



Title	成長肋軟骨・鼻中隔軟骨および下顎頭軟骨培養細胞に対するサメ軟骨由来因子の影響
Author(s)	大前, 博昭
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/33339
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

成長肋軟骨・鼻中隔軟骨および下顎頭軟骨 培養細胞に対するサメ軟骨由来因子の影響

大 前 博 昭

(昭和58年1月/2日受付)

緒 言

頭蓋・顔面骨格の成長の様相を知ることは、成長期の不正咬合患者を治療する上にも、また、治療加きわめて困難な骨格性不正咬合の成り立ちを究明する手掛りを得るためにも、きわめて重要である。

従来、頭蓋・顔面骨格の成長・発育について、ヒトではX線学的にあるいは組織学的に検討され、また、動物では移植実験や器官培養法などを用いて多くの研究が試みられ、様

々な考察が加えられてきた。すなわち、Weinman and Sicher¹⁾は上顎骨の成長は縫合部での成長によって誘導され、下顎骨の成長中心としての役割は下顎頭軟骨が果すと考えた。しかし、Scott^{2,3)}は、鼻中隔軟骨・脳・眼球などの成長によって誘発された拡大力が、上顎骨の縫合部での添加性成長を誘導し、下顎頭軟骨は機能維持のための補償的成長を行うにすぎないと考察した。一方、Moss^{4,5)}はfunctional matrix theoryを提唱し、頭蓋・顔面骨格の成長はすべて軟組織の機能的要請に応じた順応性の成長であると主張して、縫合あるいは軟骨における一次的な成長能力の存在を否定した。そこで著者は、顔面骨格における成長部位として議論の的となってきた鼻中隔軟骨および下顎頭軟骨について、従来ほとんど行われなかった細胞培養系を用いて、これらの軟骨細胞の成長の特性の究明を試みた。

ところで、骨格の成長には成長ホルモンの関与が不可欠であることはよく知られている

が、その作用は直接作用ではなく、ソマトメジンと呼ばれる一群のポリペプチドがその作用を仲介している⁶⁾。最近野村は^{7,8)}、ウシ胎仔軟骨中にソマトメジン様作用を有するポリペプチドが存在することを見出し、これをCartilage derived Factor (CDF) と呼んだ。また、長管骨の軟骨性成長の場として重要な growth plate の一つである成長助軟骨が、細胞培養系においてそれ自身の分化と増殖を促進する因子を産生することも判明している⁹⁾。

本研究は、軟骨中に存在する成長因子の起源を系統発生学的観点から探求するため、脊椎動物の中でも最も下等な軟骨魚類であるサメの軟骨から成長因子の抽出を試みるとともに、この成長因子の効果を、成長助軟骨細胞・鼻中隔軟骨細胞および下顎頭軟骨細胞の培養系で検討することにより、鼻中隔軟骨および下顎頭軟骨が顔面骨格の成長において、どのような特性を有するのかとということを明らかにしようとしたものである。

材料ならびに方法

1. サメ軟骨由来因子の精製

乾燥サメヒレ軟骨の粉末を、20倍量(%)の0.02 M 2(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(Sigma, USA), 0.1 M 6-アミノ-*m*-カプロン酸(和光純薬)を含む1 M グアニジン塩酸(半井化学)緩衝液(pH 6.0)中で、4℃48時間抽出後0℃10,000×gで20分間遠沈して上清を得た。この上清に氷冷下で、最終濃度が45%(V/V)になるように冷アセトンを加え、20分間攪拌を続けた。その後0℃10,000×gで20分間遠沈して、その上清にさらに、氷冷下で最終濃度が65%(V/V)となるように冷アセトンを加えて20分間攪拌した。得られた沈殿画分を少量の1 M グアニジン塩酸緩衝液に溶解し、蒸留水に対して十分に透析を行った。これを凍結乾燥してアセトンSCDF(Shark Cartilage Derived Factor)とした。

まず、アセトン S C D F を 0.25 M pH 6.0 の酢酸アンモニウム溶液に溶解して、同溶液で平衡にした CM-Sephadex C-50 カラム ($6 \times 30\text{ cm}$) に展開した。まず $1,500\text{ ml}$ の同溶液を流してその溶出画分を CM-1 とした。次に 1 M pH 6.0 の酢酸アンモニウム溶液 $1,000\text{ ml}$ を流してその溶出画分を CM-2 とし、最後に 0.3 M の食塩を含む 1 M の酢酸アンモニウム溶液 $1,000\text{ ml}$ を流してその溶出画分を CM-3 とした。これら 3 つの画分は、ダイアフロメンアレン UK-10 (Amicon, USA) にて濃縮した後、蒸留水に対して十分に透析して凍結乾燥した。

次に、CM-2 および CM-3 の画分を充填カラム TSK-GEL G2000SW ($21.5 \times 600\text{ mm}$: 東洋曹達) を用いて高速液体クロマトグラフィーにかけた。溶出液は 1 M pH 6.5 の酢酸アンモニウム溶液とし、カラム温度 30°C で 1 ml/分 の溶出速度でゲル濾過を行った。溶出画分は $UV280\text{ nm}$ で吸光度をモニターした。得られた活性画分についてさらに逆相カラムを用いて精製

を進めた。0.1% pH 2.0 のトリフルオロ酢酸で平衡にした LiChrosorb RP-8 (Merck; West Germany) を充填した逆相カラム (4 × 20 mm) に活性画分を添加し、イソプロピルアルコール対アセトニトリルを7対3に混合した溶液で0~80% のリニアグラジエントをかけた。カラム温度は30℃として溶出速度1 ml/分で行った。溶出像はUV 215 nm の吸光度をモニターした。

ドデシル硫酸ナトリウム (以下 SDS と略す, 和光純薬)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は以下のように行った。サンプル (50 μg) を SDS-グリセロール溶液中で2分間煮沸した後、Laemmli¹⁰⁾ の方法に準じて調製した平板型 15% SDS-ポリアクリルアミドゲル (130 × 120 × 1.5 mm) に添加し、3 mA の定電流で電気泳動を行った。泳動終了後、Coomassie brilliant blue (Sigma: USA) で1時間染色した後、メタノール・酢酸・水 (3:25:7) の溶液で脱色した。分子量マーカーには、Electrophoresis calibration kit (LMW kit, 14,000-94,000,

Pharmacia Fine Chemicals; Sweden) を用いた。

2. うさぎ軟骨細胞の培養

動物は離乳期の New Zealand 系雄性うさぎ(体重 300~400g) を用い、Shimomura⁽¹¹⁾らの方法に準じて肋軟骨・骨移行部より成長肋軟骨細胞を、岡田⁽¹²⁾らの方法に準じて鼻中隔軟骨細胞および下顎頭軟骨細胞を分離した。

成長肋軟骨細胞は、10%ウシ胎仔血清(56℃30分非働化,以下FCSと略す,GIBCO;USA)を含むイーグル最少必須培地(日水製薬)を育生培地として、マイクロプレート(直径6mm,テルモ)当り 1×10^4 個またはフラスコックティッシュ(直径35mm,テルモ)当り 1×10^5 個接種した。

鼻中隔および下顎頭の軟骨細胞は、10%FCSを含むダルバコ変法イーグル培地(以下DMEMと略す,GIBCO;USA)を育生培地として、マイクロプレート(直径6mm,テルモ)当り鼻中隔軟骨細胞は 1×10^4 個、下顎頭軟骨細胞は 4×10^4 個接種して、5%炭酸ガス気相下で6~

8日間培養して実験に用いた。

3. うシ胎仔軟骨細胞および BALB/3T3 細胞の培養

屠殺直後のうシ胎仔の四肢関節軟骨より、Shimomura らの¹⁾方法に準じて軟骨細胞を分離した。10% FCS 添加 DMEM を育生培地として、フラスコックディッシュ（直径 35 mm, テルモ）当り 1×10^5 個接種した。

BALB/3T3 細胞は、subconfluent に達した細胞を 0.1% トリプシン（半井化学）にて剥離・懸濁して、0.3% うシ血清（半井化学）を含む DMEM で十分洗浄した後、フラスコックディッシュ（直径 60 mm, Falcon）に同培養液 5 ml 中に 1×10^5 個接種した。5 時間後培養液を除去し、ディッシュ底面に付着した細胞を 5 ml のリン酸緩衝塩類溶液（以下 PBS と略す）で洗浄した後、0.2% うシ血清添加 DMEM に培地交換して実験に用いた。

4. SCDF の生物学的諸活性の測定

SCDF の活性測定には、コンフルエントに

達した培養 6~8 日目の軟骨細胞を用いた。測定培地には 0.3% FCS 添加 DMEM を用い、同培地でフレインキューベーションした後実験を行った。

1) グリコサミノグリカン (以下 GAG と略す) 合成

GAG 合成は、Solursh and Meier¹³⁾の方法に準じて、GAG 合成の最終段階である硫酸エステル化を指標として測定した。まず、コンフルエントに達して 0.3% FCS 添加 DMEM 0.1 ml 中で 24 時間培養した軟骨細胞に対し、^(後述の)各種の成長因子を添加した。実験開始 6 時間後に 50 μ g/ml の $[^{35}\text{S}]$ 硫酸 (New England Nuclear, USA) を含む DMEM 5 μ l/well を加えてさらに 18 時間培養を続けた。培養終了後 6% の水酸化ナトリウムを 50 μ l/well 加えて細胞を溶解して反応を止め、溶液を試験管に移し 100 μ l の 2% 水酸化ナトリウムで well を 1 回洗浄してこれも回収した。この溶液を中和した後、5 mM の塩化カルシウムと 1 mg/ml のフロナーゼ E (10

004ロシン単位/mg, 科研化学)を含むトリス塩酸緩衝液(pH 7.8) 0.5 mlを加えて、55℃で12時間インキュベーションした。その後、50 µg/ml のコンドロイチン硫酸ナトリウム(和光純薬) 100 µl と 2 mM の硫酸マグネシウム 1 mlを加えて37℃30分間インキュベーションし、さらに0.02 M の食塩を含む1%塩化セチルピリジニウム(以下CPCと略す, 半井化学)を加えて37℃60分間インキュベーションを続けてGAGを沈殿させた。沈殿はミリポアフィルター(直径25 mm, 孔径0.45 µm)で集め、1% CPCで5回洗浄した後十分乾燥させてシンタレーションバイヤルに移し、キシレン系シンタレーター 10 mlを加えて溶解後、液体シンタレーションスペクトロメーター(Aloka LSC-653)にてフィルターに捕集された放射能を測定した。

2) プロテオグリカン合成

[³⁵S] 硫酸のGAGへの取り込み実験と同様に、D-[6-³H] グルコサミン(Radiochemical

Centre, England) および L-[3-³H]-セリン (Radiochemical Centre, England) の CPC 沈殿画分への取り込みにより測定した。

3) DNA合成およびRNA合成

DNA合成は [6-³H]-チミジン (Radiochemical Centre, England) の、RNA合成は [5-³H]-ウリジン (Radiochemical Centre, England) の、5% トリクロル酢酸 (以下 TCA と略す) 不溶画分への取り込みにより測定した。

BALB/3T3 細胞の DNA 合成の測定は、0.2% ウシ血清添加 DMEM に培地交換した細胞に対して各種成長因子を添加した後、16 時間後に 20 μ Ci/ml の ³H-チミジンを 50 μ l 添加してさらに 3 時間培養を続けた。培養終了後冷 PBS で 3 回洗浄した後、0.5M の水酸化ナトリウムで細胞を溶解し 5% TCA を加えて DNA を沈殿させた。この沈殿をミリポアフィルターで集め 5% TCA およびエタノールで十分洗浄後乾燥して、フィルターに捕集された放射能を測定した。

4) 蛋白質合成

総蛋白質合成は、L-[3-³H]-セリンの5% TCA不溶画分への取り込みにより測定した。

5) 蛋白質の定量

総蛋白量の定量は、ウシ血清アルブミン (Sigma, USA) を標準液として、Lowry¹⁴⁾の方法に準じて行った。

5. 装置

高速液体クロマトグラフィーには、東洋曹達社製 spectroflow monitor SF770 を接続した HLC-803A を用い、逆相カラムには、柳本社製 solvent programmer 2000 G を接続した L-2000 を用いた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動には、Pharmacia Fine Chemical 社製 Electrophoresis Constant Power Supply Ecps. 2000/300 を接続した、直立平板式ゲル電気泳動装置 SE500 (Hoefel Scientific Instruments Inc, USA) を用いた。

結 果

1. SCDFの精製

サメヒレ軟骨抽出物の 0-45% および 45-65% のアセトン画分の活性を、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸とチミンの取り込みを指標として、GAG合成あるいはDNA合成の促進能で測定したところ、図1に示したように、0-45% のアセトン画分の活性に比べ 45-65% のアセトン画分の活性が強かった。すなわち、DNA合成促進については、45-65% アセトン SCDF はラシ胎仔軟骨由来因子 (CDF) またはラサギ肋軟骨培養細胞の conditioned medium に匹敵する促進活性を示したが、GAG合成促進能ではこれらにおよばなかった。

以上のことから、以降の精製にはソマトメジン様活性の強い 45-65% アセトン SCDF を用いた。

CM-Sephadex C-50 カラム ($6 \times 30 \text{ cm}$) で分画した CM1, CM2, CM3 の画分とアセトン SCDF の

活性を、 ^{32}P ミジンおよび ^{32}P リジンの取り込みを指標としたDNA合成およびRNA合成に対する影響で比較した。図2に示したように、カラムの素通り画分であるCM1は総重量の95%以上が溶出したにもかかわらず、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度ではDNA合成・RNA合成ともに活性を認めなかった。一方、CM2はアセトンSCDFに比べ、DNA合成・RNA合成とも約 $1/10$ 倍の濃度で活性を示した。CM3ではさらに強力で、DNA合成・RNA合成ともアセトンSCDFの約 $1/100$ 倍の濃度で活性を示した。

活性を有したCM2およびCM3について、高速液体クロマトグラフィーを用いてさらに精製を試みた。まず、 $1\text{ M pH } 6.5$ の酢酸アンモニウムで平衡にしたG2000SWカラムでゲル濾過したところ、各々2つずつ活性を有する画分を得ることができた。このため、これらの活性画分について、逆相カラムRP8でクロマトグラフィーを行った。4つの活性画分はいずれも、図3に示したCM2の1つめの活性画

分Fr-1の溶出像に類似した溶出像を示し、活性を有さない他の蛋白に比べてきわめて疎水性の強い部分に活性物質が溶出した。このため、他の活性画分については、活性を有した溶出画分について再クロマトグラフィーを行ったときの溶出像を示した(図3,図4)。CM-2の活性画分についてはFr-1が23分に、Fr-2が24分に活性が溶出した。CM3の活性画分についてはFr-1が23分に、Fr-2が20分と26分に活性が溶出した。これらの活性画分について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分子量を分析したところ、図5に示したように、分子量の大きい順にCM3のFr-1は21,500, Fr-2は17,500, CM2のFr-1は17,500, Fr-2は12,000~13,000に相当する部位に泳動された。これらの活性画分はいずれも、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ でウサギ成長肋軟骨細胞のDNA合成およびGAG合成を促進した。

2. プロテオグリカン合成に対するSCDFの影響

GAG合成に対する SCDF による硫酸化の促進を [^{35}S] 硫酸の取り込みで検討した(図6:上段)。CDF が対照の1.8倍の促進活性を示したのに対し、CM2 および CM3 はともに対照の1.5倍の促進活性しか示さなかった。しかし、 ^{34}P -グルコサミンの取り込みで測定したプロテオグリカン糖鎖の合成では(図6:下段)、CM2 が CDF とほぼ同程度の活性を示し対照の1.5倍前後の促進能を有したが、CM3 は対照の2倍以上の著しく強力な促進活性を示した。また、総蛋白合成に対する活性を ^{34}P -セリンの取り込みで検討すると(図7:上段)、CM2 は弱い促進活性しか示さなかったが、CM3 は CDF を上回る強力な促進活性を示した。一方、 ^{34}P -セリンの取り込みにより測定したプロテオグリカン・コア蛋白の合成促進に対しては(図7:下段)、CM2, CM3, CDF はともに対照の1.5倍程度の促進活性を有した。

3. 他の成長因子との比較

比活性の高い CM3 の SCDF を用いて、他の

成長因子と成長促進作用を比較した。

ウサギ成長助軟骨細胞に SCDF を添加すると、図 8 に示したように、11～20 時間で DNA 合成は促進されはじめ、24～28 時間でピークに達した。また、その促進程度は、至適濃度の線維芽細胞増殖因子（以下 FGF と略す, Collaborative Research, USA）を添加したときよりも強力であり、FGF とソマトメジンの一つである Multiplication Stimulating Activity（以下 MSA と略す, Collaborative Research, USA）を同時に添加したときの DNA 合成促進の程度に匹敵した。

