

抗ヒト N-myc タンパク抗体を用いた ヒト胎児中腎の免疫組織化学

東邦大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 安藤 弘教授)

川 原 昌 巳

東邦大学医学部分子生物学研究室 (主任: 嶋武博之助教授)

塚 原 哲 夫, 中 川 千 鶴

IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF HUMAN FETAL MESONEPHROS WITH ANTI-HUMAN N-myc PROTEIN ANTIBODY

Masami KAWAHARA

*From the Department of Urology, Toho University School of Medicine
(Director: Prof. K. Ando)*

Tetsuo TSUKAHARA and Chizuru NAKAGAWA

*From the Department of Molecular Biology, Toho University School of Medicine
(Director: Associate Prof. H. Shimatake)*

Expression of a N-myc gene has been found in Wilms' tumor. N-myc protein, which is a N-myc gene product, can be detected using an anti-N-myc antibody.

Paraffin sections of the fetal tissues at the seventh week of gestation were prepared for immunohistochemistry, stained by PAP method. The N-myc gene product was observed in the cells consisting of the mesonephric ductular wall.

This result may suggest that Wilms' tumor is originated from the mesonephric tissue.

Key words: Human fetal mesonephros, Anti-human N-myc protein antibody, Immunohistochemistry

緒 言

最近癌診断の実用段階にあるものに胎児性癌抗原がある。胎児には存在するが成体には通常存在せず、癌化して再び生ずる抗原で、 α -fetoprotein (AFP)^{1,2)}, carcinoembryonic antigen (CEA)¹⁻³⁾, α_2 H⁴⁾, β f⁵⁾, fetal sulfoglycoprotein antigen (FSA)⁶⁾ などがある。癌細胞では各種の酵素が胎児型に変換するために、これらの癌抗原が生ずると考えられている。これらは単に診断上有用であるだけでなく、発癌機序を考える上に重要な手懸りとなる。

一方、癌遺伝子の発現を調べることも、癌の原因診断に重要である。ここでは、N-myc 癌遺伝子を取り上げ、癌遺伝子による診断への応用について述べる。

N-myc 遺伝子は、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、Wilms 腫瘍および一部の肺小細胞性癌で特異的に発現しており、一般の正常組織には発現がみられない。

したがって、N-myc 遺伝子の発現を検出すれば、上述の N-myc 性腫瘍を同定できる。

癌遺伝子の発現を調べる方法の一つとして、癌タンパクの検出が上げられる。そのためには、癌タンパクに対する特異抗体が必要になるが、癌タンパクに対する抗体は、現状ではまだ一般的でないので、東邦大学医学部分子生物学研究室は、ヒト N-myc 遺伝子特異領域がコードするタンパクに対する抗体を作成し発表して来た⁷⁾。また、正常組織では、N-myc 遺伝子は、胚発生期から胎生期にかけて発現することが、Northern ブロット法で明らかになっている。一方、現在知られている N-myc 発現型の腫瘍は、ほとんどが小児癌のものである。N-myc 発現型の腫瘍と胎児期に生理的に N-myc を発現している細胞の関連を明らかにするために、本抗体を用いて免疫組織化学的にヒト胎児での N-myc タンパクの分布を検索した。

実験方法および材料

(1) N-myc 抗体の作成法⁸⁾

抗体の作成には、抗原を安定して供給することが重要な要点の一つである。東邦大学分子生物学研究室では、ヒト N-myc 遺伝子断片を大腸菌にクローン化し、その遺伝子断片を発現させた大腸菌から、抗原タンパクを精製した。大腸菌内で特定の外来 DNA を発現させるために、環状の発現ベクターに DNA 断片を挿入し、大腸菌を形質転換した。発現ベクターには、ファージラムダの遺伝子の一部が組み込んである (Fig. 1b)。宿主菌 (N4830) は、ファージラムダの欠陥溶原菌であり、32°C の培養条件ではファージラムダの *cl*₈₅₇ リプレッサーが発現している。このリプレッサーは発現ベクターの *O*_L オペレーターに結合し、*P*_L プロモーターの活性を抑制している。したがって、32°C の培養では発現ベクターからの転写は起らない。培養温度を 39°C に上昇させると、*cl*₈₅₇

