原	著
---	---

骨誘導タンパク質 (BMP) 含有ポリマーカプセルの 性状と骨誘導能に関する研究

磯 部 昌 継

東京医科歯科大学大学院生体機能制御歯科学系顎顔面外科学講座 (指導: 天竺光雄教授)

東京医科歯科大学医用器材研究所有機材料部門 (指導: 中林宣男教授)

(1995 年 9 月 28 日 受付)

Characteristics and Osteoinductive Activity of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Encapsulated with Poly (DL-lactide-co-glycolide)

Masatsugu Isobe

Department of Maxillofacial Surgery, Division of Life Science of Maxillofacial Systems,
Graduate School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Director : Prof. Teruo Amagasa)

Division of Organic Materials, Institute for Medical and Dental Engineering,
Tokyo Medical and Dental University

(Director : Prof. Nobuo Nakabayashi)

To develop a controlled release system for bone morphogenetic protein (BMP), encapsulation of BMP with poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA)/poly (ethyleneglycol) (PEG) mixture was accomplished by an emulsion interfacial precipitation method. The surface morphology, average particle size and hydrolytic degradation rate of two types (PLGA and PLGA/PEG) of capsules were examined. The encapsulation yield and release rate of BMP *in vitro* were measured using fluorescein isothiocyanate-labeled BMP. The amount of BMP released from the PLGA and PLGA/PEG capsules increased between day 3 and day 5. The PLGA capsules released much BMP in this period compared to the PLGA/PEG capsules. These capsules containing BMP were implanted in subcutaneous areas of rats to examine the osteoinductive activity *in vivo*. They were digested completely, however, only the PLGA capsules containing BMP could induce new bone formation, including bone marrow, three weeks after implantation. From these results, it was considered that the PLGA capsules containing BMP are a prominent system to induce bone in clinics.

I. 緒 言

骨誘導タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein : BMP) は, 異所性骨形成能を有する生理活性物質であることが Urist により 1965 年報告さ

れ¹⁾, 最近まで牛骨より抽出・精製が行われ研究に利用されてきた^{2~4)}。1988 年以後, BMP をコードする遺伝子が次々とクローニングされ^{5~8)}, 遺伝子組み替え技術によってリコンビナント BMP の合成も可能となった。そして骨欠損を伴うさまざま

な疾患に対し、リコンビナント BMP を用いた骨再生への期待が高まり、臨床応用に向けて基礎的研究が盛んに展開されている⁹⁻¹¹⁾。

BMP を臨床応用する際、BMP を生体内に担持するためのキャリアを選択しなければならない。つまり、BMP を一定期間局所にとどめながら徐放でき、しかも生体に偽害性がなく、BMP による骨リモデリングに伴って分解吸収されるようなキャリアが必須である。そして今日までいくつかの生体適合性および生体分解性を有する合成高分子材料¹²⁾がキャリアとして注目され、ラットやマウスを使った動物実験では、合成高分子材料と BMP の複合体が異所性骨誘導に有効であることが報告されている¹³⁻¹⁵⁾。

しかしながら、実際に BMP を臨床応用するためには、これまでのキャリアにはない機能、つまり放出速度を厳密に制御して必要量の BMP を効果的に標的細胞に送達することができるようなシステムを開発することがきわめて重要である。Yamazaki らは BMP の放出制御を目的として、ポリ乳酸とポリグリコール酸の共重合体 (PLGA) およびポリエチレングリコール (PEG) を用いて BMP をカプセル化し、マウス筋肉内の移植実験で異所性骨誘導を起こすことに成功した¹⁶⁾。筆者は Yamazaki らの研究を発展させ、カプセルの性状と骨誘導の関係を詳細に調べ、さらに高機能で臨床応用可能な BMP カプセルを開発することを目的に本研究に着手した。

本研究では、PLGA および PEG を用いて 6 種類の BMP 含有カプセルを作製し、その構造的特徴と平均粒径を調べた。特に操作性に適した 2 種類のカプセルに関して、BMP のカプセル化効率、カプセルの加水分解速度、BMP の放出速度および生体内での骨誘導活性について比較検討した。

II. 実験材料および方法

1. BMP の精製

BMP の精製は Harada らの方法¹⁷⁾に準じて行った。ウシ長幹骨の骨粉 (1~2 mm) をアセトンで脱脂した後、0.6 N 塩酸にて 24 時間脱灰し、

