

骨組織培養の基礎的検討及び骨成長に及ぼす 抗生物質の影響

長崎大学医学部整形外科学教室 (主任: 永井三郎教授)

長崎大学風土病研究所病理部 (主任: 登倉 登教授)

田 口 厚
た ぐち あつし

Fundamental examinations of the growth and maintainance media for the Tissue Culture of bones of chick embryo and the effects of antibiotics on the development of bones in vitro. Atsushi TAGUCHI, Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine, Nagasaki University (Director : Prof. Dr. S. NAGAI) and Pathological Department of Reseach Institute of Endemic Diseases, Nagasaki University (Director : prof. Dr. N. TOKURA)

本論文要旨は昭和38年4月2日第36回日本整形外科学会(大阪)で口演発表した。

緒 言

組織培養による分化の研究対象に鶏胚骨軟骨の体外培養が多く使用されているが、その培養法は MAXIMOW, A. (1925) の double cover slip method, FELL, H. B. (1928) の cover slide method, watchglass culture method および BURROWS, A. J. (1933) の hanging drop method 等があり、これらは GEY, G. O. (1933) によって改良された roller tube method へと進展したのに反し、その培養液は塩類溶液に血清および鶏胚浸出液を添加する旧法が常用され、鶏胚浸出液の活性の不安定性や鶏胚日令による浸出液成分の差違及び骨組織の物質代謝の研究に最も障害となる血清の存在など検討すべき点が多い。継代細胞株を用いた栄養要求の検討によって各種アミノ酸、nucleotide や coenzyme を含めた無蛋白合成培地の作成が試みられ、我国でも KATSUTA, H. et al. (1959, 1960) はL細胞およびサル腎細胞を使用した実験で高分子蛋白源として Polyvinylpyrrolidone を血清代用として使用し得る可能性を述べているが、骨軟骨細胞に関するこの方面の検討はほとんど行なわれていない。培養組織と培養法によって最も適した培養液が選択されなければならないが、鶏胚大腿骨の回転培養法に際してその栄養液に添加する鶏胚浸出液の不安定性は GAILLARD, P. J. (1948), 勝田 (1955), KATSUTA, H. (1959, 1960), 清水

(1960) 等も述べているように、著者もしばしば同様の現象を認めた。そこで鶏胚浸出液の代用として lactalbumin hydrolysate および yeast extract (Dibco) の使用の可否を検討した結果、同一製品による限り常に一定した発育率が得られることを知り、また栄養液に含まれる血清の影響の除去の方法の一つとして保持液に1% skim milk 加 Tyrode 液の応用の可能性を検査したので詳述する。また近年各種疾患に対する抗生物質の使用量、使用頻度が増加し LYON, C. (1950) は化膿性骨髄炎に際して penicillin 治療後、病的骨折が増加したことを報じ同様の現象を我国でも石山 (1950), 鈴木 (1950) 等が述べている。従って骨髄炎や骨損傷の抗生物質による治療は軟部組織におけるよりもなお骨軟骨細胞に及ぼす影響が考慮されねばならない。培養細胞に対する各種抗生物質の影響は METZGER, J. F. et al. (1952), 鈴木等 (1953), OISHI, Y. (1956), 中川等 (1953) および井上 (1960) によって鶏胚繊維芽細胞を用い、池田 (1956), 沼尾 (1957) および谷 (1958) は鶏胚前頭骨および家兎骨髄細胞を用い、いずれも cover slide method によって検討されているが、直接骨成長に及ぼす各種抗生物質の影響を観察したものはない。著者は roller tube method による鶏胚大腿骨の組織培養法で penicillin, erythromycin, leucomycin, tetracycline, chloramphenicol,

streptomycin, kanamycin, chromomycin, および mitomycin の9種の抗生物質についてその骨成長に及ぼす影響を検査した。供試抗生物質のうち、特に streptomycin と kanamycin は penicillin と同様な著明な発育促進作用を示し、骨疾患に対するこれらの薬剤の影響による骨脆弱が示唆され、抗腫瘍剤、chromomycin および mitomycin の骨軟骨の及ぼす影響に関しては未だ他に記載はない。また本研究は骨組織の物質代謝、細菌及び寄生虫特に住血吸虫等の毒素成分による骨組織の障害を究明するために行なった基礎実験でもある。

実験材料

鶏胚大腿骨：均一な材料を得るため40~45gの白色レグホン鶏の種卵を実験室内で定法に従って孵化し、

平衡溶液および Tyrode 溶液で充分洗浄したものを磨細し等量の Tyrode 溶液を加え凍結融解を3回繰り返して浸出し 3500r.p.m. 30分間遠心を反復した後、その上澄を採取し-20°Cに凍結して保存した。

血清：健康牛血清の 56°C 30分間加温を3回繰り返して非働化したものを濾過滅菌し-20°Cに凍結して保存した。

Lactalbumin hydrolysate, yeast extract および skim milk：前2者は Difco 製のもの、後1者は雪印製のものを使用し、これらを塩類溶液に溶解し lactalbumin および milk 液は10ポンド10分間高圧滅菌し yeast 液は濾過滅菌した。この際培地内濃度の10倍高濃度のものを作成して所要濃度になるように栄養液を添加した。

第1表 塩類溶液の組成

溶液の種類	g / 1000 ml	NaCl	KCl	CaCl ₂ 2H ₂ O	MgCl 6H ₂ O	MgSO ₄ 7H ₂ O	NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	KH ₂ PO ₄	Glucose	Phenol red
Tyrode		8.0	0.2	0.26	0.1		0.06			1.0	0.02
Simms X7		8.0	0.2	0.15	0.2			0.42		1.0	0.02
Earle		6.8	0.4	0.26		0.2		0.14		1.0	0.02
Gey		7.0	0.37	0.34	0.2	0.7		0.18	0.02	1.0	0.02
Hanks		8.0	0.4	0.18	0.1	0.1		0.12	0.06	1.0	0.02

開卵は時間のずれのないように確実に8日目に行ない無菌的に大腿骨を剝離し、抗生物質を含まないHanks平衡溶液および Tyrode 溶液で再三洗浄したものをを用いた。

血漿：注射筒の内壁を0.02% hepalin 加 Tyrode 液でよく湿らし、鶏翼静脈から採血し直ちに 3000 r.p.m. 20分間遠心した後、上澄を静かに採取した。

塩類溶液：第1表に示される組成の5種類の塩類溶液 (Tyrode, Simms X7, Earle, Hanks, Gey) の10倍濃度溶液をそれぞれ作成し適当量の Chloroform を加え氷室に保存し、用に臨み再蒸溜水で10倍に希釈し10ポンド10分間高圧滅菌した後、予め Seitz 濾過滅菌した7.5% NaHCO₃ 溶液で PH 7.4~7.6 に修正した。

鶏胚浸出液：白色レグホン鶏の種卵の8日目孵化胚を無菌的に取り出し四肢、眼球、嘴を除去し Hanks

抗生物質：Penicillin G (結晶ペニシリンGカリウム, 明治), erythromycin (アイロタイシン, 塩野義), leucomycin (ロイコマイシン, 東洋), chloramphenicol acid succinate (クロロマイセチン, サクシネート, 三共), pyrrolidinomethyl-tetracycline (ホスタサイクリンヘキスト) dihydrostreptomycin sulfate (硫酸ジヒドロストレプトマイシン, 明治), kanamycin sulfate (カナマイシン, 山之内), chromomycin A3 (トヨマイシン, 武田), mitomycin C (マイトマイシン, 協和) を使用した。

実験方法

鶏胚大腿骨の固着：組織培養用中試験管の管底から約3cmの高さに滅菌駒込ピペットで吸い取った2本の鶏胚大腿骨を対照的な位置に附着せしめ、余剰の液

を滅菌濾紙で吸い取り無菌箱に2時間放置して固着せしめた。また特に matrix として血漿の1滴を管壁に出来るだけ薄く拡げ、これに鶏胚大腿骨を静かに置き余剰の液を滅菌濾紙で吸い取り無菌箱内に1時間放置して固着せしめた。この際大腿骨固有の組織液と hepalin 血漿でよく凝固が起って鶏胚浸出液の追加は必要がなかった。

