生体親和性セラミック—骨形成因子複合体の骨形成能について

第2報 チタニア (TiO₂)—骨形成因子複合体

鯉江 正人・河合 達志*・片岡 宏康*

栗田 新也*・梅村 昌孝**・神出 敏影

三枝樹明道*・長谷川二郎*・河合 幹

Osteoinductive activity of biocompatible ceramic-BMP

(Bone morphogenetic protein) complex

Part 2 Titania (TiO₂)-BMP complex

Masato KOIE・Tatsushi KAWAI*・Hiroyasu KATAOKA*

Shinya KURITA*・Masataka UMEMURA**・Toshikage JINDE

Akimichi MIEKI*・Jiro HASEGAWA*・Tsuyoshi KAWAI

Abstract: Bone morphogenetic protein (BMP) was combined with titania (TiO₂) to develop a new biomaterial with osteogenetic properties. To evaluate titania as a base material of the titania-BMP complex, firstly the titania were implanted in the subcutaneous tissue of rats, and secondary osteoinductive activity of titania-BMP complex was examined in the heterotopic site.

In the first experiment, titania particles (purity: 99.8%) were molded cylindrically, and sintered at 1,450°C in an electric furnace. The cylindrical sintered titania were 2 mm in diameter and 6 mm in length. These titania were implanted in the dorsal subcutaneous tissue of wistar rats, and as controls titanium was implanted in the same manner. Five weeks after implantation, all the animals were sacrificed, then the tissue around the samples was excised. After fixation in 10% formalin, samples were removed, and the tissue was observed histomorphologically.

In the second experiment, BMP was extracted from bovine bone by 6M Urea with 0.5 M CaCl₂ using the procedure reported previously. In order to make porous titania block, titania particles mixed with resin beads were molded spherically and sintered as described before. Five mg of BMP was bound on to porous titania by using 10μl of 10% gelatine solution. The complex was lyophilized and sterilized by EOG, then implanted in the thigh muscle pouch of ddY conventional mice which were sacrificed 4 weeks after implantation. As controls, BMP (5 mg)-gelatine pellets were implanted in the same way. In order to quantitate new bone formation, bone like deposit on soft X-ray films was analyzed by means of roentgenographic and computer image analysis. Furthermore undecalcified ground sections were

愛知学院大学歯学部第2口腔外科学教室

(主任: 河合 幹教授)

* 愛知学院大学歯学部歯科理工学教室

(主任: 長谷川二郎教授)

** 愛知学院大学歯学部歯周病学教室

(主任: 野口俊英教授)

The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Aichi-

gakuin University (Chief: Prof. Tsuyoshi Kawai)

* Department of Dental Material Science, School of Dentistry, Aichigakuin University (Chief: Prof. Jiro Hasegawa)

** Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichigakuin University (Chief: Prof. Toshihide Noguchi)

受付日: 平成3年12月10日

examined by light microscopy.

After 4 weeks of implantation, the titania were surrounded by thin fibrous tissue without inflammatory cells, as were the controls. All the titania-BMP complex induced new bone. On examining the subjects by computer image analysis, no significant difference appeared between the implantation of titania-BMP complex and controls. In histomorphological observation, woven bone was seen around the titania and in the titania pores, where woven bone contacted partially.

These results suggest that titania has biocompatibility and does not suppress BMP activity. Moreover, titania-BMP complex could be clinically applied.

Key words: BMP (Bone morphogenetic protein) (骨形成因子), titania (TiO_2 : Titanium dioxide) (チタニア (二酸化チタン)), osteogenesis (骨形成)

緒 言

現在、口腔外科領域、整形外科領域において磷酸カルシウム、アルミナ、などのセラミック、ならびにチタン、バイタリウムなどの金属材料が硬組織人工材料として使用されており、それぞれ優れた物理的特性を持つものの、免疫学的、物性的には新鮮自家骨に勝るものはないとされている。また自家骨中には BMP (Bone Morphogenetic Protein) が存在し、新鮮自家骨移植では、Osteoconductive な作用に加え Osteoinductive な作用が発揮される。しかし新鮮自家骨を採取するには、新たな手術侵襲が必要となり、すべての症例に適応できるわけではない。そこで著者らは、骨形成能を有する新しい硬組織人工材料を開発すべく、本論文第1報において、ハイドロキシアパタイト (HAP)-BMP 複合体を作製し、実験を行い、BMP の担体、あるいは芯材(フレーム材)としての HAP 有用性を報告した¹⁾。