リプレッサーによる抑制がなくなるため、*P*_L プロモーターが作動する。そして、発現ベクターからの転写が始まり、大腸菌内でタンパクに翻訳される⁹⁾。中川ら⁸⁾が開発した発現ベクター pCA200 は、翻訳の開始点と終了点にそれぞれファージラムダの *cII* と *N* 遺伝子の一部を用いており、両者の間に外来 DNA をクローニングするようになっている。したがって、外来 DNA が挿入された発現ベクターから翻訳されるタンパクは、外来 DNA がコードするタンパクの両端に、それぞれ *cII* タンパクと *N* タンパクの一部をもったサンドイッチ型の融合タンパクとして発現されてくる。抗原となる融合タンパクを安定化させるために、ヒト N-myc 遺伝子断片 (NaeI-RsaI 255 bp) (Fig. 1a) を 3 つ直列につなげて、発現ベクター pCA200 にクローニングし (Fig. 1b)、大腸菌を形質転換した。この大腸菌を 32°C で培養し、39°C、90 分間の熱誘導で産生されてきた 41 kD タンパクを精製した (Fig. 1c)。大腸菌ライゼートを硫酸塩析 14~28

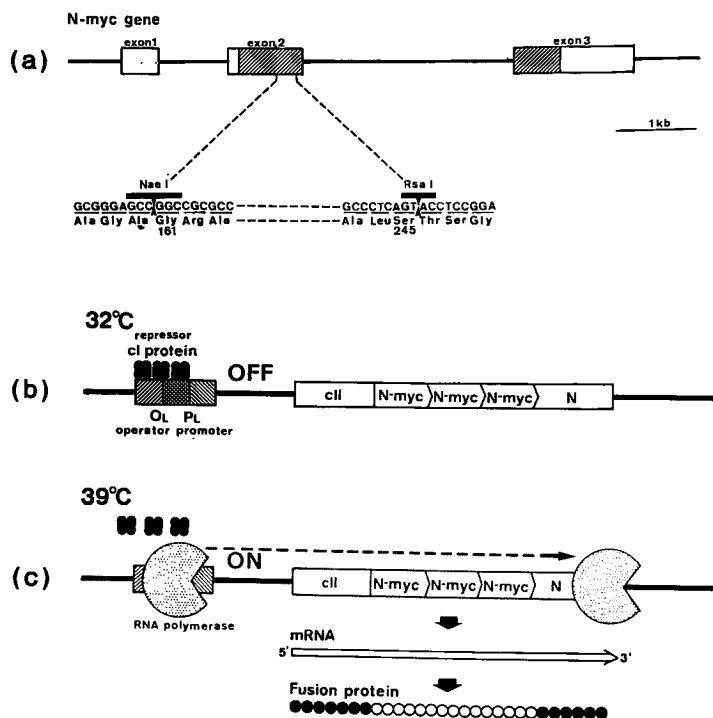


Fig. 1. (a) Human N-myc gene structure (upper row) and DNA fragment used for preparation of antigen (lower row). (b) Partial structure of fusion protein expression vector in which three tandem fragments of N-myc gene (NaeI-RsaI 255bp) are inserted into the expression vector (pCA 200). (c) Thermal induction of *Escherichia coli* transformed by fusion protein expression vector produces fusion protein as a result that *cl* repressor is removed and mRNA is synthesized from *cII* to *N*.

%の範囲の画分を採り, DEAE-Sephacryl 分画の後, CM-Sephadex カラムから 280 mM KCl で溶出されてくる画分を, さらに Sephacryl S-200 で分離した. このようにして, SDS-PAGE のクマシーブルー染色で単一バンドの精製融合タンパクを得た. 精製融合タンパクをニュージーランドホワイト種に 2 週間毎に約 40 μ g/rabbit 皮下投与した. 免疫開始後, 1 カ月以内に抗 N-myc 抗体が得られるようになった. この抗血清の検出感度を抗原タンパクを用いたイムノドットプロット法で調べたところ, 1,000 倍希釈血清で 0.24 ng (6.0 fmol/dot) 以下の検出感度であった. この抗原タンパクは, フェージラムダのタンパクを含んだ融合タンパクであるため, これらに対する抗体も一部抗血清中に含まれている. 抗血清の IgG 画分を発現ベクタータンパク (cII-N 融合タンパク) で吸収することにより, フェージラムダのタンパクに対する抗体を除去し, ヒト N-myc 特異部分に対する抗体を精製した.

