ヌードマウス可移植性 HMG 細胞株の累代移植について

乾 真登可・大瀬 周作・斎藤 弘・岩崎 均
平野 吉雄・田川 俊郎・村田 睦男

Serial transplantation of HMG cells into nude mouse

Madoka INUI・Shusaku OHSE・Hiroshi SAITO・Hitoshi IWASAKI
Yoshio HIRANO・Toshirou TAGAWA・Mutsuo MURATA

I. 緒 言

in vitro でのヒト各種細胞の培養, 特に癌細胞の培養は, 癌細胞の性状, 増殖と分化, 治療さらに癌の原因など広い範囲の研究に用いられている。*in vitro* での研究は細胞を既知の条件下で観察しうる利点があるが反面複雑な生体内との隔りは大きい。そのため, 自然発生動物腫瘍の同一動物による継代, 発癌剤による人為的動物腫瘍や, 種々の前処置を施した動物へのヒト癌の移植などが行われている。

ヌードマウスは1966年 Flanagan¹⁾ により詳細な報告がされ, つづいて1968年 Pantelouris²⁾ によって先天的に胸腺(胸腺由来リンパ球)が欠如していると指摘された。さらに, 1969年 Rygaard と Povlsen³⁾ はヒト悪性腫瘍のヌードマウスへの移植に成功した。以来, 多数の各種ヒト悪性腫瘍がヌードマウスに移植, 各種実験に応用され, その報告は枚挙にいとまがない。

ヌードマウスへの癌細胞の移植および累代は同一の腫瘍細胞を同時に大量, かつ安定して供給しうる点で大きな特徴を有している。

当教室の田川ら⁴⁻⁶⁾ はヒト歯肉由来悪性黒色腫培養細胞株(Human Malignant Melanoma from Gingiva; HMG)を樹立するとともにヌードマウスへの移植を行い *in vitro*→*in vivo* 実験系を確立した。今回, ニードマウスでの長期観察と累代移植性状について2, 3の知見を得たので報告する。

II. 実験材料ならびに実験方法

1. 実験動物および飼育法

ヌードマウス(日本クレア社製)はBALB/C—nu/nu

三重大学医学部口腔外科学教室

(主任: 村田睦男教授)

Department of Oral Surgery, School of Medicine,
Mie University (Chief: Prof. Mutsuo Murata)

受付日: 昭和57年9月9日

の遺伝子背景を有するものを用い, 本学動物センター内の Laminar Flow Iso-Rack (室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 5\%$) 中で飼育した。ケージ, 給水器はポリカーボネイト製, 床敷は電気カンナ屑を使用, 飼料は CMF (オリエンタル酵母社製), 飲料水は水道水をそれぞれ自由摂取として給与した。なお, ケージ・床敷および水道水は30分間高圧滅菌, 飼料は 100°C , 30分間乾熱滅菌した。飼育器具は週1回交換, 管理は可及的に, 実験操作はすべて無菌的に行った。また, 購入したヌードマウスは6週齢・早で約1週間無処置のまま飼育観察した後(体重 $21.0 \pm 1.0\text{g}$), 累代操作を行った。

2. 移植材料および方法

20% Calf Serum 加 Eagle's MEM で継代されている HMG 細胞 85代目をヌードマウス右側肩部皮下に 1×10^6 個移植し形成された腫瘍を初代 HMG 腫瘍とした。累代移植はエーテル麻酔下に腫瘍を摘出し, 腫瘍表層部を約2~3mmの小片に細切後, 癌細胞移植針にてヌードマウスの右側肩部皮下のみに移植, 創部はミシールのクリップで閉鎖した。なお, 無処置のものを対照とした。

3. 形成腫瘍測定法

移植後生着した HMG 腫瘍を週2回スライドキャリパーで短径(a mm), 長径(b mm)を測定 $W = a^2 \times b / 2 (W \approx \text{mg})$ の式⁷⁾に代入, 重量(W)として換算した。体重測定はマウス天秤(日本クレア社製)にて測定した。

4. 血液検査

累代5代目 HMG 腫瘍移植後34, 44, 54日目に屠殺後ただちに開腹, 後大静脈より採血し, 本学中央検査室 コールターカウンター・MODEL-B にて白血球数(WBC), 赤血球数(RBC), ヘマトクリット値(Ht), 血色素量(Hb)を測定した。同時にマウスの赤血球造血の主体が脾である点に着目, 脾を摘出し顕微鏡観察を行った。

