

生体機能分子を利用したアパタイト系生体材料の開発

¹⁾産業技術総合研究所ナノテクノロジー研究部門

²⁾産業技術総合研究所人間福祉医工学研究部門

³⁾茨城県立医療大学付属病院整形外科

大矢根綾子¹⁾, 鶴嶋英夫¹⁾, 十河友²⁾, 伊藤敦夫²⁾, 六崎裕高³⁾

Development of Apatite-Based Biomaterials Utilizing Biologically Functional Molecules

Ayako Oyane¹⁾, Hideo Tsurushima¹⁾, Yu Sogo²⁾, Atsuo Ito²⁾,
Hirotaka Mutsuzaki³⁾

¹⁾National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

²⁾National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

³⁾Ibaraki Prefectural University of Health Sciences

1. はじめに

一般に、生体は人工材料を異物として認識し、体内から排除しようとしたり周囲の組織から隔離しようとする。例えば指に小さなトゲが刺さっても、そのトゲの表面に沿って上皮組織が体内方向に成長していき (down growth), 大抵の場合トゲは自然に抜け落ちる。異物に対するこのような反応は生体の自己防衛のために必要であるが、生体材料に対しては怪我や病気の治療の妨げとなることがある。ヒトの歯や骨の主要無機成分である水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) は、生体から異物として認識されないために上述の異物反応を引き起こすことなく、しかも生体骨と直接結合して一体化する性質 (骨結合能) を有している¹⁾。このためアパタイトは、セラミック粉体・バルク体、表面コーティング材、複合材料の無機フィラーな

どの形で人工骨として臨床応用されている。

アパタイト系生体材料の高機能化 (例えば骨結合能の向上) を目指した研究は、物理化学的なアプローチ (結晶構造・組成の制御, 分極, 多孔質化, 他の材料との複合化など) によるものと、生物学的なアプローチ (生体機能分子や細胞との複合化) によるものとに大別される。近年の分子生物学や再生医療分野の飛躍的進歩を受けて、後者の生物学的なアプローチがより注目されるようになってきた。具体的には、細胞のふるまい (接着, 増殖, 分化など) を制御する生理活性タンパク質や、タンパク質合成の設計図である遺伝子といった生体機能分子をアパタイトと複合化させることにより、材料側からより積極的に生体内の細胞に働きかけ、生体反応を制御しようとする試みが盛んに行われている。本稿では、この生物学的アプローチによるアパタイト系生体材料の高機能化について、筆者らの研究内容を中心に紹介する。

2. 骨結合を促進する人工骨の開発

アパタイトセラミックは上述のように優れた生体親和性と骨結合能を有しているため、頭蓋骨から足の指骨に至るまで様々な部位の人工骨用材料として使用されている。しかし、アパタイトセラミックが生体内で周囲の骨と結合するまでには長い期間を必要とする。高齢者においては骨組織を再生する能力が低下しているため、骨結合に要する期間は若年者に比べさらに長い。骨結合が不十分であるうちは、強度不足や美容上の問題（例えば顔面に凹凸が生じてしまう）が懸念され、治療部位によっては運動制限や入院治療を必要とする。入院治療の長期化は高齢者の認知症を誘発する恐れもあることから、周囲の骨とより短期間に結合する人工骨が求められている。アパタイトセラミックの骨結合能を高めるための生物学的アプローチとしては、骨形成タンパク質-2 (bone morphogenetic protein-2; BMP-2) をセラミック表面に物理的に吸着させる手法²⁾が知られている。BMP-2 は、骨形成の誘導、促進、維持に作用する生理活性タンパク質である。しかしこの手法では、セラミック表面に吸着した BMP-2 が体液中で容易に拡散・失活してしまう。Liu らは、BMP-2 含有リン酸カルシウム過飽和溶液中で人工材料表面に BMP-2 とリン酸カルシウムの複合層を形成させることにより、上記の問題を解決した³⁾。ただし、骨再生促進効果を得るためには相当量の BMP-2 を使用する必要があるが、現状では BMP-2 は極めて高価であり臨床応用の上で問題がある。

