

〔原著〕 松本歯学 18 : 244~249, 1992

key words : 骨形成因子 - 抽出 - 精製 - 担体

骨形成因子の抽出とその生物活性

宇治英世, 川上敏行, 枝 重夫

松本歯科大学 口腔病理学教室 (主任: 枝 重夫 教授)

木瀬俊彦

ネオ製薬工業株式会社

Preparation of Bone Morphogenetic Protein and its Bioactivity

HIDEYO UJI, TOSHIYUKI KAWAKAMI
and SHIGEO EDA

*Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental College
(Chief : S. EDA)*

TOSHIHIKO KISE

Neo Dental Chemical Products Co., Ltd.

Summary

In the present investigation, BMP (bone morphogenetic protein) was obtained according to the methods of Urist et al. (1984). The bovine demineralized bone matrix was extracted with 6M Urea and the supernatant solution was dialyzed against water. The precipitate was collected by centrifugation (Urea Fraction-1: UF-1). The UF-1 was redissolved in 6M urea solution and dialyzed against a citrate buffer (pH 3.1). After that, a grayish-white precipitate was collected (UF-2).

Histopathological study revealed that both UF-1 and UF-2 induced subcutaneous and perimuscular tissues of rats to form bone, indicating that UF-1 and UF-2 have BMP activities. Furthermore, suqualane-UF complex elicited heterotopic formation of wide bone with bone marrow tissue.

結 言

骨形成因子 Bone morphogenetic protein

(BMP)は、1971年に Urist ら¹⁾によって骨誘導活性を持つタンパク質に対して命名されて以来、骨の形成を誘導あるいは促進する生体内活性物質と

して、歯科あるいは整形外科などにおける疾患の画期的な治療薬として期待されており、それに伴って数多くの研究が行なわれている。現在ではある種の BMP は遺伝子工学的手法によって合成されるようになったが、その本態の完全な解明はいまだ為されていない。そこで、多くの研究者は独自の方法で BMP の自家抽出・精製を行なって臨床応用に向けての基礎的研究に供しているのが現状である。

さて、今回我々は BMP の歯科における臨床応用の基礎的研究を遂行するために仔牛の四肢骨から Urist ら (1984)²⁾の方法に準じ粗精製段階の BMP を抽出し、その骨誘導活性を確認すると共に若干の検討を加えたのでその概要を報告する。

