

骨形成因子添加アテロコラーゲン溶液反復注入法による 骨造成術に関する実験的研究

奈良県立医科大学口腔外科学教室

稲田 育久

BONE AUGMENTATION USING REPEATED INJECTION OF ATELOCOLLAGEN SOLUTION WITH BONE MORPHOGENETIC PROTEIN

IKUHISA INADA

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nara Medical University

Received November 30, 1995

Abstract: Bone morphogenetic protein (BMP) induces differentiation of mesenchymal-type cells into cartilage and bone in a number of species. Therefore, BMP has been investigated as an osteoinductive factor for preparation of a bone substitute.

This preliminary report presents bone augmentation using repeated injection of atelocollagen (AC) solution with BMP in mice and rats.

The crude BMP and bone type I atelocollagen were prepared from fresh bovine bones. Intramuscular injection of the AC solution with crude BMP resulted in reproducible bone induction after 2 weeks. BMP activity depended on the concentration of the AC solution as a carrier, and the 0.75% AC solution with BMP induced the highest BMP activity. Repeated injection of the AC solution with BMP did not incite a significant decrease of BMP activity which suggested an immunological response inhibiting osteoinduction. The 3-consecutive-day subperiosteal injection over the rat cranium elicited significantly higher and wider deposits of bone formation than the 3-consecutive-week one after 8 weeks. Moreover, in the 3-consecutive-day injection, each injected implant unified as a mass. On the other hand, in the 3-consecutive-week injection, each induced bone deposit was individually encapsulated by fibrous connective tissues without unification.

The repeated injection method of the AC solution with BMP resulted in extensive bone induction easily and reproducibly, in the consecutive-day injection. The results obtained suggest a possibility of clinical applications of the repeated injection method of the AC solution with BMP not only for bone augmentation but also for all osseous reconstructions, considering the interval, frequency, and location of injection.

Index Terms

bone morphogenetic protein (BMP), bone augmentation, injection, atelocollagen, osteogenesis

緒 言

口腔顎顔面外科領域では、腫瘍、嚢胞あるいは外傷な

どの治療に際して、審美的ならびに機能的観点から、骨欠損に対する補填あるいは再建が重要な課題である。その中で、顎顔面骨の部分欠損に対しては、onlay graftに

よる bone augmentation (骨造成術)が行われている¹⁾。従来より、本術式には新鮮自家骨移植が一般的に用いられてきたが、採取量の限界や移植片採取手術の必要性ならびに骨採取部位の合併症を生じる場合があることから、自家骨に代わる骨代用材の研究、開発が盛んに行われている。欧米では同種保存骨の臨床応用も行われているが、供給源に限りがあり、一般的ではない²⁾。そして生体材料では、ハイドロキシアパタイトなどのセラミックスが臨床応用されているが、生体親和性や骨伝導能を有するものの、骨誘導能を有しないところが最大の欠点である³⁾。したがって、骨伝導能だけでなく、骨誘導能をも有することが、臨床的にはより有用であり、理想的な骨代用材の必要条件でもある。

骨誘導に関しては、1965年 Urist⁴⁾が同種脱灰骨基質の筋肉内移植により骨誘導能が認められることを報告して以来、骨誘導に関する研究が盛んに行われるようになり、それから抽出される骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein; 以下 BMP と略す)が骨誘導に大きく関与していることが判明し、以来 BMP に関する研究が盛んに行われ、近年では遺伝子工学的手法の導入によりリコンビナント BMP を合成することも可能となり、臨床応用に向けてさまざまな研究が行われている⁵⁻¹²⁾。しかし、リコンビナント BMP より部分精製された BMP の方が、骨誘導能に優れており、多因子が関与している骨誘導の解明にはまだまだ問題が残されているようである^{8,9)}。また、BMP の DDS(Drug Delivery System)としての担体の選択や BMP 添加骨代用材の有効利用法に関しても今後の研究課題である。諸家の報告¹³⁻¹⁶⁾では、BMP と担体を組み合わせて移植埋入する方法が主であり、簡便な応用方法に関する報告はなく、当教室の堀内¹⁷⁾が、BMP 添加アテロコラーゲン溶液の注入法が簡便で再現性の良い BMP 活性検定法であるだけでなく、非観血的な骨造成術などに臨床応用できる有望な手段となりうる可能性を示唆しているにすぎない。本研究は、再現性の良い BMP 注入法に注目し、簡便かつ有効な BMP の応用方法の開発を目的として、牛骨より骨形成因子および I 型アテロコラーゲンを精製し、BMP と混合したアテロコラーゲン溶液をマウスの背部筋肉内およびラットの頭蓋骨骨膜下への注入法による骨誘導実験を行い、さらに反復注入することにより、臨床応用への可能性を有する非観血的骨造成術に関して検討したので報告する。

実験方法と材料

1. 牛脱灰骨基質の作製(Fig. 1)

屠殺直後の食肉牛の脛骨を用い、まず骨膜などの軟部

組織を除去した後、液体窒素で凍結し、ウイレー型粉碎機を用いて約 1 mm² 大に粉碎した。次に、10 mM アジ化ナトリウムにて血液を十分に洗い流し、クロロホルム・メタノール(1:1)混合液(室温、4時間)で脱脂後、0.6 N 塩酸(4℃、72時間)で脱灰した。その後、脱イオン水で十分に洗浄し、凍結乾燥したものを牛脱灰骨基質とした。

2. BMP 画分の抽出および精製

牛脱灰骨基質から、Urist⁴⁾の方法に準じて、6倍量(重量比)の 4 M 塩酸グアニジン水溶液(以下、Gu・HCl と略す)(4℃、24時間)にて非コラーゲン性タンパク質を抽出した。なお、Protease inhibitor として、10 mM N-ethylmaleimide を添加した。抽出液は濾紙(NO 1, 東洋濾紙株式会社製)にて濾過した後、遠心分離(40,000×g, 4℃、15分)した。上清を透析チューブ(SPECTRA/POR 1 MW cutoff 6,000-8,000, SPECTORUM MEDICAL 社製)を用いて、7倍量(体積比)の脱イオン水に対して透析した後、遠心分離(40,000×g, 4℃、30分)にて沈殿物を回収し、脱イオン水で洗浄後、凍結乾燥したものを、0.5 M Gu・HCl 不溶性画分(粗精製 BMP: crude BMP)とした。

3. 牛骨 I 型アテロコラーゲンの精製(Fig. 2)

牛脱灰骨基質の 4 M Gu・HCl 抽出残渣より、木村¹⁹⁾らの方法に準じたペプシン消化法を用いて、牛骨 I 型アテロコラーゲンの抽出、精製を行った。牛脱灰骨基質の 4 M Gu・HCl 抽出残渣 10 g に対して 1 g のペプシン(1:10,000, ナカライテスク)を含む 0.1 M 酢酸を加え、ペプシン消化(4℃、48時間)し、濾過した後、遠心分離(40,000×g, 2時間)を行った。次に、上清を 20 mM リン酸水素二ナトリウム(Na₂HPO₄)に対して透析を行い、沈殿物を遠心分離(40,000×g, 30分)にて回収した。これを 0.1 M 酢酸にて再溶解し、遠心分離(40,000×g, 2時間)した後、上清を上記と同様に透析、沈殿、溶解操作を 2 回繰り返す。最後に 0.5 M 酢酸にて沈殿物を溶解し、脱イオン水にて透析(4℃、48時間)した後、凍結乾燥したものを牛骨 I 型アテロコラーゲンとした。

4. BMP 活性検定

①生化学的検定

10 mM 塩酸に本実験で精製した牛骨 I 型アテロコラーゲンを 0.5% (W/V) 加えた溶液と 4 mg の粗精製 BMP を混合し、6匹の成熟した雄の ddY マウスの背部筋肉内に各 0.2 ml 注入した。なお、コントロールとして同濃度の牛血漿アルブミンの混合液を用いた。注入 2 週後に屠殺し、アルカリフォスターゼ活性、Ca 含量、X 線写真および組織学的所見にて骨形成能を検討した。それぞれの検定は以下の方法にて行った。アルカリフォス

