

組織培養法에 依한
鼠癩菌 및 人癩菌의 培養試驗

(Cultivation of Mycobactrium leprae murium)
(and Mycobacterium leprae by the tissue Culture)

指導 洪 信 永 教授
柳 駿 教授
延世醫大 看護學科 李 仁 子
(In Ja Lee)

Abstract

Since the demonstration of Mycobacterium leprae murium and its recognition as the causative agent of rat leprosy, this intracellular parasite has been an object of unusual interest in connection with the problem of human leprosy. Like the human leprosy bacillus, it has thus far defied all efforts at cultivation in vitro, whether in bacteriological media or in cell cultures.

Many microbiologists have attempted to do artificial culture of Mycobacterium leprae.

Hansen in 1872, after this finding of Mycobacterium leprae, was the first person to discover that this microorganism could cause an infectious disease in the human body. This was 10 years before the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Koch. It is generally known that there are no any successful artificial culture meth-

ods of Mycobacterium leprae at the present time.

In the 1940's, Hanks tried to cultivate the leprae bacilli by means of the tissue culture method extensively and systemically but in 1950, according to his report it was impossible to cultivate the Mycobacterium leprae.

However, Chang at the National Institute of Health, U.S.A., attempted to culture Mycobacterium leprae murium with the tissue culture method without regarding the report of Hanks. In 1960, he reported the multiplication of Mycobacterium leprae murium in the abdominal macrophages of mice.

In 1963, Rees and his associates reported that Mycobacterium leprae were cultured in the fibroblasts of mice and rats. Japanese microbiologist, Nakamura, reported the multiplication of Mycobacterium leprae murium in the testicular fibroblasts in mice.

To date there is no validity of Chang's report, therefore we are trying to do similar experiments to test the validity of the contribution. At the same time attempts were made to cultivate *Mycobacterium leprae murium* and *Mycobacterium leprae* with various cell cultures of cold blooded animals.

Materials and Methods

Media:

NCTC-109

YLA (Yeast extract lactoalbumin hydrolysate)

Hanks's balanced salt solution

Medium 199

Beef embryo extract

Horse serum & calf serum

Penicillin & streptomycin

Heparin

Glass ware;

Pyrex Leighton-type culture glass tube

Coverslips

Pasteur pipettes

CO₂ air mixture;

Expired air

Host cells;

Abdominal macrophages from mice and frogs, kidney cells from frogs, *Ophicephalus argus* and *Cyprinus carpio*. These cell cultures were used as host cells to cultivate *Myobacterium leprae murium* and *Mycobacterium*

leprae.

Bacteria;

Mycobacterium leprae murium; Hawaiian strain of murine leprosy was preinoculated in rat testis and fresh murine leprosy granuloma was emulsified in medium 109.

Mycobacterium leprae; a fresh leprosy case was removed and emulsified in medium 109.

Preparation of cell cultures;

Abdominal macrophages from mice and cold blooded animals. Animals were killed by cervical fracture. The skin of the whole animal was sterilized with alcohol and tincture of iodine, and an opening was made just below the tip of the xiphoid cartilage. With a bent-tip Pasteur pipette and rubber bulb, the peritoneal cavity was irrigated at first with 4 to 6 ml of Hanks's balanced salt solution and later NCTC 109 medium containing heparin, diluted 1:20,000. To avoid injury and hemorrhage, the pipette was cautiously inserted and pushed gently into the pelvis with the tip facing the abdominal wall. The intestines were moved from side to side with the pipette while the xiphoid was lifted with forceps to prevent overflow of the irrigating solution. This made it possible to obtain a well-distributed cell suspension. The pipette was inserted in the right side

and the suspension aspirated from the area between the liver and the abdominal wall. Three to 5 ml of suspension, containing approximately 2×10^8 cultivable cells, was generally obtained from each animal. The suspensions were not centrifuged or washed. Sometimes pooled suspensions were made from several animals.

Kidney cells from frog, *Ophicephalus argus* and *Cyprinus carpio* were prepared by removing kidneys aseptically minced with scissors and trypsinized. These trypsinized cells were resuspended in medium 109.

Methods of implanting culture;

Emulsions of *Mycobacterium leprae murium* and *Mycobacterium leprae* in medium 109 were introduced into those cell suspension. 1 ml of cell suspension inoculated with the organisms was placed in a Leighton tube containing the coverslip.

After 1 to 3 hours at 37°C in a CO_2 condition, the supernatant fluid was replaced with fresh medium. During this time the viable cells attached themselves to the glass while the lymphocytes, which generally do not stick to the glass, were almost entirely removed. The medium was changed twice a week.

The cell cultures were carefully observed twice a week under weak magnification and a coverslip was taken out each week for a stained specimen.

The coverslip was stained in fuchsin-hematoxylin stain and the multiplication of the organisms was examined under microscopy.

Results;

Mice macrophages, obtained from the peritoneal exudate, can be maintained in good condition for 26 days in a medium consisting of 90 per cent horse serum, 10 per cent Medium NCTC 109 and 10 per cent beef embryo extract, provided that the pH is carefully maintained at 7.2.

The peritoneal exudate cells usually become active within 1 to 3 hours and most of the bacilli are phagocytized within this time. The macrophages inoculated with *Mycobacterium leprae murium* began to elongate gradually, the process being completed in about ten days and there was a definite sign of multiplication thereafter. The first signs of the growth of the *Mycobacterium leprae murium* in the culture is elongation, which is obtained as early as in 10th day; maximum length usually is seen after 2 weeks. The length of the bacilli is sometimes remarkably long.

Mouse macrophages are found to be suitable host cells for *Mycobacterium leprae murium*. In one experiment, the cells were harvested at the 30th day and shaken thoroughly until they were homogenized. Intraperitoneal injection of the homogenized material

in mice at this point resulted in progressive murine leprosy within 2 to 3 months.

Mycobacterium leprae inoculated in macrophages from the abdominal cavity of mice did not show any signs of elongation neither multiplication which was observed in *Mycobacterium leprae murium*.

Cells from frogs, *Ophicephalus argus* and *Cyprinus carpio* have not been successfully cultured in tissue culture long enough to offer suitable conditions to those organisms. The cells from those cold blooded animals can maintain their life-span only about a week in tissue culture.

1. 緒論

Stefansky (1903)가 鼠癩菌(*Mycobacterium leprae murium*)을 發見하고 이 菌에 依해서 랫드(rat)나 마우스(mouse)에 鼠癩를 일으킨다는 事實을 알게된 後, 人工培養이나 動物接種이 不可能한 人癩菌을 間接적으로 探究할수 있는 對相으로서 學者들의 非常한 關心을 모으게 되었다.

癩菌의 人工培養은 오랫동안 世界 微生物 學者에 依해 많이 試圖된바 있으며, 1872년에 Hansen에 依해 報告된 人癩菌(*Mycobacterium leprae*)은, 1882年 Koch에 依해 發見된 結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)보다 10年 앞섰었으며, 이 發見은 微生物이 人體에 疾病을 惹起 시킨다는 最初의 報告였다. 그後

長期間에 걸쳐 여러가지 方法으로 癩菌의 人工培養이 試圖되었으나, 現在까지 成功된 培養으로서 公認된 것이 없다는 것은 누구나 아는 事實이다.

Twort(1911)는 파라 結核菌(John's bacillus)의 培養에 티모테(Timothee)菌의 死菌體를 加해서 成功한바 있다.

Salle 및 Moser(1934)는 鷄胎兒 浸出液을 加하여 組織培養法에 依한 鼠癩菌 및 人癩菌을 培養하여 菌의 增殖을 보았다고 하나, 이것은 非抗酸菌이라는 것을 알게 되었다.