(2) 抗 N-myc 抗体による胎児細胞内 N-myc タンパクの検出法

子宮外妊娠と診断され摘出術を施行された第 7 週胎児の全身を許可を得て用い, 対照として, N-myc 遺伝子の増幅がみられるヒト神経芽細胞腫由来の移植株 TNB9 を用いた. 検体を Bouin 固定し, パラフィン包埋後, 胎児左半身の矢状断切片 (6 μ m) を作製し, 腎を含む腹部を 240 μ m 毎に PAP 染色に供した. TNB9 についても 6 μ m のパラフィン切片を作製した. これらの切片を脱パラフィンし, 0.3% H_2O_2 で内因性ペルオキシダーゼを吸収し, その後 4.0% ニワトリ卵アルブミンでブロッキングを行った. 抗 N-myc 抗体 (1/250 希釈) を, 4°C で 12 時間反応させ, phosphate buffered solution (PBS) で洗浄後, 2 次抗体 (抗ウサギ IgG-ヤギ血清, 1/200 希釈) を室温で 3 時間反応させた. 再度 PBS で洗浄後, 3 次抗体 (ペルオキシダーゼ-抗ペルオキシダーゼウサギ血清・PAP complex, 1/200 希釈) を室温で 3 時間反応させた. 発色は, 標本を PBS で洗浄後, 0.1% 3,3'-ジミノベンチジン (DAB)+0.003% H_2O_2 (50 mM トリスバッファー, pH 7.5) で行った. これを蒸留水で洗浄した. 隣接切片をヘマトキシリン-エオジン染色したものを組織学的に同定した.

結 果

(1) ヒト神経芽細胞腫の N-myc タンパク検出

N-myc タンパクは TNB9 細胞の核に局在して検出されたが, 濃染される核と, 薄く染まる核が点在して

いた. 一方, 腫瘍組織の周囲にあるマウスの結合組織や血液細胞などは染色されなかった (Fig. 2).

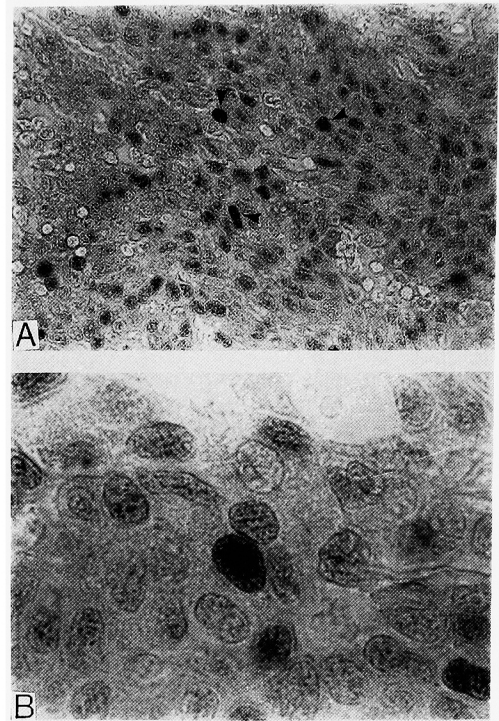


Fig. 2. Immunohistochemistry (PAP method) of human neuroblastoma (TNB9).

A: $\times 200$

B: $\times 680$

(2) 胎児組織の N-myc タンパク検出

中腎内の一層の細胞から成る細管壁細胞に陽性のものが検出されたが, N-myc 陽性細胞の分布は不均一であった. さらに, 管壁の厚い細胞と薄い細胞の両者に陽性のものが存在した. しかし, 糸球体様の構造内や間質細胞には, 陽性細胞はみられなかった. 中腎内で検出された N-myc タンパクの分布は, 細胞核のみでなく, 一部細胞質にも分布していた (Fig. 3).

考 察

現在までに 30 種近くの癌遺伝子が分離され, 腫瘍細胞で増幅例が報告されている. その増幅が腫瘍細胞に対し, どのような意味を持つか未知の部分が多いが, 一般的には, 増幅によって腫瘍細胞は growth advantage を獲得していると推測されている. 一部の癌遺伝子は特定腫瘍に集中して, 増幅が観測され注目されている.

