歯由来骨形成因子に関する実験的研究

千葉 雅 俊

Experimental studies of bone morphogenetic protein derived from bovine tooth

Masatoshi CHIBA

Abstract: A bone morphogenetic protein (BMP) that induces differentiation of mesenchymal-type cell into cartilage and bone was partially purified from bovine tooth. In this study, the activity of BMP was assayed by its ability to induce enchondral ossification after injections of samples into rat thigh muscles.

Frozen teeth were ground to fine particles and demineralized in 0.6 N HCl. The demineralized tooth matrix was treated with 4 M guanidine hydrochloride to extract BMP. Three volumes of cold ethanol were added to the supernatant obtained by filtration and the insoluble materials formed were collected by centrifugation. These materials were redissolved in 4 M guanidine hydrochloride and subjected to gel filtration using a Superose 12 column. The precipitate formed by adding three volumes of cold ethanol to each fraction was collected by centrifugation and BMP activity was assayed.

The molecular weight of BMP of bovine tooth analyzed by electrophoresis on a SDS polyacrylamide gel was 27,000. The combination of partially purified BMP with 0.5% atelocollagen (in HCl, pH 3) more effectively enlarged the volumes of cartilage and bone than did BMP alone, indicating usefulness of atelocollagen as a carrier. BMP induced enchondral ossification in the periosteum of the femur as well as in the muscle, suggesting that the periosteum includes cells that differentiate into osteoblasts in response to BMP.

Key words: Bone morphogenetic protein, atelocollagen, enchondral ossification

結 言

従来骨代謝は、骨芽細胞や破骨細胞の活性を調節する副甲状腺ホルモン、活性型ビタミンDなどのホルモンを中心に研究が進められてきた。最近、骨や軟骨に存在し、産生された局所で作用して骨代謝を制御していると考えられる様々な局所因子が報告されている¹⁻³⁾。特に骨に存在して未分化間葉系細胞に作用し、軟骨内骨化を経て骨組織を誘導する物質は、骨形成因子 (Bone morpho-

genetic protein 以下 BMP と略す) と命名され⁴⁾、多くの研究者の注目を集めてきた。BMP は骨組織以外にもある種の骨肉腫細胞や象牙質にも存在していることが知られており、これら BMP の精製が進んだ結果、骨の BMP は分子量18,500±500の蛋白質⁵⁾、Dunn 骨肉腫の BMP は、分子量22,000の塩基性疎水性蛋白質⁶⁾、象牙質の BMP は分子量27,000の蛋白質である⁷⁾とされている。このような BMP の生化学的な研究をはじめとし、これまで BMP を自家骨に代わりうる移植材料として用いることを目的とした研究^{8,9)}、BMP の周囲への拡散を防いで目的とする部位に留めておくような delivery system としての担体の研究などが行われてきた^{10,11)}。

BMP の活性は異所性の骨形成を観察することによって行われてきたため、骨そのものに対する作用についてはまだ解明されていない点が多い。本研究は脱灰骨基質に比べ強い骨誘導能があるとされる脱灰歯基質¹²⁾より

東北大学歯学部口腔外科学第2講座

(主任: 手島貞一教授)

Second Department of Oral Surgery, Tohoku University School of Dentistry (Chief: Prof. Teiichi Teshima)

受付日: 昭和63年3月10日

BMP の精製を試み、BMP の骨組織に対する反応と BMP の臨床応用を想定した場合のアテロコラーゲンの担体としての有用性について検討することを目的とした。

材 料 と 方 法

1. BMP の精製

1) 脱灰歯基質の調整

ウシ下顎前歯を液体窒素で凍結後、粉碎機（実験用カッティングミル Fritsch 社製）で約 5 mm 以下に粉碎した。以下の処理は特にことわりのないかぎりすべて、4°C で行った。粉碎した歯を蒸留水で洗浄し、歯髓や歯根膜を可及的に除去し、クロロホルム・メタノール（容積比 1:1）で 1 時間脱脂後、0.6N の塩酸で 24 時間スターラーで攪拌しながら脱灰を行った。脱灰液は 8 時間毎に交換した。この脱灰歯を蒸留水で洗浄後、8 M 塩化リチウムで 24 時間処理した。次に蒸留水で十分洗浄し、凍結乾燥し、これを脱灰歯基質とした（図 1）。