総蛋白質量の増加に対する影響は図 9 に示した。培養 3 日目から 4 日間 0.3% FCS 添加 DMEM 中で培養した対照に比べ、CDF, MSA あるいは FGF を添加したものの総蛋白質量は顕著に増加した。しかし、SCDF (CM-3) はこれらよりもさらに強力な細胞増殖促進作用を有し、FGF と MSA を同時に添加した場合とほぼ同等の効果を認めた。

4. 他の細胞に対する SCDF の影響

ウシ胎仔の四肢関節より分離培養した軟骨細胞の増殖に対しても SCDF は促進活性を示した(図10)。培養3日目から0.3% FCS 添加 DMEM 中で培養を開始すると、対照ではほとんどその総蛋白量は増加しないのに対し、SCDF (CM3) を添加した場合には MSA を添加した場合と同等に総蛋白量が増加し、2日目で対照の約2倍、5日目では5倍近くまで増加した。

さらに、SCDF は線維芽細胞である BALB/3T3 細胞に対しても増殖促進活性を示した(図11)。SCDF (CM3) は FGF よりも高濃度を要するものの、1~2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で BALB/3T3 細胞の DNA 合成を促進し、ウシ血清よりも低濃度で促進活性を示した。また、その最大促進の程度は MSA よりも著しく強かった。

5. 鼻中隔軟骨細胞および下顎頭軟骨細胞に対する SCDF の影響

鼻中隔および下顎頭軟骨細胞に対する SCDF

F の作用を、DNA 合成および GAG 合成でまず検討した(図 12-a・b)。

DNA 合成において、CM-2, CM-3 とともに $1 \mu\text{g/ml}$ から促進活性を示しはじめ、 $10 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ で最大促進活性に達した。しかしその程度は、成長肋軟骨細胞では図 2 に示したように対照の 10 数倍に達しているにもかかわらず、鼻中隔および下顎頭軟骨細胞ではともに対照の 1.6 倍前後と低いものであった。

一方、GAG 合成に対しても、DNA 合成に類似した SCDF の用量反応曲線が得られたが、その最大促進の程度は、鼻中隔軟骨細胞でやや低く対照の 1.3 倍程度であるものの、図 6-a に示した成長肋軟骨細胞における応答の程度とほぼ同等であった。

また、CM-3 を用いて DNA 合成促進の経時的変化を検討したところ、図 13 に示したように、鼻中隔軟骨細胞および下顎頭軟骨細胞はともに、SCDF 添加 $10 \sim 20$ 時間から DNA 合成が促進されはじめ、 $24 \sim 28$ 時間でピークに達し

た。DNA合成における経時の変化は、図8に示した成長助軟骨細胞における変化とほぼ一致した。

次に、総蛋白量の増加に対する SCD F と CDF の影響を比較検討した。10% FCS 添加 DMEM 中で4日間培養して充分 plating させた軟骨細胞に対し、0.3% FCS 添加 DMEM に培地交換して実験を開始した。CM2, CM3 および CDF をその至適濃度で添加してさらに4日間培養を続けた後、細胞層の総蛋白量を比色定量した(図14)。培地交換は実験開始日(day 0)より毎日行った。

0.3% FCS 添加 DMEM のみで4日間培養した cont. day 4 と実験開始日の cont. day 0 を比較すると、鼻中隔軟骨細胞ではその総蛋白量が増加したのに対し、下顎頭軟骨細胞では減少した。また、このときの位相差顕微鏡写真(図15)では、下顎頭軟骨細胞において day 0 ではほぼ均一な monolayer に見えた細胞が、cont. day 4 では細胞間に隙間が生じた。しか

し、CM-2, CM-3 あるいは CDF を添加したものでは、いずれもその総蛋白量は増加しており、位相差顕微鏡写真でも良好な増殖像を示した。

6. 鼻中隔軟骨細胞および下顎頭軟骨細胞に対する他の成長因子の影響

鼻中隔および下顎頭軟骨細胞の DNA 合成および GAG 合成に対する各種成長因子の影響を比較検討した (図 16-a・b)。

下顎頭軟骨細胞の DNA 合成に対して、CDF が他の成長因子に比べてやや強力な促進活性を示したが、いずれの成長因子に対しても、鼻中隔および下顎頭軟骨細胞は、DNA 合成促進刺激に対してほぼ同程度に応答した。しかし、GAG 合成促進において、FGF および上皮細胞増殖因子 (以下 EGF と略す, Collaborative Research, USA) はソマトメジン様作用を有さず、両者とも軟骨基質合成促進活性を示さなかった。

考 察

骨格の成長・発育において成長ホルモンが重要な役割を果たしていることはよく知られている。しかし、骨および軟骨に対するその作用は直接作用ではない。すなわち、Salmon and Daughaday^(15,16) は、下垂体摘出ラットの肋軟骨が、in vitro では成長ホルモン投与によって硫酸化を促進されないにもかかわらず、in vivo に成長ホルモンを投与すると硫酸化の促進が認められ、さらに、成長ホルモンを投与された下垂体摘出ラットの血清中に、in vitro で肋軟骨の硫酸化を促進する因子 (sulfation factor) が存在することを報告している。これは、成長ホルモンの作用が生体内で成長ホルモンに依存した物質によって仲介されて、軟骨の硫酸化促進作用を発現したことを示唆するものである。このことから、成長ホルモンを仲介してその作用を発現するソマトメジンと呼ばれる一群のポリペプチドの存在が明らかにさ

れてきた(表1)。これらのソマトメジンは以下に示すような作用を有する。

①血中濃度およびその産生は成長ホルモンに依存する。

②軟骨に対して、そのDNA合成・RNA合成および軟骨基質合成を促進する。

③インスリン様作用を有する。

一方、Klagsbrun^{24,25)}らはウシ肩甲軟骨よりCDGF (Cartilage Derived Growth Factor) を分離し、野村^{7,8)}はウシ胎仔軟骨よりCDF (Cartilage-derived Factor) を分離した。さらにKato⁹⁾らはウサギ肋軟骨培養細胞が培地中にソマトメジン様因子を放出することを報告した。これらのことは、軟骨が軟骨自身の成長を促進する因子をその局所で産生していることを示唆するものである。このため、先に発見されたsystemicなソマトメジン以外にlocalなソマトメジンの存在が注目されはじめた。

また、Canalis²⁶⁾らはラット胎仔calvariaの器官培養系の培地からBDGF (Bone Derived Grow

th Factor) を分離し、Kato²⁷⁾らとの共同実験により、軟骨由来の CDF が骨細胞に対して活性を有し、骨由来の BDGF も軟骨細胞に対して活性を有することを明らかにした。これは、骨と軟骨が BDGF と CDF を介して相互に作用している可能性を示唆するものである。すなわち、血液循環のない軟骨の成長は軟骨自身が産生する CDF によって促進されるとともに、隣在する骨由来の BDGF によっても促進され、一方、骨形成は骨由来の BDGF によっても、また、軟骨由来の CDF によっても促進されることを明らかにし、骨格成長における局所の成長因子の重要性が示唆されている。

本研究においてその存在を証明したサメ軟骨由来因子 (SCDF) は、軟骨細胞に対してソマトメジン様作用を有し、その増殖・蛋白合成および軟骨基質合成を促進した。すなわち、哺乳動物に属するウシの軟骨に存在した成長因子が、脊椎動物の中でも最も下等な軟骨魚類であるサメの軟骨にも存在することが

明らかとなった。このことは、脊椎動物の進化の点から、すべての脊椎動物において、軟骨が軟骨自身の成長を促進する因子をその局所で産生している可能性を示唆するものである。

1. SCDFの分離・精製について

本研究では、サメのヒレ軟骨より成長因子の分離および精製を試みたが、ウシ胎仔軟骨由来のCDF同様1M、pH 6.0のグアニジン塩酸で抽出された。これをアセトン分画して得たアセトンSCDFは、Ct Sephadexカラムクロマトグラフィーによって、ソマトメジン様活性を有する2つの画分へと部分精製された(図2)。この段階で95%以上の混入不活性物質が除去されている。さらにゲル濾過に引き続いて行った逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーでは、SCDFは主として疎水性が強く、他の蛋白と容易に分離できたため、純度の高いSCDF活性画分が得られた。こうして得た最終活性標品は、SPS-ポリアクリル

アミドゲル電気泳動(図5)によって分子量21,500, 17,500, 17,500, 12,000~13,000であることが判明し、SCDFは少なくとも4種類の活性物質を含むことが明らかとなった。CM2のFr1とCM3のFr2はいずれも分子量は17,500であるが、逆相カラムの保持時間が異なるため、別の物質であると考えられる。

ここで明らかとなったSCDFの分子量は、CDFの分子量11,000および13,700~17,800にほぼ類似していた。しかし、CDFが耐熱性であるのに対し、SCDFは予備実験において、95と10分または85と15分の熱処理で失活し、易熱性であった。従って、SCDFはCDFとは異った物質であると考えられる。

2. 成長肋軟骨細胞に対するSCDFの影響について、

SCDFは、ウサギ成長肋軟骨培養細胞に対してソマトメジン様作用を有していた。しかし、ウシ胎仔軟骨由来のCDFとは異なった生物活性を示した。すなわち、DNA合成および

総蛋白量の増加に対して、図1および図9に示したように、SCDFはCDFに比べ著しく強力な促進活性を有した。しかし、軟骨基質合成において、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みで測定したGAG合成(図6:上段)に対する促進活性は、SCDFはCDFより低かった。一方、プロテオグリカンへの $^{3\text{H}}$ -グルコサミンの取り込みに対しては、図6の下段に示したように、特にCM3が著しく強力な促進活性を有した。また、 $^{3\text{H}}$ -セリンの取り込みで測定したプロテオグリカン・コア蛋白の合成(図7:下段)に対して、SCDFはCDFとほぼ同程度の促進活性を有した。すなわち、SCDFは軟骨基質の主成分であるプロテオグリカン全分子の合成を促進するか、CDFとは異った型の軟骨基質の合成を促進することが示唆された。

さらに、線維芽細胞であるBALB/3T3細胞に対してSCDFはDNA合成促進作用を有し(図11)、その最大促進活性はソマトメジンの1つであるMSAよりも著しく強力であった。

。また、FGFより高濃度を要するものの、SCDFはBALB/3T3細胞に対してFGFとほぼ同等のDNA合成促進作用を示した。

これらのことから、SCDFは軟骨細胞あるいは線維芽細胞に対して強力なマイトジェンとして作用するものの、ソマトメジンとして軟骨細胞の分化機能発現の指標となる軟骨基質合成に対しては、CDFやMSAほど強力な活性を有しないことが判明した。また、線維芽細胞の増殖が軟骨由来の成長因子によって促進されることから、生体において軟骨の周囲に存在する軟骨膜や関節胞などの軟組織に対しても、骨格の成長に伴った成長を軟骨が促進している可能性が示唆された。

次に、FGFは図8および図9に示すように、成長助軟骨細胞のDNA合成および総蛋白質量の増加に対して促進作用を示した。FGFは本来線維芽細胞の強力な成長促進因子としてGospodarowicz²⁹⁻³⁰⁾によって分離され、0.1~1mg/mlより3T3細胞の増殖を著しく促進するが、筋

原細胞³¹⁾や軟骨細胞²⁷⁾に対しても増殖促進作用を有しており、軟骨細胞に対しては $1 \sim 10 \text{ ng/ml}$ でDNA合成促進作用を発現することが知られている。しかし、その軟骨基質合成は促進しない。このことは予備実験においても同様の結果を得ている。また、カエルを用いた再生組織の実験においてGospodarowicz³²⁾らは、FGFによつて未分化な細胞の増殖が促進されることを報告していることから、本研究においてFGFは、十分に分化した軟骨細胞よりも、より未分化な軟骨細胞に対して、また、軟骨細胞の分化よりも増殖に対して促進作用を示したものと考えられる。

一方、FGFはMSAと協同作用を示し、著しい相乗的増殖促進作用を示した(図8および図9)。このことは両者のレセプターが異なるだけでなく、細胞内でのMSAの作用発現経路に対してFGFが何らかの作用を有するためと考えられる。また、Kato³³⁾らはFGFとCDFによつても同様の相乗効果が認められることを

報告している。しかし、SCDFは成長助軟骨細胞に対して、FGFとMSAの相乗作用に匹敵するDNA合成および総蛋白質量増加の促進作用を示した。このように、SCDFの軟骨基質合成能はCDFやMSAに比べて弱いにもかかわらず、増殖促進能が著しく強力であることは、CDFが将来骨化する能力を有する硝子軟骨に由来するのに対し、SCDFは骨化することのない線維軟骨に由来していることに起因するのかもしれない。また、成長因子の変遷を考える上で、FGFのように、細胞の増殖を促進する能力のみ有する一般的な成長因子から、CDFやMSAのような、細胞の増殖と分化を同時に促進する能力を兼ね備えたソマトメジンへの、成長因子そのものの進化において、SCDFはその中間的なものである可能性が考えられる。そしてその作用発現の経路については、予備実験において、Swiss 3T3細胞を用いたradioreceptor assayではSCDFとCDFが交叉反応を示さなかったこと、また、CDF

とMSAが成長助軟骨細胞に対して相乗作用を示さないこと³³⁾などから、軟骨細胞の表面においても、SCDFはCDFあるいはMSAのレセプターを介さないで独自のレセプターを介するか、あるいは直接または間接に異った経路で軟骨細胞に対する作用を発現しているものと考えられる。

3. 顔面骨格に存在する軟骨細胞に対するSCDFの影響

顔面骨格の成長に対して、顔面の中央に位置する鼻中隔軟骨あるいは下顎頭に存在する軟骨の役割が注目され、歯科矯正学的観点からはもとより解剖学的観点からも多数の研究が行われ、次のような様々な考え方が述べられてきた。すなわち、Scott^{2,3)}は正常なヒトの観察によ³⁴⁾って、Ohyama³⁵⁾, Sarnat³⁶⁾, Catala³⁷⁾らは動物実験によ³⁸⁾って、また、Ackerman, Harveyらはヒトにおける鼻中隔欠損症例の検討によ³⁹⁾って、中顔面の成長における鼻中隔軟骨の重要性を主張し、特に幼児期の上顎の成長にお

いて鼻中隔軟骨が重要であることを示唆した。
 。しかし、^{4,5)}Moss, ³⁹⁾Koski, ⁴⁰⁾Melsen, ⁴¹⁾Frengらはヒトにおける鼻中隔軟骨は重要な成長部位ではなく、鼻の支持体にすぎないと主張した。中顔面の成長が完全に鼻中隔軟骨の成長に依存して生じると考えることは行きすぎであろうが、軟骨頭蓋の延長として顔面の中央に存在する鼻中隔軟骨が、中顔面の成長に二次的にしか寄与しないとは考えにくい。すなわち、⁴²⁻⁴⁶⁾Searlsはラットを用いて、⁴⁷⁾Lathamはヒト胎児の観察によつて、鼻中隔軟骨は胎生期において中顔面の主要な成長の場であり、生直後までその成長は維持されるが、徐々にその重要性は減少することを示唆している。

一方、下顎頭軟骨について、Weinman and Sicher¹⁾は、下顎頭軟骨が下顎骨全体の大きさを決定する重要なgrowth centreであると考えたが、^{2,3)}Scott, ^{4,5)}Moss, ³⁹⁾Koski, ^{48,49)}Petrovicらは下顎骨の成長は機能的・環境的要因が支配しており、下顎頭軟骨には二次的な成長があるのみで

、一次的な成長部位とは考えられないと主張した。膜性骨である下顎骨の成長が、発生学的には二次軟骨に分類される下顎頭軟骨の成長に大半を依存するという考えはほとんど否定されているが、下顎骨の成長における下顎頭軟骨の成長能力が全く無視されているわけではない。すなわち、^{50,51)} Røning, ^{52,53)} Duterloo, ^{54,55)} Meikle, ⁵⁶⁾ 岡田, ⁵⁷⁾ 中邨らによる移植実験では、下顎頭軟骨は機能的・外的要因を除去しても軟骨としての成長能力は十分に保持するが、軟骨形成を維持するためには機能的・外的要因が必要であり、また、下顎頭部の形態的骨改造を行うためにも機能的・外的要因が必要であることが示唆されている。

このように、顔面骨格に存在する軟骨の成長能力について様々な方法で研究が行われてきたが、明解な答は得られていない。本研究では、鼻中隔および下顎頭の軟骨について、従来ほとんど試みられたことのない軟骨細胞培養系を用いて、これらの軟骨細胞などのよ

うな成長の特性を有するかということの究明を試みた。その結果、これらの軟骨細胞は S CDF のみならず、CDF, MSA, FGF, EGF などの成長因子に対しても DNA 合成あるいは蛋白合成において応答し、ソマトメジン作用を有する CDF や MSA に対しては GAG 合成においても応答することが明らかとなった。このことは、鼻中隔および下顎頭軟骨細胞が培養系において、十分に分化機能を維持し増殖を行うことを示すものである。