筆者らは、BMP-2 よりも安価で、すでに厚生労働省の認可を受けて皮膚潰瘍治療薬として市販されている線維芽細胞増殖因子-2 (fibroblast growth factor-2; FGF-2) を利用して、アパタイトセラミック製人工骨の骨結合能の向上に取り組んでいる。FGF-2 は骨芽細胞や線維芽細胞を含む多くの細胞の分化、増殖に作用する生理活性タンパク質であり、ナノグラム

オーダーの極微量でも骨再生を促進することが動物実験により確認されている⁴⁾。従って、アパタイトセラミックの表面に FGF-2 とアパタイトの複合層 (F-HAP 層) を形成させれば、FGF-2 の生理活性によって周囲の骨組織の再生を促進できると考えられる。F-HAP 層は、Liu らの手法³⁾を応用して、FGF-2 含有リン酸カルシウム過飽和溶液中にアパタイトセラミック基板を浸漬することにより形成させることができる⁵⁾。ただし筆者らはこの過飽和溶液を、厚生労働省の認可を受けて市販されている医療用輸液（水分、電解質、栄養素などを静脈から体内に補給するための溶液）及び薬剤のみから調製している (Liu らは実験用試薬から調製)。具体的には、カルシウムイオン源としてリンゲル液、リン酸イオン源としてクリニザルツ®B 液、pH 調整剤としてバイフィル®専用炭酸水素ナトリウム補充液、及び FGF-2 としてフィブラスト®液を所定の割合で混合することにより、上記の過飽和溶液を調製している。実際に人工骨として臨床応用されているバーホールボタン（開頭手術後の頭蓋骨の固定に使用される）のモデル材料として、円盤状のアパタイトセラミック基板を作製し、同層表面に F-HAP 層を形成させた。リン酸緩衝生理食塩水 (37℃) を用いた in vitro 溶出試験の結果によれば、FGF-2 は生理活性を保持したまま 16 日間にわたって F-HAP 層から徐放した⁶⁾。また、ラットを用いた in vivo 評価の結果によれば、頭蓋骨への埋入 8 週間において、F-HAP 層を形成させた試料では未処理の試料に比べ、周囲の骨組織の再生が有意に促進されていた (図 1)⁶⁾。この結果は、アパタイトセラミック製人工骨の表面に F-HAP 層を形成させれば、周囲の骨組織との結合期間を短縮できる可能性があることを示している。FGF-2 は体液中で短時間のうちに失活することが知られているが、上記の過飽和溶液を利用した F-HAP 層中への担持・複合化が、長期間にわたる FGF-2 の活性保持と slow release を実現していると考えられる。認

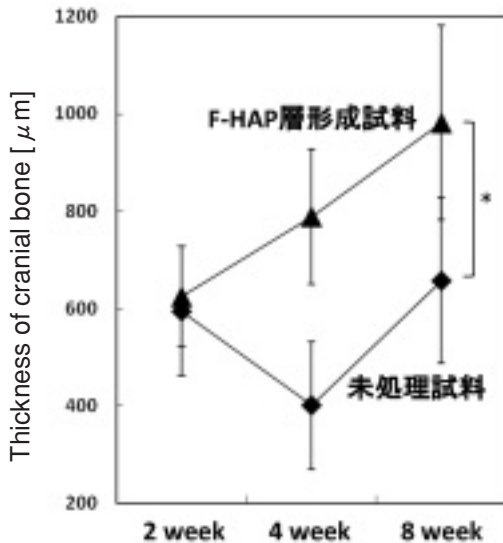


図1 埋入2, 4, 8週後における、未処理試料及びF-HAP層形成試料周辺の頭蓋骨の厚さ (*: $p < 0.001$)

