

骨端軟骨の生長に及ぼすジベレリンの影響

京都大学医学部整形外科学教室 (指導: 近藤鋭矢教授)

安 立 良 治

(原稿受付 昭和38年2月3日受付)

THE EFFECT OF GIBBERELLIN ON THE GROWTH OF EPIPHYSEAL PLATE

By

YOSHIHARU ADACHI

From the Department of Orthopaedic Surgery, Kyoto University Medical School
(Director : Prof. Dr. EISHI KONDO)

Gibberellin is a growth-promoting substance for plants produced by *Gibberella Fuzikuroi*. The effect of the substance on plants is a cell-expanding action on young tissues in the process of development. This growth-promoting mechanism has been deemed by many workers to be due to a change in the cell-membrane of the plants inducing enlargement of the cell itself, but a few have thought that it promotes cell division. In order to determine what effect Gibberellin has on the growth of animals and especially what changes it induces in the development of bone and cartilage, the writer has measured the bones and made a histological and histochemical study of the epiphyseal cartilages of young mice injected with Gibberellin solution.

Ca-salt solution of Gibberellin A was injected daily in five-day-old mice both intraperitoneally and intramuscularly in a dosage of 800 mg per kg (sublethal dosage) and the mice were examined 5, 7 and 9 weeks after the start of the injection.

Results :

- 1) The intraperitoneally injected group showed more weight gain than the controls, but no difference was found between the intramuscularly injected group and the controls.
- 2) The length and weight of the bones of the lower extremities changed almost in parallel with the gain in body weight ; in the intraperitoneally injected mice, bones were 15-21% longer than in the controls and their weight also increased nearly proportionally to the total body weight.
- 3) Histological studies showed that the proximal epiphyseal plate of the tibia in the intraperitoneally injected group was 33-38% thicker than in the controls with straight wellregulated arrangements of cartilage cell columns, large round cells in the proliferation zone, enlarged matrix of cartilage and numerous mitoses of cartilage cells in the proliferation zone. The histological picture in the intramuscularly-injected group was almost the same as in the controls.
- 4) Histochemical changes :
The ossification zone and degeneration zone in the intraperitoneally-injected group

showed an alkaline-phosphatase reaction, though little change was detectable in the intramuscularly-injected group or in the controls.

These results indicate that Gibberellin may have a growth-stimulating effect on the epiphyseal cartilage of young mice and that the mechanism of its effect is probably an enlargement of cartilage cells and a promotion of cell division due to Gibberellin's direct action on the cells.

目 次

第1章 緒 言

第2章 実験方法

第1節 実験材料並びに投与方法

第2節 観察方法

第3章 実験成績

第1節 腹腔内注射群

第1項 第5週群

第2項 第7週群

第3項 第9週群

第4項 小 括

第2節 筋肉内注射群

第1項 第5週群

第2項 第7週群

第3項 小 括

第4章 総括並びに考察

第5章 結 語

参 考 文 献

附 図

第1章 緒 言

ユトレヒト学派(1931)による Auxin の発見以来、植物体の生長、催花、発芽或は重量増加に変化を与える物質、即ち Tukey (1954) の所謂植物調節物質は数多く発見されている。

数多の植物調節物質の中で、ジベレリンはその特異な生理作用により植物学、農学方面のみならずまた化学工業の方面からも大きな関心が寄せられているものである。

ジベレリンは稲馬鹿苗病菌の代謝生産する植物生長促進物質であるが、最近の研究によれば自然状態で生育した高等植物体内においても生産され、植物の生理調節に関与している事が知られて来ている。

稲馬鹿苗病は昔からわが国に広くみられる病気で、幼苗が草丈ばかり伸長し葉の緑色があせ、ついには枯死するものである。1926年、黒沢はこの病源として Gibberella Fulukuroi Wollenweber という1種の菌が代謝生産する毒素を証明した。藪田、住木(1939)はこの

菌培養ろ液より稲の徒長作用を呈する2種の結晶を分離し、これをジベレリンAおよびBと命名した。その後住木はジベレリンAを化学的並びに生理作用の酷似したA₁、A₂、A₃、A₄の4種の物質に分離した。これらの物質の化学的性質はいづれも1塩基性酸で、難水溶性であるがアルコール系溶剤、アセトン、氷醋酸には易溶性である。その後ジベレリンの植物に対する作用については放多くの研究が行われ、その生理的作用も著しく解明されて来た。

ジベレリンの植物に対する作用を総括すれば、生長過程にある幼若組織の細胞伸長作用である。

即ち茎部の生育促進は最も顕著な作用で林(1956)の胡瓜を用いた実験によれば、細胞自体が伸長することによるものであつて、細胞分裂促進は認められなかつたと云う。併し Sachs はヒヨコの幼苗の頂点では細胞分裂の促進が認められたと述べている。ジベレリンの伸長促進作用は植物の種類によつて異り、矮性品種に対しては特に顕著でエンドウの矮性種に作用させると、対照の5倍も草丈が高くなつたと云う報告がある。

葉に対する作用は植物品種により異なるが、住木によれば稲では葉の長さ及び重量の増加が認められた。タバコでは葉数、葉面積の増加が認められたが、ニコチンの含有量は減少していると云う。

又高濃度のジベレリン処理を受けた植物は日光照射下においても葉緑素が減少し黄白化するが、その特異

表1 Gibberellin-A₁-A₂-A₃-A₄

	分子式	融 点(°C)	[L] _D	二重結合
A ₁	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	232-5 (分解)	+42.3°	1
A ₂	C ₁₉ H ₂₆ O ₆	235-7 (//)	+11.7°	1
A ₃	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	233-5 (//)	+86.0°	2
A ₄	C ₁₇ O ₂ H ₅	222 (//)	-20.8°	1

な現象の作用機序は尚解明されていない。

根の生長は抑制され根長及び根数は減少する。

多くの植物の開花を促進する。1年生の長日性のチャ、ダイコン、カラシナなどを秋、冬の短日状態で温室内で育てるとジベレリンで処理したものでは開花が促進され、長日状態で育てた場合でもジベレリン処理のものは数日から数週間も開花が早い。

体によると稲、大麦の種子の発芽を促進シタバコの如き光発芽種子にジベレリンを作用させると暗中でも発芽すると云う。又休眠状態のジャガイモをジベレリン溶液に浸漬すると急速に多数の芽が出ると云う。

ジベレリンは又植物酵素の活性に変化を与える。村上(1956)によれば稲ではホスファターゼ、アルカリピロホスファターゼ、アセチルエステラーゼ、マルターゼ、 β -グルコシダーゼ、アミラーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ等の活性を低下させ、ペルオキシダーゼの活性を高めると云っている。

以上の如くジベレリンは植物体に種々の生長促進作用を呈するが、その生長促進機序については多くの学者は、植物細胞の細胞膜に変化を来たすこと及び胞体の肥大によるものと考えており、細胞分裂の促進によるものとしている人は少い。

一方ジベレリンの動物に対する作用についての研究は極めて少い。1941年、藪田、住木は雞胚心臓組織片の組織培養を行い、これについてのジベレリンの作用を検討しているが何らの細胞増殖作用もみられなかつたと報告している。

又武田薬品工業株式会社の研究部(1957)、阿部(1959)はマウスに対する毒性について実験を行つている。その結果によるとマウスに対しジベレリンを pro Kilo. 1000mg, 500mg, 250mg, 125mg, 62.5mg, 31.25mg の各濃度液を静脈内に注射したが、7日間に死亡例なく投与後24時間内に完全に尿中に排泄されている。この事からジベレリンのマウスに対する致死量は $LD_{50} \geq 1000\text{mg/kg}$ であろうと推定している。之らの研究からジベレリンの動物に対する毒性は極めて少く、実用に供せられる程度の濃度では人畜に対して殆んど問題にならないと考えられている。

米国の Zeeuw, Sherman らは1960年、極く微量のジベレリンを家畜の飼料に混じて与えると、その生長を早め、体重を増加すると云っているが、その基礎的研究はなされてないようである。

当教室の鷲山は1963年、孵化9~10日目の雞胚上顎軟骨の体外培養を行い、培地に種々濃度のジベレリン

を添加して、培養軟骨細胞の生長を検討した結果、高濃度においては生長促進作用が認められる事を証明し、生長帯に出現している軟骨細胞中に多数の2核乃至3核細胞を認める所から、この生長促進作用は細胞分裂の促進によるものであらうと考えている。

現在までに、ジベレリンの動物に対する研究中めばしいものは上記教氏の報告以外には見当たらない。植物に対して著しく特異な作用を発現するジベレリンが、動物の生長に対して如何なる作用を呈するものであらうかと云う事は興味ある問題であるが、動物の生長殊に骨、軟骨生長に関する作用の研究は、前記鷲山の体外培養軟骨細胞についての研究以外には全くない状態である。