また、象牙質に BMP が存在することを証明するため、歯をそのまま脱灰した後、歯頸部で切断し、歯冠部に対して同様の処理を行い、これを脱灰歯冠部基質とした。

2) BMP 画分の抽出

脱灰歯基質をプロテアーゼ阻害剤 1 mM ベンジルスルホニルフルオリドを含む 6 倍量 (vol/wt) の 4 M 塩酸グアニジンでスターラーで攪拌しながら 24 時間抽出を行い、ガーゼ、濾紙 (No. 1 東洋濾紙株式会社製)、ガラスフィルター (GC 90 東洋濾紙株式会社製)、メンブランフィルター (0.45 μ m アドバンテック 東洋株式会社製) の順に減圧濾過し、最後に滅菌フィルターユニット (0.2 μ m Nalge 社製) で滅菌濾過し、濾液を塩酸グアニジン抽出画分 (以下 G-Ext) とした。この G-Ext に 3 倍量の 100% エタノール (-20°C) を加えて 3 時間放置した後、3,000 G で 5 分間遠心し、沈澱物を回収し、これをエタノール不溶性画分 (以下 Et-ppt) とした。また上清を透析チューブ (SPECTRAPOR MW cut off 6,000~8,000 SPECTRUM MEDICAL 社製) を用いて、蒸留水に対して 24 時間透析を行った。透析後 3,000 G で 5 分間遠心し沈澱物を回収し、これをエタノール可溶性画分 (以下 Et-sup) とした。

脱灰歯冠部基質についても同様の処理を行い、そのエタノール不溶性画分を crown-Et-ppt とした。

3) ゲルクロマトグラフィーによる BMP の精製

Et-ppt を 4 M 塩酸グアニジンに溶解し、同じ溶液で平衡化した高性能ゲルクロマトグラフィー カラム Superose 12 (HR 10/30 Pharmacia 社製) により分画した。溶出液は流速を 0.5 ml/min とし、280 nm で吸光度を測定し、0.625 ml ずつ分取した。標準試料蛋白

図 1 脱灰歯基質の調整

図 2 BMP の精製

質として Pharmacia 社製の分子量測定用キット（低分子量領域用）を用いた。分画した各溶出液を 6 つの画分に分け、各画分に対して 3 倍量の 100% エタノール (-20°C) を加えた。5 時間後、それぞれの画分について 3,000 G で 5 分間遠心して沈澱物を回収し、これを精製エタノール不溶性画分 (以下 p-Et-ppt: Fr. I~VI) とした（図 2）。

以上の操作で得られた各画分をそれぞれ脱イオン水で

図 3

- 1. Et-ppt の Superose 12 による分析結果
- 2. crown-Et-ppt の Superose 12 による分析結果

洗浄し、凍結乾燥した。

4) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動
p-Et-ppt について Laemmli¹³⁾ の方法に準じて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ゲルはゲル濃度勾配が10~20%の電気泳動用グラジエントゲル（第一化学薬品株式会社製）を用い、電気泳動用緩衝液は、0.1% SDS/0.025 M Tris-HCl/0.192 M Glycine pH 8.4 を用いた。試料は 0.001% BPB/1% SDS/25% Glycerol/0.0625 M Tris-HCl pH 6.8 中で 100°C で2分間加熱して変性させた。60 mA で1時間20分泳動を行った。ゲルは、電気泳動用銀染色試薬第一（第一化学薬品株式会社製）を用いて銀染色を行った。分子量測定のための標準蛋白質として、Bio-Rad 社製の電気泳動用標準蛋白質（低分子量領域用）を用いた。