可済みの医療用輸液・薬剤のみを使用する本F-HAP層形成技術は、比較的早期に臨床応用可能と期待される。

3. 細菌感染を防ぐ経皮デバイスの開発

アパタイトは骨組織だけでなく皮膚組織に対しても高い親和性を示すことから、人工骨のほかに経皮デバイスにも応用されている。経皮デバイスとは皮膚を貫通して使用される医療用具のことで、点滴や透析治療、人工呼吸器などに用いられる経皮カテーテル・チューブ、人工歯根、骨折部位の保護・固定に用いられる創外固定器、埋め込み型人工心臓用電源ケーブルを例として挙げることができる。従来の高分子材料や金属材料製の経皮デバイスは皮膚組織との親和性に劣るので、指に刺さったトゲと同様に上皮組織のdown growthを引き起こす。それにより形成される皮膚組織とデバイスの隙間を感染経路として、細菌感染（隙間感染）を誘発し易いことが問題となっている（図2、左図）。隙間感染が生じると本来の治療に支障をきたすだけでなく、感染症に対する新たな治療も必要

になってしまう。また、感染予防対策として行われる抗生物質の投与、消毒、入浴制限なども患者の生活の質の低下や医療費の増加を招くことから、感染防止機能を備えた経皮デバイスが求められている。

Aokiらはアパタイトの皮膚組織親和性に着目し、アパタイトセラミック製の経皮デバイスを開発した⁷⁾。この経皮デバイスは上皮組織のdown growthを抑制して隙間感染リスクを低減したが、セラミック材料としての硬さ、脆性が問題となっていた。Furuzonoらは、高分子材料表面にアパタイトナノ粒子からなる層を形成させることにより、高分子材料由来の柔軟性とアパタイト由来の生体親和性を併せ示す経皮デバイスを開発している⁸⁾。この経皮デバイスは現在、臨床応用に向けて企業への技術移転が開始されている。

筆者らは、材料表面のアパタイト層（HAP層）中に生体機能分子（生理活性タンパク質であるラミニンやFGF-2）を複合化させることにより、経皮デバイスの隙間感染リスクのさらなる低減に取り組んでいる（図2、右図）。具体的には、高分子材料及び金属材料の表面に、ラミニンとアパタイトの複合層（L-HAP層）

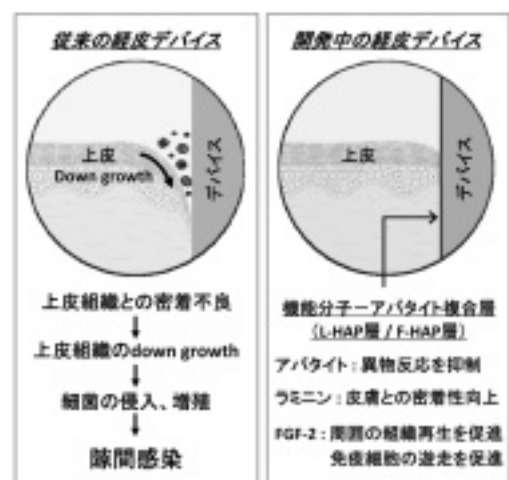


図2 従来の経皮デバイス（左図）及び筆者らが開発している経皮デバイス（右図）

やF-HAP層（第2章参照）を形成させる技術を開発し、臨床応用に向けた材料評価と技術改良を進めている。

ラミニンは皮膚の基底膜の構成成分であり、細胞接着活性を示すタンパク質（細胞接着性タンパク質）の一つである⁹⁾。経皮デバイスの表面にL-HAP層を形成させれば、ラミニンの細胞接着活性によって皮膚組織とデバイスとの密着性をより向上できると考えられる。L-HAP層は、ラミニン含有リン酸カルシウム過飽和溶液中に、表面処理された高分子材料¹⁰⁾あるいは金属材料¹¹⁾基板を浸漬することにより形成させることができる。このプロセスでは、過飽和溶液中で成長するアパタイト結晶の表面にラミニン分子が吸着・結合することにより、L-HAP層が形成されていく¹²⁾。こうして形成されるL-HAP層中のラミニン分子は、図3に示すようにナノスケールで分散した状態でアパタイト結晶よりなるマトリックス中に担持される¹²⁾。本プロセスではこのようなナノ複合構造が構築されることによって、物理的な表面吸着プロセスに比べてより多量のラミニン分子をより安定に材料表面に担持・複合化させることができる¹¹⁾。また、湿潤環境下におけるL-HAP層のせん断強度は、ラミニンを含まないHAP層のそれよりも高くなる¹³⁾。in vitro 評価の結果によれば、L-HAP層中においてもラミニンは細胞接着活性を保持しており、同層表面に対する細胞の接着・伸展を促進した(図4, 下図)^{10,11)}。ラットを用いたin vivo 評価の結果によれば、未処理の高分子材料（エチレン-ビニルアルコール共重合体）製経皮デバイス上では上皮組織がdown growthしたのに対し（図5, 上図円内）、HAP層及びL-HAP層を形成させたデバイス上では、埋入後14日間にわたって上皮組織のdown growthが抑制された(図5, 中・下図)¹⁴⁾。表面にHAP層及びL-HAP層を形成させたデバイスに対して埋入3日後に引き抜き試験を行った結果、L-HAP層を形成させたデバイスの引き抜き強度は、HAP層を形成させ

