardiac malformation 15%, Fulboventricular communication 7%であつたという. Menkes et al. (1967) は Jannus green を1 μ g 注入して奇形を7—70%に作成している. 以上のごとく, 薬剤による奇形の

発生は案外頻度が高い。

ヒトでの奇形に関する報告をふり返つてみると、先天性大血管異常形成に遺伝因子の関与があることを示唆する症例が多くみられ、放射線照射、感染、栄養の欠乏、薬剤あるいは化学物質などの投与によつて体細胞の染色体異常がおこると言う、ヒトおよび動物実験に関する報告が数多くみられているようになってきた。

本実験での、黄体ホルモンが染色体に如何に影響するかは今後の研究課題と考える。

次に内分泌の胎芽・胎児に対する影響について考察すると、内分泌に関する実験は数多く行なわれているが、これら一連の実験では、心・大血管異常の記載はほとんど行なわれていないようである。

Clavert et al. (1965) は妊娠兎第11—14日目に0.4, 1.0, 2.0および4 mg の Cortisol をそれぞれ注射して胎仔の41%に心・大血管の異常、すなわち、球動脈中隔欠損、室間孔残存などをみとめている。次に鶏胚での実験では、Estradiol について Lakshmi (1967) は投与後10日目の観察で奇形を死亡例で84.1%, 生存例では15.9%にみとめ、そして、0.05—0.4mg/0.05ml oil/egg を卵黄嚢内に注入し、20%に奇形をみとめているが、心奇形はなかつたとのことである。Pitrowski (1966) は1—5 mg in olive oil を注入したが奇形がなかつたと言ひ、Asayama (1965) は500 μ g/25mg/aquoes solution 1ml/egg 注入例で奇形をみとめていない。Pitrowski (1966) も10—500 μ g/olive oil 0.03—0.05mg 注入したが心奇形をみとめていない。

Follicle stimulating hormon について、Sherbet et al. (1968) は0.005ml of antiserum in 0.2ml saline explanted embryo において、奇形は46%にみられ、死亡率4—98%であり、発育停止は16%であつたと言う。本実験での Estradiol 投与の対照群では心奇形はみとめられなかつた。

Progesterone については、Pitrowski (1966) は10—1,000 μ g/0.03—0.05ml oliveoil/egg を2 $\frac{1}{6}$ 日に注入し、21日目に観察したが、死亡10—94%

であり、奇形は2—16%で主に肢の奇形で心奇形はみとめていない。

Teststerone については Warner et al. (1961) は1—2 mg/egg を注入したが奇形はみられず、Lakshmi (1967) は0.015—0.4mg/0.05ml of sea-sam oil/egg を注入したところ死亡33—51%であり奇形はみられていない。Nakamura (1967) は640—1,200mg/egg を注入したところ、脳神経、下肢などの奇形をみとめたというが、心奇形はみられていない。

以上のごとく、ホルモンの影響は従来奇形に関与するであろうかと考えているが、特に性ホルモンに関してはその報告は少なく、また、心奇形の発生頻度も低率である。そしてこれらの実験をみると、注入量は0.05ml であるが、著者の実験でも0.05ml 注入では生食水でも死亡例がみられているのであり、これらは注入量がやや多すぎたと思う。

本実験においては、確かに Progesterone 0.05 ml では死亡率が高く、観察例においては心奇形の発生率は50%であるが、最も観察例の多い0.025ml 注入群においても心奇形が20%以上に発生しており、この事実は黄体ホルモンが心奇形をおこす可能性を示唆しているものと思われる。

最後に薬物注入時期であるが、著者は心形成の始まる時期、すなわち、孵卵開始32—42時間を選び薬物を注入し、心が完成された時期(10日目)に検索を行なつたのであるが、この薬剤注入時期および検索時期はすでに述べた他者の実験においておもほぼ同じ時期であつた。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜わつた恩師大内広子教授、心研小児科高尾篤良教授に深甚なる謝意を表す。なお、本論文の第1報は第20回日本不妊学会総会に於て発表した。

文 献

- 石川自然 (1975) : 東女医会誌, 45, 258.
- 岡本直正 (1969) : 先天異常, 9, 45, 117.
- 高尾篤良 (1976) : 流産防止剤研究班報告書, 33.
- Asayama, S. (1965): J. Biol. Osaka Univ., 16, 59.
- Beck, F., Llyod, J.B. and Griffiths, A. (1967): Science, 157, 1180.
- Clavert, J., Buck, P., Rumpler, Y. and Ruch, J.V.

