

淋巴细胞杂交瘤技术的应用

顾方舟 主编

人民卫生出版社

淋巴细胞杂交瘤技术的应用

主 编 顾方舟

副主编 孙宗棠 刘尔翔

人 民 卫 生 出 版 社

封面设计 肖恩仲

淋巴细胞杂交瘤技术的应用

顾方舟 主编

人民卫生出版社出版
(北京市崇文区天坛西里10号)

三河县中赵甫印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 8 $\frac{1}{4}$ 印张 184千字
1985年6月第1版 1985年6月第1版第1次印刷

印数: 00,001—5,550

统一书号: 14048·4974 定价: 1.95元

〔科技新书目95—87〕

前 言

淋巴细胞杂交瘤技术自 1975 年问世以来只不过短短九年已经取得了惊人的进展。这项技术出现不久就有人称它是生命科学中的一项革命性突破并预测了它的广阔前景,目前,杂交瘤单克隆抗体的应用范围愈来愈广泛,已经深入到整个生物医学的各个领域,诸如生物化学、分子生物学、免疫学、药理学、病毒学、细菌学、寄生虫学、肿瘤学、遗传学、药理学、血液病学、内分泌学等等。几乎所有抗原物质都可以应用这项技术获得针对单一抗原决定簇的单克隆抗体。所以,可以说它是一把分子刀,用它可以剖析任何一种抗原物质的细微结构;它又是一种均质的、高特异性的抗体,可用它研究免疫学、遗传学、肿瘤学和其他学科中各种复杂的现象,同时还可用于诊断各种疾病,包括恶性肿瘤;它又可当作一种药剂治疗某些疾病,甚至肿瘤;还可以用于提纯各种蛋白质。

淋巴细胞杂交瘤技术已被列入当今四大生物技术(工程)之一。这项生物技术现正促进着其他生物技术(基因重组、固定化酶、发酵)迅速进入商业领域,形成庞大的产业。

目前单克隆抗体主要应用在诊断方面。据 1984 年美国国会技术评估局出版的《商业生物技术》一书所载,1981 年 5 月到 1983 年 6 月在美国得到批准的单克隆抗体诊断产品已有 41 种之多。加上以前进入市场的估计已达六、七十种。

我国也非常重视生物技术,已将它列入国家重点研究和开发项目之一。不久前,中国科学技术委员会成立了中国生

0030622/85-11-20/1.95元

物工程开发中心。近年来，我国淋巴细胞杂交瘤技术的研究和开发工作如雨后春笋般蓬勃地开展起来，并取得了不少可喜的成果。

为了使我国广大医药科学工作者和临床医师更多了解这项技术的进展情况，我们特邀请了从事这方面工作的同志撰写文章。我们希望这本书能对读者有一些帮助。

在编辑过程中，中国医学科学院学报编辑部陈永生同志作了大量的工作。对此表示衷心感谢。此外，我们还得到人民卫生出版社的大力支持。在此一并致以深切的谢意。

顾 方 舟

1984年10月

目 录

前言	顾方舟〔1〕
应用于杂交瘤技术的骨髓瘤细胞系与实 验动物	陈妙兰〔1〕
小鼠B细胞杂交瘤方法在我国的进 展	刘尔翔〔12〕
单克隆抗体的分离、提纯与鉴定	吴宁华等〔20〕
单克隆抗体的某些理化性质	王世中〔27〕
单克隆抗体在细胞生物学中的应用	章静波等〔40〕
单克隆抗体在生物化学、分子生物学中 的应用和前景	王惠媛等〔54〕
T细胞杂交瘤及其所产生的淋巴因 子	戴顺志〔67〕
单克隆抗体在T细胞研究中的应用	戴顺志〔87〕
淋巴细胞杂交瘤技术在其他免疫细胞的 研究应用	戴顺志〔114〕
单克隆抗体作为药物的载体	甄永芬〔135〕
单克隆抗体在药物受体研究中的应 用	毕晓峰等〔147〕
单克隆抗体在病毒学中的应用	陈伯权〔156〕
单克隆抗体应用于利什曼病的进展	瞿靖琦〔169〕
单克隆抗体在疟疾研究中的应用	李文涿〔174〕
单克隆抗体技术在血吸虫病研究中的应 用	严自助等〔187〕
单克隆抗体和人肿瘤抗原	王雁飞等〔197〕
单克隆抗体在血液病研究中的应用	陈 璋〔219〕
单克隆抗体在内分泌学中的应用	吴从愿〔243〕

