研究論文

リン酸カルシウム-生分解性ポリマー複合材料への骨形成促進イオン徐放機能の付与

河合 星, 松原 孝至, 前田 浩孝, 小幡 亜希子, 春日 敏宏*

名古屋工業大学大学院環境セラミックス分野, 〒466-8555 名古屋市昭和区御器所町.

Preparation of Calcium Phosphate-Biodegradable Polymer Composites with Ion-Releasing Ability for Enhancing Bone Formation

Akari KAWAI, Takashi MATSUBARA, Hirotaka MAEDA, Akiko OBATA and Toshihiro KASUGA*

Division of Advanced Ceramics, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8555, Japan.

Received January 30, 2020; Revised March 26, 2020; Accepted March 26, 2020

ABSTRACT

An inorganic-organic composite consisting of bioreabsorbable β -tricalcium phosphate (β -TCP) and a biodegradable polymer is one of the most important materials for artificial bone with good shapability. In the present work, in order to activate bone-forming cells immediately after being implanted in a living body, a function for releasing therapeutic ions was incorporated to the composite. A small amount (8 vol%) of $46.1\text{SiO}_2 \cdot 24.4\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{MgO} \cdot 26.9\text{CaO} \cdot 2.6\text{P}_2\text{O}_5$ (mol%) glass particles was embedded successfully in the composite. When the glass particles containing Na_2O were included in the composite, the molecular weight of the polymer as the matrix phase was severely reduced and its hydrolysis in Tris-HCl buffer solution was drastically accelerated. On the other hand, when the glass particles containing MgO were included, therapeutic ions such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , and silicate ions were continuously released with almost no change in the pH of the buffer solution. The release amount of silicate ions was well controlled, to avoid excessive dissolution, compared to those of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions. The glass is one of the great promising candidates as a source in the composite for releasing therapeutic ions that enhance bone formation.

KEY WORDS

composite, tricalcium phosphate, glass, biodegradable polymer, ion release

1 緒 言

骨欠損部に埋入する材料として、高い骨伝導能を有し生体吸収性を示す β 型リン酸三カルシウム (β -TCP) が広く使用されている¹⁾。一方、無機有機複合材料の開発も進んでいる^{2,3)}。 β -TCP を生分解性ポリマーに分散させた複合材料では、脆性を克服することは容易ではないが⁴⁾、様々な形状へ加工しやすくなり適応例が広がると期待される。代表的な生分解性ポリマーとして、ポリ乳酸⁵⁾やポリ(乳酸・グリコール酸)共重合体⁶⁻⁸⁾が挙げられる。とくに、D 体を含む共重合体(以下、PDLLGA)は非晶質で生分解性が高いとされており、水膨潤性も有する場合がある⁹⁾。

近年では早期治療を目的とし、材料に骨形成促進機能を付与することが期待されている。材料の溶解とともに骨形成促

進因子を溶出させるものであり、これにより骨芽細胞を遺伝子的に活性化させ、石灰化過程(接着, 増殖, 分化, 石灰化)を促進することができる。このような働きを示す骨形成促進因子の例として、いくつかのタンパク質やアミノ酸、あるいは無機イオン(治療イオン; Ca^{2+} , Mg^{2+} , ケイ酸イオン他)が挙げられる¹⁰⁾。このうち、無機イオンは材料合成に伴う変性や保管時の経時変化がない点で有用である。たとえば、生体内に埋入した直後から治療イオンが徐放して骨形成性細胞を活性化させる機能が β -TCP/生分解性ポリマー複合材料に付与されれば、超高齢社会へ向けた人工骨として重要な素材となると期待される。

Hench らにより開発された Bioglass[®]45S5 は、 $46.1\text{SiO}_2 \cdot 24.4\text{Na}_2\text{O} \cdot 26.9\text{CaO} \cdot 2.6\text{P}_2\text{O}_5$ 組成 (mol%) からなり、優れた生体活性(骨と化学結合する性質)を有する。45S5 は生体内に埋め込まれると、無機イオン (Na^+ , Ca^{2+} , ケイ酸, リン酸