- (1965): *Therapie.*, 20, 1579.
- Clegg, K.J.* (1964): *Food Cosmet Toxicol.*, 2, 712.
- Dehann, R.L. and Carter, D.* (1959): *Anat Res.*, 134, 551.
- De la Cruz, M.V., Campillo-Sainz, C., Munoz-Armas, S., Pascual-Chavez, A. and Samudio-Bandera, R.* (1963): *Cir Res.*, 13, 572.
- De la Cruz, M.V., Sainz, C.C. and Armas, S.M.* (1966): *Cir. Res.*, 18, 257.
- Detweiler, D.K.* (1964): *Circulation*, 30, 114.
- Edith, P.L., Cohen, A. and Fraser, F.C.* (1973): *Lancet*, 1, 611.
- Gessner, I.H.* (1966): *Cir. Res.*, 28, 625.
- Grabowski, C.T. and Paar, J.A.* (1958): *Am. J. Anat.*, 103, 313.
- Hamilton, H.L.* (1952): *Lillie's Development of the chick*. 3ed. 71, Henry Holt & Co. New York.
- Harh, J.Y., Paul, M.H., Gallen, W.J., Friedberg, D.Z. and Kaplan, S.* (1973): *Am. J. Cardio.*, 31, 51.
- Licata, R.H., Lev, M. and Brown, E.R.* (1962): *Quart Bull. Northwest Univ. Med. Sch.*, 36, 107.
- Menkes, B.A., Pavkov, A. and Mircov, O.* (1967): *Rev. Roum Embryo. Cytol.*, 4, 35.
- Nakamura, T.* (1967): *Hiroshima Daigaku Sui-chikusan Kiyo'*, 7, 25.
- Newcomer, V.D., Writht, E.T. and Tamblin, E.E.* (1952): *J. Lab. Clin. Med.*, 39, 303.
- Nora, J.J.* (1968): *Circulation*, 38, 604.
- Nora, J.J. and Nora, A.H.* (1973): *Lancet*, 1, 942.
- Romanoff, A.* (1972): *Pathogenesis of the avian embryo*. 1st Ed. 34, 67, 105, 320, 321, 388: John Wiley & Sons Inc. New York.
- Romanoff, A.* (1960): *The Avian Embryo*. 1st Ed. 681, The Mac Millan Co. New York.
- Rubsamen, H.* (1952): *Beitr. Pathol.*, 112, 336.
- Ruch, J.V., Kremer, O.G.R., Rumpfer, Y. and Gerlinger, P.* (1965): *Therapie*, 20, 1585.
- Rychter, Z.* (1962): *Adv. Morph.*, 2, 333.
- Schellong, G.* (1954): *Beitr. Path. Anat.*, 114, 212.
- Sherbet, G.V. and Lakshmi, M.S.* (1968): *Nature*, 217, 1257.
- Siller, W.G.* (1958): *J. Pathol.*, 76, 431.
- Smith, S.I., Weber, C.W. and Reid, B.L.* (1970): *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16, 179.
- Stanzhavskaia, T.I.* (1966): *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.*, 51, 7.
- Stephan, F.* (1952): *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 86, 218.
- Stephan, F. and Sutter, B.* (1961): *J. Embryo Exp. Morphol.*, 9, 410.
- Warner, N.L. and Burnet, F.M.* (1961): *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 39, 235.

(特別掲載 No.4073 昭51・11・25受付)