2. BMP 活性の検定方法

仔ウシ真皮不溶性コラーゲンをペプシンで可溶化し精製した0.5%酸性アトロコラーゲン溶液（pH 3 高研社製）と各画分を十分混合した。混合した割合は、Et-ppt, crown-Et-ppt, Et-sup 各 15 mg にアトロコラーゲン 2 ml, および p-Et-ppt 0.5 mg と 5 mg にアトロコラーゲン 1.5 ml とした。各画分は酸性アトロコラーゲン溶液と混合した後、ラットに注入するまで4°C で保存した。Et-ppt/アトロコラーゲンは、4°C で完全にゲル化しており、注入直前に40°C に加温し一部ゾル化させてから注入した。コントロールとして、アトロコラーゲン単独（2ml）および Et-ppt 15 mg に生理食塩水 2ml を注入直前に混合したものを用いた。
塩酸ケタミン麻酔下で、4週齢の雄 Wistar 系ラットの大腿骨に近接した筋肉内に、24ゲージの注射針を用いて各画分を注入した。また Et-ppt/アトロコラーゲンは

表 1 精製エタノール不溶性画分

p-Et-ppt	各画分が溶出される時間	骨誘導能の有無
Fraction. I	12.5~15分	—
Fraction. II	15~17.5分	—
Fraction. III	17.5~22.5分	—
Fraction. IV	22.5~25分	—
Fraction. V	25~27.5分	+
Fraction. VI	27.5~30分	—

試料（Et-ppt）を注入してから上記の時間に溶出される溶出液を集めて6つの画分に分けた。

ラット頭頂部骨膜下にも注入した。注入2週後に屠殺し、大腿部と頭頂部をそれぞれ一塊として摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、Plank・Rychlo 法¹⁴⁾で脱灰した。大腿部は大腿骨骨幹中央部で横断面が出るように、頭頂部は頭頂骨前額断面が出るように標本を調整した。標本を通法どおりパラフィンに包埋し、4μm の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびトルイジンブルー染色を施し、組織学的に観察した。

結 果

1. BMP の精製

1) BMP 画分の抽出

ウシ下顎前歯を0.6N 塩酸で脱灰し、8M塩化リチウムで処理し、凍結乾燥することにより、約8% (dry wt/wet wt) の脱灰歯質を得た。この脱灰歯質を4M塩

図4 活性の認められた Fr. V の
Superose 12 による分析結果

写真1 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像

1. 分子量マーカー
2. Fr. V

1. Rabbit muscle phosphorylase b 97,400
2. Bovine serum albumin 66,200
3. Hen egg white ovalbumin 42,699
4. Bovine carbonic anhydrase 31,000
5. Soybean trypsin inhibitor 21,500
6. Hen egg white lysozyme 14,400

図5 BMP の分子量の推定

検量曲線は写真1の電気泳動の結果をもとに作成した。

酸グアニジンで24時間抽出し、その抽出画分(G-Ext)に100%エタノールを加えてエタノール不溶性画分(Et-ppt)とエタノール可溶性画分(Et-sup)に分離した。Et-pptは、脱灰歯基質の約1.7% (dry wt/wt)であった。

2) BMP の精製

Et-ppt, crown-Et-pptについて Superose 12 を用いてゲルクロマトグラフィーを行い、図3~1, 2に示すようにほとんど同じ溶出パターンを得た。表2で示すように骨誘導は Et-sup には認められず Et-ppt にその活性が認められたので Et-ppt について更に精製を進めた。Et-ppt を表1のように Superose 12 を用いて6つの画分に分けた。6つの画分のうち分子量25,000以上の画分(Fr. I~IV)はエタノールを加えるとただちに沈澱物を生じたのに対して、分子量25,000以下の画分(Fr. V, VI)は3時間経過してもわずかな沈澱物しか生じなかった。図4は、骨誘導が認められた画分(Fr. V)を、Superose 12を用いて Et-ppt と同じ条件で分析した結果を示したものである。分子量13,700~25,000の間にピークを持つ溶出パターンが得られた。また、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動では、分子量27,000付近に濃染した一本のバンドと淡染した数本のバンドが認められた(写真1, 図5)。