Lowe 및 Dharmendra(1937)는 組織培養法에 依해서 鼠癩菌의 顯著한 增殖을 보았다고 報告한 바 있다.

1940年代에 Hanks는 組織培養法을 組織적으로 廣範하게 癩菌培養에 適用하려고 試圖한 바 있다. 그의 長期間에 걸친 許多한 努力에도 不拘하고 그 結果는 培養이 組織培養法으로는 不可能 했다는 結論이었다. 그는 그의 實驗을 通하여 癩菌培養이 困難한 여러가지 理由를 提示한바 있다(1950a, 1950b, 1954a, 1956b). 抗酸菌의 大家인 Hanks의 이러한 結論은 거의 確實히 世界の 많은 同調者들에게 失望을 주었던 것이 事實이다. 그리하여 한동안 組織培養法을 癩菌培養에 應用하는 傾向이 거의 없었다.

Evans 및 Bryant(1956)는, 培地에 Vitamin B₁₂를, Wallace et al.(1959)은, 培地에 hydrocortisone

을 加하여 長期間 培養을 試圖했다.

美國 保健院의 Chang은 前 研究者들의 暗示를 一段 無視하고, 다시 組織培養法을 癩菌培養에 適用하기 始作하였다.

그리하여 Chang(1960, 1963)은 人癩菌과 비슷한 쥐에 있는 鼠癩菌(Mycobacterium leprae murium)을 마우스의 腹腔內의 大喰細胞(macrophage)에 增殖 시키는데 成功했다고 主唱했으며, 한편 이 培地에 グリ세린(glycerin)을 넣어서 培養하면 菌이 좀더 길어 진다고 했다(1963).

Rees 및 Fieldes(1958, 1963)는 마우스와 랫드의 纖維芽細胞(fibroblast)에, 그리고 日本의 中村(1963)은 마우스의 睪丸纖維芽細胞(testicular fibroblast)에 增殖시켰다고 報告했다.

上記한 바와 같이 Chang, Rees는 그들의 報告에 成功했다고 主唱하나 아직도 追試者들의 實驗成績이 報告되어 있지 않다.

柳(1962)는 이 鼠癩의 重要性에 對하여 人癩菌과 더불어 微生物學的으로 抗酸菌(Mycobacteria)에 屬하며, 形態學的으로 類似하여 같은 抗酸性을 갖고, 人工培養은 되지 않으나 實驗動物, 特히 마우스, 랫드등에는 잘 感染되며, 사람의 癩病에 잘 効는 藥品은 많은 境遇 鼠癩에도 効果가 있음을 알고 있기 때문이라 했다.

著者는 于先 上記 報告者들의 일을 追試함과 同時에 多角度로 새로운 方法을 追求함으로써, 鼠癩菌 및 人癩菌의 培養試驗을 試圖했다. 첫째로는 Chang의 方法으로 人癩菌을 培養코져 했다.

또한 各種 冷血動物(Cold blooded animal) 즉 개구리(frog), 가볼치(Ophicephalus argus), 잉어(Cyprinus carpio) 등의 大喰細胞와 腎臟細胞에 鼠癩菌과 人癩菌을 接種 實驗했다.

冷血動物을 使用한 것은, 冷血動物에는 非定型的(atypical)인 抗酸菌이 많이 存在하는 것으로서, 冷血動物의 細胞가 혹시 鼠癩菌이나 人癩菌의 宿主細胞(host cell)로서 使用될 수 있지 않을까 기대 했던 것이다.

醫療事業에 從事하는 모든 사람들은 물론이러니와, 그 中에서도 臨床 看護時, 或은 一般患者 看護時에 여 더 가지 무서운 傳染病과 直接間接으로 接하게 되는 것은 周知의 事實이다.

本 實驗에 있어서 取扱된 癩菌도 慢性 傳染病인 癩菌을 일으키는 것으로서 不知間에 傳染될 可能性을 갖고 있는 것이다. 따라서 癩病의 傳染 徑路를 알고, 그 治療와 豫防을 하려면 于先, 實驗室의 培養이 急先務라고 생각하여, 人癩菌과 비슷한 性質을 가지고 있으면서 動物接種이 可能한 鼠癩菌을 먼저 實驗했다. 따

라서 臨床看護時는 물론, 一般의
로 家庭에서나 社會에서 要求하는
多様な 看護教育의 目的을 達成하
는데도 多少나마 도움이 되어 줄
것을 기대 하였던 것이다.

II. 實驗方法 및 材料

A. 使用된 材料

1. 宿主細胞로서는 實驗動物로서
무게 23gm 내지 25gm되는 마우스^①
의 腹腔內 大陰細胞 및 冷血動物組
織으로서, 개구리^② 가물치 그리고
잉어 등의 腎臟細胞 및 腹腔內 大陰
細胞를 使用했다.

2. 培地는 MaQuilkin (1957) 및
Chang (1964)이 使用한 合成培地*
NCTC-109^③를 主로 使用했고, *YLA
(Yeast extract lactoalbumin hy-
drolysate), *Medium 199 그리고
*Hanks's balanced salt solution
(Hanks's BSS)을 썼다.

여기에 牛胚抽出液 (beef embryo
extract, BEE)과 馬血清을 加했다.
指示藥으로는 페놀레드 (phenol red)
0.002 퍼센트를 使用 했고, 抗生物
質은 페니시린 (penicillin, P)을 1ml
當 50 μ , 스트렙토마이신 (streptom-
ycin, S)을 1 ml 當 5r와, 헤파린

* 부록참조

註① 韓國 國立 保健院에서 保管한 種
(Strain).

註② 京畿道 高陽郡 産.

註③ Microbiological Associates, Ins.
Bethesda, Md.

(heparin) 1 : 20,000을 抗凝劑로
썼다.

以上 여러가지 培地 使用은,

a. 마우스의 腹腔內 大陰細胞 培地
에서는 第1表와 같이,

i) Hanks's BSS에, 20 퍼센트 牛
血清 (calf serum, CS), 5 퍼센트 락
트알부민 하이드로라이세이트 (lacto-
albumin hydrolysate, LH), 페니
시린을 1 ml 當 200 μ 과 스트렙토마
이신을 1 ml 當 200r를 使用했다.

ii) Medium 199에, 20 퍼센트 馬
血清 (horse serum, HS), 2 퍼센트
이스트 엑스트랙트 (yeast extract,
YE), 5 퍼센트 락트알부민 하이드로
라이세이트, 페니시린을 1 ml 當 2
00 μ , 스트렙토마이신을 1 ml 當 200 μ
를 使用했다.

b. 마우스의 腹腔內 大陰細胞에 鼠
類菌 接種에서는 第1表와 같이

i) 50 퍼센트 Medium NCTC-109
에, 40 퍼센트 馬血清, 10 퍼센트 牛
胚抽出液, 헤파린 1 : 20,000, 페니
시린 1 ml 當 50 μ 과 스트렙토마이신
을 1 ml 當 5r 를 使用했다.

ii) 10 퍼센트 Medium NCTC
109에, 90 퍼센트 馬血清, 10 퍼센
트 牛胚抽出液, 헤파린 1 : 20,000,
페니시린을 1 ml 當 50 μ 과 스트렙토
마이신을 1 ml 當 5r 를 使用하였다.

c. 마우스의 腹腔內 大陰細胞에 人
類菌 接種에서는, 10 퍼센트 Medi-
um NCTC 109에, 90 퍼센트 馬血
清, 10 퍼센트 牛胚抽出液, 헤파린

1:20,000, 페니시린을 1 ml 당 50 μ 과 스트렙토마이신을 1 ml 당 5 r 를 사용 하였다.

