

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19592273

研究課題名（和文） 理想的な足場材料サンゴ、その特性と新生骨形成

研究課題名（英文） Characteristics and new bone formation of coral as an ideal scaffold

研究代表者

西川 哲成 (NISHIKAWA TETSUNARI)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70140209

研究成果の概要（和文）：

サンゴの機械的強度は 12.4 MPa であった。そして、内部は直径 100～300 μ m の無数の管状構造が外界と繋がり、隣接する孔は管で繋がっていた。また、骨格の表面は 60～200 μ m の丸みを帯びた無数の突起が観察された。*In vitro* でサンゴ周囲にも毛細血管の形成が認められた。*In vitro* でイヌ大腿骨の実験的欠損部にサンゴを埋入した。その8週後でサンゴの内腔に骨格に接して多核巨細胞の出現と、骨芽細胞で縁取りされた新生骨が形成されるとともに、骨の増生が認められた。

研究成果の概要（英文）：

Mechanical strength of coral was 12.4 Mpa. Inside the coral were innumerable tubular structures 100-300 μ m in diameter that communicated with the outside, connected to neighboring ducts through pores. The surface of the skeleton was covered with innumerable rounded projections of 60-200 nm were observed. *In vitro*, formation of capillaries was seen around coral particles. *In vivo*, a block of coral was implanted into an experimental defect in a canine femur. After 8 weeks, multinucleated giant cells were observed in contact with the coral, and bone augmentation was seen together with new bone formation bordered by osteoblasts in the inner cavities of the coral block.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：歯科インプラント学

1. 研究開始当初の背景

歯槽骨増生としてチタンフレームで補強

したスペースメーカーや GBR (guided bone regeneration) 法の応用が行われ、さらに BMP

(bone morphogenetic protein)や血小板由来の PDGF (platelet-derived growth factor) などの造骨因子の応用が試みられている。現在まで、骨の足場材料として新鮮自家骨は良好な結果が得られているが、患者のオトガイ部や腸骨から骨を採取することが多く、手術的侵襲や採取する骨量の制限などの問題もある。そこで、自家骨に代わる骨補填材の試みがなされており、ハイドロキシアパタイト、コラーゲン、トリカルシウムなどの報告がある。

2. 研究の目的

外傷、腫瘍や嚢胞の術後、そして歯周疾患などで、歯を喪失し顎骨の量が減少した場合審美的あるいは咀嚼機能に障害が生じる。また、インプラントの適応には顎骨の量が必要であり、骨量すなわち顎骨の唇舌的および垂直的な吸収が著しい場合は歯槽堤増生（造成）術や延長術が試みられる。ところで、骨の再生には骨芽細胞、造骨因子そして足場材料が必要であるが、その中の足場材料として理想的な条件は、1) 毒性が少なく組織親和性があり、アレルギー反応がない、2) 宿主によって吸収され、しかも新生骨によって置き換わる（多孔性生体吸収材料が優れていると考えられる）、3) 周囲組織からの圧力に対してスペースを確保できる機械的な強度を保持するなどが考えられる。しかし、一般的に骨足場材料の作製において、生体吸収性と機械的強度の条件は相反する関係にあり、これらを全ての具備すべき条件を満足する材料は少ない。今回、古くから注目されてきた多孔性サンゴに再び焦点をあて、足場材料としての条件を検討する。

3. 研究の方法

(1) サンゴは琉球大学理学部より提供をうけ、入手が容易で代表的な多孔性のサンゴ数種を選び、それぞれの種類と産地を調べる。(2) これらサンゴを入手し、今後実験に使用する様々なサイズのサンゴブロックを作製したのち、アルカリで有機質を除去、低温下にてリン酸緩衝液に保存する。(3) 【**化学組成**】これら各種サンゴの無機物の組成をX線解析法によって調べる。(4) 【**物理強度**】サンゴの機械的強度を圧縮試験、引張試験、衝撃試験、圧迫試験について測定する。(5) 【**内腔の形態**】多孔性サンゴの内腔の形態を、マイクロCTを用いて三次元的に観察する。(6) 【**組織親和性**】各種サンゴのブロック(10mmx10mmx2mm)を入れた培養皿にヒト歯根膜由来の線維芽細胞の培養し、その増殖曲線やサンゴブロックとの接触状況から、これら材料の組織親和性を調べる。(7) 【**生体親和性・アレルギー反応**】ラット背部皮下に各種サンゴブロック(3mmx3mmx2mmの立方体)