表 2 各画分の活性検定の結果

注入した試料	注入した試料の量	注入した部位	軟骨・骨の形成の有無
アテロコラーゲン	2 ml	大腿部筋肉内	—
Et-sup/アテロコラーゲン	15 mg/2 ml	大腿部筋肉内	—
Et-ppt/生理食塩水	15 mg/2 ml	大腿部筋肉内	+
Et-ppt/アテロコラーゲン	15 mg/2 ml	大腿部筋肉内	+
Et-ppt/アロコラーゲン	15 mg/2 ml	頭頂部骨膜下	+
crown-Et-ppt/アテロコラーゲン	15 mg/2 ml	大腿部筋肉内	+
Fraction. V/アテロコラーゲン	5 mg/1.5 ml	大腿部筋肉内	+
Fraction. V/アテロコラーゲン	0.5 mg/1.5 ml	大腿部筋肉内	+

* アテロコラーゲンはすべて 0.5% 酸性アテロコラーゲン溶液を用いている。

写真 2 アテロコラーゲン注入群 10倍 H-E 染色

写真 4 Et-ppt/アテロコラーゲン注入群 10倍 H-E 染色

写真 3 Et-ppt/生理食塩水注入群 13倍 H-E 染色

写真 5 Et-ppt/アテロコラーゲン注入群 100 倍 H-E 染色

2. 活性検定

各画分の活性検定の結果は、表 2 に示した。またその組織所見は、以下の通りであった。

1) アテロコラーゲン単独注入群

2 週ではほぼ完全にアテロコラーゲンは吸収されている、正常な大腿部の組織像と同じであった（写真 2）。

2) Et-sup/アテロコラーゲン注入群

筋組織内に軽度の異物反応と線維芽細胞の増殖が認められた。

3) Et-ppt/生理食塩水注入群

筋組織内にわずかな軟骨・骨の形成が認められた（写

写真 6 Et-ppt/アテロコラーゲン注
入群 28倍 H-E 染色

写真 9 p-Et-ppt (Fr. V 5 mg)/アテロコラーゲン
注入群 10倍 H-E 染色

写真 7 p-Et-ppt (Fr. V 5 mg)/アテロコラーゲン
注入群 10倍 H-E 染色

写真 10 p-Et-ppt (Fr. V 5 mg)/アテロコラーゲン
注入群 100倍 H-E 染色

写真 8 p-Et-ppt (Fr. V 5 mg)/アテロコラーゲン
注入群 50倍 トリイジンプルー染色

写真 11 p-Et-ppt (Fr. V 0.5 mg)/アテロコラーゲ
ン注入群 26倍 H-E 染色

F: 大腿骨 T: 頭頂骨 M: 筋肉 N, 矢印:
誘導された軟骨・骨

真3)。

4) Et-ppt/アテロコラーゲン注入群

筋組織内および注入側の大腿骨に活発な軟骨・骨の形成が認められ、誘導された骨の骨膜は大腿骨の骨膜と連続していた(写真4)。誘導された骨芽細胞は上皮細胞様に配列し、細胞質は好塩基性で活発に骨基質を形成している像を呈していた(写真5)。Et-ppt/アテロコラーゲンを骨膜下に注入した群では、頭頂骨と骨膜の間に吸収されていないEt-ppt/アテロコラーゲンが存在し、その周囲に硝子軟骨が誘導されていた。硝子軟骨と骨膜の間に骨形成が認められたが頭頂骨には特に変化は認められなかった(写真6)。

