アテロコラーゲンスポンジ (TERUPLUG®) を担体とする遺伝子組み換え
ヒト骨形成因子の骨誘導に関する実験的研究
—— アテロペプチドコラーゲン (Cellmatrix LA®) を担体とした場合との比較 ——

海原真治・別所和久・藤村和磨*・大久保康則
園部純也・楠本健司**・飯塚忠彦

Experimental study of bone inducing ability of recombinant
human bone morphogenetic protein- 2 with atelo-collagen
sponge (TERUPLUG®) as a carrier
—— Comparison with atelo-peptide collagen (Cellmatrix LA®) as a carrier ——

KAIHARA Shinji・BESSHO Kazuhisa・FUJIMURA Kazuma*
OKUBO Yasunori・SONOBE Junya
KUSUMOTO Kenji**・IIZUKA Tadahiko

Abstract: We evaluated the usefulness of atelo-collagen sponge (ACS) (TERUPLUG®, TERMO CORPORATION, Tokyo) as a carrier for Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 (ErhBMP-2) as compared with that of atelo-peptide collagen (CL) (Cellmatrix LA, Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan), which we previously demonstrated to be useful for bone induction. Five micrograms of ErhBMP-2 with either 3 mg of ACS (ACS group) or 3 mg of CL (CL group) was implanted into the calf muscle of 13 10-week-old Wistar rats. The implanted material was sampled on days 7, 14, and 21 after implantation (5 specimens each per time, group). Radiographic evaluation, histological analysis, and biochemical examinations were performed. On radiographic evaluation, no opaque shadows were observed 7 days after implantation in either group. Oval shadows were observed 14 days after implantation. Twenty-one days after implantation, the area of the shadows had increased. On histological analysis, much new cartilage was observed 7 days after implantation in both groups, but immature endochondral ossification was observed in only the ACS group. Endochondral ossification was found on the outermost edge of the implant after 14 days in both groups. After 21 days, mature bone had formed. On biochemical examinations on days 7 to 14 after implantation, alkaline phosphatase (ALP) activity and the calcium (Ca) content had increased markedly in both groups. On days 14 to 21 after implantation, ALP activity and Ca content increased gradually. These findings were similar in both groups.

Our results suggest that, similar to CL, ACS is useful as a carrier for ErhBMP-2 designed to promote new bone formation.

Key words: bone morphogenetic protein (骨形成因子), bone induction (骨誘導), carrier (担体), atelo-collagen sponge (アテロコラーゲンスポンジ)

京都大学大学院医学研究科感覚運動系病態学講座口腔機能病態学領域 (口腔外科学)
(主任: 飯塚忠彦教授)

*金沢医科大学口腔科学講座
(主任: 瀬上夏樹教授)

**関西医科大学医学部形成外科学講座
(主任: 小川 豊教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Graduate School of Medicine, Kyoto University

(Chief: Prof. IIZUKA Tadahiko)

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Kanazawa Medical University (Chief: Prof.
SEGAMI Natsuki)

**Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
Kansai Medical University (Chief: Prof. OGAWA
Yutaka)

受付日: 2002年5月27日

採択日: 2003年1月24日

結 言

骨誘導能をもつ生体材料の開発にあたり、骨形成因子 (bone morphogenetic protein: 以下 BMP と略) の応用が期待され、多くの施設で研究がなされている。高精製 BMP や遺伝子組み換えヒト BMP-2 (rhBMP-2) については生体内に埋入後すぐに周囲組織に拡散してしまい骨誘導能が発揮できないため、徐放系として働く担体が必要である^{1, 2)}。しかし、現在研究に使用されている担体は、未だ臨床使用に対し厚生労働省より認可されていないものが多いのも事実である。そこで今回われわれは、抜歯窩用として厚生労働省より製造承認を得、すでに臨床で使用されているアテロコラーゲンスポンジ (atelo collagen sponge: 以下 ACS と略) (テルプラグ®; テルモ (株), 東京) の担体としての有用性を、以前よりわれわれが使用し、良好な結果を得ているアテロペプチドコラーゲン (atelo-peptide collagen: 以下 CL と略) (pH3.0, 3 mg/ml: Cellmatrix LA®; 新田ゼラチン, 大阪)³⁾と比較することにより経時的に検討したので報告する。

材料および方法

実験動物

10週齢、雄性、Wistar 系ラット (体重: 230-260g) 30匹を用いた。

埋入材料

本実験に使用した大腸菌由来 rhBMP-2 (ErhBMP-2) は、rhBMP-2 の変種である。これが、チャイニーズハムスター卵巣細胞由来などの本来の rhBMP-2 と変わらない十分な骨誘導活性をもっていることはわれわれの以前の動物実験から証明されている^{4, 5)}。

一方 ACS は、線維化アテロコラーゲンと熱変性アテロコラーゲンを 9 : 1 の割合で混合し、凍結乾燥処理によりスポンジ状に成形し、さらに熱脱水架橋されたものである。この線維化アテロコラーゲンは、牛真皮よりペプシン処理することにより得られたアテロコラーゲン (高研, 東京) を酸性溶液 (pH3.0) にて溶解させ、37℃で中和処置を行ったもので、熱変性アテロコラーゲンはアテロコラーゲン溶液を 60℃, 30分間熱処理して得られたものである⁶⁾ (表 1)。