材料と方法

1. 抽出方法

抽出方法は図 1 に示したフローチャートによって行なった。すなわち抽出原材料は、屠殺直後に冷凍した仔牛の四肢骨約 6.1 kg である。この骨

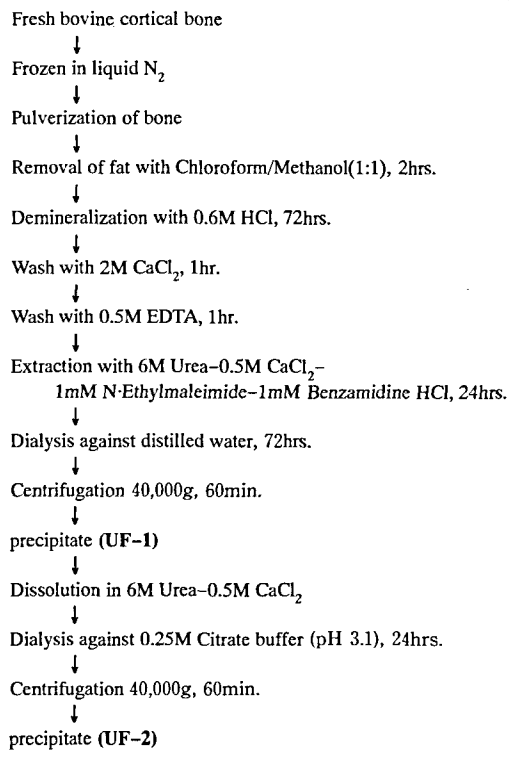


図 1 : 骨形成因子の抽出方法

端部を切断し骨幹部のみとし、付着している軟組織および骨髄を可及的に除去した後、液体窒素で再凍結し、粉碎機を用いて 1~2 mm³程度の大きさの骨細片を得た。この骨細片をクロロホルムとメタノールの混合溶液 (1:1:6,000 ml) を用い、低温室内にて攪拌しつつ 1 時間ずつ 2 回脱脂の前処理を施した。これを室温にて乾燥した後、0.6M の塩酸 (6,000 ml) で合計 72 時間の脱灰を行なった。以後 2M 塩化カルシウム水溶液に 1 時間浸漬攪拌処理した後蒸留水によって洗浄した。さらに、0.5M EDTA 水溶液に 1 時間浸漬攪拌処理した後再び蒸留水によって洗浄し、脱灰骨基質を得た。

以上の処理を経た脱灰骨基質を、1mM N-エチルマレミド、1mM 塩酸ベンザミンおよび 0.5M 塩化カルシウムを含む 6M 尿素によって 24 時間抽出した後、濾紙を用いて吸引濾過した。さらに濾液を 40,000 g で 1 時間遠心分離し抽出液を得た。これをセルロースチューブ (Spectrapor, MW cut off 6,000-8,000, Spectrum Medical Industry) を用いて、蒸留水で 72 時間透析し、40,000 g で 1 時間遠心分離し上清を除去、沈渣 (尿素可溶化画分: Urea-Fraction; UF-1) を得た。これを再び 0.5M 塩化カルシウムを含む 6M 尿素で溶解し、同様にクエン酸緩衝液 (pH 3.1) に対して 24 時間透析を行ない、40,000 g で 1 時間遠心分離し沈渣を蒸留水で洗浄した後、メタノールによって再脱脂して乾燥した (UF-2)。一度 6M 尿素によって 24 時間抽出した脱灰骨基質を再度の抽出によって UF の増収を図った。

2. 電気泳動による分子量の測定

ミニプロティアン II (バイオ・ラッドラボラトリー) を用い、アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって、UF-1 および UF-2 の分子量を測定した。その際の緩衝液としては 0.1% SDS・0.025M トリス・グリシン (pH 8.3) を用いた。なお、測定試料は 0.2% SDS・0.756% トリス塩酸 (pH 6.8) にて溶解し、定電流 20 mA にて泳動した。測定用の標準蛋白質は、バイオ・ラッドラボラトリー製の低分子量測定用キットを使用した。ゲルは 0.25% クマシー ブリリアントブルー R-250-40% メタノール-10% 酢酸にて染色し、10% 酢酸-40% メタノールにて脱色した。

3. 生物活性の検定

UFの骨誘導能の検定には、体重約100gのSD系雌性ラット（5週齢）を約1週間の観察飼育の後、健康と考えられるものを実験に供した。UFの埋入に先立ちペントバルビタール・ナトリウム注射液の腹腔内注射による全身麻酔下に背部の手術野を電気バリカンで剃毛し、酒精綿で拭掃した。メスで皮膚に切開を加え、鈍的に剝離した背部皮下組織内に、このUF-1あるいはUF-2（3-5mg）をゼラチンカプセル（日本薬局方#5）に容れ埋入した。なお対照としてはゼラチンカプセルのみのものを作った。埋入3週後にそれぞれのラットから埋入部組織を一塊として摘出し、10%ホルマリンで固定した後、パラフィン切片としH-E染色を施して病理組織学的に検索した。

4. スクアランを担体とした場合の組織反応

ゼラチンカプセル内にUF-1とともに担体としてスクアラン（C₃₀H₆₂）を用いたものについても、前述と同様の方法によってラットの大腿筋膜

上に埋入し、埋入後6週後の病理組織像について検討した。

結 果

1. 抽出

仔牛の四肢骨約6kgから皮質骨片約625gを分離し、これを脱灰することによってその基質約90gを得た。さらに脱灰骨基質からの6M尿素による2度の抽出で灰白色を呈する粉体UF-1（図2）が約1,500mg、また一部でUF-2まで精製したものは約100mg得られた。