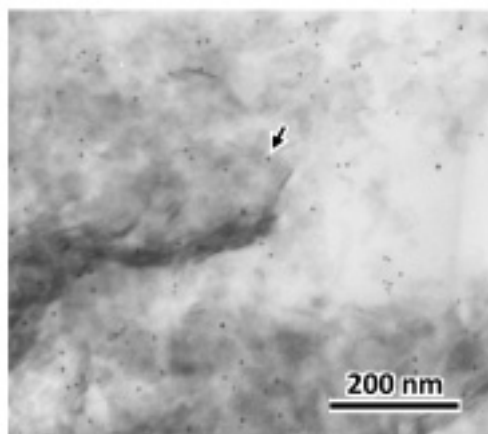


図3 免疫染色されたL-HAP層切片の透過型電子顕微鏡写真
(矢印：ラミニンの標識である直径5 nmの金コロイド)

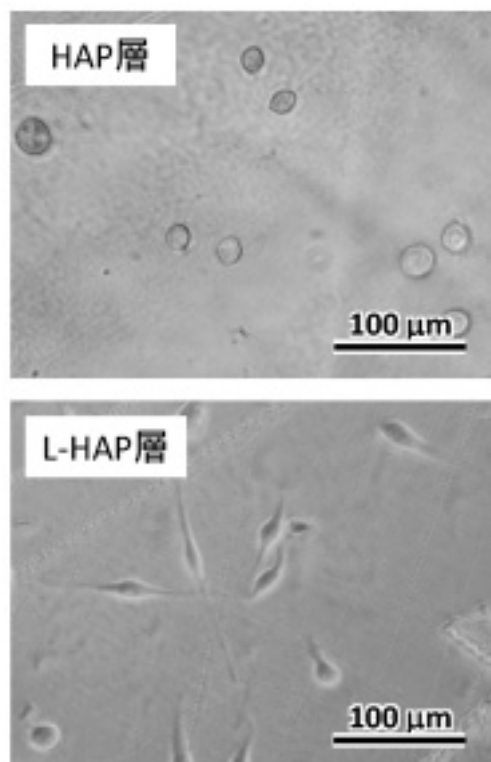


図4 培養24時間後における、HAP層（上図）及びL-HAP層（下図）表面のBHK-21細胞の形態（ラミニンの複合化により、細胞が接着性の低い球状（上図）から接着性の高い扁平状（下図）に変化している。）