ErhBMP-25 μ g を、ACS 3 mg と混和し凍結乾燥後、直径 4.0mm、厚さ 1.5mm の円板状のペレットとした。

また対照群の担体として CL を使用した。ACS と同様に ErhBMP-2 5 μ g を、CL 3 mg と混和し凍結乾燥後、直径 4.0mm、厚さ 1.5mm の円板状のペレットにした (表 1)。

なお、ErhBMP-2 は、濃度依存性に ALP 活性、Ca 濃度が上昇することは、著者らがすでに報告しているため⁷⁾、

表 1 ACS および CL の成分比較

	CL	ACS
由来動物	豚	子牛
部 位	皮 膚	皮 膚
形 状	アテロコラーゲン溶液 (pH3.0, 3 mg/ml) を凍結乾燥後使用	線維化コラーゲン + 熱変性コラーゲン (9 : 1) のスポンジ
架橋処理	未 架 橋	熱脱水架橋

単一濃度で評価を行った。

術式および評価方法

ラットにペントバルビタール (5 mg/100g) を腹腔内投与後、下腿部腓腹筋内に調製した前記のペレットを埋入した。

[X 線学的観察方法]

埋入 7, 14, 21 日後に各群 5 匹ずつペントバルビタールの過剰投与により屠殺を行った。下腿部腓腹筋を摘出し、触知できる結節を周囲組織を含め摘出し、摘出標本を軟 X 線撮影 (SRO-M50; Sofron Inc. 東京) した。撮影後標本を 2 分割し、一方を組織標本に、もう一方を生化学的分析に使用した。

[組織学的観察方法]

10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、14 日後、21 日後のものは、EDTA にて脱灰し、パラフィン包埋を行った。ミクロトームを用い 4 μ m の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、組織学的観察を行った。

[生化学的分析方法]

触知できる結節を周囲の組織から摘出、質量を計測し、0.25M 蔗糖 5 ml 内でホモジナイズ (Bio-Mixer, type ABM; 日本精機, 東京) した。1250 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、その上清中のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性、総蛋白 (TP) 量を 4-nitro-phenylphosphate 法⁸⁾ にて測定した。さらに、沈澱物を 0.5N 塩酸 5 ml で 16 時間 20℃ にて脱灰した後、1250 $\times$ g で 10 分間遠心分離し上清中のカルシウム (Ca) 含有量を Orthocresolphthalein complexone 法⁹⁾ にて測定した。

ALP 活性 (IU/mg) と Ca 濃度 (μ g/mg) を骨形成の定量的な指標とした。

[統計学的分析方法]

生化学的分析の結果は標準偏差にて評価した。ALP 活性と Ca 濃度の 2 群間の統計学的差異は student's t 検定にて行った。

写真1 埋入7, 14, 21日後の軟X線写真
2群とも14日後以降にX線不透過像を認める。(左: CL群, 右: ACS群)

写真2 埋入7日後
2群とも軟骨形成を認める。ACS群には新生骨も認める。(M: 筋肉, C: コラーゲン, NC: 軟骨, NB: 新生骨)
(H-E染色, $\times 50$ 左: CL群, 右: ACS群)

結 果

〔軟X線学的所見〕

7日後では2群とも不透過像は認めなかったが、14日後では2群とも楕円形的不透過像を認めた。21日後では14日後に比べて2群ともより不透過度が高い不透過像を認めた(写真1)。

〔組織学的所見〕

7日後で、ACS群、CL群ともに埋入物周囲に軟骨の形成を認め、ACS群では軟骨内骨化の過程を思わせる所見とともに幼若な骨形成を認めた(写真2)。14日後では、ACS群、CL群ともに埋入物周囲に骨形成がみられた(写真3)。21日後では、ACS群、CL群ともに中心部まで骨髄組織を伴う成熟した骨が形成されていた(写真4)。

〔生化学的分析結果〕

ALP活性の経時的変化は、ACS群、CL群ともに埋入7日後より14日後まで急激に上昇し、21日後までは緩徐に上昇した(図1)。2群間に有意差はなかった。Ca濃度は、ACS群、CL群ともに埋入7日後までは上昇せず、埋入14日後で急激に上昇し、21日後までは緩徐に上昇する傾向を示した(図2)。2群に有意差はなかった。

また、高精製BMPもしくはrhBMPは、徐放性をもつ担体を使用しなければ生体内で骨形成を生じないことはすでに報告している¹⁾。さらに、コラーゲンのみを埋入したものでも特記すべき所見が得られないことも報告しており²⁾、ACSおよびCLのみを埋入したものの比較検討も特記すべき所見が得られないため、今回の検討から除外した。

写真3 埋入14日後

2群とも周囲には成熟した骨形成がみられる。(M: 筋肉, C: コラーゲン, NC: 軟骨, NB: 新生骨, BM: 骨髄)
(H-E 染色, $\times 50$ 左: CL 群, 右: ACS 群)