4 M 塩酸グアニジンで 48 時間抽出を行った。不溶物を濾過して塩酸グアニジン抽出画分を分離し、塩酸グアニジン濃度が 0.5 M になるように 7 倍量の蒸留水にて透析した。透析中に生成する沈殿を 8,000×g で 20 分間遠心分離し、得られた沈殿を 4 M 塩酸グアニジン/50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) に再溶解した後、同じ緩衝液で平衡化したゲル濾過カラム (Sephacryl S-200) にて分画した。BMP 活性を有する画分を蒸留水中で透析し、凍結乾燥した。

2. BMP のカプセル化

Yamazaki らが報告した液中界面沈殿法¹⁸⁾により、BMP を所定割合の PLGA (ポリ乳酸のモル分率 0.75, 重量平均分子量 5.8×10^4 , 三井東圧化学) と PEG (分子量 750, Aldrich Chemical) でカプセル化した。PLGA と PEG の重量分率を 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50 の 6 種類とした。PLGA と PEG をそれぞれ 1.5 ml の塩化メチレンに溶解後、混合したポリマー溶液に 15.0 mg の BMP と 10.0 mg のゼラチン (DIFCO) を 1.0 ml の 4 M 塩酸グアニジンに溶解した溶液を混合し、手で乳化させた (W/O エマルジョン)。この W/O エマルジョンをピペットに採り、250 rpm で攪拌した 130 ml の 1%ゼラチン水溶液中 (40℃) に滴下して W/O/W エマルジョンを作製した。さらに塩化メチレンを蒸発させるために、W/O/W エマルジョンを 40 分間攪拌し続けた。得られたカプセルを回収し、200 ml の蒸留水で 3 回洗浄した後、凍結乾燥した。

3. カプセルの形態と大きさ

BMP を含むカプセルを金蒸着した後、走査型電子顕微鏡 (SEM : JSM-5400, 日本電子) で表面形態の観察を行った。また、実体顕微鏡下でのカプセルの撮影像を画像解析ソフトウェア (NIH image : NIH, Research Service Branch) を用いてカプセルの平均粒径を求めた。さらにカプセル内の PEG の存在を確認するために、PLGA と PEG の重量分率が 80/20 のカプセル 10.0 mg を 1.0 ml の重クロロホルムに溶解し、核磁気共鳴スペクトル (¹H-NMR : JNM-A 500, 日本電子) に

て分析した。

4. カプセルの加水分解速度の測定

作製されたカプセルのうち、PLGA と PEG の重量分率が 100/0, 80/20 の 2 種類のカプセル (PLGA カプセル, PLGA/PEG カプセル) の加水分解速度を測定した。2 種類のカプセルを 30.0 mg ずつ, それぞれ 4 本のサンプル瓶に採り, 30.0 ml の 0.5 M リン酸緩衝溶液 (PBS, pH 7.4) を加えて, 37°C の水浴中に保持した。7, 14, 28, 56 日後にそれぞれのカプセルを採取し, 自然乾燥後, 重量を測定し, その減量をもって加水分解されたポリマー量とした。

5. カプセル化効率と BMP の放出速度

5.0 mg の BMP を fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma Chemical) で蛍光標識し, 200 ml の 4 M 塩酸グアニジン溶液で 24 時間, 透析を 3 回くり返し行った。透析チューブのなかの 4 M 塩酸グアニジン溶液を回収し, これに 10.0 mg の蛍光標識していない BMP を加えて全量を 1 ml とした後, II-2 に記した方法で蛍光標識した BMP を含有する PLGA および PLGA/PEG カプセルを作製した。それぞれのカプセルを 5.0 mg ずつ試験管に採り, 3.0 ml の塩化メチレンに 24 時間浸漬した後, 3.0 ml の 4 M 塩酸グアニジン溶液を加えて乳化した。これらの溶液は 2 相に分離し, BMP が存在する 4 M 塩酸グアニジン溶液の蛍光強度を蛍光分光計 (FP-777, 日本分光) を用いて励起波長 490 nm, 蛍光波長 520 nm で測定し, 2 種類のカプセルのカプセル化効率を求めた。

次に, これら 2 種類のカプセルを 5.0 mg ずつ, それぞれ 4 本のサンプル瓶に採り, 30.0 ml の 0.5 M PBS を加えて, 37°C の水浴中に保持した。1, 3, 5, 7 日後にそれぞれサンプル瓶を取り出し, 沈澱物を遠心分離した後, 上清溶液を 1.0 ml 回収し, その蛍光強度を測定してカプセルから徐放された BMP の量を求めた。

