

著一

ヒト胎児由来2倍体細胞の増殖に与える フッ素イオン (NaF) の効果

小 黒 章

新潟大学歯学部予防歯科学教室 (主任: 堀井欣一教授)

(昭和54年6月14日受付)

Effect of Fluorine Ion (NaF) on Proliferation of Diploid Cells
Derived from Human Embryonal Tissues

Akira OGURO

Department of Preventive Dentistry, Niigata University School of Dentistry
(Director: Prof. Kin-ichi Horii)

序 論

株細胞の増殖に及ぼすフッ素イオンの効果について、過去に十余編の報告があり¹⁾⁻¹⁸⁾、それによれば、おおむね、10 ppm ないし 20 ppm のフッ素イオン濃度において細胞増殖の抑制が観察される¹⁾³⁾⁴⁾⁷⁾¹²⁾。一方、1963年 Berry と Trillwood は 0.045 ppm という低濃度においても増殖抑制がおこると報告し²⁾、その後 Le Coultre-Mulder らは 2 ppm において HeLa 細胞が、4~8 ppm において T 細胞が、8 ppm において羊膜細胞が増殖を抑制されると報告している¹⁰⁾。また 80~120 ppm の高濃度において増殖しうる耐性株の出現も報告されている⁷⁾¹¹⁾¹²⁾¹⁴⁾¹⁷⁾。これらを合わせ考えるとフッ素イオンが株細胞の増殖に及ぼす抑制効果は発現閾値に巾があり、フッ素イオンに対する耐性、ひいてはフッ素イオン存在下での細胞の生活反応に細胞種による差異のあることを示唆している。さらに筆者は BHK 21 株細胞について、細胞増殖の抑制が発現する濃度より低い濃度では細胞増殖が促進するのを観察した¹⁹⁾。

フッ素イオンに対する各臓器組織の細胞の生活反応が異なるのではないかという予想は、組織学的、細胞生理生化学的にみて見過ごすことができない。しかし、株細胞を用い導き出された所見は、株化の過程で損われた由来細胞の原型²⁰⁾、また前述のごとく株細胞そのものの多様性故にそのまま生体組織に適用することはできない。

筆者は、フッ素イオン存在下での増殖能が細胞株により差を示すことから、株という要素を除き、より直接的にフッ素イオンが生体細胞の増殖に与える効果を知りたいと考え、妊娠早期のヒト胎児組織の細胞培養を行なった。そして所謂、正常2倍体細胞の増殖に与えるフッ素イオンの効果について知見を得たので報告する。

研究方法と材料

実験材料; 本実験には、妊娠月齢3ヶ月のヒト胎児組織の細胞を用いた。

培養液; 培養液の組成は以下の通りである。

- ① Medium 199^{21)a)} 1000 ml (10倍濃縮液 100 ml を 900 ml の滅菌蒸留水^{b)}で希釈

a) 千葉県血清研究所 千葉縣市川市

b) 東洋化学の採水装置 GS-20N より得た

- ② 仔牛血清^{c)} 100 ml
- ③ 7 W/V% NaHCO₃^{d)} 20ml
- ④ 結晶ペニシリン G カリウム^{e)} 10⁵iu (100 iu/ml)
- ⑤ 硫酸ストレプトマイシン^{f)} 10⁵r (100r/ml)
- ⑥ ファンギゾン^{f)} 5×10³r (5r/ml)

フッ素イオン濃度調整は NaF^{g)} 2.210 g を 100 ml の蒸留水^{b)} に溶解, 滅菌し, 0.1 ml をとり 10 ml の培養液で希釈した 100 ppm 液を基として順次培養液で希釈し調製した。

実験方法; 先ず鋏で細切したヒト胎児組織から直径 7 cm の中シャーレに細胞増殖を計った。これを mother culture として 0.25% トリプシン^{h)} を用い, 細胞分散を行い, 濾過の後均一浮遊液を作製し, 19 mm×11 cm のスピッツ型試験管を使用して同型培養を行った。細胞付着後, 液換えを行い, その際にフッ素イオンを加えた。monolayer (単層細胞膜) 形成後, 核数計算法により細胞増殖度を測定した。なお, 培養は全て炭酸ガス培養器ⁱ⁾ で CO₂ 5% を混合しながら行った。細胞培養の過程は基本的に Hayflick と Moorhead が行ったヒト 2 倍体細胞株の作製過程²²⁾ と同じである。以下に, その手順を述べる。

(1) 同型培養の作製; 上述の mother culture から, 勝田らの simplified replicate tissue culture の技法^{23,24)} に従い, 均一細胞浮遊液 1 ml を試験管に分注する。試験管数は各フッ素イオン濃度につき 4~5 本であり, これは mother culture の細胞収量に影響されるのでやむをえず 2~3 本とすることもあった。試験管壁に細胞が付着した後, 上清をすべて捨て, フッ素イオンを含む培養液 1 ml を新たに注ぐ。フッ素イオン濃度は各々, 0.02, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 ppm であ

るが, strain I では 50, 80, 100 ppm についても行い 0.02 ppm については行わなかった。培養温度は 37°C, 試験管の傾斜角は 5° である。

(2) 核数計算²⁵⁾; 対照群がほぼ monolayer を形成した時期をもって培養の終点とし, 増殖した細胞の核のみを遊離させ, その数を数えた。即ち, 培養試験管から, 培養液を廃棄し, 次に, 0.01% クリスタル紫を含む 0.1 M クエン酸溶液約 2 ml を各試験管に加え, 37°C で 1 時間半培養する。その後直ちに 10 分間, 70 回/min の振盪を加える。しかる後, 1,600 rpm 10 分間遠沈し, 毛細管ピペットで上清を吸引し, 正確に 1 ml とする²⁶⁾²⁷⁾。

このようにして得た核浮遊液を均一に攪拌し, Bürker-türk 型計算盤に入れ, 核数計算を行った。1 本の試験管の核浮遊液の濃度を決定するための計測は原則として 4 回行った。