以上 a,b,c, 實驗에서는 37°C 孵卵器에서 培養時, 炭酸가스 混成氣體를 通過시켰으며, 對照群에서는 위와같은 條件下에서 다만 炭酸가스 混成氣體를 通過시키지 않았다.

d. 개구리, 가물치, 잉어의 腎臟細胞培養에 있어서는 第2表와 같이.

i) 개구리의 腎臟細胞를

YLA 培地에, 20 퍼센트 馬血清, 페니시린을 1 ml 당 200 μ 과 스트렙토마이신을 1 ml 당 200 r 를 사용 했다.

ii) 개구리 가물치, 잉어의 腎臟細胞를,

Hanks's BSS에 20 퍼센트 牛血清, 2 퍼센트 이스트 엑스트랙트, 5 퍼센트 락탈알부민 하이드로라이세이트, 페니시린을 1 ml 당 200 u과 스트렙토마이신 200 r 를 사용 하였다.

以上 d의 實驗에서는 溫度別로 4°C, 20°C, 37°C 에 各各 培養했다.

e. 개구리의 大喰細胞 培養은 第3表와 같이,

i) 50 퍼센트 Medium NCTC-109에, 40 퍼센트 馬血清, 10 퍼센트 牛胚抽出液, 페니시린을 1 ml 당 200 u, 스트렙토마이신을 1 ml 당 200 r 와 헤파린 1:20,000을 사용 했다.

ii) 10 퍼센트 medium NCTC-

109에, 90 퍼센트 馬血清, 10 퍼센트 牛胚抽出液, 페니시린을 1 ml 당 200 u, 스트렙토마이신을 1 ml 당 200 r, 헤파린 1:20,000을 사용하여 37°C에 培養時 炭酸가스 混成氣體를 通過시켰다.

3. 硝子器具(glass ware)

培養에 使用된 硝子器具로서는 角瓶^①과 파이렉스製 試驗管^② 160mm×150mm, 카-바그라스^③ 12mm×32mm, 그리고 파스유어 피펫트(Pasteur pipettes)를 使用했다.

B. 硝子器具 準備

器具(카-바그라스 除外)는 水道水(흐르는 물)로 잘 씻어서, 蒸溜水 4,000 ml 당 中性비누(Hemosol^④ 이나 Ivory soap^⑤) 30 gm을 溶解시켜, 90°C에서 24時間 加熱後 冷却시켜, 다시 흐르는 水道水에 洗滌하여 蒸溜水로 24時間씩 2回 끓인後 冷却시켜, 다시 蒸溜水로 洗滌하여 乾燥시켜, 乾熱滅菌器로 170°C에서 1時間 半 乃至 2時間 滅菌시켰다.

카-바그라스는 特別히 取扱하였으며, 上記와 같은 操作으로 滅菌하였다. 즉 中性 비누물을 90°C로 加熱하여 한장씩 넣어서 上記 方法과 같이 處理하여 冷却시킨後, 水道水에 洗滌하여 蒸溜水에 2回 끓여서 乾

註① Matsunami, Japan

註② Pyres Leighton-typecultu-reglass tube, Bellco Glass, Inc., VineLand, N.J., U.S.A.

註③ Matsunami, Japan

燻시킨 後, 試驗管 15 mm×85 mm 에 10장씩 넣어서 乾熱滅菌했다.

C. 牛胚抽出液 (beef embryo extract)의 製法

胚 (embryo)는 길이가 10 cm 乃至 25 cm 되는 것을 使用했다. 이것은 屠獸場에서 胚胎된 子宮을 屠殺直時 그 母牛로부터 可及的 無菌的으로 摘出하여 實驗室로 옮겨서 無菌的으로 胚만 摘出하였다.

胚에서 筋肉, 結締組織과 腦, 心臟, 肺臟 그리고 腎臟을 摘出하여 可及的 細切한 後, 부렌더 (Waring Blendor)에 넣고 30 秒 동안 磨粹한 後, 同量의 Hanks's BSS 에 스트렙토마이신을 1 ml 當 100 r와 퀵시틴을 1 ml 當 100u를 넣어서, 37°C에 30 分間 두었다가 遠心分離器로 1 分 當 2,000 回轉 (2,000 r.p.m.)에서 30 分間 遠心分離 시켰다. 그리하여 上層液을 取하여 適當量씩 나누어 試驗管에 保管하고, 一部는 無菌試驗을 하여 汚染이 되지 않았을 경우에 -15°C 乃至 -20°C에 保管하여 놓고 2 個月 乃至 3 個月間 使用했다 (Parker, 1961).

D. 炭酸가스 孵卵器 (CO₂ incubator)

Chang (1959, 1961, 1964)은 이 炭酸가스 孵卵器를 폴리에치렌 (polyethylene)으로 된 높이 20 cm 乃至 25 cm 되는 것으로 一般 孵卵器 크기로 만들어서, 炭酸가스 混成氣體

(空氣 1 分 當 4 l, 炭酸가스 1 分 當 0.2 l) 가들어 가도록 했다.

本 實驗에서는 容積 400 l 되는 비니루스에 入口와 出口를 만들어서 입김 (Harper, 1963)을 붙여 넣어서, 5 퍼센트 炭酸가스 混成氣體를 通過 시키도록 했다. 즉 비니루로 만든 袋에 試驗管臺를 넣어서, 여기에 入김이 들은 袋을 入口에 連結시켜서 炭酸가스를 供給하였다. 이것은 入김 1 時間 當 40 l 씩 供給했다.

E. 培養細胞 準備

1. 마우스의 腹腔內 大陰細胞

마우스 무게 23 gm 乃至 25 gm 되는 암컷을 使用했다. 出産 直後의 마우스는 腹腔이 넓어서 使用하기에 便利했다.

皮膚는 沃度丁幾 (incture of iodine)로 消毒하고 알콜 (70 퍼센트 alcohol)로 再消毒 했으며, 開口 (opening)는 劍狀軟骨 (xiphoid cartilage)直下에 내고, 尖端이 구부러진 파스츄어 피펫트로 먼저 4 ml 乃至 6 ml의 Hanks's BSS로 洗滌하고, 그 後에 Medium NCTC-109 (或은 YLA, 199) 培地에 헤파틴을 섞은 것으로 洗滌해 었다. 이때 出血이나 傷害가 없도록 피펫트를 操心스럽게 挿入하기 爲하여, 피펫트 尖端을 腹壁을 向하게 하고 骨盤속으로 넣었다. 劍狀軟骨을 피펫트로 들어서 洗滌液의 流出을 防止하고 피펫트로 腸을 흔들어서 大陰細胞가

洗滌液속에 들어오도록 했다. 피펫트는 右側으로 挿入하여 大喰細胞懸濁液(suspension)을 肝과 腹壁 사이에서 吸引(aspirate)시켰다. 이때 3 ml 乃至 5 ml의 大喰細胞懸濁液中에는 約 2×10^6 乃至 5×10^6 의 細胞를 一管에서 얻을 수 있었다.

이懸濁液은 洗滌이나 遠心分離를 하지 않았다. 이것은 1 ml 當 細胞數가 500,000 乃至 1,000,000 되도록 調節하여 培養試驗에 使用했다.

2. 冷血動物(개구리, 가물치, 잉어)의 腎臟細胞 및 大喰細胞,

개구리와 腹腔內 大喰細胞吸引은 개구리 25 gm 乃至 30 gm 되는 것을 使用하여 小鼠의 大喰細胞의 懸濁液 吸引과 같은 方法으로 했다.