ァターゼ活性²⁰⁾は、抽出物の重量を測定した後、2 ml の 1.5 M NaCl/3 mM NaHCO₃ 溶液中でホモジナイズ (Ultra Turrax homogenizer) し、遠心分離 (12,000×g, 4°C, 15分) 後の上清を酵素溶液として、酵素溶液: 83 mM p-ニトロフェニルリン酸: 50 mM MgCl₂: 0.5 M Tris 塩酸緩衝液: 蒸留水=10:10:1:25:4 の割合で混合し、37°C で 15 分間インキュベートした。次に、1 N 水酸化ナトリウムの添加にて反応を停止させ、p-ニトロフェノールの生成量を 420 nm における吸光度にて測定した。なお、蛋白質 1 mg を 15 分間基質と反応して 1 μM の p-ニトロフェノールを生成する酵素量を 1 単位 (unit) とし、タンパク質量は、Bradford 法²¹⁾にて測定した。

Ca 含量²⁰⁾は、ホモジナイズした残渣を 6 N 塩酸にて 16 時間脱灰し、遠心分離後の上清より原子吸光分光光度

計 (島津製作所社製) を用いて測定した。

②組織学的検索

10% 中性ホルマリンで固定し、ブランクリクロ急速脱灰液にて脱灰した後、通法に従って 4 μm のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施したもので行った。

③ X 線検査

X 線写真は、KXO-15 E (TOSHIBA MEDICAL 社製) を用いて、管電圧 60 KV, 0.02 秒にて撮影した。

5. 粗精製 BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液の調製および注入実験

①骨誘導能に対するアテロコラーゲン溶液の濃度の影響:

BMP を注入法として用いる際のアテロコラーゲン溶液の至適濃度を求めるために、0.5%, 0.75%, 1.0%,

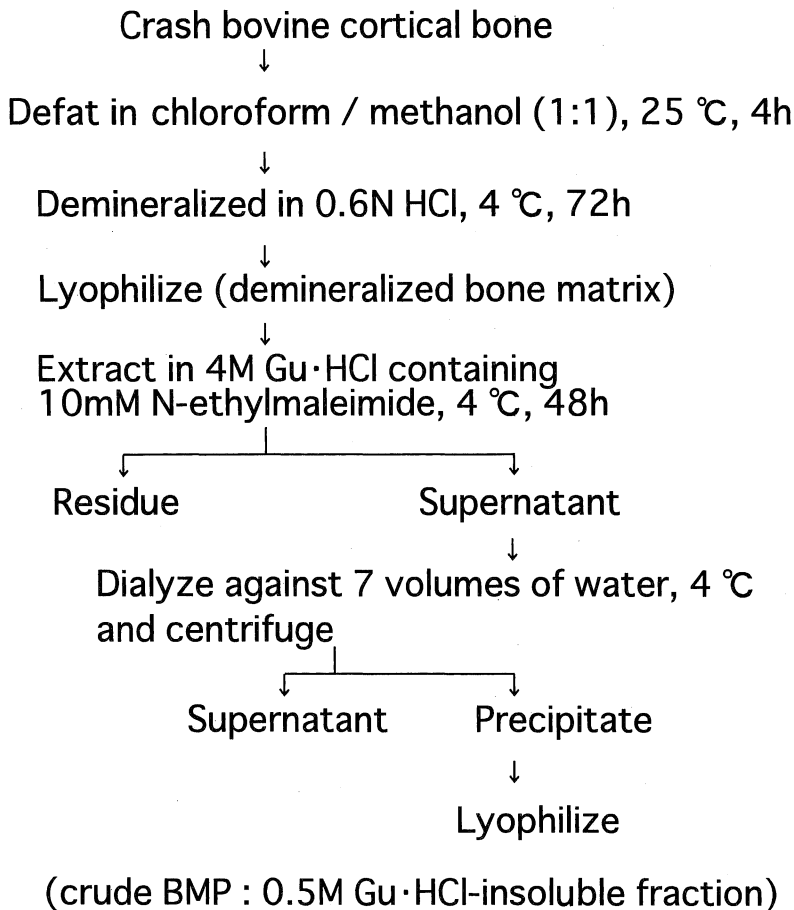


Fig. 1. Flow diagram of the procedure for separation of the crude BMP.

1.5% (W/V) のアテロコラーゲン溶液と 4 mg の粗精製 BMP を混合し、ddY マウスの背部筋肉内に各 0.2 ml 注入し、2 週目の BMP 活性検定を行った。

②粗精製 BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液の反復注入による骨誘導能への影響 (Fig. 3) :

反復注入後の骨誘導の比較を行うため、ddY マウスの背部筋肉内に 0.75% (W/V) アテロコラーゲン溶液と 4 mg の粗精製 BMP を混合し、1 週間隔で異なった部位に 0.2 ml を 3 回注入した。それぞれの注入によって誘導

された組織片を注入後 2 週目に摘出し、骨誘導能を生化学的に検索した。また、3 日間連続で異なった部位に注入を行い、17 日目にすべて摘出し、骨誘導能を生化学的に検索した。

③粗精製 BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液の反復注入法による骨造成術に関する実験 :

注入法による骨造成術への応用性を目的として、1 回注入と反復注入後の骨誘導の比較を行うため、Wistar ラット頭蓋骨骨膜下に 0.75% (W/V) アテロコラーゲン溶

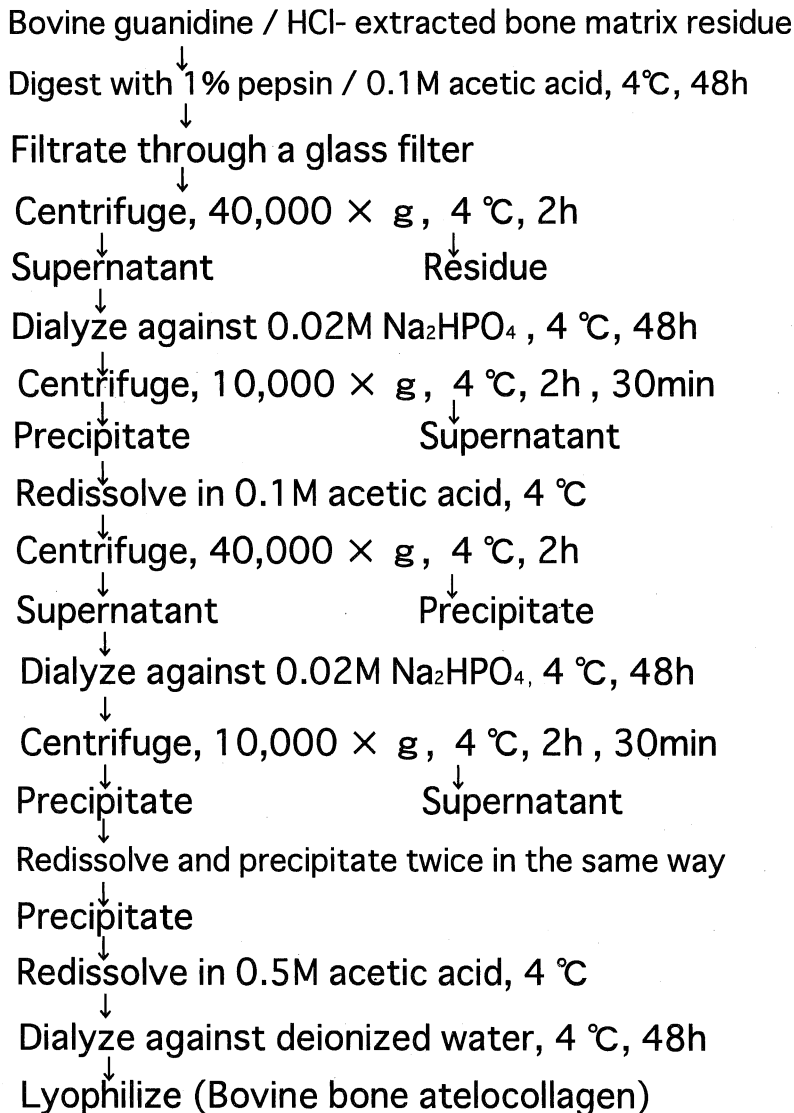


Fig. 2. Flow diagram of the procedure for preparation of the bovine bone atelocollagen.