著者はジベレリンを動物生体に直接投与した際、骨、軟骨生長に如何なる変化が生ずるかを知らる目的で幼若マウスにジベレリン溶液を注射し、全身状態の観察、骨の計測、骨端軟骨の組織学的、組織化学的研究を行つたので、茲にその結果を報告するものである。

第2章 実験方法

第1節 実験材料並びに投与方法

実験動物はCF1系マウスの同腹の仔を以つて1群となし、之を投与群、非投与群に分け、生後5日目よりジベレリンを投与し、離乳後はオリエンタル固形飼料並びに水を以つて飼育した。

投与したジベレリンはジベレリンA (ジベレリンA₃とA₁の9:1の混合物)のCa塩の4%食塩水溶液を作製し、マウスの体重5grに対して0.1c.c. 宛、即ち pro Kilo. 800mgの割合に毎日腹腔内、筋肉に注射した。非投与群に対しては同量の生理的食塩水を腹腔内に注射した。性別による実験成績の差異をさけるため、投与群、非投与群ともに可及的雌雄を混じた。

第2節 観察方法

1) 全身状態

動物の動作、毛髪の状態を観察した。

2) 体重変化

注射開始時より毎週体重を測定した。

3) 摘出下肢骨格長並びに重量測定

注射開始後、第5週目、第7週目、第9週目に屠殺し、各週群とも屠殺直後に可及的充分に下肢の軟部組織を除去し、大腿骨長径即ち大腿骨頭より膝関節大腿骨関節面まで及び下腿骨長径即ち膝関節脛骨関節面より足関節裂隙までの長さをノギスで測定し、同時に大腿骨下腿骨の重量合計を測定した。

4) 組織学的並びに組織化学的観察

下肢骨格長並びに重量測定後、下肢骨を直ちに氷冷無水アルコール、アセトン等量混合液に浸漬固定し、5%中性 E.D.T.A. 液にて脱灰、セロイジン包埋した後、型の如く薄切片となした。観察部位は脛骨中樞側骨端軟骨を用いた。この部位は骨端軟骨が屈曲せず平坦にみえ、軟骨細胞の配列も規則正しく、種々の計測に最も便利である。切片標本はヘマトキシリン・エオジン2重染色(以下H・E染色と略す)、アザン、マローリー染色(以下A・M染色と略す)による膠原線維染色、アルカリ、ホスファターゼ染色(高松・赤松法、以下Al-P反応と略す)、一般多糖類染色を目標としたPAS反応及び必要に応じてはトルイジンブルー液(pH 7.0)によるメタクロマジー反応(以下Meta反応と略す)によりコンドロイチン硫酸の検索を行った。

第3章 実験成績

第1節 腹腔内注射群

第1項 第5週群

投与群3匹、非投与群2匹である。

1) 全身状態

腹腔内に注射したが、マウスの動作は注射により変化は来さず活潑に動き、毛髪的光沢消失、脱毛等は認められず、投与群に1例の死亡も認められなかつた。

2) 体重変化

実験開始時は全群とも同一体重である。投与後第4週目までは、投与群、非投与群とも体重は急上昇カー

表2 第5週群摘出下肢骨格長並びに重量

	下 肢 長 (mm)		重 量 (gr)
	大腿骨長径	下腿骨長径	
非投与群	13	16	0.17
非投与群	14	18	0.18
筋注群	13	17	0.16
筋注群	14	18	0.18
腹腔内注群	14	20	0.20
腹腔内注群	14	19	0.19
腹腔内注群	15	20	0.20

ブを示すが、投与群では2週目後半より非投与群の上昇カーブを凌駕し、注射終了まで凌駕し続けた。投与後第5週目において投与群の平均体重は25gr.であるのに対して、非投与群の平均体重は22.4gr.であつた(図1)。

3) 摘出下肢骨格長並びに重量

大腿骨長径は腹腔内注射群では非投与群よりも1~2mm長く、下腿骨長径は腹腔内投与群においては全群とも非投与群より長く、平均値において2.6mmの差が認められ長径生長の促進が認められた。

又外観上骨の太さも投与群の方が太い。

下肢骨格の重量は下腿骨長径の変化に略平行しており、腹腔内注射群の骨格重量は非投与群より明らかに増加している(表2)。

4) 組織学的並びに組織化学的变化

H. E 染色(図7, 9)

非投与群では軟骨細胞柱は各柱とも曲つており、軟骨細胞柱間の距離は割に狭く、細胞配列も不規則である。増殖細胞は扁平であり泡状細胞層との境界が割にはつきりとしている。軟骨基質も狭く、軟骨細胞柱は中樞側境界部まで一杯に伸びていないものもみられる。泡状細胞の大きさも大小様々で、三角形、四角形、円形の多様な形を示している。増殖細胞に2核細胞が所々に散見される(図10, 11)。

投与群では脛骨中樞側骨端軟骨は非投与群よりその厚さが著しく厚くなつており、軟骨細胞柱は真直で配列は規則正しく、又軟骨細胞柱間の距離は非投与群に比べ増しており 明らかな軟骨基質の増大が認められる。骨端軟骨の厚さの変化を数値的に示す目的で、オクラールマイクロメーターにより軟骨細胞柱のうち静止層より泡状層までの長さを10ヶ細胞柱について測定しその平均値を算出した。非投与群はこの値が平均175μであるのに対し、投与群の平均値は233μで非投与群

図1 第5週群体重変化(平均値)

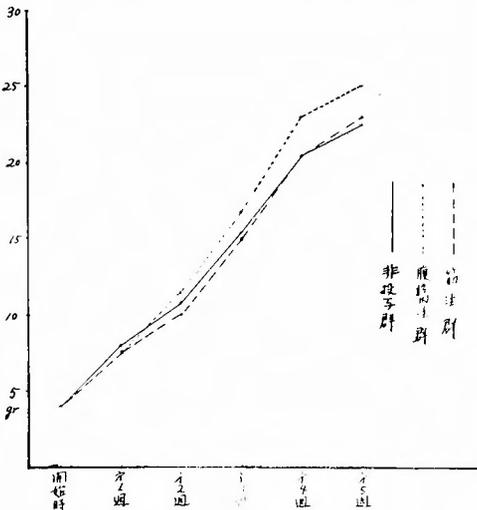
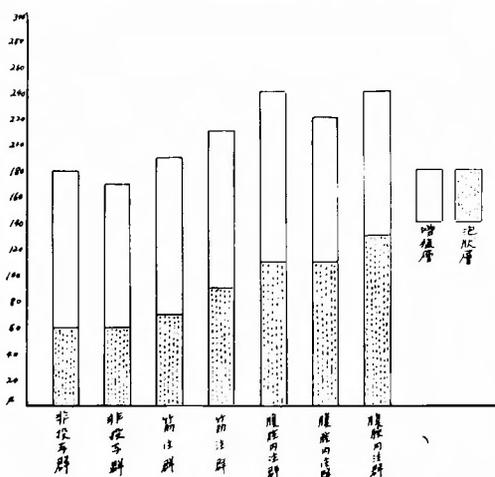


図4 第5週群骨端軟骨層の厚みの計測値



10, 11).

増殖層の軟骨細胞は扁平な形をしているが、増殖層と泡状層との境界部の軟骨細胞は投与群では楕円形で、徐々に円形の泡状細胞へと移行しているのに対し非投与群では増殖層の扁平な軟骨細胞より急に円形な泡状細胞層に移行している。

投与群では泡状層の軟骨細胞は大きく且つ円形で配列は規則正しいが、非投与群では投与群にみる様な一定の形を呈せず楕円形、三角形等の形を呈しその配列も投与群ほど整然としていない。

化骨層の石灰化軟骨細胞は大きくエオジンに濃染して、非投与群よりも多く且つ形も大きく、そこに出現している骨芽細胞も非投与群よりも多くみられる。

骨稜形成は投与群の方が非投与群よりも良好である。

細胞核、軟骨基質の染色性は非投与群、投与群の間に差は認められなかつた。

A. M染色(図12, 13)

軟骨基質は美麗な青色に染まり、細胞核は赤色を呈している。投与群ではH.E染色所見と同様、軟骨細胞柱は真直ぐに規則正しく配列し個々の細胞を基盤状に膠原線維が屈繞し、細胞間線維は規則正しく縦横に走っている。従つて細胞は規則正しい方形又は方形に近い円形を呈して並んでいて軟骨基質が広くみえるが、非投与群においては細胞間膠原線維束は不規則に錯走し細胞配列は乱れ、細胞の形態も円形、三角形、多角形等まちまちで且つ細胞は密集しており、軟骨基質の中は明らかに狭く、両者の所見の相違は一見して明瞭である。増殖層における軟骨細胞は投与群ではいづれも楕円形を呈し、その長軸を正しく水平位にして並んで居るが、非投与群においては軟骨細胞は扁平、三角形あるいは多角形を呈しその長軸の方向はまちまちで規則正しい配列はみられない。