2. SDS-PAGEによる分子量の測定

UF-1およびUF-2ともに、低分子量領域では14から30Kの間に数多くのバンドがあった。しかしUF-2においてはUF-1に比較してバンドが明瞭化してきており、14, 22, および28K付近に主バンドが認められた。なお、あまり明かではないものの18K付近にもバンドが検出された（図3）。

3. 生物活性

UF-2をゼラチンカプセルに容れラットの背部皮下組織内に埋入し3週間経過すると、埋入部に一致して主として紡錘形の単核の細胞の増殖があり、その中に不定形の小さな骨基質が形成されており（図4）、そこにはに封入細胞である骨細胞が確認された。同様にUF-1によっても皮下組織内埋入によって幼若な骨組織が形成された。しかし、いずれの場合においても軟骨性の組織は確認されなかった。なお、UF-1とUF-2の場合とを比較すると、UF-2の方がより骨形成活性が高く観察された。一方、同様にUF-1あるいはUF-2をゼラチンカプセルに容れてラットの皮下組織内に埋入した実験のかなりの例では、埋入部の病理組織学的検索では、紡錘形の単核の細胞の増殖が主で、その中に多角の巨細胞を混じており、骨基質の形成されないものが多くあった（図5）。

なお、ゼラチンカプセルのみを埋入した対照群のラットでは、カプセルは実験期間内に全例で完全に吸収されていた。

4. スクアランを担体とした場合の組織反応

UF-1を担体のスクアランと共にゼラチンカプセルに容れて、大腿部の筋膜に沿って埋入したものでは、骨形成がかなり広範囲にわたって活発



図2：抽出された骨形成因子（UF-1）

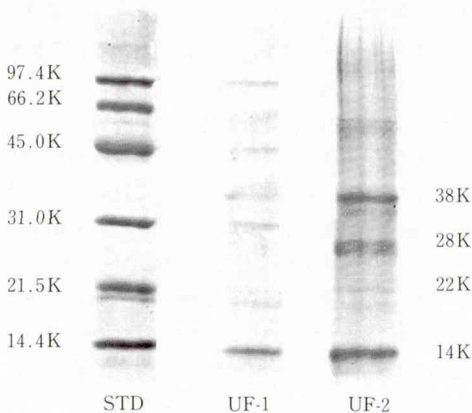


図3：SDS-PAGE（STD：標準試料）

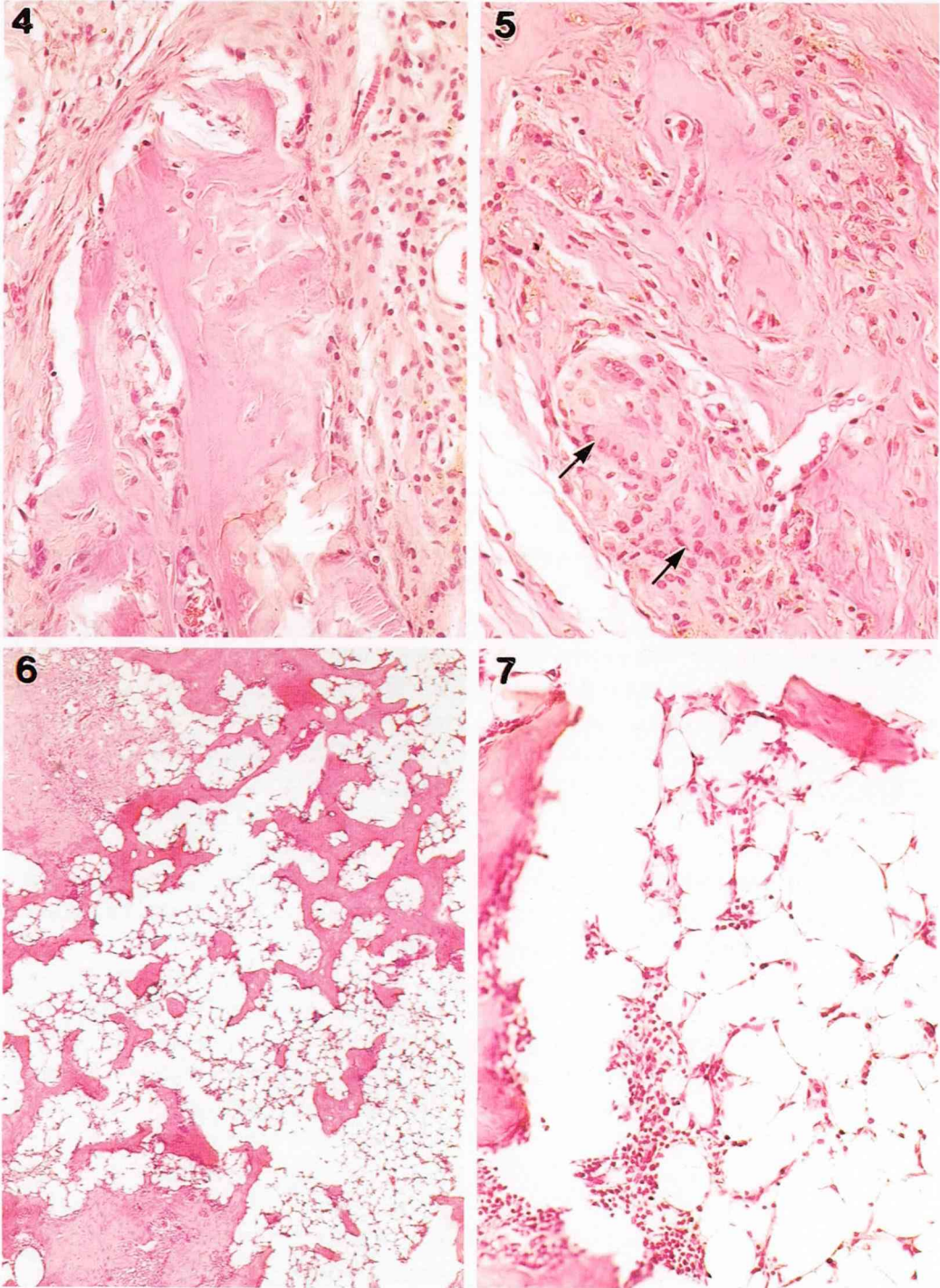


図4：増殖した組織内に形成された幼若で不規則な形態をした骨梁（×250）