液と4mgの粗精製BMPを混合し、1回注入、1週間隔で3回または3日間連続で3回の注入を行い、それぞれ最終の注入から2、4、8週後にX線所見および組織学的所見にて骨誘導に関する検討を行った。なお、1回の注入量は0.2mlとした。

また、それぞれの注入法により誘導された骨組織の最大高径および頭蓋骨と接する基底部の面積を比較検討した。

結 果

1. BMP 画分の精製および骨誘導活性

湿重量1kgの粉碎牛脛骨の皮質骨より199gの凍結乾燥脱灰骨基質が得られた。これを4M Gu・HClで抽出し、7倍量の脱イオン水にて透析することによって、270mgの0.5M Gu・HCl不溶性画分(粗精製BMP)が得られた。この画分4mgを0.75%(W/V)牛骨アテロコラーゲン溶液に懸濁し、ddYマウスの背部筋肉内に注入したところ、21日目の軟骨内骨化現象が観察された(Fig. 4, 5)。また、アルカリフォスファターゼ活性、Ca含量とも同種脱灰骨基質移植よりも高かった。しかし、0.5M Gu・HCl不溶性画分以外の0.5M Gu・HCl可溶性・水不溶性画分および水可溶性画分を注入した群には、BMP活性は認められなかった(Table 1)。

2. 骨誘導能に対するアテロコラーゲン溶液の濃度の影響

コラーゲン溶液のみであれば、2%(W/V)までは調製可能であったが、粗精製BMPと混合した状態では、粘稠

になり過ぎるため、コラーゲン溶液濃度を1.5%までとした。しかし、0.5%では、稠度が低く注入部位より液漏れが生じることがあった。

コラーゲン溶液濃度が変化しても、すべてに骨誘導は認められ、抽出物重量はコラーゲン濃度の上昇に伴い増加するが、コラーゲン濃度が1%以上になった場合アルカリフォスファターゼ活性およびCa含量が0.75%でピークになった(Fig. 6)。

3. BMP添加牛骨I型アテロコラーゲン溶液の反復注入による骨誘導能への影響

0.75%アテロコラーゲン溶液0.2mlを1回注入後、1週間隔で3回注入後、あるいは3日連続注入後、それぞれ最終の注入から2週間後の抽出物の湿重量、アルカリフォスファターゼ活性、Ca含量の値を1回注入法のみと比較しても、1週間隔で3回注入および3日連続注入を行ってもそれぞれの抽出物の湿重量、アルカリフォスファターゼ、Ca含量に有意な低下は認められなかった(Table 2, 3)。

4. BMP添加牛骨I型アテロコラーゲン溶液の反復注入法による骨造成術に関する実験

① 0.75%溶液1回注入法

0.75%溶液1回注入後2週目には、ラット頭蓋骨上に半球形で外殻がX線不透過性の膨隆が認められた(Fig. 7)。組織学的所見では、頭蓋骨上に、膨隆の中心部にはアテロコラーゲンが残留するものの、外殻部では軟骨から骨に置換されつつあり、いわゆる軟骨内骨化現象が認められた(Fig. 8)。

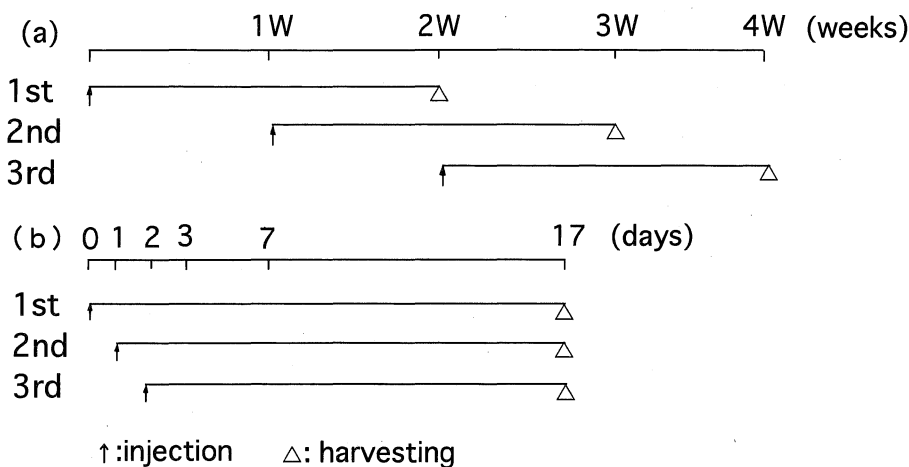


Fig. 3. Schedule of BMP activity bioassay after repeated injection with atelocollagen solution. (a) 3-consecutive-week injection (b) 3-consecutive-day injection

4週目では、X線的には2週目に比べて、頭蓋骨上の膨隆全体に不透過性の充進が認められた(Fig. 9)。組織学的所見では、誘導された骨は一部頭蓋骨と一体化し、中心部まで骨髄組織を有した骨組織によって置換され、アテロコラーゲンの残留は認められなかった(Fig. 10)。

② 1週間隔による3回の0.75%溶液反復注入法

1週間隔で3回の注入を行い、最終の注入から2週目では、頭蓋骨上にそれぞれの注入によって誘導された3つの骨膨隆が認められた(Fig. 11)。組織学的所見においては、1回目(4週目)、2回目(3週目)に注入したもの

では、骨髄組織を有する骨組織が形成され、3回目(2週目)注入後のものでは、軟骨組織から骨組織に置換されつつある所見が認められたものの、それぞれは線維性結合組織に囲まれており、一塊にはなっていなかった(Fig. 12)。

③ 3日連続0.75%溶液反復注入法

3日連続注入を行い、2週後では、頭蓋骨上に一塊とした半球形の膨隆が認められ(Fig. 13)、内部はX線透過性ではあるが、外殻がX線不透過性を示した(Fig. 14)。組織学的所見では、内部にアテロコラーゲンが残存



Fig. 4. Roentgenogram of a day-21 implant of the crude BMP (4 mg) with 0.75% bovine bone atelocollagen solution (0.2 ml) by injection.

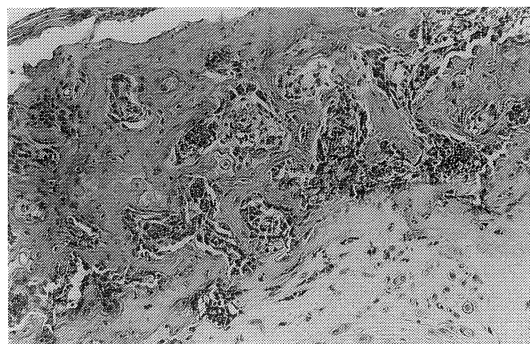


Fig. 5. Photomicrograph of a day-21 implant of 0.75% AC solution with the crude BMP by injection. Endochondral ossification develops. (H-E, $\times 100$)