HAP は osteoconductive な作用を有する bioactive セラミックスとして知られ、その作用は体液あるいは、HAP から由来する Ca, P などの微量物質の影響によるものと推測されている²⁻⁴⁾。本実験では、BMP の担体あるいは芯材としてチタニア (二酸化チタン) の多孔質焼結体を作製し実験に使用した。このチタニアはアルミナなどと同じく bioinert なセラミックであるが、BMP と複合化することにより、生体活性材料として用いることができると考えられる。またチタン金属表面に形成される不動態膜としてのチタニアの良好な生体親和性は、多数報告されているものの、焼結体としてのチタニアに関して、生体材料の分野で報告されているものはほとんどない⁵⁾。そこで本実験において、チタニアの生体親和性を評価するため、チタニアをラット背部皮下組織に埋入し、その周囲組織の観察を行い、さらに担体あるいは芯材としてのチタニアの評価を行うため、チタニア-BMP 複合体を作製しその骨形成能について調べた。

実験材料および方法

1. チタニアの皮下埋入実験

チタニアの生体親和性を検索するため以下の手法で実験を行った。

1) チタニア焼結体の作成

本研究で用いたチタニア粉末は、石原産業社製 CR-EL (純度99.8%, 粒径 $0.25\ \mu\text{m}$) で、これを粉液比1.6で1%ポリビニールアルコールを加え練和し十分に乾燥した。この粉末を鋼鉄製の金型に填入し、圧力 $200\ \text{kg}/\text{cm}^2$ を加え一軸加圧成形を行った。さらにこの成形体を大気中電気炉内で $7^\circ\text{C}/\text{min}$ で昇温し 400°C , 600°C , で各1時間係留後、さらに $1,450^\circ\text{C}$ まで昇温して、5時間係留を行い、次いで電気炉内で自然放冷し、直径2mm、長さ6mmのチタニア焼結体(チタニア)を作製した。対照試料として直径2mm、長さ6mmのチタン(純度99.9%)を準備した。各試料ともアセトンに浸漬し脱脂後、蒸留水で十分に洗浄し、超音波洗浄を行った。さらにエチレンオキシドガス滅菌を行い実験に使用した(図1)。

2) 試料埋入方法

本研究では体重 $100\sim 150\ \text{g}$ のWistar系ラット雄、7週齢を使用した。日本クレア社製 CE-2を与え、水道水を自由摂取させ、環境気温 $23\pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ で飼育した。処置前に1週間飼育後異常のないものを実験に使用した。

エーテル麻酔下にてラット背部の刺毛と皮膚消毒を行い、皮下組織に達する約10mmの縦切開を、背部中央に2か所約2cmの間隔をあけて処置し、皮下組織を鈍的に剝離し、1匹の動物に対してチタニアとチタンを各1個埋入して、切開部をナイロン糸で縫合閉鎖した。なおn数は5である。

3) チタニアの生体親和性の検索

3-1) 肉眼的観察: 実験に供したラットの屠殺前の体

図1 チタニア焼結体のX線回折チャート，各ピークはルチル型酸化チタンを示した。

写真1 BMP 移植4週後の組織像

NB: 新生骨組織, C: 軟骨組織, M: 骨髄組織,
Mu: 筋肉組織

写真2 多孔質チタニア (写真左), ならびにチタニア-BMP 複合体 (写真右) の SEM 像

重測定と，創の観察，摘出組織および試料の肉眼的観察を行った。

3-2) 組織形態学的観察：試料埋入後5週にてラットを屠殺し，試料を含め周囲組織を一塊として摘出し，10%ホルマリン液にて固定後，試料を抜き通法にしたがってパラフィン包埋を行った。ついで5 μ mの切片を作製し，ヘマトキシリン-エオジン染色を行い鏡検した。

