

簡易化動物細胞培養を組み入れた 生命科学学生実験の試み

細 川 友 秀¹⁾

A Trial to Introduce a Simplified Procedure of Animal Cell Culture into the Educational Experiments for Students of Life Science Course

Tomohide HOSOKAWA

抄録：クリーンベンチ(無菌箱)を使用しないで、通常の学生実験室の実験台を使用して、無菌操作と動物の正常細胞の培養を、主として生命科学専攻生向けの学生実験に導入しようと試みた。実験は3, 4回生14人が6組に分かれて、器具の滅菌、培養液の準備、マウス癌細胞の培養、マウスの胸腺と脾臓の無菌的摘出とそれぞれの細胞の初代培養を行った。1回目の初代培養実験を除いて、どの実験でも細胞培養中への微生物の混入は非常に少なく、どのグループも良い成績を取めた。初代培養実験も2回目は、1回目の経験をもとに学生諸君が脾臓の無菌的摘出操作をいっそう注意深く行い、微生物の混入は1シャーレのみであった。さらに、この実験ではほとんどのグループの脾臓細胞の培養で、細胞の分化を誘導し抗体を産生させることに成功した。実験室の入室は土足を禁止したが、室内の空気は清浄ではなく無菌操作には悪い環境であった。しかし、今回の結果は、10人以上の人数で通常の学生実験室で行うという悪い条件下でも、操作の各段階での十分な注意を払えば、無菌操作と細胞培養を基本とする教育実験を実施できることを示すと思われる。

キーワード：生命科学, 学生実験, 無菌操作, 動物細胞培養, 抗体産生

Abstract

We attempted to introduce animal cell culture experiments into the educational curriculum for students of the Life Science course. Fourteen undergraduate students of third and fourth grades divided into 6 groups carried out the experiments. EL-4 mouse T-lymphoma cells were collected from tissue culture bottles and were washed with sterilized Eagle MEM. In other experiments, mouse thymuses and spleens were removed and cell suspensions of the lymphoid organs were prepared with mincing and pressing an organ onto a stainless mesh and washed with sterilized Eagle MEM. Cells were finally suspended in a complete culture medium and counted, and aliquots of each cell suspension were put in various tissue culture dishes and incubated for up to 7 days in

1) 京都教育大学

a CO₂ incubator at 37°C under 5% CO₂ and humidified air conditions. In an experiment, bacterial lipopolysaccharide (LPS) was added to some spleen cell cultures to induce differentiation of antibody-forming cells and polyclonal antibody production. Every step of these procedure was manipulated without any clean bench in an ordinary room for the educational experiments. In any experiments, except the first primary culture experiment of thymus and spleen cells, few, if any, dishes were contaminated by microorganisms. In the last experiments, almost all groups of students were successful in spleen cell culture and inducing polyclonal antibody production.

The present results indicate that, even with insufficient equipments, educational experiments which are based on aseptic manipulation and cell culture, are possible to run sufficiently, if each step of the procedures is followed with religious care.

Key Words: educational experiment, cell culture, mouse lymphoid cells, clean bench

I. は じ め に

最近の生命科学のめざましい進歩は、我々の生活を大きく変化させ、自然や生命の尊厳に関する考え方に大きな影響を与えつつある。今や、ヒトや動物の多くの遺伝子がクローニングされ、ヒトの全ゲノムの遺伝子構造を解明する計画が進行しつつある。クローニングされた遺伝子の中から目的の遺伝子を得て、実験動物の胚性幹細胞に導入して増殖させ、その細胞を受精後早期の胚に混入させて妊娠を継続させるという方法で、我々は、目的の遺伝子を発現し、しかも、その遺伝子の子孫に伝える実験動物を何匹も得ることができる。また、我々は動物やヒトの個々の受精、妊娠、妊娠の継続と誕生までも自由な左右できる技術を獲得しつつある。我々は、生命そのものを本質的に自由にすることが可能になりつつある。このような時代に生きる我々は、生命科学とその技術のもつ可能性を正確に理解し、適確に判断する力を要求されている。それゆえ、学校教育では生命科学の教育がさらに重要になると考えられる。