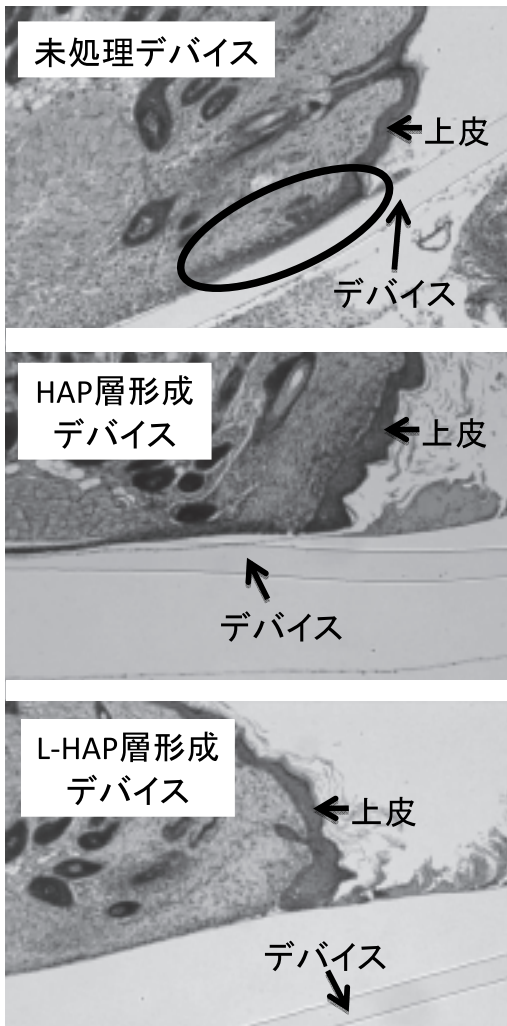


図5 埋入2週間における、未処理デバイス（上図）、HAP層形成デバイス（中図）、及びL-HAP層形成デバイス（下図）周辺の組織標本（上図円内：上皮 down growth）

たデバイスのそれに比べ有意に高かった。以上のように、経皮デバイスの表面にL-HAP層を形成させれば、上皮 down growthを抑制しつつ皮膚組織との密着性を向上できるので、隙間感染リスクの低減に有効と期待される。ただし、ラミニンは医薬品としての認可を受けていないため、本L-HAP層形成技術を臨床応用するためのハードルは高い。

一方FGF-2は、皮膚潰瘍治療薬として既に臨床応用されている（第2章参照）。FGF-2は

骨芽細胞や線維芽細胞に作用して骨や皮膚組織の再生を促進するだけでなく、血管新生も促進することが知られている。経皮デバイスの表面にF-HAP層を形成させれば、周囲の皮膚組織の再生が促進されるとともに、侵入細菌を攻撃する免疫系細胞（リンパ球や白血球）が新生血管を通じてデバイス周辺の組織に送達され易くなることによって、隙間感染リスクを低減できると考えられる。アパタイトセラミック基板表面にF-HAP層を形成させるプロセス（第2章参照）と同様のプロセスにより、表面処理された高分子材料¹⁵⁾及び金属材料¹⁶⁾の表面にもF-HAP層を形成させることができる。実際に経皮デバイス（骨折治療用創外固定器）として臨床応用されている、陽極酸化チタン金属製スクリューの表面にHAP層及びF-HAP層を形成させ、ウサギを用いてin vivo評価を行った。埋入4週間において、未処理のデバイスとHAP層を形成させたデバイスでは、全16検体のうちの約94%にあたる15検体に隙間感染（細菌感染が骨髄炎にまで進行した検体を含む）が認められたのに対し、F-HAP層を形成させたデバイスで隙間感染が認められたのはその約半数の7検体（全16検体のうちの約44%）のみであった¹⁶⁾。すなわち、経皮デバイス表面にF-HAP層を形成させることにより、隙間感染率を半減できることが示された。第2章でも述べたように、このF-HAP層形成技術で使用する過飽和溶液の原料溶液・薬剤はいずれも厚生労働省の認可を受けて市販されているものであることから、本技術は比較的早期に臨床応用可能と期待される。

4. 細胞分化を効率的に誘導する再生医療用スキャホルドの開発

第2・3章では、生理活性タンパク質であるFGF-2やラミニンを複合化することによってアパタイト系生体材料の高機能化を図る試みについて紹介したが、タンパク質合成の設計図であるDNAを複合化することによっても高機能

化を図ることができる。本章では、DNA と生理活性タンパク質を利用した再生医療用スキャホールドの開発について紹介する。

再生医療とは、細胞を用いて失われた臓器や組織の機能を回復させたり、臓器や組織そのものを再生しようとする医療のことで、臓器移植医療や人工材料を用いた置換医療の問題点を解決し得る新しい医療として注目されている。再生医療では一般に、スキャホールドと呼ばれる連通多孔形状の細胞足場材料の上に未分化な細胞（例えばES細胞やiPS細胞）を播種し、生体内または生体外の適当な環境下で培養することによって目的の組織を再生する。スキャホールドとしては、生分解性の高分子材料や生体親和性に優れたアパタイトセラミックなどが用いられる。生体親和性を高めるために、表面にHAP層を形成させた高分子材料も用いられる¹⁷⁾。このスキャホールドの上に播種された細胞から組織を再生させるためには、未分化な細胞から目的とする細胞への分化を誘導する必要がある。