各胎児組織から得られた細胞群を実験時期順に strain I~V と名づける。

培養期間は mother culture にほぼ 2 週間, 実験期間にほぼ 1 週間である。

実験結果

表 1 に均一細胞浮遊液作製時の細胞濃度と液換え時の細胞濃度を共に示した。図 1, 2 における縦線は同一フッ素イオン濃度群における平均細胞濃度の標準偏差である。同型培養調製後 24 時間を経て細胞は試験管壁に附着したので, この時液換えを行った。細胞はこの時よりフッ素イオンに曝される。strain I, II, III では培養液に抗真菌剤, ファンギゾンを加えていなかったが, strain III の実験時期から強度の真菌汚染に悩まされたので IV V にはこれを加えた。そのため図を 2 つ

c) GIBCO Grand Island, N. Y., U. S. A.

d) 大塚製薬 東京

e) 明治製菓 東京

f) 三共 東京

g) 試薬特級 和光純薬 大阪

h) DIFCO (1:250) Detroit, Michigan U. S. A.

i) Forma Scientific model 3156 Marietta, Ohio U. S. A.

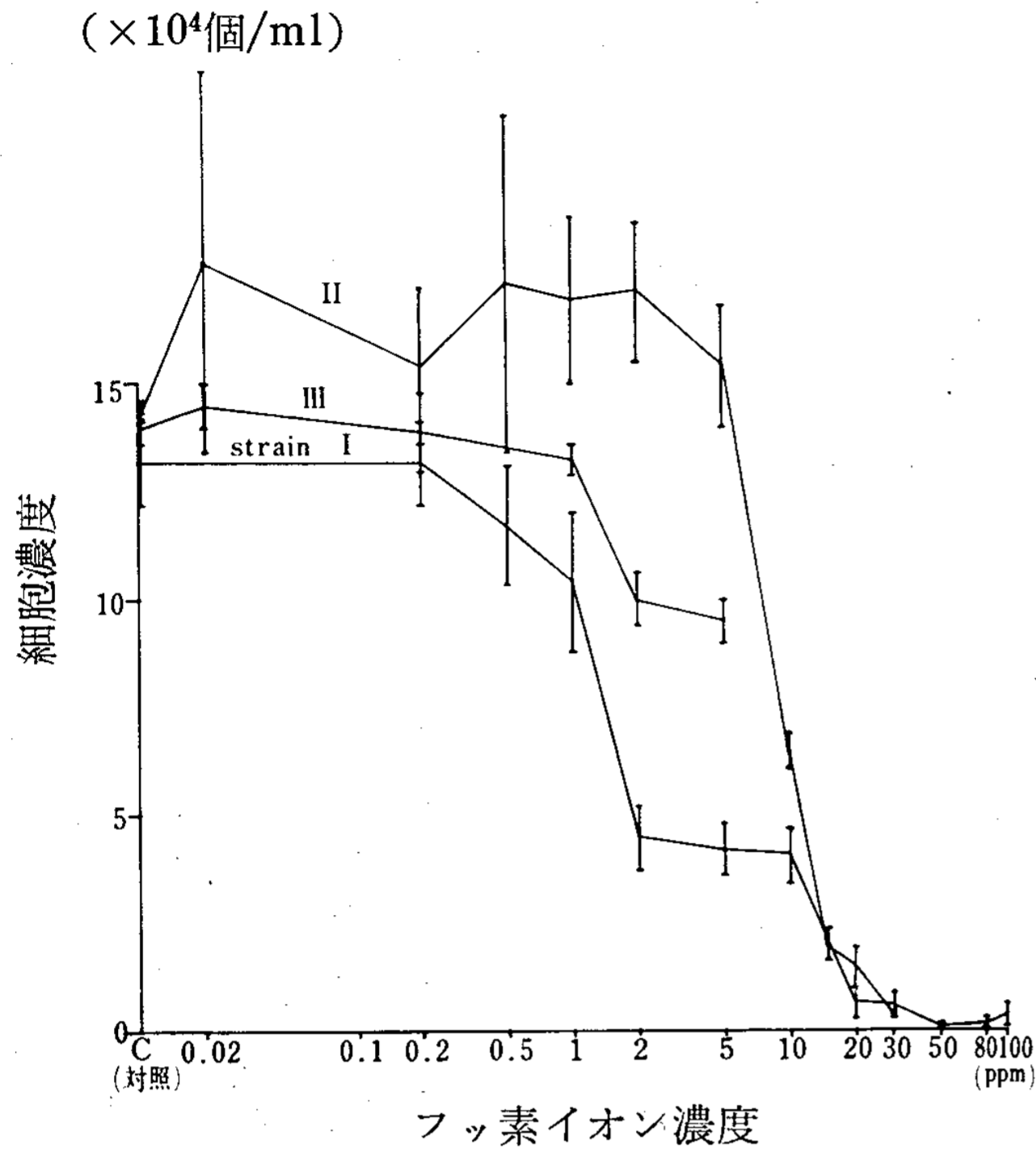


図 1 フッ素イオン濃度と細胞濃度の関係

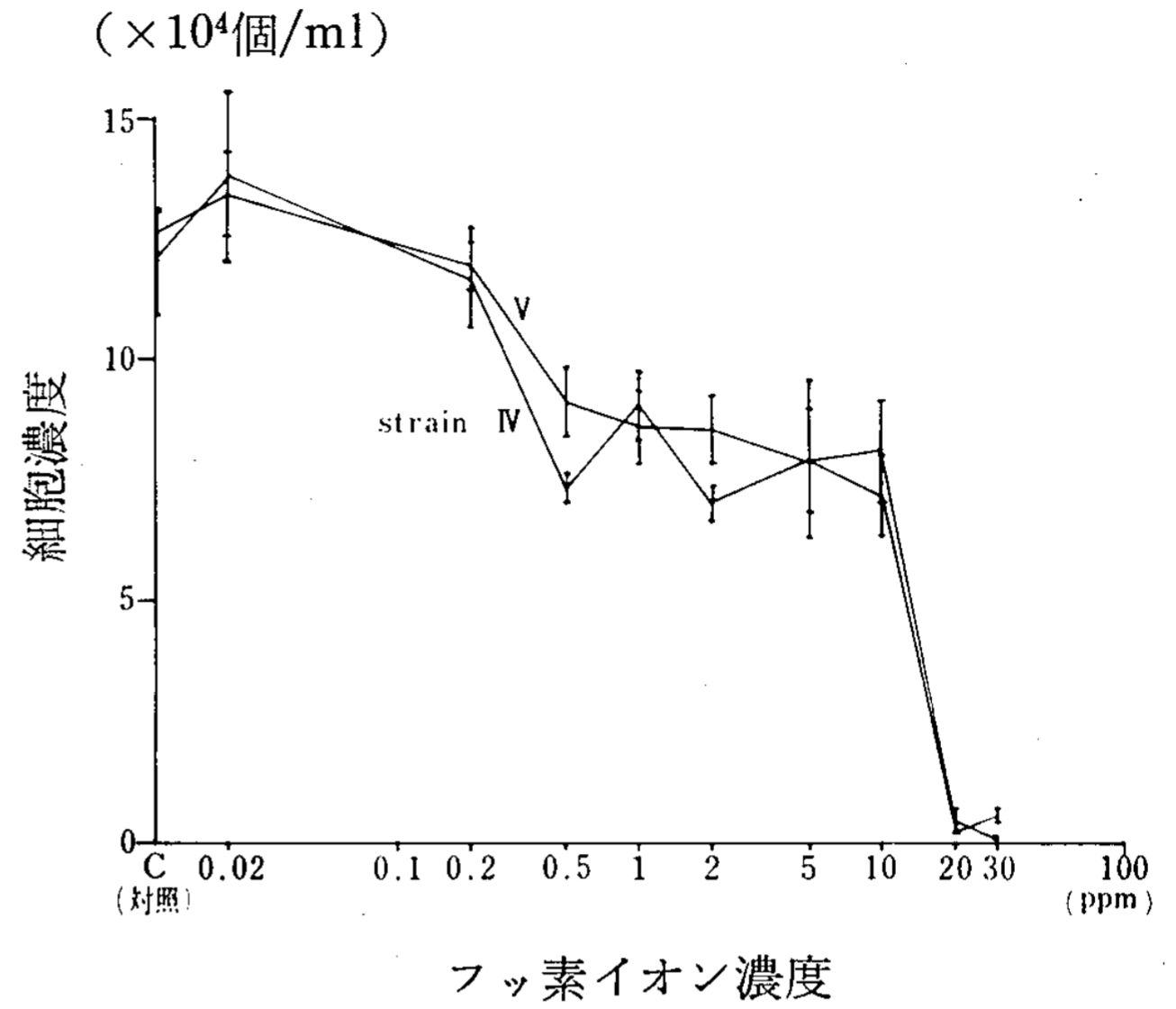


図 2 フッ素イオン濃度と細胞濃度の関係

表 1 各 cell strain の細胞増殖とフッ素イオン濃度の関係

strain	I	II	III	IV	V
接種細胞濃度	9.24 ± 0.30 ⁴	11.26 ± 0.40 ⁴	15.60 ± 0.49 ²	12.38 ± 0.10 ²	11.36 ± 0.57 ³