生命科学では、無菌操作と細胞培養は重要な基本的技術のひとつであり、株細胞の樹立、細胞融合、細胞への遺伝子導入と遺伝子導入細胞のクローニングなどこの技術を基本とする技術は多い。このような生命科学の基本的技術の一端を学生実験に取り入れるならば、学生にとって生命科学がいつそう身近になるだろう。多細胞生物の組織・器官を形成する、種々の機能分化した細胞をシャーレ内で増殖させ、機能発現・機能分化させることは、細胞が生命の基本単位であること、細胞の諸機能と多細胞生物の生命の成り立ち、多細胞生物の感染防御機構など、生命の基本を学生に考察させ理解させるために大いに有効であろう。

昨年、2回生、卒業研究生、大学院1回生、それぞれ数人ずつを対象にして、通常の実験室でクリーンベンチを使用しないで、培養液の無菌的分注とマウスの癌細胞株の無菌的分注を行わせ、どの程度細菌などの微生物の混入と増殖がみられるか、どの程度無菌操作に成功し細胞培養に成功するかを調べた¹⁾。この予備的検討は非常に良い成績を得た。ここでは、生命科学専攻の学生実験に無菌操作と細胞培養を導入し、通常の実験室でクリーンベンチを使用せずに、マウスの正常細胞を材料として、学生の手により in vitro (シャーレ内) で細胞の増殖・分化と機能発現を起こさせることを試みた。

II. 材 料 と 方 法

細胞：株細胞として、我々の研究室で維持している、EL-4細胞（マウス Tリンパ細胞腫）を使用した²⁾。正常細胞として、我々の研究室で維持している近交系マウスの C57BL/6 系統から 2-3 カ月齢のものを選り、脾臓細胞を得た。

器具の洗浄と滅菌：200ゲージのステンレスメッシュ、眼科用ハサミ、ピンセットなどの金属製器具やメスピペット、コマゴメピペット、耐圧ビンなどのガラス器具やポリスチレン製の50ml遠沈管（コーニング社）、マイクロピペット用チップなどは、使用前に洗剤により汚れを落とし、次に水道水で洗剤をよく洗い流し、さらに再蒸留水で3回濯いで水道水を除き乾燥した。乾燥した金属、ガラス器具は乾燥器により160-170℃で1.5時間乾熱滅菌し、プラスチック製品は121℃で20分間オートクレーブして滅菌した。また、オートクレーブの加熱にも耐えないプラスチック製の15ml遠沈管（コーニング社、ファルコン社）、シャーレ（ファルコン社）などは、滅菌した製品を業者から購入して使用した。

培地：市販の RPMI1640 粉末培地（ニッスイ製薬）を再蒸留水に溶かし、500mlの耐圧ビンに入れてオートクレーブ滅菌した。アンプル入りの滅菌した7%の炭酸水素ナトリウム水溶液（大塚製薬）を購入し、30mg/mlの Lグルタミン水溶液を、0.22 μ m-pore-size のミリポアメンブレンフィルター（マイレックス社）を通過させて滅菌し、それぞれ18mlと5mlを500mlの滅菌 RPMI1640 培養液に加えた。さらに、市販の滅菌牛胎児血清（ギブコ社）を25ml加えてよく混合して完全培地とした³⁾。マウス脾臓細胞の培養は、完全培地に 5×10^{-5} M に 2-メルカプトエタノールを加えて行った。培地には抗生物質や抗菌物質を添加せず、乾熱滅菌した100mlの耐圧ビンや、オートクレーブ滅菌した50mlのポリスチレン遠沈管に分注して冷蔵庫に保存し、2週間以内に使用した。

細胞の洗浄には、市販のイーグル MEM 粉末培地（ニッスイ製薬）を再蒸留水に溶かし、オートクレーブ滅菌したものを使用した。

細胞懸濁液の作製：EL-4細胞は、懸濁状態で継代培養し、最後の継代から2日後の対数増殖期にあるものを使用した。

また、通常の実験室内でマウスを解剖し、滅菌したハサミとピンセットを使って無菌的に脾臓を取り出した。滅菌したイーグル MEM 液とステンレスメッシュを入れた滅菌シャーレのなかにその脾臓を入れ、シャーレごと氷上にのせ、ハサミで脾臓に切れ目を入れ、ピンセットでステンレスメッシュに押し付けて、冷やしながら細胞をほぐし出した。得られた細胞懸濁液を50ml遠沈管に入れ、1000rpm（回転/分）、10分間遠心して細胞を沈降させた後、上清をすてて再びイーグル MEM 液を入れ、ピペットで細胞を懸濁するという操作によって、細胞を3回洗浄した。最後に上清をすて、完全培地に懸濁して細胞の濃度を測定した。