又投与群の軟骨細胞は非投与群より大きく、殊に増殖層細胞において著明に認められる。泡状層における軟骨細胞は、細胞核には投与群、非投与群の間に大きさの差はみられないが、投与群の軟骨細胞の胞体は著しく増大している。

Al-P 反応(図14, 15)

投与群、非投与群とも骨稜形成部、化骨層におけるAl-P反応は強陽性に出現している。泡状層における軟骨細胞の本反応は投与群では中等度陽性乃至弱陽性を示しているが、非投与群においては極めて反応は弱い。増殖層における軟骨細胞の本反応は両群とも陰性

よりも明らかに長くなつている(図4)。

又軟骨細胞柱に含まれる軟骨細胞は、投与群では増殖層、泡状層を通じて略一様な間隔で並んでいるのに対し、非投与群では各泡状細胞間の間隔より増殖細胞間の間隔は著しく狭く恰も細胞が重り合う如き感じを与える。又10ヶ細胞柱の両端柱間の距離を比較してみると投与群では非投与群よりも広く、著明なものでは2倍に近い値を示すものもあり、更に1軟骨細胞柱に含まれる軟骨細胞数を算定してみると、非投与群、投与群共大きな差がみられない。投与群において軟骨細胞柱に含まれる細胞数が非投与群と余り変わらないにも拘らず、軟骨細胞柱全体の長さが増しているという事は、各細胞自体が大きくなつているのみならず、軟骨基質が増大している事を示すものと考えられる(表3)。

投与群では増殖細胞中に多数の2核細胞が存在しているのが認められるが、非投与群では2核細胞は稀で全視野に2~3ヶしかみられない程度にすぎない(図

表 3

第5週群	各々の軟骨細胞柱に含まれる細胞数の平均値 (10ヶ細胞柱)	10ヶ軟骨細胞柱の両端間距離 (μ)
非投与群	16.4	64
非投与群	13.6	96
筋注群	14.6	104
筋注群	14.2	112
腹腔内注群	15.1	112
腹腔内注群	11.8	104
腹腔内注群	16.3	119

である。

PAS 反応

両群とも差異は認められず、いずれも軟骨基質並びに骨膜は一様に反応陽性である。

Mata 反応

投与群、非投与群とも軟骨層に陽性に出現しているが、差異は認められない。

第2項 第7週群

投与群3匹、非投与群2匹である。

1) 全身状態

腹腔内注射群はその動作は非投与群よりも寧ろ活潑で、食餌摂取も旺盛であった。毛髪の状態は正常であり、投与期間中死亡例は一匹もなかった。

2) 体重変化

注射開始時では投与群、非投与群とも同じ体重である。注射開始後第3.5週目位までは投与群、非投与群とも同様の体重増加曲線を示すが、それ以後は投与群では体重増加が著しく、注射開始後第4週目においては投与群では明らかに非投与群の体重を凌駕している。その後は略々同一の体重増加曲線を示す(図2)。

3) 摘出下肢骨格長並びに重量

大腿骨長径は投与群では平均16.3mmで非投与群では平均14mmであり、投与群は約17%弱の増加が認められるが、下肢骨長径は投与群は平均21mm、非投与群は平均17.5mmで約20%の増加が投与群にみられる。

下肢骨格全重量は投与群では非投与群より25~50%も増加している(表4)。

即ち下肢骨の長さ並びに重量の変化は略々体重変化と平行している。

4) 組織学的並びに組織化学的変化

図2 第7週群体重変化(平均値)

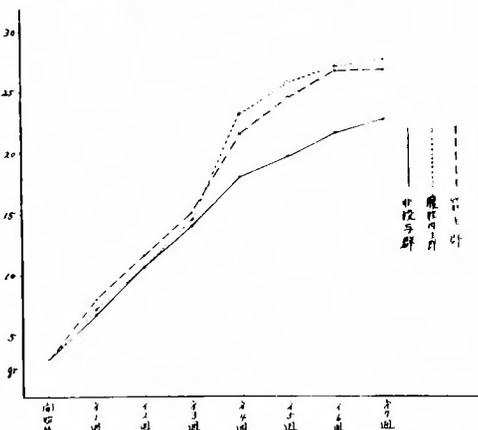
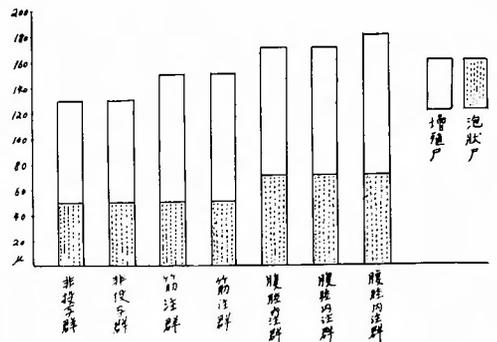


表4 第7週群摘出下肢骨格長並びに重量

	下肢長(mm)		重量(gr)
	大腿骨長径	下腿骨長径	
非投与群	14	17	0.20
非投与群	14	18	0.25
筋注群	15	20	0.27
筋注群	14	20	0.27
腹腔内注群	16	21	0.30
腹腔内注群	16	21	0.30
腹腔内注群	17	21	0.32

図5 第7週群骨端軟骨層の厚みの計測値



H. E染色(図16, 17)

非投与群の脛骨中樞側骨端軟骨は軟骨層の厚さは第5週群に比し著しく狭くなって来ており、軟骨細胞柱は曲つて配列が不規則である。軟骨細胞柱の中も狭く、細胞は扁平で、大きさも大小さまざま揃っていない。従つて軟骨基質は著しく狭い様にみられる。又個々の軟骨細胞柱は中樞側境界部一杯に伸びていないものが目立つ。

投与群では骨端軟骨層の厚さは一見して非投与群より増大して、軟骨基質の増加している事が分る。軟骨細胞の配列は整然としており、非投与群の軟骨細胞柱が歪み、中樞側境界部一杯まで伸びてないのがみられるのに反し、投与群では軟骨細胞柱はいずれも充分伸びており、細胞配列は真直で歪んでいない。

軟骨細胞柱の長さは投与群では非投与群より長く、増殖層及び泡状層の長さも長くなっている。計測してみると投与群と非投与群との間には約50μの差があり投与群の方が長く、泡状層、増殖層ともに長さが増大している(図5)。

10ヶ細胞柱両端間距離を計測してみると、非投与群では平均145μ、投与群では200μ 強で明らかに投与群

表 5

第7週群	各々の軟骨細胞柱に含まれる細胞数の平均値 (10ヶ細胞柱)	10ヶ軟骨細胞柱の両端間距離 (μ)
非投与群	11.0	140
非投与群	11.8	150
筋注群	12.8	160
筋注群	12.7	190
腹腔内注群	13.5	200
腹腔内注群	12.8	200
腹腔内注群	13.5	210

の個々の軟骨細胞柱の中は非投与群より広い。

一方各々の細胞柱に含まれる細胞数は非投与群で平均11.4, 投与群では約13.3であり, 上記軟骨細胞柱の長さ, 1軟骨細胞柱の中, 1細胞柱に含まれる細胞数の関係から, 投与群では1個の軟骨細胞の平均の大きさは非投与群のそれより明らかに大で約2倍となっている。即ち軟骨細胞自身が大きくなつているとともに軟骨基質が増し, その結果骨端軟骨層全体の厚さが増しているものと考えられる(表5)。

非投与群では増殖層の軟骨細胞は扁平で, 恰も押しつぶされたような外観を呈するが, 投与群では楕円形で泡状層軟骨細胞への移行部が整然としていない。

投与群増殖層の軟骨細胞に多くの2核細胞及び Mitosis がみられるが, 非投与群ではこの様な所見は殆んどみられない。

投与群では化骨細胞が少いのに対し, 非投与群では大型の化骨細胞がみられ, 骨稜形成は投与群では非投与群よりよく伸びており且つ骨芽細胞も多い。

A. M 染色(図18, 19)

投与群においては, 軟骨細胞を圍繞する膠原線維の走向は縦横に略平行して走っているが, 非投与群では線維の方向はまちまちであり, ために細胞が諸々に点在するように見える。

投与群では増殖細胞に核分裂像が多くみられ, 細胞核は楕円形をしているのに対し, 非投与群では扁平な増殖細胞が密集しているが, 核分裂像はみあたらない。

投与群の泡状細胞は形及び大きさは略同じで整然として細胞柱を構成しているが, 非投与群においては泡状細胞は多形性で大きさも大小様々でその間を線維が迂曲して走っている。

H. E 染色の項で述べた如く, 個々の軟骨細胞の大きさは, 明らかに本染色によつても非投与群より投与

群の方が大きい事が証明される。

Al-P 反応(図20, 21)