(1) myc 系遺伝子の研究について

myc 系遺伝子のうち, ニワトリの骨髓細胞腫を起

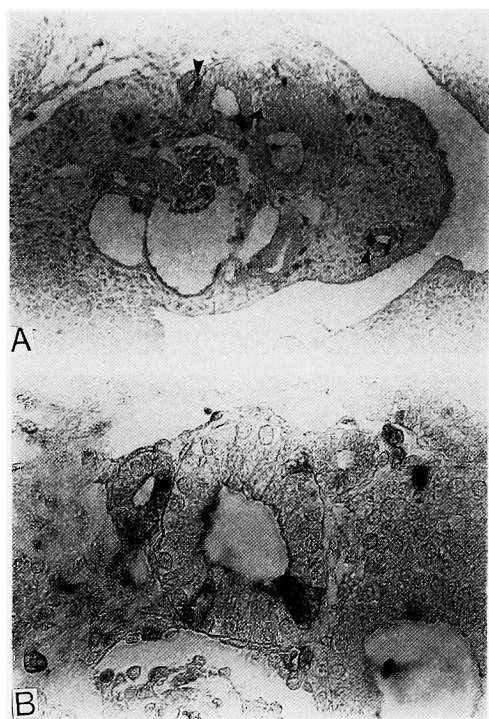


Fig. 3. Immunohistochemistry (PAP method) of human fetal tissue.

A: Sagittal section of mesonephric tissue ($\times 66$)

B: N-myc protein-positive cell detected in mesonephric ductule ($\times 200$)

こすウイルス由来の癌遺伝子としてまず *v-myc* が Fevery ら¹⁰⁾ (1982) により分離された。さらに、*v-myc* 遺伝子と相同性の遺伝子として、ヒト染色体から、*c-myc*¹¹⁾、*N-myc*^{12,13)}、および *L-myc*¹⁴⁾ 遺伝子が分離された。最近では、*L-myc* 遺伝子類似のものとして、*R-myc* や *P-myc* 遺伝子も報告されている¹⁵⁾。これらの *myc* 系遺伝子は、ヒト^{13,16,17)} 以外の動物からも分離されており、*N-myc* 遺伝子はマウス^{18,19)} から、*c-myc* 遺伝子はマウス²⁰⁾、ニワトリ²¹⁾ およびアフリカツメガエル²²⁾ (一部) から分離され、その遺伝子構造が報告されている。これらの *myc* 系遺伝子から予想されるアミノ酸配列を比較すると、相互によく類似している (Fig. 4)。このように、*myc* 系タンパクのアミノ酸配列は明らかにされてきているが、*N-myc* タンパクについて遺伝子構造が明らかになったのは、1986年^{13,16,17)}、*N-myc* タンパクの抗体を用いた研究についての報告はまだ極めて少ない^{23,24)}。

(2) *N-myc* 遺伝子について

N-myc 遺伝子は、癌遺伝子 *c-myc* の第2エクソン

に対し、一部塩基配列の相補性をもつクローンとして、ヒト神経芽細胞腫細胞株から分離された。この遺伝子は、正常細胞では第2染色体 p24 に存在し²⁵⁾、*in vitro* で、*c-Ha-ras* とともにラットの胎仔組織の初代培養細胞にトランスフェクトすると、細胞が腫瘍性増殖を始めるところから癌遺伝子の一つとされている²⁶⁾。*N-myc* 遺伝子の増幅は神経芽細胞腫に特異的であり、約80%に観察されたとの報告がある。増幅程度は、10～700倍であった^{12,27)}。このほかに、*N-myc* 遺伝子の増幅は網膜芽細胞腫²⁸⁾、肺小細胞癌²⁹⁾においても観察されている。また、ヒト泌尿器系腫瘍では、*N-myc* の増幅が一部の Wilms 腫瘍³⁰⁾において観察されている。これらの腫瘍は、*N-myc* 遺伝子の増幅型と非増幅型に分類される。増幅型の腫瘍は、Southern ブロット法で検出できるが、非増幅型の腫瘍はこの方法では正常組織と区別できない。そのため現在では、*N-myc* 遺伝子発現の検出には、Northern ブロット法が行われている。しかし、mRNA の抽出には比較的大量の試料が必要なことと、mRNA の分解が早いことなどの理由から、手術材料を Northern ブロット法で調べることは、困難である。一方、*N-myc* タンパクは分解が非常に迅速に (30～40分) 行われることが知られている²³⁾が、手術材料を可及的速やかに固定すれば、抗 *N-myc* 抗体を用いることによって手術材料でも *N-myc* 遺伝子発現の検索が可能になった⁷⁾。さらに、Wilms 腫瘍などのように *N-myc* 遺伝子の増幅を伴うことの少ない腫瘍でも、その発現をとらえることが可能である²¹⁾。