개구리, 가물치, 잉어 등의 腎臟細胞는 腎臟을 無菌的으로 摘出하여 Hanks's BSS 로 洗滌하여 寬과 가위로 細切(四方 2 mm 程度)하여 0.25 퍼센트 트립신(trypsin) 溶液 50 ml 乃至 100 ml에 넣어 電磁攪拌器(magnetic stirrer)에서 4時間 乃至 6時間 消化시켰다. 이 溶液을 滅菌된 加一계로 濾過시켜서, 遠心分離(1分 當 1,500 r.p.m.에 10分間)하여 沈澱된 細胞를 取하여 培地에 懸濁시켜 1 ml 當 細胞數가 20萬 乃至 30萬이 되도록 하였다.

F. 接種菌

1. 鼠癩菌(Mycobacterium leprae murium)

마우스에 3個月前에 鼠癩菌을 注射하여 鼠癩가 發生된 小鼠를 犧牲하여 脾臟을 磨碎하여 Hanks's BSS 培地 5 ml를 加하여 鼠癩菌 및 組織의 懸濁液을 만들어 2 ml 스포이드(spoid)로 2滴을 大喰細胞懸濁液에 加하여 잘 混和하여 使用했다. 接種에 使用된 Mycobacterium leprae murium은 大喰細胞로 하여금 充分히 喰菌된 後에, 即 接種後 3時間 乃至 5時間 後에, 細胞 및 細菌懸濁液을 染色하여 每細胞 當 3個 乃至 5個의 Mycobacterium leprae murium이 喰菌될 程度의 菌液이 되도록 알켜 懸濁液 만들때에 稀釋 調節된 것을 使用했다.

2. 人癩菌(Mycobacterium leprae)

過去에 治療를 받지 않은 癩腫樣型 癩患者로부터 發生後 2個月 乃至 3個月 以內의 新鮮한 結節을 無菌的으로 摘出하여, Medium NCTC-109에 浸漬시킨 後, 研으로 培地를 加하면서 잘 갈아 菌液을 만들었다. 이 懸濁液은 低速度 遠心分離(1分 當 1,000 r.p.m.에서 3分間)하여 粗大 組織片을 沈澱시킨 後, 上層液을 取하여 接種菌으로 使用했다. 菌의 接種濃度는 前者 Mycobacterium leprae murium에 準했다.

G. 培養液 注入 方法

大喰細胞에 細菌 接種된 懸濁液(或은 腎臟細胞 懸濁液) 1 ml을, 카

바그라스가 들어있는 培養試驗管에 넣어서, CO₂ 가스를 通過시키면서 37°C 孵卵器에 24 時間 두었다가 培地를 갈아주면, 이때 生存 可能한 細胞는 모두 試驗管内 카바그라스에 附着된다. 그 後 부터는 1 週 2 回 培地를 갈아 주었다.

H. 培養된 細胞의 固定 및 染色法.

카바그라스를 갈고리 모양의白金線으로 꺼내어 Hanks's BSS(葡萄糖과 重曹를 除去한)로 洗滌한 다음, 젠커용액(Zenker fluid, Maximow, 1948)에 넣어 室溫에서 5 分間 固定(fixation)시켰다. 그 後 카볼 흑신(carbol fuchsin)에 20 分乃至 30 分間 加溫 染色한 後, 흐르는 물에 操心스럽게 洗滌하여 1 퍼센트 염산알콜(HCl alcohol)로 脫色시켰다. 그 後에 다시 細胞를 헤마톡시린(hematoxylin)에 1 分間 染色한 後, 암모니아水(蒸溜水 100 ml 에 암모니움 하이드록사이드 5 滴이 포함)에 沈漬시켜 헤마톡시린의 着色을 復舊시킨 後에 水道물로 洗滌하여 乾燥시킨 後, 슬라이드 그라스(slide glass)에 中性 발삼, 或은 씨다오일(cedar oil)로 마운트한 後에 油沈裝置로서 檢鏡하였다.

이와같은 實驗을 數次 反復하였으 며 培養試驗管은 顯微鏡의 弱放大로 서 每週 2 回씩 培養液을 갈아 주었 으며, 그때마다 細胞의 狀態를 觀察

하고 24 時間, 1 週, 2 週, 3 週 그리고 4 週에 試驗管内 카바그라스를 꺼내서 染色하여 菌의 增殖與否를 觀察하였다.

Ⅲ. 實驗結果

腹腔内の 滲出液속에 있는 細胞(peritoneal exudate cells)는 一般的으로 1 時間乃至 3 時間内に 活潑해지고 이때 噬菌된다.

鼠癩菌(Mycobacterium leprae murium)은 大喰細胞(macrophage) 内에서 길어져, 漸次的으로 成熟하는데, 첫 前兆(sign)는 鼠癩菌이 길어지는 것인데 이것은 거의 10 日 걸리며, 2 週일이 뒤된 길이는 最高에 達해서 플트 갈라진다. 이와 같은 過程으로 26 日間 大喰細胞가 生存하 며, 그 속에서 鼠癩菌은 增殖을 繼 續한다.

A. 마우스의 腹腔内 大喰細胞에 鼠 癩菌 接種 培養;

實驗 1, 2, 3, 에서 보는 바와 같이, 5 퍼센트 CO₂ 混成氣體를 通過시키면서, 大喰細胞만 培養시키는데서는 5 日間, CO₂를 通過시키지 않은 對照群에서는 2 日間 細胞를 持續시켰다.

實驗 3, 4, 5, 6, 7, 에서는 5 퍼센트 混成氣體를 通過시키는데서는 6 日間, CO₂ 通過시키지 않은 데서는 4 日間 培養 可能했다.

大喰細胞에 鼠癩菌 接種한 培養實

驗 8, 9, 10 에서는, 5 퍼센트 CO₂ 混成氣體를 通過시킨데서는 8日間, CO₂ 通過시키지 않은데서는 5日間 生存했다.

역시 大喰細胞에 鼠竊菌 接種한 實驗 11乃至 20에서는, 5 퍼센트 CO₂ 混成氣體를 通過시킨데서는 26日間, 對照群에서는 10日間 培養할 수 있는 것을 나타내어, Medium NCTC-109에 10 퍼센트 馬血清, 10퍼센트 牛胚抽出液이 包含된 培地에 5 퍼센트 CO₂ 混成氣體를 通過시키면서, 37°C 孵卵器에서의 培養이 가장좋은 結果를 보여주고 있다.

같은 方法으로 人竊菌도 마우스의 大喰細胞에 接種해 보았으나, 人竊菌의 길어지는 모양이나 增殖하는 現象은 認定되지 못하였다.

B. 冷血動物(개구리, 가물치, 잉어) 腎臟細胞의 培養;
第2表에서 보는 바와 같이, 冷血

動物의 腎臟細胞를 溫度別로 培養시킨 結果, 개구리는 37°C에서 5時間 20°C에서 3時間, 4°C에서 2時間 培養시켜, 結局 37°C에서의 培養이 가장 좋은 成績을 나타내고 있다.

가물치와 잉어는 거의 培養이 不可能한 結果를 보이고 있다.

C. 개구리 大喰細胞 培養:

成績은 第3表와 같다.

實驗 1, 2, 3, 4에서는 가장 오래 培養시킨것이 2日間이었다. 이때는 5 퍼센트 CO₂ 混成氣體를 通過시키지 않았다.

實驗 5乃至 15에서는, 5 퍼센트 CO₂ 混成氣體를 通過시키면서, 37°C에 培養한 것에서 7.5日間 生存 持續시켰다.

따라서 개구리 大喰細胞 培養에서 5 퍼센트 CO₂ 混成氣體를 必要로 하나 아직은 鼠竊菌및 人竊菌의 接種培養은 可能치 못함을 알 수 있다.