Al-P 反応は化骨層並びに骨稜形成部では両群とも陽性に出現している。泡状層軟骨細胞は投与群では中等度陽性に, 非投与群では弱陽性乃至陰性である。

PAS 反応

第5週群と同様で軟骨層, 骨膜に陽性に出現するが投与群, 非投与群との間に差は認められない。

Meta 反応

軟骨層, 骨膜に陽性である事は PAS 反応と同様であるが, 投与群, 非投与群との間に差は認められない。

第3項 第9週群

投与群3匹, 非投与群2匹

1) 全身状態

投与群における動作, 毛髪状態, 食餌摂取量等は非投与群と差はなく, 且つ投与期間中死亡例なし。

2) 体重変化

生後5日目即ち注射開始時は全群とも同一体重であるが, 投与開始後第4.5週までは投与群, 非投与群とも同様の体重増加を示す。その後は投与群の体重増加曲線は急上昇の傾向を示し, 1週を経過する度に非投与群との差は大となつて来ている(図3)。

3) 摘出下肢骨格長並びに重量

大腿骨長径は投与群においては非投与群に比し16%長くなっている。

下腿骨長径は投与群においては, 非投与群に比し20%長くなっている。

下肢骨格の全重量は非投与群に比し投与群は平均60%増加している(表6)。

即ち下肢骨格長, 重量ともに体重に比例して増加し

図3 第9週群体重変化(平均値)

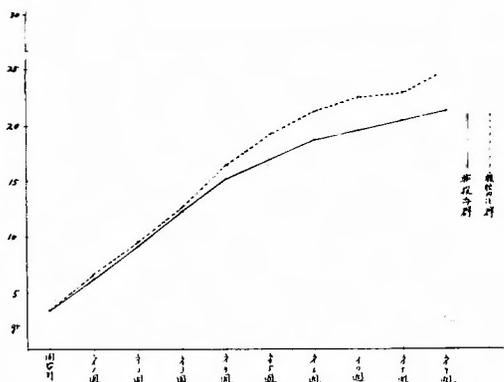
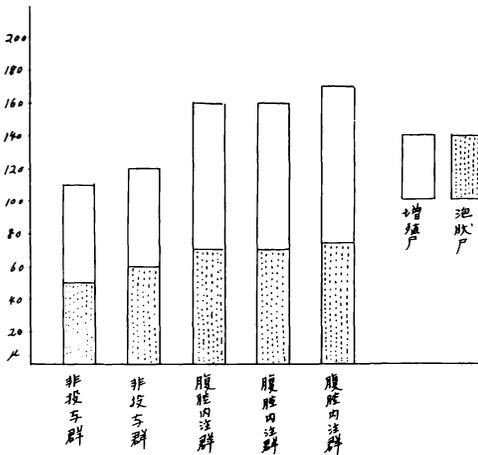


表 6 第9週群齶出下肢骨格長並びに重量

	下 肢 長 (mm)		重 量 (gr)
	大腿骨長径	下腿骨長径	
非投与群	13	16	0.10
非投与群	13	16	0.125
腹腔内注射群	15	19	0.15
腹腔内注射群	15	20	0.19
腹腔内注射群	15.5	21	0.20

図 6 第9週群骨端軟骨層の厚みの計測値



ているわけである。

1) 組織学的並びに組織化学的变化

H. E 染色 (図22, 23)

非投与群の骨端軟骨層の厚さは第7週群に比し、狭小化している。軟骨細胞柱の配列も乱れ、増殖層における軟骨細胞は非常に扁平化しており、且つ他群の非投与群と異り全く2核細胞を見出せない。

投与群においては、骨端軟骨の厚さは非投与群より平均15μ厚く38%の増大がみられ、明らかに厚さが増している。

軟骨細胞柱の配列は投与群より真直で整然としている。又投与群では第5, 7週群と同様増殖層及び泡状層の長さがともに増大している。増殖層の軟骨細胞は非投与群においては扁平な形をしており、細胞が小さく且つ大きさが不揃いであるのに反し、投与群の増殖層軟骨細胞は幾分楕円形に近い円形をしており、細胞が大きく、大きさも略々同じ位で配列している。

又特徴的な事は非投与群の増殖層の軟骨細胞に2核細胞が全くみられないのに、投与群においては2核細胞が所々に認められる (図24, 25)。

表 7

第9週群	各々の軟骨細胞柱に含まれる細胞数の平均値 (10ヶ細胞柱)	10ヶ軟骨細胞柱の両端間距離 (μ)
非投与群	11.3	190
非投与群	11.5	200
腹腔内注射群	11.0	220
腹腔内注射群	11.0	230
腹腔内注射群	11.2	240

泡状層における軟骨細胞は非投与群では、形が円形、方形、三角形等まちまちで且つ大きさも大小さまざまであるのに反し、投与群では略々一様な円形で大きさは殆んど同一な軟骨細胞が並んでいる。

又1個の軟骨細胞の保有平面積は非投与群は21μ²であるのに対し、投与群では26μ²に達している。即ち投与群では軟骨細胞は大きくなっている事が判る (表7)。

化骨層における変化は投与群では大型な化骨した細胞が所々に存在しているのに対し、投与群においては化骨細胞はよほど大型でなく各細胞柱の末梢側に並んでいる。

両群とも骨芽細胞の出現は第7週群よりも減少している。

軟骨細胞核、基質の染色性は第5, 7週群に比し低下しているが、特に非投与群の方がその程度が強い。

A-M 染色 (図26, 27)

細胞間を走る膠原線維は投与群では泡状層、増殖層細胞間を一様に略々平行して走り、規則正しく細胞を分けており、軟骨細胞の中には2核細胞がみられ、H.E染色の項で述べた如く、細胞の大きさが両層とも略々一様な大きさを呈し、形も略々同じ形をしており、増殖細胞は大きい、非投与群では膠原線維は増殖層、泡状層とも走行が錯走しており、泡状層の軟骨細胞は大小不同で互に癒合し合つたりして形も一定せず著明な変形が認められる。

即ち本染色法の所見は投与群では第5, 7週の所見と大差をみないが、非投与群では著しい退行変性を示していると云つていい。

Al-P 反応 (図28, 29)

化骨層、骨梁形成部における本反応は、投与群では中等度乃至強陽性であるが、非投与群では同部の反応は弱陽性である。

泡状細胞層における反応は投与群では中等度陽性で

あるが、非投与群は陽性に認められる。増殖細胞層は両群とも陰性である。

投与群は第7週群と同様な反応は非投与群よりも陽性度が強い。

PAS 反応, Meta 反応

共に軟骨層, 骨膜に陽性であるが、投与群, 非投与群に差を認めない。

第4項 小 括

生後5日目のCF1系マウスにジベレリンをpro Kilo. 800mgの割で腹腔内に毎日注射して、投与開始後第5週, 第7週, 第9週目における全身状態, 体重変化, 下肢骨格長, 重量, 脛骨中樞側骨端軟骨の組織学的並びに組織化学的变化を検索してみた。

体重は各群とも投与群は非投与群を凌駕して増加している。

摘出下肢骨格の長さは、大腿骨, 下腿骨長径は各群とも投与群は非投与群よりも長く、特に下腿骨長径において著明にその差がみられた。

下肢骨格重量も下肢骨格長に比例して投与群は非投与群より増加している。

脛骨中樞側骨端軟骨の組織学的変化は各週群とも投与群は非投与群に比し、骨端軟骨の厚さは厚く、軟骨細胞柱の配列も真直で規則正しく、各軟骨細胞柱の中も広く細胞が大きく軟骨基質の増大が認められ、増殖細胞に2核細胞が非投与群より投与群に多くみられた。併しこれらの変化は第5週群投与群に最も著明で長期投与群になるに従いその程度を減じているが、それでも尚非投与群より著しい変化がみられる。

組織化学的には各週群とも投与群に Al-P 反応は高度で、PAS 反応, Meta 反応は投与群, 非投与群との間に差は認められなかつた。

第2節 筋肉内注射群

第1項 第5週群

投与群2匹, 非投与群2匹であるが、筋肉内注射群は第5週群腹腔内注射群と同腹で且つ非投与群は前節第5週群非投与群と同一である。

1) 全身状態

投与群は腹腔内注射群と同様に動作, 毛髪に変化なく死亡例はない。

2) 体重変化

生後5日目における体重は腹腔内注射群と同一で投与群, 非投与群も同一体重で投与群は投与開始後第1週目までは、非投与群より体重曲線は低下しており、第4週以後において僅かに非投与群より増加する。

3) 摘出下肢骨格長並びに重量

大腿骨長径は非投与群のそれと同長であり、下腿骨長径も殆んど両群とも差は認められなかつた。

下肢骨格重量の平均値はむしろ非投与群よりも軽い。

4) 組織学的並びに組織化学的变化

脛骨中樞側骨端軟骨の厚さは投与群は僅かに非投与群よりも厚くなる。軟骨細胞柱の配列はやや整然とするが、腹腔内注射群には及ばない。増殖層, 泡状層における細胞の大きさ, 形態は非投与群, 投与群ともに大した差を認めず両群とも非常に似た組織像を呈している。