細胞数の算定：EL-4細胞あるいは脾臓細胞の懸濁液中に含まれる生細胞数は、トリパンブルー（ナカライ社）を $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Mg}^{2+}$ を含まないリン酸緩衝液（PBS(-)）に0.2%に溶解した液と細胞懸濁液を1:1あるいは3:1で混合し、色素に染色されない細胞を生細胞として、FucksあるいはThomaの血球計数盤を用い顕微鏡下で算定した⁴⁾。

細胞の培養：EL-4細胞を、直径3cmの組織培養用プラスチックシャーレに、1枚当たり 2×10^4 個入れ完全培地を最終的に2mlとした。そして、37℃、5% CO_2 、加湿条件の炭酸ガス細胞培養器で数日間培養した。また、脾臓細胞は、同様のシャーレに 5×10^6 個入れ培地を2mlとした。そして、シャーレを3群に分け、B細胞を抗体産生細胞に分化させるため、大腸菌内毒素（LPS）を1 μ g/mlあるいは10 μ g/mlに添加した。また、添加しない培養を対照とした。各シャーレをEL-4

細胞の培養と同様に炭酸ガス細胞培養器で7日間培養した後、各シャーレの培養上清を回収し、各上清中に含まれるIgMとIgG抗体量を測定して、抗体産生細胞の分化と機能発現を評価した。

抗体量の測定：培養上清中のIgM、IgG抗体量はEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)にて行った⁵⁾。略記すると、coating buffer⁶⁾に抗マウスIgM、IgG抗体を1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に溶解し、その100 μl ずつを96穴ELISAプレートに分注し、1夜4℃で吸着させた。PBS-Tween⁶⁾でプレートの各穴を洗浄後、完全培地で200倍と400倍に希釈した脾臓細胞培養上清100 μl を各穴に分注し、上清中のIgM、IgG抗体を吸着させた後、PBS-Tweenで2000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgM、あるいはIgG抗体液100 μl を各穴に入れて吸着させた。各穴をPBS-Tweenで洗浄後、diethanolamin buffer⁶⁾で1 mg/mlに溶解したp-ニトロフェニルリン酸ナトリウム溶液100 μl を各穴に入れ、反応発色させ発色の程度を415nmと450nmにおける吸光度を、コンピューター（マッキントッシュ社）制御されたマイクロプレートリーダー（バイオラド社）にて測定した。また、マウスIgM、IgG ミエローマタンパク（リットンバイオネティクス社）を2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ からcoating buffer⁶⁾で倍倍希釈して得た希釈系列により、IgM、IgG抗体の濃度測定のための濃度/吸光度検量線をコンピューター（マッキントッシュ社）で求め、各上清サンプル中のそれぞれの抗体量を計算した。

実験の実施者と実験室：本年度（平成5年度）から新たに生命科学学生実験を開講するのを機会に、できるだけ人間に近い脊椎動物を材料に選び、無菌操作と組織培養・細胞培養をその学生実験に導入することを試みた。そのため、生命科学専攻を中心として理学科3回生11人と4回生3人の14人で行った。我々の研究室には培養関連の実験操作を行っている実験室があり、そこでは土足禁止で比較的清掃がゆきとどいていて、クリーンベンチを使用しなくても無菌操作は容易であり、昨年の子備的研究はそこで行った¹⁾。しかし、その部屋は狭くそこでの実験は3～4人が限度であるので、今回の実験は通常の生物学生実験室を土足禁止として使用した。実験室は2スパン分の広さであり、14人の学生には少し狭い状況であった。

Ⅲ. 結 果

(1) 完全培地の準備とEL-4細胞培養の成績

実験室の広さと実験器具の数量上の制約から、学生2人または3人を1組として、6組に分けて実験を実施した。実験を始める前には、実験台と実験者の両手を70%エタノールで清拭した。ガラスピペットはあらかじめ滅菌したものを使用し、使用途中のものは金属製の試験管立などの上に置き、使用時ごとに、先端から手元に適当な長さ分をガスバーナーで加熱してから使用した。培地を入れたビン、細胞培養ボトル、50ml遠沈管などについても、スクリーキャップの脱着時に、ガスバーナーでキャップと容器の口の部分を加熱して、微生物の混入を防いだ。2つの中央実験台に3組ずつ分かれて、クリーンベンチを使用しないで、以下の操作を行った。

