

氏名	張 紹 全
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1589号
学位授与の日付	平成9年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	ウシ骨由来粗精製BMPとI型アテロコラーゲン複合体 による異所性骨誘導に関する基礎的研究
論文審査委員	教授 杉本朋貞 教授 滝川正春 教授 永井教之

学位論文内容の要旨

【緒言】 骨形成タンパク質 (Bone morphogenetic proteins:BMP) は、細胞分化増殖の調節や形態形成に深く関わるTGF- β スーパーファミリーに属する成長分化因子のひとつで、未分化間葉系細胞に作用して軟骨・骨系列の細胞に分化誘導し、骨を形成する特異な活性をもつタンパク質であることが知られている。

ウシ骨由来BMPを作製する方法は4M Guanidinium 塩酸による抽出 (Guanidine extraction:G-ext) の後、一般的に多段階のクロマトグラフィーにより精製を行っている。この方法は、高度に精製されたBMPを得るには適した方法であるが、手技が極めて複雑で多くの時間を費していることが問題となっている。大量のBMPを利用する大型動物の実験を行うためには、クロマトグラフィーを用いずに、効率良くBMP活性を有する画分を得る改良法を確立する必要がある。著者は、限外濾過を行うことによってこの問題を解決しようと試みた。

一方、従来よりBMPの最も優れた担体として脱灰抽出残渣骨基質である不溶性骨基質 (Insoluble bone matrix: IBM) が用いられてきた。しかしIBMには未同定成分の存在や滅菌法の問題などから担体としての条件が備っていないと指摘されている。今回著者は、改めてIBMに注目しIBMの主成分であるI型コラーゲンを担体として利用できないかを考えた。

著者は改良法によって得られた粗精製BMP画分 (Curde BMP) の骨誘導能の検定と、骨由来I型アテロコラーゲンの担体としての可能性の検討を目的として以下の実験を行った。

【材料および方法】

実験1: 久保木法によるS300BMP(0.3mg)とIBM(20mg)複合体を、ラット皮下に埋入して1W,2W,3W後に標本作製して骨誘導を観察した。

実験2: 1)S300BMP(0.3mg)と骨由来I型コラーゲン複合体および2)S300BMP(0.3mg)と真皮由来I型コラーゲン複合体をラット皮下に埋入して骨誘導を観察した。

実験3: 久保木法を改良し分子量早期限定した精製システムからS200BMP粗精製BMP (Curde BMP) と骨由来I型アテロコラーゲン複合体をラット皮下に埋入して久保木法で得られる粗精製BMP (G-Ext) と骨誘導を観察した。

1.ウシ骨由来粗精製BMPの作製法: 湿性重量1kgの骨粉 (大きさ150-840 μ m) を洗浄し、続いてクロロホルム/メタノール(1:1)溶液を用いて脱脂を行い、次に塩酸を用いてpH2.0を維持したまま脱灰を行った。脱灰骨基質は、冷蒸留水で十分洗浄後、4M Guanidinium 塩酸溶液4.0リットルを用いて可溶画分を抽出した (72h, 4 $^{\circ}$ C) (G-Ext)。この際、抽出液にタンパク質分解酵素阻害剤を添加した。今回導入した粗精製法は、骨タンパク質を

含む抽出液より限外濾過器を用いて分画分子量を10kDaから100kDaの範囲に限定してタンパク質を濾過濃縮し、大量の冷蒸留水に対して透析後、沈澱物のみを回収するため遠心分離（15,000rpm,30min）している（Curde BMP）。

2.ウシ骨由来I型アテロコラーゲン溶液の調整：

IBMを大量の冷蒸留水で洗浄しエタノールに浸漬後、塩酸溶液（pH3.0）中で膨潤させた。次にペプシンで2回消化し可溶化後酸性条件下で0.7MNaCl添加による分別沈澱を2回行い精製した。塩析後の沈澱物を塩酸に溶解し透析後、濃度0.3%のI型アテロコラーゲン酸性溶液（3.0mg/ml）となるように塩酸（pH3.0）で調整した。

3.複合体の調整：

粗精製BMP（CurdeBMP, G-Ext）と骨由来I型アテロコラーゲン溶液（10mg）を滅菌チューブ内で混和し凍結乾燥した。

4.埋入した複合体の種類：

- 1) S200BMPと骨由来I型アテロコラーゲン10mgの複合体
- 2) Curde BMP5mgと骨由来I型アテロコラーゲン10mgの複合体
- 3) Curde BMP0.5mgと骨由来I型アテロコラーゲン10mgの複合体
- 4) G-Ext 50mg 単独の場合（対照）
- 5) G-Ext 50mg と骨由来I型アテロコラーゲン10mgの複合体（対照）
- 6) G-Ext100mg 単独の場合（対照）
- 7) G-Ext100mgと骨由来I型アテロコラーゲン10mgの複合体（対照）
- 8) 骨由来I型アテロコラーゲン10mg（対照）

上記8種類の検体をラット皮下組織に埋入した。埋入2週目に摘出、組織標本を作製し、HE染色を施して骨誘導を観察し、改良法と久保木法の骨形成を比較した。

【結果と考察】

- 1) S300BMPとIBM複合体を調製し骨誘導能を検定した結果、骨誘導能の検定期が2週目であることを明らかにした。
- 2) 早期に分子量を限外濾過することによって得られた簡便法Crude BMPはS200BMPよりも骨誘導能が劣るものの、G-Extよりも骨誘導能を有することが確認された。
- 3) ウシ骨由来I型アテロコラーゲンは真皮由来コラーゲン線維膜（FCM）と同様に BMPの担体として有効であった。
- 4) ウシ骨由来I型アテロコラーゲンは、BMPの抽出過程で得られるIBMから容易に調製可能であり、IBMに比較して化学的組成が明らかであることから、骨誘導能の検定の標準担体としての可能性が示唆された。

【結論】今回クロマトグラフィーを利用せず、限外濾過と透析を利用して、骨タンパク質抽出液の分画分子量を早期に限定することにより、骨誘導能の高い画分粗精製BMP

（Curde BMP）を大量にしかも簡便に入手することができた。骨由来I型アテロコラーゲンは作製法も簡便であることから、BMPの埋入担体としての可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究は骨形成タンパク質（BMP）の基礎的実験として、大型動物でのインプラント植立実験などへの応用の必要性からウシ骨抽出BMP（Crude BMP）を簡便法によって調製し、その骨誘導能の有無を確認すること及び骨由来I型アテロコラーゲンの担体としての利用を目的として、S300BMP、改良法S200BMP、簡便法Crude BMP及びG-Extの各骨誘導能について、さらに真皮由来コラーゲン線維膜と骨由来可溶化I型アテロコラーゲンを担体として用い、ラット皮下組織の異所性骨誘導を組織学的に検討したものである。

本研究の結果、1) 牛骨由来BMPの骨誘導能の測定の時期は複合体埋入2週間後から可能であること、2) 限外濾過により早期に分子量を限定することによって得られた簡便法Crude BMPは、S200BMPよりも骨誘導能が劣るものの、G-Extよりも高い骨誘導能を有することが確認されたこと。3) ウシ骨由来I型アテロコラーゲンはコラーゲン線維膜と同様に担体としての有効性が確認され、標準担体としての可能性が示された。

本研究は簡便法のCrude BMPとウシ骨由来I型アテロコラーゲンが骨誘導再生実験に有用であることを示した。よって本申請者は、博士（学位）を得る資格があると考ええる。