A. M 染色によつても膠原線維の走行は乱れ増殖細胞は扁平化し全く非投与群と同様の所見がみられた。

Al-P 反応, PAS, Meta 反応いずれも投与群, 非投与群の間に差をみなかつた。

第2項 第7週群

投与群2匹, 非投与群2匹である。本群も腹腔内注射群と同腹で非投与群は腹腔内注射群非投与群と同一である。

1) 全身状態

動作は活潑で、毛髪状態には変化がみられず、死亡例なし。

2) 体重変化

注射開始時は非投与群と同一体重であるが、注射開始後第3週目までは非投与群と略々同一の増加曲線を通るが、その後は急に増加の傾向を示し非投与群を凌駕しているが腹腔内注射群には及ばない。

3) 摘出下肢骨格長並びに重量

大腿骨長径は投与群, 非投与群とも差がないが、下腿骨長径は明らかに投与群の方が増加している。

下肢骨格重量は投与群に増加が認められる。

4) 組織学的並びに組織化学的变化

脛骨中樞側骨端軟骨層の厚さは投与群は非投与群よりも僅かに増加している。併し泡状層の厚さは両群とも略々同一である。併しその軟骨細胞柱の配列, 細胞の大きさ, 形は非投与群と殆んど大差なく軟骨基質も腹腔内注射投与群の如く広くない。増殖細胞も扁平である。

A. M 染色による膠原線維の走行も非投与群に似て錯走し、増殖細胞, 泡状細胞ともに投与群は多形性に富み、大きさも不揃いである。

組織化学的に Al-P 反応, PAS 反応, Meta 反応共に両群に大差を認めない。

第3項 小 括

摘出下肢骨格長並びに重量、体重変化は筋肉内注射投与群は非投与群と殆んど大差を認めず第7週群にては投与群が僅かに非投与群より増加しているが、組織学的並びに組織化学的变化は両群の間に著明な差を認めなかつた。即ち筋注群投与群においては、腹腔内注射群の如く一貫した変化をみず、筋肉内注射によるジベレリンの効果は殆んど認められなかつたと云つていい。

第4章 総括並びに考察

各種動物ホルモンの骨軟骨生長に及ぼす影響については、古くより多くの研究がある。動物ホルモン特に脳下垂体前葉ホルモン、甲状腺ホルモン、性ホルモン、副腎皮質ホルモンは骨、軟骨の生長、成熟に欠くべからざるものであることは周知の事実である。

又最近生体に有害作用を有する物質の骨、軟骨に対する作用についての研究が盛んに行なわれている。即ち堀口(1954)、Robert D. Ray(1956)は低蛋白食、低磷食により骨端生長帯が狭小化し、軟骨細胞が萎縮する事を報告し、V. P. Amato(1959)は Sweet Pea の種子を動物に投与し、同様な変化を来たす事を観察し、その原因は一種の Alkaloid による毛細血管障害に基因する Ca 代謝の変化によるものと考えている。Hult(1959)は Papain が骨端生長帯に極めて短時間内に著明な萎縮を惹起する事を報告して注目をあびている。

即ち現在までの所、骨端軟骨の生長促進物質としては各種動物ホルモンについての研究が殆んどで、動物体自ら生産し得ない物質で、骨軟骨の著明な生長促進を来たすものについての研究は少ないのが現状のように思われる。

然し植物においては生長促進物質の研究は極めて旺んで、植物の生長に関与する所謂植物ホルモンについては多くの研究がある。これらの生長促進物質で自ら植物体内において生産する物質を総称して Auxin と呼んでいるが、ジベレリンは Auxin とは異なる生長促進物質で稲の馬鹿苗病菌の代謝生産する物質である。

ジベレリンの植物に対する大きな作用は若い生長過程にある茎、葉の伸長作用で、その作用効果、機序については Auxin と異なるものである。Sachs の述べる如くジベレリンには植物細胞の分裂促進作用もあると云う論もあるが、現在の所は細胞膜に作用してその伸長を促進すると考えている人が多い。

動物細胞は植物細胞と異なり細胞膜を欠き且つ機能

的にも全く異質のものである。

著者は極く幼若なマウスにジベレリンを大量投与する事により骨端軟骨の厚さが増大し、軟骨基質が増加し細胞自身が大きくなる事を観察した。著者の実験から得た所見が軟骨の生長促進を意味するものであるかどうか、又ジベレリンの動物軟骨細胞に対する作用及びその作用機序が如何なるものであるかについて考察を行なつてみたい。

骨端軟骨の生長促進の様相について Maximow & Bloom(1957)は脳下垂体除去動物における骨端生長帯の変化より考察して次の如く述べている。即ち骨端軟骨層の生長旺盛なことを示す組織像は軟骨層の厚さの増大、軟骨細胞柱の配列が真直で整然とし、各軟骨細胞柱に含まれる細胞数の増加、細胞が大きくなる事、核分裂の旺盛な像及び軟骨基質の増大が軟骨生長の旺盛な事を示す指標となると云う。又生長期の動物に過剰の前葉ホルモンを投与すると巨大動物を生じ、生長期以後の動物に投与すれば、骨の大きさを僅かに増すのみであると述べている。

氏は又この様な変化は Vitamin A, C によつても惹起されるものであると云つている。

Maximow の説をもつて著者の実験成績をみるに

Zeuuw & Sherman は微量のジベレリンを家畜の飼料に混じて与えると体重増加を来たすと云つている。本実験は大量投与実験であるが、体重は各群ともジベレリン投与時は略々同一であるが腹腔内注射群は各週群とも非投与群より増加している。元来マウスの体重は著者の経験によると生後6週にして生長に伴う体重増加率が少くなり、それ以後の増加は極めて緩徐なものである。本実験においては全群とも注射開始後第4週まで(生後約5週)急峻なカーブを以つて増加し、以後は徐々に増加しているが投与群と非投与群との間に、特に腹腔内注射群においては明らかな体重の差がみられる。殊に第7週、第9週群においては非投与群は増加のカーブが第4週以後は極めて緩徐となつているのに腹腔内注射群は、なおつづけて増加していく傾向を示しているから、この事からジベレリンは腹腔内に投与された場合体重を増す作用があると云い得る。

又各群とも屠殺直後、可及的充分に軟部組織を除去した下肢骨格長並びに重さを測定してみたところ、全群とも体重変化カーブに一致した計測値を得た。

即ち大腿骨長径については筋注群は非投与群に比し殆んど差を認め得なかつた。腹腔内注射群第5週群では殆んど増加が認められなかつたが、第7、第9週群

では明らかな長さの増大が認められた。即ち15%内外の増加がみられた。

下腿骨長径は筋注群では投与第7週群では約14%増大しており、腹腔内注射群は全群とも16~21%の増加がみられた。

下肢骨格重量も骨の長さ按比例して増加している。即ちジベレリンは全体重を増加させるのみならず、骨の生長をも促進させる作用がある事が分る。

以上の肉眼的、計測的に認められた骨の生長促進作用を組織学的並びに組織化学的に証明するため脛骨中樞側骨端軟骨を検索した。

骨端軟骨層の厚さは表に示した如く、各群とも投与群は非投与群に比し増大している。特に腹腔内注射群は各群とも厚さの増大が一層著明である。この事実は Maximow の云う生長促進の1条件にかなうものである。

軟骨層の厚さの増加は Ham (1953) によれば、間質生長の増加によるものであると云う。骨端軟骨の生長促進作用を有する VC の投与によつて膠原線維形成が旺になり配列が整然とする事を Wolbach (1933) は述べている。本実験で A・M 染色により骨端軟骨層の染色を行なつてみると、投与群は非投与群に比し、膠原線維の走行が非投与群より著るしく整然としており、膠原線維は平行して軟骨細胞を圍繞して走っている。この事実は Maximow, Ham の云う軟骨基質生長促進の所見と一致するものである。

堀口はトリプトファン欠乏食飼育動物の骨端軟骨層の変化を調べているが、その結果、軟骨生長は抑制され、軟骨層の厚さは菲薄化し、増殖細胞はその高さを減じ扁平化の傾向が強くなる。即ち細胞の萎縮を来たしそのために軟骨層の厚さが減るのであろうと結論している。氏の実験によると増殖細胞の扁平化は、細胞の萎縮に基因するので生長抑制の証拠であると考えてよいであろう。著者の実験では増殖層の軟骨細胞は第5,第7週目では非投与群では扁平であるが、腹腔内注射投与群は楕円形となつている。第9週群においては腹腔内注射投与群、非投与群とも扁平化する傾向がみられるが、投与群においてはなお増殖層、泡状層境界部では楕円形の細胞が存在している。又腹腔内注射投与群は各週群とも軟骨細胞柱は中樞側境界部まで一杯に伸びている。これらの事実も又投与群の骨端軟骨の生長力の旺盛さを示す所見と考えられる。