* Corresponding author, E-mail: kasuga.toshihiro@nitech.ac.jp

イオン)を溶出し、徐々に溶解する¹¹⁾。45S5のようなシリカ含有量の低いケイ酸塩ガラスを生体内に埋入すると¹²⁾、すぐに体液中のプロトンとのイオン交換により、 Na^+ や Ca^{2+} イオンが溶出する。次に、この反応に伴いシラノール基(Si-OH)が形成され、続いて Si-OH の縮合によりガラス表面にシリカゲル層が形成される。このため、ケイ酸イオンの溶出は緩やかになる。

筆者らの研究グループは、ケイ酸、 Mg^{2+} イオンの供給源として $40\text{SiO}_2 \cdot 40\text{MgO} \cdot 20\text{Na}_2\text{O}$ ガラス、 Ca^{2+} イオン供給源として炭酸カルシウム(バテライト)粒子を選択し、PDLLGAと複合化した材料を作製した¹³⁾。材料を細胞培養培地中に浸漬した際には、ガラスから溶出したケイ酸イオンがバテライト粒子表面を被覆するようにシリカゲルを形成した。このゲル層は、浸漬直後に起こるバテライトからの過剰な Ca^{2+} イオン溶出を抑え、その結果、より長期間にわたる Ca^{2+} イオンの供給を可能にした。

筆者らは、生体内に埋入後の早い段階で骨形成性細胞を活性化し、その後は骨リモデリングの機序に移行できる素材を目指して、 β -TCPとPDLLGAとの複合体に少量のガラス粒子を分散させた素材を作製することに着想した。本研究では、45S5ガラス、およびこの組成の Na_2O を MgO とを全量置換したガラスを用いて二種類の複合材料を作製した。Tris-HCl緩衝溶液中に浸漬した際のイオン溶出挙動を調べ、複合化に適するガラス組成の候補を考察した。

2 実験方法

2.1 ガラスの調製

45S5ガラスBG-Na($46.1\text{SiO}_2 \cdot 24.4\text{Na}_2\text{O} \cdot 26.9\text{CaO} \cdot 2.6\text{P}_2\text{O}_5$, mol%)と、 Na_2O を MgO で置換したガラスBG-Mg($46.1\text{SiO}_2 \cdot 24.4\text{MgO} \cdot 26.9\text{CaO} \cdot 2.6\text{P}_2\text{O}_5$, mol%)を作製した。ガラス収量20 gとして秤量した試薬(全てキシダ化学特級試薬、 SiO_2 : 99.0%, Na_2CO_3 : 99.8%, MgO : 98.0%, CaCO_3 : 99.5%, H_3PO_4 : 85.0%(液状))をテフロン®ビーカーに入れ蒸留水を加えスラリー状にし、攪拌混合した。その後、赤外ランプ下で一晩乾燥させた。この混合物を白金坩堝に入れ、大気雰囲気下において電気炉で 1500°C 、30 min 溶融した。溶融後、ステンレス板にキャストし、アイロンプレス法によってガラスを作製した。ジルコニア製ポットに、得られたガラスの全量、直径3 mmのジルコニアボール400 g、メタノール(キシダ化学一級)150 mLとともに入れ、一軸型ボールミルで24 h 粉碎した後、 80°C で乾燥した。

得られたガラス粉末について、粉末X線回折法(XRD; X'pert-MPD, Malvern Panalytical)を用いて結晶混在の有無を確認した。また、エネルギー分散型X線分析(EDX; JED-2300, 日本電子)によりガラス組成を分析した($n=5$)。さらに、示差熱分析法(DTA; Thermoplus TG8120, リガク)を用いて、ガラス転移温度 T_g を求めた。得られたガラスの構造を調べるため、レーザーラマン分光(LRS; NRS-3300, 日本分光, Nd:YAG レーザー使用)を行った。