2. チタニア-BMP 複合体の骨形成実験

1) BMP の抽出

牛皮質骨より第1報において報告した方法に準じてBMPの抽出¹⁾を行い，部分精製されたBMP（以下この部分精製BMPをBMPと称する）を得た。このBMP 3mgをマウス（ddy conventional 雄5週齢）の大腿部筋膜間に移植し，4週で屠殺後，軟X線ならびに，組織

形態学的観察により，骨形成能を確認して実験に使用した（写真1）。

2) 多孔質チタニアの焼結

本実験に使用したチタニア粉末は，上記のCR-ELで，これをチタニア：レジンビーズ（松風社製，粒径700 μ m）=2：1の重量比で調製し，20%ゼラチン（Merk社製）を加え練和し，シリコン製の球形の型に圧入した後，恒温器中で乾燥成形した。この成形体を前記のチタニアの焼結と同じ条件，方法で焼結を行いチタニア焼結体を作製した（図1，写真2左）。

3) チタニアとBMPの結合

BMP 5mgを10%ゼラチン溶液（Merk社製）30 μ lで練和し，これを多孔質チタニア表面に塗布した後，凍結乾燥を行いチタニア-BMP複合体を作成した（写真2

図2 骨形成能の定量結果

右)。

4) 移植方法

チタニア-BMP 複合体を No 5 ゼラチンカプセル内に封入し、マウスの左側大腿部筋膜間にエーテル麻酔下にて移植した。対照として BMP 5 mg を 10% ゼラチン溶液で練和し練結乾燥したものを No 5 ゼラチンカプセル内に封入し、同様に移植した。なお各群とも試料数は 10 とした。

5) 骨形成能の評価

移植 4 週間後に動物を屠殺し、軟 X 線写真上で骨様不透過像を確認した。さらにこの骨様不透過像を、河合らの方法⁶⁾に準じて Macintosh Plus に転送し、そのコンピュータ画面上的骨様不透過像の部分の白黒反転し、黒化度の計算により、骨形成能の定量評価を行った。

6) 組織形態学的観察

骨様不透過像を含む組織部分を一塊として 10% ホルマリンに 1 週間固定後、水洗、アルコール上昇系にて脱水し、スチレンモノマーで置換した後 Polyester resin (応研商事社製, Rigolac) に包埋した。この樹脂包埋した標本を Leitz 社製 Sawing microtome を用い 200 μm 前後の厚さに薄切片し、さらに 2 枚のすりガラスを用い厚さ 60 μm の研磨切片を作製した後、メチレンブルー-フクシン重染色^{7,8)}を行い鏡検した。

実験結果

1. チタニアの皮下埋入実験

1) 肉眼的所見

各実験群とも順調な体重増加を示し、局所所見としては創部の炎症は認められず正常に治癒した。また各試験片の色調、形態などの変化は全く認められなかった。

2) 組織形態学的所見

各チタニア試験片は、密な線維性被膜に被包され、その細胞成分は、核の扁平化を呈していた。またこの被膜内あるいはそれに接する部分にはマクロファージ、多核巨細胞は観察されなかった。被膜周囲の組織には、炎症性細胞浸潤はほとんど認められず、巨細胞の出現も観察されなかった。膠原線維の走行は、被膜線維の走行とは

写真3 チタニア周囲の組織像 (H-E, ×25)

写真4 チタン周囲の組織像, (H-E, ×25)

ば平行性を保っていた (写真3)。

対照としたチタン試験片は、チタニア試験片と同様に、密な線維性被膜により被包され、細胞成分も同様の所見を呈し、巨細胞も観察されなかった。また線維性被膜の厚さに関しては、両者ともほとんど差は認められなかった (写真4)。