应用于杂交瘤技术的骨髓瘤 细胞系与实验动物

中国医学科学院科研处 陈妙兰

淋巴细胞杂交瘤 (lymphocytic hybridoma) 技术需要骨髓瘤细胞系 (myeloma cell line)。正如 Milstein 指出: 如果在理论上没有克隆选择学说, 在技术上没有细胞融合 (cell fusion) 和培养方法, 在材料上没有实验性骨髓瘤和体外培养的骨髓瘤细胞, 就不可能出现单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb) ^[1]。这充分说明了骨髓瘤细胞系和实验动物在杂交瘤技术中的重要作用。本文对此作扼要介绍。

一、用于融合的骨髓瘤细胞系

1. 选择骨髓瘤细胞系的要求 在淋巴细胞融合技术中, 理想的骨髓瘤细胞系应能获得高融合率, 并得到产生特异性抗体的杂交瘤。有些骨髓瘤细胞系不仅融合率不高, 而且本身分泌免疫球蛋白 (Ig), 致使杂交瘤细胞仍分泌亲系骨髓瘤的 Ig 链。据估计, 细胞融合时, 在两种重链和两种轻链随机组合的情况下, 得到的杂交瘤可能产生 10 种 Ig 分子, 特异性抗体只占其总量的 1/16。为了得到只分泌特异性抗体的杂交瘤, 需选择本身不产生 Ig 的骨髓瘤细胞系 ^[2]。其次, 适用的骨髓瘤细胞系应对 8-氮杂鸟嘌呤 (8-azaguanine, 8-AG) 或 6-硫鸟嘌呤 (6-thioguanine, 6-TG) 有抗药

性, 缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT), 不能利用外源性次黄嘌呤 (H), 在含 HAT (次黄嘌呤hypoxanthine, 氨基蝶呤 aminopterin, 胸腺嘧啶核苷thymidine) 的培养液中死亡。

2. 现已建立的骨髓瘤细胞系 用于B细胞杂交瘤技术的骨髓瘤细胞系列表介绍如下。

表 1 用于B细胞杂交瘤的骨髓瘤细胞系

	细胞系名称	分泌/表达	参考文献
小鼠	P3-NS1/1-Ag4-1	(κ)*	[3]
	P3-X63-Ag8	IgG1(κ)	[4]
	P3-X63-Ag8.653	—	[5]
	P3-X63-Ag8-U1	(κ)*	[6]
	Sp2/0-Ag14	—	[2]
	45.6TG1.7	IgG _{2b} (κ)	[7]
	PuBul-Ou	IgG _{2a} (κ)	[8]
大鼠	Y3-Ag1.2.3	(κ)	[9]
	YB2/0	—	[10]
人	SKO-007	IgE(λ)	[11]
	GM1500.6TG-A12	IgG(κ)	[14]
	GM4672	IgG(κ)	[15]
	LICR.LON/HMy2	IgG(κ)	[16]
	LICR.LON-HMy2/CAM1	IgG(κ)	[17]
	UC729-6	IgM	[18]
	UC729-HF2	—	[18]

* 只合成, 不分泌

(1) 小鼠骨髓瘤细胞系:

1) 小鼠 P3-NS1/1-Ag4-1: 是常用的骨髓瘤细胞系。来源: NS1/1 是小鼠骨髓瘤 P3(MOPC21)细胞系的亚系, P3 细胞分泌 IgG1(κ)。NS1/1 细胞不合成重链 (γ 1), 只合成而不分泌轻链 (κ)。P3-NS1/1-Ag4-1 是 NS1/1 的亚系, 抗 8-AG (20 μ g/ml), 在 HAT 培养液中死亡^[3]。

2) 小鼠 P3-X63-Ag8: 是 Köhler 和 Milstein 首次获得产生 McAb 杂交瘤所用的骨髓瘤细胞系。来源: 它来自 BALB/c 小鼠的 P3(MOPC21) 骨髓瘤细胞系, 分泌 IgG1(κ), 抗 8-AG (20 μ g/ml), 在 HAT 培养液中不生长^[4]。