まず、DNA 合成における鼻中隔および下顎頭軟骨細胞の反応について、SCDF の CM-3 を用いた DNA 合成促進作用の経時的な変化は図 13 に示すように、添加 24 時間で最大促進反応を示し、成長財軟骨細胞の場合（図 8）とほぼ一致した。この事実から、これら 3 種類の軟骨細胞の細胞周期における S 期の長さはほぼ等しいことが示された。また、SCDF の CM-2 および CM-3 に対する用量反応性においても（図 12-a, b）、10 ~ 20 $\mu\text{g/ml}$ で最大促進反応に

達しており、両者と成長肋軟骨細胞の用量反応性(図2)との間に差を認めていない。

しかし、SCDFが最大促進活性を示したとき、成長肋軟骨細胞は対照の10倍以上の促進反応を示した(図2)のに対し、鼻中隔および下顎頭軟骨細胞は対照の2倍たらずの反応しか示さなかった(図13-a・b)。また、MSA、CDF、FGF、EGFなど他の成長因子によるDNA合成促進刺激に対する鼻中隔および下顎頭軟骨細胞の反応も、SCDFに対する反応とほぼ同程度であつた(図16-a・b)。このように、鼻中隔および下顎頭軟骨細胞のDNA合成促進刺激に対する応答性が、成長肋軟骨細胞に比べて低い理由として以下のようなことが考えられる。

まず、個体の成長・発育における軟骨の成長時期が部位によつて異なることが考えられる。すなわち、Searls⁴²⁻⁴⁶⁾はラットの鼻中隔軟骨の成長は胎生期において最も著しいことを報告している。本研究で用いた動物はウサギであ

るが、離乳期の動物であり、生後の軟骨の成長は残っているものの、その最大成長を示す時期はすでに過ぎていっているのではないかと考えられる。

次に、成長助軟骨細胞は助軟骨のうち静止助軟骨を除いて分離した細胞であるが、鼻中隔軟骨は Sarnat³⁵⁾、堀坂⁵⁸⁾らのラットを用いた研究によると、その主な成長部位は肋骨鉛直板との接合部であり、残りの大部分を占める軟骨は大きな成長を示さない静止軟骨である。一方、下顎頭軟骨は発生学的には二次軟骨であり、構造的には長管骨の骨端軟骨と関節軟骨の両方の機能を兼ね備えている⁵⁹⁾。しかし、いずれの軟骨においても、成長の旺盛な部分と静止状態の部分とを分離して軟骨細胞を得ることはきわめて困難なため、本研究では両者を分離して培養していない。

さらに、著者ら⁶⁰⁾は下垂体摘出ラットを用いた組織培養実験において、成長助軟骨および静止助軟骨とともに、正常ラット由来の助軟

骨に比べ分子量の小さいプロテオグリカンを合成したのに対し、鼻中隔軟骨は正常ラットのものと変わらず、成長ホルモン欠如に対する感受性が低いことをすでに報告している。

以上に述べた事実によって、実験に用いた軟骨細胞が同じ動物から分離されたにもかかわらず、DNA合成促進刺激に対する応答性が異ったのではないかと考えられる。

一方、軟骨細胞としての分化機能の発現において、図12-a,bに示したように、鼻中隔および下顎頭軟骨細胞はともにSCDFに対して成長助軟骨細胞(図6:上段)とほぼ同程度の応答性を示した。すなわち、GAG合成で測定した軟骨基質合成において、両者ともSCDFに対して対照の1.5倍程度の促進反応を示した。また、MSAやCDFに対しても(図16-a,b)鼻中隔および下顎頭軟骨細胞は、GAG合成において対照の1.5倍前後の促進反応を示し、SCDFとほぼ同程度に反応した。しかし、FGFあるいはEGFに対して鼻中隔および下顎頭軟骨

細胞は、DNA合成促進刺激に対して応答したが、GAG合成の促進は認められなかった。EGFは上皮組織の増殖と角化を促進する因子として分離され、3T3細胞⁶¹⁾・ヒト線維芽細胞⁶²⁾などにおいてそのDNA合成を促進することが知られている。さらに、ラット胎仔のcalvariaのコラーゲン合成阻害⁶³⁾あるいはラット胎仔の口蓋閉鎖阻害⁶⁴⁾などの阻害効果の報告もあり、EGFは未分化な細胞に対して種特異性のない作用を有すると考えられている。本研究においてもEGFは、軟骨細胞に対してその分化に対するよりも、分化機能の亢進を伴わない増殖促進作用を発現したものと考えられる。

ところで、0.3% FCS添加DMEM中で4日間軟骨細胞を培養したとき、図14に示したように、鼻中隔軟骨細胞においてその総蛋白質量が増加しているのに対し、下顎頭軟骨細胞では鼻中隔軟骨細胞の接種密度の4倍という好条件で接種したにもかかわらず、その総蛋白質量は減少した。このことは、両者の軟骨細胞が

有する増殖能力の差を示すものであろう。

すなわち、すでに報告したように、⁶⁰⁾下垂体摘出ラットを用いた実験によると、鼻中隔軟骨は成長ホルモン欠如による影響を受けにくいこと、予備実験によると、ウシ胎仔の鼻中隔軟骨中にはCDFと同等のソマトメジン様活性を有する成長因子が存在すること、さらに、ラットの鼻中隔軟骨に対する抗体が中顔面の成長・発育を低下せるという報告⁶⁵⁾があることなどから、鼻中隔軟骨が他の組織に由来する各種の成長因子による調節とは別に独自の成長能力を有し、胎生期の顔面骨格の成長のみならず、生後の中顔面の成長においても、鼻中隔軟骨は重要な役割を果たす部位の一つとして無視できないものであろう。

一方、下顎頭軟骨細胞については、著者ら⁶⁶⁾が先に報告したように、軟骨細胞としての分化機能を維持したまま増殖するために、下顎頭軟骨細胞は鼻中隔軟骨細胞の4倍の接種密度を要する。これは実際に生体においても、

鼻中隔軟骨が軟骨基質に富み細胞密度が低い
 のに対し、下顎頭軟骨では軟骨基質が少なく
 細胞密度が高いことと一致している。さらに
 、McNamara,⁶⁷⁾ Ghafari⁶⁸⁾らによる動物実験では、
 下顎頭軟骨は二次軟骨でありながら関節軟骨
 とは異なり、むしろ骨端軟骨に類似した旺盛な
 成長能力を有し、機能的・外的要因に対する
 高度な適応能力を有することか示唆されてい
 る。このことは本研究において、下顎頭軟骨
 細胞が⁶⁶⁾高い細胞密度を要し、培養条件の悪化
 によって著しく影響を受けるものの、適切な
 培養条件下では十分に軟骨細胞の分化機能を
 維持して増殖することと一致するであろう。
 従って、下顎頭軟骨は下顎骨の主要な成長の
 中心ではないが、下顎骨全体の正常な形態形
 成をもたらすためにきわめて重要な働きをし
 ていると考えられる。すなわち、下顎骨体部
 の膜性の成長・歯の萌出・咀嚼機能の発達な
 どに適応した顎関節部の機能を満足すること
 が、下顎骨全体の正常な成長には必要である

か、機能的・外的刺激に対して十分な分化機能と適切な増殖能を有する下顎頭軟骨が存在することは、下顎頭部の主要な成長・改造部位としてきわめて重要であると考えられる。

以上のことから、生体において軟骨は、軟骨自身が生産する成長因子によ、てその成長を促進するとともに、隣在組織の成長をも促進するが、逆に、隣在組織に由来する各種の成長因子によ、てもまた、軟骨の成長は影響をうけていると言えよう。しかし、軟骨をとりまくこれらの成長因子以外に、軟骨細胞自体のこれら成長因子に対する応答性の差異によ、ても、軟骨の成長は調節されていると考えられる。

結 論

1) サメヒレ軟骨より、1 M グアニジン塩酸抽出・アセトン分画・イオン交換クロマトグラフィー・限外濾過などの方法により、サメ軟骨由来因子；Shark Cartilage Derived Factor (SCDF) を部分精製した。

2) SCDF は、高速液体クロマトグラフィーによって高度に精製された。SCDF は他の蛋白に比べきわめて疎水性が強く、その精製に逆相カラムが有効であった。

3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、サメ軟骨中には、分子量12,000~13,000, 17,500, 17,500, 21,500 の少くとも4種類のSCDF 活性を有する物質が存在することが明らかとなった。

4) SCDF をウサギ成長肋軟骨細胞培養系に添加して、その増殖に対する影響を検討した。その結果、ウシ胎仔軟骨由来因子；Cartilage-derived Factor (CDF) に比べSCD

Fは、 ^3H -チミジンの細胞への取り込みを著しく促進し、総蛋白量の増加に対しても強力な促進作用を示した。

5) SCDFは、軟骨細胞の分化機能発現の指標の1つである軟骨基質合成において、その主成分であるプロテオグリカンの合成に対しても促進作用を有した。 ^3H -カルコサミンの取り込みに対して、SCDFはCDFより強力な促進作用を示し、糖鎖の伸長を強かに促進したが、 $[\text{}^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みで測定したその硫酸化に対しては、CDFほど強力な促進作用を示さなかった。一方、プロテオグリカン・コア蛋白への ^3H -セリンの取り込みに対して、SCDFはCDFと同等の促進作用を示し、プロテオグリカン分子全体の合成を促進することが明らかとなった。このように、SCDFはソマトメジン様作用を有するものの、CDFやソマトメジンの1つであるMultiplication Stimulating Activity (MSA)とは異なった型の軟骨基質の合成を促進することが示

唆された。

6) SCDFは、ウサギ成長肋軟骨細胞のみならず、ウシ胎仔四肢関節軟骨細胞や線維芽細胞であるBALB/3T3細胞に対しても、その増殖を促進した。

7) 脊椎動物中最も高等な哺乳動物に属するウシの軟骨中に存在する成長因子が、最も下等な軟骨魚類のサメの軟骨中にも存在することが明らかとなった。このことは、系統発生の学的観点から、すべての脊椎動物において、軟骨は軟骨自身の成長を促進する因子をその局所で産生していることを示唆するものである。

8) 顔面骨格に存在する鼻中隔軟骨および下顎頭軟骨より分離した軟骨細胞に対しても、SCDFはソマトメジン様作用を有した。すなわち、鼻中隔および下顎頭軟骨細胞はともにSCDFによる増殖促進刺激および軟骨基質合成促進刺激に対して応答した。しかし、軟骨基質合成において、これらの軟骨細胞は成長

肋軟骨細胞と同程度に反応したにもかかわらず、DNA合成においては、成長肋軟骨細胞ほど著しい反応を示さなかった。この事実により、顔面骨格に存在する鼻中隔軟骨および下顎頭軟骨は、成長肋軟骨に代表される骨端軟骨に比べ、軟骨としての分化機能は十分保持するが、増殖能は骨端軟骨ほど強力ではないことが示唆された。

9) SCDFのみならず、MSAやCDFも鼻中隔および下顎頭軟骨細胞に対して、DNA合成および軟骨基質合成を促進した。しかし、線維芽細胞増殖因子(FGF)および上皮細胞増殖因子(EGF)は、これらの軟骨細胞に対してDNA合成のみ促進し、軟骨基質合成は促進しなかった。

10) 鼻中隔および下顎頭軟骨細胞を0.3%ウシ胎仔血清添加培養液中で培養すると、鼻中隔軟骨細胞は成長肋軟骨細胞と同様に、その総蛋白量が増加したのに対し、下顎頭軟骨細胞では減少を示し、細胞の形態も悪化した。し

かし、SCDFあるいはCDFの存在下では、下顎頭軟骨細胞は鼻中隔軟骨細胞と同様の良好な増殖を示した。すなわち、下顎頭軟骨細胞は鼻中隔軟骨細胞や成長肋軟骨細胞に比べ、環境条件の悪化によって影響を受けやすいか、良好な環境条件下では、十分に軟骨細胞としての分化機能を維持したまま増殖することが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、本研究を実施する機会を与えて頂き、終始熱心なご指導とご校閲を賜った歯科矯正学講座作田亨教授に謹んで感謝の意を表しますとともに、本研究にあたり、適切なご助言とご校閲を賜った生化学講座鈴木不二男教授に深く感謝致します。また、研究に際し終始ご指導とご教示を頂いた生化学講座加藤幸夫講師ならびに歯科矯正学講座岡田充泰博士に心から謝意を表します。さらに、BALB/3T3細胞に対するSCDFの効果を検討して頂いた金沢医科大学第二生化学講座西川克三教授に厚くお礼を申し上げます。また、サメ軟骨を供与して頂いた生化学工業山本龍人氏に心よりお礼を申し上げます。最後に、多くの貴重なご援助とご助言を頂きました歯科矯正学講座ならびに生化学講座の皆様方に深謝致します。

文 献

- 1) Weinman, J.P. and Sicher, H. (1964): Bone and bones. ed. 2, Henry Kimpton, London.
- 2) Scott, J.H. (1954): The growth of the human face. Proc. Roy. Soc. Med., 47, 91-100.
- 3) Scott, J.M. (1958): Further studies on the growth of the human face. Proc. Roy. Soc. Med., 52, 263-268.
- 4) Moss, M.L. (1962): Vistas in orthodontics. (Klaus, B.S. and Riedel, R.A., editor) Lea and Febiger, Philadelphia, 85-98.
- 5) Moss, M.L. (1968): The primacy of functional matrices in orofacial growth. Dent. Practit., 19, 65-73.
- 6) Chchinov, R.H. and Daughaday, W.H. (1976): Current concepts of somatomedin and other biologically related growth factors. Diabetes, 25, 994-1004.
- 7) 野村慶雄 (1981): ウシ胎児軟骨より分離した細胞増殖・分化促進因子に関する研究, I. 作用機作: ソマトメジン様作用. 阪大歯誌, 26, 121-136, 昭和 56.
- 8) 野村慶雄 (1981): ウシ胎児軟骨より分離した細胞増殖・分化促進因子に関する研究, II. 精製法の開発. 阪大歯誌, 26, 137-147, 昭和 56.
- 9) Kato, Y., Nomura, Y., Tsuji, M., Watanabe, R. and Suzuki, F.

- (1980): A factor in conditioned medium of rabbit costal chondrocytes stimulates their synthesis of sulfated glycosaminoglycans, RNA and DNA. Biochem. Intl., 1, 319-324.
- 10) Leammler, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- 11) Shimomura, Y., Yoneda, T. and Suzuki, F. (1975): Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. Calcif. Tiss. Res., 19, 179-184.
- 12) 岡田充泰・土居健夫・作田守・滝川正春・高野照子・鈴木不二男 (1980): ウサギ鼻中隔軟骨および下顎頭軟骨培養細胞の比較研究. 骨代謝, 13, 249-256, 昭和55.
- 13) Solursh, M. and Meier, S. (1972): The requirement for RNA synthesis in the differentiation of cultured chick embryo chondrocytes. J. Exp. Zool., 181, 253-262.
- 14) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 15) Salmon, W.D. Jr. and Daughaday, W.H. (1956): Sulfation factor, a serum component mediating the action of growth hormone in stimulating incorporation of sulfate into cartilage. J. Clin. Invest., 35, 733.

- 16) Salmon, W.D.Jr. and Daughaday, W.H. (1957): A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. J.Lab.Clin.Med., 49, 825-836.
- 17) Fryklund, L., Uthne, K. and Sievertsson, H. (1974): Identification of two somatomedin A active polypeptides and in vivo effects of a somatomedin A concentrate. Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 957-962.
- 18) Van Wyk, J.J., Underwood, L.E., Baseman, J.B., Hintz, R.L., Clemmons, D.R. and Marshall, R.N. (1975): Exploration of the insulin like and growth-promoting properties of somatomedin by membrane receptor assays. Adv. Metab. Disord., 8, 127-150.
- 19) Rinderknecht, E. and Humbel, R.E. (1978): The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. J.Biol.Chem., 253, 2769-2776.
- 20) Rinderknecht, E. and Humbel, R.E. (1978): Primary structure of human insulin-like growth factor II. FEBS Lett., 89, 283-286.
- 21) Dulak, N.C. and Temin, H.M. (1973): A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication-stimulating activity for embryo fibroblasts. J.Cell.Physiol., 81, 153-160.

- 22) Dulak, N.C. and Temin, H.M. (1973): Multiplication-stimulating activity for chicken embryo fibroblasts from rat liver cell conditioned medium: A family of small peptides. J. Cell. Physiol., 81, 161-170.
- 23) Marquardt, H., Todaro, G.J., Henderson, L.E. and Oroszlan, S. (1981): Purification and primary structure of a polypeptide with multiplication-stimulating activity from rat liver cell culture: Homology with human insulin-like growth factor I. J. Biol. Chem., 256, 6859-6865.
- 24) Klagsbrun, M., Langer, R., Levenson, R., Smith, S. and Lillehei, C. (1977): The stimulation of DNA synthesis and cell division in chondrocytes and 3T3 cells by a growth factor isolated from cartilage. Exp. Cell Res., 105, 99-108.
- 25) Klagsbrun, M. and Smith, S. (1980): Purification of a cartilage-derived growth factor. J. Biol. Chem., 255, 10859-10866.
- 26) Canalis, E., Peck, W.A. and Raisz, L.G. (1980): Stimulation of DNA and collagen synthesis by autologous growth factor in cultured fetal rat calvaria. Science, 210, 1021-1023.
- 27) Kato, Y., Watanabe, R., Hiraki, Y., Suzuki, F., Canalis, E., Raisz, L.G., Nishikawa, K. and Adachi, K. (1982): Selective stimulation of sulfated glycosaminoglycan synthesis by

multiplication-stimulating activity, cartilage-derived factor and bone-derived growth factor; comparison of their actions on cultured chondrocytes with those of fibroblast growth factor and rhodamine fibrosarcoma-derived growth factor. Biochem. Biophys. Acta, 716, 232-239.