液換え時の細胞濃度	3.66 ± 0.23 ⁵	5.13 ± 0.39 ⁴	7.33 ± 2.36 ²	6.27 ± 0.12 ²	4.33 ± 0.27 ²
対 照	13.16 ± 0.97 ⁴	14.33 ± 0.27 ³	13.93 ± 0.37 ³	12.06 ± 1.10 ³	12.64 ± 0.41 ⁴
0.02ppm		17.78 ± 4.41 ⁴	14.45 ± 0.49 ³	13.83 ± 1.78 ³	13.43 ± 0.89 ⁴
0.2	13.11 ± 0.93 ⁵	15.36 ± 1.81 ⁴	13.81 ± 0.92 ³	11.69 ± 1.02 ³	12.95 ± 0.52 ⁴
0.5	11.67 ± 1.35 ⁵	17.27 ± 3.92 ³		7.35 ± 0.33 ³	9.13 ± 0.70 ⁴
1	10.34 ± 1.59 ⁵	16.87 ± 1.92 ³	13.19 ± 0.35 ³	9.04 ± 0.71 ³	8.60 ± 0.75 ⁴
2	4.44 ± 0.75 ⁵	17.03 ± 1.60 ⁴	9.98 ± 0.62 ³	7.02 ± 0.34 ³	8.58 ± 0.69 ⁴
5	4.14 ± 0.62 ⁵	15.33 ± 1.38 ⁴	9.44 ± 0.53 ³	7.91 ± 1.61 ³	7.91 ± 1.04 ⁴
10	4.01 ± 0.62 ⁵	6.47 ± 0.38 ⁴		7.16 ± 0.84 ³	8.15 ± 1.03 ⁴
15		1.94 ± 0.40 ⁴			
20	0.61 ± 0.36 ⁵	1.43 ± 0.47 ⁴		2.37 ± 0.25 ³	0.49 ± 0.23 ⁴
30	0.58 ± 0.27 ⁵	0.31 ± 0.08 ⁴		0.57 ± 0.15 ³	0.14 ± 0.05 ⁴
50	0.09 ± 0.09 ⁵				
80	0.14 ± 0.13 ⁵				
100	0.34 ± 0.26 ⁵				