培養法：鶏胚大腿骨の固着後、1管につき1.5 ml の栄養液を静かに注入し滅菌ゴム栓で密栓した培養管を5度の傾斜で roller tube dram に挿入し 12 r. p. m. 37°C で回転培養を行ない、栄養液の更新は特に記載しない限り72時間目毎に行なった。

Lactalbumin hydrolysate, yeast extract および抗生物質の添加：供試薬剤を栄養液に溶解して所要濃度のものを作成し、原則として鶏胚大腿骨培養の初日に栄養液として各試験管毎に1.5 mlずつを加えた。薬剤加栄養液は72時間毎に更新し、その都度新しく作成したものをを用いた。

観察方法：回転培養した各試験管を2, 4, 6, 8日目毎に50倍拡大で接眼レンズ内に収めたmicrometer によって大腿骨の長径を測定し目盛を数値で表わした。(この際 micrometer の26目盛が1mmに相当した。)

発育率の算定：発育率はまず重量を測定する方法があるが、本法には種々の困難が伴うので比較成長価または直線回帰係数のいずれかを適用すべく検討した。比較成長価 (E) は最初の測定値をAとし培養後の測定値をBとすを $E = \frac{B-A}{A}$ 式で表わされるが本式によると培養経過途中の逐次的な骨発育を掌握することが困難であって、かつ供試鶏胚大腿骨の成長は実際には必ずしも直線あるいは曲線を描かないし、また測定日毎に比較成長価を求めたにしても経時的な発育態度を数値として表わすことは困難であって本式による発育率の算定は適当でないと考えられた。直線回帰係数では骨成長の実測値と測定日が相関関係にあるものとすれば発育率は常にこの2つの値のグラフ上の接線の総合値として表わすことが出来る利点がある。毎日の実測値を Y_i 、測定日を X_i とし、 \bar{Y} を Y_i の平均値、 \bar{X} を X_i の平均値とすれば、その回帰係数は

$$\frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum (X_i - \bar{X})^2} = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$$

となり、この係数値によって発育の過程を最もよく表示することが出来る。この際同一条件で培養する骨は長短を問わずその成長した長さの増加を算定の基礎とするわけであるが培養開始前の骨の長さのバラッキを

少なくすることによって、より正確な値が得られるわけである。

発育率の比較判定：一元配置法による分散分析法に従い、各母集団即ち、実験群の有意差を同時に判定した。要因bを栄養液組成の差として変動を求めると、

$$ST(\text{全分散}) = \sum \sum U_i^2 j - \frac{T^2}{N} = a - c.f.$$

$$Sb(\text{級間分散}) = \sum \frac{T_i^2}{n_i} - \frac{T^2}{N} = b - c.f.$$

$$Sw(\text{級内分散}) = ST - Sb$$

$$(c.f. \text{は } \frac{T^2}{N} \text{ で修正項})$$

これから不偏分散を求めると

$$U^2 = \frac{Sb}{K-1}, \quad V^2 = \frac{Sw}{N-K} \text{ となり,}$$

不偏分散比 (F) = $\frac{U^2}{V^2}$ が得られ、このFについてF分布表で5%および1%の値と比較すると要因(b)全体としての有意差の有無が決定され、有意水準5%で有意の場合、不偏分散比の肩に*印を、1%で有意の場合**印を付した。この際同時に行なった実験例のみを比較判定し、実験日を別にし出発材料が異なった場合の実験群の成績は比較しなかった。また特に抗生物質の発育率の比較の場合は抗生物質を含まない栄養液で培養した対照群の発育率と抗生物質の各濃度における発育率と本法に従ってそれぞれ相互に比較し有意差の有無を検定した。なお、いつれの実験においても同一条件で8ないし12本の鶏胚大腿骨を用い、発育率は $\frac{\sum xy}{\sum x^2}$ を100倍したものの平均を使用して計算に便ならしめた。

実験成績

I 骨組織培養の基礎的検討

予備実験：鶏胚大腿骨を孵化卵の鶏胚から剝離して採取する場合、常に骨周囲の結合組織が同時に附着して得られ培養時に特に繊維性細胞の存在は骨成長を妨げることが予想されたので、まず結合組織の除去が必要と思われた。このため始めに trypsin による結合組織の消化を試みた。鶏胚の下肢を眼科用ピンセットで膝関節より離断させると、大腿骨末梢端がわずかに露出し、これを静かに末梢方向に引き出すと骨の周囲に結合組織が附着したまゝ取り出される。前以って滅菌三角コルベンで37°Cに保った、0.2% trypsin 加 Puck 溶液 (NaCl 8.0g, KCl 4.0g, glucose 10.0g, 7.5% NaHCO₃ 5.0ml Aq.1000ml) に剝離した骨

を浮遊させ magnetic stirrer で攪拌しつつ消化した。5分間の消化では結合組織は充分除去されなかったが、10分間の消化で結合組織は完全に除去された反面、培養による骨成長がほとんど見られず、また0.1%溶液を使用した場合は消化はほとんど認められず、trypsin による結合組織の消化除去は適当でないことがわかった。従って結合組織の除去は滅菌シャーレ内でピンセットで充分除去するという熟練によるほかはなかったが、幸いにも残された結合組織は培養初期に著明な発育を示すものの、2日目以後培養が進むにつれて徐々に骨周囲より剝離し最後には骨軟骨のみが発育するということがわかったので以下の実験はもっぱら技術的に骨に損傷を与えないようにし、出来るだけ結合組織の除去に努めた。

塩類溶液の検討：Earle, Tyrode, Simms X 7, Gey, Hanks の各溶液に10%の割合で牛血清および20%の割合に鶏胚浸出液を加えたものについて、matrix を培養試験管のガラス壁として実験を行なった。培養成績は第2表、第1図に示すように Tyrode 液が最も良好な発育率を示し他の溶液に比し明らかに有意差をもっていた。従って以下の実験にはすべて Tyrode 溶液を用いることとし、かつ特別な場合を除いて抗生物質の添加も行なわなかった。

第2表 栄養溶液の検討

$\sum xy$	T	H	E	G	S
$\sum x^2$	676**	589	529	634	591

分散分析表

	s.s	d.f	m.s
ST	955107.78	44	
Sb	520631.40	4	130157.85**
Sw	434476.38	40	1086.19

$F = 11.98$

備考：T…Tyrode 溶液

H…Hnaks 溶液

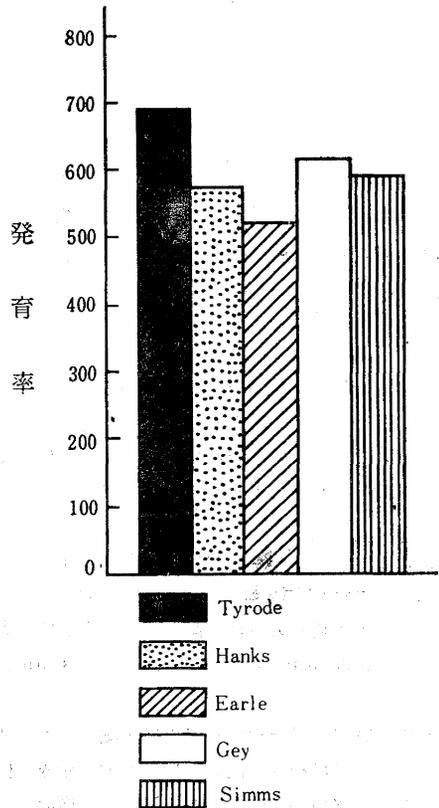
E…Earle 溶液

G…Gey 溶液

S…SimmsX7 溶液

上欄**は1%以下の危険率で有意差を示した場合を示し、以下の各表には本表に準じて符号を記した。

第1図 各種塩類溶液による骨発育



牛血清濃度の影響：健康成牛血清を、1, 5, 10, 20, 40, 60%の割合にそれぞれ Tyrode 液に加えたものを栄養液として鶏胚大腿骨を培養した成績は第3表、および第2図に示されるように血清濃度20%の場合が最も発育率が高く、10%、40%および60%ではほとんど同程度の発育率であってこの間に有意差は認められなかった。