第 1 表 마우스의 腸腔內 大喰細胞에 鼠癩菌 接種 培養의 結果

實驗回數	細胞生存日數		備 考
	CO ₂	-CO ₂	
1	3	1	Hanks's BSS + 20%GS, 2%YE, 5%LH P 200u/cc, S 200r/cc
2	5	2	"
3	4	2	"
4	5	3	Medium 199 + 20%HS, 2%YE, 5%LH P 200u/cc, S 200r/cc
5	6	2	"
6	5	4	"
7	5	1	"
8	8	5	50% Medium NCTC-109+40%HS, 10%BEE. Heparin, P 50u/cc, S. 5r/cc
9	7	3	"
10	7	4	"
11	10	3	10% Medium NCTC-109+90%HS, 10%BEE Heparin, P 50u/cc, s r/cc
12	14	2	"
13	10	3	"
14	20	6	"
15	26	10	"
16	21	7	"
17	10	3	"
18	15	5	"
19	24	9	"
20	20	7	"

YLA.....Yeast extract lactoalbumin hydrolysate
 HS.....Horse serum
 PPenicillin
 S.....Streptomysin
 CF.....Calf serum
 YS.....Yeast extract
 LH.....Lactoalbumin hydrolysate
 BEEBcef embryo extract

第 2 表 冷血動物(개구리, 가물치, 잉어) 腎臟細胞의 培養의 結果

實驗 種 類	溫 度	細胞生存時間			備 考
		4°C	20°C	37°C	
Frog	1	0	0	0	YLA+20%HS, P 200u/cc, S 200r/cc
	2	2	2	4	"
	3	0	0	3	"
	4	0	0	0	Hanks's BSS+20%CS, 2%YE, 5%LHI, P 200u/cc, S 200r/cc
	5	0	0	0	"
	6	2	2	2	"
	7	2	3	3	"
	8	0	0	0	"
	9	0	3	3	"
	10	0	2	5	"
O.a	11	0	0	0	"
	12	1	2	2	"
	13	0	0	0	"
G.c	14	0	0	0	"
	15	0	0	0	"
	16	0	0	0	"

第 3 表

개구리 大喰細胞 培養의 結果

實驗回數	細胞 生存日數	備 考
1	0	50% Medium NCTC 109+40% HS, 10% BEE, P 200u/cc, S 200r/cc, heparin
2	0	"
3	2	"
4	1	"
5	3	10% Medium NCTC 109+90% HS CO ₂ air 10% BEE, P 200u/cc, S 200r/cc, heparin mixture
6	2	" "
7	2.5	" "
8	5	" "
9	7	" "
10	6	" "
11	7	" "
12	7.5	" "
13	6.5	" "
14	5	" "
15	7	" "

IV. 總括 및 考按

人類의 歷史上에 組織培養이 제일 처음 始作된 것은 지금으로 부터 約 100年 前 일이다.

Recklinghausen(1866)은 兩棲類의 血球를 滅菌된 容器에서, 여러가지 條件을 주어서 55日間 살아있는 狀態로 保管했다. 그러나 培養實驗을 組織的으로 實行한 이는 Roux(1885)이다.

Ljunggren(1898)은 數週日 동안

腹水에서 人間皮膚를 生體로 維持시키는데 成功했다.

Jolly(1903)는 兩棲類의 白血球를 體外에서 1個月間이나 培養했다.

Harrison(1907)은 처음으로 神經纖維의 成長과 發育에 對해 觀察했다.

그後 Carrel, Burrows(1910,1913)는 繼續해서 여러가지 組織을 培養하는 基礎를 세웠다.

Carrel(1914, 1931)은 병아리의 結締組織細胞의 種(strain)을 34年間

増殖시켰다.

그러나 細胞培養은 주로 Earle(1943, 1955, 1956, 1958, 1960) 이 發展시켰다 하리만큼 많은 業績을 보이며, 其他 여러 實驗室에서 여러 學者들에 의해 오늘날까지 研究 途上에 있는것이다.

本 實驗에 있어서 먼저 冷血動物을 使用한 것은 冷血動物에서 여러 가지 非定型的인 抗酸菌이 많이 發見되고 人類菌은 人體에서도 特히 比較的 溫度가 낮은 皮膚에서 増殖되므로, 人體보다 體溫이 낮은 冷血動物에서의 培養을 期待했었다. 그러나 아직은 그 細胞(大喰細胞 或은 腎臟細胞)의 長期間 培養에 成功치 못했다. 따라서 이 細胞의 長期間 培養方法이 急先務이고, 다음에 以上の 方法으로 *Mycobacterium leprae murium*, 혹은 *Mycobacterium leprae* 가 培養이 안될 境遇엔, 方向을 달리하여 試驗管内 培養을 試圖해야 할 것이다.

다음에 마우스의 大喰細胞를 使用했다. 그것은 Stefansky(1903)가 鼠癩를 처음으로 發見했을때, 털이 部分的으로 빠져지고 그 모양이 人癩와 恰似한 것을 알았다. 또한 이 적에서 人癩菌과 形態學的으로 비슷한 菌을 發見하여, 그는 人癩菌이 쥐에도 傳染된 것으로 生覺했다. 그러나 그 後, 곧, 그는 人癩菌과는 別個의 抗酸菌에 依하여 發生된 것임을 알게 되어 그 菌을 鼠癩菌(*Mycobact-*

erium leprae murium) 이라고 命名하고 그 病을 鼠癩(*murine leprosy*)라고 부르게 되었다.

이와같이 人癩菌과 鼠癩菌은 恰似하며, 人功培養은 아직까지 못하고 있으나, 鼠癩菌만은 動物接種이 可能하며 人類에 잘 듣는 藥은 鼠癩에도 잘 듣는다는 報告(Lew, 1962)가 있어서 動物接種이 可能的인 鼠癩菌에 重點을 두고 實驗했다.

마우스의 大喰細胞에 *Mycobacterium leprae murium* 을 増殖시키고자 할때 Hank's(1954)는 少量의 炭酸가스가 必要하다 했으며, Chang(1959)은 5 퍼센트 CO₂ 混成氣體를 通過시켰다.

著者は 炭酸가스 混成氣體로서 印검을 使用했다. 그것은, 첫째로, 우리나라에서 純粹한 가스를 求하기 어렵고, 둘째는, 人癩菌의 培養을 目的으로 始作한 實驗이었기 때문에, 人癩菌은 人體에 寄生하는 것이므로 人體에서 產生되는 炭酸가스가 더 좋을것 같이 生覺하였다. 그러나 人癩菌増殖에 成功하지 못했다.

人癩菌을 마우스의 大喰細胞에 培養해 보았으나 細胞를 1週日 밖에 持續시키지 못하여, 増殖하는 것을 볼 수가 없었다.

Chang(1961)은 마우스의 大喰細胞에서 鼠癩菌을 100日間이나 培養시켰다고 하나, 著者は 26日間 밖에 生存 持續시키지 못했다. Chang 과 別個의 條件은, 첫째로, 炭酸가스

混成氣體를 通過시킨 것이다. Chang은 純粹한 炭酸가스 0.2 l, 空氣 4 l를 每分當 通過시켰으며, 著者は 입을 每時間當 40 l을 通過시켰다. 그러나 炭酸가스 量이 적어서 細胞가 보다 오래 살지 못했고, 따라서 그 속에서 增殖해 가는 鼠癩菌을 더 오래 持續시키지 못했다고는 이야기 할 수 없다. 그것은 아직까지 알고있는 知識으로서 (Hank's 1954c) 細胞가 必要로 하는 炭酸가스 量은 極少量으로서 充分한 것이다. 다음은 牛胚抽出液으로서, Chang (1959, 1960, 1964)은 Difco BEE¹⁾를 使用한데 反하여, 著者は 醫獸場에서 直接 牛胚를 갖다가 만들어서 使用했다. 그래서 Chang이 使用한것 보다 더 純粹하고 新鮮한 것이어서 나쁘지 않을 것이라고 生똥된다. Chang (1963)은 培地에 구리세틴을 넣으면 細菌의 길이가 더 길어진다고 했다. 그래서 本實驗에서도 2 퍼센트, 또는 5 퍼센트의 구리세틴을 培地에 加해서 培養시켜 보았으나, 別差를 發見치 못했다.