増殖層における細胞核分裂像は投与後第5,第7週群においては、非投与群より投与群殊に腹腔内注射群に

多くみられる。第9週群においては、腹腔内注射群には多くの2核細胞がみられるが、非投与群では核分裂像は全くみられない。

多核細胞が老化退行変性の過程のみに生ずるのでなく、旺盛な細胞分裂の過程においても生ずる事は、肥大軟骨細胞の培養について既に鶴海(1958)が証明している事であり、教室の鷺山はジベレリンは培養軟骨細胞に対し、その生長を促進すると述べて、特に2~3核の多核細胞が対照例より多い事を認めている。この事実から骨端軟骨増殖層における2核細胞の存在は Maximow の云う生長促進の一所見と考えてよいと思う。

又投与群においては個々の軟骨細胞は非投与群より肥大している。これは A・M 染色により細胞間膠原線維により囲まれた細胞が非投与群より投与群の方が大きく、細胞核自体も大型である事が証明される。

Al-p 反応は明らかに腹腔内注射各投与群では非投与群より反応が強くと出現している。

現在まで Al-p 反応に関する研究において、その反応性の強弱を染色度によつて決定している傾向がみられるが、染色度は切片の厚薄、染色時間、染色液の条件により左右される事が多く、従つて染色度のみを以つて反応の強弱を論ずるのは妥当でないと思われるが、本実験において、同一標本を20~30枚の切片として、同時に同一染色液において染色して換鏡してみたが、いずれも上記の如き染色度を得、投与群は非投与群より染色性が強かつた。Kulman (1960) は骨端軟骨部に含有する Al-p 量の分布を調べ、化骨層、泡状層、増殖層の順に多いと述べている。Al-p 反応の生物学的意義については Robinson (1923) が石灰沈着に直接関係があると称えた時代より大きく飛躍し新陳代謝の旺盛な活動的組織に多量に存在する事は一般に信じられている。

本実験においても、ジベレリン投与群に強く反応する事は、骨端軟骨細胞の活動旺盛な事、即ち生長促進作用の一つの表現であると考えられる。

以上述べた如く、体重、下肢骨格長、重量、組織学的並びに組織化学的所見を総合してみるに、ジベレリンは骨軟骨生長に対して、生長促進作用を有する事が証明出来た。

著者は本実験を行なう前に、ジベレリンを pro Kilo. 800mg, 500mg, 250mg, 100mg, 50mg, 20mg, 10mg, 5mg, 1mg の割に生後2週目よりマウスの筋肉内、腹腔内に隔日に投与し、投与開始後第1週目より第7週目まで

毎週屠殺して非投与群と体重変化、脛骨中樞側骨端軟骨の組織学的変化を比較してみたが、投与群に何らの変化もみられず全く非投与群と同一所見を示した。この実験と本実験との結果を考察してみると、

1) 本実験は生後5日目の極めて幼若なマウスに投与を開始した。

2) 本実験は毎日連続して投与した。

以上の2点が異なる。

然して本実験においては骨軟骨は計測上からも、組織学的変化から Maximow の述べている脳下垂体前葉ホルモンを投与した動物生長の所見に極めて酷似している事実は、ジベレリンの作用は脳下垂体前葉ホルモンの作用に全く似ている。

即ち武田薬品工業株式会社研究部、安部の実験により腹腔内に投与されたジベレリンは24時間以内は体内に残存している故、毎日連続腹腔内に投与すれば、常時体内にジベレリンが存在している事は脳下垂体前葉ホルモンが常時体内に分泌されている事と似ている。この事は著者が前に行つた実験で隔日投与で変化を見出せなかつた事から考えてジベレリンの作用の前葉ホルモンとの酷似を確信させる。

更に脳下垂体前葉ホルモンが生長期の動物に強く作用し生長期以後には、その作用が余り認められない事実は、生後2週目で既に充分生長したマウスにジベレリンを投与した実験では殆んど生長を促進する変化を認めず、本実験における如く、生後5日目の生長機能旺盛な時期にジベレリンを投与して生長を促進し得た事もジベレリンと前葉ホルモンの作用の類似性を示す根拠となりうるものである。

Zondeck によれば性ホルモンが骨端軟骨の生長を抑制するのは、前葉ホルモンに性ホルモンが作用して間接的に骨端軟骨に影響すると述べているが、本実験においてジベレリンをマウスの腹腔内に投与すると骨端軟骨増殖層の細胞分裂が促進され2核細胞を多数認め、軟骨基質の増大を来した所見を得、岡山が培養軟骨細胞にジベレリンを直接作用させ同様に多数の2~3核細胞の出現を証明した事実からジベレリンは生体に投与された場合、性ホルモンと異なり直接骨端軟骨細胞に作用するものと推察される。

即ちジベレリンは直接骨端軟骨細胞に作用して、細胞分裂を促進し軟骨細胞を肥大させ、その細胞機能を亢進させて軟骨基質の生成が旺盛となり軟骨層の厚さが増大して来るものと考えられる。

以上の事実は植物体にジベレリンを直接ふりかけて

植物の生長を促進する事実から考えて、極めて興味深いのである。

又本実験において生後5日目よりジベレリンの大量をマウスに投与したが、投与中マウスの動作、毛髪の状態などは非投与群に比し何らの変化もみられず、又一匹の死亡例もなかつた。又投与群の内臓に肉眼的に認むべき変化もみられなかつた。

第5章 結 語

植物生長促進物質であるジベレリンを生後5日目の極めて幼若なマウスの筋肉内、腹腔内に注射して次の結果を得た。

- 1) 腹腔内投与群は非投与群に比し体重増加が認められた。
- 2) 摘出下肢骨格の長さ並びに重量も略々体重に平行して腹腔内投与群は非投与群より増加していた。
- 3) 脛骨中樞側骨端軟骨は非投与群に比し腹腔内投与群は軟骨層の厚さが増し、軟骨細胞の配列は真直で整然としており、増殖層における細胞分裂が旺盛で軟骨細胞も大きく、軟骨基質の増大が証明された。
- 4) 化骨層、泡状層における Al-p 反応は明らかに投与群に強く出現し、軟骨生長帯の活性の高い事を認めた。
- 5) 筋肉内投与群は腹腔内投与群に比し、変化の程度は少く殆んど非投与群と同一であつた。

以上の変化はジベレリンが骨軟骨の生長を促進する作用がある事を示すものであり、その生長促進作用は軟骨細胞の肥大と細胞分裂促進によるもので、恐らくジベレリンが骨端軟骨細胞に直接作用するものであろうと推論した。

稿を終るに臨み、ご指導、ご校閲を賜つた恩師近藤鋭矢教授に深甚の謝意を捧げ、また終始ご懇篤なるご指導、ご助言を賜つた当教室鶴海寛治講師に深謝します。

ジベレリンについてご教示を戴いた京大農学部応用植物学教室小西通夫講師に感謝します。

尙本研究に対しジベレリンを提供され、多大のご援助を戴いた武田薬品工業株式会社から感謝致します。

又本研究を遂行するに当り、財団法人藤原記念財団より研究費の援助を受けたことを記して感謝の意を表します。

本論文の要旨は第92回近畿外科学会の席上において発表した。

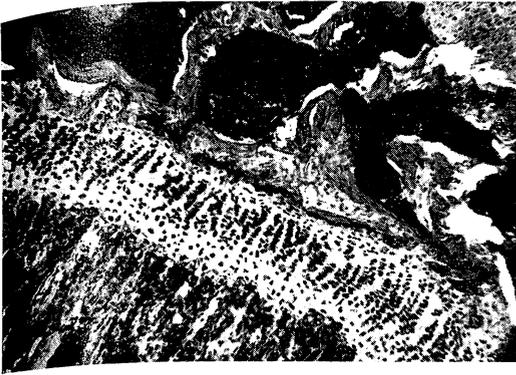


図7 第5週群 腹腔内注射群, 非投与群, H.E染色.

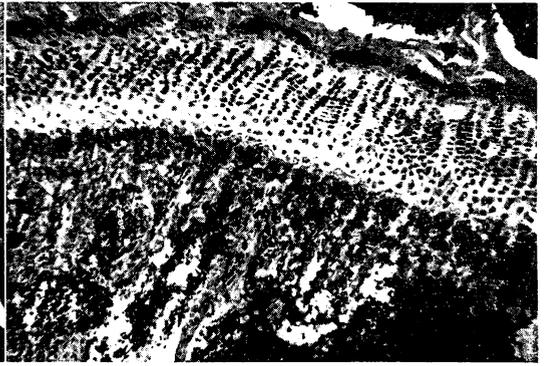


図8 第5週群 筋肉内投与群, H.E染色.