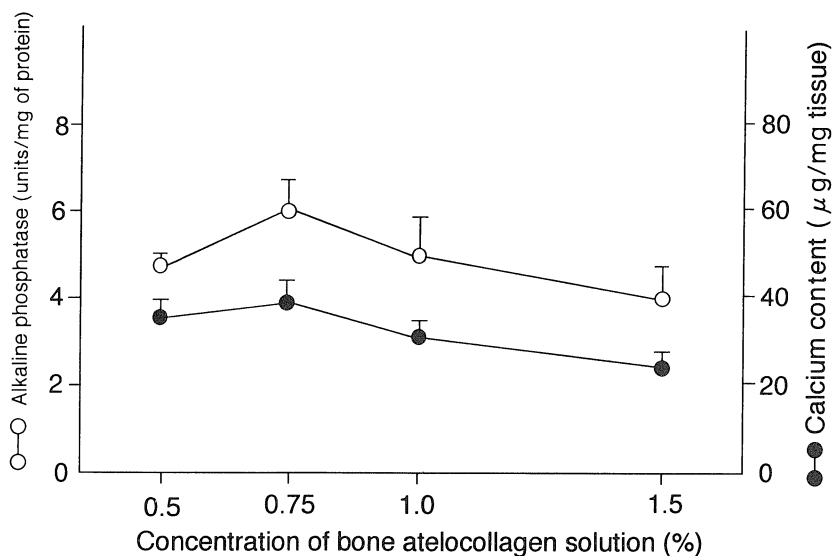


Fig. 6. Influence of varying concentration of bone atelocollagen solution on bone tissue yielding activity of BMP 14 days after injection. (Values are shown as mean \pm SEM)

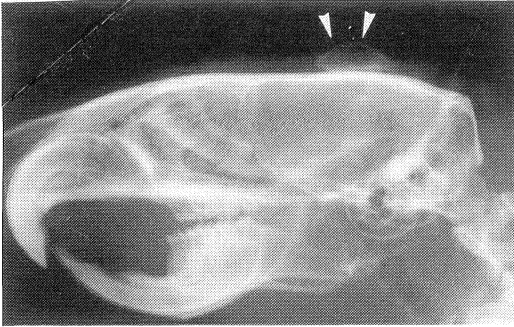


Fig. 7. Roentgenogram of a day-14 implant of single subperiosteal injection.

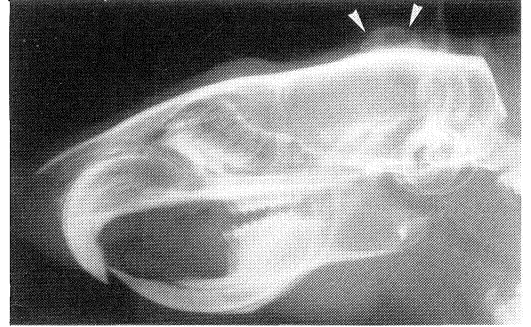


Fig. 9. Roentgenogram of a day-28 implant of single subperiosteal injection. The mass increases in radiopacity.

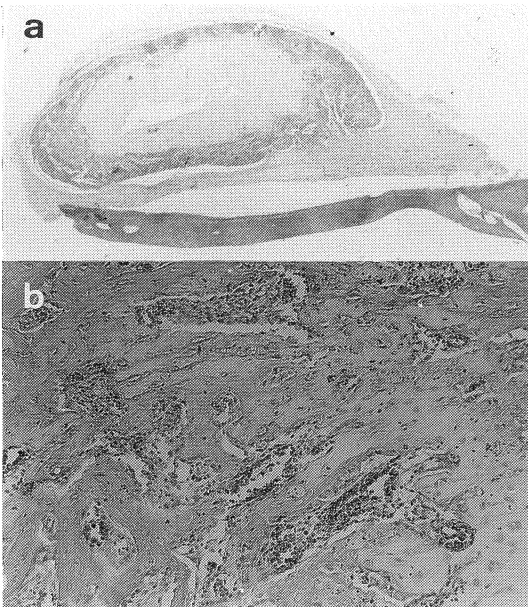


Fig. 8. Photomicrographs of a day-14 implant of single subperiosteal injection.
 a : Cartilage is induced, which is converting into bone tissue at the periphery of the implant. Atelocollagen has not been resorbed in the central portion of the implant yet. (H-E, $\times 2$)
 b : Higher magnification of the upper. (H-E, $\times 100$)

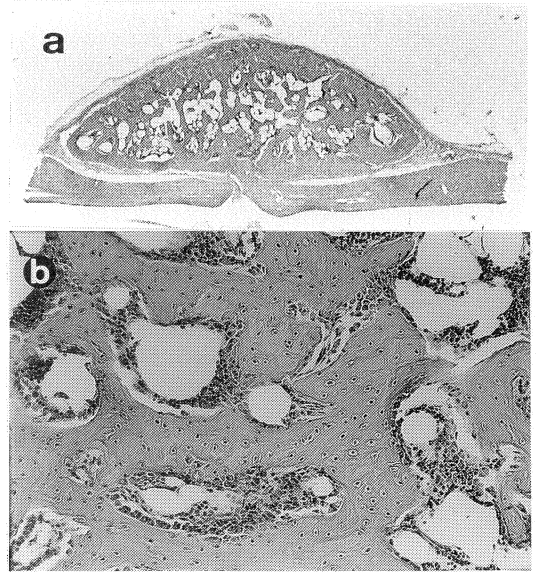


Fig. 10. Photomicrographs of a day-28 implant of single subperiosteal injection.
 a : Cartilage has converted into bone tissue containing bone marrow. Atelocollagen has been replaced by bone tissue. (H-E, $\times 2$)
 b : Higher magnification of the upper. (H-E, $\times 100$)

Table 1. BMP activity of day-14 implants of DBM*¹ and various fractions injected with 0.75% atelocollagen solution.

	Incidence of bone formation	Alkaline phosphatase unit/mg of protein	Calcium content $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue
Mouse DBM* ²	6 / 6	4.10 ± 0.25	37.25 ± 3.48
Bovine DBM* ³	0 / 6	0.61 ± 0.02	2.15 ± 0.07
4M Gu • HCl-soluble* ⁴			
0.5M Gu • HCl-insoluble	6 / 6	4.95 ± 0.31	48.46 ± 2.04
0.5M Gu • HCl-soluble water-insoluble	0 / 6	ND* ⁵	ND
water-soluble	0 / 6	ND	ND

Values are shown as mean \pm SEM

- *¹ DBM=demineralized bone matrix
- *² Implantation of 10 mg of lyophilized mouse DBM
- *³ Implantation of 10 mg of lyophilized bovine DBM
- *⁴ Injection of 4 mg of each fraction
- *⁵ ND=not detected

Table 2. BMP activity in implants of 3-consecutive-week injection two weeks after the injection.

	wet weight (mg)	Alkaline phosphatase unit/mg of protein	Calcium content $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue
1st	21.73 ± 0.84	5.21 ± 0.22	41.78 ± 2.85
2nd	26.55 ± 1.26	4.44 ± 0.31	41.42 ± 1.74
3rd	20.29 ± 0.66	4.23 ± 0.23	35.68 ± 1.55
SI*	21.73 ± 0.84	4.95 ± 0.31	48.46 ± 2.04

SI* : single injection

Values are shown as mean \pm SEM



Fig. 11. Photographs of a day-28 implant of 3-consecutive-week subperiosteal injection. The induced mass has three eminences.