各枠の上段は使用された培養試験管数, 下段は細胞濃度 (×10⁴個/ml ± 標準偏差) を示す。

に分けた。

培地フッ素イオン濃度は ORION 社ポータブルイオンメーター model 407 A 型による直接測定で 0.017 ppm, 全フッ素濃度は McCann の方法²⁸⁾に準じて 0.026 ppm の値をえた。これは培地フッ素イオン濃度調整にあたり特別考慮していない。表 1 のように I~V において接種細胞濃度は各々 9.24 ± 0.30 , 11.26 ± 0.40 , 15.60 ± 0.49 , 12.38 ± 0.10 , $11.36 \pm 0.57 \times 10^4$ 個/ml であり, 培養液交換時の細胞濃度は 3.66 ± 0.23 , 5.13 ± 0.39 , 7.33 ± 2.36 , 6.27 ± 0.12 , $4.33 \pm 0.27 \times 10^4$ 個/ml である。また対照群の細胞濃度は 13.16 ± 0.97 , 14.33 ± 0.27 , 13.93 ± 0.37 , 12.06 ± 1.10 , $12.64 \pm 0.41 \times 10^4$ 個/ml である。フッ素イオン濃度と細胞濃度の関係は, strain I では 2 ppm まで漸減した後 2~10 ppm で一定の細胞濃度を保ち, その後また漸減し 20 ppm でほぼ死滅している。strain II では 5 ppm までほぼ一定濃度を保ち, その後漸減し, 20 ppm でほぼ死滅している。strain III では strain I と同じ様相であるが, mother culture の真菌汚染のため細胞収量が充分でなく 10 ppm 以上の濃度は測定できなかった (図 1)。strain IV, V, では 0.5 ppm まで漸減し 0.5~10 ppm の間で一定濃度を保ち, その後濃度の上昇と共に 10 ppm から再び減少し, 20 ppm でほぼ死滅している (図 2)。一定の細胞濃度を保つ相はいずれも分散分析により差を生じていない。また strain II においては対照群, 0.02~5 ppm 群における細胞濃度に, 分散分析による差を生じない。

考 察

2倍体細胞の増殖に与えるフッ素イオンの効果は3相をもつようにみえる。即ちフッ素イオンに煩わされることなく, 分裂, 増殖を続ける第1相と, フッ素イオンの影響により細胞は生息してはいるが, 分裂を全く抑制される第2相, および細胞の破壊, 細胞死の起こる第3相である。培養液に抗真菌剤の含まれている strain IV, V と, 含まれていない strain I, II, III を分けて考えると strain IV, V には培地フッ素イオン濃度 0.5

~10 ppm に一定の細胞濃度を示す相が認められ (表 1, 図 2), strain I, III では 2 ppm 以上にそれが認められる (表 1, 図 1)。strain III は真菌汚染のために十分な量の細胞を得られなかったので 10 ppm 以上のフッ素イオン濃度を含む培地における細胞増殖を観察できなかつたが, それでも 2~5 ppm に, また strain I では 2~10 ppm に上述の現象を認める。

strain I, III と IV, V に観察されるこの差は実験条件として抗真菌剤ファンギゾン (アムホテリシン B) を用いているか否かによって生じているので, strain I, III において 2 ppm から発現している相が strain IV, V において 0.5 ppm から発現しているのは, ファンギゾンと他の要因との相乗効果によると考えられる。細胞増殖にとって Medium 199, 仔牛血清, PH 等は不可欠な要素であるが微生物汚染を予防するために加えられたペニシリン, ストレプトマイシン, ファンギゾン等は, 細胞に対しむしろ毒性効果をもつ物質である。これら抗生物質の与える毒性効果, 即ち増殖抑制効果について割引いて考えるとすれば, この 2 ppm の臨界点は多少高くなる可能性がある²⁹⁾³⁰⁾。

上述の一定の細胞濃度の第2相と培養液交換時の細胞濃度との比をみると (表 2), 第1相に比べていずれもこの比ははるかに小さいが 1 以上である。培養液交換時の細胞濃度は増殖開始時の細胞濃度であるから, これら以下の低濃度相に比べこの相では細胞は増殖開始時の状態のまま分裂を妨げられていることになる。

これは厳密には分裂細胞の占める頻度と細胞周期及び増殖後の細胞数を比較しなければ結論を下すことはできないが, 分裂を活発に行なう細胞にとって, 分裂抑制剤の作用が DNA 合成等分裂機能の抑制に先だつて細胞質の構造蛋白の破壊を招来するとは考えられず³¹⁾⁻³⁴⁾, 分裂増殖と細胞死が同時に起こり, この両者が平衡関係にある可能性は極めて小さい。

10 ppm 以上では細胞死がもたらされると考えられる。

培養液交換時における細胞濃度は接種細胞濃度

表 2 細胞生存率と増殖比

strain	I	II	III	IV	V
細胞生存率	39.61(%)	45.56(%)	46.99(%)	50.65(%)	38.12(%)
0.5ppm における増殖比				1.172	2.109
1				1.442	1.986
2	1.213		1.362	1.120	1.982
5	1.131		1.288	1.262	1.827
10	1.096			1.142	1.882

の約40~50%であり(表2), また当然のことながら単層細胞膜形成時, 即ち培養終点における対照群の細胞濃度は各実験においてほぼ等しい。従って, 培養液交換時における細胞濃度, 即ち増殖起始点での細胞濃度は単に接種細胞濃度に左右されるのであって, P. D. R (population dependent requirement) を補う範囲であれば, 増殖速度が異なる以外, 培養結果に影響を与えないことになり, 単層細胞膜形成時をひとつの基準として論ずることは細胞増殖が最もすすんだ時期をとらえて観察できる利点を有する。単層細胞膜形成時の細胞濃度は株細胞のそれに比し, ほぼ1/10で増殖開始から単層細胞膜形成時まで約2倍である。これは contact inhibition の効果³⁵⁾⁻³⁸⁾であると考えられるが, 同時に細胞分裂に与える効果を検定するうえで障害となる懸念がない訳ではない。何故なら, 細胞分裂の準備は一世代前の細胞周期の間に行なわれ, 作因の作用は少なくとも二世代に及ばなければその効果を正確に反映しないと考えられるからである。

しかし, strain II においては全く様相が異っており, 過去に株細胞について提出された結果と同じである。何故に strain II と他の実験群との差がもたらされたかは不明である。著者は BHK 21 株細胞において細胞分裂が抑制され始めるより低いフッ素イオン濃度においては, むしろ細胞分裂が促進されるのを観察した。さらに, 低フッ素イオン濃度における細胞分裂の促進とそれにつながる代謝活性の促進を報告した文献も散見される。古くは1931年, Sellei と Jány が癌組織の呼吸が N/1000~N/10000 のフッ素イオンにより昂揚されると報告し³⁹⁾, Hintzsche は1954年,