2.2 複合材料の作製

PDLLGAとして、乳酸:グリコール酸の比が75:25のものをを用いた(Purasorb®PDLG7509, Corbin)。これをヘキサフルオロ2プロパノールに溶解し、 β -TCP(β -TCP100 粉碎品, 太平化学産業)とガラス粉末(BG-Na, BG-Mg)を混合しスラリーを作製した。構成比率(体積比)は、BG-NaまたはBG-Mg: β -TCP:PDLLGA=8:42:50とした。スラリーをジルコニア製ボールミルポットに入れ、ボールを入れずに自転公転型(遊星型)回転装置にて5 min 混合した後、直径80 mmのテフロン®容器にキャストして 80°C で24 h 乾燥することで、フィルムを作製した。

作製した複合材料の分子量を測定するため、ゲル透過クロマトグラフィー(GPC: HLC-8320GPC, 東ソー)を行った。複合材料をクロロホルム(和光純薬特級試薬)に混合してスラリーとし、フィルター(PTFE マイシヨリディスク®H-13-5, 孔径: 0.5 μm , 東ソー)で濾過した。試料濃度2 mg/mL, 流速0.6 mL/min, カラム温度 40°C で測定した。標準試料にはポリスチレン(PStQuick® C, D)を用いた。

Tris-HCl緩衝溶液10 ml中に、フィルム状の複合材料(10×10 mm, 厚さ 0.63 ± 0.1 mm, 重量 110 ± 14 mg)を浸漬し、 37°C の恒温振とう器(KS4000i, IKA)中で所定期間攪拌した($n=3$)。この溶液を濾過し、濾紙上に残った試料を室温で乾燥した。浸漬後の溶液のpHを測定し、 Ca^{2+} , Mg^{2+} , ケイ酸, リン酸イオン濃度を誘導結合プラズマ発光分析(ICP-OES: ICPS-7000, 島津)を用いて測定した。なお、ケイ素とリンは溶液中でケイ酸イオン, リン酸イオンとして存在するが、本研究では便宜上 Si^{4+} , P^{5+} として測定し記述した。

浸漬前および浸漬7日後の試料の断面を観察するため、集束イオンビーム加工観察装置(FIB: EM-9320FIB, 日本電子)により加工し、透過型電子顕微鏡(TEM: JEM-2100F, 日本電子)観察に用いた。付属のエネルギー分散型X線分光器(EDX)を用いて点分析した。

3 結 果

3.1 ガラスの組成と構造

得られたガラスのXRDパターンとLRSスペクトル、およびガラス組成の分析結果と T_g をそれぞれFig. 1 (a), (b)およびTable 1に示す。BG-Na, BG-Mgともにガラス由来のハローピークを示し、結晶の混在はみられなかった。EDX分析では、目的組成に近いガラスが得られたことが示された。

一方、XRDパターン(Fig. 1 (a))にみられるハローピークの位置は両者でやや異なり、それらの構造は異なることを暗示した。 T_g も両者で大きく異なっていた。SiおよびP周囲の架橋酸素数 n をそれぞれ Q_{Si}^n , Q_{P}^n と表すと、LRSスペクトル(Fig. 1 (b))では、680, 870 cm^{-1} 付近に Q_{Si}^1 由来のピーク^{14,15)}、630, 860-870, 980 cm^{-1} 付近に Q_{Si}^2 由来のピーク¹⁵⁻¹⁷⁾、1080 cm^{-1} 付近に Q_{Si}^3 由来のピーク¹⁴⁾、1040 cm^{-1} 付近に Q_{Si}^n 由来のピーク¹⁴⁾がみられた。また、940-960 cm^{-1} 付近に Q_{P}^0 由来のピーク¹⁴⁾がみられた。BG-Mgでは、860 cm^{-1} 付近に存在する Q_{Si}^2 由来のSi-Oのピーク¹⁷⁾と940 cm^{-1} 付近に存在する

Fig. 1 (a) XRD patterns and (b) LRS spectra of BG-Na and BG-Mg.