第3表 血清濃度の検討

$\frac{\sum x^2}{\sum xy}$	血清濃度					
	1%	5%	10%	20%	40%	60%
	491	599	716	847*	716	690

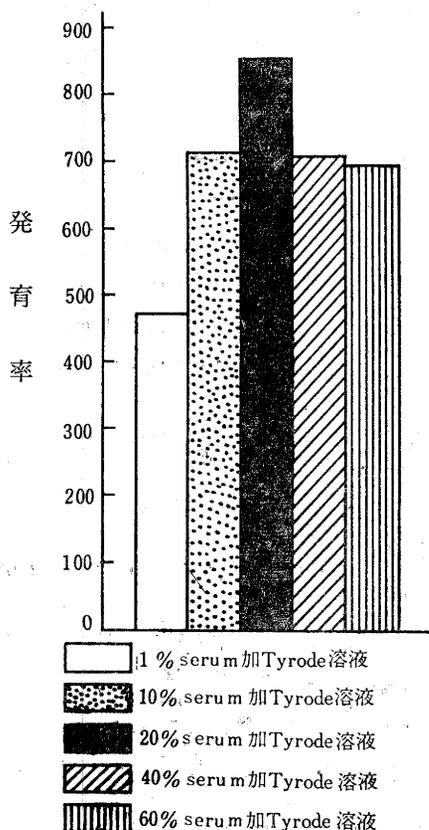
分散分析表

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	2568239.82	53	
S b	653661.10	5	130732.22*
S w	1914578.72	48	

F = 3.28

備考：上欄中*は5%以下の危険率で有意義を示した場合を示し、以下の各表は本表に準じて符号を記した。

第2図 骨発育に及ぼす血清濃度の影響



鶏胚浸出液 (以下 c.e.e. と記す) の濃度と骨発育との関係：鶏胚組織の培養には鶏胚組織浸出液が不可欠のもので追試の意味も含めてその至適濃度を再検討した。

c.e.e. を 10, 20, 40, 60% の割合にそれぞれ 10% serum-Tyrode 液に添加して行なった成績は第4表

および第3図に示されるように c.e.e. 20%濃度が有意差をもって最も高い発育率を示した。

第4表 c.e.e. の濃度の検討

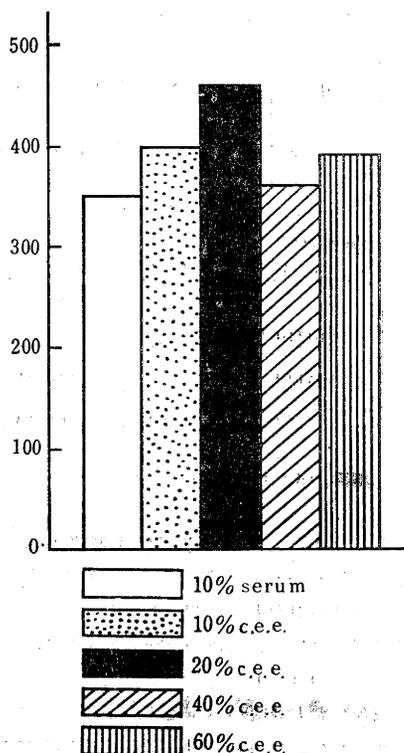
Σxy	c. e. e. の濃度				
	0%	10%	20%	40%	60%
Σx^2	360	410	446**	365	391

分散分析表

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	739138.84	55	
S b	387457.58	4	96864.40**
S w	351681.26	51	6895.71

F = 14.04

第3図 骨発育に及ぼす鶏胚浸出液の影響



備考：10% serum 加 Tyrode 液に c.e.e. の各濃度を添加したものを栄養液とした。

Lactalbumin hydrolysate の添加濃度と骨成長との関係：鶏胚浸出液は毎常一定したものが得られるものではなく孵化日数，浸出条件および保存法等によってその発育促進作用に差があるといわれているので入手が容易でかつ溶液作成に便利である lactalbumin hydrolysate の代用の可能性を検討することとした。前もって添加濃度の10倍濃度 lactalbumin hydrolysate の水溶液を10ポンド10分間高圧滅菌し冷却した後10% serum-Tyrode 液で所要濃度としたものを使用した。Lactalbumin hydrolysate の添加濃度が0.01, 0.05, 0.5および1.0%の場合の鶏胚大腿骨の培養成績は，第5表，および第4図に示されるように添加濃度の上昇に伴い高い発育率を示したが，1.0%以上の濃度は lactalbumin hydrolysate が析出するため実験に使用することが出来なかった。また lactalbumin hydrolysate の添加濃度を0.01, 0.05, 0.5% とし実験を反復したがその成績は全く同様であった。

第5表 Lactalbumin hydrolysate の濃度の検討

$\frac{\sum xy}{\sum x^2}$	Lactalb. hydr. の濃度				
	0 %	0.01%	0.05%	0.5%	1.0%
	255	446	578	667	840**

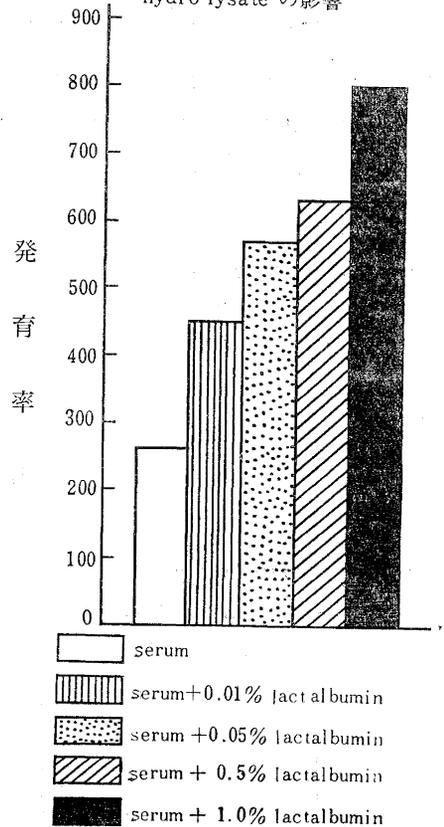
分散分析表

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	1640249.57	57	
S b	833472.35	3	277824.12**
S w	806777.22	54	14940.32

F = 18.595

Yeast extract の骨発育に及ぼす影響：Lactalbumin hydrolysate が鶏胚大腿骨の発育に好影響を与えることは前項の実験で明らかであったが，なお種々の栄養源に富む Yeast extract を10% serum-Tyrode 液に0.1, 0.5, および1.0%になるように添加して行なった実験成績は第6表，および第5図に示される。0.1% Yeast extract 加の場合最も高い発育率が得られ0.5%および1.0%加の場合鶏胚大腿骨の発育は著しい阻害をうけた。

第4図 骨発育に及ぼすLactalbumin hydrolysate の影響



第6表 Yeast extract の濃度の検討

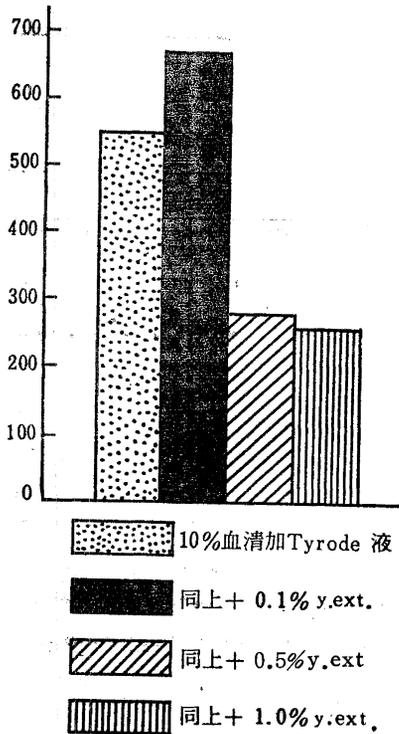
$\frac{\sum xy}{\sum x^2}$	Yeast extract の濃度			
	0 %	0.1%	0.5%	1.0%
	568	673**	288	261