28) Gospodarowicz, D. (1975): Purification of fibroblast growth factor from bovine pituitary. J. Biol. Chem., 250, 2515-2520.

29) Gospodarowicz, D. and Moran, J. S. (1974): Stimulation of division of sparse and confluent 3T3 cell populations by a fibroblast growth factor, dexamethasone, and insulin. Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 4584-4588.

30) Gospodarowicz, D. and Moran, J. (1974): Effect of a fibroblast growth factor, insulin, dexamethasone, and serum on morphology of BALB/c3T3 cells. Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 4648-4652.

31) Gospodarowicz, D., Westman, J., Moran, J. A. and Lindstrom, J. (1976): Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion on bovine myoblasts. J. Cell. Biol., 70, 395-405.

32) Gospodarowicz, D., Rudland, P., Lindstrom, J. and Benirschke, K. (1975): Fibroblast growth factor: its location, purification, mode of action and physiological significance. Adv. Metab. Disord., 8, 302-335.

- 33) Kato, Y., Hiraki, Y., Inoue, H., Kinoshita, M., Yutani, Y. and Suzuki, F. (1983): Differential and synergistic action of somatomedin-like growth factors, fibroblast growth factor and epidermal growth factor and epidermal growth factor in rabbit costal chondrocytes. Eur. J. Biochem., in press.
- 34) Ohyama, K. (1969): Experimental study on growth and development of dentofacial complex after resection of cartilaginous nasal septum. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., 16, 157-176.
- 35) Sarnat, B.G. (1971): Surgical experimentation and gross potential growth of the face and jaws. J. Dent. Res., 50, 1462-1476.
- 36) Catala, A.E. and Johnston, L.E. (1980): Interstitial growth of septal cartilage in the young albino rat. J. Dent. Res., 59, 1453-1456.
- 37) Ackerman, J.L., Takagi, Y., Proffit, W.R. and Beat, M.J. (1965): Craniofacial growth and development in Cebopcephalia. Oral Surg., Oral Med. and Oral Path., 19, 543-554.
- 38) Harvey, K. (1973): The importance of the nasal septum in facial development. J. Laryng. Otol., 87, 379-386.
- 39) Koski, K. (1975): Morphogenesis and Malformation of Face and Brain. (Bergsma, D., editor). Birth Defects: Original

Article Series XI.7, Cartilage in the face, Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y., 231-254.

- 40) Melsen, B. (1977): Histological analysis of the postnatal development of the nasal septum. Angle Orthod., 47, 83-96.
- 41) Freng, A. and Kvam, E. (1979): Facial sagittal growth following partial, basal resection of the nasal septum: a retrospective study in man. Eur. J. Orthod., 1, 89-96.
- 42) Searls, J.C. and Kinser, D.D. (1972): Radioautographic study of chondrocytic proliferation in nasal septal cartilage of the 10-day-old rat. J. Dent. Res., 51, 812-818.
- 43) Searls, J.C. (1975): Radioautographic study of chondrocytic proliferation in nasal septal cartilage of the 5-day-old rat. Cleft Palate J., 12, 291-298.
- 44) Searls, J.C. (1976): A radioautographic study of chondrocytic proliferation in nasal septal cartilage of the prenatal rat. Cleft Palate J., 13, 330-342.
- 45) Searls, J.C. (1977): A radioautographic study of chondrocytic proliferation in nasal septal cartilage of the newborn rat. Am. J. Anat., 150, 559-564.
- 46) Searls, J.C. (1979): A comparative radiographic study of chondrocytic proliferation in nasal septal cartilage of the 5-day-old rat, rabbit, guinea pig and beagle. Am. J. Anat., 154, 437-446.
- 47) Latham, R.A. (1976): Factors affecting the growth of the

- midface, (McNamara, J.A. editor), Monograph 6, Center for Human Growth and Development, The University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 43-59.
- 48) Petrovic, A. (1974): Control of postnatal growth of the secondary cartilages of the mandible by mechanisms regulating occlusion, cybernetic model. Trans. Eur. Orthod. Soc., 50, 69-75.
- 49) Stutzmann, J. and Petrovic, A. (1979): Intrinsic regulation of the condylar cartilage growth rate. Eur. J. Orthod., 1, 41-54.
- 50) Rönning, O. (1966): Observations on the intracerebral transplantation of the mandibular condyle. Acta Odont. Scand., 24, ⁴43-⁴57.
- 51) Rönning, O. and Koski, K. (1969): The effect of the articular disc on the growth of condylar cartilage transplants. Trans. Eur. Orthod. Soc., 99-108.
- 52) Duterloo, H.S. (1967): In vivo implantation of the mandibular condyle of the rat. Ph.D. thesis. University of Nijmegen. Netherlands.
- 53) Duterloo, H.S. and Wolters, J.M. (1971): Experiments on the significance of the articular function as a stimulating chondrogenic factor for the growth of secondary cartilages of the rat mandible. Trans. Eur. Ortod. Soc., 103-115.
- 54) Meikle, M.C. (1973): In vivo transplantation of the mandi-

bular joint of the rat; An autoradiographic investigation into cellular changes at the condyle. Arch. Oral Biol., 18, 1011-1021.

55) Meikle, M.C. (1973): The role of the condyle in the post-natal growth of the mandible. Am. J. Orthod., 64, 50-62.

56) 岡田充泰 (1977): ラット下顎頭の発育に関する実験的研究 — 皮下移植した下顎頭の発育について — 阪大歯誌, 22, 21-45, 昭和52.

57) 中邨隆子 (1978): 器官培養下における幼若兔の下顎頭の成長発育について — ^3H -thymidine オートラジオグラフィによる観察 — 口病誌, 45, 618-636, 昭和53.

58) 堀坂孝 (1981): 上歯列弓の急速拡大に対する鼻中隔軟骨の反応 — オートラジオグラフィによる研究 — 阪大歯誌, 26, 359-380, 昭和56.

59) Sperber, G.H. (1976): Craniofacial Embryology. (Derrick, D., editor). Dental practitioner handbook No. 15, ed. 2., John Wright & Sons Ltd., Bristol., 121-123.

60) 浜本伸治・加藤幸夫・久米啓之・開祐司・
辻光子・高野照子・鈴木不二男・野村慶雄

・木下正彦・岡田充泰・大前博昭・作田守
(1982):下垂体摘出ラット肋軟骨成長軟骨
細胞・静止軟骨細胞および鼻中隔軟骨細胞
による70kDプロテオグリカン合成・骨代謝,15,183-
189,昭和57.

- 61) Rose, S.P., Prüss, R.M. and Herschman, H.R. (1975): Initiation of 3T3 fibroblast cell division by Epidermal Growth Factor. J. Cell. Physiol., 86, 593-598.
- 62) Lenbach, K.J. (1976): Enhanced synthesis and extracellular accumulation of hyaluronic acid during stimulation of quiescent human fibroblasts by mouse epidermal growth factor. J. Cell. Physiol., 89, 277-288.
- 63) Canalis, E. and Raisz, L. (1979): Effect of epidermal growth factor on bone formation in vitro. Endocrinology, 104, 862-869.
- 64) Hassell, J.R. and Pratt, R.M. (1977): Elevated levels of cAMP alters the effect of epidermal growth factor in vitro on programmed cell death in the secondary palatal epithelium. Exp. Cell. Res., 106, 55-62.
- 65) Hans, M.G. (1981): The effect of anti-nasal septal cartilage antibodies on midfacial growth and development. (Thesis abstract: Graber, T.M.), Am. J. Orthod., 80, 662-663.
- 66) 岡田充泰・大前博昭・作田守 (1981): 下顎

頭軟骨細胞の培養条件の検討, 日矯歯誌, 40, 66
- 172, 昭和 56.

67) McNamara, J.A. Jr. and Carlson, D.S. (1979): Quantitative analysis of temporomandibular joint adaptations to protrusive function. Am. J. Orthod., 76, 593-611.

68) Ghafari, J. and Heeley, J.D. (1982): Condylar adaptation to muscle alteration. Angle Orthod., 52, 26-37.

EFFECT OF SHARK-CARTILAGE DERIVED FACTOR
ON CHONDROCYTES FROM GROWTH COSTAL, NASAL
SEPTAL AND MANDIBULAR CONDYLAR CARTILAGES

Hiroaki OHMAE

Department of Orthodontics, Osaka University Dental School
3-48, Nakanoshima 4-chome, Kita-ku, Osaka, Japan

It has been widely accepted that growth hormone is important for skeletal growth and its effect is not a direct one but mediated by somatomedins. Recently, Kato et.al. isolated a local somatomedin-like growth factor from fetal bovine cartilage and named it cartilage-derived factor(CDF).

An attempt was made to extract and isolate a local somatomedin-like growth factor, shark-cartilage derived factor(SCDF), from the fin cartilage of shark, one of the most primitive vertebrates. It was found that the shark fin cartilage contains some SCDF-active substances with 12,000-21,500 daltons.

The purpose of this study was to investigate the characteristics of cartilaginous growth of the facial skeleton by comparing the response of chondrocytes to the growth factor, in vitro, obtained from rabbit costal, septal and condylar cartilages.

The following results were obtained.

1. SCDF stimulated the DNA synthesis more strongly than CDF in the rabbit costal chondrocytes. On the other hand, SCDF stimulated the GAG synthesis less strongly than CDF. Although SCDF stimulated the synthesis of different type of proteoglycans from CDF, it may be concluded that SCDF has the somatomedin-like activity. This suggests that the cartilage contains somatomedin-like growth factor that commonly contributes the cartilaginous growth of vertebrates.
2. SCDF stimulated the GAG synthesis in the septal and condylar chondrocytes in similar magnitudes as that in the costal chondrocytes. However, SCDF stimulated DNA synthesis in the septal and condylar chondrocytes less strongly than that in the costal chondrocytes.

Comparing the characteristics of the septal and condylar chondrocytes, both chondrocytes grew well in the medium supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS), while in the medium with 0.3% of FCS, the condylar chondrocytes grew poorly, although the septal chondrocytes grew well.

These findings suggest that the septal and condylar chondrocytes do not show high mitogenic response to the growth factor as the costal chondrocytes manifested, and

also the condylar cartilage is more susceptible to the environmental conditions than the costal and septal chondrocytes.

図の説明

図1 アセトン画分したサメヒレ軟骨抽出物の活性

0-45%のアセトン画分(100 μ g蛋白/ml), 45-65%のアセトン画分(100 μ g蛋白/ml), CDF(5 μ g蛋白/ml)あるいはウサギ成長肋軟骨細胞由来のconditioned medium(25倍濃縮標品25 μ l/ml)を添加して、0.3% FCS添加DMEM中でウサギ成長肋軟骨細胞を培養した。GAG合成(a)は各種成長因子添加6時間後に $[^{35}\text{S}]$ 硫酸0.25 μ Ciを添加してさらに18時間培養した。DNA合成(b)は各種成長因子添加20時間後に ^3H -4ミジン13 μ Ciを添加してさらに4時間培養した。GAG合成はCPC沈殿画分中の、DNA合成はTCA沈殿画分中の放射能を、それぞれ測定した。対照のdpm数は、GAG合成が2,469, DNA合成が3,131であった。SCDF活性は

45-65% アセトン画分に強く認められた。

A-SCDF: アセトン SCDF

C.M.: conditioned medium

図2 CM-Sephadex C-50 カラムで分画した SCDF の DNA 合成および RNA 合成に対する影響

DNA 合成 (上段): 0.3% FCS 添加 DMEM 中で成長助軟骨細胞に対し、各種濃度の SCDF 画分を添加し 20 時間後に ^3H -チミジン $1.3 \mu\text{Ci}$ を添加してさらに 4 時間培養した。

RNA 合成 (下段): 血清無添加 DMEM 中で成長助軟骨細胞に対し、各種濃度の SCDF 画分を添加し 2 時間後に ^3H -ウリジン $0.5 \mu\text{Ci}$ を添加してさらに 3 時間培養した。

CM2, CM3 の画分はアセトン SCDF に比べ、各々 10 倍あるいは 100 倍低い濃度で DNA 合成および RNA 合成促進活性を示した。

- : アセトン SCD F
- : CM-1 (0.25 M, pH 6.0 酢酸アンモニウム素通り画分)
- : CM-2 (1 M, pH 6.0 酢酸アンモニウム溶出画分)
- : CM-3 (0.3 N 食塩添加 1 M 酢酸アンモニウム溶出画分)

破線は対照の dpm を示す

図 3 CM-2 の活性画分の高速液体クロマトグラフィー逆相カラムの溶出像とその活性 G2000 SW カラムにてゲル濾過して得られた活性画分を逆相カラムに展開すると、いずれも Fr-1 のように、他の蛋白に比べてきわめて疎水性の強い部分に活性物質の溶出（点描部分）が認められた。このため、他の活性画分については、点描した活性画分の再クロマトグラフィーを行、たときの溶出像を示した。右縦軸は、イソプロピルアルコール対アセトニトリル =

トリルを7対3に混合した溶液の濃度を示す。CM2のFr-1は23分に、Fr-2は24分にそれぞれ活性物質の溶出が認められた。

図4 CM3の活性画分の高速液体クロマトグラフィー-逆相カラムの溶出像とその活性G2000SWカラムにてゲル濾過して得られた活性画分Fr-1およびFr-2を逆相カラムに展開し、得られた活性画分をCM2の場合と同様に、再クロマトグラフィーしたときの溶出像を示した。CM3のFr-1は23分に、Fr-2は20分と26分にそれぞれ活性物質の溶出（点描部分）が認められた。

図5 CM2およびCM3から得られた活性画分のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動高速液体クロマトグラフィー-逆相カラムによつて得られたCM2およびCM3の活

性画分について、SDS-ホリ アクリルアミドゲル電気泳動を行った。分子量の大きい順に CM3 の Fr-1 (A) は 21,500, Fr-2 (B) は 17,500, CM-2 の Fr-1 (C) は 17,500, Fr-2 (D) は 12,000~13,000 に相当する部位に、単一バンドとして泳動された。CM3 の Fr-2 は 20 分の溶出画分を用いた。

図 6 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸と ^3H -グルコサミンのプロテオグリカンへの取り込みに対する SCDF の影響

ウサギ成長肋軟骨細胞を、CM-2 (15 μg 蛋白 / ml), CM-3 (10 μg 蛋白 / ml) あるいは CDF (5 μg 蛋白 / ml) を添加した 0.3 % FCS 添加 DMEM 中で培養した。各種成長因子添加 6 時間後に、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸 0.25 μCi または ^3H -グルコサミン 0.5 μCi を添加してさらに 18 時間培養した。対照の dpm 数は、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みが 3,398, ^3H -

ガルコサミンの取り込みが 5318 であつた。
 ・ $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込みに対して CM2, CM
 -3 は CDF ほど強力な促進活性を示さなかつた(上段)。しかし、 ^3H -ガルコサミン
 の取り込みに対して CM3 が特に強力な促進
 活性を示した(下段)。

図7 ^3H -セリンの総蛋白質およびフロテオグリカン・コア蛋白質への取り込みに対する SCDF の影響

ウサギ成長肋軟骨細胞を CM2 (15 μg 蛋白質/ml), CM3 (10 μg 蛋白質/ml) あるいは CDF (5 μg 蛋白質/ml) を添加した 0.3% FCS 添加 DME M 中で培養した。各種成長因子添加 6 時間後に ^3H -セリン 0.5 μCi を添加してさらに 14 時間培養した。総蛋白質は TCA 不溶画分中の、フロテオグリカン・コア蛋白質は CPC 沈殿画分中の放射能を測定した。対照の dpm 数は、総蛋白質への取り込みは 33155、フロテオグリカン・

コア蛋白への取り込みは2,640であった。総蛋白質中への3H-セリンの取り込みに対する促進活性は、CDFに比べてCM2は弱かったがCM3は強かった(上段)。プロテオグリカン・コア蛋白への3H-セリンの取り込みに対するこれらの者の促進活性はほぼ同等であった(下段)。

図8 各種成長因子のDNA合成促進作用の経時的变化

成長肋軟骨細胞を、CM3, FGFあるいはFGFとMSAを添加した0.3% FCS添加DMEM中で培養した。3H-チミジン(1.3 μ Ci)は、培養終了4時間前に添加した。各種成長因子添加28時間後にDNA合成はピークに達し、CM3はFGFとMSAの協同効果に匹敵するDNA合成促進作用を示した。