3) 小鼠 P3-X63-Ag8.653: 是 P3-X63-Ag8 的亚克隆, 不可逆地丧失表达免疫球蛋白 γ 1重链和 κ 轻链的能力, 其生长特性、融合率及所产生的杂交瘤细胞系的稳定性等方面均可与P3-X63-Ag8或P3-NS 1/1-Ag4-1相比拟^[5]。

4) 小鼠 P3-X63-Ag8-U1: 是 P3-X63-Ag8 骨髓瘤细胞系的变系。P3-X63-Ag8 分泌重链 (γ 1) 和轻链 (κ), P3-X63-Ag8-U1则只合成而不分泌轻链 (κ)^[6]。

5) 小鼠 Sp2/0-Ag14: Köhler 等将 P3-X63-Ag8 骨髓瘤细胞系与具有抗绵羊红细胞活性、产生 γ 2b重链和 κ 轻链的BALB/c小鼠脾细胞融合得到杂交瘤细胞系 Sp2/HLGK, 从后者得到的 Sp2/HL-Ag 进行再克隆, 得到 Sp2/0-Ag14。它抗 8-AG, 在 HAT 培养液中死亡, 不分泌 Ig 链, 其细胞含有约 73 个染色体, 比 P3-X63-Ag8 骨髓瘤细胞系多 8 个染色体, 用其融合得到的杂交瘤数与 P3-X63-Ag8 相似^[2]。

6) 小鼠 45.6TG1.7: 来源于小鼠 MPC-11 骨髓瘤, 分泌重链 (γ 2b) 和轻链(κ), 抗 6-TG(5 μ g/ml), 在 HAT

培养液中死亡^[7]。

7) 小鼠 45.6TG1.7.5: 是 45.6TG1.7 骨髓瘤细胞系的亚系^[6]。

8) 小鼠 PuBul-Ou: 是分泌 IgG2a(κ) 的骨髓瘤细胞系, 对哇巴因 (ouabain) 抗药^[8]。

(2) 大鼠骨髓瘤细胞系: 在细胞融合技术中, 使用大鼠骨髓瘤细胞系的优点是, 从带瘤大鼠得到的血清和腹水量约比小鼠高 10 倍, 适于大量生产 McAb 或同种异型的抗大鼠抗体。

1) 大鼠 Y3-Ag1.2.3: LOU 系大鼠的骨髓瘤经体外培养获得的细胞系 R210, 从它得到抗 8-AG 的亚系 210. RCY3.Ag1 (分泌 κ 轻链), 后者经两次克隆, 选获 Y3-Ag1.2.3。它经 5 个月连续培养后, 与脾细胞的融合率可达到小鼠骨髓瘤细胞系的水平。在显微镜下, Y3-Ag1.2.3 系及其杂交瘤细胞比小鼠 P3-X63-Ag8 骨髓瘤细胞要小得多。它在 DMM 培养液 (含 5% 胎牛血清) 生长良好, 在软琼脂中易产生克隆。Y3-Ag1.2.3 及其杂交瘤所产生的克隆, 细胞分布较分散, 不像小鼠 $\times$ 小鼠杂交瘤的克隆细胞密集。用它与 DA 系大鼠脾细胞融合, 获得抗小鼠 IgG 的大鼠 McAb。其杂交瘤 YA2/40H (LK) 细胞接种在 (LOU $\times$ DA)F1 大鼠可以产生肿瘤, 带瘤大鼠血清中抗体含量为 10~15mg/ml。因此认为 210. RCY3-Ag1.2.3 是适用于大鼠 $\times$ 大鼠细胞融合的骨髓瘤细胞系^[9]。

2) 大鼠 YB2/0: 此细胞系不分泌 κ 轻链。将 YB2/0 及 Y3-Ag1.2.3 分别与经酵母微管蛋白免疫的大鼠脾细胞融合, 结果证明两者均适用作细胞融合的亲系, 而且 YB2/0 产生的杂交瘤不分泌骨髓瘤抗体链。接种杂交瘤的大鼠血清

滴度可达 $1:10^8$ [10]。

(8) 人骨髓瘤细胞系：目前，许多研究者对 McAb 用于人类疾病诊断和治疗给予很大关注。为了避免因注入异种蛋白所产生的过敏和由于免疫复合物形成所致的临床症状，极需人的 McAb。当前的主要困难是它不如小鼠或大鼠 McAb 容易得到。