5. 形態学的観察法

1) 顕微鏡観察

通法に従い10%ホルマリン固定後H-E染色を施した。

2) 顕微鏡観察

形成された HMG 腫瘍は肉眼的に中心部に壊死がみられるので皮膚直下から壊死部までの比較的辺縁部を資料として採取後、ただちに 5.4% 蔗糖加クエン酸緩衝液で 2 ないし数回洗浄，2.5% グルタルアルデヒドで 2 時間一次固定を行った。同様の緩衝液で 3 時間洗浄し，1% オスミウム酸で 1 時間二次固定，洗浄後アルコール・アセトン系列で脱水，Epon 包埋は 60°C で 48～72 時間行い，以下通法に従い超薄切片を作製した。ウラールアセテート，酢酸鉛にて重染色を施した。

III. 成績

1. 生着率

累代初代から 7 代まで移植を行った計 136 匹中 HMG 腫瘍の生着が確認されたのは 128 匹(94.1%)で初代と 7

表 1 腫瘍生着率および次代移植までの期間		
累代数	腫瘍生着率	次代移植までの期間
初 代	5/ 6 (83.3%)	108日
2 代	28/30 (93.3%)	93日
3 代	19/20 (95.0%)	94日
4 代	20/20 (100%)	64日
5 代	29/30 (96.7%)	123日
6 代	23/25 (92.0%)	141日
7 代	4/ 5 (80.0%)	
合 計	128/136(94.1%)	

代を除いては90%以上の生着率を示し，2 代から 6 代までで生着率に差はなかった。また，次代移植までの期間は最短64日，最長141日であった（表 1）。

図 1 HMG 腫瘍増殖曲線

2. 腫瘍増殖曲線

各代（2～7代）ともに同様な増殖曲線を示したが、6・7代目でわずかな増殖遅延がみられた。各代とも移植後14日頃より腫瘍が触知可能となった。約20日で7×7mm（≒170～200mg）となり生着が確認された。以後、増大し60～70日で腫瘍は約20×20mm（≒3,000～4,000mg）に達した（図1、写真1）。その後、ヌードマウス肩部皮膚が腫瘍の増大のため緊張し、腫瘍の大きさは横ばい状態となり、マウスの行動を著しく制限する。しかし、悪液質に陥ったと思われる例は観察していない。また、70～140日で腫瘍の一部表層部皮膚が自壊し腫瘍が脱落する例、出血により死亡する例がみられた。なお、腫瘍倍加時間は各代とも累代後10～60日で約5.0～7.0日であった。

3. 体重変化

HMG 腫瘍が生着し対数増殖に入る時期（移植後約20日）にわずかな体重減少がみられ、その後増加するが、腫瘍の増大に伴い実質的体重（体重－腫瘍重量）は減少していた。累代7代では腫瘍の増大に伴う体重の減少が少なかった。また、対照群では体重減少なく順調に増加していた（図2）。なお、対照群4匹の平均生存日数は453±14（日）であった。

4. 血液検査結果

移植後34日で WBC の軽度な増加を認めた（図3）。摘出された脾は34, 44, 54日目に屠殺した全例に脾腫があり、正常ヌードマウスの脾長径の約1.2～1.5倍であ

った。また、光顕所見で正常ヌードマウスに比較してやや大型の未熟な赤芽球が目立った（写真2, 3）。

5. HMG 腫瘍肉眼的所見

腫瘍は表面乳白色で、一部に出血巣がみられ分葉状であった。剖面で中心部に壊死がみられ、それぞれ各累代間であまり差異はなかった。また、色素沈着は認めなかった（写真4, 5）。

6. 光学顕微鏡所見

腫瘍は大部分 HMG 腫瘍細胞で占められ、わずかにヌードマウス由来と思われる血管、結合組織がみられた。組織型は元の組織と類似していたが amelanotic であった。組織構築は腫瘍最外部に HMG 腫瘍細胞の充実性

写真1 累代4代、移植後64日目

図2 体重変化図

図 3 血液検査結果 (影の部分は正常範囲)

組織層があり、ところどころに血管がみられた。腫瘍の中心部に近づくに従い壊死している部位がみられ、血管を中心とした HMG 腫瘍細胞が円形に認められ、島嶼状に分布していた。細胞の核は不整で、細胞質は明るく分裂期のものが散見された。また、累代を重ねるに伴い不整な核は少なく、ヘマトキシリンに濃染する核が目立ってくる傾向がみられた (写真 6, 7)。

