

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23592909

研究課題名(和文) 補綴前処置におけるサンゴブロックを応用した歯槽骨および顎骨の増生

研究課題名(英文) Bone augmentation of jaw and alveolus bone with coral block in preprosthetic surgery.

研究代表者

西川 哲成 (Nishikawa, Tetsunari)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70140209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：サンゴの内部は外部と交通する直径100-300  $\mu\text{m}$ の無数の管構造で、隣接する管とは孔で連絡していた。サンゴ骨格の表面は10-20  $\mu\text{m}$ の突起物で覆われ、さらにその突起物は60-200 nmの無数の突起物で覆われていた。酸性溶液中ではサンゴのCaは溶出し、アルカリ溶液中ではCaがサンゴ表面に沈着した。イヌの骨欠損部とラット頭蓋骨ではサンゴに接して多核巨細胞が観察され、骨芽細胞で縁取りされた新生骨とともに骨の増生が認められた。埋入後12ヶ月後ではサンゴブロックは消失し、新生骨や骨髄で置換していた。  
以上のことから、サンゴブロックは生体吸収性の骨の増生を目的とした足場材料であることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Inside the coral were innumerable tubular structures 100-300  $\mu\text{m}$  in diameter that communicated with the outside, connected to neighboring ducts through pores. The surface of the skeleton was covered with 10-20  $\mu\text{m}$  protrusions, on the surface of which further rounded projections of 6-200 nm were observed. The calcium of coral was released in acid solution, and calcium ions in the alkaline solution were deposited on the surface coral particles. In vitro, formation of capillaries was seen around coral particles. In vivo, at bone defects of dogs and on the skull of rats, multinucleated giant cells were observed in contact with the implanted coral, and bone augmentation was seen together with newly formed bone bordered by osteoblasts in the inner cavities of the coral block. After 12 months, coral block were disappeared and replaced with newly formed bone and bone marrow. The above suggests that coral blocks are promising as a bioabsorbable scaffolding material for bone augmentation.

研究分野：口腔病理

キーワード：足場材料 骨再生 骨増生 サンゴ 新生骨 補綴前処置

1. 研究開始当初の背景

骨の再生には、骨膜、骨芽細胞、破骨細胞、造骨に關する因子、そして足場が必要である。この足場材料の具備すべき条件は、組織障害性や抗原性が少ないこと、血管形成を促すこと、骨芽細胞が附着しやすく正常な増殖や分化を促すこと、そして生体吸収性で新生骨と置換 (replacement) することなどである。歯周疾患等で歯を失ったヒト、あるいは顎骨腫瘍や嚢胞を摘出した症例では顎の骨量が減少するので、義歯を適応した場合、維持が困難となる。また、口腔インプラントの施術に際しては顎骨の質と量はインプラント体の保持と密接な關係がある。したがって、骨量の減少や顎骨における欠損部の治療には骨の再生だけではなく、骨の増量 (増生) が求められる。このように歯科の領域では補綴前に行う外科 (preprosthetic surgery) による顎骨の増生は患者の QOL を維持するために必要不可欠である。

増生を目的とした足場材料の条件は、骨の再生に加え、新生骨形成のスペースを確保できる湿潤条件下における機械的強度を保持する機能が必要と考えられる。このすべての条件を満たすのは新鮮自家骨である。一般的に骨足場材料の生体吸収性と機械的強度は相反する關係にあるため、現在までに両者を満たす骨増生の足場材料は少ない。近年、生物の機能を取り入れることによる製品の開発 (biomimic) が注目されている。

2. 研究の目的

自然界に存在する多孔質でカルシウムを主成分としたサンゴに焦点をあて、物理・化学的な特性や *in vitro*, *in vivo* による生体への実験結果から、骨の増生を目的とする足場材料の開発を考えた。

3. 研究の方法

(1) サンゴの微細構造

エダコモンサンゴ (*Montipora digitata*) (図 1) をパラジウムで蒸着し走査電微で、また原子間力顕微鏡で微細構造を観察した。



図 1 エダコモンサンゴ

(2) 機械的強度

各種サンゴの湿潤条件下における硬さと圧縮強さを Barcol hardness tester で測定し、ラット大腿骨のそれと比較した。

(3) 化学的特性

組成

エダコモンサンゴと人工焼成骨の組成を Biochemical Immuno Autoanalyzer で調べた。

pH による変化

エダコモンサンゴと人工焼成骨の化学的変化を酸性あるいはアルカリ溶液中に 48 時間浸漬させ、溶液中のカルシウム量を

Biochemical Immuno Autoanalyzer で測定した。

(4) 組織親和性と毛細血管の誘導 *in vitro* ヒト線維芽細胞と血管内皮細胞を共培養し、さらにサンゴ粒子を添加して 10 日間共培養した。細胞増殖と毛細血管の形成を anti-CD31 抗体で観察し、無添加の対照群と比較した。