分散分析表

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	1955318.92	36	
S b	1172492.04	3	390830.68**
S w	782826.88	33	23722.03

F = 16.48

第5図 骨発育に及ぼす yeast extractの影響



Growth medium として skim milk 加10% serum-Tyrode 溶液の検討: skim milk の添加濃度を, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0% として培養した。まず培養試験管壁を matrix とした場合回転培養で始めに固着せしめた大腿骨は培養日数の経過と共に剝離して骨成長の測定が出来なかつたので heparin 血漿による固着後, 実験を反復した。その成績は第7表, 分散分析表(B)および第6図, から明らかなように1.0および2.0%の場合やゝその発育率は高かつたが推計学的には有意差は認められず, 10% serum-Tyrode 液の場合に劣ることがわかつた。(分散分析表(A))

第7表 Skim milk の濃度の検討

$\frac{\sum xy}{\sum x^2}$	Skim milk の濃度					
	0%	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%	4.0%
	547**	311	379	450	442	401

(A) 分散分析表

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	1142310.35	57	
S b	316307.85	5	63261.57**
S w	826002.50	52	15884.66

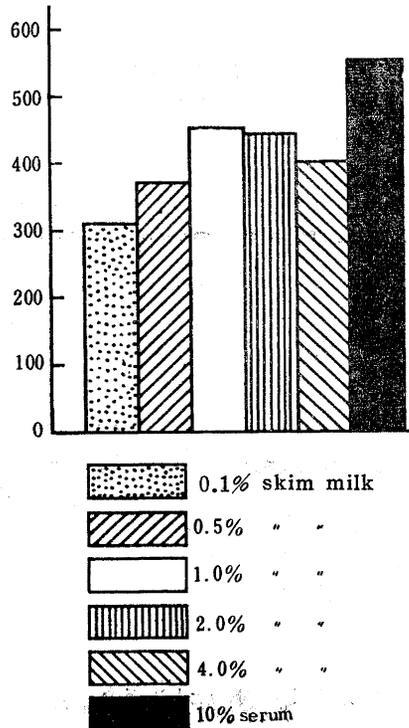
$F = 3.982$

(B) 分散分析表

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	848999.48	47	
S b	130359.48	4	32589.87
S w	718640.00	43	16712.56

$F = 1.950$

第6図 骨発育に及ぼす skim milk の影響



Lactalbumin hydrolysate および yeast extract の c.e.e. 代用の試みと maintenance medium とし て 1% skim milk 加 Tyrode 液の応用の検討 : Lactalbumin hydrolysate および yeast extract が鶏胚大腿骨の発育に著明な促進作用を示したので (第5表および第6表) 両者の組み合わせによる骨発育を10% serum-Tyrode 液, これに10% c.e.e. を加えたもの, さらに1% skim milk を重加したものと三者を対照として比較検討した。また maintenance medium に含まれる血清が skim milk で代用されるとすれば medium 中に添加された種々の物質の骨発育に及ぼす影響を観察する際、血清加の場合より比較的端的にその影響を吟味出来る利点があるので1% skim milk 加 Tyrode 液を応用し得るかを同時に検討することにした。反復した実験のうち第1回目の実験成績は第8表, および第7図に示されるように、10% c.e.e. 加 10% serum-Tyrode 液, 0.5% lactalbumin hydrolysate 0.1% yeast extract 加 10% serum-Tyrode 液, 1% skim milk 加 10% c.e.e.-Tyrode 液, および10% c.e.e. 加 10% serum-Tyrode 液で1日培養後 maintenance medium とし て 1% skim milk 加 Tyrode 液を応用した場合、その成績は四者間で有意差が認められず、10% c.e.e. 加 10% serum-Tyrode 液に1%の割合に skim milk を添加した場合僅かに発育率の低いことが注目された。同種の実験を作成日を異にした c.e.e. を用いて行なった成績は第9表および第8図に示されるように前回の実験に比し、10% c.e.e. 加 10% serum-Tyrode 液は他の栄養液より優れ、0.5% lactalbumin hydrolysate, 0.1% yeast extract 加 10% serum-Tyrode 液がこれに次ぐ成績を示した。本項の実験から種卵の種類、孵化日数および鶏胚浸出液の作成方法を同じくしても c.e.e. の発育促進作用に著しい変動を示したが、lactalbumin hydrolysate および yeast extract の併用は本項の実験におけるように、c.e.e. 加の場合に劣るとはいえ、常に10% serum-Tyrode 液に優れ、かつ c.e.e. 作成の繁雑さやその発育促進作用に著しい変動があるのに比べると、市販品としての入手が簡便であること、およびその発育促進作用は c.e.e. の場合のように変動がなく一定した成績が得られることなどから両者は栄養液内添加物として充分使用出来ることがわかった。また10% c.e.e. 加 10% serum-Tyrode 液で1日培養し Tyrode 液で鶏胚大腿骨を再三洗浄した後、maintainance medium とし て 10% skim milk 加 Tyrode 液で栄養液の更新を行なったとこ

ろ10% serum-Tyrode 液の場合より骨発育はよく保たれたが、10% c.e.e. 加の場合や lactalbumin hydrolysate および yeast extract 添加の場合の骨発育には及ばないことがわかった。

第8表 growth 及び maintainance medium の検討

Σxy	medium			
	A	B	C	D
Σx^2	462	558	501	493

分散分析表

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	572261.76	33	
S b	43934.65	3	15333.34
S w	528327.11	30	17610.90

$F = 0.831$

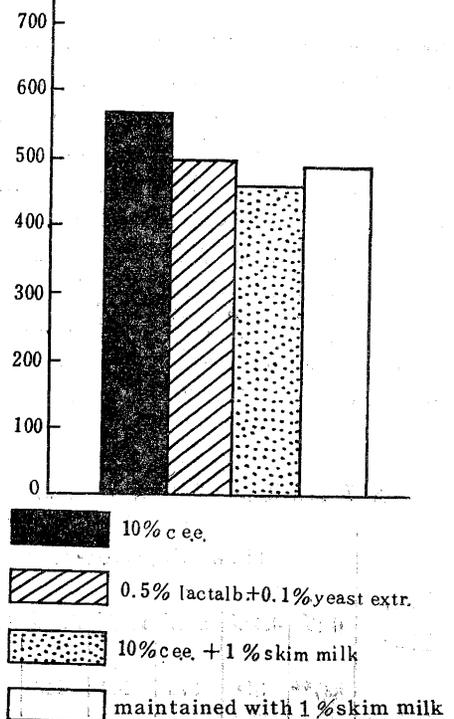
備考: A...10% c.e.e + 1% skim milk

B...10% c.e.e.