5) crown-Et-ppt/アテロコラーゲン注入群

Et-ppt/アテロコラーゲン注入群と全く同様の組織像を示しており、Et-pptとcrown-Et-pptとの間には骨誘導能の差は認められなかった。

6) p-Et-ppt/アテロコラーゲン注入群

p-Et-ppt (Fr. V) を5mg注入したラットでは、大腿骨骨幹部に接して骨幹部の断面積よりも大きい硝子軟骨が誘導されており(写真7)、その周囲には軟骨内骨化が認められた(写真8)。誘導された骨の骨膜は、大腿骨の骨膜と連続していたが、反対側骨膜には特に変化は認められなかった。写真9は、筋組織内に誘導された骨組織を示している。大腿骨に近い部分に一部軟骨が認められたが大部分は骨髄様組織を伴った骨組織であった。誘導された骨は多数の破骨細胞により吸収されており、骨改造が盛んなことを示していた(写真10)。同画分を0.5mg注入した場合、筋組織内に軟骨・骨の誘導は認められたものの5mg注入した場合に比べてその量は少なかった(写真11)。Fr. V以外の画分では、筋組織内に肉芽様の結合組織が認められるのみで、軟骨・骨の形成は全く認められなかった。

考 察

1. BMP の精製

BMPを精製するにあたって、BMPを可溶化することが大きな研究課題とされていたが、高岡¹⁵⁾や花村¹⁶⁾らによって4M塩酸グアニジンを用いたBMPの抽出法が報告され、その精製に関する研究が進んだ。本実験においても4M塩酸グアニジンを用いて脱灰歯質からBMPを抽出し、この抽出液に3倍量のエタノールを加えることでBMP画分を沈澱物Et-pptとして回収した。Et-supには活性が認められなかったことから、BMPはすべてEt-pptとして回収することができたと考えられる。この方法は、高岡ら¹⁵⁾がDunn骨肉腫のBMPの精製に用いた方法であるが、骨肉腫ではBMP活性は沈澱物ではなく、その上清にあった。また大山¹⁷⁾、鳴原¹⁸⁾は、同方法を脱灰骨に用い、活性画分は骨肉腫同様

上清にあることを報告している。

精製を進めたBMP (Fr. V) は、エタノールを加えて3時間経過しても少量の沈澱物を生じただけであったが、25,000以上の画分 (Fr. I~IV) ではエタノールを加えるとただちに沈澱物が生じた。したがってエタノール分画法でBMP画分をEt-pptとして効率よく回収できたのは、BMPより大きい分子量を持つ蛋白質が沈澱する過程でBMPが共沈したためではないかと考えられる。

今回の実験に用いたSuperose 12は本来分析用であり、試料添加量が5~10mg/カラムと少量である。分取用には、Superose 12と同じ分離パターンを得ることができるSuperose 12 prep gradeがあるが、十分な分離度が得られなかったため、試料の添加回数は多くなるがSuperose 12を用いた。活性の認められたFr. VをSuperose 12を用いて分析した結果、分子量13,700~25,000の間にピークを持つ溶出パターンが得られ、またSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動では、分子量27,000付近にバンドが認められた。このことより歯のBMPの分子量は、約27,000と推定されたが、この値は米良らの報告⁷⁾と一致している。しかし分離は十分とはいえずさらに精製を進め検討しなければならないと考えられる。

2. 象牙質由来の BMP

Bangら¹⁹⁾は、脱灰象牙質基質を眼や筋に移植すると骨が誘導されるが、象牙質形成前の脱灰した歯胚を移植しても骨誘導が認められないことから、象牙質の細胞成分ではなく基質に骨を誘導する物質が存在しているのではないかと述べている。今回調整した脱灰歯冠部基質は、象牙質のみでエナメル質やセメント質をほとんど含んでいない。これから抽出したcrown-Et-pptに骨誘導能が認められたことから、象牙質にBMPが存在していることが直接証明されたと考えられる。精製に用いた脱灰歯基質には象牙質の他にセメント質が含まれている。しかしEt-pptをSuperose 12で分析した結果、crown-Et-pptと全く同じ溶出パターンが得られたので、セメント質の影響はほとんどないものと考え分離しないで精製を進めた。