(5) 骨の増生 *in vivo*

イヌ大腿骨の実験的欠損部

*In vivo* の実験で、イヌの大腿骨に実験的欠損を作りサンゴ円柱ブロックを埋入し多孔性フィルターで覆い、7 週後にカルセインを投与しさらに 1 週後に大腿骨を摘出した。埋入しない対照群としそれぞれ骨増生を調べた。

ラット頭蓋骨表面

*In vivo* の実験で、ラット頭蓋骨表面の骨膜下にサンゴ円柱ブロック (直径 1 mm<sup>2</sup> X 1 mm) を埋入し、6 か月後に頭蓋骨を摘出し組織学的に観察した。

4. 研究成果

(1) サンゴの微細構造

サンゴの内部は外部と交通する直径 100-300 μm の無数の管構造で、隣接する管とは孔で連絡していた。サンゴ骨格の表面は 10-20 μm の突起物で覆われ (図 2)、さらにその突起物は丸みをおびた 60-200 nm の無数のふくらみで覆われていた (図 3)。(日口腔インプラント誌 . 24(3), 2011, 378-388)

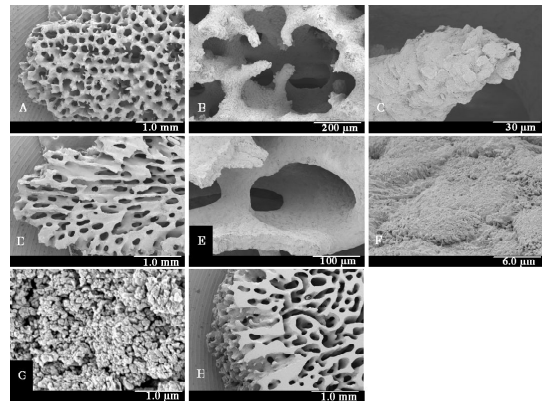


図 2 走査電子顕微鏡におけるサンゴ外骨格

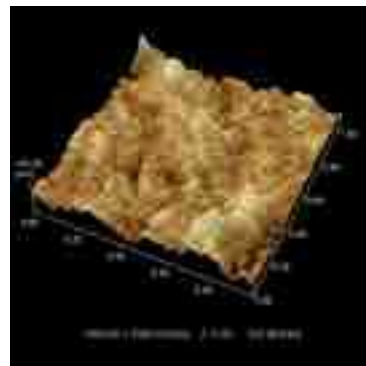


図 3 原子間力顕微鏡におけるサンゴ表面

(2) 機械的強度

サンゴの硬さはラット大腿骨の 60-80%を示し、エダコモンサンゴの硬さが高かった(図4)。また、サンゴの圧縮強さはラット大腿骨の 20-25%を示した(図5)。(J Oral Tissue Engin. 9(2), 2011, 88-95)