結論으로 其他 細菌은 大部分이 20分만에 倍로 늘어나는데 反하여, 鼠癩菌단 해도, 10日以上을 要하는 것이나 이와 恰似한 人癩菌도 오랜 時日을 要할 것이다.

따라서 于先 培養 可能한 細胞를 可及의 長期間 生存 維持시키도록 해

註① Difco Laboratories, Detroit, Mich. U.S.A.

야 할 것이며, 다음은 이 細胞에 細菌이 適應(adaptation)할 수 있도록 必要한 條件을 주도록 努力해야 할 것이다.

V. 結 論

마우스의 腹腔內 大喰細胞 및 各種 冷血動物의 大喰細胞와 腎臟細胞에 對한 鼠癩菌 및 人癩菌의 實驗的 試驗管內 接種培養을 試圖한 바, 다음과 같은 結果를 얻었다.

A. 鼠癩菌 培養을 目的하여는, 마우스 腹腔內 大喰細胞를 宿主로 하고, 培地로서 Medium NCTC-109 10 퍼센트, 馬血清 90 퍼센트, 牛胚抽出液 10 퍼센트를 使用하여, 同菌을 26日間 細胞와 더불어 培養할 수 있었으며, 菌體의 長大 및 增殖을 觀察할 수 있었다.

B. 마우스의 大喰細胞를 宿主로 하는 鼠癩菌 培養에는, 5 퍼센트 CO₂ 混成氣體를 必要로 한다.

C. 마우스의 腹腔內 大喰細胞에 人癩菌을 接種培養한 實驗에 있어서는 같은 方法으로 實驗한 鼠癩菌에 있어서와 같은 菌體의 長大化 및 增殖의 相을 觀察치 못했다.

D. 冷血動物 即 개구리, 가물치, 잉어 등의 腹腔內 大喰細胞 및 腎臟細胞는 約 1週日間 組織培養할 수 있었으며, 이들 細胞에 接種된 鼠癩菌 및 人癩菌은, 菌體의 長大化나 增殖

을 나타내지 못하였다.

References

- Burrows, M.T. : The tissue culture as a physiological method. *Tr. Cong. Am. Physiciana & Ssrgeons*, 9: 77, 19-13.
- Carrel, A.: Present condition of a strain of connective tissue twenty-eight months old. *J. Exper. Med.*, 20:1, 1914.
- Carrel, A.: The new cytology. *Science*, 73: 297, 1931.
- Carrel, A.: and Burrows, M.T.: Cultivation of adult tissues and organs outside of the body. *J.A.M.A.* 55: 137-9, 1910.
- Carrel, A., and Burrow, M.T.: Cultivation of sarcoma outside of the body. *J.A.M.A.* 55: 1554, 1910.
- Chang, Y.T.: Evolution of murine Leprosy. *Amer. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.*, 79: 805-809, 1959.
- Chang, Y. T.: Growth of *Mycobacterium leprae murium* in cell culture. *Fed. Proc.*, 18: 373, 1959.
- Chang, Y. T.: Continuous growth of *Mycobacterium leprae murium* in cultures of mononuclear phagocytes. *Fed. Proc.*, 19: 1 1 March 1960.
- Chang, Y.T.: The mouse macrophages as host cell for *Mycobacterium leprae murium*. *In* Transaction Leonard Wood Memorial Johns Hopkins University Symposium on Research in Leprosy (Doull, J.A., ed.). Washington, D.C., Leonard Wood Memorial, 118-125, 1961.
- Chang, Y.T.: Growth of *Mycobacterium leprae murium* in cultures of mouse macrophages. *In* VIIIth International Congress on Microbiology Montreal, Canada, 122, 1962.
- Chang, Y. T.: Long-term cultivation of mouse peritoneal macrophages. *J. Nat. Can. Ins.*, 32:1, January 1934, 1964.
- Evans, V.J., and Bryant, J.C.: Studies of nutrient media for tissue cells in Vitro. I. A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L cells. *Can. Res.*, 16:77-86, 1956.
- Evans, V.J., and Bryant, J.C.: II. An improved protein free chemically defined medium for long-term cultivation of strain L-929 cells. *Can. Res.*, 16:87-94, 1956.
- Eagle, H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122:501, 1955.
- Eagle, H.: The salt requirements of mammalian cells in tissue culture. *Arch. Biochem.*, 61:356, 1956.
- Eagle, H.: The sustained growth of human and animal cells in a protein-free environment. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.*, 46:427, 1960.
- Eagle, W.R.: Production of malignancy in Vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 4:16-5, 1943.
- Fildes, C., Rees, R.J.W., and Garb-

- utt, E.W.: Multiplication of *Mycobacterium Leprae murium* in cell cultures. In VIIIth Internat. Congress of Leprosy. Sept. 63, 1963.
- Garbutt, E.W., Rees, R.J.W. & Barr, Y.M.: Multiplication of rat-leprosy bacilli in cultures of rat fibroblasts. *Lancet*, 2:127, 1958.
- Goulding, R., Robson, J.M., & Rees, R. J. W.: Intracorneal murine-leprosy and its response to isoniazid. *Lancet*, 1:423, 1953.
- Gray, C.T.: The respiratory metabolism of murine leprosy bacilli. *J. Bact.* 64:305-313, 1952.
- Hanks, J. H.: Relationship between the metabolic capacity and the infectiousness of *Mycobacterium leprae murium*: Refrigeration Studies. *Internat. J. Leprosy*, 22: 450-460, 1954a.
- Hanks, J.H., & Gray, C.T.: The application of metabolic studies to leprosy research. *Internat. J. Leprosy*, 22:147-161, 1954b.
- Hanks, J.H.: The fate of the bacilli in incubated lepromatous tissues and the question of microscopic growth. *Internat. J. Leprosy*, 13: 9-24, 1945.
- Hanks, J.H.: The tissue sites most favorable for the development of murine leprosy in rats and mice. *Internat. J. Leprosy*, 18:2, 185-207, 1950a.
- Hanks, J.H.: Influence of physical and chemical factors on the hydrogen transfer capacity of murine leprosy bacilli. *Internat. J. Leprosy*, 22:162-173, 1954c.
- Hanks, J.H.: Three factors which may influence the experimental transmission of leprosy. *Internat. J. Leprosy*, 18:33-47, 1950.b.
- Harper, H.A.: Review of physiological chemistry. 9:148, 1963.
- Harrison, R.G.: Observation on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 4:140, 1907.
- Jolly, J.: Sur la duree de la vie et la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. *Compt. rend. Soc. biol.*, 55:1266, 1903.
- 柳 陵: 癩病, 延世大學校 出版部, 第一版 20, 1962
- Lowe, J. & Dharmendra: Rat leprosy; critical review of literature. *Internat. J. Leprosy*, 5:311-328. July-Sept., 1937.
- Ljunggren, C.A.: Von der Fähigkeit des Hautepithels, ausserhalb des Organismus sein Leben zu behalten, mit Berücksichtigung der Trasplantation. *Deutsche Ztschr. Chir.* 47:608, 1897-98.
- Maximow, A.A., & Bloom, W.: A textbook of histology. 5th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 112, 1948.
- McQuilkin, W.T., Evans, V.J., and Eargle, W.R.: The adaptation of additional lines of NCTC clone 929 (strain L) cells to chemically defined protein-free medium NCTC-109. *J. Nat.*

Cancer Inst., 19:885-907, 1957.