細胞の分化を誘導するための効果的な手法の一つとして遺伝子導入が挙げられる。遺伝子導入とは、目的のタンパク質を合成させるための遺伝情報（塩基の並び順）を含むDNAを細胞内に送り込む技術のことである。実は、アパタイトは遺伝子導入の際に使用される導入剤（DNAを内包して細胞内に送り届ける運び屋）としても、古くから用いられてきた¹⁸⁾。アパタイト以外にも、ウイルス、脂質、カチオン性高分子などが遺伝子導入剤として用いられている。しかし、従来の遺伝子導入剤はいずれも粒子状であり、細胞の上から振り掛けて使用される。従って、連通多孔形状を有するスキャホールドの全表面において遺伝子導入を行うことは困難であった。Sheaらは、粒子状の遺伝子導入剤を用いる代わりに、スキャホールドを構成する生分解性高分子材料（乳酸-グリコール酸共重合体）中にDNAを複合化させることによってこの問題を解決した¹⁹⁾。しかし、

上記の高分子材料の生体親和性は、アパタイトのそれに比べて低い。Shenらは、高分子材料（ポリスチレン）の表面にDNAとアパタイトの複合層（D-HAP層）を形成させ、同層表面において比較的高効率に遺伝子導入を行えることを示した²⁰⁾。この技術を再生医療に応用するためには、遺伝子導入効率をさらに高める必要がある。

筆者らは、L-HAP層（第3章参照）の形成技術を応用し、上記のD-HAP層中に細胞接着性タンパク質であるラミニン²¹⁾あるいはフィブロネクチン²²⁾を担持・複合化させることによって（DC-HAP層とする）、遺伝子導入効率をさらに一桁から二桁高めることに成功した（図6）。DC-HAP層表面における遺伝子導入効率は、非ウイルス系の遺伝子導入剤の中でトップクラスの効率を発揮する市販の脂質系導入剤、LipofectamineTMと同等以上であった²¹⁾。すなわち、DC-HAP層による遺伝子導入システムは、ウイルスを用いない安全性の高いシステムとしては非常に高効率であると言える。このDC-HAP層表面において実際に細胞の分化を

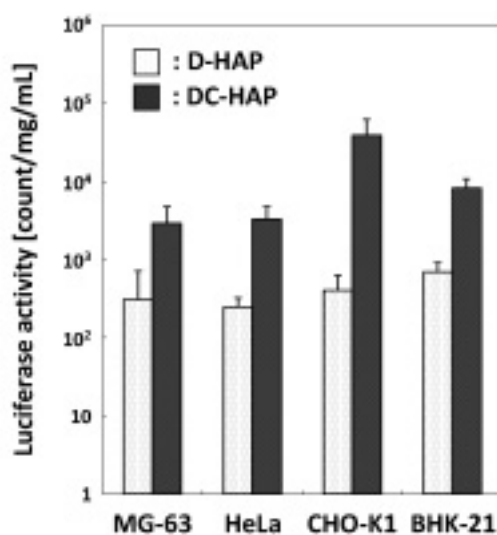


図6 D-HAP及びDC-HAP層（luciferaseを合成させるための遺伝情報を含むDNA、及びラミニンを用いて形成）表面における、MG-63、HeLa、CHO-K1及びBHK-21細胞への遺伝子導入効率

誘導できることを、以下のように確認した。まず、神経成長因子を合成させるための遺伝情報を含む DNA、及びラミニンを用いて DC-HAP 層を形成させた。同層表面で未分化神経様細胞である PC 12 細胞を培養したところ、培養 7 日後には PC 12 細胞が神経突起を伸長させて神経様細胞に分化することを確認した²³⁾。