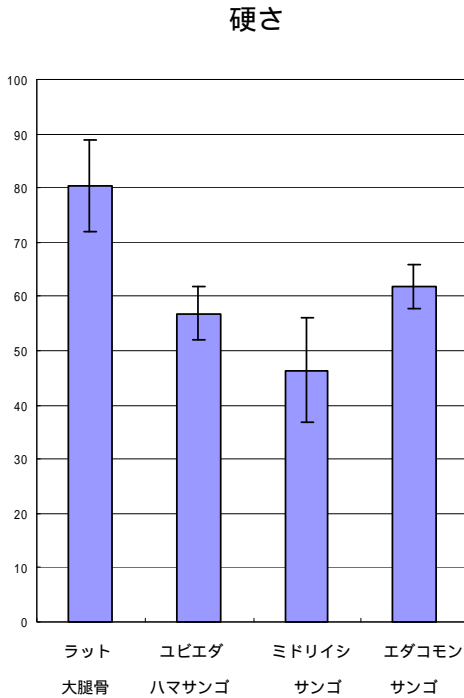


図4 各種サンゴの硬さ

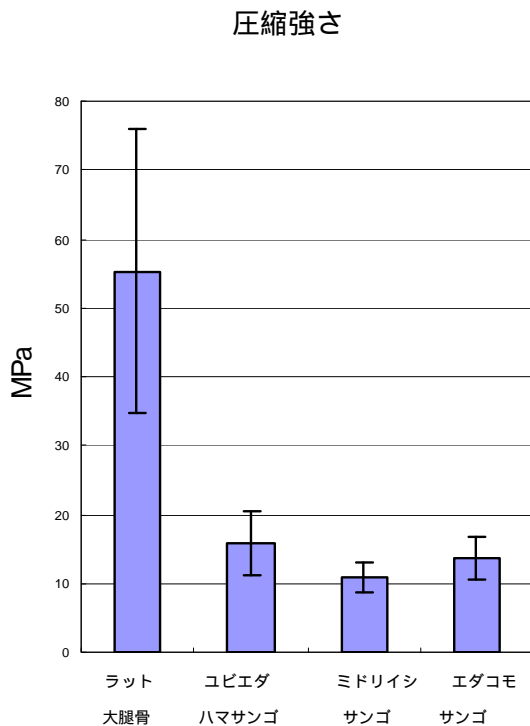


図5 各種サンゴの圧縮強さ

(3) 化学的特性

組成

サンゴには乾燥重量 1g 当たりカルシウムは 377 mg, マグネシウムは 26 mg, 亜鉛は 71 mg 含まれていたが、無機リンは検出されなかった。人工焼成骨はカルシウムが約 342 mg, 無機リンが約 171 mg 含まれていたが、マグネシウムや亜鉛は検出されなかった(表 1)。

	Ca mg/g	iP mg/g	Mg mg/g	Zn μg/g
coral	377.6 ± 11.8	n.d.	26.3 ± 0.8	71.3 ± 8.7
ceramic bone	341.6 ± 0.8	170.6 ± 2.6	n.d.	n.d.

n.d.: not detected

表1 サンゴと人工焼成骨の組成  
pH による変化

サンゴおよび人工焼成骨は酸性溶液中で溶解し、溶液中のカルシウム量が増えたが、人工焼成骨と比較しサンゴで有意に増加していた。このことは破骨細胞やマクロファージでサンゴは比較的容易に処理される可能性が示唆された。また、カルシウム含有のアルカリ溶液中では人工骨は溶液中のカルシウム濃度はほとんど変化しなかったのに対し、サンゴで減少した。このことはアルカリ条件下ではサンゴ表面に溶液中のカルシウムが沈着したと考えられ、サンゴを核とした新生骨の形成が促進される可能性を示唆した(表2)。(Nano Biomed 3(1) 2011, 231-236.)

	coral	ceramic bone	control
pH 6.0	*11.15 ± 0.13 (332.8 %)	*5.35 ± 0.22 (159.7 %)	3.35 ± 0.05 (100.0 %)
pH 7.0	*4.35 ± 0.05 (127.9 %)	*3.68 ± 0.08 (108.1 %)	3.40 ± 0.00 (100.0 %)
pH 8.0	*3.85 ± 0.05 (86.0 %)	*4.33 ± 0.01 (96.6 %)	4.48 ± 0.01 (100.0 %)

\* Difference with  $P < 0.05$  was considered significant

表2 pH によるサンゴと人工焼成骨の変化



(4) 組織親和性と毛細血管の誘導 *in vitro* 実験群, 対照群ともに細胞増殖が認められた. 毛細血管の形成は対照群と比較し, 実験群で減少していたが, サンゴ顆粒の周辺では細胞の増殖(図6の青色は核を染めた)および毛細血管とそれら網状の形成(図6の黄緑は毛細血管を染めた)が認められた. 以上のことからサンゴには組織親和性が認められ, サンゴによる毛細血管形成への誘導が示唆された. (J Oral Tissue Engin. 9(2), 2011, 88-95.), (J Oral Tissue Engin. 12(2), 2014, 93-99.)