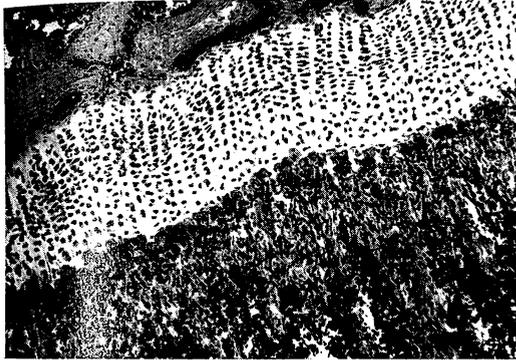


図9 第5週群 腹腔内投与群, H.E染色.

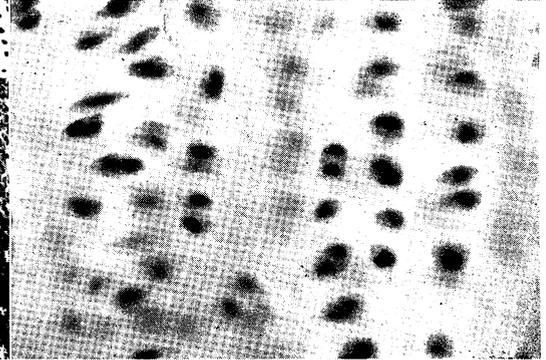


図10 第5週群 腹腔内投与群, 増殖細胞中に多数の2核細胞を認める.



図11 第5週群 非投与群, 増殖細胞中に2核細胞がみられない.

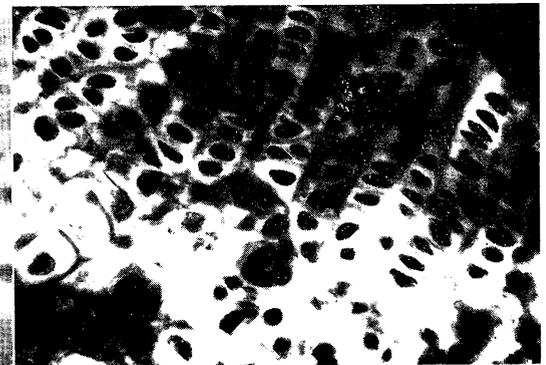


図12 第5週群 非投与群, A.M染色, 膠原線維が錯走し細胞の形は不整で小型である. 軟骨基質が狭い.

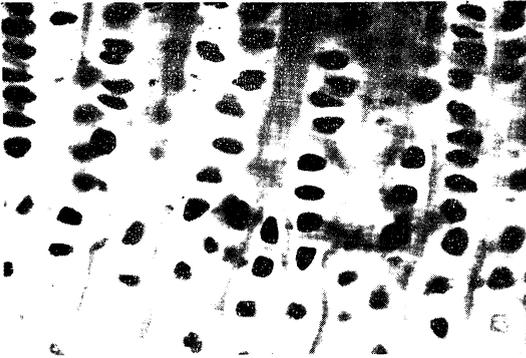


図13 第5週群 腹腔内投与群, A.M染色.
 膠原線維は平行に走り細胞を基盤状に分ち, 細胞も大きさが大型で揃っている, 基質の増大がみられる.

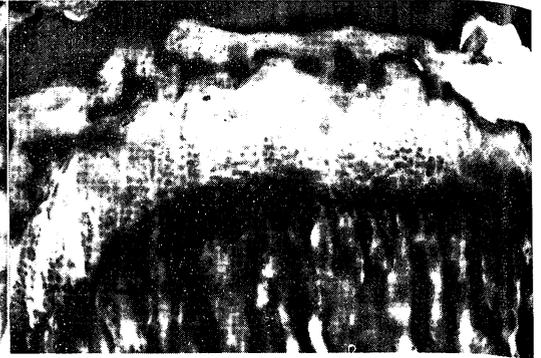


図14 第5週群 非投与群, Al-p反応.
 骨稜形成部, 化骨層に陽性

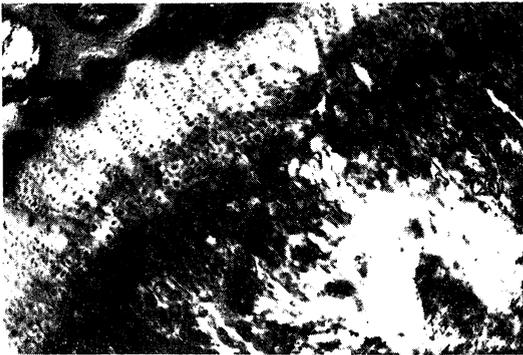


図15 第5週群 腹腔内投与群, Al-p反応.
 骨稜形成部, 化骨層, 泡状層に陽性である.



図16 第7週群 腹腔内注射群, 非投与群,
 H.E染色.

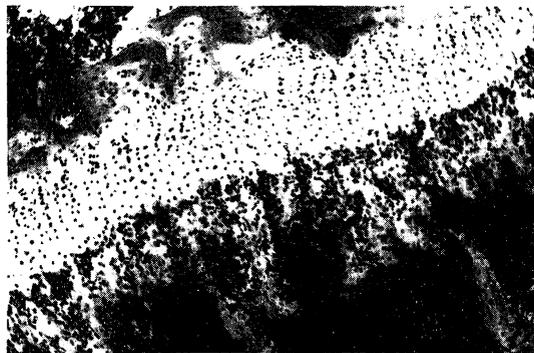


図17 第7週群 腹腔内投与群 H.E染色.



図18 第7週群 非投与群, A.M染色.
 膠原線維は錯走し, 小型な不整な細胞
 がみられる.

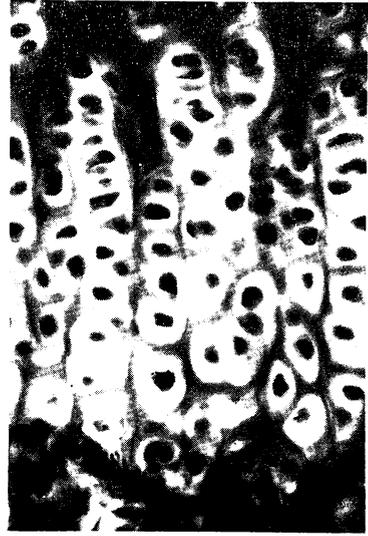


図19 第7週群 腹腔内投与群, A.M染色.
 膠原線維は平行し同じ大きさの大型な
 細胞が並び, 軟骨基質増大す.

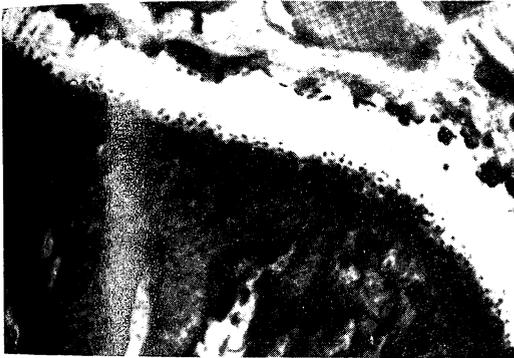


図20 第7週群 非投与群, Al-p反応.
 骨稜形成部, 化骨層に陽性.



図21 第7週群 腹腔内投与群, Al-p反応.
 骨稜形成部, 化骨層, 泡状層に陽性.



図22 第9週群 腹腔内注射群, 非投与群
 H.E染色.

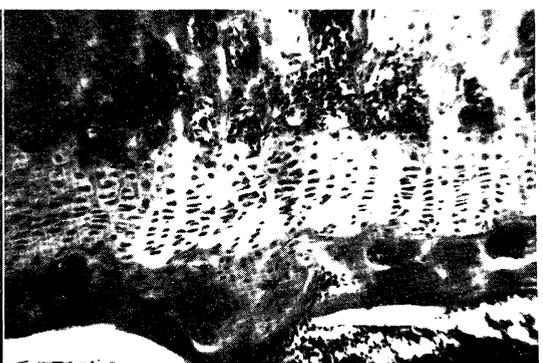


図23 第9週群 腹腔内投与群, H.E染色.

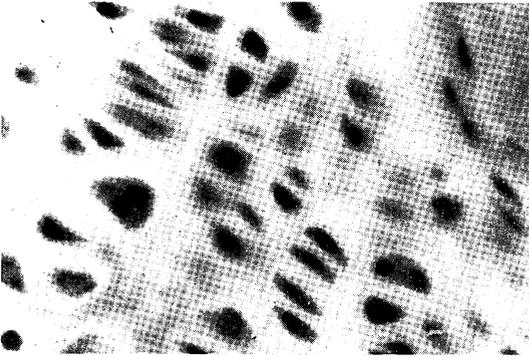


図24 第9週群 腹腔内投与群.
増殖細胞は大型で2核細胞を認める.

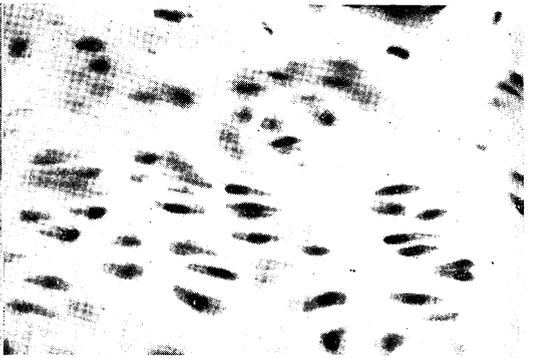


図25 第9週群 非投与群.
増殖細胞は扁平で2核細胞を認めず.