D-HAP 層に比して DC-HAP 層において遺伝子導入効率が向上した理由は、次のように考察される。DC-HAP 層中に担持・複合化された細胞接着性タンパク質は、図 4 に示した結果と同様に細胞の接着・伸展を促進し、細胞と複合層との間の接着面積を広げる^{21,22)}。D-HAP 層表面においては、細胞は接着性の低い球状であるので^{21,22)}、層から溶出する DNA は周囲の溶液中に拡散し易いと考えられる (図 7, 左図)。一方 DC-HAP 層表面においては、細胞との間の広い接着面内に層から溶出した DNA が濃縮されることにより、効率良く細胞内に送り込まれると考えられる (図 7, 右図)。

以上のような遺伝子導入の機序によって、DC-HAP 層から溶出した DNA は、同層表面に接着した細胞にのみ選択的に導入され、同じ培養液中でたった数ミリ離れた場所であっても、層の外部にいる細胞にはほとんど導入されない²²⁾。従って、DC-HAP 層をスキヤホールド表面にパターンニングすれば、スキヤホールド上の一部分に接着した細胞にのみ DNA を導入し

たり、場所によって別々の DNA を細胞内に導入することができる。このようなスキヤホールドを用いることによって、複数の細胞からなる組織の形態的構築や、副作用の少ない再生治療を実現できる可能性がある。また DC-HAP 層は、スキヤホールドとして多用されているアパタイトセラミック、生分解性のポリ乳酸²⁴⁾及びポリカプロラクトン^{25,26)}を含む、種々の人工材料の表面に形成させることができる。DC-HAP 層を表面に形成させたスキヤホールドは、生体親和性に優れ、安全かつ効率的に目的の場所の細胞に DNA を導入でき、これにより細胞の分化を誘導できることから、再生医療において有用と考えられる。

5. おわりに

アパタイトは優れた生体親和性と骨結合能を有することから、人工骨などの生体材料に応用されてきた。本稿では、生体機能分子である生理活性タンパク質や DNA を複合化させることによりアパタイト系生体材料を高機能化する試みについて紹介した。アパタイトは古くから研究されてきた材料であるが、このような生物学的なアプローチによる研究が臨床応用にまで発展した事例は少ない。生体機能分子を利用した生体材料の臨床応用には、安全性の確保や品質保証、製造コスト、生理活性の不活化の問題など、クリアするべきハードルが多いが、これら

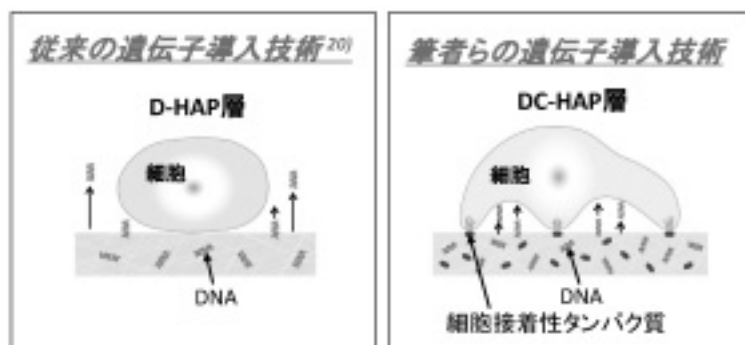


図 7 D-HAP 層 (左図) 及び DC-HAP 層 (右図) 表面における遺伝子導入の推定機序

のハードルを越えるだけの高い機能を有する生体材料が開発され、患者の生活の質の向上に資することを期待している。

謝辞

筆者らの経皮デバイスに関する研究は平成17年度NEDO産業技術研究助成の助成を受けて実施されました。また、同研究成果は、産業技術総合研究所の兵藤行志氏、東北大学の佐々木健吉氏、上高原理暢助教、井奥洪二教授との共同研究により、筆者らのスキヤホールドに関する研究成果は、早稲田大学の村山雅美氏、矢崎侑振氏、山崎淳司教授との共同研究により得られました。