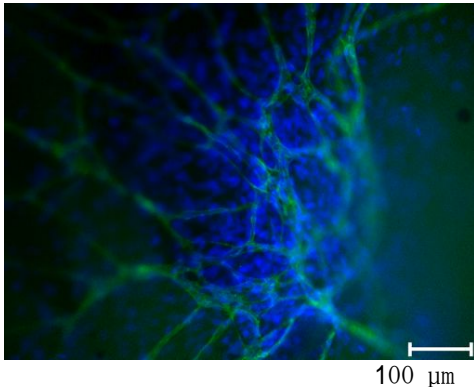


図6 サンゴ周囲の毛細血管の形成

(5) 骨の増生 *in vivo*

イヌ大腿骨の実験的欠損部

実験群ではサンゴの外骨格に接し多核巨細胞が認められ, サンゴ内腔には骨芽細胞によって縁取りされた新生骨が観察された. そして, 大腿骨の外側には骨の増生が認められた. 対照群では骨欠損部に骨芽細胞によって縁取りされた新生骨が観察されたが, 骨の増生は認められなかった(図7). 以上のことから, サンゴブロックは生体吸収性の骨の増生を目的とした足場材料であることが推察された. (日口腔インプラント誌. 24(3), 2011, 378-388) (Applied Surface Science .262, 2012, 42-47)

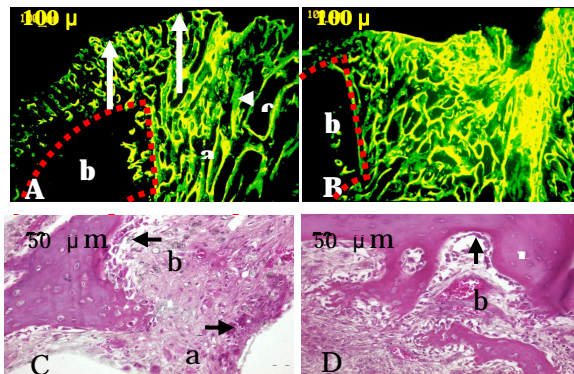


図7 イヌ大腿骨実験的欠損部における骨増生 A; 実験群. 欠損部にはサンゴ内腔に新生骨の形成、既存骨(b)から外側に骨増生が認められた(矢印) B; 対照群. C; 実験群. サンゴ骨格表面に多核巨細胞(a)、骨芽細胞で縁取りされた新生骨(b)が観察された. D; 対照群.

ラット頭蓋骨表面

サンゴ内腔には骨芽細胞によって縁取りされた新生骨が観察され, 一部で新しい骨髄組織が形成されていた. そして, 頭蓋骨の外側には骨の増生が認められ. 以上のことから, サンゴブロックは骨に欠損部を作らなくても表面に置くだけで骨の増生 1,300 μm (矢印)を誘導することが推察された(図8). (Nano Biomed. 5(2), 2013, 109-113)

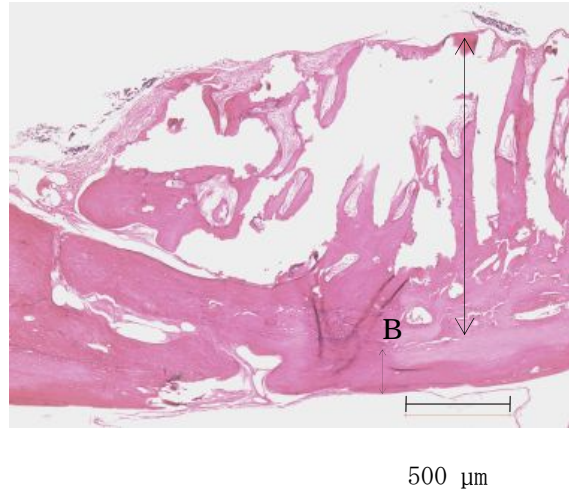


図8 ラット頭蓋骨表面の骨増生

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計17件)

1. Nishikawa T, Okamura T, Tominaga K, Wato M, Kurioka K, Morita S, Imai K, Miyake T, Tanaka A. Tissue affinity and bioabsorption to fine calcium carbonate particles. *Nano Biomed* 「査読有」, 2015; 7: 21-27.
2. Imai K, Shirai T, Honda Y, Nishikawa T, Okamura T, Taknaka A, Ogawa F, Sawai H, Shida M, Suese K. Study of hybrid culture technique using human hepatocytes and mouse ES cells by three-dimensional culture scaffolds. *J Oral Tissue Engin* 「査読有」, 2015; 12: 121-126.
3. Okamura T, Nishikawa T, Wato M, Tominaga K, Kato H, Imai K, Tanaka A. Application of porous materials to three-dimensional tissue culture in capillary formation *in vitro*. *J Oral Tissue Engin* 「査読有」, 2014; 12: 93-99.
4. Nishikawa T, Okamura T, Ono T, Matsushita H, Imai K, Honda Y, Hidaka M, Matsumoto N, Takeda S, Tanaka A. Bone augmentation

experiment using coral on the skull of rat . *Nano Biomed* 「査読有」, 2013 ; 5 : 109 113 .