(3) 抗 *N-myc* 抗体の作成

ヒト *N-myc* タンパクに特異的な抗体を作るには、次の各条件を満足する必要がある⁷⁾。

(i) *c-myc* タンパクと免疫交差しないように、*c-myc* タンパクと相同性のない部分を抗原とする。

(ii) 抗原タンパクには、抗原決定基となるための親水領域を含む。

(iii) 抗原タンパクは、抗体産生に十分な大きさを持つ。

(iv) 大量の抗原タンパクが比較的容易に安定して確保できる。

条件 (i) を満たすために、ヒト *N-myc* タンパクの前半部分から、他の *myc* タンパクと相同性のない部分を選んだ。条件 (ii) を調べるために、ヒト *N-myc* タンパクの親水性を計算した (Fig. 5)。また、充分長いタンパク部分 (条件 (iii)) を考えると、ヒト *N-myc* タンパクの140～250番位の領域に限定されてくる。長いタンパクを大量に得るには、タンパクを大量に

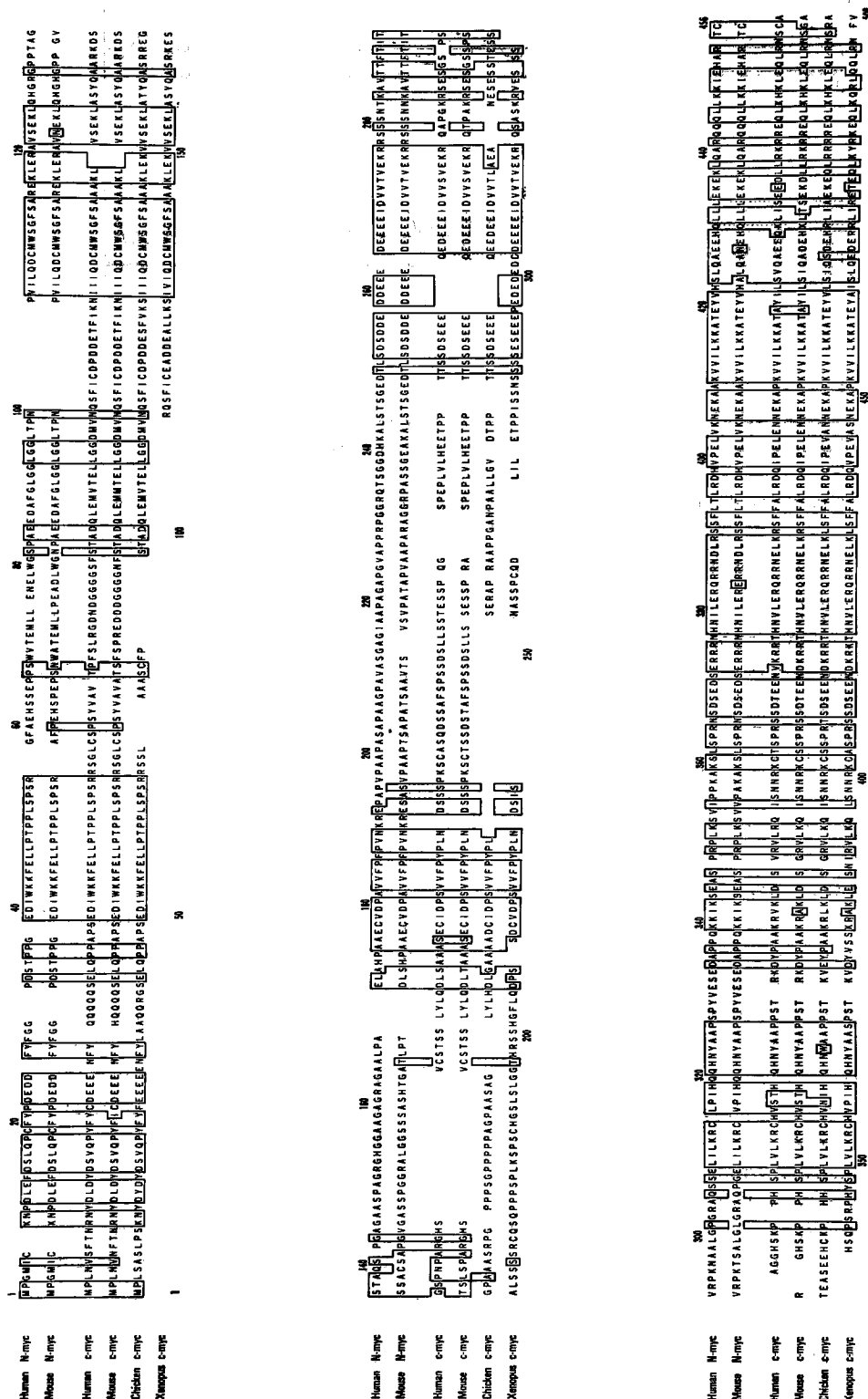


Fig. 4. Comparison of amino acid sequences between N-myc and c-myc proteins. These are amino acid sequences ranging from those in human to *Xenopus* and the amino acids which are common among them and whose natures are resembling each other are surrounded by □. The figures on the top represent N-myc amino acid numbers.

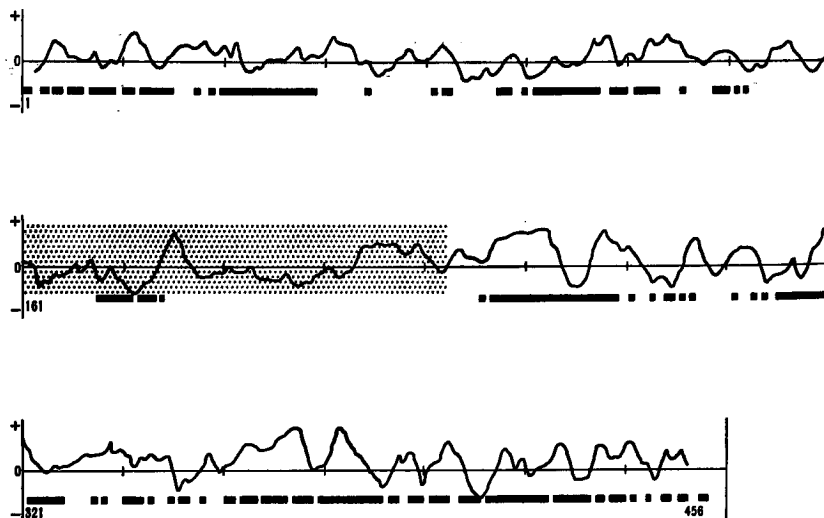