実験1

- ① ガラスアンプルを開け、滅菌ピペットで7%炭酸水素ナトリウム水溶液を必要量取り、オートクレーブ滅菌したイーグルMEM液と、RPMI1640液に加えてpHを調整する。
- ② pH調整したRPMI1640液を、各人用に滅菌した100ml入り培養液ビンに100mlずつ分注し、それぞれにL-グルタミン水溶液1mlと牛胎児血清5mlをピペットで加えて完全培地を作製する。
- ③ EL-4細胞を培養ボトルから、滅菌した50mlプラスチック遠沈管に、ピペットを使って移

し、イーグルMEM液を必要量入れ攪拌する。

- ④ 卓上低速遠心機で1000rpm, 10分遠心し, 上清をピペットで吸い取り捨てる。
- ⑤ 残った細胞ペレットにイーグルMEM液を2 ml加えてピペットで優しく攪拌し, 得られた細胞懸濁液から100 μ l程度を3回サンプリングして, 懸濁液中の生細胞濃度を測定する。
- ⑥ 必要量の細胞懸濁液をマイクロピペットで取り, 前もって完全培地を入れた, 各人9枚の3 cmシャーレに分注し, シャーレ当たり 2×10^4 細胞 $\cdot$ 2 ml完全培地を含むようにする。完全培地のみ2 ml含むシャーレを別に用意し, 使用した培地が微生物に汚染されていないことを確認するために使う。
- ⑦ すべてのシャーレを炭酸ガス細胞培養器に入れ細胞を培養し, 培養開始後, 0 ~ 7日の適当な時点で3枚ずつシャーレを取り, それぞれのシャーレの中の細胞数を測定する。

実験 2

- ① ~ ⑤までのステップは実験1と共通に行う。
- ⑥ 96穴平底マイクロ培養プレートの各穴に 1×10^3 個または 1×10^4 個 EL-4 細胞を含み, 完全培地を0.2ml含むように細胞と培地を各人24穴分注する。
- ⑦ すべてのプレートの細胞を7日間培養し, 細胞の増殖の様子を観察する。

結果は, 実験1では, 実験を実施した13人のうち4人の培養で, 1人10枚の3 cmシャーレのうち1 ~ 2枚に細菌の混入と増殖が認められたのみであった。細胞の増殖の様子は, 実施者により, また, シャーレごとにもばらつき, 増殖がみられず細胞が死滅したシャーレもいくつかあった。図1に, 得られた増殖曲線の例を示す。このように結果がばらついたのは, 主として,