□ : SCDF (CM3) (10 μ g 蛋白 / ml)

■ : FGF (0.3 μ g / ml)

● : FGF (0.3 μ g / ml) + MSA (0.5 μ g

/ ml)

対照、の dpm 数は 2,185 であつた。

図 9 各種成長因子の総蛋白量に対する影響
成長肋軟骨細胞を、培養3日目からの3% FCS 添加 DME M 中で培養を開始した。CDF (5 μ g 蛋白 / ml), MSA (0.5 μ g / ml), FGF (0.3 μ g / ml) あるいは CM-3 (10 μ g 蛋白 / ml) 存在下で4日間培養した。培養液は2日ごとに交換した。

control day 0 : 実験を開始したときの総蛋白量

control day 4 : 0.3% FCS 添加 DME M のみで4日間培養したときの総蛋白量

CM-3 は FGF と MSA の協同効果に匹敵する総蛋白量増加促進作用を示した。

図 10 ウシ胎仔四肢関節軟骨細胞に対する S CDF の影響

ウシ胎仔四肢関節より得た軟骨細胞を、培養3日目から0.3% FCS添加DMEM中で培養を開始した。CM3あるいはMSA存在下で2日又は5日間培養した。培養液は毎日交換した。0.3% FCS添加DMEMのみで培養した場合、その総蛋白量はほとんど増加しなかったが、CM3又はMSAを添加すると両者ともほぼ同程度に著しい総蛋白量の増加を示した。

□ : SCDF (CM3) ($10 \mu\text{g}$ 蛋白 / ml)

△ : MSA ($0.5 \mu\text{g}$ / ml)

▲ : 対照

図11 BALB/3T3細胞に対するSCDFの影響
BALB/3T3細胞を、0.2%ウシ血清添加DMEM中で培養を開始した。各種成長因子を添加して16時間後に ^3H -チミジン $50 \mu\text{Ci}$ を添加し、さらに3時間培養した。CM3はFGFより高濃度を要したが、 $1 \sim 2 \mu\text{g}$ 蛋白 / mlでBALB/3T3細胞のDNA合成を

著しく促進した。

■ : FGF

□ : SCDF (CM3)

▲ : ウシ血清

△ : MSA

図 12-a, b 鼻中隔および下顎頭軟骨細胞の DNA 合成および GAG 合成に対する SCDF の影響

鼻中隔軟骨細胞 (a) および下顎頭軟骨細胞 (b) を、DNA 合成については、0.3% FCS 添加 DMEM 中に各 SCDF 画分を添加し 20 時間後に ^3H -チミジン $1.3 \mu\text{Ci}$ を加えてさらに 4 時間培養し、GAG 合成については、6 時間後に $[^{35}\text{S}]$ 硫酸 $0.25 \mu\text{Ci}$ を加えてさらに 18 時間培養した。軟骨細胞は両者とも、CM-2, CM-3 に対してほぼ同様の用量反応性を示した。

○ : アセトン SCDF

● : CM2

□ : CM-3

図13 鼻中隔および下顎頭軟骨細胞のDNA合成に対するSCDFの促進作用の経時的変化

鼻中隔軟骨細胞(□)および下顎頭軟骨細胞(△)を、CM3(10μg蛋白/ml)を添加した0.3%FCS添加DMEM中で種々の時間培養した。3H-4ミジン1.3μCiは培養終了4時間前に添加した。鼻中隔および下顎頭軟骨細胞はともに、CM3添加24時間でDNA合成促進反応はピークに達した。

図14 鼻中隔軟骨細胞(NSC)および下顎頭軟骨細胞(MCC)の総蛋白質量の増加に対するSCDFあるいはCDFの影響

鼻中隔軟骨細胞(上段)および下顎頭軟骨細胞(下段)を、培養4日目から0.3%FCS添加DMEM中で培養を開始した。

CDF (5 μ g 蛋白 / ml), CM2 (15 μ g 蛋白 / ml) あるいは CM3 (10 μ g 蛋白 / ml) の存在下で4日間培養した。培養液は毎日交換した。

cont. day0 : 実験を開始したときの総蛋白量

cont. day 4 : 0.3% FCS 添加 DMEM のみで4日間培養したときの総蛋白量

CM2, CM3 は CDF と同等の総蛋白量増加促進能を示した。

図15 鼻中隔軟骨細胞 (NSC) および下顎頭軟骨細胞 (MCC) の増殖像に対する SCD F あるいは CDF の影響

図14に示した対照および各実験群における軟骨細胞の増殖の様相を位相差顕微鏡写真で示した。鼻中隔および下顎頭軟骨細胞はともに、CM2, CM3 あるいは CDF の添加によって良好な増殖像を示した。

図16-a.b 鼻中隔および下顎頭軟骨細胞のDNA合成およびGAG合成に対する各種成長因子の影響

鼻中隔軟骨細胞(a)および下顎頭軟骨細胞(b)を、CM-2 (15 μ g 蛋白 / ml), CM-3 (10 μ g 蛋白 / ml), MSA (0.5 μ g / ml), CDF (5 μ g 蛋白 / ml), FGF (0.3 μ g / ml) あるいはEGF (5 ng / ml) を添加した0.3% FCS 添加 DMEM 中で培養した。

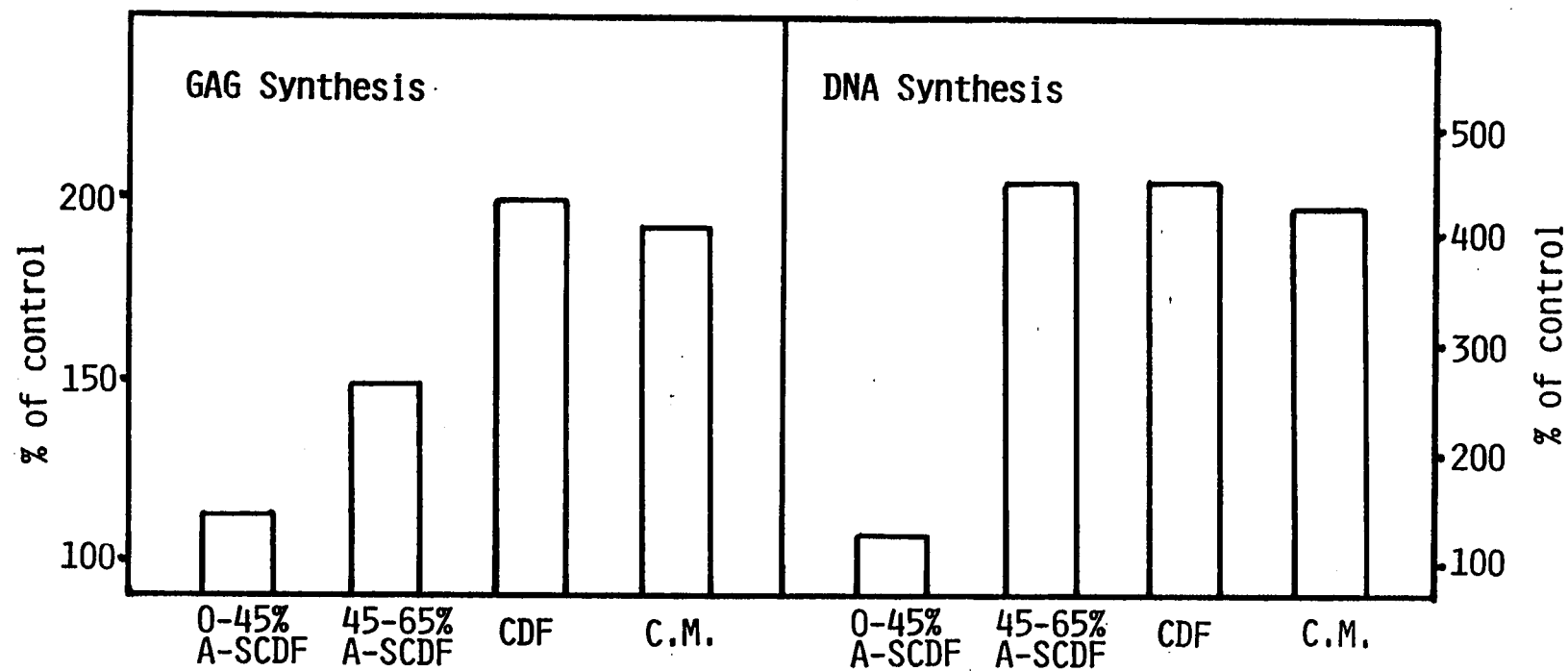
DNA合成(上段): 各種成長因子添加20時間後に³H-4 ミジン 1.3 μ Ci を添加してさらに4時間培養した。

GAG合成(下段): 各種成長因子添加4時間後に³⁵S 硫酸 0.25 μ Ci を添加してさらに18時間培養した。

鼻中隔および下顎頭軟骨細胞は両者ともDNA合成において、いずれの成長因子に

対してもほぼ同程度の促進反応を示した。
GAG合成において、FGFとEGFは促進
活性を示さなかった。

図 1



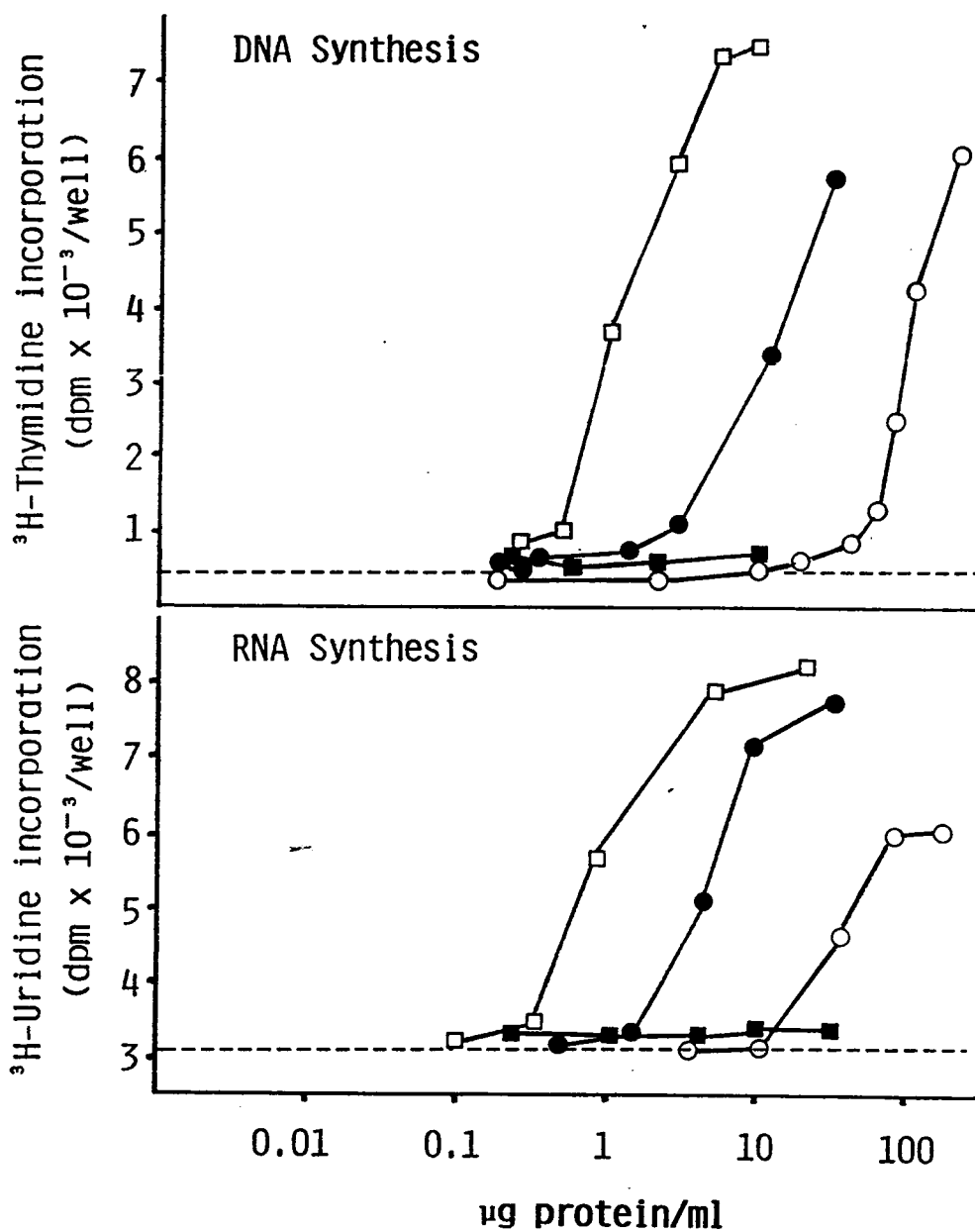


図 3.