Fig. 5. Hydrophilicity of human N-myc protein. The positions corresponding to the amino acid homologous between the N-myc and c-myc in Fig. 4 are indicated by a thick line (—) and antigen portion by $\square$. The figures represent amino acid numbers.

するより、大腸菌内でこの N-myc タンパクの一部を発現させ、それを精製する方が容易である。このために、ヒト N-myc 遺伝子の断片をクローン化した。ヒト N-myc 遺伝子の塩基配列には、アミノ酸の 161番と 245番に相当する部分に、それぞれ制限酵素 NaeI (GCC*GGC), RsaI (GT*AC) で切断できる部位がある (Fig. 1a)。この NaeI-RsaI 断片は遺伝子コードの読み枠がクローン化する発現ベクター (pCA 200) と一致している。またこの領域には、2カ所の大きな親水部分があるので、抗原とするには適当である。175～190番には他の myc タンパクと相同なアミノ酸配列があるが、この部分は疎水性を示すので、抗原決定基とはなりにくい。ちなみに、抗原タンパクとした 161～245番の部分は c-myc タンパクばかりでなく、マウス N-myc タンパクとも比較的同様性の低い部分でもある。

(4) 胎児組織内 N-myc 遺伝子の検出

N-myc 遺伝子は、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、Wilms 腫瘍など特定の小児悪性腫瘍にのみ出現し、一般の正常細胞内には出現しないとされているので、N-myc 遺伝子が胎児組織内、ことに中腎内の細管壁細胞に認められたことは、興味深いことである。