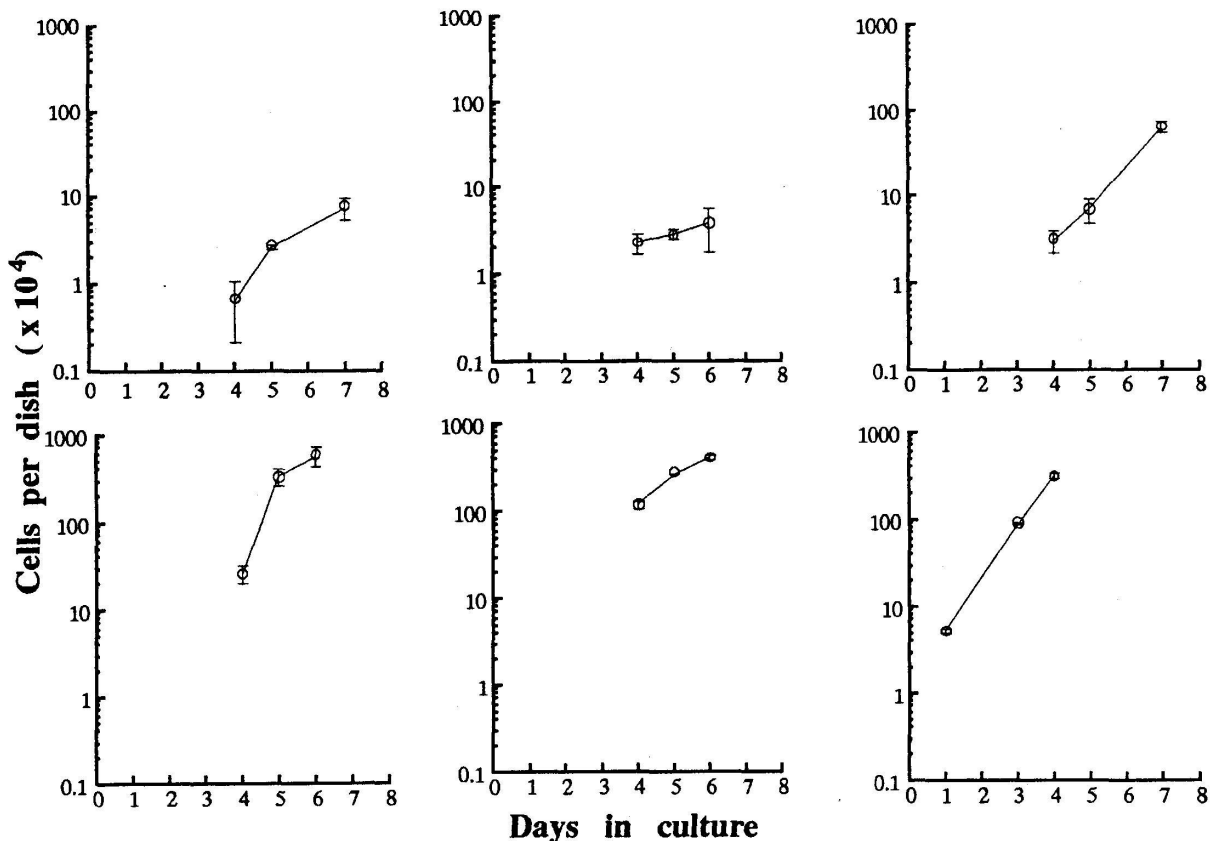


図1 学生実験における培養で得られたEL-4細胞の増殖曲線の例

実施者のピペティングと細胞数測定操作が未熟であったためと思われる。

実験2では、実施した13人のうち実験1とは別の組み合わせの4人の培養で、各人24穴のうち1～2穴に細菌の増殖が認められた。細胞の増殖の様子は実験1と同様、実施者ごとにばらつきがあった。

(2) マウスのリンパ細胞の初代培養とLPS刺激による分化誘導

哺乳類の免疫系を構成するリンパ細胞を初代培養し、そしてB細胞の増殖と分化を誘導する適当な物質（ここではLPSを使用した）で培養を刺激して、ポリクローナルな抗体産生をさせるために、以下の操作をクリーンベンチを使わず通常の実験台の上で行った。

実験1

- ① 各組1匹のマウスを頸椎断裂により瞬時に屠殺し、70%エタノールで体表を体毛ごと清拭して、滅菌したハサミで表皮を切り剥いで、無菌的に胸腺と脾臓を取り出し、イーグルMEM液を入れた6 cmシャーレ内に入れる。
- ② 滅菌したメッシュ、ハサミ、ピンセットを使って胸腺と脾臓それぞれの細胞懸濁液を得る。
- ③ 各懸濁液を、滅菌した適当な厚さの脱脂綿を通過させて、組織の断片や細胞塊を除去して、50mlのプラスチック遠沈管に集める。
- ④ 1000rpm・10分遠心、上清廃棄、イーグルMEM液への懸濁の一連の操作を3回繰り返して細胞を洗浄し、最後に2-メルカプトエタノールを加えた完全培地2 mlに懸濁する。
- ⑤ 得られた2つの細胞懸濁液から、それぞれ100 μ l程度を3回サンプリングして、懸濁液中の有核生細胞濃度（赤血球は数えない）を測定する。
- ⑥ 各組とも、胸腺と脾臓細胞のそれぞれについて 1×10^7 個と 5×10^6 個を、完全培地2 mlを入れた3 cmシャーレ1枚ずつに入れる。
- ⑦ すべてのシャーレを炭酸ガス細胞培養器に入れ7日間培養し、それぞれの細胞の生存状態を観察する。