参考文献

- 1) M. Jarcho, J. F. Kay, K. I. Gumaer, R. H. Doremus, and H. P. Drobeck, *J. Bioeng.*, **1**, 79-92 (1977).
- 2) Y. Horisaka, Y. Okamoto, N. Matsumoto, Y. Yoshimura, J. Kawada, K. Yamashita, and T. Takagi, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **268**, 303-312 (1991).
- 3) Y. Liu, K. de Groot, and E. B. Hunziker, *Bone*, **36**, 745-757 (2005).
- 4) J. S. Wang and P. Aspenberg, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **333**, 252-260 (1996).
- 5) Y. Sogo, A. Ito, M. Onoguchi, A. Oyane, H. Tsurushima, and N. Ichinose, *Biomed. Mater.*, **2**, S 175-S 180 (2007).
- 6) 鈴木謙介, 鶴嶋英夫, 丸島愛機, 十河友, 大矢根綾子, 伊藤敦夫, 松村明, 第1回日本整容脳神経外科研究会発表記録集, 24-25 (2008).
- 7) H. Aoki, M. Akao, Y. Shin, T. Tsuzi, and T. Togawa, *Med. Prog. Technol.*, **12**, 213-220 (1987).
- 8) T. Furuzono, P. L. Wang, A. Korematsu, K. Miyazaki, M. O. Mori, Y. Kowashi, K. Ohura, J. Tanaka, and A. Kishida, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 217-226 (2003).
- 9) R. Timpl, H. Rohde, R. P. Gehron, S. I. Rennard, J. M. Foidart, and G. R. Martin, *J. Biol. Chem.*, **254**, 9933-9939 (1979).
- 10) A. Oyane, M. Uchida, and A. Ito, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **72**, 168-174 (2005).
- 11) M. Uchida, A. Oyane, and A. Ito, *Adv. Mater.*, **16**, 1071-1074 (2004).
- 12) A. Oyane, M. Uchida, K. Onuma, and A. Ito, *Biomaterials*, **27**, 167-175 (2006).
- 13) A. Oyane, Y. Yokoyama, M. Kasahara, N. Ichinose, M. Saito, and A. Ito, *Mater. Sci. Eng. C*, **29**, 1681-1686 (2009).
- 14) A. Oyane, K. Hyodo, M. Uchida, Y. Sogo, and A. Ito, *Key Eng. Mater.*, **309-311**, 1181-1184 (2006).
- 15) K. Sasaki, A. Oyane, K. Hyodo, A. Ito, Y. Sogo, M. Kamitakahara, and K. Ioku, *Key Eng. Mater.*, **361-363**, 455-458 (2008).
- 16) H. Mutsuzaki, A. Ito, M. Sakane, Y. Sogo, A. Oyane, and N. Ochiai, *J. Biomed. Mater. Res. B*, **86**, 365-374 (2008).
- 17) C. M. Cowan, Y. Y. Shi, O. O. Aalami, Y. F. Chou, C. Mari, R. Thomas, N. Quarto, C. H. Contag, B. Wu, M. T. Longaker, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 560-567 (2004).
- 18) F. L. Graham and A. J. van der Eb, *Virology*, **52**, 456-467 (1973).
- 19) L. D. Shea, E. Smiley, J. Bonadio, and D. J. Mooney, *Nat. Biotech.*, **17**, 551-554 (1999).
- 20) H. Shen, J. Tan, and W. M. Saltzman, *Nat. Mater.*, **3**, 569-574 (2004).
- 21) A. Oyane, H. Tsurushima, and A. Ito, *Gene Therapy*, **14**, 1750-1753 (2007).
- 22) A. Oyane, M. Murayama, A. Yamazaki, Y. Sogo, A. Ito, and H. Tsurushima, *J. Biomed. Mater. Res. A*, in press.
- 23) A. Oyane, H. Tsurushima, and A. Ito, *J. Gene Medicine*, submitted.
- 24) Y. Yokoyama, A. Oyane, and A. Ito, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **18**, 1727-1734 (2007).
- 25) A. Oyane, M. Uchida, Y. Yokoyama, C. Choong, J. Triffitt, and A. Ito, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **75**, 138-145 (2005).
- 26) A. Oyane, M. Uchida, C. Choong, J. Triffitt, J. Jones, and A. Ito, *Biomaterials*, **26**, 2407-2413 (2005).