中村昌弘: 鼠癩菌의 in vitro 榮丸內 培養. 레프라 32:3, 152-155, 1963.

Parker, R.C.: Methods of tissue culture. 3rd ed. Hoeber Medical Division Hareer & Row, Publishers, 1962.

Recklinghausen, F.D.: ueber die Erzeugung von rothen Blutkörperchen. Arch. mikroskop. Anat., 2:137, 1866.

Rees, R.J.W. & Wong, P.C.: Limited multiplication of Mycobacterium leprae murium in tissue culture. Nature, 187:357-360, 1958.

Rees, R.J.W.: The study of rat leprosy in tissue culture as an approach to propagating human leprosy bacilli in vitro. In Transactions of the VIIth International Congress of Leprology. Tokyo 47-53. Nov., 1958.

Roux, W.: Beitrage zur Entwicklungsmechanik des Embryo. Ztschr. Biol. 27:411, 1885.

Salle und Moser: Bacteriology of leprosy; growth and staining reactions of organisms inoculated into minced chick embryo medium. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 37:725-726, March 1934.

Twort, F.W.: A method for isolating and growing the leprae bacillus of man. Proc. Rog. Soc., B., 83:156-158, 1911.

Wallace, J.H., Elek, S.D., & Hanks, J.H.: Limited multiplication of Mycobacterium leprae murium in cell cultures. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.,

97:101-104, 1958.

Wallace, J.H., & Hanks, J.H.: Agar substrates for study of microepidemiology and physiology in cells in vitro. Science, 728:658, 1958.

附 錄

Hanks's Balanced Salt Solution. Stock 10X

溶 液 A

NaCl.....	160 gm
KCl.....	8 gm
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	4 gm

以上の試藥을 800ml 의 2次 蒸溜水에 溶解시키고, 鹽化칼슘 2.8gm 을 100ml 의 2次 蒸溜水에 溶解시킨다. 이 두 溶液을 섞어서 2次 蒸溜水 1.000ml 가 되도록 채운다. 그 後에 크로루호-를 2ml 를 넣어서 冷蔵庫에 保管한다.

溶 液 B

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O.....	3.04 gm
KH ₂ PO ₄	1.2 gm
Dextrose.....	20.0 gm

以上の試藥을 800ml 의 2次 蒸溜水에 溶解시킨다. 여기에 0.4 퍼센트 페놀레드 溶液 100ml 를 加하고 蒸溜水로 1.000ml 가 되도록 채운다. 그 後에 크로루호-를 2ml 를 넣어서 冷蔵庫에 保管한다.

Mebium NCTG-109

Ingredients per Liter

1-Alanine.....	31.48mg
1-alpha-Aminobutyric Acid.....	5.51mg
1-Arginine.....	25.76mg

1-Asparagine.....	8.09mg
1-Aspartic Acid.....	9.91mg
1-Cystine.....	10.49mg
d-Glucosamine.....	3.2mg
1-Glutamic Acid.....	8.26mg
Glycine.....	13.51mg
1-Histidine.....	19.73mg
Hydroxy-1-Proline.....	4.09mg
1-Isoleucine.....	18.04mg
1-Leucine.....	20.44mg
1-Lysine.....	30.75mg
1-Methionine.....	4.44mg
1-Ornithine.....	7.38mg
1-Phenylalanine.....	16.53mg
1-Proline.....	6.13mg
1-Serine.....	10.75mg
1-Taurine.....	4.18mg
1-Threonine.....	18.93mg
1-Tryptophan.....	17.5mg
1-Tyrosine.....	16.44mg
1-Valine.....	25.00mg
Tween 80.....	12.5mg
Thiamine.....	0.025mg
Riboflavin.....	0.025mg
Pyridoxine.....	0.0625mg
Pyridoxal.....	0.0625mg
Niacin.....	0.0625mg
Niacinamide.....	0.0625mg
Pantothenate.....	0.025mg
Biotin.....	0.025mg
Folic Acid.....	0.025mg
Choline chloride.....	1.25mg
Inositol.....	0.125mg
p-Aminobenzoic Acid.....	0.125mg
Vitamin A.....	0.25mg
Calciferol.....	0.25mg
Menadione.....	0.025mg
alpha-Tocopherol Phosphate.....	0.025mg
Vitamin B ₁₂	1.0mg
Glutathione.....	10.1mg
Ascorbic Acid.....	49.9mg
Cysteine HCl.....	25.99mg
Diphosphopyridine Nucleotide.....	7.0mg

Triphosphopyridine Nucleotide.....	1.0mg
Coenzyme A.....	2.5mg
Coccarboxylase.....	1.0mg
Favin Adenine Dinucleotide.....	1.0mg
Uridine Triphosphate.....	1.0mg
Deoxyadenosine.....	10.0mg
Deoxycytidine.....	10.0mg
Deoxyguanosine.....	10.0mg
Thymidine.....	10.0mg
5-Methylcytosine.....	0.1mg
Glucuronolactone.....	1.8mg
Sodium Glucuronate.....	1.8mg
Glutamine.....	135.73mg
Sodium Acetate.....	0.05mg
Sodium Chloride.....	6.8g
Potassium Chloride.....	0.4g
Calcium Chloride.....	0.2g
Magnesium Sulfate-7H ₂ O.....	0.2g
Monosodium Phosphate.....	0.125g
Dextrose.....	1.0g
Phenol Red.....	0.02g
Sodium Bicarbonate.....	2.2g

Medium 199

培地 每 1 當 A 溶液 0.1ml 를, 2 次 蒸
溜水 300ml 에 加한 다음, B 群 1.12gm
을 加하고 完全히 溶解한데 까지 攪拌한
다. 여기에 最終的으로 C 群을 10.84gm
을 加하고, 다시 攪拌하던 有毛性의 沈
澱이 生긴다. 잘 攪拌하던서 12 規定濃度
의 鹽酸을 이 混合物에 加하여, 沈澱物
이 60 水素이온 濃度에서 溶解되게 한다.
透明하게된 赤色溶液을 濾過하여 滅菌한
다. 培地는 加壓滅菌해서 는 안된다.

滅菌된 溶液을 使用하기 爲하여, 滅菌
된 2 次 蒸溜水 1l 를 稀釋하고, 混合物中
存在하는 靑黴素를 指示藥으로하고, 苛
性소다를 加하여 水素이온 濃度가 7.5 가
되게 한다.