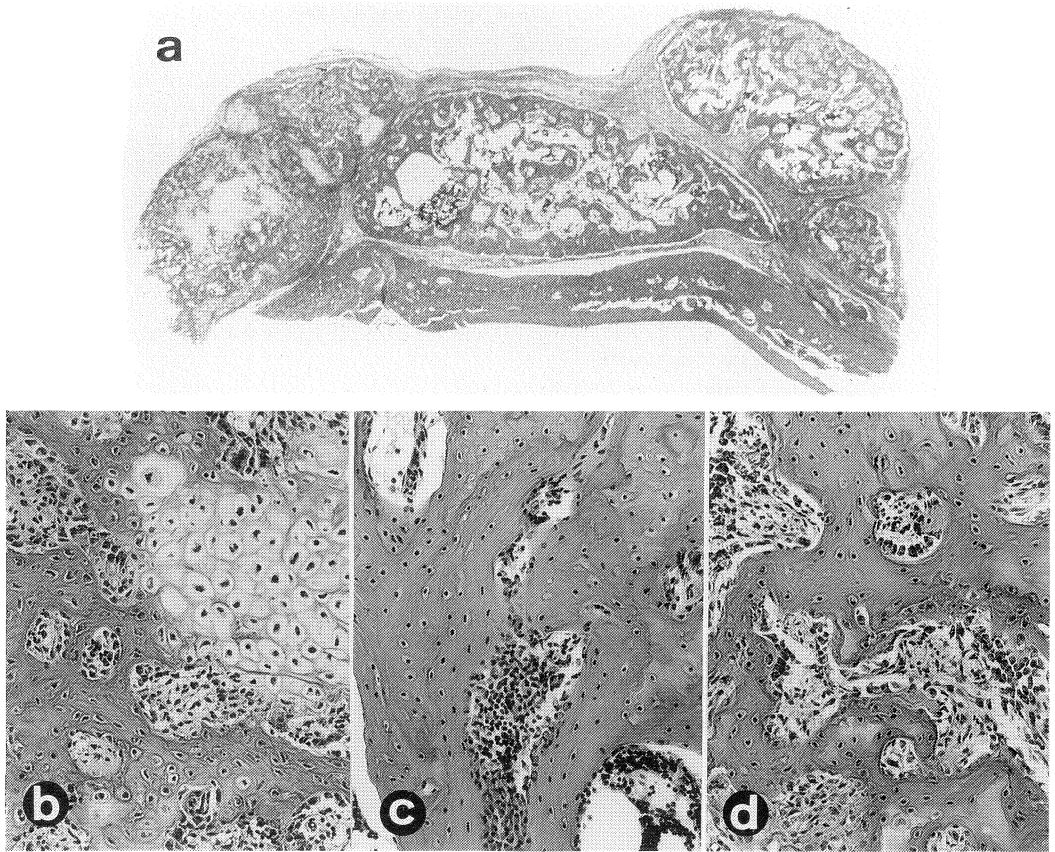


Fig. 12. Photomicrographs of a day-28 implant of 3-consecutive-week subperiosteal injection. a: Each induced bone deposit is encapsulated by the fibrous connective tissues without unification. (H-E, $\times 2$)
b: (2 weeks after injection) Cartilage is converting into bone tissue. (H-E, $\times 100$)
c: (4 weeks after injection) Trabecular bone is formed and intra-trabecular spaces are filled with bone marrow. (H-E, $\times 100$)
d: (3 weeks after injection) Cartilage has been replaced by bone tissue which contains bone marrow. (H-E, $\times 100$)

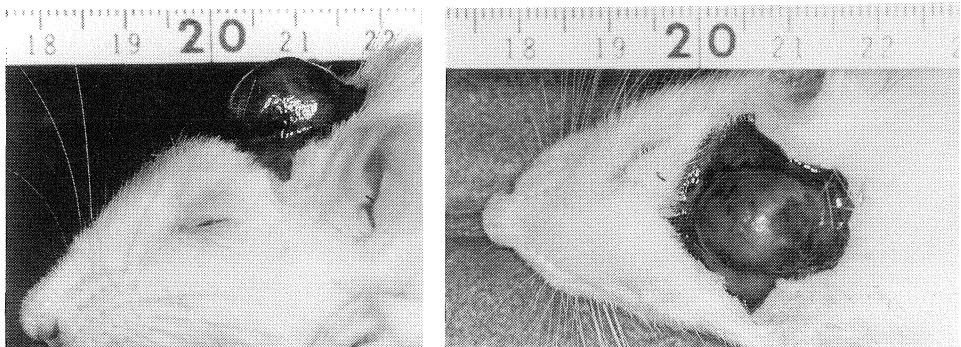


Fig. 13. Photographs of a day-17 implant of 3-consecutive-day subperiosteal injection. Each injected implant seems to unify as a mass, which is larger than that of 3-consecutive-week injection.



Fig. 14. Roentgenogram of a day-17 implant of 3-consecutive-day subperiosteal injection.



Fig. 16. Roentgenogram of a day-31 implant of 3-consecutive-day subperiosteal injection.

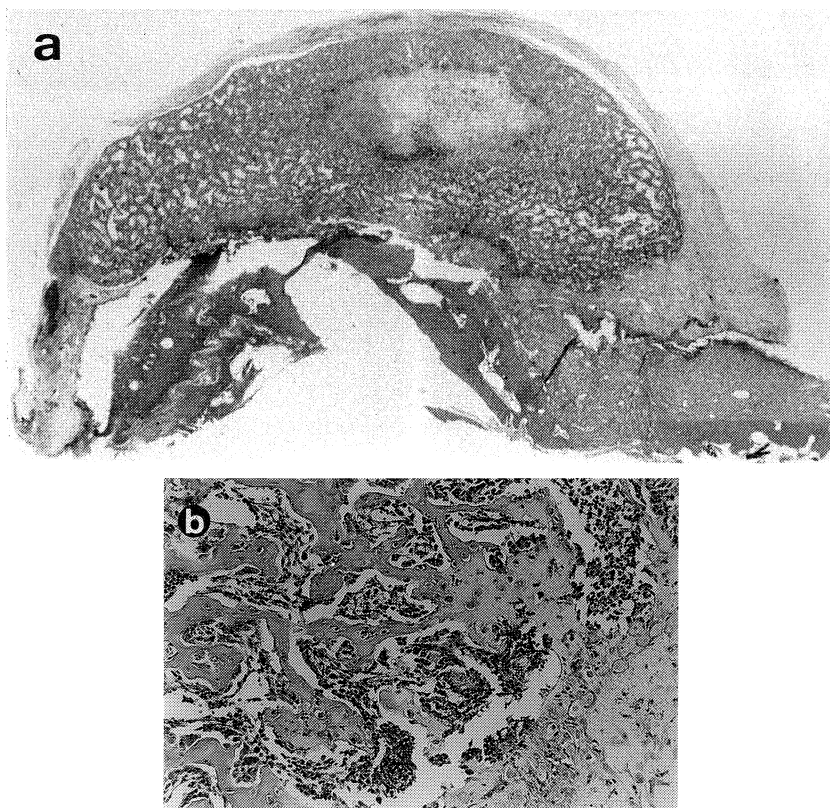


Fig. 15. Photomicrographs of a day-17 implant of 3-consecutive-day subperiosteal injection.

a : Carilage is induced, which is converting into bone tissue at the periphery of the implant . Atelocollagen has not been resorbed in the central portion of the implant yet. (H-E, $\times 2$)
b : Higher magnification of the upper. (H-E, $\times 100$)

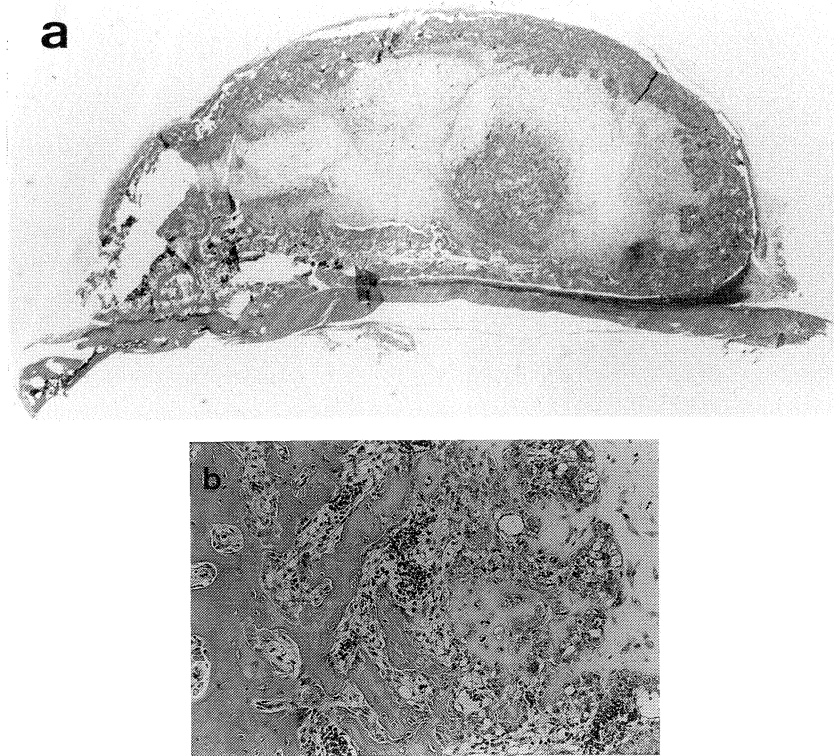


Fig. 17. Photomicrographs of a day-31 implant of 3-consecutive-day subperiosteal injection.
 a : Large bone deposit develops. However, cartilage and atelocollagen still remain in the central portion of the implant. (H-E, $\times 2$)
 b : Higher magnification of the upper. (H-E, $\times 100$)