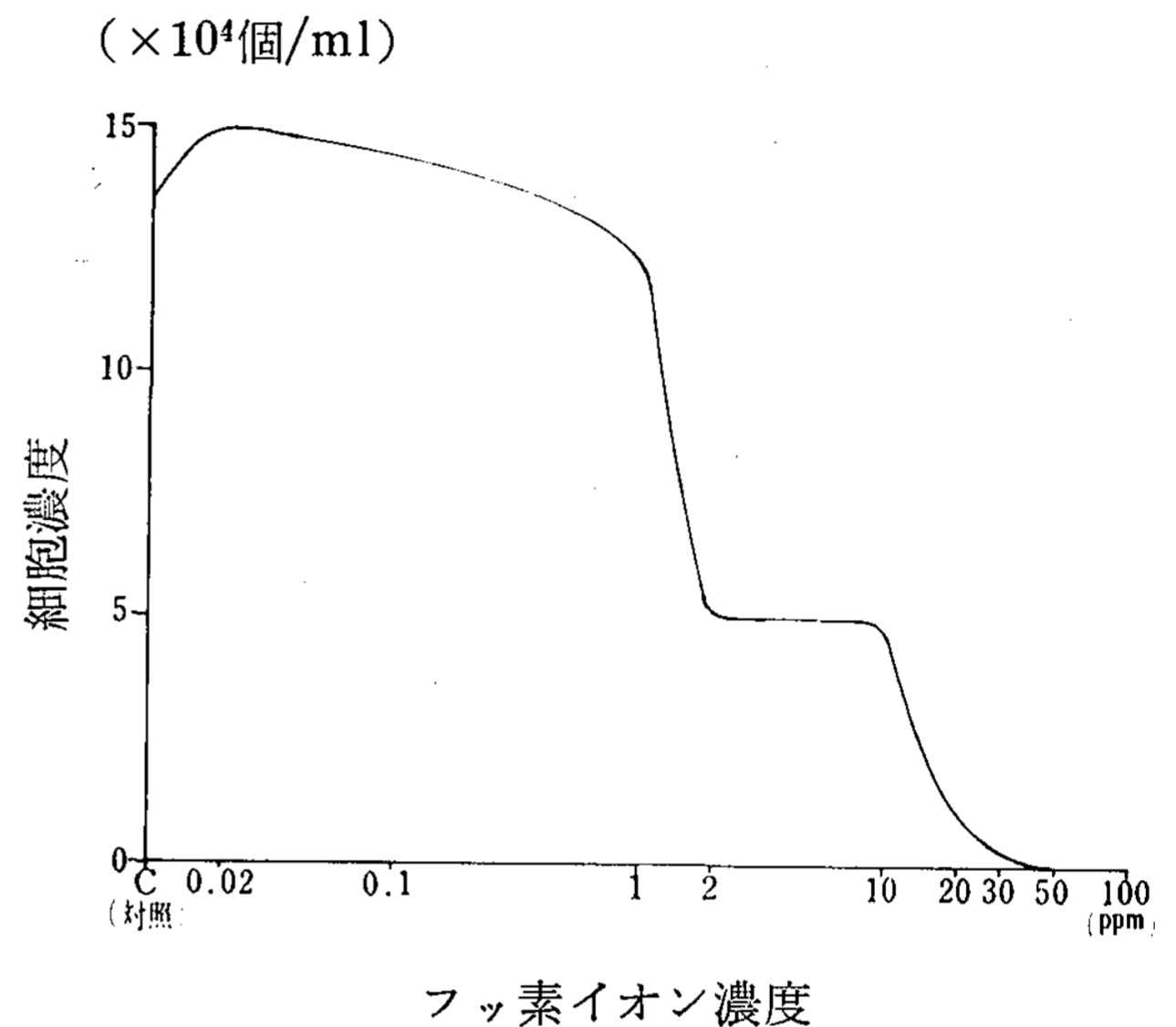


図 3 ヒト由来2倍体細胞の増殖に与えるフッ素イオンの効果

Chick embryo の心筋片を懸滴培養し, NaF を24時間作用させ0.25 ppmで細胞分裂頻度が高くなることを観察した⁴⁰⁾。また1973年, Olsen と Sögnen は38°で30分, ラットの腸粘膜の細胞を浮遊培養し0.05 mMのNaFが催かにブドウ糖利用度を高め, フッ素濃度の上昇とともに利用度は低下し, 3 mMで50%妨げると報告している⁴¹⁾。これらの報告から類推すれば前述の第1相において, 細胞分裂が抑制されるより低いフッ素イオン濃度では細胞分裂が促進するものと想定される。しかし, この実験では対照群と第1相のいずれの点における細胞増殖の間にも検定による差を生じなかった。その理由としては培養試験管数が少ないこと, 株細胞のように圧倒的な増殖を得られないこと, 培養液のフッ素イオン濃度を0に調製できないこと等を挙げられる。

これらを考え合わせるとフッ素イオン濃度に対応する同型培養の細胞濃度を図示すれば図3の如

く理論曲線を描き得るものと考え。ヒト胎児由来2倍体細胞の増殖は先ず極低濃度において極に達し、1 ppm以下のフッ素イオン濃度ではその存在に煩わされることなく分裂、増殖を続ける。2~10 ppmにおいて、細胞は分裂機能を全く抑制され接種時の細胞濃度を維持する。10 ppm以上の高濃度では細胞構造の破壊、細胞死が起こり、急激に細胞濃度は減少していく。20ないし30 ppm以上での細胞の生存は不可能である。

細胞モデルとしての株細胞の所見を生体に適用する際、大きな障害となるのは、由来組織から分離されて以後の時間的経過が及ぼす脱分化、変異の過程²⁰⁾である。生体から培養に移された胎児細胞は染色体数の2倍性を保ちながら50回前後の分裂を経て静止期に入るといわれ²²⁾⁴⁷⁾⁴⁹⁾、少なくとも無限増殖性、染色体数の異数性という変異を引き起こすより前の段階にある⁴²⁾⁻⁴⁹⁾。