C...maintained 1% skim milk

D...0.5% lactalb. + 1% yeast extract

第7図 Lactalb. hydr. と yeastextr. の c.e.e. 代用の試み及び maintainance med. に skim milk 加 Tyrode 液の応用の検討



第 9 表 栄養液及び保持液の検討

要 因	$\sum xy / \sum x^2$
(A) Tyrode + serum	194
(B) (A) + c.e.e.	468
(C) (A) + albumin + yeast extr.	253
(D) maintained with 1% skim milk	290

分散分析表 1 (B : A)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	499385.94	15	
S b	301126.56	1	301126.56**
S w	198259.38	14	14161.38

F = 21.263

分散分析表 2 (B : C)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	470625.00	15	
S b	338913.00	1	338913.00**
S w	131712.00	14	9408.00

F = 36.023

分散分析表 3 (B : D)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	471523.44	15	
S b	126914.06	1	126914.06**
S w	344609.38	14	2461.96

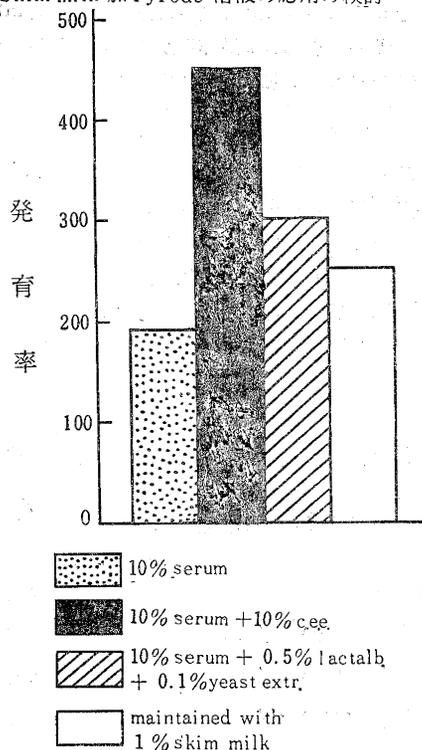
F = 5.155

II 鶏胚大腿骨の発育に及ぼす各種抗生物質の影響について

同一系統の種鶏の種卵を用い同じ孵化日数の鶏胚を使用し、同様の条件下で作成した c.e.e. を Tyrode 液に添加した栄養液でも鶏胚大腿骨の発育に著しい変

第 8 図

Lactalbumin hydrolysate と Yeast extract の C.e.e. 代用の試み及び maintenance medium に Skim milk 加 Tyrode 溶液の応用の検討



動がみられ実験成績の動揺が予想されるのに反して、lactalbumin hydrolysate および yeast extract の併用は栄養液作成が c.e.e. に比して容易であり、かつ鶏胚大腿骨の発育にも一定した促進作用がみられるので以下の実験はすべて 0.5% lactalbumin hydrolysate, 0.1% yeast extract 加 10% serum-Tyrode 液を栄養液として使用した。なお、この際鶏胚大腿骨を 10% c.e.e. 加 10% serum-Tyrode 液で 1 日培養後 maintenance medium には牛血清の代りに 1% skim milk を使用して栄養液の更新を行なった場合、10% serum-Tyrode 液の場合より骨発育はよく保たれるが c.e.e. 加および lactalbumin hydrolysate および yeast extract の併用の場合に劣るので今後検討すべき点があると考えられ本実験には使用しなかった。

供試した抗生物質は主として抗球菌作用を示す penicillin, erythromycin および leucomycin, 球菌及び桿菌の発育阻止作用をもつ chloramphenicol および tetracycline, 主として抗結核剤として

使用される streptomycin および kanamycin, 制癌作用を持つ mitomycin C および chromomycin A 3 の 4 群である。

Penicillin, erythromycin および leucomycin の影響: penicillin の作用は最も特異で 1000 u/ml 加の場合骨発育の著しい促進作用が認められたが 10000 および 50000 u/ml 加の場合に急激に著明な骨発育の抑制が認められた。(第10表, 第9図)。

Erythromycin および leucomycin はほとんど同様の傾向を示し 10 mcg/ml まではその影響が認められなかったが, 50 mcg/ml でそれぞれ骨発育は抑制された(第11表および第12表, 第8図)すなわち penicillin 10000 u/ml とまた前者 50000 u/ml の抑制は後者 100~500 mcg/ml に匹敵することがわかった。

第 10 表 骨発育に及ぼす Penicillin の影響

Penicillin の濃度	$\Sigma xy / \Sigma x^2$
(A) non	492
(B) 100 u / ml	527
(C) 1000 u / ml	702
(D) 10000 u / ml	297
(E) 50000 u / ml	100

分散分析表 1 (A : C)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	519527.28	21	
S b	241692.28	1	241692.28**
S w	277835.00	20	13891.75

$$F = 17.398$$

分散分析表 2 (A : D)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	392173.81	21	
S b	162422.90	1	162422.90**
S w	229750.91	20	12092.15

$$F = 13.432$$

第 11 表 骨発育に及ぼす leucomycin の影響

leucomycin の濃度	$\Sigma xy / \Sigma x^2$
(A) non	391
(B) 0.05 mcg / ml	359
(C) 0.5 mcg / ml	355
(D) 5 mcg / ml	308
(E) 50 mcg / ml	227
(F) 500 mcg / ml	112

分散分析表 (A : E)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	321205.00	19	
S b	133036.81	1	133036.81**
S w	188168.19	18	10453.79

$$F = 12.726$$

第 12 表 骨発育に及ぼす erythromycin の影響

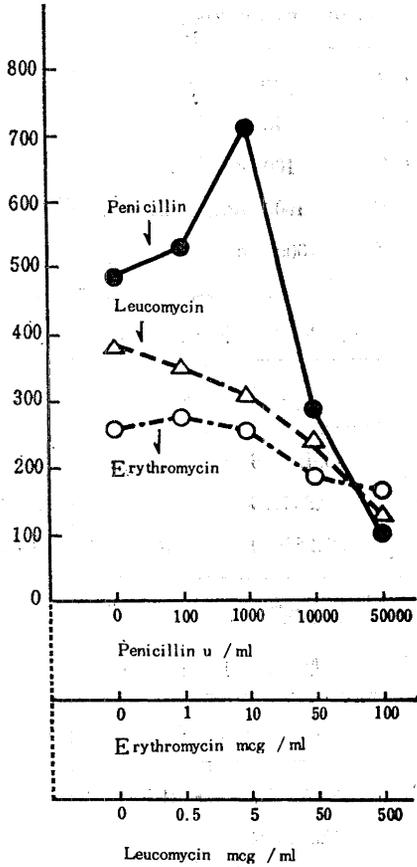
erythromycin の濃度	$\Sigma xy / \Sigma x^2$
(A) non	255
(B) 1 mcg / ml	272
(C) 10 mcg / ml	252
(D) 50 mcg / ml	195
(E) 100 mcg / ml	188

分散分析表 (A : D)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	66236.37	21	
S b	19636.37	1	19636.37**
S w	46600.00	20	2330.00

$$F = 8.42$$

第9図 鶏胚大腿骨の發育に及ぼすPenicillin, Erythromycin, Leucomycin の影響



Chloramphenicol および tetracycline の影響 :
 chloramphenicol の場合, 1 mcg/ml で骨發育は全く阻害されたが(第13表, 第10図), tetracycline の場合 10 mcg/ml までその影響はほとんど認められず 50 mcg/ml でやゝ抑制され, 100 mcg/ml ではじめて著明な抑制が認められた(第14表, 第10図). 即ち tetracycline の影響は比較的緩徐であるが chloramphenicol は骨發育に抑制的であることがわかった.

第13表 骨發育に及ぼす chloramphenicol の影響

chloramphenicol の濃度		$\Sigma xy / \Sigma x^2$
(A)	non	235
(B)	1 mcg / ml	100
(C)	10 mcg / ml	117
(D)	100 mcg / ml	90
(E)	1000 mcg / ml	62
(F)	10000 mcg / ml	37

分散分析表 (A : B)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	272065.79	18	
S b	85193.91	1	85193.91*
S w	186871.88	17	10992.46

F = 7.750

分散分析表 (A : C)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	277895.00	19	
S b	67450.20	1	67450.20*
S w	210444.80	18	11691.38

F = 5.769

第14表 骨發育に及ぼす tetracyclin の影響

tetracyclin の濃度		$\Sigma xy / \Sigma x^2$
(A)	non	536
(B)	1 mcg / ml	526
(C)	5 mcg / ml	514
(D)	10 mcg / ml	585
(E)	50 mcg / ml	418
(F)	100 mcg / ml	224