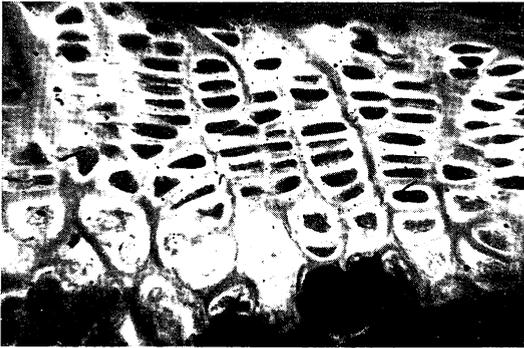


図26 第9週群 非投与群, A.M染色.
細胞は小型で極めて扁平, 膠原線維の
走行が乱れている.

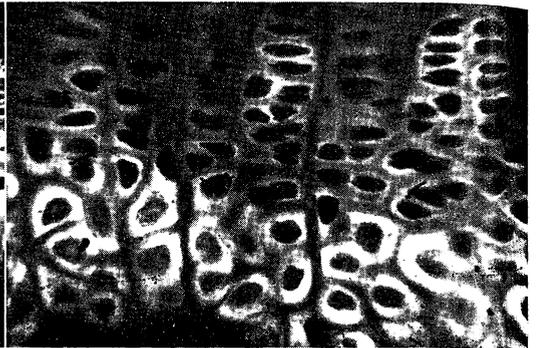


図27 第9週群 腹腔内投与群, A.M染色.
細胞は大型で核は円形に近く, 膠原線
維は平行している.

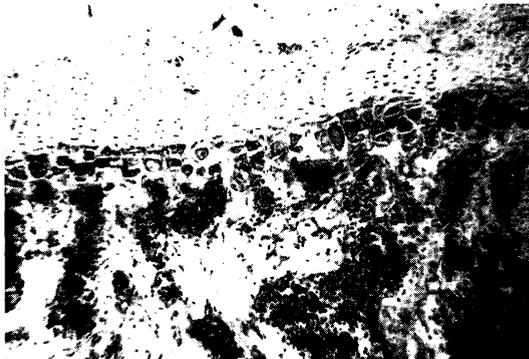


図28 第9週群 非投与群, Al-p反応.
泡状層化骨層の反応弱い.

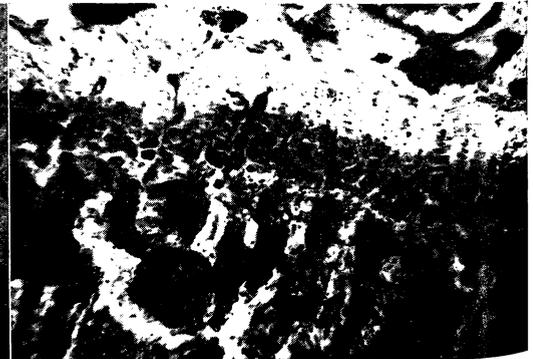


図29 第9週群 腹腔内投与群, Al-p反応.
泡状層, 化骨層の反応は尚強い.

参 考 文 献

- 1) Ham, A. W. : Histology, London, Lippincott Company, 1952.
- 2) Weinmann, J. P. : Bone and Bones, St. Louis, C. V. Mosby Company, 1955.
- 3) Bourne, G. H. : The Biochemistry and Physiology of Bone, Academic Press Inc., 1956.
- 4) Ray, R. D., Stedman, D. E. : The Effect of Various Diets on The Mobilization of Strontium from the Rat Skeleton. J.B.J.S., **38-A**, 637, 1956.
- 5) Maximow, A. A., Bloom, W. : The Textbook of Histology, 7th. Ed., 1957.
- 6) Amato, V. P., Bombelli, R. : Early Skeletal and Vascular Changes in Rats Fed on Sweet Pea (Lathyrus Odoratus) Seeds. J.B.J.S., **41-B**, 600, 1959.
- 7) Hulth, A., Westernborn, O. : The Effect of Crude Papain on the Epiphyseal Cartilage of Laboratory Animals. J.B.J.S., **41-B**, 836, 1959.
- 8) Kuhlman, R. E. : A Microchemical Study of the Developing Epiphyseal Plate. J. B. J. S., **42-A**, 457, 1960.
- 9) Kember, N. F. : Cell Division in Endochondral Ossification. J.B.J.S., **42-B**, 824, 1960.
- 10) 飯田貞二郎, 他 : 動物組織培養に及ぼす Gibberellin A の影響. 日農化誌, **18**, 207, 1942.
- 11) 飯田貞二郎, 他 : 稲馬鹿苗病菌の生産する稲苗を徒長せしむる物質 Gibberellin について. 日農化誌, **15**, 257, 1939.
- 12) 大村清二 : 植物ホルモンの動物細胞に及ぼす影響. 日病会誌, **36**, 32, 昭23.
- 13) 大村清二 : 植物ホルモンの動物細胞に及ぼす影響. 日病会誌, **37**, 22, 昭24.
- 14) 末広 勲 : 植物ホルモンの動物体に対する作用. 日病会誌, **38**, 141, 昭24.
- 15) 末広 勲 : 植物ホルモンの動物体に対する作用 (2). 日病会誌, **39**, 79, 昭26.
- 16) 堀口銀二郎 : 骨と栄養 (第1編). 日整会誌, **28**, 173, 昭29.
- 17) 堀口銀二郎 : 骨と栄養 (第2編). 日整会誌, **28**, 487, 昭29.
- 18) 児玉柱三, 他 : 生物化学最近の進歩. 東京, 技報堂, 昭30.
- 19) 武田薬品工業K.K.研究部 : 武田ジベラ. 昭32.
- 20) 高松英雄, 赤星義彦 : 硬組織にけおるアルカリ・フォスファターゼの組織化学的証明法. 日外宝, **26**, 301, 昭32.
- 21) 鷺谷澄夫 : 負荷条件の生長長期長管骨長径成長に及ぼす影響に関する実験的研究. 日整会誌, **31**, 719, 昭32.
- 22) 赤星義彦 : 実験的関節結核の組織化学的研究. 日外宝, **27**, 755, 昭33.
- 23) 住木諭介 : ジベレリンの化学とその生理. 蛋白質核酸酵素, **3**, 3, 27, 1958.
- 24) 重城良一 : 弗素の骨折治癒に及ぼす影響に関する実験的研究. 日外宝, **27**, 1210, 昭33.
- 25) 鶴海寛治 : 軟骨細胞の組織培養に関する研究. 日外宝, **27**, 1433, 昭33.
- 26) 林 瑞庭 : 坐骨神経切断及び股動静脈結紮の骨折治癒機転及び骨端軟骨部に及ぼす影響に関する実験的研究. 日外宝, **27**, 1484, 昭33.
- 27) 阿部又三 : ジベレリンについて. 澱粉糖技術研究所会報, **19**, 16, 昭31.
- 28) 長岡正泰 : 上皮小体別出が諸臓器アルカリフォスファターゼの消長に及ぼす影響に就いての組織化学的研究. 北野病院紀要, **1**, 2, 昭34.
- 29) 吉川 修 : 骨髄腔閉塞の長管状骨々長径成長に及ぼす影響に関する実験的研究. 日整会誌, **32**, 1057, 昭34.
- 30) 赤堀四郎, 他 : 植物の生化学, 生化学講座, 東京, 共立出版株式会社, 昭34.
- 31) Lison, L., 今泉訳 : 組織化学および細胞化学, 東京, 白水社, 1959.
- 32) 林 武 : ギベレリン研究の概観. 日本土壤肥料科学雑誌, **30**, 553, 昭35.
- 33) 薬事日報, 昭35年8月27日号.
- 34) 榎田喜三郎 : 骨端軟骨板串釘式骨移植の骨長径成長に及ぼす影響に関する研究. 日整会誌, **34**, 75, 昭35.
- 35) 道山新一 : 慢性水銀中毒に於ける骨変化に関する実験的研究. 日整会誌, **34**, 329, 昭35.
- 36) 山口博三 : 鶏胎仔の発育, 特に骨発育に及ぼす諸種ホルモンの影響に関する研究. 日整会誌, **34**, 579, 昭35.
- 37) 住木諭介 : 植物生長調整物質の化学. 有機合成化学協会誌, **18**, 79, 1960.
- 38) 水野昭平 : 発育期マウスの骨に対する性ホルモンの影響. **35**, 143, 昭36.
- 39) 住田武夫 : 血行障害が骨成長帯に及ぼす影響に関する実験的研究. 日整会誌, **35**, 629, 昭36.