図5：紡錘形で単核の細胞の増殖の中に多核巨細胞（矢印）が認められる（×250）

図6：比較的広範囲に形成された不定形で梁状の骨組織（×40）

図7：不規則な形態の骨梁周囲にみられる脂肪化した骨髄組織（×200）

に行なわれており、埋入後6週間経過したものにおいては不規則な比較的大きな骨基質(図6)が形成されて、その間にはいわゆる脂肪髓が認められた(図7)。

考 察

骨形成因子：BMPについて、その完全精製および本態の究明をすべく活発な研究が行なわれているが、先にも記した通りその本態の完全な解明は未だ為されてはいない。従って、その臨床応用を考慮に入れての基礎的な研究も多くの研究者によって行なわれているが、その多くは独自にBMPの抽出および精製を行なって自らの研究に供しているのが現状である。しかしそのためには、一度に一定量のBMPを得ることが必要となる。そこで今回我々は、仔牛の四肢骨からUristら(1984)²⁾の方法に準じBMPの抽出を試みた。得られたBMPは、細粉化後脱脂した幼牛の四肢骨を0.6M塩酸で処理した脱灰骨基質から、6M尿素で抽出された部分精製段階の尿素可溶化画分(Urea-Fraction：UF)で、蒸留水に対して透析したUF-1、あるいは6M尿素に最溶解の後0.25Mのクエン酸緩衝液に対して透析したUF-2である。すなわち、これらはUristら(1984)²⁾の方法ではStep 4(UF-1)ないし5(UF-2)に相当するものである。またこれはSDS-PAGEの結果みられた数多くのバンドが示すように、これが部分精製段階のものであることは明かである。なお、今回認められた主バンドはいずれも低分子量領域にあり、これらは諸家による既報値(河合ら、1988³⁾；河合ら、1991⁴⁾；田辺、1990⁵⁾)とは完全には一致しなかった。しかし、ラットを用いた生物活性試験によって異所性の骨組織が形成され、骨形成因子としての活性が確認された。このことは、多くの研究者が指摘しているように、これは多様なBMPの存在を示唆するものであろう。