Q_p^0 由来の $P-O^-$ のピーク¹⁴⁾ がシフトしていることが特徴的である。Dietzel により提案された電界強度を式 (1) に示す¹⁸⁾。

$$F = z / a^2 \tag{1}$$

ここで、F：電界強度、z：陽イオンの価数、a：陽イオンと陰イオンの距離 (Å) である。Na⁺ (6 配位)、Ca²⁺ (8 配位)、Mg²⁺ (6 配位) イオンの電界強度はそれぞれ 0.15、0.31、0.44 となり、すなわち結合強度が変化する。上記のシフトは、非架橋酸素に配位している陽イオン種が変化したためと考えられる。

Table 1 Nominal and analyzed compositions in mol% of BG-Na and BG-Mg and their glass transition temperatures (Tg). The analyzed compositions are shown with standard deviation.

Glass code	Composition (mol%; upper: nominal, lower: analyzed)					Tg (K)
	SiO ₂	Na ₂ O	MgO	CaO	P ₂ O ₅	
BG-Na	46.1	24.4	—	26.9	2.6	804
	47.8 ± 0.2	23.3 ± 0.9	—	25.9 ± 0.8	3.0 ± 0.1	
BG-Mg	46.1	—	24.4	26.9	2.6	983
	48.3 ± 1.1	—	23.6 ± 2.0	25.1 ± 3.9	2.6 ± 0.2	

Table 2 Weight-average molecular weights (Mw) and polydispersities (Mw/Mn) of as-received PDLLGA and PDLLGA in the resulting composites. Mn means number-average molecular weights.

Sample code	Mw (kDa)	Mw/Mn
PDLLGA	126.7	1.86
BG-Na/TCP/PDLLGA	1.4	2.10
BG-Mg/TCP/PDLLGA	71.3	1.95

Fig. 2 pH after soaking the composites in Tris-HCl buffer solution. Initial pH of the solution is 7.40.

3.2 複合材料の無機イオン溶出性

得られた複合材料中の PDLLGA の分子量（重量平均分子量 Mw、および多分散度 Mw/Mn）を Table 2 に示す。PDLLGA 単味に比べ、BG-Na を含有する場合には 2 桁もの低下がみられた。BG-Mg を含有する場合でもほぼ半減した。多分散度も大きくなった。

フィルム状の複合材料を Tris-HCl 緩衝溶液に浸漬した際の pH を Fig. 2 に示す。BG-Mg/TCP/PDLLGA を浸漬した場合には pH はほとんど変化しなかったが、BG-Na/TCP/PDLLGA の場合では大きく減少した。

Fig. 3 は、フィルム状の BG-Mg/TCP/PDLLGA を浸漬した Tris-HCl 緩衝溶液中の無機イオン濃度を示す。Ca²⁺、Mg²⁺ イオンは、浸漬時間とともにほぼ直線的に溶出した。BG-Mg ガラスの組成からみると Si⁴⁺ イオンの溶出はかなり低く抑えられたといえる。P⁵⁺ イオンはほとんど検出されなかったが、これはガラス中のリン酸含有量が低く、かつ複合材料中でのガラス量も少ないためと思われる。

Fig. 3 Ion amounts in Tris-HCl buffer solution after soaking BG-Mg/TCP/PDLLGA.

Fig. 4は、Tris-HCl緩衝溶液に浸漬する前後のBG-Mg/TCP/PDLLGAフィルム表面付近の断面TEM写真（明視野像）である。浸漬前の写真にみられる、鋭利で細かな粒子(a)がBG-Mgガラスであり、比較的大きな粒子(b)が β -TCPであるとEDXの結果から判断される。無機粒子間の空隙にはポリマーが充填されていることがわかる。大きなボイド等は見られない。一方、浸漬7dの写真では、多数のボイドがみられ

る。浸漬前にみられた鋭利な粒子はほとんどなく、0.5 μm 以下の微細な粒子(c)がみられるようになった。EDXスペクトルからは、Siを主成分とし、CaやMgはほとんど含有されていない。