6. 骨誘導活性の検定

6 週齢のウィスター系ラット 6 匹の背側および腹側皮下組織に, 1.4 mg の BMP を含有する PLGA カプセルと 1.1 mg の BMP を含有する

PLGA/PEG カプセルをそれぞれ 8.0 mg ずつ移植した。3 週間後, 移植部の組織を摘出し, 10% ホルマリンで固定し, パラフィンに包埋した。厚さ 5 μ m の切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジンにて染色した後, 光学顕微鏡で摘出物の組織学的形態を観察した。

III. 結 果

1. カプセルの形態と大きさ

液中界面沈澱法により作製した BMP 含有カプセルの形態は微小孔を有する球形を呈していた (図 1)。カプセルの平均粒径は, カプセル化に利用する PEG の量が増すにつれ小さくなったが, PLGA と PEG の重量分率が 90/10 と 80/20, および 70/30 と 60/40 のカプセルの間には有意差は認められなかった (表 1)。また $^1\text{H-NMR}$ 分析では, PLGA/PEG カプセル中に PEG に帰属されるピークは確認されなかった。

2. カプセルの加水分解速度

加水分解速度は PLGA カプセルと PLGA/PEG カプセルともにほぼ同じ時間依存性を示していた (図 2)。7 日間で 60% のカプセルが分解されるが, その後はゆるやかに分解が進み, 80% のカプセルを分解するまでには 56 日を要した。

3. BMP のカプセル化効率と放出速度

PLGA および PLGA/PEG カプセルのカプセル化効率はそれぞれ 91% と 54% であった。BMP の放出速度に関しては, 2 種類のカプセルとも 3 ~ 5 日目に BMP の放出量が増加していた。また PLGA カプセルのほうが PLGA/PEG カプセル

表 1 カプセルの平均粒径

PLGA/PEG	平均粒径 (mm)
100/0	1.22 $\pm$ 0.16
90/10	1.05 $\pm$ 0.17
80/20	1.04 $\pm$ 0.19
70/30	0.87 $\pm$ 0.12
60/40	0.88 $\pm$ 0.20
50/50	0.73 $\pm$ 0.13

図1 PLGA と PEG の重量分率が異なる 6 種類のポリマーカプセルの表面の SEM 像
(PLGA/PEG ; a : 100/0, b : 90/10, c : 80/20, d : 70/30, e : 60/40, f : 50/50)

図2 PLGA カプセルと PLGA/PEG カプセルの *in vitro* 加水分解速度

図3 PLGA カプセルと PLGA/PEG カプセルからの BMP 放出速度

に比べ、多くの BMP が放出されることがわかった (図3)。

4. 骨誘導能

BMP 含有 PLGA カプセルは移植後3週間で完全に分解吸収され、骨髄を含む新生骨組織が誘導されていた (図4)。一方、BMP 含有 PLGA/PEG カプセルは生体内で分解吸収されていたが、

異所性骨形成はみられなかった。

IV. 考 察

1. カプセルの性状について

液中界面沈澱法によるカプセルの大きさは一般に W/O エマルジョンや W/O/W エマルジョンの攪拌速度、ポリマー溶液の濃度、保護コロイド

図4 BMP含有PLGAカプセル移植後3週間の組織像(ヘマトキシリン・エオジン染色, A:×40, B:×200)
カプセルは完全に分解吸収され, 骨髄(BM)を含む新生骨(NB)が認められる

溶液の濃度などに影響される¹⁹⁾。今回のPLGAカプセルとPLGA/PEGカプセルはともに移植の際, 操作性に適したサイズのカプセルであり(表1), さらにその性状を詳しく調べる目的から本研究の調査対象となった。

移植した2種類のBMP含有カプセルの生体内での分解挙動をみてみると, 移植後3週間で完全に分解吸収されていることが確認された(図4)。一方, これとは対称的に予備実験の際, BMPのカプセル化を試みるもカプセルを形成せずに凝集したPLGAあるいはPLGA/PEGポリマーをラットの皮下組織に3週間移植しても, これらのポリマーは完全に分解されず一部残存していた。このことから, 図1に示すようなカプセル構造をとったポリマーは, 生体内で容易に分解されることがわかった。またBMPのカプセル化効率と放出速