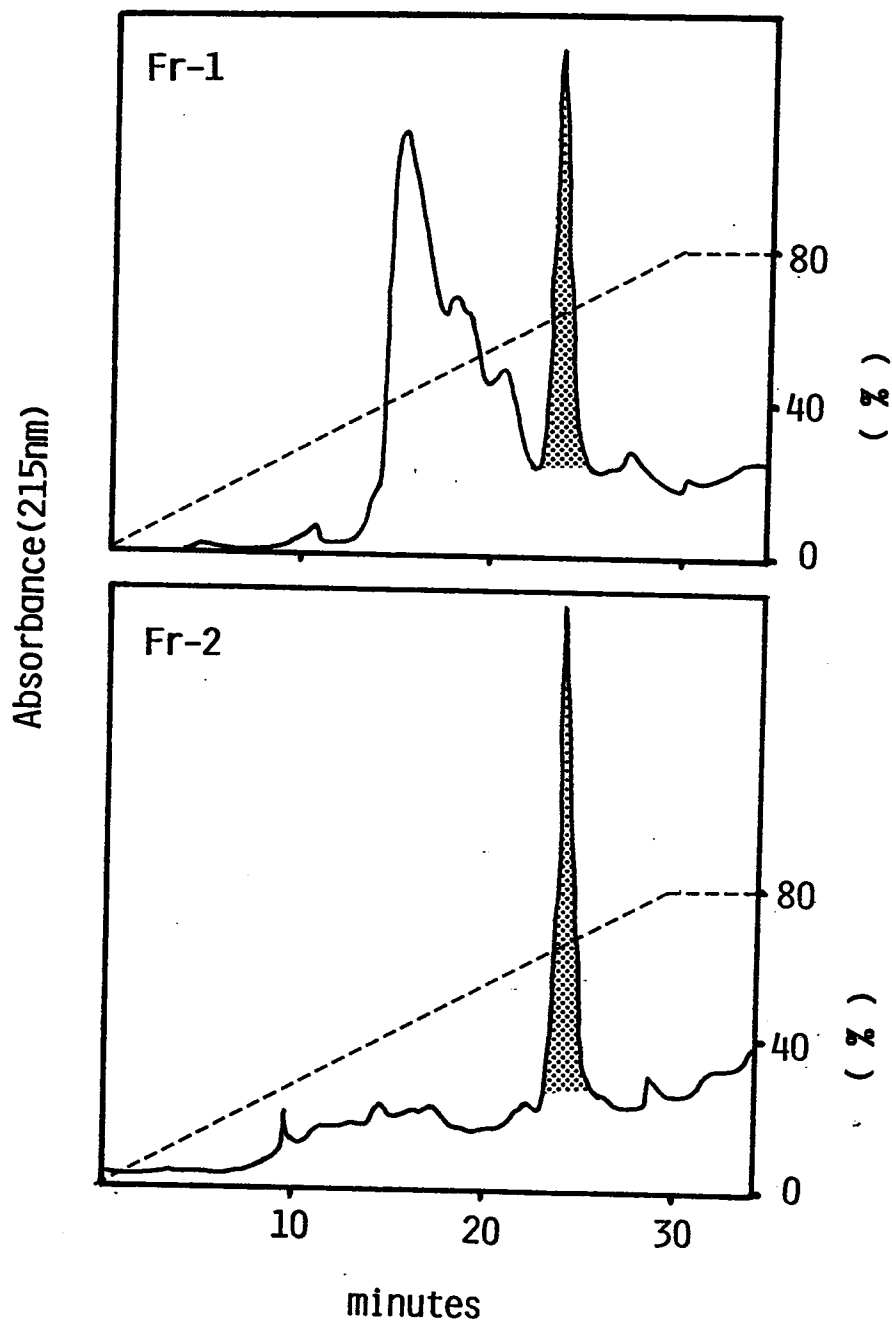
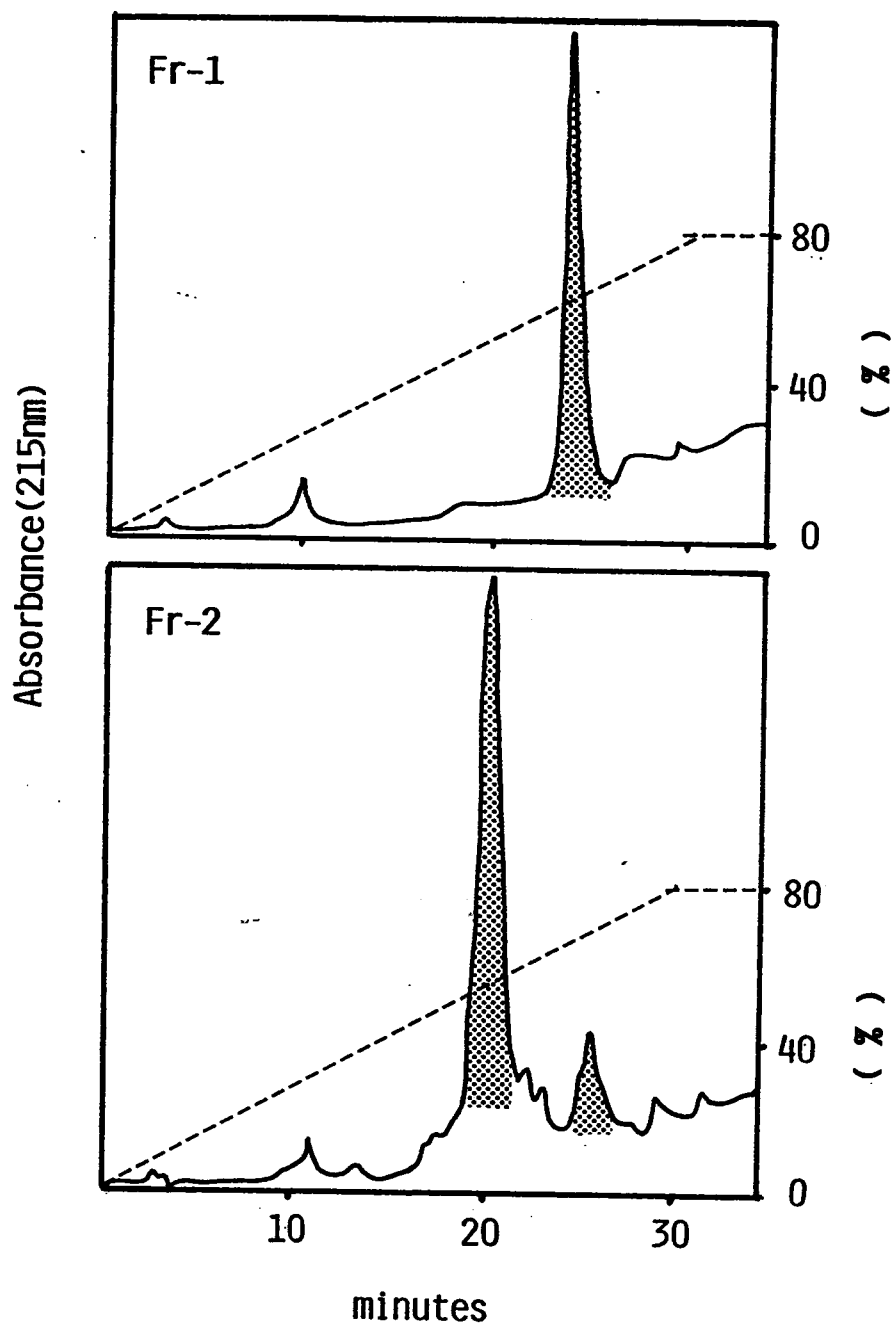
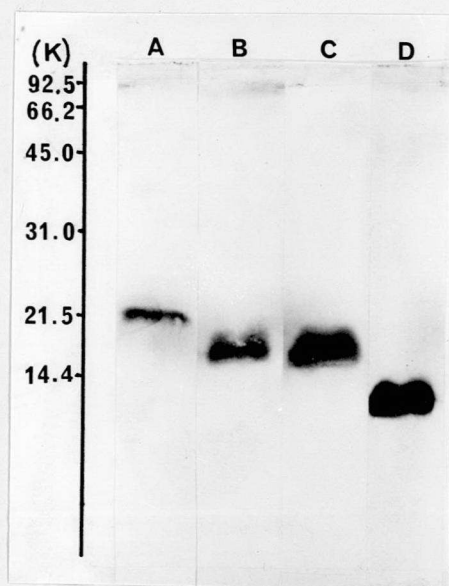