Fig. 18. Roentgenogram of a day-59 implant of 3-consecutive-day subperiosteal injection, The induced mass becomes radiopaque mostly.

しているが、辺縁部では軟骨組織から骨組織に置換されつつある組織像が認められた(Fig. 15)。4週目にはX線のには、2週目と比較すると内部の不透過性はやや亢進しているものの(Fig. 16)、組織学的所見では、まだ中心部にアテロコラーゲンが残留し、その周囲では軟骨組織が骨組織に置換されている所見が認められた(Fig. 17)。これは、一回注入法や1週間隔注入法と異なり、中心部での骨誘導が遷延しているものと思われる。

8週目では、頭蓋骨上の半球状膨隆は不透過性が亢進し、ほぼ均一な不透過像は認められるようになった(Fig. 18)。組織学的所見では、4週目より内部への骨置換は進行し、軟骨組織は認められなくなったが、まだ中心部にアテロコラーゲンが残留することから、同部での骨新生は生じないものと思われる(Fig. 19)。

④各注入法により誘導された骨組織の形態比較

高さに関しては3日連続注入を行った場合、1回法より2.2倍、1週間隔3回注入法より1.8倍の高さを得る

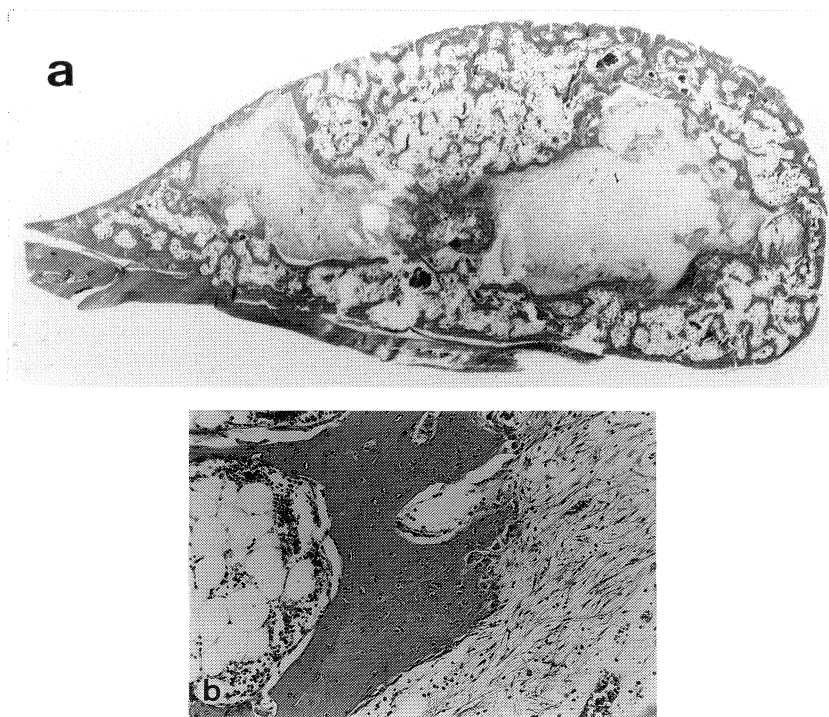


Fig. 19. Photomicrographs of a day-59 implant of 3-consecutive-day subperiosteal injection,
a : Cartilage has converted into bone tissue which contains bone marrow. However, atelocollagen still remains in the central portion of the implant. (H-E, $\times 2$)
b : Higher magnification of the upper. (H-E, $\times 100$)

Table 3. BMP activity in implants of 3-consecutive-day injection two weeks after the 3rd injection.

	wet weight (mg)	Alkaline phosphatase unit/mg of protein	Calcium content $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue
1st	18.63 ± 0.91	4.09 ± 0.23	47.57 ± 2.95
2nd	26.83 ± 0.82	4.83 ± 0.21	44.50 ± 1.54
3rd	17.00 ± 0.75	5.11 ± 0.20	60.02 ± 1.45
SI*	21.73 ± 0.84	4.95 ± 0.31	48.46 ± 2.04

SI* : single injection

Values are shown as mean \pm SEM

Table 4. Size of the induced bone after various types of injection.

type of injection	maximum height (mm)	basal area (mm^2)
single	3.25 ± 0.69	49.01 ± 3.40
3-consecutive-day	8.00 ± 0.50	139.24 ± 6.73
3-consecutive-week	4.25 ± 0.19	63.54 ± 17.93

Values are shown as mean \pm SEM

ことができた(Table 4)。面積に関しては1回法より2.8倍、1週間隔3回注入法より2.2倍の広さを得ることができた。したがって、3回反復注入法でも、連日注入法の方が1週間隔注入よりも、有意に大きな骨誘導が可能であった。

考 察

1. BMP について

骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein : BMP)は、同種脱灰骨に骨誘導能を持つことから、この活性にはある種のタンパク質が関与していると考え、1965年 Urist¹⁾により BMP と名づけられた。しかし、BMP の可溶化が困難であったことなどから、その実態は長い間不明であった。1980年に花村²⁾らが、4M 塩酸グアニジンを用いて、ラットの脱灰骨基質から BMP 画分を抽出して以来、BMP の精製に関する研究が盛んになり、BMP の構造の解明が待たれていた。1988年に Wozney⁵⁾らは液体クロマトグラフィーによって精製した分子量 30,000 の骨誘導因子から4つのポリペプチドを分離、遺伝子クローニングに成功した。これらを元にして作られたリコンビナント BMP は骨誘導活性を有し、BMP-1, 2(2A), 3, 4(2B)と名づけられた。さらに Celeste⁶⁾らによって1990年に BMP-5, 6, 7の、1992年 BMP-8の遺伝子が分離され、リコンビナント BMP も調製された⁷⁾。これらのうち BMP-1 以外は、成熟したタンパク質に存在する9個のシステイン残基のうち7個が同じ位置に保持されており、TGF- β スーパーファミリーに分類されている。これらの BMP のうち BMP-2, 3, 4, 7(Osteogenic protein-1 : OP-1)は *in vivo* において軟骨・骨組織を誘導し、BMP-1 は軟骨を誘導するとされており、特に BMP-2 は骨誘導活性が高く、*in vivo* における骨誘導実験に汎用されている。しかし、リコンビナント BMP-2 あるいは単離された BMP よりも部分精製された BMP の方が骨誘導能に優れているという報告が多い^{8,9)}。これは、骨誘導は単に BMP のみならず複数の他の骨基質タンパク質が複雑に関与しているからと考えられている。したがって、本実験では、BMP 添加アテロコラーゲン溶液の注入法を応用した効果的な骨造成術の開発が主眼であるので、マウス・ラットにおいて再現性に優れた骨誘導能を有するとされている牛骨由来の粗精製 BMP を用いることにした。