度(図3)に関しては, 2種類のカプセルの間に違いがみられた。これに大きく影響を与えていると考えられるのがPEGの存在である。PLGA/PEGカプセルを¹H-NMRにより分析したところ, PEGの存在は確認されなかった。この事実は, PEGがW/O/Wエマルジョン作製過程で水相に移動したと考えられる。結局のところ, PEGはカプセルに存在しながらカプセルの性状に影響を与えたのではなく, カプセル作製過程でBMPとともに水相に抜け出してカプセル化効率を下げ, さらにカプセル壁を構成するポリマー鎖間を粗にすることによって, BMPの放出速度を上げたと考えられる。BMP含有カプセルからのBMPの放出制御には, PEGをPLGAに混合してカプセル化することが有効であろうと考えてきたが¹⁸⁾, 本実験の結果から, PLGAを至適条件でカプセル化することができればPEGはかならずしも必要でないことがわかった。

2. BMPの放出制御と骨誘導能について

Reddiは, 脱灰骨基質を皮下移植したときに起こる異所性骨誘導過程で一連の細胞の動きについて詳細に報告している²⁰⁾。それによると, 移植後3, 4日目に紡錘形の未分化間葉系細胞が移植した骨基質へ移走, 接着し, 5日目には軟骨芽細胞, 7, 8日目には軟骨細胞が現れる。9日目には肥大軟骨基質の石灰化と血管の侵入が起こり, 10, 11日目には血管の周りに骨芽細胞が現れ, 12~18日目には骨リモデリングに伴って新生骨が形成される。つまり, この一連の過程で, 分化誘導のスイッチであるBMPが働いているのは, 未分化間葉系細胞が骨基質へ接着する3, 4日目までであると考えられる。そこで, BMPを移植し確実に骨を誘導するためには, BMPの放出速度を制御して効果的に未分化間葉系細胞に作用させることが大切であると考えられる。2種類のカプセルとも未分化間葉系細胞がカプセルへ移走・接着すると考えられる3~5日目にBMPの放出が増加していたが, その量には差がみられた(図3)。生体内でのカプセルからのBMPの放出については今後詳しく調べる必要はあるが, BMP含有PLGAカ

プセルだけが骨誘導を起こすことが移植実験(図4)から確認されており, 生体内における2種類のカプセルからのBMPの放出については顕著な差が生じている可能性が高いと考えられる。

3. 臨床応用について

今日では, 骨再生を目的に生体適合性および生体分解性を有するポリマーとリコンビナントBMPを組み合わせた研究は盛んに行われている^{21,22)}。しかしながら, BMPを生体内で使用する場合, BMPの投与量を可及的に抑え, しかも確実に骨誘導を起こさせることが大切である。これまでのようにBMPとキャリアをただ混ぜるだけでは, BMPを効果的に標的細胞に作用させることが困難であるために, BMPの投与量を増す必要があった。またカプセルに比べ凝集したポリマー塊は生体内で分解されにくいいため, 含有するBMPを有効に放出できない可能性がある。これに対して, 生体適合性にすぐれ, 分解されやすく, しかも放出制御能を有したPLGAカプセルは, BMPの臨床応用に向け有効なキャリアとしての条件を満たしていると結論できる。

V. 結 論

BMPを生体適合性, 生体分解性ポリマー(PLGA)を用いてカプセル化し, 2種類のBMP含有ポリマーカプセル(PLGAカプセルとPLGA/PEGカプセル)について, その性状と生体内における骨誘導能を検討した。

その結果, BMP含有PLGAカプセルをラット皮下組織に移植すると, 移植後3週間で異所性骨形成を起こすことができたが, BMP含有PLGA/PEGカプセルは骨誘導を確認できなかった。この原因は, 2種類のカプセルにおけるBMPの放出速度の違いによる可能性が高く, カプセル化効率にすぐれたPLGAカプセルは, BMPによる異所性骨誘導に有効な放出制御能をもつキャリアであると結論できる。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始懇篤なるご指導とご校閲

を賜りました東京医科歯科大学歯学部顎顔面外科学講座天笠光雄教授ならびに医用器材研究所有機材料部門中林宣男教授に深甚なる感謝の意を表します。また終始直接懇切なるご指導とご校閲を賜りました医用器材研究所有機材料部門石原一彦助教授, 北里大学医学部形成外科学教室山崎安晴博士, 本学歯学部生化学教室大井田新一郎博士に心より感謝いたします。あわせて本研究に際し, 暖かいご支援とご協力を賜りました医用器材研究所有機材料部門渡辺昭彦先生, 田中志信博士(現山形大学工学部助教授), 岩崎泰彦先生, 本学歯学部生化学教室五関正江博士に深謝申し上げます。最後に, 終始暖かいご支援をいただいた医用器材研究所有機材料部門, 口腔外科学第1講座の諸先生方に深くお礼申し上げます。