2. チタニア-BMP 複合体の骨形成実験

1) 骨形成能の評価

チタニア-BMP 複合体、対照群を移植して、その 4 週

写真5 チタニア-BMP複合体移植4週後の組織像（フクシン-メチレンブルー重染色，×10）

NB: 新生骨組織，C: 軟骨組織，M: 骨髓組織，Mu: 筋肉組織

後に撮影した軟X線写真上の、骨様不透過像の部分、画像解析によって定量した結果両実験群において有意な差は認められなかった（図2）。

2) 組織形態学的観察

チタニアを取り囲むように Woven bone が認められ、部分的にその骨梁がチタニアに接触している像も認められた（写真5）。その骨梁内部には骨細胞が散在し、骨梁周囲には骨芽細胞、破骨細胞がところどころに観察され、骨の吸収添加が行われていることが示唆された。骨梁の間には、骨髓組織も認められ、骨梁の内側には軟骨が、その基質内には軟骨細胞が観察された。しかしながらチタニアのポア内には Woven bone の形成が部分的に認められるものの、ポア全体に骨形成が、広がっている所見は観察されなかった。チタニア中心部のポア内には骨組織は認められず、全く細胞の侵入がみられない部分も存在し、侵入した細胞群は線維芽細胞様であり、未分化な間葉系細胞も認められた。これらの細胞群はチタニア表面側のポア内とその周囲にも認められた（写真6）。また遊離したチタニア粉も少しながら散在し、それに近接して多核巨細胞も認められた。

写真6 チタニア表面側ポア内の組織像（フクシン-メチレンブルー重染色，×25）

NB: 新生骨組織

考 察

1. チタニアの組織親和性について

今回の実験では、動物の取り扱いやすさ、埋入操作の容易さ、動物自身の運動による創の影響、埋入試料の移動を最小限にするために、Wistar系ラットの背部皮下組織に短期（5週）埋入実験を行った。埋入期間に関しては、埋入後1か月の時点での組織反応が、その後の経過を十分推察できるとする報告⁹⁾に準拠して、今回の実験では5週間の観察のみとした。

チタニア (TiO_2) はチタン表面に形成される不動態膜として知られており、一種のセラミックである。チタンの良好な生体親和性は、この不動態膜の存在によるものであるとされており、チタンが軟組織内に移植された場合、薄い線維性被膜により覆われる^{10,11)}。

一般に異物が体内に埋入された場合、埋入操作の侵襲による炎症の修復過程に、異物反応が修飾する形を示す。この場合の炎症の修復とは、まず組織の挫滅により多少とも局所の変性、壊死、出血などの現象が伴われる、次いでその周辺に、充血、滲出が起こり、さらに壊死組織や滲出物の貪食とともに血管増生を主体とした肉芽形成にいたり、また一部の壊死産物などは、自己融解を起こし吸収排除される。そして最後に線維性組織を主体とした肉芽におき代わり瘢痕として治癒する。一方異物反応は、異物がやや大きく、しかも固形性のままである場合、あるいは刺激ないし障害作用の強い場合、肉芽組織の増殖を主体とする器質化の現象をみる¹²⁾。今回のチタニアの皮下埋入実験の結果では、埋入後5週の時点ですでに線維性組織被膜により被包化されており、異物巨細胞などの貪食細胞も観察されておらず、炎症性細胞浸潤や、滲出物の貯留なども認められなかったことより、チタニアは、現在医用生体材料として多く使用されているチタンと比較しても、良好な組織親和性を有すること

が確認された。

2. チタニア-BMP 複合体の骨形成能

1) チタニアと BMP の結合方法について

本実験においては、BMP の結合材としてゼラチンを使用した。これはゼラチンは入手が容易で安価なこと、操作性が比較的良好なこと、また前報までの一連の BMP 関連の研究において、BMP の活性を確認する際、ゼラチンカプセル内に封入したものを動物に移植し、その結果病理組織学的にも、骨形成能に関しても特に問題を認めていないこと^{1,6,13)}、さらに脱灰骨基質の保持材としてゼラチンカプセルを使用した報告において、ゼラチンは移植後 2 週の時点ですでに吸収されており、炎症性細胞浸潤も認められなかったとしていることによるものである¹⁴⁾。また本実験においても移植後 4 週の時点ですでにゼラチンは吸収されており、ゼラチンによると考えられる炎症性細胞浸潤は観察されなかった。

2) 画像解析による定量的評価

本実験で行った画像解析は、同じ条件で撮影現象された軟 X 線写真上の骨像不透過像の部分をもそのままコンピューター内部に転送し、その部分の黒化度の程度を計算することにより、チタニア-BMP 複合体の骨形成能を定量的に試みたものである。この実験結果では、チタニア周囲に全試料とも BMP の骨形成能によると考えられる骨像不透過像が軟 X 線上で観察され、その定量化においてもチタニア-BMP 複合体は、対照群と同程度に骨形成能を示した。このことはチタニアは、BMP の骨形成能を阻害しないことを示唆するものであり、チタニアの良好な生体親和性と、生体不活性な性質によるものであると考えられる。