7. 電子顕微鏡所見

累代初期 (2~5 代) では細胞質には多数のミトコンドリア、ロゼッタ様リボゾーム、種々の段階の premelanosome がみられ、核には不整な核縁、クロマチンの不均一な分布がみられた。累代を重ねるに従い (6, 7 代) 細胞質でミトコンドリアは少なくなり、リボゾームは散在し、premelanosome の数は減少、未熟なものが目立っていた。核で核縁は丸くなり、クロマチンの分布は均

一化する傾向がみられた (写真 8, 9)。

8. 転 移

HMG 腫瘍は膨張性に発育するが、増大するにつれ周囲結合組織、筋層に圧迫浸入する像がみられたが、骨破壊像は認めなかった (写真 10, 11)。また、累代 6 代目で移植後 219 日目に腫瘍が自壊し痂皮形成をみた例の直下の腹膜に浸潤、腹腔内に腫瘍の突出を観察した (写真 12)。遠隔転移は、累代 2 代目 249 日目に死亡した例の剖検にて肝転移が、累代 5 代目 194 日目に屠殺した例に左側腎転移が観察された (写真 13, 14)。

腎転移例の光顕像で腎盂粘膜下、腎実質内、腎皮膜上への HMG 腫瘍細胞の転移巣がみられた (写真 15)。

写真 2 無処置ヌードマウス脾(H-E, $\times 200$) 写真 3 HMG 腫瘍累代 5 代, 移植後 54 日目脾 (H-E, $\times 200$)

写真 4 累代 6 代摘出時所見

写真 5 累代 6 代摘出物所見

IV. 考 察

ヌードマウスは感染抵抗性が弱く Conventional state では数か月以内に wasting を起こし死亡する⁹⁾。しかし, SPF 条件下では長期生存は可能である。われわれは無処置対照群で最長 477 日, 平均 453 ± 14 日間の生存を観察した。また, Conventional state で filter cap を使用し, 1 年 5~7 か月生存したという報告もある⁹⁾。

1. ヌードマウスへのヒト癌移植率について

ヌードマウスに異種移植される腫瘍はヒト癌で手術時または生検時採取されたもの, 培養後移植されるものがあり, 移植率は後者が前者より優れている⁹⁾。

ヒト癌を直接移植した例の生着率は文献的に 6/35 (17.1%)¹⁰⁾, 35/140 (25%)¹¹⁾, 17/27 (63%)¹²⁾, 154/277

(55.6%)¹³⁾とさまざまであるが全体では 30~40% 前後とされている⁹⁾。口腔領域では 2/17 (11.8%)¹⁴⁾, 0/5 (0%)¹⁵⁾であり生着率は低いと報告されている。これは, 口腔内腫瘍は手術時無菌的に摘出するのが困難であるためと考えられる。玉置・上山¹¹⁾は癌のうち低分化で発育の早いものが移植されやすく, 組織型で低分化扁平上皮癌は容易で, 腺癌はより困難な傾向があると述べている。さらに, 移植後の組織型の保存はきわめて良好でヌードマウスでの 10 数代の継代によっても不変であったと報告している。HMG 腫瘍では累代 2~7 代目それぞれ組織型の保存は良好であった。

ヒト癌細胞株をヌードマウスに移植した例の生着率は 127/162 (78.4%) で, 生着した腫瘍の 90% が 1 か月, 10% が 2~5 か月で生着した報告¹⁶⁾ や 27/31 (87.1%) で腫瘍形成が 10~90 日でみられた報告¹⁰⁾ などがある。移植後

写真 6 累代 2 代移植後106日目(H-E, ×200)

写真 7 累代 7 代移植後196日目(H-E, ×200)

写真 8 累代 2 代電顕所見 (×20,000)

写真 9 累代 7 代電顕所見 (×20,000)

写真 10 累代 2 代移植後106日目(H-E, ×200)

写真 11 累代 2 代移植後102日目 (軟X線像)

写真 12 累代6代移植後219日目、腹腔内への腫瘍の突出▲

写真 13 累代2代移植後249日目、肝転移▲

写真 14 累代5代移植後194日目、腎転移↓

写真 15 累代5代腎転移巣光顕像(H-E, x200)