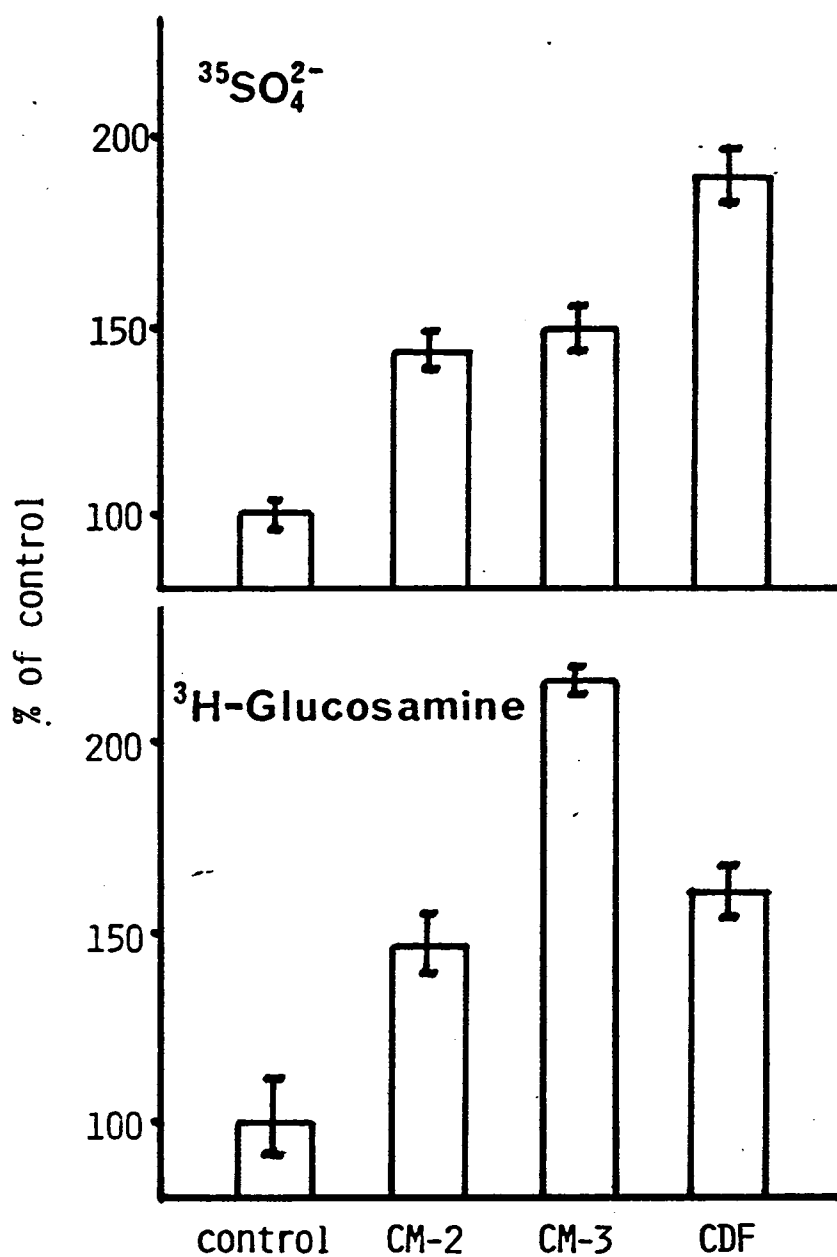
図 4

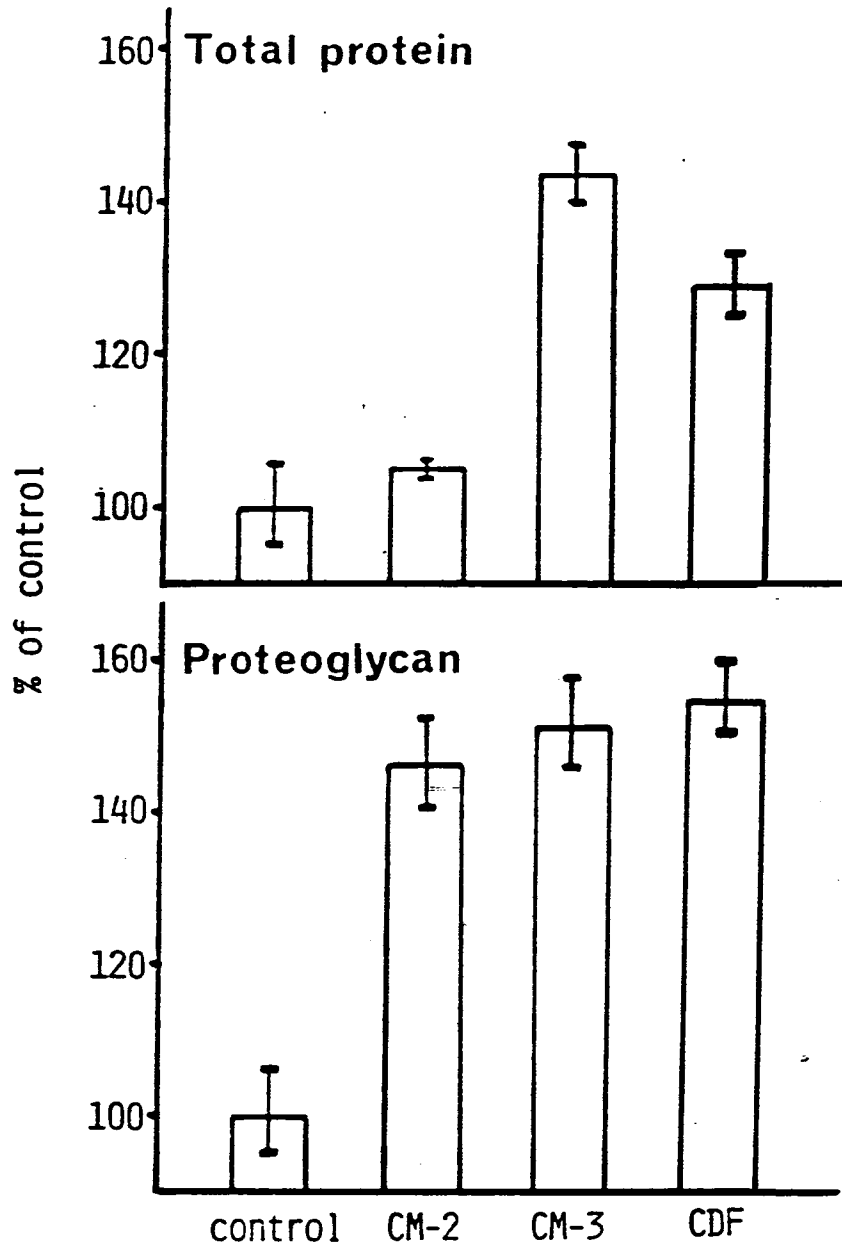


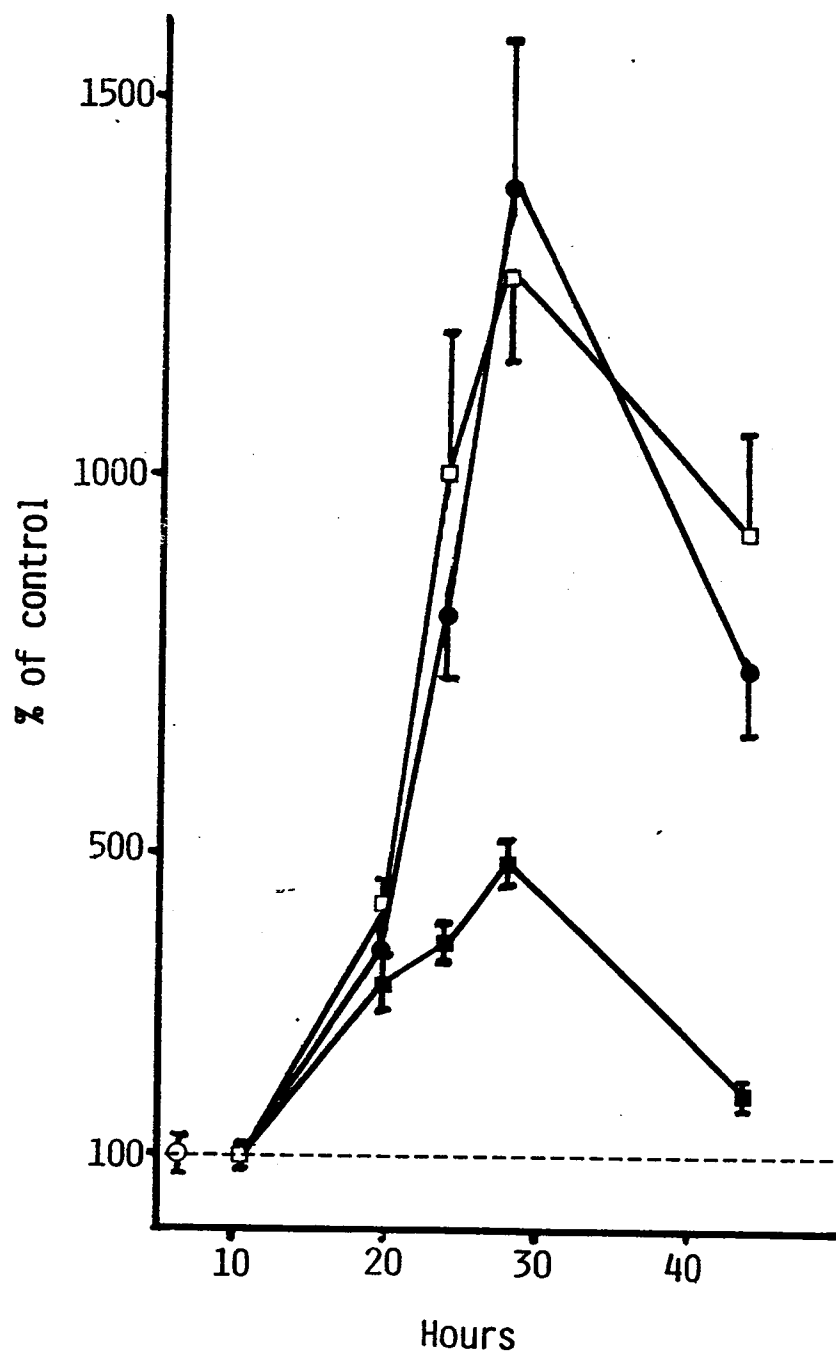
5



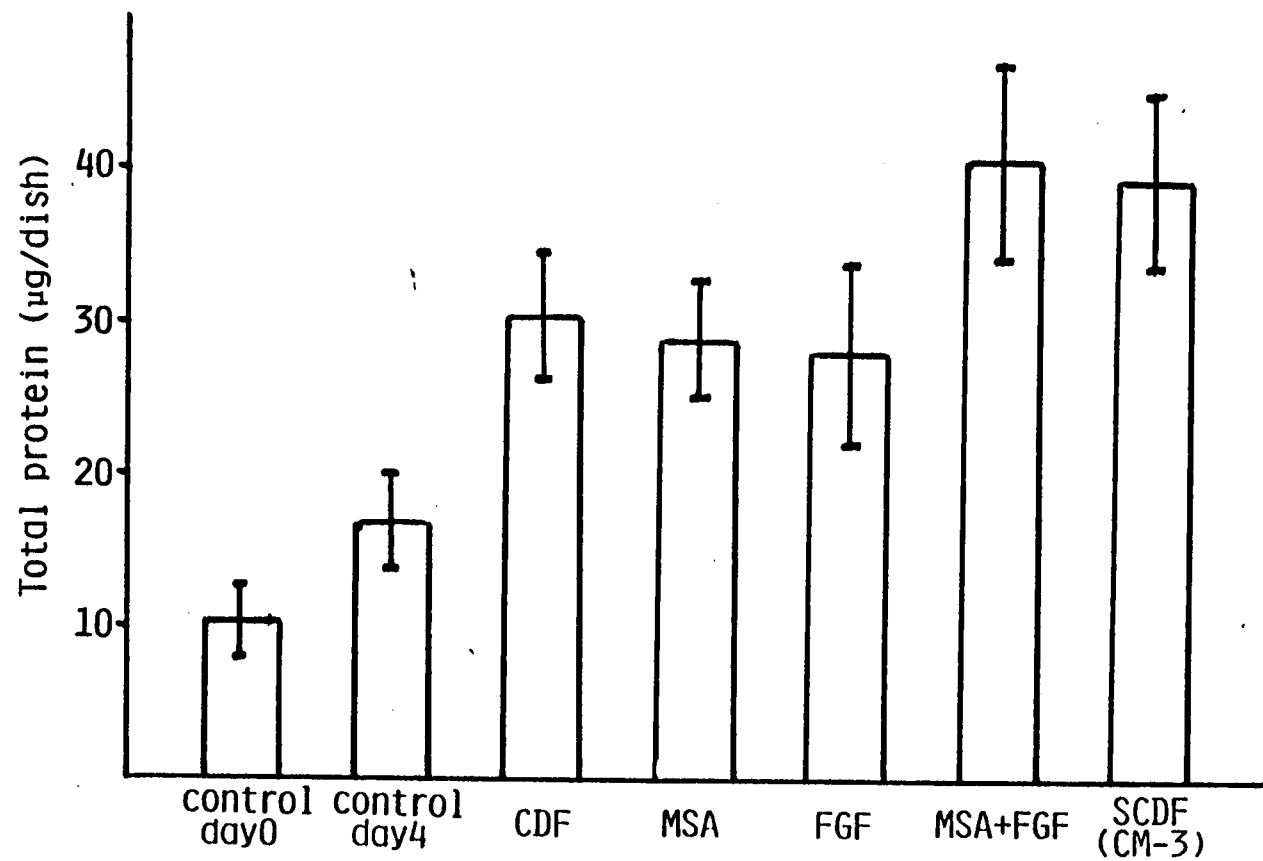
↑
大前





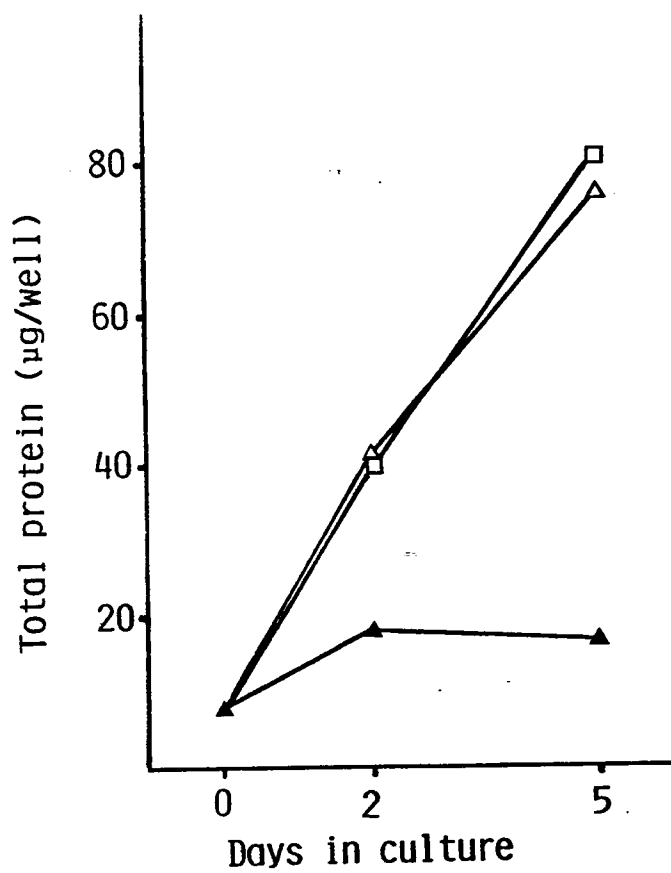


9



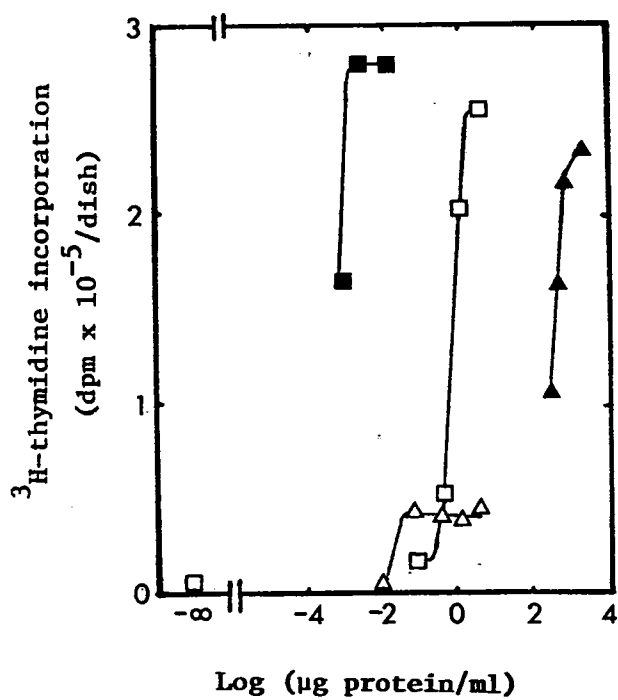
↑
大前

10



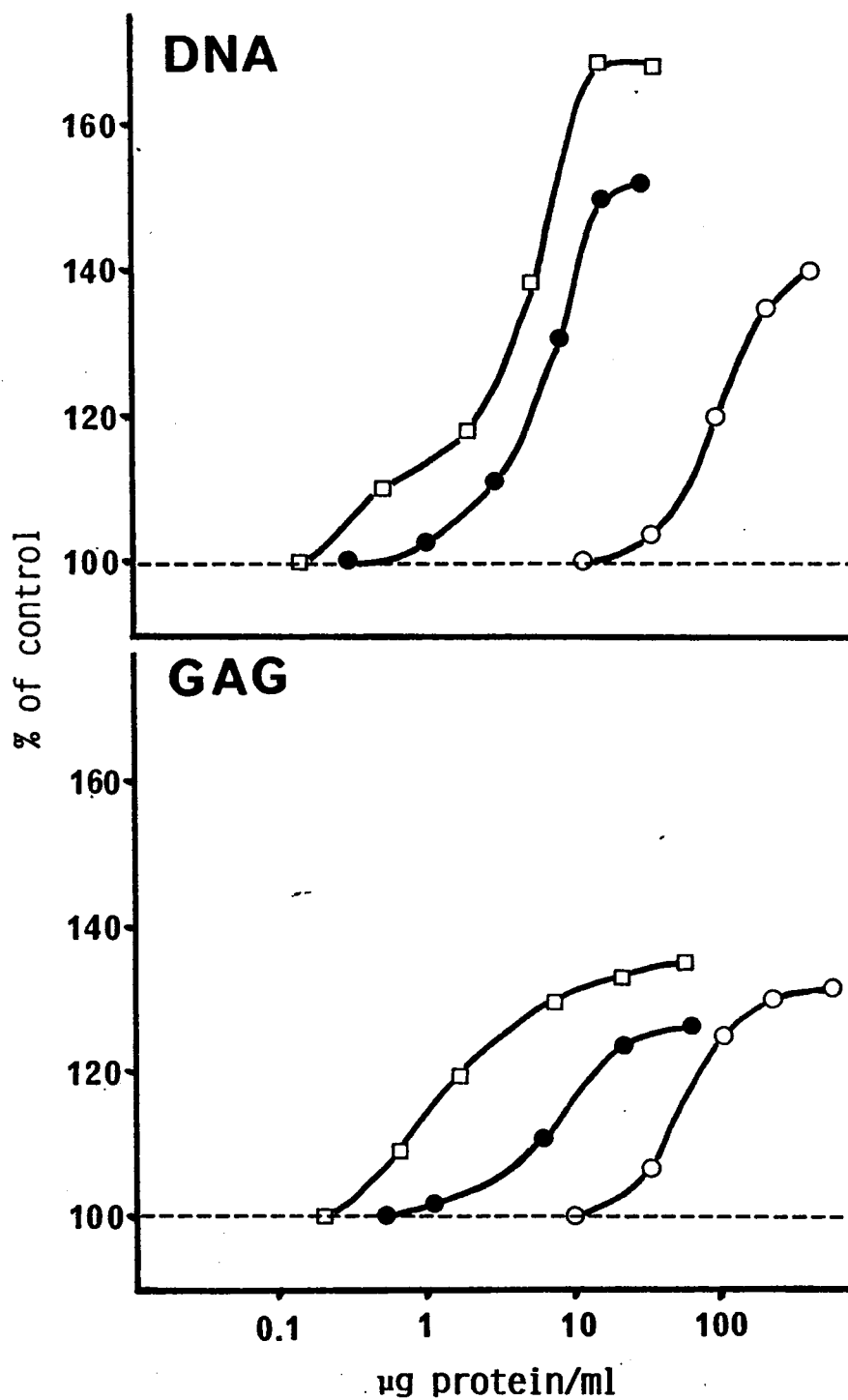
↑
大前

11



大前 ↑

图 12-a



↑
大前

図 12-b

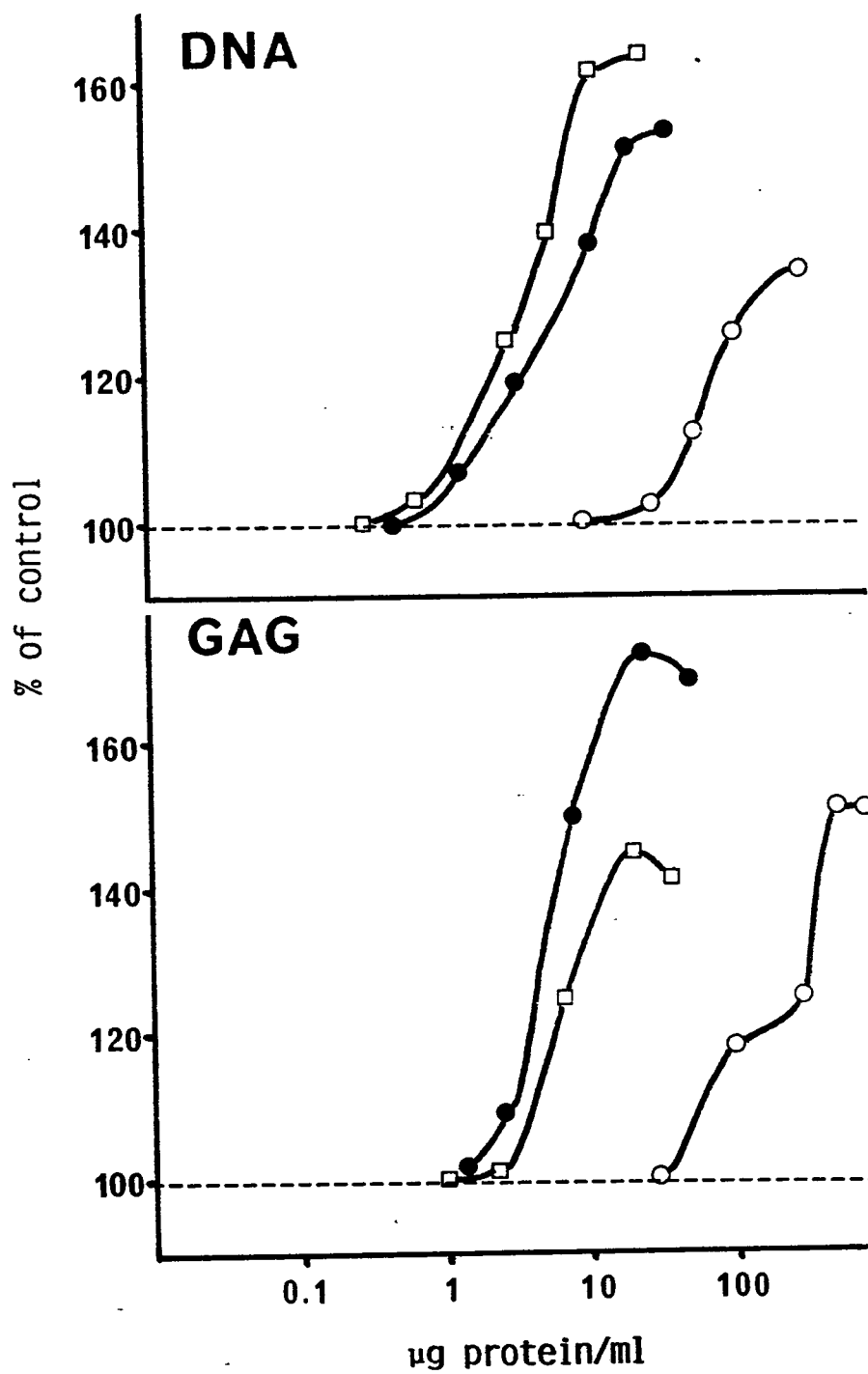
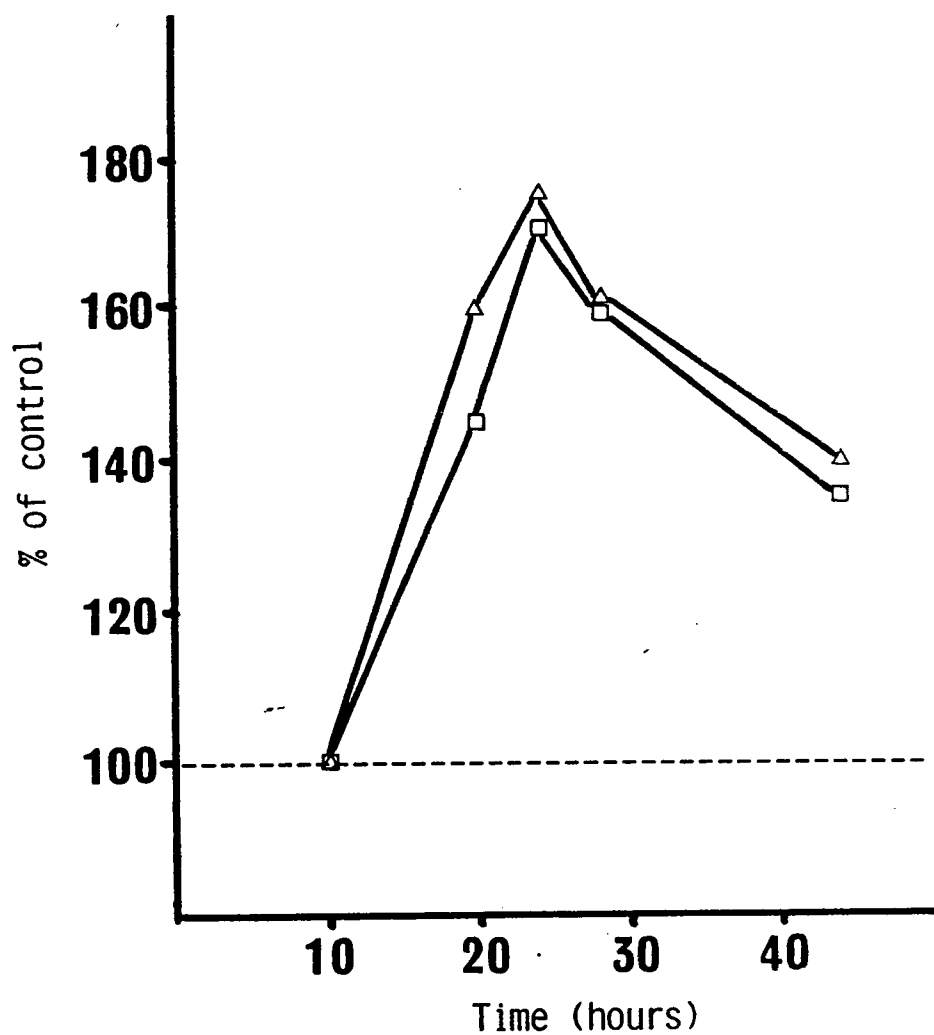
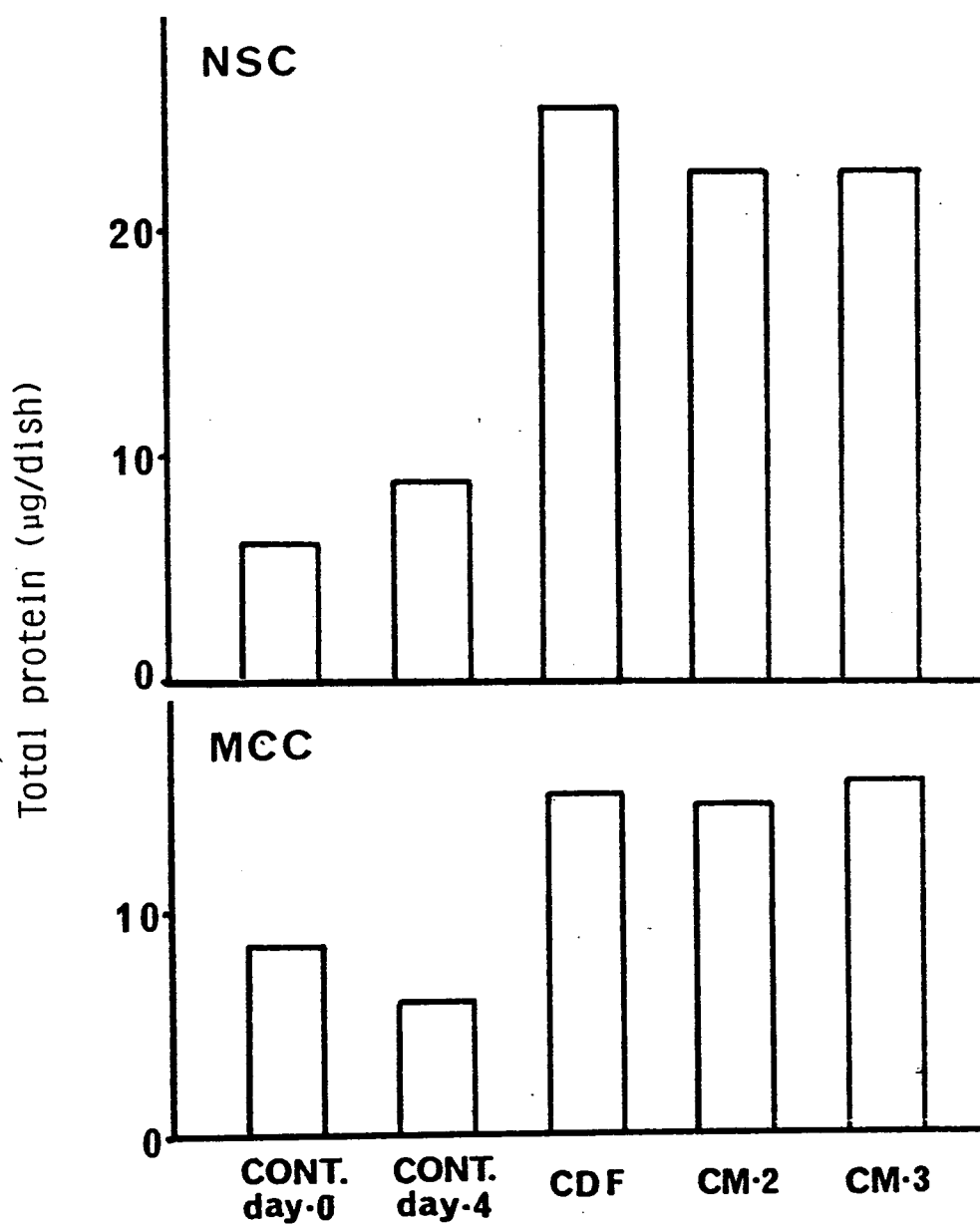