制备人 McAb 有两种途径，一种是用杂交瘤技术，将能分泌抗体的人 B 细胞与骨髓瘤细胞或淋巴母细胞系融合；另一种是用 EB 病毒使人的抗原特异性 B 细胞转化而长期存活。本文仅讨论前一种途径。

关于杂交瘤技术，曾有人用小鼠或大鼠骨髓瘤细胞系与人 B 细胞融合，但得到的杂交瘤细胞趋向于丢失人的染色体，最后失去编码产生免疫球蛋白的染色体而丧失产生 McAb 的能力。因此有必要建立较稳定的人×人杂交瘤系统。为此需要获得适用于融合的人骨髓瘤细胞系。理想的人骨髓瘤细胞系应和小鼠、大鼠骨髓瘤细胞一样，应具有高的融合率，高的克隆生成率，能迅速繁殖，本身不分泌 Ig，但融合后能大量产生 Ig。

目前已建立的只有为数不多的人骨髓瘤细胞系能长期培养。有的细胞系为酶缺陷系 (HGPRT⁻)，在 HAT 培养液中不能生长，可用于融合。

1) 人 SKO-007：报导的第一个能产生 McAb 的人×人杂交瘤是用 SKO-007 融合得到的。SKO-007 又称 U-266 AR1，来自 U-266 人骨髓瘤细胞系。将 U-266 细胞培养在含 8-AG 培养液中，选出一个抗 8-AG 和对 HAT 敏感的亚系即为 SKO-007。其特点是繁殖快，速度为 U-266 亲系的 1 倍 [11]。将人淋巴细胞（取自淋巴结、末梢血、脾、

肿瘤) 分别与人 LICR-LON-HMy2(LICR-2)、人 SKO-007 和小鼠 NS1 骨髓瘤细胞融合, 在同样条件下, 与 NS1 融合产生的克隆数比 LICR-2 或 SKO-007 高 5~20 倍, 与 LICR-2 融合者又比 SKO-007 高 4 倍。但分泌人 McAb 的克隆百分率, 产生 Ig 的类别以及产生 IgM、IgA、IgG 克隆的比例, 三个细胞系均相似^[12]。另据报道, 用 SKO-007 融合得到的人×人杂交瘤与小鼠杂交瘤相比较, 融合率明显较低, 杂交瘤生长较慢, 染色体较不稳定^[13]。

2) 人 GM1500.6TG-A12: 来自人 GM1500 细胞系。后者来自多发性骨髓瘤病人, 分泌 IgG₂(κ)。用乙基甲烷磺酸酯 (ethylmethane sulphonate) 对 GM1500 细胞进行诱变, 在 6-TG (3 μ g/ml) 存在下选获 GM1500.6TG-A12 亚系。它缺乏 HGPRT, 在 HAT 培养液中死亡, 分泌 IgG₂(κ), 此细胞与病人淋巴细胞融合可得到分泌人 McAb 的杂交瘤^[14]。

3) 人 GM4672: 也是 GM1500 骨髓瘤细胞系的亚系, 产生 IgG₂(κ), 缺乏 HGPRT, 对 HAT 培养液敏感, EB 病毒核抗原阴性。将此细胞系与自身免疫性疾病患者末梢血淋巴细胞或脾细胞融合获得 108 个杂交瘤, 其中 16 个产生自身抗体, 均为 IgM^[15]。

4) 人 LICR-LON-HMy2: 来源于人骨髓瘤 ARH77, 是淋巴母细胞样细胞系, 表达 EB 病毒核抗原, 与人体淋巴细胞融合得到适度的融合率, 但 Ig 的分泌率低, 24 小时仅 0.2~0.8 μ g/ml^[16]。据报告, 它与人淋巴细胞融合产生的克隆数比 SKO-007 细胞系高 4 倍^[12]。

5) 人 LICR-LON-HMy2/CAM1: 是将 LICR-LOU-HMy2 于无血清培养液中生长, 进行克隆而得, 抗 8-

AG, 对 HAT 敏感, 产生 κ 和 γ 链。180 例肿瘤 (肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、胶质瘤、胃癌、膀胱癌等) 病人的淋巴细胞与此细胞系融合, 24 例获得杂交瘤 162 个, 均可在无血清培养液中生长, 继续产生 κ 和 γ 链, 长期培养仍持续分泌 Ig, 培养上清液中 Ig 含量为 $1\sim 5\mu\text{g/ml}$ 。有 12 个杂交瘤上清液对人肿瘤细胞系有结合活性^[17]。