5. Ono T , Nishikawa T , Tanaka A , Matsumoto N . Histological reaction to porous coral and ceramic bone . *J Oral Tissue Engin* 「査読有」, 2013 ; 11 : 85 97 .
6. Nishikawa T , Kokubu M , Kato H , Imai K , Tanaka A . Confocal laser scanning microscopy in study of bone calcification . *Appl Surf Sci* 「査読有」, 2012 ; 262 : 64 68 .
7. Imai K , Akasaka T , Watari F , Tanoue A , Nakamura K , Suese K , Takashima H , Nishikawa T , Tanaka A , Takeda S . *In vitro* study of cell differentiation by two type mouse embryo stem cells on mono and multilayer nanocarbon tubes . *Appl Surf Sci* 「査読有」, 2012 ; 258 : 8444 8447 .
8. Nishikawa T , Okamura T , Kokubu M , Kato H , Imai K , Ono T , Tamura I , Takeda S , Ikeo T , Matsumoto N , Hidaka M , Tanaka A . Morphological and physical characteristics and cell affinity of coral as a scaffold . *J Oral Tissue Engin* 「査読有」, 2011 ; 9 : 88 95 .
9. 中村真一 , 西川哲成 , 益野一哉 , 今井弘一 , 田中昭男 . サングの形態的特性と骨の増生への応用について . 日本口腔インプラント学会誌 「査読有」, 2011 ; 24 : 378 388 .
10. Nishikawa T , Okamura T , Masuno K , Tominaga K , Wato M , Uobe K , Imai K , Takeda S , Kono T , Morita S , Hidaka M , Tanaka A . Tissue affinity and chemical characteristics of coral . *Nano Biomed* 「査読有」, 2011 ; 3 : 231 236 .

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 岡村友玄 , 西川哲成 , 和唐雅博 , 富永和也 , 今井弘一 , 田中昭男 . 3 種類の多孔性材料を足場として三次元培養したヒト毛細血管の長期観察共 . 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015 . 8 . 25 朱鷺メッセ (新潟市) .
2. 岡村友玄 , 西川哲成 , 和唐雅博 , 富永和也 , 田中昭男 . 共培養された正常ヒト皮膚線維芽細胞および正常ヒト臍帯静脈内皮細胞

における 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ehanesulfonic acid の影響 . 第 15 回日本外傷歯学会、第 7 回アジア国際外傷歯学会 2015 . 3 . 11 . 北九州国際会議場 (北九州市) .

3. 岡村友玄 , 西川哲成 , 和唐雅博 , 富永和也 , 嘉藤弘仁 , 今井弘一 , 武田昭二 , 田中昭男 . ヒト毛細血管 3 次元培養におけるサング粒子の応用 . 日本動物実験代替法学会第 26 回大会 2013 . 12 . 21 京都テルサ (京都市) .
4. Nishikawa T , Tanaka A . Bioabsorption of porous coral inducing augmentation in dogs . International Conference of Oral Implantology 2013 . 10 . 3 Istanbul Lutfi Kirdar International Convention ( Istanbul , Turkey ) .
5. Ono T , Nishikawa T , Tanaka A , Matsumoto N . Histological reaction to porous coral and ceramic bone . International Conference of Oral Implantology 2013 . 10 . 3 Istanbul Lutfi Kirdar International Convention ( Istanbul , Turkey ) .
6. 小野高尚 , 西川哲成 , 田中昭男 , 松本尚之 . 多孔性のサングおよび人工焼成骨に対する生体反応 . 第 7 回ナノ・バイオメディカル学会 2013 . 1 . 24 京都テルサ (京都市) .
7. 西川哲成 , 嘉藤弘仁 , 国分麻佑 , 益野一哉 , 富永和也 , 和唐雅博 , 岡村友玄 , 田中昭男 . サングの骨増生への応用 . 第 22 回日本歯科医学会総会 2012 . 11 . 10 インテックス大阪 (大阪市) .
8. 西川哲成 . 骨増生 . 第 6 回日本再生歯科医学会シンポジウム 2012 . 10 . 7 十勝歯科医師会館 (帯広市) .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西川 哲成 (NISHIKAWA, Tetsunari)  
大阪歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 70141209