PART A

calciferol..... 0.1mg
 cholesterol..... 0.2mg
 menadione..... 0.01mg
 a-tocopherol phosphate.....0.01mg
 tween 80 20.0mg
 vitamin A.....0.1mg

PART B

L-arginine, hydrochloride... 70mg
 L-histidine, HCl·H₂O.....20mg
 L-lysine hydrochloride.....70mg
 L-tyrosine..... 40mg
 DL-tryptophan.....20mg
 DL-phenylalanine..... 50mg
 L-cystine.....20mg
 DL-methionine.....30mg
 DL-serine..... 50mg
 DL-threonine..... 60mg
 DL-leucine..... 120mg
 DL-isoleucine..... 40mg
 DL-valine..... 50mg
 DL-glutamic acid, H₂O..... 150mg
 DL-aspartic acid..... 60mg
 DL-alanine.....50mg
 L-proline..... 40mg
 L-hydroxyproline..... 10mg
 glycine..... 50mg
 L-cysteine hydrochloride.....0.1mg
 adenine· H₂SO₄10mg
 guanine hydrochloride.....0.3mg
 xanthine0.3mg
 hypoxanthine0.3mg
 thymine.....0.3mg
 uracil0.3mg
 thiamine hydrochloride.....0.01mg
 riboflavin0.01mg
 pyridoxine hydrochloride, 0.025mg
 pyridoxal hydrochloride...0.025mg
 niacin.....0.025mg
 niacinamide.....0.025mg
 calcium-d-pantothenate0.01mg
 botin.....0.01mg
 folic acid.....0.01mg
 choline chloride.....0.5mg

inositol0.05mg
 p-aminobenzoic acid0.05mg
 ascorbic acid0.05mg
 glutathione.....0.05mg
 L-glutamine100.mg
 adenylic acid-5'0.2mg
 adenosine triphosphate-2Na, 10.mg

PART C

ribose0.5mg
 deoxyribose0.5mg
 ferric nitrate·9H₂O.....0.72mg
 phenol red.....20.0mg
 sodium chloride.....6.8g
 potassium chloride.....0.4g
 calcium chloride.....0.2g
 magnesium sulfate·7H₂O0.14g
 sodium bicarbonate2.2g
 glucose1.0g

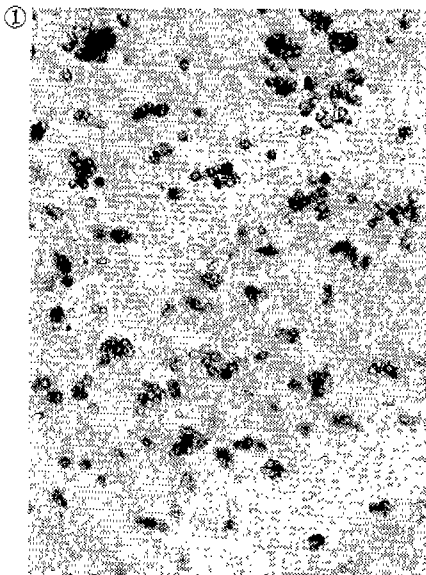
YLA xI

Distilled water.....700ml
 NaCl7.18gm
 KCl.....0.4gm
 CaCl₂0.2gm
 MgSO₄· 7H₂O.....0.2gm
 NaH₂PO₄0.125gm
 glucose4.5gm
 phenol red(10mg/ml)1.5ml
 2% yeast extract50.0ml
 lactoalbumin hydrolysate ...5.0gm

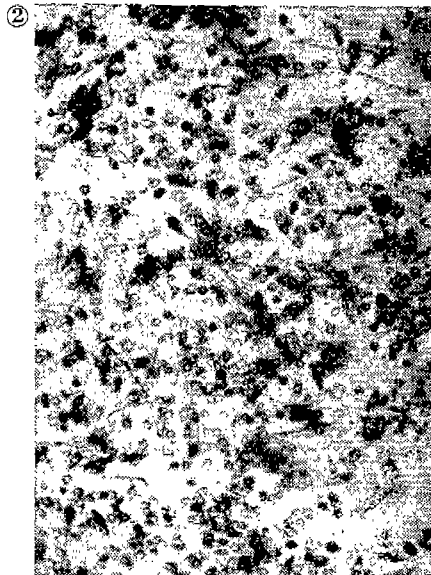
Zenker-formol

1. Potassium bichromate2.5g
 Sodium sulphate1.0g
 Sublimate5.0g
 Distilled water.....100.ml
2. Formalin.....5ml

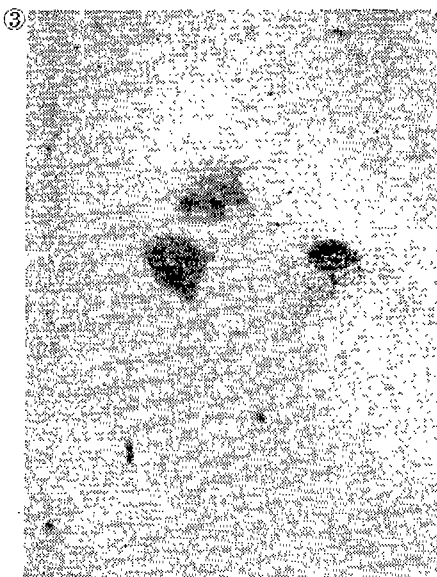
使用 直前に 1 과 2 를 섞는다.



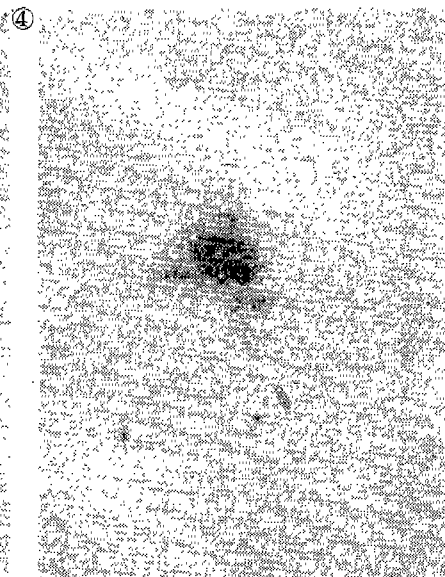
① 마우스 大喰細胞 培養 第 1 日



② 마우스 大喰細胞 培養 第 3 週



③ 마우스 大喰細胞內 鼠類菌 培養 第 1 日



④ " " " " 第 3 週

연세의대 간호학과에 대학원 창설이래 처음으로 석사과정을 마치고 첫 졸업생을 낳게 되었다.

이 월고는 석사 논문이며 현재 연세의대 간호학과에서 미생물학을 가르치고있는 이인자씨 연구 논문을 밝힌다. (편집주)

◎ 소 식

- 제 13차 국제간호협회 총회 참석차 항독하신 본 회 회장 홍신영선생은 독일을 위시하여 구라파 여러 나라, 미국을 거쳐 여행하시고 8월 17일 부산히 귀국하셨다.
- 스웨덴정부 초청으로 교환간호원을 교류하게 되어 보사부 간호사업과와 본 회가 추천한 12명의 간호원을 스웨덴에 파견하게 되었다. 스웨덴 시립병원에서 근무하게 될 우리 회원들은 그곳 간호원들과 같은 대우를 받게 되리라 한다.
- 8월 26일~27일 육군본부 간호과 주최로 국민합동학술연구발표회가 수도육군병원에서 있었다.
- 8월 31일 본 회 이사회에서는 제 13차 I. C. N. 총회에 다녀오신 홍신영선생을 축하하는 간단한 저녁 대접이 있었다.

”대한간호“지와 그 구독신청법

본 회 출판부에서는 간호교육발전과 신속한 보도를 도모코져 1962년 8월부터 대한간호지를 내고 있습니다.

이 대한간호지에는 간호교육문제, 간호행정문제, 임상간호연구발표 등 새로운 학술과 기술이 소개되며 특히 본 회에서 진행하고 있는 모든 사업의 활동상황이 세밀히 소개됩니다. 기관에서 일하고 계시는 회원은 그 기관을 통해 구독신청을 직접 신청 할 수 있겠으나 집에서 쉬고 계신분이나 개인 병원에서 일하시는 분은 직접 본 회 출판부로 구독신청을 할 수 있습니다. 구독신청을 하실 때에는 대한간호지 값 1부 40원과 우송료 2월을, 1년분을 신청하실 때는 6부값 240원을 보내시면 우송료는 감해드립니다.

단 주소를 명확히 기입하여 되돌아움이 없도록 동·반 ○○씨방을 세밀히 적어 보내시기 바랍니다.

본 협회 주소.

서울특별시 중구 쌍림동 88-7
대한간호협회 출판부