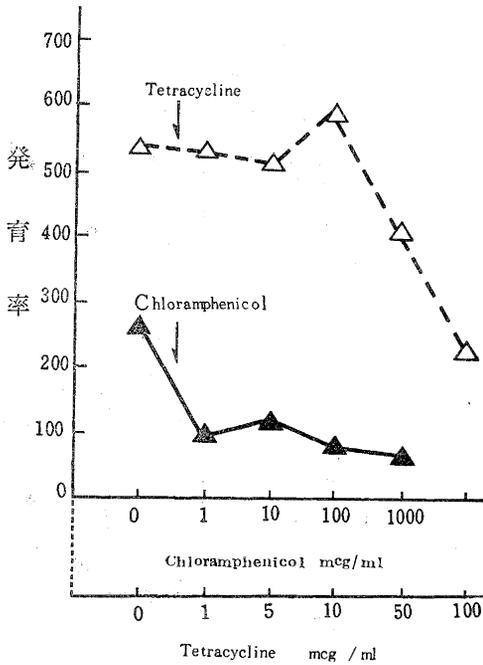
分散分析表 (A : E)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	238900.00	23	
S b	88868.57	1	88868.57**
S w	150031.43	22	6819.61

F = 13.03

第10図

鶏胚大腿骨の発育に及ぼす Chloramphenicol 及び Tetracycline の影響



Streptomycin および kanamycin の影響：成績は第15表、第16表および第11図に示されるように両者の作用は全く対蹠的であって、streptomycin の場合 100 mcg/ml で軽度に、10000 mcg/ml では著明に抑制され、penicillin と類似の作用傾向を示したが、kanamycin の場合は濃度の増加に伴い骨発育は増大し 1000 mcg/ml で著しく促進されるという特異な作用態度が認められた。

第15表 骨発育に及ぼす streptomycin の影響

streptomycin の濃度	$\Sigma xy / \Sigma x^2$
(A) non	456
(B) 10 mcg / ml	433
(C) 100 mcg / ml	560
(D) 1000 mcg / ml	404
(E) 10000 mcg / ml	78

分散分析表 (A : C)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	391812.50	17	
S b	48302.50	1	48302.50
S w	343510.00	16	21469.38

F = 2.249

分散分析表 (A : E)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	756345.00	19	
S b	685540.83	1	685540.83**
S w	70704.17	18	3933.57

F = 174.279

第16表 骨発育に及ぼす kanamycin の影響

kanamycin の濃度	$\Sigma xy / \Sigma x^2$
(A) non	253
(B) 1 mcg / ml	275
(C) 10 mcg / ml	331
(D) 100 mcg / ml	321
(E) 1000 mcg / ml	577

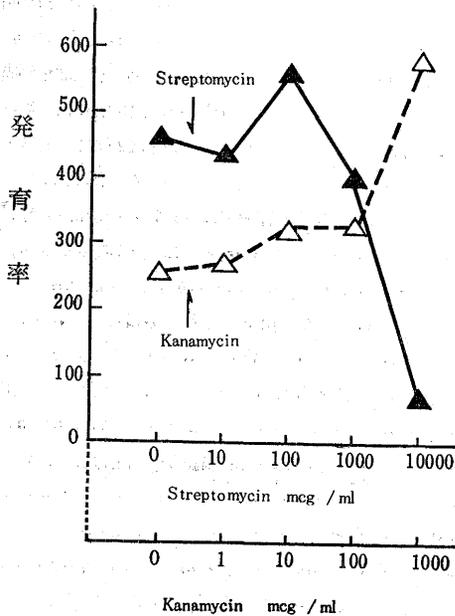
分散分析表 (A : E)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	626373.44	15	
S b	417639.06	1	417639.06**
S w	208734.38	14	14909.60

F = 28.011

第11図

鶏胚大腿骨の発育に及ぼす Streptomycin 及び Kanamycin の影響



第17表 骨発育に及ぼす chromomycin の影響

chromomycin の濃度	$\Sigma xy / \Sigma x^2$
(A) non	417
(B) 0.1 mcg / ml	129
(C) 0.5 mcg / ml	155
(D) 1 mcg / ml	158
(E) 10 mcg / ml	165
(F) 50 mcg / ml	51

分散分析表 (A : B)

	s. s.	d. f.	m. s.
S T	531745.24	20	
S b	425500.00	1	425500.00**
S w	106245.15	19	5591.85

F = 76.092

第18表 骨発育に及ぼす mitomycin の影響

mitomycin の濃度	$\Sigma xy / \Sigma x^2$
(A) non	489
(B) 0.1 mcg / ml	441
(C) 1 mcg / ml	306
(D) 10 mcg / ml	110
(E) 100 mcg / ml	81

分散分析表 (A : C)

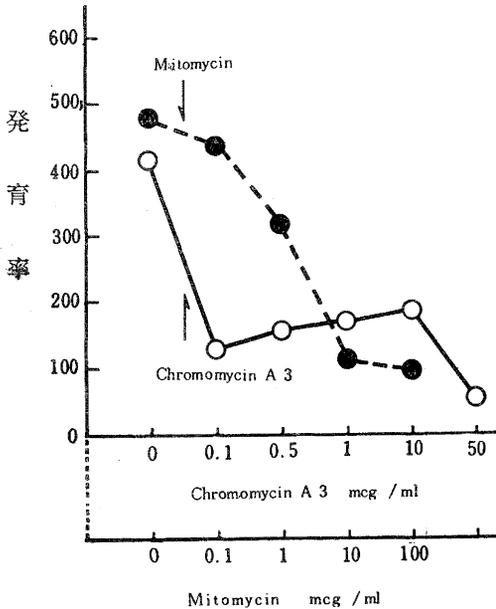
	s. s.	d. f.	m. s.
S T	380828.58	20	
S b	176465.85	1	176465.85**
S w	204362.73	19	10755.93

F = 16.406

Chromomycin A 3 および mitomycin C の影響:
 chromomycin A 3 は 0.1 mcg/ml で既に著明な骨発育の抑制を示しその抑制作用が強いが(第17表および第12図), mitomycin C の場合, 0.1 mcg/ml では殆んど影響がなく, 1 mcg/ml でやや抑制され, 10 mcg/ml で chromomycin A 3, 0.1 mcg/ml と同程度の抑制が認められ(第18表および第12図), mitomycin C は chromomycin に比べるとその骨発育に同程度の抑制作用を示すに至るまでに10倍の開きがあって, 前者の作用が比較的緩徐であることがわかった。

第12図

鶏胚大腿骨の発育に及ぼす Chromomycin A 3
及び Mitomycin の影響



考 察

骨軟骨の体外培養は MAXIMOW (1925) による double cover slip method, FELL, H. B. (1928) の cover slip method, および watch glass culture method, BURROW, H. J. (1933) の hanging drop method が試みられていたが, GEY, G. O. (1933) によって改良された roller tube method は培養組織が栄養液と空気に交互に接し液の攪拌も同時に行なわれ培養組織細胞の成長にきわめて好適であるという利点があって, 骨軟骨の組織培養にも応用されるに至り, 化骨の機序や骨組織の物質代謝に関する多くの知見が加えられた。鶏胚骨軟骨の組織培養は人骨の場合のモデル実験として広く使用されるが骨組織の物質代謝の研究の進展にもかかわらずその栄養液は Gey, Tyrode, Simms, Hanks 等の塩類溶液に血清および鶏胚浸出液を添加する旧法が常用されていてこの方面の改良はあまり行なわれていない。培養組織および細胞の種類によりその培養法に適する栄養液を選択すべきことは当然であるが, 特に培地内の添加物質の骨成長に及ぼす影響を検索するに当って栄養液の組成は最も考慮を要するもの一つである。著者はこのような考えから骨発育の成績が一定して得られ, 製品の入手および栄養液の作成が容易で,

かつ添加した薬物の影響を直截的に知り得る栄養液ないし保持液の作成に主眼を置いて, 常用の栄養液(塩類溶液+血清+鶏胚浸出液)を検討した後, 骨成長に及ぼす各種抗生物質の影響を検査した。