象牙質のBMPの分子量は、骨のBMPの分子量より約9,000大きいことから象牙質が形成される過程で周囲の骨のBMPを取り込んだのではなく、象牙芽細胞がBMPを分泌している可能性があると考えられる。しかし象牙質のBMPが生体内でどのような役割を果たしているかについてはこれまで報告がなく現在のところ明らかでない。

3. BMP の担体としてのアテロコラーゲン

精製したBMPを単独で移植しても周囲組織に拡散し、予想したほどの骨を誘導することが出来なかった^{5,10)}。このことはBMPを局所に留めておくなんらかの担体が

必要であることを示していると考えられる。また BMP の臨床応用を考慮すれば、その適応は骨欠損が大きい場合であり、これを BMP 単独で補填しようとする、大量の BMP が必要となり、実用的ではない^{8,9)}。Urist¹⁰⁾ は、 β -tricalcium phosphate との混合移植実験を行い、中原¹¹⁾ は、ハイドロキシアパタイトおよびアテロコラーゲンなどの混合移植を試みている。

今回の実験では BMP の担体の役割を果たし、BMP を筋肉内に注入する材料として細胞培養用に市販されている酸性アテロコラーゲン溶液を用いた。コラーゲンの主な抗原決定部位は、コラーゲン分子の両端に位置するテロペプチドであることがわかっている。この部位は、本体と異なり螺旋構造を形成しておらずペプシンで消化切断され、螺旋構造の部分だけを取り出すことができる²⁰⁾。こうして得られたアテロコラーゲンは、後述するコラーゲンの性質を保ちながら抗原性は著しく低い。ため、生体材料としてはコラーゲンを用いるより有利である。Et-ppt を生理食塩水あるいはアテロコラーゲンに混合した場合、明らかに後者において活発な骨誘導が観察されたことから、アテロコラーゲンは担体として有効に機能していると考えられる。

Sampath²¹⁾ は、同種骨基質を 4M 塩酸グアニジンで抽出した残渣と BMP を再構成し移植すると、骨誘導能が回復し、一方骨と同じ I 型コラーゲンである腱と BMP を再構成して移植しても骨誘導が観察されなかったことから、骨基質の立体構造が細胞の基質依存の増殖や分化に適した環境を作り出していると述べている。本実験で用いたアテロコラーゲンは、真皮から調整しており、また立体構造もコラーゲンとは異なるが、BMP 画分との混合により活発な骨誘導が認められ、必ずしも骨基質を用いなくても BMP の活性を効率よく発現することができると思われる。またコラーゲンは、細胞を呼び込む作用があり、細胞増殖の足場として優れており、*in vitro* の実験では細胞の分化にも関係していると考えられている。このようにコラーゲンには、細胞との相互作用という他の合成材料にはみられない性質がある²²⁻²⁴⁾。本実験においても BMP の保持や徐放の他にも、このような性質が骨誘導においてなんらかの役割を果たしているのではないかと推察され、骨誘導を効率よく発現するという点では他の生体材料より優れていると考えられる。なお *in vitro* では、酸性アテロコラーゲン溶液は 37°C に加温すると変性し螺旋構造がほどけてしまいゼラチン化する。一方酸性アテロコラーゲンを pH やイオン強度を生理的条件下に調節して 37°C に加温すると繊維を形成してゲル化するとされている^{23,24)}。生体内に注入された酸性アテロコラーゲンがどのような構造をとっているかについては明らかでない。