を埋入する。術後2日、1週、4週で同部位を摘出、脱灰後薄切切片を作製し、HE染色および抗リンパ球の免疫染色を施し、短期・長期のアレルギー反応および組織親和性を組織化学的に観察する。(8) 【**生体吸収性・新生骨の形成**】ラット大腿骨に生理食塩水注入下で実験的欠損部を作り、各種サンゴブロック(1mmx1mmx2mmの立方体)を充填し、切開創は縫合する。そして、ラットを犠牲にする4日と2日前にそれぞれ骨石灰化のラベリング剤であるカルセイン、アリザリンレッドを腹腔内投与する。サンゴ充填後4週、8週そして12週でラットを犠牲にし、ホルマリンによって灌流固定したのち、摘出された大腿骨を二つに分割する。一方はEDTAで脱灰し、パラフィン切片からHE染色およびTRAP(酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ)染色し、サンゴの吸収を組織化学的に観察する。残り的大腿骨はレジンで包埋したのち、サンゴを含む大腿骨の切断面を共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)を用いて新生骨の形成を組織学的に観察する。また、強拡大の断層像にて、骨細胞と新生骨との接触関係を観察するとともに、新生骨に含まれる骨小腔の突起から栄養補給路と内腔との位置的關係を調べる(9)。実験で得られたデータを基に、サンゴの特性(化学的組成、物理的強度、内腔の形態など)と、動物実験における生体吸収性および新生骨の形態との関係を明らかにする。(10) サンゴの吸収と新生骨の形成に主眼において、足場材料として適切なサンゴを一つ選択し、以後の実験ではこのサンゴを用いる。(11) 【**生体吸収性・新生骨の形成**】選択されたサンゴ内腔の立体像をマイクロCTで観察する。ビーグル犬の大腿骨に作った実験的欠損部(直径3mmの円)に、サンゴブロックを埋入する。犬を犠牲にする7日と4日前にそれぞれカルセイン、アリザリンレッドを腹腔内投与する。サンゴ充填後4週、8週そして12週で犬を犠牲にし、X線撮影を行う。下顎骨を摘出、ホルマリンで固定後、レジン包埋する。サンゴを含む下顎骨の切断面をCLS Mで組織学的に、またマイクロCTで三次元的に観察し、サンゴの生体吸収と新生骨の形成を観察する。

4. 研究成果

骨量が減少した顎骨においては、良好なインプラント治療結果を得るため骨の増生が望まれる。そのため、新生骨形成のスペースを確保できる機械的強度を有する足場材料の開発が求められている。我々は足場材料としてサンゴに焦点をあて、その骨増生からみた足場材料としての特徴を検討した。

サンゴ(*Montipora digitata*)の比重は1.40、気孔率50.4%で、湿潤条件下における

機械的強度は圧縮強さで 12.4 Mpa (ラット大腿骨の 21%)、硬さで 61.7 (ラット大腿骨の 66%) であった。

マイクロCTで観察した三次元的な構造は内腔 200 μ m の多孔性構造で外界と連絡していた (図 1)。

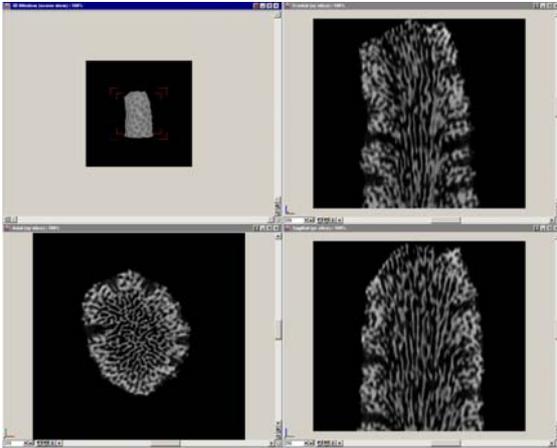


図 1

走査電子顕微鏡および原子間力顕微鏡で微細構造を明らかにしたところ、サンゴの内部は直径 100~300 μ m の無数の管状構造が外界と繋がり、隣接する孔は管で繋がっていた (図 2、3)。