2. BMP の応用法による骨誘導能の違い

本実験でも牛骨由来粗精製 BMP 添加アテロコラーゲン溶液をマウスの筋肉内に注入した場合には、再現性の良い骨誘導が認められた。しかし、牛骨由来粗精製 BMP

添加骨代用材をマウスの筋肉内に埋入した場合には、BMP の早期拡散を防止する目的でアテロコラーゲンを併用しても骨誘導の再現性は良くないとされている。この原因としては、移植片として埋入した場合には、手術操作による炎症などによって内因性 BMP 分解酵素(Endogenous BMP-ase)²³⁾あるいは骨形成阻害タンパク(Osteogenesis Inhibitory Protein : OIP)²⁴⁾が活性化されること、また炎症によって酸性フォスファターゼなどが活性化され、局所の pH が低下することにより、骨誘導に重要なアルカリフォスファターゼ活性が抑制されることがあげられる²⁵⁾。したがって、BMP 活性検定法だけでなく、BMP の応用法としても、ゼラチンカプセル²⁶⁾あるいは同種骨基質残渣²⁷⁻²⁹⁾を用いた筋肉間または皮下埋入法よりも、本実験のようにアテロコラーゲン溶液を用いた注入法の方が、これらの因子に影響されにくく、きわめて簡便で再現性の良い方法であると共に、ごく微量でも検索できる利点がある。牛真皮 I 型アテロコラーゲン溶液を用いた筋肉内注入法でも BMP 活性検定法としての有用性についての報告が散見される³⁰⁻³¹⁾。しかしながら、注入法が BMP の臨床応用において、手術せずに非観血的に骨再建や骨癒合不全の治療などが容易にできる可能性を示唆したのは、当教室の堀内の報告が最初である¹⁷⁾。

BMP の早期拡散を防止する目的で用いるアテロコラーゲン溶液の濃度による骨誘導への影響を調べると、抽出物重量はコラーゲン濃度の上昇に伴い増加するが、アルカリフォスファターゼ活性、Ca 含量が低下していることから、コラーゲン濃度が1%以上になった場合、コラーゲンの吸収が遅れ BMP の除放効果が減少し、骨誘導が起りにくいと考えられた。したがって、注入法には0.75%アテロコラーゲン溶液を用いれば、最も優れた骨誘導が得られたので、以下に述べる本実験ではこの濃度を使用した。

臨床応用に際しては、1回の注入のみでは目的を達成することが不可能となり、反復注入の必要性が想定できるため、本実験はその至適条件をも検討した最初の報告である。

3. BMP の担体

BMP の早期拡散のため、良好な骨誘導は得られないので、BMP を有効に利用するには delivery system としての担体(carrier)が重要な鍵を握っていると考えられる。今までに β -tricalcium phosphate¹³⁾、多孔質ハイドロキシアパタイト^{32,33)}、多孔質ハイドロキシアパタイトおよび牛真皮 I 型アテロコラーゲン¹⁴⁾、polylactic acid (PLA) polymer¹⁶⁾、人フィブリン¹⁵⁾、強化コラーゲン線

維膜³⁴⁾などを担体として複合材が作製され、埋入実験を行なわれたが、注入法としてはアテロコラーゲン以外の担体は用いられていなかった。アテロコラーゲン以外の担体で注入法として用いることのできるものは、人フィブリンであるが、高価であり、また、HIV や HBV などの感染の危険性もある上、アテロコラーゲンより生体吸収が早いので、必ずしも実用的ではないと考えられる。したがって、異種コラーゲンの主要な抗原決定部位であるコラーゲン分子の両端に位置する telopeptide をペプシン消化により除去したアテロコラーゲンは、異物反応がほとんどなく、生体親和性に優れて、単に DDS の媒体だけでなく、当該細胞の分化と増殖に必要な細胞支持体の役割も果たしていると考えられる。一般に、BMP は軟骨内骨化によって骨誘導を惹起するといわれ、まず軟骨ができ、それが骨に置換されていくと考えられてきた。しかし、多孔質ハイドロキシアパタイト³³⁾や強化コラーゲン線維膜³⁴⁾などは、軟骨形成がなく、直接骨形成(direct bone formation)が認められることから、BMP による細胞分化の現象が細胞環境としての基質に依存していると考えられている。

4. BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液の反復注入による骨誘導の影響

Urist ら³⁵⁾は、牛骨由来の部分精製した BMP を犬の頭蓋骨欠損に 3 週間隔で反復埋入したところ、1 回目の骨再生が 96% であったのに対して、2 回目は 62% であったと報告している。これは、異種 BMP 移植により血清抗 BMP 抗体が産生され、体液性免疫反応による骨誘導の阻害によるものとされている。また、血清抗 BMP 抗体価は初回移植後 3 週目には 3 倍の上昇を認めている。しかし、本研究では 1 週間隔に 3 回の反復注入を行ったにもかかわらず、骨誘導活性の有意な低下は認められなかった。これは、血清抗 BMP 抗体価の上昇にもかかわらず、粗精製 BMP の旺盛な骨誘導能が免疫反応よりも優位であったためと考えられる。しかしながら、臨床応用に際しては、精製された異種あるいは同種の BMP ではなく、ヒトリコンビナント BMP などが用いられると考えられるので、抗原性に対して考慮する必要はないと考えられる。したがって、粗精製 BMP の反復注入にても骨誘導能に変化がなかったことは、ヒトリコンビナント BMP の反復注入法の臨床応用を想定した実験系に代わり、粗精製 BMP を用いても問題がないと考えられる。一方、担体として用いた異種アテロコラーゲンについても抗原性の報告がある^{36,37)}。しかし、牛真皮由来の I 型アテロコラーゲンは皮膚の陥凹などの軟部組織の欠陥部の皮内に注入することにより、これらの修復に臨床応用されている。し

かも、DeLustro ら³⁷⁾は平均 4.4 回の反復注入を行っているにもかかわらず、約 1% の患者に注入部の過敏反応症状が生じたのみであったと報告している。したがって、BMP の担体として I 型アテロコラーゲンをを用いることは、臨床的にも問題はないと考えられる。しかし、抗原性がなく、注入可能で、しかも担体として I 型アテロコラーゲんに匹敵する性質を有する化合物が開発できれば、臨床的により有用となるであろう。

5. BMP 添加アテロコラーゲン溶液の反復注入による骨造成術への応用

反復注入を行っても骨誘導が得られたことから、移植に伴う手術の必要性と較べれば、BMP とアテロコラーゲンとの混合溶液の反復注入法による非観血的な骨造成術の方が、より有効的な臨床応用手段の一つではないかと考えられる。

1 週間隔で反復注入した場合には、一塊の骨組織を形成せず、それぞれの注入によって誘導された骨は線維性結合組織に囲まれており、萎縮した顎堤の骨造成術のように力学的負荷のかかる部位への応用するには、骨の可動性についての問題は残るが、頬骨や頭部のような力学的負荷のかからない部位の骨造成術には比較的容易に適応可能と考えられる。また、誘導される骨の形状を考慮すると、3 日連続注入法と比較した場合、高さよりも広さを必要とする手術術式の代わりとして適していると考えられる。

3 日連続注入した場合には、一塊の骨組織を形成することから、力学的負荷のかかる部位への応用にも問題はなく、1 週間隔の反復注入法と比較すると、高さよりも広さを必要とする骨造成術に適しているようである。しかし、かなりの高さ(厚み)を有する骨形成が可能ではあるが、骨誘導が周囲から生じるため、3 日連続注入後 8 週目でも、中心の一部ではあるが、骨誘導が認められず、アテロコラーゲンは吸収されずに残っていた。このことは、より高さを必要とする場合には問題であるけれども、内部からの骨誘導も可能にするために自家骨髄細胞を BMP 添加アテロコラーゲン溶液に混合し、注入することによって解決するものと考えられ、今後の研究課題として行きたい。また、より望ましい形状を有する骨誘導を可能にするために、BMP 添加アテロコラーゲン溶液の反復注入法に誘導組織再生法(GTR 法)を併用した研究も行っていく。