6) 人 UC729-6 和 UC729-HF2: UC729-6 是人 B 淋巴母细胞样细胞系, 抗 6-硫鸟嘌呤, 分泌 IgM。UC729-HF2 是 UC729-6 的亚系, 抗 6-硫鸟嘌呤, 但不分泌 Ig。

对比研究 6 个人细胞系 (U-266、RPMI8226、UC729-6、UC729-HF2、LICR-LON-HMy2、GM4672) 和小鼠 NS1 细胞系, 研究其与 1 例慢性淋巴细胞性白血病的淋巴细胞融合后产生杂交瘤的能力、分泌 McAb 情况及杂交瘤的克隆化, UC729-6 和 UC729-HF2 最适用于人 $\times$ 人杂交瘤研究。其杂交瘤生成率分别为 51% 和 46%, 分泌 Ig 者分别占 43% 和 24%, 与用小鼠 NS1 细胞系的结果相近。LICR-LON-HMy2 的杂交瘤生成率低, 但其中分泌 Ig 者较多, 占 67%^[18]。

二、动物的自发性和诱发性骨髓瘤

1. 自发性骨髓瘤 据报道能合成免疫球蛋白的肿瘤存在于狗、马、地鼠、大鼠和小鼠。除大鼠、小鼠外, 这类肿瘤在其它动物仅偶然发现, 故未能广泛用于研究。在小鼠中, 与 Ig 产生相关联的肿瘤包括浆细胞瘤 (骨髓瘤) 和淋巴瘤。这些肿瘤能分泌 Ig 或有 Ig 结合在细胞表面, 或分泌与表面结合同时存在。至今研究最广泛的、能产生 Ig 的小鼠肿瘤为浆细胞瘤。其来源为单克隆性, 几乎每一种浆细

胞瘤细胞都只产生一种 Ig 分子, 含有相同的轻链和重链。小鼠自发性浆细胞瘤最常发生于回盲部粘膜固有层, 伴有粘膜溃疡和粘膜下炎症^[19]。晚期肿瘤转移至肠系膜淋巴结。Pilgrim 系统研究了 125 例小鼠回盲部浆细胞瘤, 诊断依据是在回盲部有形状异常的浆细胞^[20]。此种肿瘤一般难以移植成功。据报道, 已建成的移植性瘤株有: 产生 IgG 的 × 5563, 产生 IgA 的 × 5647、SPC1 和 DPC1 (均来源于 C3H/He 小鼠) 及 YPC1 (来源于 BALB/c × A 的 F₁ 杂交小鼠)^[21]。

2. 诱发性骨髓瘤 首次报道 BALB/c 小鼠诱发性浆细胞瘤是将装有 C3H 小鼠乳腺瘤组织的微孔扩散盒植入小鼠腹腔, 6 个月后在腹膜下结缔组织内发生浆细胞瘤或纤维肉瘤并有出血性腹水^[22]。后来发现, BALB/c 小鼠腹腔注入 Freund 佐剂可诱发浆细胞瘤^[23]。只注射矿物油也可诱发浆细胞瘤。据报道, 小鼠腹腔注入矿物油 0.5 毫升, 两个月 1 次, 共 3 次, 40~60% 雌鼠可诱发浆细胞瘤^[24]。其诱发可能与多种因素有关^[21], 最重要的是遗传因素。BALB/c 小鼠有独特的敏感性, 浆细胞瘤诱发率很高, 其它纯系小鼠如 DBA/2、A/He、A/LN、C57BL/He、C57BL/Ka、C3H/He 等, 注射矿物油或植入扩散盒仅偶见诱发浆细胞瘤。NZB 小鼠可能和 BALB/c 系小鼠一样敏感, 但由于动物死于其它原因, 诱发率通常较低。BALB/c 与其他品系小鼠杂交的第 1 代, 注射矿物油的诱发率一般很低, 但例外的是 (BALB/c × NZB)F₁ 的诱发率高达 60%。另一有关因素是激素, BALB/c 小鼠注射矿物油时, 雄鼠诱发率比雌鼠高。雌鼠注射睾酮可提高诱发率, 注射孕酮、雌二醇、皮质醇则可抑制浆细胞瘤的发生。注射纯的链烷化合物