4 考 察

リン酸含有量の低いケイリン酸ガラスにおいて、リン酸グループ中の非架橋酸素には Na^+ イオンが優先的に配位すると報告されている¹⁹⁾。また、 Ca^{2+} と Mg^{2+} イオンが共存する場合には、リン酸グループ中の非架橋酸素と Ca^{2+} イオンが優先的に配位するとされている^{20,21)}。このことからBG-Mgでは、リン酸グループには Na^+ イオンに代わり Ca^{2+} イオンが配位し、 Mg^{2+} イオンの配位したケイ酸グループが増加したと予想される。ガラス組成によっては、中間酸化物であるMgOの一部は網目形成酸化物として働く²²⁾。 Mg^{2+} イオンの一部がガラスネットワークに入りSi-O-Mg結合を形成した可能性が考えられる。このようなガラス構造の違いに起因して、BG-MgはBG-Naより耐水性に優れる。

実際、BG-Na粒子は吸湿性が高く、取り扱いに注意を要した。複合材料作製の際の混合過程では、ガラス粒子の水和によって Na^+ や Ca^{2+} イオンが溶出することでその表面付近の塩基性が増している環境にあり、混合に用いたヘキサフルオロ2プロパノールに溶存した水によるPDLLGAの加水

Fig. 4 TEM bright images of FIB-polished cross-sections before and after soaking BG-Mg/TCP/PDLLGA in Tris-HCl buffer solution for 7 d, and EDX spectra collected from positions (a-c) shown in the images.

分解が加速されることが考えられる。この混合過程では、PDLLGA 分子鎖は機械的衝撃によるだけでなくこのような化学的作用によっても切断されるものと予想される。そのため PDLLGA の分子量が極端に低くなり、Tris-HCl 緩衝溶液に浸漬した際には、ポリマーの加水分解が著しく早く、結果として pH が低下したと考えられる。この種の複合材料の作製において、骨形成促進イオンの供給源として BG-Na を選択するには考慮が必要といえる。

次に、Tris-HCl 緩衝溶液に浸漬した際の BG-Mg を含有する複合材料のイオン溶出挙動について考察する。pH 7 付近では、 β -TCP の溶解度²³⁾はガラスに比べてかなり低く、浸漬 7 d という短期間でのイオン溶出のほとんどはガラスの溶解に由来するものと考えられる。TEM 観察結果 (Fig. 4) では、無機粒子は良好に分散されており、凝集部分が少ないことが示された。したがって、無機粒子の凝集に起因するパーコレーション効果は生じず、浸漬直後のバースト溶出は起こらない。浸漬後には多くのボイドがみられることから、PDLLGA が加水分解されて水が材料中に侵入し、ガラス粒子からイオンが溶出したと思われる。表面付近のガラスだけでなく、材料内部のガラスからも、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンがプロトンとのイオン交換により 7 日間継続的に溶出したと考えられる。Fig. 3 の結果から、複合した BG-Mg 粒子中の Ca^{2+} および Mg^{2+} イオンのそれぞれ約 90% が 7 日間で溶出したと見積もられた。一方、網目を形成しているケイ酸塩骨格は水の侵入により加水分解され、Si-OH 基を作って一部溶出するようになる (Fig. 3 から見積もると、7 日間のケイ酸イオン溶出量は複合した BG-Mg 粒子中の SiO_2 の約 7% である)。また一部は Si-OH 基が脱水縮合してゲル化し材料内に残留するものと考えられる。そのことは浸漬後の TEM 観察 (Fig. 4 (c) 部分の EDX スペクトル) で支持されている。したがって、ケイ酸イオンの溶出量は低く抑えられていると考えられる。