以上のように、簡便かつ再現性に優れた旺盛な骨誘導が得られる BMP 添加アテロコラーゲン溶液の反復注入法という動物実験に基づく報告は本研究が最初であり、臨床応用の可能性をも示唆するものである。また今後、

遺伝子工学的手法にて量産されるリコンビナント BMP が臨床応用できる際には、本法は注入間隔、注入回数、注入部位を考慮することで、骨造成術のみならず骨再建法のすべてに応用可能であることから、本研究で得られた結果は非常に有用であると考えられる。

結 語

1. 牛脱灰骨基質から抽出した 4 M Gu・HCl 可溶性・0.5 M Gu・HCl 不溶性画分は粗精製ではあるが、異種動物であるマウスの筋肉内で同種脱灰骨と同様の骨誘導能を有していた。

2. 粗精製 BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液の注入法において、0.75 % アテロコラーゲン溶液の使用が骨誘導に最適であった。

3. 粗精製 BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液の反復注入を 1 週間隔に 3 回、あるいは 3 日連続注入を行ったにもかかわらず、骨誘導活性の有意な低下は認めなかった。

4. 粗精製 BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液を 1 週間隔でラットの頭蓋骨骨膜下に反復注入した場合には、一塊の骨組織を形成せず、それぞれの注入によって誘導された骨は線維性結合に囲まれており、萎縮した顎堤の骨造成術のように力学的負荷のかかる部位への応用には、骨の可動性についての問題を残すが、頬骨や頤部のような力学的負荷のかからない部位の骨造成術には適応可能であると考えられる。

5. 粗精製 BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液をラットの頭蓋骨骨膜下に 3 日連続注入した場合には、注入後 8 週目でも中心の一部分にアテロコラーゲンが残留するが、一塊としてかなりの高さ(厚み)を有する骨形成が可能であり、広さよりも高さを必要とする骨造成術に適していると思われる。

6. 粗精製 BMP 添加牛骨 I 型アテロコラーゲン溶液の反復注入法では、簡便かつ再現性に優れた旺盛な骨誘導が得られ、注入間隔、注入回数、注入部位を考慮することで、骨造成術のみならず骨再建法のすべてに臨床応用が可能であることが示唆された。

本研究の成果の一部は、1993 年 10 月第 38 回日本口腔外科学会総会(新潟)、1994 年 4 月 The 3rd World Congress for Oral Implantology (Yokohama)において発表された。なお本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(課題番号 03771550 および 05671681)援助による。

稿を終えるにのぞみ、本研究の機会を与え、本研究の遂行に終始ひとかたならぬ御指導と御校閲を賜った恩師

文 献

杉村正仁教授に心から感謝致します。また御校閲を賜った整形外科教室玉井 進教授ならびに公衆衛生学教室米増國雄教授に深謝致します。あわせて研究を御援助いただきました教室諸兄姉とりわけ直接ご指導をいただいた堀内克啓助教授に深く感謝致します。

- 1) Jensen, J. and Sindet, P. S. : J. Oral. Maxillofac. Surg. 49 : 1277, 1991.
- 2) William, B., Higuchi, K., Ulf, L. and Burton, E. B. : Int. J. Oral. Maxillofac. 10 : 143, 1995.
- 3) Arnold, B. S. : J. Oral. Maxillofac. Surg. 51 : 26, 1993.
- 4) Urist, M. R. : Science 150 : 893, 1965.
- 5) Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. and Wang, E. A. : Science 242 : 1528, 1988.
- 6) Celeste, A. J., Innazi, A. and Taylor, R. C. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 9843, 1990.
- 7) Celeste, A. J., Taylor, R. and Yamaji, N. : J. Cell. Biochem. (Abstract supp) 161 : 100, 1992.
- 8) Takuwa, Y., Ohse, C. and Wang, E. A. : Biochem. Res. Comm. 166 : 750, 1990.
- 9) Vukicevic, S., Luyten, F. P. and Reddi, A. H. : Biochem. Biophys. Res. Comm. 166 : 750, 1990.
- 10) Linde, A. and Hedner, E. : Calcif. Tiss. Int. 56 : 549, 1995.
- 11) Sigurdsson, T. J., Lee, M. B., Kubota, K., Turek, T. J., Wozney, J. M. and Ulf, M. E. : J. Periodontol. 66 : 131, 1995.
- 12) Fujimura, K., Bessyo, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y. and Iizuka, T. : Biochem. Biophys. Res. Comm. 208 : 316, 1995.
- 13) Urist, M. R., Lietze, A. and Dawson, E. : Clin. Orthop. 187 : 277, 1984.
- 14) 中原治彦, 高岡邦彦 : 形成外科 6 : 535, 1987.
- 15) Kawamura, M. and Urist, M. R. : Clin. Orthop. 235 : 302, 1988.
- 16) Miki, T., Harada, K., Imai, Y. and Enomoto, S. : J. Oral. Maxillofac. Surg. 52 : 387, 1994.
- 17) 堀内克啓 : 奈医誌. 42 : 335, 1991.
- 18) Mizutani, H. and Urist, M. R. : Clin. Orthop. 17 : 1213, 1982.
- 19) Kimura, S. and Matsura, F. : J. Biochem. 75 :

- 1231, 1974.
- 20) **Reddi, A. H. and Sullivan, N. E.** : *Endocrinology* **107** : 1291, 1980.
- 21) **Bradford, M. M.** : *Anal. Biochem.* **72** : 248, 1976.
- 22) **Hanamura, H., Higuchi, Y., Nakagawa, M., Iwata, H., Nogami, H. and Urist, M. R.** : *Clin. Orthop.* **148** : 281, 1980.
- 23) **Urist, M. R., Delange, R. J. and Finerman, G. A. M.** : *Science* **220** : 680, 1983.
- 24) **Brownell, A. G., Gerth, N. and Fineman, G. A. M.** : *Conn. Tiss. Res.* **17** : 261, 1988.
- 25) **Sela, J., Applebaum, J. and Uretzky, G.** : *Biomat. Med. Dev. Art. Org.* **14** : 227, 1986.
- 26) **Urist, M. R., Hou, Y. K., Brownell, A. G., Hohl, W. M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hunkapiller, M. and Delange, R.** : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 371, 1984.
- 27) **Sampath, T. K., Muthukuman, N. and Reddi, A. H.** : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 7109, 1987.
- 28) **Wang, E. A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R. M., Kriz, W. J., Luxenberg, D. P., Sibley, B. S. and Wozney, J. M.** : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 9484, 1988.
- 29) **Samath, T. K. and Reddi, A. H.** : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 6591, 1983.
- 30) 千葉雅俊 : *日口外誌.* **34** : 1557, 1988.
- 31) **Bessyo, K., Tagawa, T. and Murata, M.** : *Biochem. Biophys. Res.* **165** : 959, 1989.
- 32) **Kawamura, M., Iwata, H., Sato, K. and Miura, T.** : *Clin. Orthop.* **217** : 281, 1987.
- 33) **Ono, I., Kuboki, Y., and Murata, M.** : *Plast. Reconstr. Surg.* **90** : 870, 1992.
- 34) **Urist, M. R. and Hudak, R. T.** : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **176** : 472, 1984.
- 35) **Nilsson, O. S. and Urist, M. R.** : *Int. Orthop.* **15** : 257, 1991.
- 36) **Frank, D. H., Vakassian, L., Fisher, J. C. and Ozkan, N.** : *Plast. Reconstr. Surg.* **87** : 1080, 1987.
- 37) **DeLustro, F., Smith, S. T., Sundsmo, J. M. S. N., Salem, G. B. S., Salem, G. B. S., Kincaid, S. and Ellingsworth, L.** : *Plast. Reconstr. Surg.* **79** : 581, 1987.