実験2

- ①～⑤までの各ステップを実験1と同様に行って、濃度の分かった脾臓細胞の完全培地懸濁液をつくる。
- ⑥ 各組とも、1枚につき、 5×10^6 個の脾臓細胞を含んだ2 mlの完全培地を3 cmシャーレ6枚に入れる。
- ⑦ LPSを1 μ g/mlあるいは10 μ g/mlになるようにそれぞれ2枚ずつの脾臓細胞培養シャーレに入れ、残り2枚のシャーレはそのまま対照として、すべてのシャーレを7日間培養し、7日後培養上清を回収し、各上清中の抗体量をELISAで測定する。

結果は、実験1では胸腺細胞の培養で6組のうち2組で1枚ずつのシャーレに、脾臓細胞の培養では6組のうち3組で1～2枚のシャーレに、全体では24枚のシャーレの6枚に細菌の混入が見られた。この実験の目的は、動物の体から胸腺と脾臓を無菌的にとりだし、細胞を培養に移すことであったが、成績は良くなかった。これは、はじめてマウスの免疫臓器を取り出す操作を行ったため、汚染につながる単純ミスが多かったためと思われる。

実験1の成績をふまえて、いっそう注意深く行った実験2では、全36枚のシャーレのうち1枚のみに細菌の混入がみられた。この結果から、各組とも臓器を取り出す手順に慣れて、無菌的に取り出すことに成功したと考えられる。

実験2の主要な目的である、細胞培養による抗体産生細胞の分化誘導に関しては、ほとんどの組でLPSの刺激により対照のバックグラウンドレベルよりも有意に高い抗体産生が誘導できたと考えられる。主な結果を表1にまとめた。

表1 マウス脾臓細胞を LPS とともに培養して誘導した IgM 抗体産生反応の例

組	培養上清中の IgM 抗体量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	LPS 濃度		
	$0 \mu\text{g}/\text{ml}$	$1 \mu\text{g}/\text{ml}$	$10 \mu\text{g}/\text{ml}$
1	39.1	141	96.5
2	26.8	148	95.5
3	49.2	109	69.6
4	31.4	140	71.0
5	22.2	26.6	78.3

(3) 実験室の空気の清浄さについての検討

既報¹⁾の予備的検討は学生実験室ではなく我々の、比較的清潔に保った実験室内で行った。室内の空気はかなり清浄であり、それが予備的検討を成功させた大きな要因のひとつと考えられた。そこで、今回の学生実験で使用した実験室の空気の清浄さについて調べた。これは今回の学生実験のために、実験室を土足で入室する状態から土足禁止で上履使用に切り替えた効果を評価するためもある。完全培地を2mlずつ3cmシャーレ21枚に入れて、3枚は直ちにふたをし、残り18枚を各組が実験操作を行った2つの実験台の上3カ所ずつ、6カ所に均等に振り分けて、ふたをとったまま放置し、5分、15分、30分、60分、90分、そして120分後に均等に3枚ずつふたをしていった。この実験中はそれぞれの台上で、これらのシャーレから20~30cm離れてほかの実験を行い、培養実験の室内条件に近づけた。そして最後の3枚にふたをした後、すべてのシャーレを培養器に入れて7日間培養した。その結果直ちにふたをした3枚には微生物の混入はなく、5分と15分の1枚ずつと30分以上のすべてのシャーレに桿菌様や連鎖球菌様の細菌の増殖がみられた。

IV. 考 察

各組の細胞培養実験における無菌操作の成績を表2にまとめた。実験2の1以外の実験では、既報¹⁾の予備的検討の成績と変わらず、クリーンベンチを使って行った場合にほぼ匹敵する良い成績である。実験2の1で微生物の混入頻度が高い主な原因は、すでにふれたように学生が動物の胸腺、脾臓の摘出の経験がなかったことと考えられる。事実、実験2の2で微生物の混入は激減し、脾臓摘出の経験を2回ほど積んだ成果が現れ、非常に良い成績につながった。

実験室の空気の清浄さは、予備的検討を行った我々の実験室に比べ、かなり悪いと考えられる。我々の実験室では4時間の放置でも4枚のうち3枚は微生物の混入がなかったが、今回の実験室では5分から15分で3枚のうち1枚、30分以上ではすべてのシャーレに混入があった。これは、実験室の清掃の不十分さと実験室の単位面積当たり作業する人数の多さが主な原因と思われる。しかし、このような実験室内の空気条件の悪さにもかかわらず、今回の学生実験の無菌操作の成績は非常に