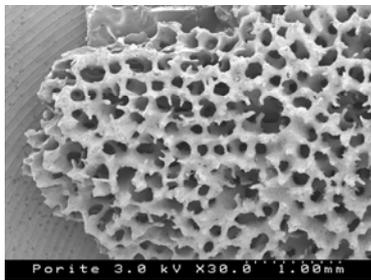


図 2

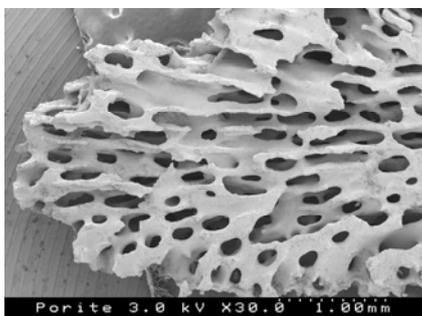


図 3

そして、骨格の表面は 10~20 μ m の隆起物で覆われ、突起物の表面にはさらに 60~200 μ m の丸みを帯びた無数の突起が観察された (図 4、5)。

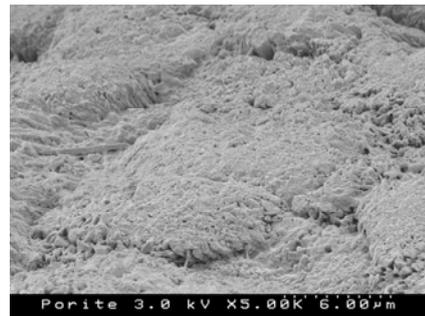


図 4

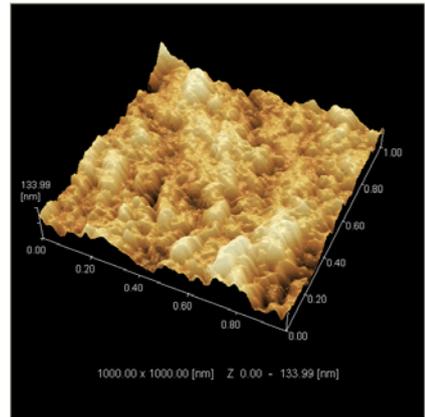


図 5

In vitro でサンゴとともに線維芽細胞および血管内皮細胞の共培養で、サンゴ周囲にも培養細胞の増殖が認められた。さらに、抗 CD31 抗体による免疫組織化学的染色を行い毛細血管の形成状態を観察したところ、サンゴ周囲に毛細血管の形成が認められた (図 6)。

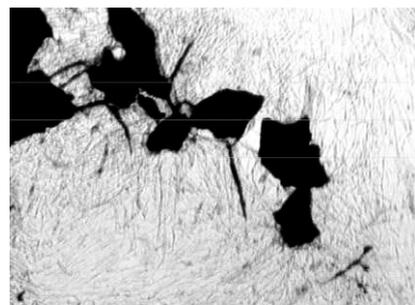
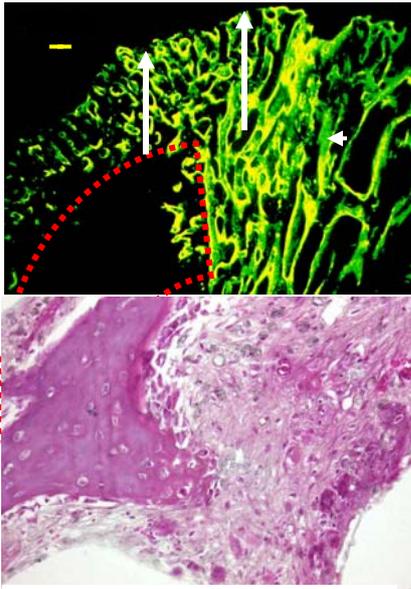


図 6

サンゴ粒子を (pH 6~pH 8) 溶液に浸漬しその溶液中のカルシウム濃度を測定したところ pH 6~pH 7 溶液ではサンゴは溶解し、pH 8 溶液ではカルシウムを沈着することがわかった。

In vitro でイヌ大腿骨の実験的欠損部にブロック状のサンゴを埋入し、多孔性フィルターで被覆した。その結果、埋入処置後 8 週でサンゴに接して多核巨細胞が観察され、サンゴブロックの内腔に骨芽細胞で縁取りされた新生骨が形成されるとともに、骨の増

生が認められた (図7) .