多くの論文において記載されているようにBMP単独より、例えばヒドロキシアパタイトあるいはアテロコラーゲンなどを担体として用いた方がより強い活性を現すようである(河合ら、1988³⁾；河合ら、1991⁴⁾)。今回の実験でもUF単独ではあまり強い骨形成能を発揮せず、担体としてスクアランを用いたものにおいて骨髄様の組織ま

で伴ったかなり大きな骨組織が形成された。このことは、このUFを用いての歯科臨床のための基礎的検討のためには、その利用形態によって今回用いたスクアランに限らずそれぞれに適切な担体を用いるべきである事を物語っている。なお、スクアランは、コレステロール生合成過程の中間体であり、自然界では鮫類の肝油に多く含まれている。これはヒトの皮脂腺における生合成系で合成されるスクアレン(C₃₀H₅₀)の誘導体であり、これの水素飽和型のスクアレンは生体内には存在し得ない。しかし、これが化学的に安定な化合物であり、最近その合成が容易になったこと、およびその安全性が確認されたため、主として化粧品に基剤として利用されている物質である。これについて、川上ら(1992)⁶⁾は、これを生体の内部に應用する事を想定してラットを用いての皮下組織内埋入実験でこの安全性を検討している。従ってこれもBMPの担体としての可能性を持った化合物の1つであらう。

さて、今回の抽出では一度抽出した脱灰骨基質を再度6M尿素で抽出することによってかなりのUFが得られた。すなわちUF-1が約15,000mgで、UF-2が約100mgである。UF-1からUF-2にまで精製するとほぼ1/3から1/5になってしまうことから、UF-1を粗精製のBMPとして実験に供すると今回と同量の原材料から約2,000mgが得られることになる。このことから、一回の抽出操作によってある程度の規模の基礎的実験が可能となることが確認されたわけである。

以上のごとく、今回抽出された脱灰牛骨粉末から6M尿素によって抽出された精製段階の異なる尿素可溶化画分(Urea-Fraction：UF)UF-1とUF-2はともにラットを用いての組織内埋入実験で異所性の骨組織を形成したことから、これは粗精製段階のものではあるがBMPとしての生物活性を持っていると考えられる。従って、今後は同様な方法によって抽出したUF-1およびUF-2を場合により使い分けながら、歯科における臨床応用のための基礎的検討を行なっていく予定である。

結 語

脱灰牛骨粉末から6M尿素によって抽出された

尿素可溶化画分(Urea-Fraction: UF)は、ラットを用いた組織内への埋入実験で骨形成因子: BMP としての生物活性を示した。また、担体としてスクアランを用いた場合に BMP としての働きがより強く発揮された。

文 献

- 1) Urist, M. R. and Strates, B.S. (1971) Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* **50**: 1392-1406.
- 2) Urist, M. R., Huo, Y. K., Brownell, A. G., Hohl, W. M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hun-
kapiller, M. and DeLange, R. J. (1984) Purifica-
tion of bovine bone morphogenetic protein by
hydroxyapatite chromatography. *Proc. Natl.
Acad. Sci. USA.* **81**: 371-375.
- 3) 河合達志, 長谷川二郎, 大野友三(1988) BMP の
応用. *歯科ジャーナル*, **28**: 735-740.
- 4) 河合達志, 大野友三, 長谷川二郎(1991) 基礎か
らみた組織誘導再生法(GTR法)の明るい将来
性. *日本歯科医師会雑誌*, **44**: 921-928.
- 5) 田辺俊一郎(1990) 骨形成因子の抽出と骨誘導実
験. *日口外誌*, **36**: 2659-2669.
- 6) 川上敏行, 安東基善, 吉河 靖, 宇治英世, 長谷
川博雅, 枝 重夫(1992) ラットの皮下組織内に
埋入したスクアランに対する組織反応. *松本歯学*,
18: 117-122.