の組織型は培養前の原腫瘍と類似しているとされ¹⁶⁾, Kuga¹⁰⁾ らは培養細胞株は組織構築の能力を有し、ヌードマウスに移植されることで細胞自身に保存されている分化能を発現するのではないかと述べている。Fogh¹⁶⁾ らはヒト腫瘍細胞株のヌードマウスへの生着がみられないことについて、(a)接種量をさらに増やす、(b)観察期間の延長、(c)接種されるヌードマウスを増やす、(d)特殊な処理による immunodeficiency の増加、(e)接種経路の変更などを行いさらに追試すべきであると述べている。

2. ヌードマウスへの悪性黒色腫の移植について

悪性黒色腫培養細胞株のヌードマウスへの移植は10/10(100%)¹⁷⁾, 14/17(82.4%)¹⁸⁾, 46/46(100%)¹⁶⁾, 2/2(100%)¹⁰⁾ の報告などがあり他の細胞株より良い成績である。また、直接移植されたものでは14/32(43.8%)¹⁹⁾, 12/22(54.5%)²⁰⁾, 0/3(0%)¹¹⁾ の報告がある。

Giovanella²¹⁾ らは1972年最初にヌードマウスへ培養細胞株として無色素性黒色腫細胞を移植した。そして、組織型は原腫瘍に類似し、染色体分析にて murine 由来の染色体はみられず、さらに human と murine の正常胚細胞を移植したが生着はみられなかったと述べ、ヌードマウスへの培養細胞の移植は細胞の malignancy を

テストするのに有用だと報告している。HMG 細胞株を田川^{5,6)} らはヌードマウスに移植し、腫瘍の形成能の確認、再分化、再培養による培養経過の再現、さらに HMG-nu の再移植による腫瘍形成期間の短縮化を観察している。

黒色腫細胞株を移植し形成された腫瘍の組織型は HMV・SEKI 株で原腫瘍と類似した組織型を得ているが、メラニン産生はなかったと報告されている¹⁰⁾。Kanzaki¹⁷⁾ らは10系の黒色腫細胞株をそれぞれ原腫瘍の組織型より Epithelioid type, Spindle-shaped type, Mixed type とに分けヌードマウスに移植し、形成された腫瘍は Epithelioid type からは Epithelioid, Spindle-shaped type からは Spindle-shaped, Mixed type からは Mixed な腫瘍が形成されたとしている。HMG 細胞株の原腫瘍は Mixed type であり²²⁾、形成された HMG 腫瘍も Mixed type であった。また、長期間培養された細胞株がヌードマウスへの移植により原腫瘍の組織型をとったという多数の報告がある^{11,16,17)}。

黒色腫を直接ヌードマウスに移植した場合、特性であるメラニン形成能は無色素性のものは無色素で、低色素性のものは低色素の状態で継代されていくとされている²⁰⁾。さらに、尾谷・小出²⁰⁾は腫瘍の黒色部を移植し白

色性に転じた1例を経験したが、無色素性腫瘍が有色色素性に転じた例は経験していないと述べている。岡本ら²³⁾は同一の患者より採取した melanotic および amelanotic な系を分離し、それぞれ生物学的性状も薬物感受性も異なっていると報告している。

HMG 腫瘍は amelanotic であり、累代中に melanotic に転じた例は観察していないが、累代を通じて電顕的に premelanosome が観察されている。さらに、累代を重ね検討してゆきたいと考えている。

3. 累代移植による変化について

累代移植で次代に累代されるまでの期間が長くなると生着率が減少する傾向がみられ、また、腫瘍増殖曲線でも遅延が認められた(図1)。HMG 腫瘍では2代目より安定な増殖を示したが、一般的には累代によって増殖が良好となり4代目頃より安定した増殖を示すとされている⁸⁾。

次代移植までの期間は HMG 腫瘍では90日前後が良く、径20~30 mm 大(4,000~5,000 mg)であった。しかし、径10 mm 大で累代移植するのが良いとする報告がある⁸⁾。

移植腫瘍の組織形態は累代を重ねても元の組織形態をよく維持しているものと退形成を示すものがある^{8,11,20)}。下里⁸⁾は肺原発扁平上皮癌で、累代によって中分化扁平上皮癌から未分化大細胞癌への退形成を観察したが、電顕的にはかなり発達したデスモゾームと張原線維を有し扁平上皮癌の超微構造をよく維持していると報告している。われわれは光顕・電顕観察で組織型の保存は良好であったが、累代後期(6, 7代)で個々の細胞の activity が低いと思われる所見を得た。これは5代目以後、移植後130日前後に累代を行ったため、HMG 腫瘍がヌードマウス肩部皮膚の緊張のため増殖を抑制されたためと考えられた。ゆえに、今後の累代移植は一定期日(60~90日)中に行い観察してゆきたいと考えている。