脱分化の範疇に含まれる事柄は、組織構成細胞としての機能喪失という現象面を狭義に捕えただけでは不十分で、最初の誘因である細胞分散⁵⁰⁾⁻⁵²⁾とそれに続く培養液への適応過程における要因²⁰⁾⁵³⁾⁻⁵⁸⁾総てを考慮し、生体組織から逸脱した細胞が培養環境への適応過程で生ずる変化として解釈する必要がある。これらにより生ずる因子は密接な作因として狭義の脱分化、即ち機能喪失に働らく可能性があり、切離して考えることはできない。培養環境での時間経過の短かい初期継代細胞の場合には生体組織の細胞からの変化はそれほど大きくないとも考えられる。しかし実際には細胞遺伝学的正常性は保ちつつも⁴²⁾⁻⁴⁹⁾酵素化学的脱分化は既に始まり⁵³⁾⁵⁵⁾⁻⁵⁸⁾、遅かれ早かれ形態学的脱分化をともなう状態⁵⁷⁾にある。それらは培養細胞の特性として検討され解決されるべき問題である。ここでは実験結果を生長している細胞群一般に対するフッ素イオンの増殖抑制効果として論じ、特にフッ素イオンの細胞増殖に与える効果に関係すると思われる事項、一、二を取り上げてみたい。

トリプシンによる細胞分散後細胞はlag phaseと呼ばれるG₁期に留まって回復を計り、次いでS期に入りDNA合成を行う³²⁾⁻³⁴⁾。ほぼ6時間

で細胞は形態学的に正常に復帰し⁵⁹⁾⁶⁰⁾、36~40時間後からDNA合成が始まる³²⁾。従って24時間後にフッ素イオンを添加するという時間的条件は、直接細胞分裂に関与するDNA合成期、即ちS期に関する影響を判定するうえでは十分である。しかしS期におけるDNA合成にはG₁期におけるある種の蛋白、RNAの合成が必要であるとされ、細胞分散後数時間にしてそれらは始まる³²⁾⁻³⁴⁾⁶¹⁾のでそれらに対する影響まで観察するには本実験では不十分である。即ちフッ素イオン添加までに多少のRNA合成、蛋白合成はなされていると考えられ、例えばActinomycin D⁶²⁾、1-β-D-Arabinofuranosylcytosine⁶³⁾等がRNA生成を阻害するにもかかわらずRibonucleotide reductaseの働きを阻害することなくDeoxyribonucleotideが生成されるように、既にあるRNA、蛋白等を基質としてDNA合成がなされる可能性はあり、それが分裂を完全に抑えきっていない(表2)原因となることも考えられる。

生体組織において細胞は立体的構築をなし細胞間隙を組織液が満たしている。一方、単層静置培養では平面的に増殖した一層の培養細胞を培養液が浸している。これを単純に細胞濃度として計算すれば前者は10⁸個/mlのオーダーとなる⁶⁴⁾のに対し、human diploid cell strainでは10⁵個/mlとなる²²⁾。P. D. Rのような細胞数に依存するものを除けば、外部環境として液にとり囲まれ直接そこから物質を交換する状況には細胞濃度は影響しないはずである。実際には単層静置培養と形態が異なり、細胞濃度も当然異なるはずの白血球の培養の場合フッ素イオンが細胞分裂に与える抑制効果は10⁻³Mでも認められないと、1976年にSlacik-ErbenとObeが報告している⁶⁵⁾。単層静置培養と白血球の培養で観察されるこの差は、果たして細胞濃度に由来するものであるか否かは明確でない。何故なら、培養器壁への細胞の附着と遊離浮遊という培養形態の違いを含め、細胞濃度がフッ素イオンの細胞内代謝に影響を及ぼすと同程度、またはそれ以上に白血球培養用の培地に組み入れられたPHA-Mが細胞分裂に作用すると考えられるからである。単層静置培養と白

血球の培養の培地組成で異なるのは後者に PHA-M が用いられることのみであり、PHA-Mは白血球の生活にとってかなり厳しい条件下でも分裂を誘起する能力を失わない⁶⁶⁾⁶⁷⁾。

2倍体細胞の増殖に与えるフッ素イオンの影響は細胞遺伝学的、生化学的意義を背景として、以上のような概要にある。

総 括

ヒト胎児由来2倍体細胞の増殖に与えるフッ素イオンの影響を simplified replicate tissue culture の技法を用い観察した。

フッ素イオン存在下での2倍体細胞の増殖は3相をもつように見える。0~1 ppm においてはフッ素イオンの存在にかかわらず増殖を遂げ、2~10 ppm においては全く細胞分裂を妨げられ、接種濃度のまま生息する。20ないし30 ppm 以上の高濃度における細胞の生存は不可能のようである。2倍体細胞は細胞遺伝学的、生化学的に株細胞とは異なり、細胞モデルとしてはより生体組織細胞に近いと思われる。

謝 辞

実験に臨み、種々、御指導、御助言を賜りました本学医学部公衆衛生学教室須永寛教授ならびに沢田清子助手、他教室員の皆様、また、種々、御助力頂きました口腔病理学教室の皆様、心よく実験材料の提供を賜りました各位に厚く御礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) Pace D. M. and Elrod L. M.: Effects of respiratory inhibitors on glucose and protein utilization and growth in strain L cells. *P. S. E. B. M.* **104**: 469-472, 1960.
- 2) Berry R. J. and Trillwood W.: Sodium fluoride and cell growth. *Brit. Med. J.* **2**: 1064, 1963.
- 3) Albright J. A.: Inhibitory levels of fluoride on mammalian cells. *Nature* **203**: 976, 1964.
- 4) Armstrong W. D., Blomquist C. H., Singer