古くから細胞増殖の足場として血漿の必要性が唱えられ, 血漿の代用として種々の方法も考察されたが回転培養法の改良に伴って栄養液の検討に先立って matrix の要否並びに同時に増殖するであろう結合組織細胞の除去について検討する必要がある。その結果, 既述の予備試験で明らかなように, matrix は直接管壁でよいこと, 結合組織は培養経過と共に脱落し骨成長が認められることがわかった。鶴海 (1958) は鶏胚鞏膜軟骨, 上顎骨, 脛骨等を trypsin で処理し軟骨細胞の組織外遊出や発育の程度を観察し培養後期には fibroblasten と同様の形態をとると述べているが著者の場合, 骨軟骨の trypsin 処理は鶏胚大腿骨の成長を著しく阻害したので特別な目的がない限り骨軟骨の培養には trypsin 処理は行なわない方がよいと考えられる。常用の栄養液について, 塩類溶液, 血清濃度, および鶏胚浸出液の濃度を追試の意味も含めて検討した結果は, Tyrode 液, 20% の濃度の血清, 10 または 20% 濃度の鶏胚浸出液の場合, 鶏胚大腿骨の発育は良好であったが, 第 8 表, 第 7 図および第 9 表, 第 8 図に示されたように鶏胚浸出液の発育促進作用は一定した成績が得られない欠点があった。勝田 (1955), 立岩 (1956) および KATSUTA, H. et al. (1957) は鶏胚浸出液は鶏胚組織の体外培養には必須のものであってその成長促進物質は pentose nucleic protein であるとしている。また GAILLAND, P. J. (1948) は鶏胚浸出液が採取時期によって活性が異なるので組織の培養日数に従い孵化日数の多い鶏胚浸出液を用いるのがよいとし, これに反して勝田 (1955) は孵化日数が多いと成長促進性が低下するといひ, また清水 (1960) は Seitz 濾過で鶏胚浸出液の活性は著しく低下すると述べるなど鶏胚浸出液の活性の不安定性が指摘されているにもかかわらず鶏胚浸出液の代用物質に関する検討ははなはだ少なく, KATSUTA, H. et al. (1959, 1960) の研究に見られるのみである。KATSUTA, H. (1959), KATSUTA, H. et al. (1959, 1960) は lactalbumin のみでは発育促進がなく, かつ lot によって活性の変動があり vitamin 類および glutamin の質的量的差を注意し, また同時に血清の存在が必要であると述べ高分子蛋白源として polyvinylpyrrolidone の使用を推奨しているが実用にまで至っていない。著者は成績の一定という立場か

ら lactalbumin, yeast extract を鶏胚浸出液の代用とし、これを血清加 Tyrode 液に添加し、鶏胚大腿骨の回転培養における栄養液とした。

培地内に添加する薬物の影響を検査する場合、血清の存在はまた考慮すべきもの一つである。このためには無蛋白合成培地が望まれるが、鶏胚大腿骨を用いたこの方面の研究には既述の KATSUTA, H. et al. (1960) による polyvinylpyrrolidone の血清代用としての企図をみるのみで殆んど検討されていない。著者はまず培養初日を血清加 Tyrode 液で培養後 1% skim milk 加 Tyrode 液を更新し保持液としたところ第 8 表、第 7 図および第 9 表、第 8 図にみられるように大腿骨の持続的成長を認め、本法の応用の可能性が伺われたが、第 8 表、第 7 図に示されたようにこの保持液に鶏胚浸出液を添加すると大腿骨の成長促進は期待に反して低下したことや、skim milk 粒子の沈澱は鏡下の夾雑物として残ること等は本法の応用を阻む点であって今後更らに検討を加えなければならないと思う。

近年、多くの抗生物質が臨床面に応用され、各種の疾患に対する使用量と使用頻度は増加の傾向にあって、骨疾患の治療の場合も例外たり得ないが、抗生物質の汚染細菌に対する著効は抗生物質の使用に伴う組織細胞特に骨損傷の場合の骨軟骨細胞の新生増殖や化骨に及ぼす影響をしばしば等閑視する原因ともなっている。METZGER, J. P. et al. (1952), 鈴木等 (1953), OISHI, Y. (1956), 中川等 (1953) および井上 (1960) は鶏胚心線維芽細胞を用いて cover slide method でそれぞれ penicillin, chloramphenicol, polymixin, streptomycin, viomycin, aureomycin の影響を、池田 (1956) および谷 (1958) および沼尾 (1957) は鶏胚前頭骨および家兎骨髓細胞を用いて cover slide method または静置培養法で、penicillin, streptomycin, chloramphenicol および leucomycin の影響を検査したが、いずれも骨成長に対する影響には触れていない。

著者は球菌に抗菌作用を持つ penicillin, erythromycin, leucomycin; 球菌及び桿菌に抗菌作用を持つ tetracycline, chloramphenicol, 抗結核剤として使用される streptomycin, kanamycin および抗腫瘍剤 chromomycin A3 および mitomycin C の 4 群、9 種類の抗生物質について鶏胚大腿骨の発育に及ぼす影響を検査した。penicillin (第 10 表、第 9 図), tetracycline (第 14 表、第 10 図), streptomycin (第 15 表、第 11 図) および kanamycin

(第 16 表、第 11 図) の影響は特異でそれぞれ 1000 u/ml, 10 mcg/ml, 100 mcg/ml, 1000 mcg/ml で骨発育の促進が認められ、特に tetracycline を除く 3 者の場合は顕著であって kanamycin は供試濃度では発育抑制域も認めなかった。鈴木等 (1953) および谷 (1958) はそれぞれ鶏胚心線維芽細胞および家兎骨髓の cover slide method で penicillin 0.01~10 u/ml および 100 u/ml で培養細胞の発育促進を認め、手術後の化膿防止のための penicillin 投与は腹膜癒着を促進するとし、LYON, C. (1943), 石山等 (1950), 鈴木 (1950) は化膿性骨髓炎における penicillin 治療後の病的骨折が増加したことを述べ、penicillin 投与による骨新生の促進や異常刺激による骨の脆弱化がその原因であろうと考えた。Streptomycin の発育促進作用は、OISHI, Y. (1956) によって鶏胚心線維芽細胞の静置培養法で 500 mcg/1.5ml の場合および谷 (1958) によって家兎骨髓の cover slide method で 10 mcg/ml の場合に認められているが、同薬剤による治療後における特発骨折の示唆にまでは触れていない。著者の今回の実験で明らかなように鶏胚大腿骨の発育は、streptomycin, kanamycin でも penicillin と全く同様の著しい発育促進作用を有し、かつ骨髓炎や骨関節結核の治療に際して直接薬剤を骨髓内に長期に亘って注入する機会が多いことを併せ考えると、これらの薬剤による治療後の骨の脆弱化を考慮する必要がある。Erythromycin (第 11 表、第 9 図), leucomycin (第 12 表、第 9 図), pyrrolidinomethyl tetracycline (第 14 表、第 10 図) の鶏胚骨の発育抑制域は、50 mcg/ml 以上で penicillin 1000 u/ml の場合に相応用し、発育促進は認めなかった。Chloramphenicol (第 13 表、第 10 図) は既に 1 mcg/ml で著明な骨発育の抑制を認め、谷 (1958) は家兎骨髓の cover slide method で好酸球の機能を指標とし、10 mcg/ml で阻害を認められたと述べ著者の場合と抑制濃度にかかなりの開きが認められたことは実験方法の差によるものと考えられたが、いずれにしても本剤による骨発育の抑制は抗腫瘍剤 chromomycin A3 (第 17 表、第 12 図) と同様な傾向を示し、骨髓炎の治療に際して特に留意の要があると思われた。Chromomycin A3 および mitomycin C (第 18 表、第 12 図) は最近抗腫瘍剤として広く使用されつつあるが、前者は既に 0.1 mcg/ml で骨発育の完全抑制が認められ、後者は 10 mcg/ml で始めて同程度の抑制を示したが mitomycin C は現在使用されている抗腫瘍剤の中で最も抗腫瘍性が強いといわれていることを