4. BMP の骨組織に対する作用

従来 BMP の活性検定は、異所性骨形成によって行わ

れてきたが、本来 BMP は骨に存在し骨に作用する因子である。骨欠損を作り、BMP を移植すると速やかに骨の再生が生じることから、骨膜や骨髓に BMP に反応する細胞が含まれているとする報告がある^{9,10,25)}。また当教室はこれまで一連の骨移植実験において、ラット頭頂骨骨膜下に脱灰骨やウシ骨由来 BMP を移植してきた^{17,18,26)}。これらの実験は、いずれも骨組織に侵襲を加えており、またハイドロキシアパタイトのような BMP 活性を有しない材料でも骨伝導で骨を形成する²⁷⁾ため、厳密に BMP の骨組織に対する反応を見るという点では、必ずしも適切とはいえない。本実験では、前に述べたように酸性アテロコラーゲン溶液に BMP 画分を混合して大腿骨に近接した筋肉内に注入した。この方法は、骨膜に対して機械的障害を与えることが少なく、また非観血的であるため感染の可能性も少なく、確実に注入すれば目的とする部位での骨誘導を観察することができ、BMP の生物学的性質を調べる方法として優れていると考えられる。

中原²⁸⁾ は Dunn 骨肉腫由来 BMP をマウスの背部筋膜下に移植し、拡散した BMP が肋骨に作用して骨膜性骨形成が起こると報告している。骨膜における BMP の target cell を同定するためには、骨膜の細胞を分離して各細胞群に BMP を作用させて活性検定を行わなければならないと考えられる。しかし現在骨膜の細胞を確実に分離することは困難であり、BMP の target cell は主に *in vivo* の実験結果より推察されている^{9,10)}。

本実験では、BMP/アテロコラーゲン注入側の大腿骨に接して軟骨内骨化が認められた。一方反対側の骨芽細胞は、単層扁平細胞様に配列しており、休止期の不活発な骨芽細胞であった。本来長管骨骨幹の径の成長は、骨膜下の膜性骨化によるため軟骨は関与していない。また、頭頂骨骨膜下に Et-ppt/アテロコラーゲンを注入した群では、骨膜に沿って軟骨内骨化が認められたが、頭頂骨にはほとんど反応が認められなかった。以上のことから、大腿骨に接して誘導された軟骨・骨は、BMP が骨膜に直接作用して誘導されたものと考えられ、骨膜に歯由来 BMP の target cell が存在していると推察された。しかし今回の実験ではこの細胞を同定することはできなかった。骨膜に生じた軟骨内骨化は、骨折において仮骨の中の軟骨が軟骨内骨化で骨になる過程と類似しており、骨折の治癒に BMP が関与している可能性を示唆する。このように骨膜は膜内骨化により骨を形成すると同時に、軟骨内骨化で骨を形成する能力も有している。しかし骨折以外で骨膜の軟骨内骨化がどのような役割を果たしているかは、骨膜における未分化間葉系細胞から骨芽細胞にいたる分化の過程とあわせて今後の研究課題である。

結 論

1. ウシ脱灰歯基質の 4 M 塩酸グアニジン抽出画分にエタノールを加えることで BMP 画分を析出させることができ、ウシ象牙質に BMP 活性があることが証明された。

2. ウシ脱灰歯の BMP を部分精製した結果、分子量約 27,000 の蛋白質であった。

3. BMP の作用で骨膜に軟骨内骨化が生じた。このことから骨膜に BMP の target cell が存在していることが推察された。

4. アテロコラーゲンは BMP の活性を効率よく発現させ、担体として有用であると考えられた。

本論文の一部は、第 41 回日本口腔科学会総会 (1987 年 4 月 東京)、第 32 回日本口腔外科学会総会 (1987 年 11 月 東京) において発表した。

稿を終えるにあたり、終始懇篤なるご指導とご校閲を賜った手島貞一教授に深甚なる感謝の意を表します。

併せて、論文校閲の労をとられた本学口腔解剖学第二講座加賀山学教授に感謝するとともに、本研究の推進に際して、ご助言、ご協力をいただいた越後成志先生、幸地省子先生、山口泰先生、松田耕策先生、安藤良晴先生、鴨原隆先生、ならびに教室員の諸兄に深く感謝の意を表します。