- L., Pollock M. E. and McLaren L. C.: Sodium fluoride and cell growth. *Brit. Med. J.* **1**: 486-488, 1965.
- 5) Armstrong W. D., Pollock M. E. and Singer L.: Sodium fluoride and cell growth. *Brit. Med. J.* **1**: 1435, 1965.
- 6) Nias A. H. W.: Sodium fluoride and cell growth. *Brit. Med. J.* **1**: 1672-1673, 1965.
- 7) Carlson J. R. and Suttie J. W.: Effects of sodium fluoride on HeLa cells. I. Growth sensitivity and adaptation. *Exptl. Cell Res.* **45**: 415-422, 1967.
- 8) Carlson J. R. and Suttie J. W.: Effects of sodium fluoride on HeLa cells. II. Metabolic alterations associated with growth inhibition. *Exptl. Cell Res.* **45**: 423-432, 1967.
- 9) de Jong J. C.: De invloed van fluoride op de groei van menselijke en dierlijke cellen in vitro. *Ned. T. Geneesk.* **112**: 2266-2267, 1968.
- 10) Le Coultre-Mulder G. W. A. E., Veldhuizen C., Bouman J. and Wise M. E.: Influence of the fluorine ion on the growth in vitro of human amnion cells, T-(Kidney) cells and HeLa cells. *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* **15**: 1-19, 1969.
- 11) Hongslo J. and Jonsen J.: Effect of sodium fluoride on cells in vitro. *J. Dent. Res.* **50**: 717, 1971.
- 12) Hongslo J. K., Holland R. I. and Jonsen J.: Effect of sodium fluoride on LS cells. *J. Dent. Res.* **53**: 410-413, 1974.
- 13) Drescher M. and Suttie J. W.: Intracellular fluoride in cultured mammalian cells. *P. S. E. B. M.* **139**: 228-230, 1972.
- 14) Quissell D. O. and Suttie J. W.: Development of fluoride-resistant strain of L cells: membrane and metabolic characteristics. *Am. J. Physiol.* **223**: 596-603, 1972.
- 15) Quissell D. O. and Suttie J. W.: Effect of fluoride and other metabolic inhibitors on intracellular sodium and potassium concentration in L cells. *J. Cell. Physi-*

- ology **82**: 59-64, 1973.
- 16) Helgeland K. and Leirskar J.: PH and cytotoxicity of fluoride in an animal cell culture system. *Scand. J. Dent. Res.* **84**: 37-45, 1976.
 - 17) Holland R. I., Hongslo J. K. and Rugstad H. E.: Resistance to fluoride of two enzyme-deficient mutants of mouse fibroblasts (L cells). *Acta pharmacol. et toxicol.* **40**: 537-540, 1977.
 - 18) Hongslo J. K. and Holland R. I.: Glucose consumption and lactate production in normal and fluoride adapted LS cells. *Cell Biology International Reports* **1**: 369-374, 1977.
 - 19) 小黒 章: BHK 21 株細胞の増殖に与えるフッ素イオン (NaF) の効果. *新潟歯学会雑誌*, **5**: 73-86, 1975.
 - 20) Chang R. S.: A comparative study of the growth, nutrition, and metabolism of the primary and the transformed human cells in vitro. *J. Exper. Med.* **113**: 405-417, 1961.
 - 21) Morgan J. F., Morton H. J. and Parkar R. C.: Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *P. S. E. B. M.* **73**: 1-8, 1950.
 - 22) Hayflick L. and Moorhead P. S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exptl. Cell Res.* **25**: 585-621, 1961.
 - 23) Katsuta H., Takaoka T., Oishi Y., Baba T. and Chang K. C.: Cultivation of fibroblast from chick embryo heart in the simplified replicate tissue culture. *Japan. J. Exp. Med.* **24**: 125-130, 1954.
 - 24) Katsuta H., Takaoka T. and Oishi Y.: Further studies on the cultivation of fibroblasts in the simplified replicate tissue culture. *Japan. J. Exp. Med.* **27**: 19-29, 1957.
 - 25) Sanford K. K., Earle W. R., Evans V. J., Walts H. K. and Shannon J. E.: The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *J. Nat. Cancer Inst.* **11**: 773-795, 1950.
 - 26) Katsuta H., Takaoka T. and Saito S.: Cultivation of liver cells from chick embryos in the simplified replicate tissue culture. *Japan. J. Exp. Med.* **27**: 367-380, 1957.
 - 27) Katsuta H., Endo H., Takaoka T. and Oishi Y.: Studies on the growth-promoting substance for fibroblasts in the simplified replicate tissue culture. *Japan. J. Exp. Med.* **27**: 343-365, 1957.
 - 28) McCann H. G.: Determination of fluoride in mineralized tissues using the fluoride ion electrode. *Archs oral Biol.* **13**: 475-477, 1968.
 - 29) Oishi, Y.: The effect of antibiotics and chemotherapeutics on the growth of fibroblast from chick embryo heart in the simplified replicate tissue culture (I). *Japan. J. Exp. Med.* **24**: 167-179, 1954.
 - 30) Oishi, Y.: Effects of antibiotics and chemotherapeutics on the growth of fibroblasts from chick embryo heart in the simplified replicate tissue culture (II). *Japan. J. Exp. Med.* **26**: 161-171, 1959.
 - 31) Watanabe Y.: Some factors necessary to produce division conditions in *Tetrahymena pyriformis*. *Jap. J. M. Sc. & Biol.* **16**: 107-124, 1963.
 - 32) Lieberman I. and Ove P.: Deoxyribonucleic acid synthesis and its inhibition in mammalian cells cultured from the animal. *J. Biol. Chem.* **237**: 1634-1642, 1962.
 - 33) Lieberman I., Abrams R. and Ove P.: Changes in the metabolism of ribonucleic acid preceding the synthesis of deoxyribonucleic acid in mammalian cells cultured from the animal. *J. Biol. Chem.* **238**: 2141-2149, 1963.
 - 34) Lieberman I., Abrams R., Hunt N. and Ove P.: Levels of enzyme activity and deoxyribonucleic acid synthesis in mammalian cells cultured from the animal. *J. Biol. Chem.* **238**: 3995-3962, 1963.
 - 35) Abercrombie M. and Heaysman J. E. M.:

- Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. I. speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Exptl. Cell Res.* **5**: 111-131, 1953.
- 36) Abercrombie M. and Heaysman J. E. M.: Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. "Monolayering" of fibroblasts. *Exptl. Cell Res.* **6**: 293-306, 1954.
- 37) Abercrombie M., Heaysman J. E. M. and Karthaus H. M.: Social behaviour of cells in tissue culture. III. Mutual influence of sarcoma cells and fibroblasts. *Exptl. Cell Res.* **13**: 276-291, 1957.
- 38) Rhode, III S. L. and Ellem K. A. O.: Control of Nucleic acid synthesis in human diploid cells undergoing contact inhibition. *Exptl. Cell Res.* **53**: 184-204, 1968.
- 39) Sellei C. und Jány J.: Die Beeinflussung des Stoffwechsels der Tumoren mittels Fluornatrium. *Biochem. Z.* **239**: 94-99, 1931.
- 40) Hintzsche E.: Die Wirkung von Natriumfluorid auf Kulturen embryonaler Hühnerherzen. *mikr.-anat. Forsch.* **60**: 137-144, 1954.
- 41) Olsen I. and Sögnen E.: A comparative study on the effect of fluoride, laurylsulphate and chlorhexidine on glucose utilization in rat intestinal mucosal cells. *Acta Pharmacol. et toxicol.* **33**: 346-352, 1973.
- 42) Tjio J. H. and Puck T. T.: Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J. Exp. Med.* **108**: 259-271, 1958.
- 43) Puck T. T., Cieciura S. J. and Robinson A.: Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**: 945-959, 1958.
- 44) Levan A. and Biesele J. J.: Role of chromosomes in cancerogenesis as studied in serial tissue culture of mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **71**: 1022-1053, 1958.
- 45) Hsu T. C., Billen D. and Levan A.: Mammalian chromosomes in vitro. XV. Patterns of transformation. *J. Natl. Cancer Inst.* **27**: 515-541, 1961.
- 46) Rothfels K. H., Kupelwieser E. B. and Parker R. C.: Effect of X-irradiated feeder layers on mitotic activity and development of aneuploidy in mouse-embryo cells in vitro. *Canad. Cancer. Conf.* **5**: 191-223, 1963.
- 47) Hayflick L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exptl. Cell Res.* **37**: 614-636, 1965.
- 48) Sonnenshein C. and Chang R. S.: Karyotypic analysis of normal human amnion cells in the recovery phase. *Exptl. Cell Res.* **57**: 329-332, 1969.
- 49) Stanley J. F., Pye D. and MacGreger A.: Comparison of doubling numbers attained by cultured animal cells with life span of species. *Nature* **255**: 158-159, 1975.
- 50) Buckley I. K.: Cellular injury in vitro: Phase contrast studies on injured cytoplasm. *J. Cell Biol.* **14**: 401-420, 1962.
- 51) Dalen H. and Todd P. W.: Surface morphology of trypsinized human cells in vitro. *Exptl. Cell Res.* **66**: 353-361, 1971.
- 52) Witkowski J. A. and Brighton W. D.: Influence of serum on attachment of tissue cells to glass surfaces. *Exptl. Cell Res.* **70**: 41-46, 1972.
- 53) Lieberman I. and Ove P.: Enzyme activity levels in mammalian cell cultures. *J. Biol. Chem.* **233**: 634-636, 1958.
- 54) Menefee M. G. and Evans V. J.: Structural differences produced in mammalian cells by changes in their environment. *J. Nat. Cancer Inst.* **25**: 1303-1323, 1960.
- 55) Sato G., Zaroff L. and Mills S. E.: Tissue culture populations and their relation to the tissue of origin. *proc. N. A. S.* **46**:

- 963-942, 1960.
- 56) Michl J.: Metabolism of cells in tissue culture in vitro. I. The influence of serum protein fractions on the growth of normal and neoplastic cells. *Exptl. Cell Res.* **23**: 324-334, 1961.
- 57) Ebner K. E., Hoover C. R., Hageman E. C. and Larson B. L.: Cultivation and properties of bovine mammary cell cultures. *Exptl. Cell Res.* **23**: 373-385, 1961.
- 58) Wang K. -M., Rose N. R., Bartholomew E. A., Balzer M., Berde K. and Foldzary M.: Changes of enzymatic activities in human diploid cell line WI-38 at various passages. *Exptl. Cell Res.* **61**: 357-364, 1970.
- 59) Witkowski J. A. and Brighton W. D.: Stages of spreading of human diploid cells on glass surfaces. *Exptl. Cell Res.* **68**: 372-380, 1971.
- 60) Kolodny G. M.: Effect of various inhibitors on readhesion of trypsinized cells in culture. *Exptl. Cell Res.* **70**: 196-202, 1972.
- 61) Harris H.: The initiation of deoxyribonucleic acid synthesis in the connective-tissue cell, with some observations on the function of the nucleolus: *Biochem J.* **72**: 54-60, 1959.
- 62) Murphree S., Stubblefield E. and Moore E. C.: Synchronized mammalian cell cultures. III. Variation of ribonucleotide reductase activity during the replication cycle of chinese hamster fibroblasts. *Exptl. Cell Res.* **58**: 118-124, 1969.
- 63) Kaplan A. S., Brown M. and Ben-Porat T.: Effect of 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine on DNA synthesis. 1 In normal rabbit kidney cell cultures. *Molecular Pharmacology* **4**: 131-138, 1968.
- 64) 山田正篤: ヒトの正常細胞を培養する. *科学*, **34**: 295-300, 1964.
- 65) Slacik-Erben R. and Obe G.: The effect of sodium fluoride on DNA synthesis, mitotic indices and chromosomal aberrations in human leukocytes treated with trenimon in vitro. *Matat. Res.* **37**: 253-266, 1976.
- 66) Nowell P. C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* **20**: 462-466, 1960.
- 67) McIntyre O. R. and Ebaugh, Jr. F. G.: The effect of phytohemagglutinin on leukocyte cultures as measured by P³² incorporation in the DNA, RNA, and acid soluble fractions. *Blood.* **19**: 443-453, 1962.