以上のことから、サンゴブロックは骨欠損部における骨の増生を目的とした生体吸収性の足場材料としての応用が期待される。

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 11 件)

1. Mori M, Motohashi M, Nishikawa T, Masuno K et al (8 名、3,4 番目) . Biological implications of growth factors in bone remodeling following fracture, surgical resection and bonegrafting. Part 1: Transforming growth factors, bone morphogenetic proteins and related factors. Asian J Oral Maxillofac Surg 22; 2010; 117-125. (査読有り)
2. Nishikawa T, Masuno K et al (11 名、1,2 番目) . Biological reactions to calcium phosphate-coated calcium carbonate particles. J Oral Tissue Engin 8; 2010; 115-123. (査読有り)
3. Imai K, Nishikawa T et al (6 名、2 番目) . Influences of in vitro tubule-like structures by two types of ultrafine titanium dioxide and zinc oxide. Nano Biomedicine 2; 2010; 52-58. (査読有り)
4. Imai K, Nishikawa T et al (7 名、2 番目) . In vitro new capillary formation with eight metal ions of dental biomaterials. J Oral Tissue Engin 8; 2010; 74-79. (査

読有り)

5. Mori M, Nishikawa T, Masuno K et al (6 名、2,3 番目) . Statins: candidates for promoting bone formation via BMP-2. Oral Med Pathol 14; 2010; 81-87. (査読有り)
6. Mori M, Nishikawa T et al (6 名、4 番目) . Endothelin: Potential modulator of bone remodeling, craniofacial development and tumor metastase. Asian J Oral Maxillofac Surg 22; 2010; 53-60. (査読有り)
7. Nishikawa T, Okamura T, Masuno K et al (10 名、1,3 番目) . Physical characteristics and interior Structure of coral skeleton as a bone scaffold material. J. Oral Tissue Engin 7; 2009; 121-127. (査読有り)
8. Nishikawa T, Nakamura S, Masuno K et al (10 名、1,3 番目) . Biocompatibility and bioabsorption of novel porous calcium microparticles. Nano Biomedicine 1; 2009; 75-82. (査読有り)
9. Okamura T, Nishikawa T, Tanaka A. Calcification on cultured human dental pulp cells exposed to high glucose level. Oral Med Pathol 13; 2009; 47-53. (査読有り)
10. Tominaga K, Nishikawa T, Masuno K, et al (10 名、5,6 番目) . Immunohistochemical stainability of rat maxillae and intestine immersed in six types of decalcifying solutions. J Osaka Dent Univ 42; 2008; 83-87. (査読有り)
11. Nishikawa T, Masuno K et al (10 名、1,4 番目) . Comparative observations of bone formation in peri-implant tissue using Soft x-ray, micro-computed tomography and confocal laser scanning microscopy. J. Oral Tissue Engin 5; 2007; 104-112. (査読有り)

[学会発表] (計 22 件)

1. NISHIKAWA T, Masuno K et al (9 名、1,2 番目) . Tissue Affinity and Chemical Characteristics of Coral. Nano・Biomedicine Symposium. 2011 年 2 月 22 日. Nagoya.
2. IMAI K, WATARI F, NISHIKAWA T et al (5 名、3 番目) . In vitro study of cell differentiation by mouse embryo stem cells on C 60 fullerene. Nano・Biomedicine Symposium. 2011 年 2 月 22 日. Nagoya.
3. 富永和也, 益野一哉, 西川哲成 他 (7 名、3,6 番目) . エナメルマトリックスデリバティブ (EMD) に対する組織反応の免疫組織化

学的研究. 日本歯周病学会 第4回 近畿地区臨床研修会. 2010年12月5日. 大津市.

4. 益野一哉, 西川哲成 他 (5名、1,2番目). 骨増生を誘導するエダコモンサンゴ (*Montipora digitata*) の特性. 第30回 日本インプラント学会近畿・北陸支部学術大会. 2010年11月20日. 福井市.