写真4 埋入21日後

2群とも中心部まで成熟した骨が形成されている。(M: 筋肉, NB: 新生骨, BM: 骨髄)
(H-E 染色, $\times 50$ 左: CL 群, 右: ACS 群)

図1 ALP 活性の変化 (○: CL 群, △: ACS 群)

図2 Ca 濃度の変化 (○: CL 群, △: ACS 群)

考 察

ACS は従来、抜歯窩に対する止血、治癒促進などに応用されている生体材料である。その生体親和性と、生体内安定性については、テルダーミス® (テルモ (株), 東京) のコラーゲン層として、多くの報告がなされている^{10, 11)}。そこで本研究では ACS のこのような特質に着目し、BMP の担体としての有用性について検討した。

ACS の構造的な特徴は、線維化アテロコラーゲンと熱変性アテロコラーゲンの複合体であることと、熱脱水架橋されていることである。

熱変性したコラーゲンを添加すると細胞親和性が著しく向上し¹²⁾、熱脱水架橋することにより生体親和性を低下させずに生体内残存性をもたせることができる¹³⁾ことはすでに報告されている。これらのことにより、細胞浸潤、軟骨形成、骨形成が早期に深部まで起こることが示唆される。本研究でも組織学的に CL 群では 7 日後には軟骨細胞しか認めないが、ACS 群では、軟骨細胞とともに軟骨内骨化の過程を思わせる所見が認められ、すでに幼若な骨形成が認められた。この結果は、熱変性コラーゲンを加えたことに起因する細胞浸潤、生体親和性の向上によるものと考えられる。また、CL は架橋処理が施されていないが、ACS は熱脱水架橋が施されているため骨形成の初期においては組織内で安定した線維構造を保持し骨形成においてより適切な環境を提供されたためと考えられる¹¹⁾。14 日後には ACS 周囲に骨形成が起こり、埋入 21 日後には、骨髓組織を含む成熟した誘導骨が確認された。14 日後以降の所見は 2 群に特記すべき差は認められなかった。X 線所見、生化学所見も 2 群間に差はなかった。これらの結果は ACS が CL と同様に BMP の担体として適切に応用できることを示唆している。

近い将来 rhBMP-2 の臨床応用が開始されと考えられているが、臨床応用に際してその担体の選択はきわめて重要である。ACS は本邦で、厚生省の認可を得てすでに臨床応用され、その安全性も証明されているため、rhBMP-2 担体の有力な選択肢の 1 つとして考慮されるべきであると考えられる。

結 語

今回 ACS を担体として 5 μ g ErhBMP-2 を成熟ラット下腿腓腹筋内に埋入し、その骨誘導に関して経時的に X 線学的、組織学的、生化学的分析を加え検討した。

ACS は ErhBMP-2 の担体として有用であることが証明された。

引 用 文 献

- 1) Bessho, K. and Iizuka, T.: Activity and solubility of bone morphogenetic protein derived from porcine bone matrix. *Br J Oral Maxillofac Surg* 32: 86-90 1994.
- 2) Fujimura, K., Bessho, K., et al.: Experimental studies on bone inducing activity of atelopeptide type I collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 316-322 1995.
- 3) Yoshida, K., Bessho, K., et al.: Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. *J Cranio Maxillofac Surg* 26: 112-115 1998.
- 4) Bessho, K., Konishi, Y., et al.: Bone induction by Escherichia coliderived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cellderived recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38: 645-649 2000.
- 5) Ruppert, R., Hoffmann, E., et al.: Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem* 237: 295-302 1996.
- 6) 小西 淳, 後藤明久, 他: 自己組織を再構築させる新タイプのコラーゲン材料. *人工臓器* 18: 151-154 1989.
- 7) Bessho, K., Kusumoto, K., et al.: Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37: 2-5 1999.
- 8) 日本臨床化学会分析部会酵素部会: 血清アルカリホスファターゼ活性測定に対する標準的測定法: 第 7 回臨床化学分析部会資料 Draft 1, Step 2, p11-19 1988.
- 9) Connetry H.V. and Briggs A.R.: Determination of serum by means of orthocresolphthalein complexone. *Am J Clin Pathol* 45: 290-296 1966.
- 10) 白井泰彦, 別所和久, 他: 下顎口腔前庭拡張における二層性真皮欠損用グラフト (テルプラダーミス®) の有用性. *口外誌* 41: 896-898 1995.
- 11) 上田 実, 大久保 肇, 他: スポンジ状アテロコラーゲンの骨欠損治療に及ぼす影響. *口科誌* 43: 363-368 1994.
- 12) Yoshizato, K., Taira, T., et al.: Growth inhibition of human fibroblasts by reconstituted collagen fibrils. *Biomed Res* 6: 61-71 1985.
- 13) Mcpherson J.M., Ledger P.W., et al.: The preparation and physicochemical characterization of an injectable form of reconstituted glutaraldehyde cross-linked bovine corium collagen. *J Biomed Mater Res* 20: 79-92 1986.