引 用 文 献

- 1) Seyedin, S.M., Thomas, T.C., et al.: Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2267-2271 1985.
- 2) Farley, J.R. and Baylink, D.J.: Purification of a skeletal growth factor from human bone. *Biochemistry* 21: 3502-3507 1982.
- 3) Kato, Y., Nomura, Y., et al.: Cartilage-derived factor (CDF) I. Stimulation of proteoglycan synthesis in rat and rabbit costal chondrocytes in culture. *Exp Cell Res* 130: 73-81 1980.
- 4) Urist, M.R. and Strates, B.S.: Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50: 1392-1406 1971.
- 5) Urist, M.R., Huo, Y.K., et al.: Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 371-375 1984.
- 6) Takaoka, K., Yoshikawa, H., et al.: Purification of a bone-inducing substance (osteogenic factor) from a murine osteosarcoma. *Biomed Res* 2: 466-471 1981.
- 7) 米良和彦, 水谷英樹, 他: 骨形成因子に関する

研究—ウシ脱灰歯牙基質からの精製—(抄). *日口科誌* 36: 1098 1987.

- 8) Sato, K. and Urist, M.R.: Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin. Orthop.* 197: 301-311 1985.
- 9) Nilsson, O.S., Urist, M.R., et al.: Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *J Bone Joint Surg* 68-B: 635-642 1986.
- 10) Urist, M.R., Lietze, A., et al.: β -tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop.* 187: 277-280 1984.
- 11) 中原治彦, 高岡邦夫: 骨形成因子の臨床応用の可能性. *形成外科* 6: 535-542 1987.
- 12) Conover, M.A. and Urist, M.R.: Transmembrane bone morphogenesis by implants of dentine matrix. *J Dent Res* 58: 1911 1979.
- 13) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature* 227: 680-685 1970.
- 14) Plank, J. und Rychlo, A.: Eine Schnellentkalkungsmethode. *Zentralbl. f. Path. Anat.* 89: 252-254 1952.
- 15) Takaoka, K., Ono, K. et al.: Solubilization and concentration of a bone-inducing substance from a murine osteosarcoma. *Clin. Orthop.* 148: 274-280 1980.
- 16) Hanamura, H., Higuchi, Y., et al.: Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix. *Clin. Orthop.* 148: 281-290 1980.
- 17) 大山 治: 牛脱灰骨由来骨形成因子に関する実験的研究. *東北犬歯誌* 4: 123-134 1985.
- 18) 鴨原 隆: 牛骨由来骨形成因子に関する実験的研究. *東北犬歯誌* 5: 75-86 1986.
- 19) Bang, G. and Urist, M.R.: Bone induction in excavation chambers in matrix of decalcified dentine. *Arch Surg* 94: 781-789 1967.
- 20) 永井 裕, 藤本大三郎, 他: コラーゲン代謝と疾患. 第 1 版, 講談社, 東京, 1982, 134-154 頁.
- 21) Sampath, T.K. and Reddi, A.H.: Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7599-7603 1981.
- 22) 宮田暉夫: コラーゲンと血小板の相互作用. *化学の領域増刊* 135: 31-41 1982.
- 23) 宮田暉夫: バイオテクノロジーへの繊維材料の応用. *繊維と工業* 39: 427-435 1983.
- 24) 宮田暉夫: バイオマテリアルとしてのコラーゲ

- ン膜. 膜 10: 268-278 1985.
- 25) Takagi, K. and Urist, M.R.: The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defect. Clin. Orthop. 171: 224-231 1982.
- 26) 安藤良晴: 脱灰骨の Onlay Graft に関する実験的研究. 東北大歯誌 1: 91-104 1983.
- 27) 高木幸人: 合成ハイドロキシアパタイトの骨膜下 Only Graft に関する基礎的研究. 東北大歯誌 4: 135-151 1985.
- 28) 中原治彦, 津田隆之, 他: 骨形成因子の骨膜に対する作用 (抄). 日骨代謝誌 5: 70 1987.
-