3) 組織形態学的観察

本実験では、チタニア-BMP 複合体は、移植例の全例において骨形成を示した。しかしながら、今回の実験で使用したチタニアのポアー径は、その SEM 像より約 400 μm と推定され、骨の侵入が十分に可能な大きさであるにもかかわらず^{5,15)}、チタニアのポアー内には部分的に骨の侵入が認められるものの骨あるいは軟骨によって満たされることはなく、また中心部分のポアー内には全く組織の侵入がみられなかった。このことはチタニアが連続孔を有していないこと、多少なりとも異物反応が生じていることが考えられる。河村らによる BMP の担体として多孔質 HAP を用いた実験^{16,17)}では、多孔質 HAP の中心部のポアー内には、新生骨の形成は認められず、また一部ポアー内では BMP の周囲や、HAP に接して多核巨細胞が観察され、一部に異物反応が生じていたとしている。その原因には、ポアー内への未分化間葉系細胞の侵入が量的に不十分なために BMP との反応が起こらないこと、使用した BMP が粗抽出のものであるため異物反応が起こりえること、HAP そのものにも、異物反応があることなどがあげられている。一方、河合

ら¹⁸⁾は同じく HAP を BMP の担体に使用した実験において、新生骨と HAP の間には、結合組織の存在を認めなかったとしている。このことは同じ HAP でも合成方法、焼成方法などにより生体親和性、Bioactive な性質に変化が生じてくることを示唆しており、また担体自身の溶解性も影響を及ぼすのではないかと推定される。溶解性の大きな HAP は、異物反応による、吸収、排泄、あるいは HAP 自身の持つ Bioactive な性質によりその場に新生骨を誘導するのに有利な環境を作っていることが考えられる。また三枝樹による吸収性のリン酸カルシウム系セラミックスの β -TCP を BMP の担体に用いた実験では、新生骨と残存した β -TCP の間には結合組織は観察されなかったとしている¹⁹⁾。一方チタニアのような非吸収性のセラミックスは、生体の異物処理による吸収、排泄が行われないため、チタニアは、その場において、多少なりとも異物反応が生じることが懸念されるが、特に問題となる組織障害性は認められず、きわだった炎症反応も生じていないため、BMP 活性にはほとんど影響を与えず、骨形成において、促進効果も阻害効果も認められなかったものと考えられる。

3. チタニア-BMP 複合体の臨床応用の可能性

口腔外科領域において、BMP の臨床応用の可能性として、1) 嚢胞摘出後の骨欠損腔などへの補填応用、2) 骨折治癒への応用、3) 絶対的歯槽堤形成術への応用、4) 腫瘍切除後の顎顔面再建への応用、などが考えられる。今回の実験では、主に顎顔面の再建材料の開発を想定してチタニア-BMP 複合体を作成しその基礎的実験を行った。チタニア-BMP 複合体において、チタニアは一種の BMP の担体としての役割をしているが、梅村らは BMP の担体としての条件を次のようにあげている¹⁹⁾。

1) BMP の作用期間の間これを保持すること、2) 骨形成における芯材となること、3) BMP の作用を阻害しないこと、4) 生体親和性が良好なこと。今回の実験結果からチタニア-BMP 複合体は、これら 4 条件をすべて満たしていることが判明した。しかしながら人工骨として応用するためには、これらの条件のほかに、担体自身に機械的、物理的な強度が要求され、研究の余地が残されている。一方 BMP は最近多くの研究者によって分離精製が進められ、生物活性を持ついくつかの BMP が報告されており^{20,21)}、その本体がはっきりとされつつあるが、TGF- β との関連など^{22,23)} まだ不明な点も多い。将来 BMP が完全な形で精製され、大量生産が可能となったとき、BMP を応用した、補填材、人工骨などあらゆる応用の可能性が広がると考えられる。