pristane (2,6,10,14-四甲基十五烷) 可以在 BALB/c 小鼠诱发浆细胞瘤^[25]。浆细胞瘤的诱发率大致和注射 pristane 的量成正比, 注射总量为 1.5ml (分 3 次注射, 每次 0.5ml) 的诱发率为 61%, 剂量 1ml (一次注射) 的诱发率为 42%, 1ml 分两次注射的诱发率为 39%, 一次注射 0.5ml 的诱发率仅为 22%。鼠龄对诱发率也有影响, 比较 2 个月、3 个月和 1 年鼠龄的动物, 其诱发率以 1 年鼠龄动物最低^[26]。

三、常用于淋巴细胞杂交瘤技术的实验动物

1. 小鼠 BALB/c 系 它是此技术中最常用的动物。目前用于细胞融合的小鼠骨髓瘤细胞系几乎都来源于 BALB/c 系小鼠。其杂交瘤可接种于 BALB/c 或它的杂交第 1 代小鼠, 从带瘤动物取血清或腹水制备 McAb。BALB/c 系小鼠比较驯服, 具有很大的网状内皮器官, 对放射特别敏感; 乳腺肿瘤发生率低 (10~20%), 白血病发生率为 67%。老年动物有心脏病变, 动脉硬化常见^[27]。

2. 大鼠 LOU 系 又称 LOU/Wsl 系。可能来自 Wistar 大鼠, 是 1956 年开始近亲交配而形成的品系。约在 1 岁龄时的大鼠回盲部淋巴结产生一种自发性肿瘤, 发展迅速, 当触及肿瘤后的一个月死亡。此种肿瘤的发生率超过 10%, 形态为极低分化的淋巴细胞, 称之为大鼠回盲部免疫细胞瘤 (rat ileocecal immunocytoma) 此种肿瘤移植于同系大鼠或其杂交第 1 代均易生长。

此种肿瘤约有 60% 病例合成单克隆性 IgG 或 IgA, 或 κ 型 Bence-Jones 蛋白。未发现产生 IgM^[28]。大鼠 Y3-Ag 1.2.3 骨髓瘤细胞系是 LOU 系大鼠骨髓瘤体外培

养所获, 故 LOU 系大鼠也适用于 B 细胞杂交瘤技术。

参 考 文 献

1. Fortner JG, et al, Accomplishments in Cancer Research, Lippincott Co, Philadelphia, p 35, 1982
2. Shulman M, et al, Nature 276:269, 1978
3. Köhler G, et al, Eur J Immunol 6:292, 1976
4. Köhler G, et al, Nature 256:495, 1975
5. Kearney JF, et al, J Immunol 123:1548, 1979
6. Sharon J, et al, Somat Cell Genet 6:435, 1980
7. Margulies DH, et al, Cell 8:405, 1976
8. Köhler G, et al, Eur J Immunol 6:511, 1976
9. Galfre G, et al, Nature 277:131, 1979
10. Kilmartin JV, et al, J Cell Biol 93:576, 1982
11. Olsson L, et al, Proc Natl Acad Sci USA 77:5429, 1980
12. Cote R, et al, Proc Natl Acad Sci USA 80:2026, 1983
13. Olsson L, et al, J Immunol Methods 61:17, 1983
14. Croce CM, et al, Nature 288:488, 1980
15. Shoenfeld Y, et al, J Clin Invest 70:205, 1982
16. Sikora K, et al, Nature 300:316, 1982
17. Sikora K, et al, Brit J Cancer 47:135, 1983
18. Abrams PG, et al, J Immunol 131:1201, 1983
19. Dunn TB, J Natl Cancer Inst USA 19:371, 1957
20. Pilgrim HI, Cancer Res 25:53, 1965
21. Potter M, Physiol Rev 52:631, 1972
22. Mervin RM et al, Proc Soc Exp Biol Med 101:437, 1959
23. Lieberman R, et al, Proc Soc Exp Biol Med 107:163, 1961
24. Potter M, et al, Nature 193:1086, 1962

25. Anderson PN, et al, Nature 222:994, 1969
26. Potter M, et al, J Natl Cancer Inst 71:391, 1983
27. Staat SJ, In "The Mouse in Biomedical Research", Academic Press, New York, vol. 1, p 177, 1981
28. Bazin C, et al, Int J Cancer 10:568, 1972