4. 担癌ヌードマウスの宿主反応について

ヌードマウスに移植されたヒト腫瘍は増大するに従い全身的にさまざまな影響を与え、特に腫瘍産生物質による paraneoplastic syndrome が出現することがある²⁴⁾。黒色腫では悪液質がみられ、腫瘍摘出により消失したという報告がある²⁵⁾。しかし、現在まで HMG 腫瘍では観察していない。

また、われわれは全身的影響を知る指標として血液検査(WBC・RBC・Hb・Ht)を行った。それぞれの正常値は BALB/C-nu/nu ♀ で WBC; $2,380 \pm 641/\text{mm}^3$, RBC; $850 \pm 70(\times 10^4)/\text{mm}^3$, Hb; $13.4 \pm 1.0 \text{ g/dl}$, Ht; $43 \pm 5(\%)$ と報告されている²⁶⁾。われわれは同一遺伝子背景をもつヌードマウス・♀ 5匹で検討したところ、ほぼ同様の結果を得たが WBC のみ約 $1,000/\text{mm}^3$ の高値を得ている。そして、移植後34日目で WBC の増加がみられたが44, 54日目では正常範囲内であった。

玉置²⁵⁾はヌードマウス移植腫瘍では腫瘍の機能分化、活性物質に対する感受性がヒトとほぼ等しいため、ときにはヒト宿主で明瞭でなかった症状が増幅され確認されることもあると述べ、Colony Stimulating Factor (CSF) 産生腫瘍やヒトでは宿主効果の明らかでない肝癌や York sac tumor の一部がエリスロポエチンによる多血をきたす例をあげている。われわれは担HMG 腫瘍ヌードマウスで検索した全例に脾腫を、組織学的には未熟な赤芽球を多く認めた。この点について、今後さらに詳細に検索してゆきたいと考えている。

5. ヌードマウス可移植性ヒト癌の転移について

転移についてヌードマウス可移植性黒色腫では転移をみたもの^{18,23)}、みないものがある^{17,19,20)}。HMG 腫瘍では移植後200日前後経過した3例にそれぞれ腹腔内への腫瘍の浸潤、肝転移、腎転移を観察した。ヌードマウスでの転移率は低いとされている⁸⁾、長期間観察することで転移率は増加するのではないかと考えている。

腫瘍の転移率について上山²⁷⁾らは癌腫、肉腫、造血系腫瘍を含む66系の腫瘍を移植したヌードマウス543匹中30匹(5.6%)に転移を認め、ヒト癌患者と比較してヌードマウスでは少ないように感じられるが観察期間、移植部位(皮下)について考慮せねばならないと述べている。さらに、ヌードマウスに移植されたヒト腫瘍の転移率がヒト癌患者におけるよりも低いとは結論できず、今後厳密な対照をおいた上で比較検討する必要があるとしている。

近年、ヒト悪性腫瘍細胞の分離にヌードマウス移植腫瘍を用いた免疫学的選択法が報告され²⁸⁾、これまで最大の困難とされていた線維芽細胞の除去を含め、腫瘍細胞の同定、材料としての腫瘍の入手などを解決する有力な手段となるとであろうと考えられる。

V. 結 語

1. ヌードマウスに移植された HMG 腫瘍は累代中、原腫瘍の形態を良く維持していた。
2. 電顕観察で累代を通じて premelanosome が認められた。
3. 腫瘍増殖曲線で累代間(2~5代)に大きな差異はみられなかったが6, 7代でわずかな増殖遅延がみられた。
4. 6, 7代目光顕・電顕観察で個々の細胞の activity の低下を思わせる所見を得たが、これは次代移植までの期間が深く関係していると思われた。
5. 各累代を通じて生着率は $128/136(94.1\%)$ であった。
6. 担HMG 腫瘍ヌードマウス血液検査で移植後34日で WBC の増加がみられたが、44・54日では正常範囲内であった。