考慮すれば、本剤は少なくとも chromomycin A 3 系の薬剤よりすぐれているものと思う。

要 約

鶏胚大腿骨の回転培養法に際して matrix の要否と結合組織細胞の除去を検討し、matrix は直接管壁でよいこと、結合組織細胞は回転培養の経過と共に脱落し骨成長は持続することが明らかとなり、特にその除去のため trypsin 処理は骨発育を著しく阻害するので、特別な目的がない限り行なわない方がよいことがわかった。また栄養液の組成を検討した結果、塩類溶液を Tyrode 液とし血清および鶏胚浸出液をそれぞれ20%に加えたものが好適であったが、鶏胚浸出液は同じような条件下で作成してもその発育促進作用に変動がみられたので、その代用として lactalbumin hydrolysate, yeast extract を用いて一定の成績が得られた。鶏胚大腿骨を血清加 Tyrode 液で1日培養後1% skim milk 加 Tyrode 液で更新し保持液とした場合、骨成長は持続しその応用の可能性が考えられたが、鶏胚浸出液を添加すると却って発育が劣ることや skim milk 粒子の沈澱が鏡下の夾雑物と

なるので、なお改良の余地があった。

鶏胚大腿骨の回転培養法を応用し、10% 血清0.5% lactalbumin hydrolysate, 0.1% yeast extract 加 Tyrode 液を栄養液とし、各種抗生物質の影響を検査した結果、penicillin 1000u/ml, tetracycline 10 mcg/ml, streptomycin 100 mcg/ml, kanamycin 1000 mcg/ml で著明な発育促進作用を認め、濃度の増加と共に抑制が認められたが、kanamycin のみは供試濃度では発育抑制域は認められなかった。

Erythromycin および leucomycin は、50mcg/ml 以上で penicillin 1000u/ml の骨発育抑制と同程度であったが、chloramphenicol は既に1mcg/ml でも発育は抑制された。2種の抗腫瘍剤のうち chromomycin A 3 の骨発育抑制濃度は、mitomycin C のその10倍高濃度であって、後者の抗腫瘍性が強いことを考慮すれば前者よりすぐれた抗腫瘍性抗生物質であるといえる。

擱筆に当り御懇篤な御校閲を賜った恩師永井教授及び登倉教授に対し、御指導を賜った林講師に深甚の謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Burrow, H. J. : The intercellular product of a pure culture of osteogenic cells in vitro. Arch. exp. Zellforsch., 14 : 202, 1933.
- 2) Fell, H. B. : Experiments on the differentiation in vitro of cartilage and bone. Arch. exp. Zellforsch., 7 : 390, 1928.
- 3) Gaillard, P. J. : Growth, differentiation and function of explants of some endocrine glands. Symposia Soc. Exper. Biol. Cambridge Univ. Press., 11 : 139, 1948.
- 4) Gey, G. O. : An improved technic for massive tissue culture. Am. J. Cancer, 17 : 752, 1933.
- 5) 池田真人 : 各種薬物の骨組織体外培養に及ぼす影響。千葉医学会誌, 32 : 53, 1956.
- 6) 井上義邦 : 緑膿菌感染創の治療に関する基礎的研究。長崎医学会誌, 35 : 1262, 1960.
- 7) 石山俊次, 菊地武弥, 戸川悟, 永井吉造 : ペニシリン療法と骨髄炎骨折。外科, 12 : 141, 1950.
- 8) 石崎有信 : 医学研究のための統計法, 医歯薬出版社。東京, 1955.
- 9) 勝田 甫 : 組織培養, 納谷書店, 東京, 1955.
- 10) Katsuta, H., Endo, H., T. & Oishi, Y. : Studies on growth promoting substances for fibroblast in the simplified replicate tissue culture. Jap. J. Exp. Med., 27 : 343, 1957.
- 11) Katsuta, H., Takaoka, T., & Kuwabara, S. : Cultivation of strain He La cells (Human cervical carcinoma) in the simplified replicate tissue culture. Jap. J. Exper. Med., 29 : 493, 1959.
- 12) Lyon, C. : Penicillin therapy of surgical infection in the U. S. Army., J. A. M. A., 123, 16, 1943.
- 13) Maximow, A. : Carnegie Inst. Wash. Pub., Contrib. Embryol. 16 : 47, 1925.
- 14) 中川三真三, 立岩邦彦 : Penicillin の結締織母細胞に及ぼす影響について。外科, 15 : 441, 1953.
- 15) 沼尾欣一 : Leucomycin に関する研究。J. Antibiotics, Ser. B., 10 : 98, 1957.

- 16) Oishi, Y. : The effect of antibiotics and chemotherapeutics on the growth of fibroblast from chick embryo heart in the simplified replicate tissue culture. Jap. J. Exp. Med., 24 : 167, 1954, & 26 : 161, 1956.
- 17) 清水 晃 : 合成培地による骨軟骨の組織培養, 日整会誌, 34 : 21, 1960.
- 18) 鈴木五郎 : 急性化膿性骨髄炎における特発骨折について, 外科, 12 : 239, 1950.
- 19) 鈴木茂, 栗田彰三 : ペニシリンの腹膜癒着に及ぼす影響について, 外科, 15 : 55, 1953.
- 20) Takaoka, T., Katsuta, H. & Kaneko, K. : Nutritional differences among lactalbumin hydrolysate product for tissue culture. Jap. J. Exp. Med., 30 : 393 1960.
- 21) 谷 和芳 : 抗生物質の骨髓造血機能に及ぼす影響, 岡山医会誌, 71 : 717, 1958.
- 22) 立岩邦彦 : 組織培養法による石灰化機序の研究, I 骨軟骨組織培養の基礎的研究, 日整会誌, 30 : 593, 1956.
- 23) 鶴海寛治 : 軟骨細胞の組織培養について, 日整会誌, 32 : 729, 1958.

Summary

The tissue culture of the bone and cartilage of chick embryos has been used for the fundamental studies on the mechanism of the development of cartilagification, the general physiology and metabolism and also cytological studies of tumour cells in avian cartilage and osteoid tissues. Though there have been many works with regard to the metabolism of the osteoid tissues, they made always use of the growth and maintenance medium which the serum and chick embryo extract were added in the balanced salt solution to. It should be necessary to use adapted media for the tissue culture for the purpose of such examining the influence of antibiotics or metabolic substances on the growth of osteoid tissues tested. Katsuta, H. et al. (1959, 1960) has designated that the polyvinylpyrrolidone was successfully substituted for serum in the growth medium for the L cells, but there was no examination regarding the osteoid tissue culture. In this paper, growth and maintenance media for the tissue culture of chick embryo femora by means of the roller tube culture method were examined, and the influence of antibiotics on the growth of them were tested.

In case of the tissue culture of the chick embryo femora, glass wall of culture tubes was applicable to the matrix and it was not necessary to trypsinize the connective tissues, as it falled off from effect of the chick embryos extract has been changeable even if it was made under the same condition. Therefore, lactalbumine hydrolysate and yeast extract were substituted for it, that is to say, the Tyrode solution added 10 or 20 per cent of calf serum and 0.5 per cent of lactalbumine hydrolysate and 0.1 per cent of yeast extract has been available for the growth medium of the tissue culture of the femora by the roller tube culture method. From the experiment in regard to the maintenance medium for the culture of the femora, it was possible that the Tyrode solution added 1 per cent of skim milk to may be available for it after the cultivation for twenty four hours.

The influence of the antibiotics upon the growth of the femora were as follows : The growth of the femora was markedly promoted in the media added 1000 u/ml of penicillin, 10 mcg/ml of tetracycline, 100 mcg/ml of streptomycine, and 1000 mcg/ml of kanamycine which was the highest concentration tested, respectively, and it was inhibited in the solution of higher concentrations tested of three of them except kanamycin. The growth

of the femora was inhibited in the solution of 50 mcg/ml and more over concentrations of leucomycine and erythromycine as same degree as the inhibition by the 10000 u/ml of penicillin, and the growth promoting phenomenon of it could not be found by the addition of any concentrations tested of them. As 1 mcg/ml or more over concentrations of chloramphenicol inhibited the growth of the femora, it may be not available for the treatment of injuries of the bone and cartilage of man. Furthermore, it was found that 0.1 mcg/ml of chromomycin and 1 mcg/ml of mitomycin inhibited the growth of the femora respectively. (Author)

Received for publication May 21, 1963.