Bennington (1975)³¹⁾によれば、Wilms 腫瘍の発生には後腎芽説、中腎管説、未分化中胚葉説、多能分割細胞説があるとし、その後実験的に、後腎芽が種々の組織に分化する点が証明され^{32,33)}、現在では後腎芽細胞由来とするのが一般的である。しかし、篠田

ら³⁴⁾は Wilms 腫瘍の発生母組織を下記のように5型に分類している。

第Ⅰ型：腎芽ないしは後腎芽細胞に類似を求めることのできる未熟なもの。

第Ⅱ型：中腎または中腎細胞癌に類似の組織像を示すもの。

第Ⅲ型：後腎芽細胞に由来することの明らかなもので、尿細管様構造の明瞭なもの。

第Ⅳ型：尿細管様構造で、腎蕾に相当する組織成分の認められるもの。

第Ⅴ型：成熟したもので、血管芽 (糸球体様構造) および尿細管構造が明瞭で、未熟な細胞の少ないものの。

以上のごとく、Wilms 腫瘍の発生母組織については、論議の多いところであるが、今回著者が胎児組織の中腎細管壁細胞に N-myc 遺伝子を検出し得た事実は、上述の Wilms 腫瘍の中腎由来説に関連して興味ある結果となった。

結 語

(1) ヒト N-myc 遺伝子特異領域がコードするタンパクに対する抗体を用い、免疫組織化学的にヒト胎児の N-myc タンパクの分布を検索した。

(2) N-myc 遺伝子が、胎児組織内の中腎細管壁細胞に認められた。

(3) Wilms 腫瘍に出現する N-myc 遺伝子が胎児の中腎内に認められたことは、Wilms 腫瘍の中腎由

來說に関連して興味深い結果であった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った、恩師東邦大学泌尿器科学教室、安藤弘教授、松島正浩教授、同分子生物学研究室、嶋武博之助教授および同研究室的の諸先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Klavins JV: Gastrointestinal tumor markers, other than carcinoembryonic antigen, and alpha fetal protein. *Cancer Detect, Prev.* 6(1-2): 131-136, 1983
- 2) Kuusela P, Haglund C, Roberts PJ and Jalanko H: Comparison of CA-50, a new tumor marker, with carcinoembryonic antigen (CEA) and alpha-fetoprotein (AFP) in patients with gastrointestinal disease. *Br J Cancer* 55: 673-676, 1987
- 3) Janssen CW Jr.: Immunoglobulins, complement and carcinoembryonic antigen in patients with gastric carcinoma. *Acta Chir Scand* 535: 1-60, 1987
- 4) Kuhns WJ and Schoentag R: Carcinoma-related alterations of glycosyltransferases in human tissues. *Cancer Res* 41: 2767-2772, 1981
- 5) Weidekamm E, Schwartz DE, Dubach UC and Weber B: Single-dose investigation of possible interactions between the components of the antimalarial combination Fansimef. *Chemotherapy* 33: 259-265, 1987
- 6) Hakkinen IP, Heinonen R, Inberg MV and Viikari SJ: The use of oncofetal antigen FSA in discrimination between benign and malignant gastric ulceration. *Acta Chir Scand* 146: 507-510, 1980
- 7) Shimatake H, Nakagawa C, Kikuchi T and Tsukahara T: Antibody production against genetically engineered human *N-myc* oncogene product, and its clinical application. *Saishin Igaku* 42: 1491-1505, 1987
- 8) 中川千鶴, 塚原哲夫, 菊地孝信, 嶋武博之: 抗 *N-myc* 抗体を用いて神経芽細胞腫を原因診断する. *Bio Medica* 2: 1036-1042, 1987
- 9) Shimatake H and Rosenberg M: Purified λ regulatory protein cII positively activates promoters for lysogenic development. *Nature* 292: 128-132, 1981
- 10) Fevera RD, Gelmann EP, Martinotti S, Franchini G, Papas TS, Gello RC and Wong-Staal F: Cloning and characterization of different human sequences related to the oncogene (*v-myc*) of avian myelocytomatosis virus (MC29). *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6497-6501, 1982
- 11) Hayward WS, Neel BG and Astrin SM: Activation of a cellular onco gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukaemia. *Nature* 290: 475-480, 1981
- 12) Schwab M, Alitalo K, Klempnauer K-H, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M and Trent J: Amplified DNA with limited homology to *myc* cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor. *Nature* 305: 245-248, 1983
- 13) 菊池孝信, 安部千鶴, 嶋武博之: *N-myc* 癌遺伝子の構造解析と大腸菌によるその遺伝子発現系の確立. *生化学* 58: 1027, 1986
- 14) Nau MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, McBride OW, Bertness V, Hollis GF and Minna JD: *L-myc*, a new *myc*-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 318: 69-73, 1985
- 15) Alt FW, Depinho R, Zimmerman K, Legouy E, Hatton K, Ferrier P, Tesfaye A, Yancopoulos G and Nisen P: The human *myc*-gene family. Cold Spring Harbor Symp: 1983 (in press)
- 16) Stanton LW, Schwab M and Bishop JM: Nucleotide sequence of the human *N-myc* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1772-1776, 1987
- 17) Kohl NE, Legouy E, DePinho RA, Nisen PD, Smith RK, Gee CE and Alt FW: Human *N-myc* is closely related in organization and nucleotide sequence to *c-myc*. *Nature* 319: 73-77, 1986
- 18) Taya Y, Mizusawa S and Nishimura S: Nucleotide sequence of the coding region of the mouse *N-myc* gene. *EMBO J* 5: 1215-1219, 1986
- 19) DePinho RA, Legouy E, Feldman LB, Kohl NE, Yancopoulos GD and Alt FW: Structure and expression of the murine *N-myc* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1827-1831, 1986
- 20) Stanton LW, Fahrlander PD, Tesser PM and Marcu KB: Nucleotide sequence comparison of normal and translocated murine *c-myc* gene. *Nature* 310: 423-425, 1984
- 21) Watson DK, Reddy EP, Duesberg PH and Papas TS: Nucleotide sequence analysis of the chicken *c-myc* gene reveals homologous and unique coding regions by comparison with the transforming gene of avian myelocytomatosis virus MC29, Δ gag-*myc*. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2146-2150, 1983
- 22) Taylor MV, Gusse M, Evan GI, Dathan N and Mechali M: Xenopus *myc* proto-oncogene during development: expression as a stable maternal mRNA uncoupled from cell