7. 担 HMG 腫瘍ヌードマウスに脾腫がみられ、長径で正常ヌードマウスの1.2~1.5倍であり、光顕所見で大型の未熟赤芽球が目立っていた。

8. 転移形成は移植後200日前後に2例経験し、肝転移1例、腎転移1例であった。

9. HMG 腫瘍は amelanotic で累代中に melanotic に転じた例はみられなかった。

引用文献

- 1) Flanagan, S.P.: "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res Camb* 8: 295 1966.
- 2) Pantelouris, E.M.: Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217: 370 1968.
- 3) Rygaard, J., Povlsen, C.O.: Heterotransplantation of a human Malignant tumor to "nude" mice. *Acta Path Microbiol Scand* 77: 758 1969.
- 4) 田川俊郎, 他: 上顎前歯部悪性黒色腫患者胸水より採取した細胞の培養所見について. *日口外誌* 27: 331 1981.
- 5) 田川俊郎: ヒト肉肉由来悪性黒色腫培養細胞に関する実験的研究. *日口外誌* 27: 833 1981.
- 6) Tagawa, T., et al.: Primary malignant melanoma of the oral cavity. case report and establishment of melanoma cell line. *Int J Oral Surg* 10 Suppl. 1: 16 1981.
- 7) Overjera, A.A., et al.: Proceeding of the second international workshop on nude mice. led, University of Tokyo Press, Tokyo, 1977, p453.
- 8) 下里幸雄: ヌードマウス, その癌研究への応用. *蛋白質 核酸 酵素* 23: 719 1978.
- 9) 阪本知二, 他: 癌の化学療法に関する研究 第1報 ヒト口腔領域腫瘍のヌードマウスへの移植成績とその性状について. *日口外誌* 26: 263 1980.
- 10) Kuga, N., et al.: Heterotransplantation of cultured human cancer cells and human cancer tissues into nude mice. *Gann* 66: 547 1975.
- 11) 玉置憲一, 上山義人: 1. ヌードマウス移植ヒト腫瘍の発育形式と宿主反応. *癌の臨床* 22: 694 1976.
- 12) 下里幸雄, 他: 2. 可移植性ヒト癌に対する各種治療実験の試み. *癌の臨床* 22: 699 1976.
- 13) Giovanella, B.C., et al.: Heterotransplantation of human cancers into nude mice. *Cancer* 42: 2269 1978.
- 14) 安達 泉, 他: ヒト口腔腫瘍のヌードマウスへの移植. *歯科医学* 42: 508 1979.
- 15) 中島嘉助, 他: *in-vivo* level (nude mouse) における各種制癌剤の効果判定に関する実験的研究. *日口外誌* 24: 460 1978.
- 16) Fogh, J., et al.: One hundred and twentyseven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59: 221 1977.
- 17) Kanzaki, T., et al.: Heterotransplantation of human malignant melanoma cell in athymic nude mice. *J Natl Cancer Inst* 62: 1151 1979.
- 18) Giovanella, B.C., et al.: Human neoplastic and normal cells in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* 56: 1131 1976.
- 19) Povlsen, C.O.: Heterotransplantation of human malignant melanomas to the mouse mutant nude. *Acta Path Scand Sect A* 84: 9 1976.
- 20) 下里幸雄, 玉置憲一編: 人癌とヌードマウス 医歯薬出版, 初版, 東京, 1982, 261頁.
- 21) Giovanella, B.C., et al.: Development of invasive tumors in the "nude" mouse after injection of cultured human melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 48: 1531 1972.
- 22) 山本有一郎, 他: 上顎前歯部肉肉に発生した悪性黒色腫の1例. *日口外誌* 27: 619 1981.
- 23) 岡本嘉六, 他: ヒト悪性黒色腫の研究におけるヌードマウス可移植腫 (Endo 株). *癌と化学療法* 7: 931 1980.
- 24) 玉置憲一: ヌードマウスによる生体内培養. *細胞* 11: 462 1979.
- 25) 下里幸雄, 玉置憲一編: 人癌とヌードマウス 医歯薬出版, 初版, 東京, 1982, 85頁.
- 26) Rygaard, J., Povlsen, C.O.: Effects of homozygosity of the nude (NU) gene in three inbred strains of nude mice. *Acta Path Microbiol Scand Sect A* 82: 48 1974.
- 27) 下里幸雄, 玉置憲一編: 人癌とヌードマウス, 医歯薬出版, 初版, 東京, 1982, 67頁.
- 28) 岡部哲郎, 大沢伸昭: ヒト悪性腫瘍組織培養—最近の進歩とその応用について. *医学のあゆみ* 117: 1 1981.