表2 各組の細胞培養における微生物の混入の頻度

微生物が混入した培養数／全培養数						
実験1の1	4/27	0/18	0/18	0/18	0/18	1/18
実験1の2	1/72	1/48	0/48	0/48	1/48	2/48
実験2の1	1/4	2/4	2/4	0/4	0/4	1/4
実験2の2	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6

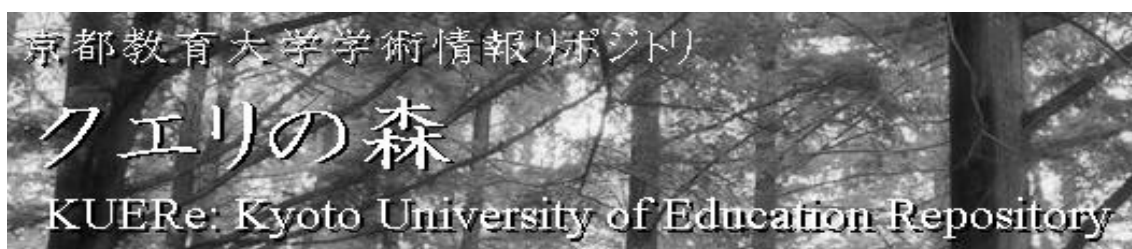
よかったと結論できる。これは、室内の空気に長時間さらされて、しかも操作によって培養液などに直接接触してそれを汚染する可能性がある、ガラスピペットの先端や培養ボトル、遠沈管、耐圧ビンの口とキャップなどを、使用時に必ずガスバーナーで加熱するなど各操作段階の注意点を励行すれば、少々悪い条件下でも無菌操作は十分可能であることを示す。

10人から10数人程度の規模で、通常の実験室でクリーンベンチなしで、基本的無菌操作と細胞培養に関連した基本的な学生実験を行うことが十分可能であると結論できる。ただし、比較的長い時間を必要とする複雑な操作を含む実験にはクリーンベンチが必須であることは明らかであり、実験室に少なくとも1台クリーンベンチがあれば、演示実験をするなり、代表の小人数の学生によって実験を行わせることができる。

この成果をふまえて、来年度以降の生命科学学生実験では、培養した種々の細胞を教材として生きた細胞の諸機能について教育実験を組み立てたい。このような考えにたって、マウスの脾臓細胞を培養し、そのなかから抗体産生細胞を分化させることを試みた。細胞の分化誘導は表1に示すようにほとんどのグループで成功したことは大きな成果であり、この成果を今後の工夫をさらに促す力としたい。

文 献

- 1) 細川友秀, 谷岡直子, 森本容子, 島田 浩, 辻本 学, 早瀬善仁 (1993) 生命科学教育の教材化を目的とした細胞培養法の簡易化. 京教大環境教育年報, 1: 67-72.
- 2) Nishi, Y., Hosokawa, T., Aoike, A., Kawai, K. and Kamahora, T. (1990) Early development of CD8-negative and CD8-positive MHC-unrestricted cytotoxic cells induced by alloantigen inoculation in mice. *Microbiol. Immunol.*, 34: 775-785.
- 3) Hosokawa, T., Hosono, M., Higuchi, K., Aoike, A., Kawai, K. and Takeda, T. (1987) Immune responses in newly developed short-lived SAM mice. I. Age-associated early decline in immune activities of cultured spleen cells. *Immunology*, 62: 419-423.
- 4) Hosokawa, T. and Cinader, B. (1983) Sensitized spleen B cells in tolerance-resisting SJL mice. *Immunol. Lett.*, 6: 51-57.
- 5) 吉田明子, 細川友秀, 西尾真一, 青池 晟, 川井啓市. (1990) マウス脾細胞の抗体産生反応の加齢変化. 日本衛生学雑誌, 45: 773-780.
- 6) 細川友秀, 竹原浩司, 韓 迪, 荻原正示, 青池 晟, 川井啓市. (1993) 水浸拘束ストレス負荷マウスにおける経口トランス導入. 消化器と免疫, 28: 71-76.



この文献は、国立情報学研究所において電子化されたものを、本学でテキスト加工したものです。