5. 西川哲成, 益野一哉 他 (9名、1,2番目). サンゴに対する組織親和性および生体反応. 日本再生歯科医学会学術大会. 2010年10月29日. 名古屋市

6. 今井弘一, 西川哲成 他 (5名、2番目). 8種類の歯科用合金組成金属元素イオンによるin vitro 血管新生の影響. 日本再生歯科医学会学術大会. 2010年10月29日. 名古屋市

7. 富永和也, 益野一哉, 西川哲成 他 (7名、4,6番目). 骨形成を誘導する新規合成ペプチドに対するマウスモノクローナル抗体の作製とその評価. 日本歯周病学会秋季学術大会 第53回. 2010年9月18日. 高松市

8. 今井弘一, 西川哲成 他 (6名、4番目). 毛細血管の形成に及ぼすC60フラーレンの影響について (in vitro). ナノ・バイオメディカル学会. 2010年9月17日. 横浜市.

9. 西川哲成, 益野一哉 他 (9名、1,2番目). 多孔性カルシウム微粒子に対する生体反応. ナノ・バイオメディカル学会. 2010年9月17日. 横浜市.

10. Nishikawa T, Tanaka A. Coral as an increased bone mass scaffold.

International Congress of Oral Implantologists XXVI. 2010年8月26日. Hamburg.

11. 西川哲成, 益野一哉 他 (10名、1,2番目). 微細構造からみた骨足場としてのサンゴの魅力. 第2回ナノ・バイオメディカル学会 2010年02月22日.

12. 西川哲成, 益野一哉 他 (10名、1,2番目). ラット背部皮下に埋入した足場材料の生体吸収性. 日本歯周病学会. 2009年10月11日. 宮崎.

13. 西川哲成, 益野一哉 他 (9名、1,2番目). サンゴの骨再生足場材料としての物理的特性および内部構造. 日本再生歯科医学会. 2009年9月11日. 北九州.

14. 富永和也, 益野一哉, 西川哲成 他 (9名、1,2番目). 骨形成を誘導する新規合成ペプチドに対するモノクローナル抗体作製. 基礎歯科医学会. 2009年09月11日 72: 34.

15. 岡村友玄, 益野一哉, 西川哲成 他 (9名、1,2番目). ヒト歯髓由来培養細胞における高濃度グルコースの影響. 日本臨床分子形態学会. 2009年09月05日. 神戸.

16. 川中彩子, 益野一哉, 西川哲成 他 (9名、1,2番目). ヒト歯根膜線維芽細胞に対する

エムドゲイン由来ペプチドの作用機序. 日本臨床分子形態学会. 2009年09月05日. 神戸.

17. 川中彩子, 益野一哉, 西川哲成 他 (9名、1,2番目). エムドゲイン®由来ペプチドに対する歯根膜線維芽細胞の分子生物学的研究. 歯科医学. 2009, 72; 34. 大阪.

18. 岡村友玄, 益野一哉, 西川哲成 他 (4名、2,3番目). High glucose 培養下のヒト歯髓由来培養細胞における石灰. J Oral Biosciences. 50; 2008; 157.

19. Nishikawa T, Masuno K et al (5名、1,3番目). The bioabsorption of the novel porous calcium particles in the back skin of rats. 日本再生歯科医学会誌 2008; 6; 58. 2008年9月12日. 東京.

20. 西川哲成, 益野一哉 他 (9名、1,2番目). 共焦点レーザー走査顕微鏡によるインプラント周囲の新生骨形成の観察. 日本歯周病学会. 2007年9月21日. 東京.

21. Nishikawa T, Tanaka A. Bone formation at peri-implant tissue; A new observation method using confocal laser scanning microscopy. The International Congress of Oral Implantologists. 2007年8月24日. San Francisco.

22. Nishikawa T, Masuno K et al (5名、1,2番目). Comparative observation of bone formation in peri-implant tissue using soft x-ray, micro-computed tomography and confocal laser scanning microscopy. J Oral Tissue Engin. 2007; 5; 104-112.

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・准教授
研究者番号: 70140209

(2) 研究分担者

益野 一哉 (MASUNO KAZUYA)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 40288775