图13



大前↑

図 14

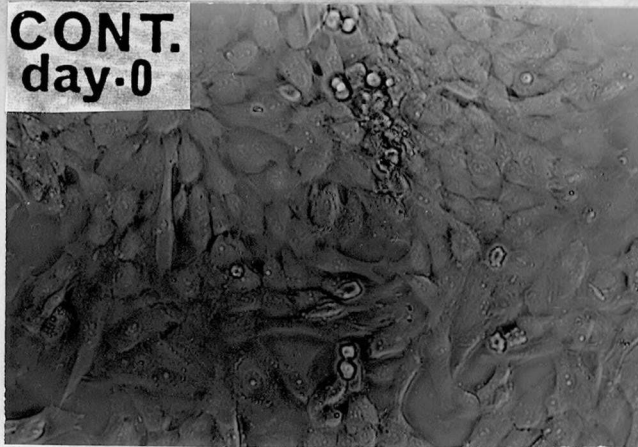


大前 ↑

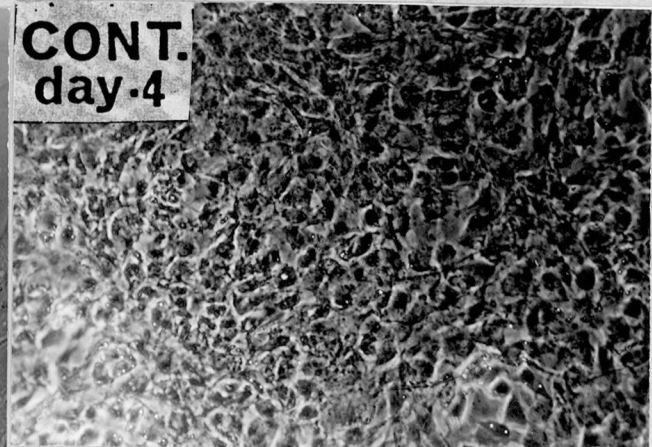
NSC

図15

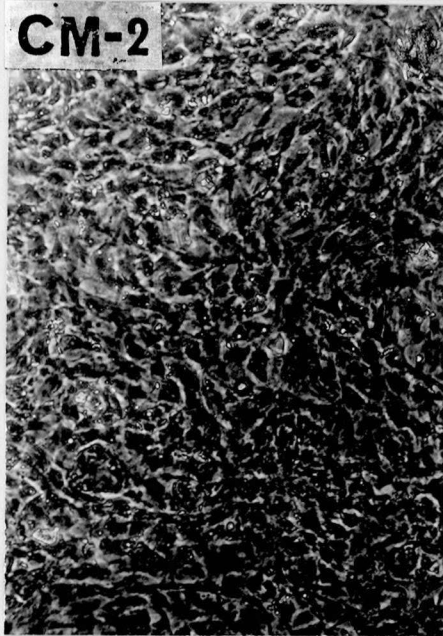
CONT.
day-0



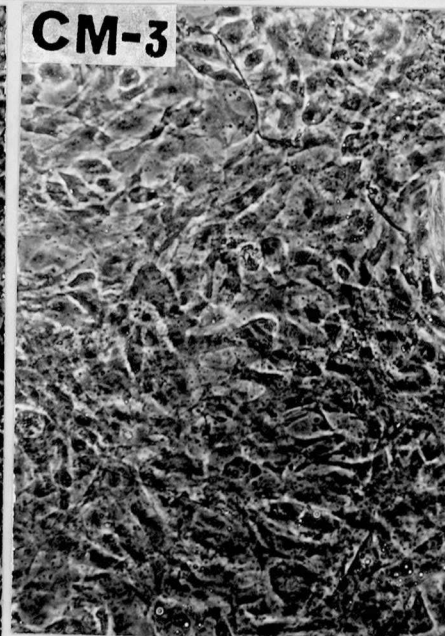
CONT.
day-4



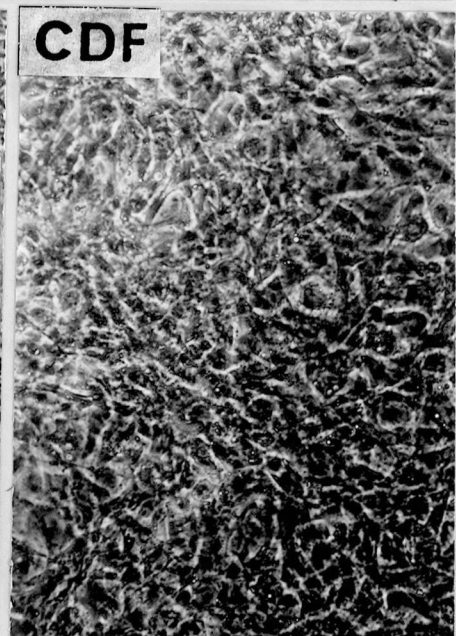
CM-2



CM-3



CDF



↑
大前

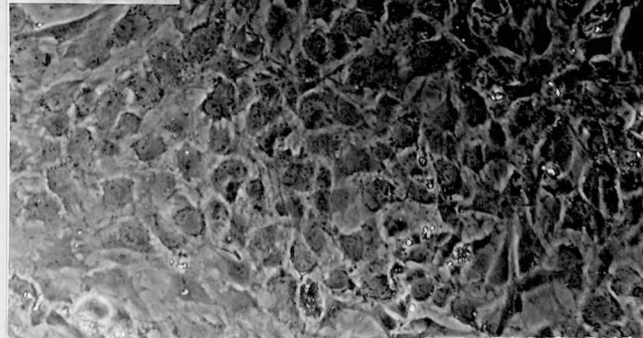
MCC

図15

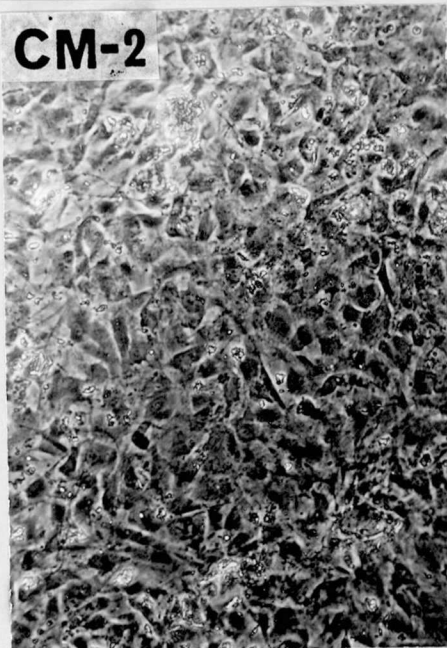
CONT.
day-0



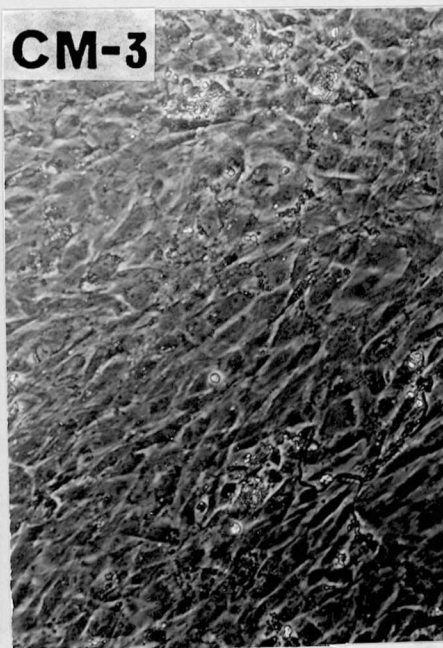
CONT.
day-4



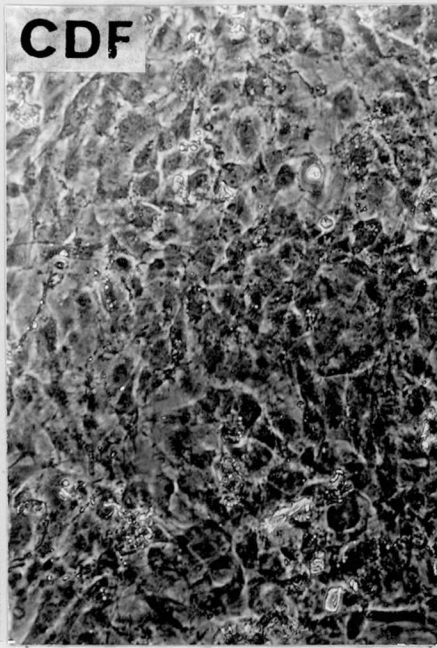
CM-2



CM-3

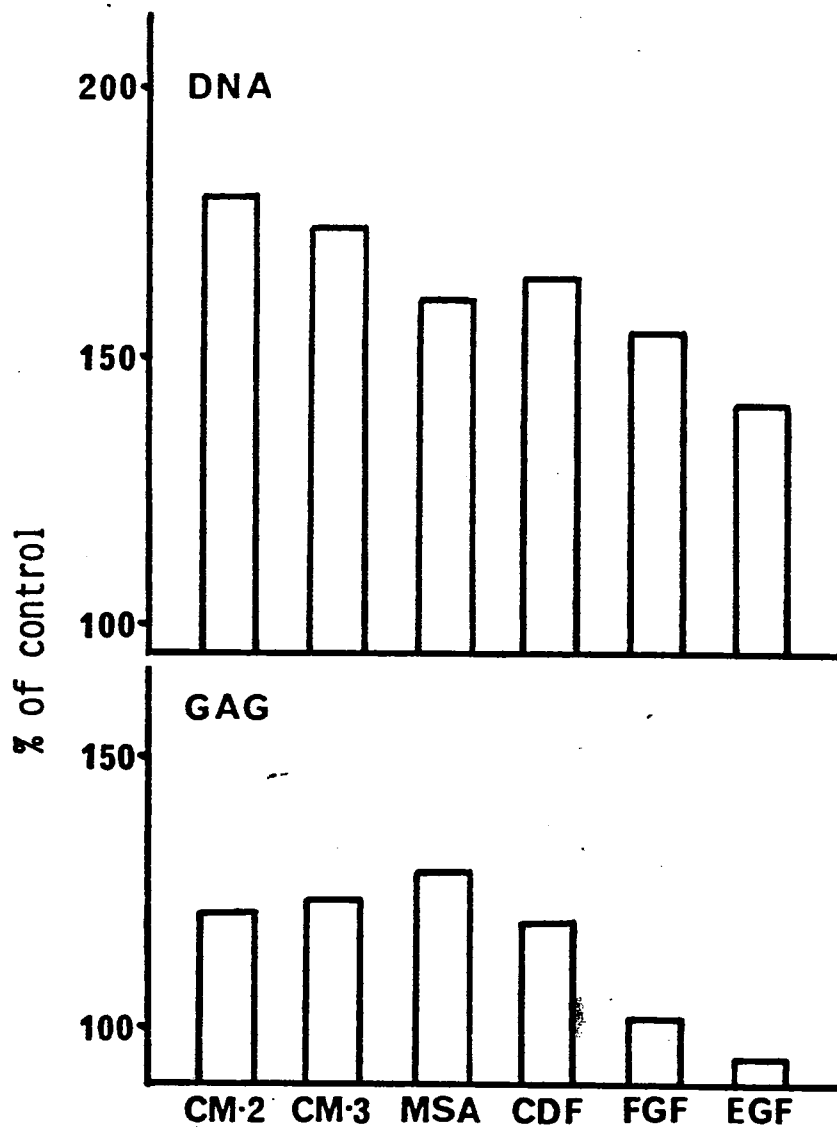


CDF



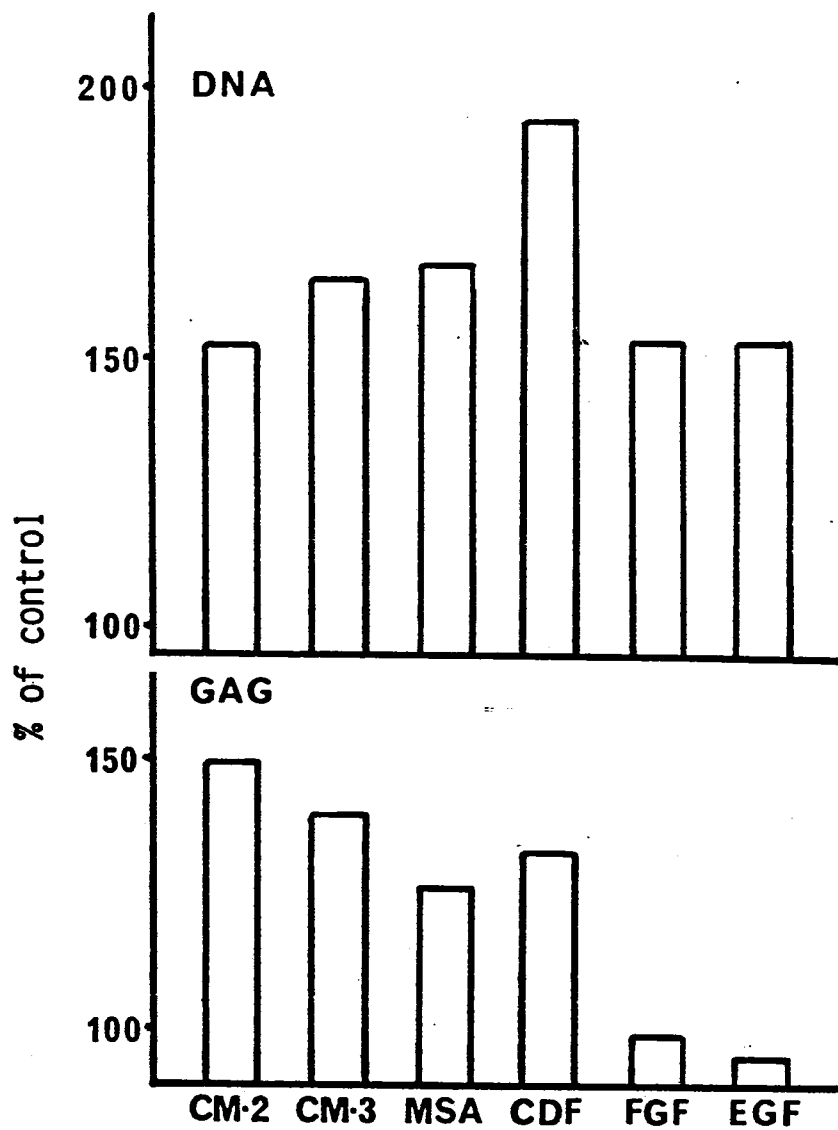
↑
大前

図16a



大前↑

図 16-b



大前↑

表. 1

	分子量	等電点	抽出源
ソマトメジン A ¹⁷⁾	約 7,600	中性	ヒト血漿
ソマトメジン C ¹⁸⁾	約 7,600	塩基性	ヒト血漿
I G F-I ¹⁹⁾	7,649	塩基性	ヒト血漿
I G F-II ²⁰⁾	7,471	中性	ヒト血漿
M S A ²¹⁻²³⁾	7,484	中性	肝細胞培養液