結 語

チタニア焼結体を作製し、その生体親和性を評価するとともに、BMP との複合体を作製して骨形成実験を行

った結果、次のような結論を得た。

1. チタニアは、良好な生体親和性を示す。
2. チタニア-BMP 複合体は、移植した全例において骨形成能を示した。

3. チタニアは、BMP の作用を阻害しないことが示された。

以上のことから、チタニア-BMP 複合体は、口腔外科領域の骨再建材料などに、応用される可能性があることが示唆された。

引用文献

- 1) 河合達志, 三枝樹明道, 他: 生体親和性セラミックス-骨形成因子複合体の骨形成能について. 第1報-ハイドロキシアパタイト-骨形成因子複合体. 日口外誌 35: 1804-1811 1989.
- 2) 青木秀希, 加藤一男, 他: 新しい歯科インプラント材料としてのアパタイト焼結体. 歯界展望 49: 567-575 1977.
- 3) 岩田耕三: ハイドロキシアパタイト (HAP) の組成, 表面性状, 溶解性が骨伝導性および組織親和性に与える影響. 口科誌 39: 1039-1065 1990.
- 4) 須田 暁, 白井康正, 他: 合成水酸化アパタイトと新生骨結合部の微細構造. 整外基礎科学 12: 252-255 1985.
- 5) Hulbert, S.F., Bowman, J.J., et al.: Characterization of tissue growth into pellets and partial sections of porous porcelain and titania implanted in bone. Materials Science Research 7: 283-298 1974.
- 6) Kawai, T. and Urist, M.R.: Quantitative computation of induced heterotopic bone formation by image analysis system. Clin Orthop 233: 262-267 1988.
- 7) Huber, J.D., Parker, F., et al.: A basic fuchsin and alkalized methylene blue rapid stain for epoxy-embedded tissue. Stain Technol 43: 83-87 1969.
- 8) 桐ヶ久保光弘: 骨適合性を有する多相系生医学材料に関する研究. 第2報 ハイドロキシアパタイト-合成高分子複合材料の生体内組織反応について. 日口外誌 32: 1561-1580 1986.
- 9) 佐藤温重編: 医歯用バイオマテリアルの安全性評価法. 第12版, サイエンスフォーラム, 東京, 1987, 89-92頁.
- 10) 栗田新也, 河合達志, 他: (抄)骨形成因子金属複合体の開発. 歯材器10(特17): 147-148 1991.
- 11) 松前久子: 生体材料としてのタンタルおよびジルコニウムに関する実験的研究. 口科誌 37: 862-878 1988.
- 12) 赤崎兼義編: 病理学総論. 第11版, 南山堂, 東京, 1974, 204-208頁.
- 13) Kawai, T. and Urist, M.R.: Bovine Tooth-Derived Bone Morphogenetic Protein. J Dent Res 68: 1069-1074 1989.
- 14) 北岡 豊: 脱灰骨基質の骨形成能に関する実験的研究. 日口外誌 33: 2081-2090 1987.
- 15) Hulbert, S.F., Young, F.A., et al.: Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prosthesis. J Biomed Mater Res 4: 433-456 1970.
- 16) 河村守雄, 岩田 久, 他: 骨形成因子結合ハイドロキシアパタイトの軟骨. 骨形成能について. 中部日整災外会誌 29: 130-132 1986.
- 17) Kawamura, M., Iwata, H., et al.: Chondro-osteogenic response to crude bone matrix proteins bound to hydroxyapatite. Clin Orthop 281-292 1986.
- 18) 梅村昌孝, 河合達志, 他: 骨形成因子-ハイドロキシアパタイト複合体の骨形成能について. 日歯周誌 31: 860-869 1989.
- 19) 三枝樹明道: β -リン酸三カルシウム-骨形成因子複合体の骨形成能. 愛院大歯誌 28: 43-58 1990.
- 20) Wozney, J.M., Rosen, V., et al.: Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. Science 242: 1528-1534 1988.
- 21) Luyten, V.S., Reddi, A.H., et al.: Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes *in vitro* by osteogenin. Proc Natl Acad Sci USA 86: 8793-8797 1989.
- 22) Sampath, T.K., Coughlin, J.E., et al.: Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP 2A, two members of the transforming growth factor- β superfamily. J Biol Chem 265: 13198-13205 1990.
- 23) Takuwa, Y., Ohse, C., et al.: Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. Biochem Biophys Res Commun 174: 96-101 1991.