- division. *EMBO J* 5: 3563-3570, 1986
- 23) Slamon DJ, Boone TC, Seeger RC, Keith DE, Chazin V, Lee HC and Souza LM: Identification and characterization of the protein encoded by the human *N-myc* oncogene. *Science* 232: 768-772, 1986
- 24) Ikegaki N, Bukovsky J and Kennet RH: Identification and characterization of *N-myc* gene product in human neuroblastoma cells by monoclonal antibodies with defined specificities. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5929-5933, 1986
- 25) Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grazeschik KH, Naylor SL, Sakaguchi AY, Brodeur G and Trent J: Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to *c-myc*. *Nature* 308: 288-291, 1987
- 26) Yancopoulos GD, Nisen PD, Tesfaye A, Kohl NE, Goldfarb MP and Alt FW: *N-myc* can cooperate with *ras* to transform normal cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5455-5459, 1985
- 27) Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F and Alt FW: Transcription and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35: 359-367, 1983
- 28) Lee H-W, Musphree AL and Benedict WF: Expression and amplification of the *N-myc* gene in primary retinoblastoma. *Nature* 309: 458-462, 1984
- 29) Nau MM, Brooks BJ, Carney DN, Gazdar AF, Battey JF, Sausville EA and Minna JD: Human small cell lung cancers show amplification and expression of the *N-myc* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1092, 1989
- 30) Nisen PD, Zimmerman KA, Cotter SV, Gilbert F and Alt FW: Enhanced expression of the *N-myc* gene in Wilms' tumor. *Cancer Res* 46: 6217-6222, 1986
- 31) Bennington JL and Beckwith JB: Nephroblastoma, Tumors of the kidney, renal pelvis and ureter. Armed Forces Institute of Pathology: 31-78, 1975
- 32) Bernstein J: Developmental abnormalities of the renal parenchyma. Renal hypoplasia and dysplasia. *Pathol Annu* 3: 213-247, 1968
- 33) Williams AO and Ajayi OO: Ultrastructure of Wilms' tumor (nephroblastoma). *Exp Molec Path* 24: 35-47, 1976
- 34) 篠田昭男, 坂口 弘: Wilms' 腫瘍の組織像について 一腎の発生と比較一. 癌の臨床 13: 1033-1039, 1967

(1987年12月28日迅速掲載受付)