本研究の要旨は, 第13回日本骨代謝学会(1995年8月, 福岡)にて発表した。

なお, 本研究の一部は文部省科学研究費補助金一般研究(C)(課題番号06671943)の補助により行われた。

文 献

- 1) Urist, M. R. : Bone ; Formation by autoinduction. *Science* 150 : 893-899, 1965.
- 2) Urist, M. R., Huo, Y. K., Brownell, A. G., Hohl, W. M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hunkapillar, M. and DeLange, R. J. : Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 371-375, 1984.
- 3) Sampath, T. K., Muthukumaran, N. and Reddi, A. H. : Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 7109-7113, 1987.
- 4) Wang, E. A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R. M., Kriz, M. J., Luxenberg, D. P., Sibley, B. S. and Wozney, J. M. : Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 9484-9488, 1988.
- 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. : Novel regulators of bone formation ; Molecular clones and activities. *Science* 242 : 1528-1534, 1988.
- 6) Celeste, A. J., Jannazzi, J. A., Taylor, R. C., Hewick, R. M., Rosen, V., Wang, E. A. and Wozney, J. M. : Identification of transforming growth factor b family members present in

- bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 9843-9847, 1990.
- 7) Ozkaynak, E., Rueger, D. C., Drier, E. A., Corbett, C., Ridge, R. J., Sampath, T. K. and Oppermann, H. : OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO J.* 9 : 2085-2093, 1990.
 - 8) Ozkaynak, E., Schneggelberg, P. N. J., Jin, D. F., Clifford, G. M., Warren, F. D., Drier, E. A. and Oppermann, H. : Osteogenic Protein-2. *J. Biol. Chem.* 267 : 25220-25227, 1992.
 - 9) Toriumi, D. M., Kotler, H. S., Luxenberg, D. P., Holtrop, M. E. and Wang, E. A. : Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117 : 1101-1112, 1991.
 - 10) Yasko, A. W., Lane, J. M., Fellingner, E. J., Rosen, V., Wozney, J. M. and Wang, E. A. : The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J. Bone Joint Surg.* 74-A : 659-670, 1992.
 - 11) Gerhart, T. N., Kirker-Head, C. A., Kriz, M. J., Holtrop, M. E., Henning, G. E., Hipp, J., Schelling, S. H. and Wang, E. : Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 293 : 317-326, 1993.
 - 12) Piskin, E. : Biodegradable polymers as biomaterials. *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* 6 : 775-795, 1995.
 - 13) Lucas, P. A., Laurencin, C., Syftestad, G. T., Domb, A., Goldgerg, V. M., Caplan, A. I. and Langer, R. : Ectopic induction of cartilage and bone by water-soluble proteins from bovine bone using a polyanhydride delivery vehicle. *J. Biomed. Mater. Res.* 24 : 901-911, 1990.
 - 14) Miyamoto, S., Takaoka, K., Okada, T., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Suzuki, S. and Ono, K. : Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 278 : 274-285, 1992.
 - 15) Miyamoto, S., Takaoka, K., Okada, T., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Suzuki, S. and Ono, K. : Polylactic acid-polyethylene glycol block copolymer. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 294 : 333-343, 1993.
 - 16) Yamazaki, Y., Oida, S., Ishihara, K. and Nakabayashi, N. : Ectopic induction of cartilage and bone by bovine bone morphogenetic protein using a biodegradable polymer capsule. *Trans. Soc. Biomat.* 14 : 78, 1991.
 - 17) Harada, K., Oida, S. and Sasaki, S. : Chondrogenesis and osteogenesis of bone marrow-derived cells by bone-inductive factor. *Bone* 9 : 177-183, 1988.
 - 18) Yamazaki, Y., Oida, S., Ishihara, K. and Nakabayashi, N. : Ectopic induction of cartilage and bone by bovine bone morphogenetic protein using a biodegradable polymeric reservoir. *J. Biomed. Mater. Res.* : in press, 1995.
 - 19) 近藤 保, 小石真純 : マイクロカプセル. 東京, 1977, 三共出版, 83-84.
 - 20) Reddi, A. H. : Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. *Collagen Relat. Res.* 1 : 209-226, 1981.
 - 21) Kenley, R., Marden, L., Turek, T., Jin, L., Ron, E. and Hollinger, J. O. : Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J. Biomed. Mater. Res.* 28 : 1139-1147, 1994.
 - 22) Lee, S. C., Shea, M., Battle, M. A., Kozitza, K., Ron, E., Turek, T., Schaub, R. G. and Hayes, W. C. : Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. *J. Biomed. Mater. Res.* 28 : 1149-1156, 1994.