骨芽細胞や骨芽細胞様細胞の成長を促進させる無機イオンとして、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、ケイ酸イオン等が報告されている²⁴⁾。 Ca^{2+} 、ケイ酸イオンは、骨芽細胞様細胞の増殖、分化、石灰化を促進する^{25,26)}。 Mg^{2+} イオンは細胞の接着を促進し²⁷⁾、また、石灰化も促進する場合がある^{28,29)}ことが報告されている。また、微量のケイ酸イオンが適当値で存在する場合に骨形成性が高まることが報告されている^{30,31)}。

当研究グループは、Si - Ca - Mg イオンの組み合わせが骨芽細胞様細胞の石灰化過程に及ぼす影響について調査している^{32,33)}。接着段階では Mg^{2+} イオンとの組み合わせ、増殖段階では三種のイオンの組み合わせ、石灰化段階では Ca^{2+} イオン単味もしくは、 Ca^{2+} およびケイ酸イオンの組み合わせにおいてより高い細胞活性化効果を示すことが報告されている。骨形成を一層促進するためには、これら無機イオンの溶出挙動を最適化することが重要であり、本研究の BG-Mg はそのイオン供給源の候補である。今後、複合材料中でのガラス含有量を変化させる等により、細胞活性化に最適な溶出量の調整を進める予定である。

5 結 論

本研究では、生体内埋入の初期段階で骨形成性細胞を活性化できる素材を目指して、少量のガラス粒子を分散させた β -TCP/PDLLGA 複合材料を作製した。このような複合材料を作製するにあたり、Bioglass®45S5 ガラスは複合化過程で PDLLGA の分子量を大きく低下させ分解性を著しく高め、水溶液中で周囲環境を酸性化させることがわかった。一方、45S5 の Na_2O 全量を MgO で置換したガラスを用いた複合材料を Tris-HCl 緩衝溶液に浸漬したところ、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、ケイ酸イオンの継続的な溶出特性を示した。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンの溶出量に比べてケイ酸イオンの溶出は抑えられていた。 $46.1\text{SiO}_2 \cdot 24.4\text{MgO} \cdot 26.9\text{CaO} \cdot 2.6\text{P}_2\text{O}_5$ ガラスは骨形成促進イオンの供給源として重要な候補である。

謝 辞

本研究の一部は、NEDO 戦略的基盤技術高度化支援事業の委託により行われた。

文 献

- 1) D. Buser, B. Hoffmann, J. P. Bernard, A. Lussi, D. Mettler, R. K. Schenk: Clin. Oral Impl. Res., **9** (1998) 137-150.
- 2) K. Rezwani, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, A. R. Boccaccini: Biomaterials, **27** (2006) 3413-3431.
- 3) S. J. Peter, L. Lu, D. J. Kim, A. G. Mikos: Biomaterials, **21** (2000) 1207-1213.
- 4) Y. M. Khan, D. S. Katti, C. T. Laurencin: J. Biomed. Mater. Res., **69** (2004) 728-734.
- 5) F. A. D. Santos, M. I. B. Tavares: Polímeros, **24** (2014) 561-566.
- 6) P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola, P. V. Hatton: Int. J. Mol. Sci., **15** (2014) 3640-3659.
- 7) D. K. Gilding, A. M. Reed: Polymer, **20** (1979) 1459-1464.
- 8) R. A. Miller, J. M. Brady, D. E. Cutright: J. Biomed. Mater. Res., **11** (1977) 711-719.
- 9) A. G. Mikos, M. D. Lyman, L. E. Freed, R. Langer: Biomaterials, **15** (1994) 55-58.
- 10) M. M. Stevens: Mater Today, **11** (2008) 18-25.
- 11) L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee: J. Biomed. Mater. Res., **5** (1971) 117-141.
- 12) D. S. Brauer: Angew. Chem. Int. Ed., **54** (2015) 4160-4181.
- 13) N. Osada, A. Terada, H. Maeda, A. Obata, Y. Nishikawa, T. Kasuga: R. Soc. Open Sci., **6** (2019) #190612 (10 pages).
- 14) C-C. Lin, S-F. Chen, K. S. Leung, P. Shen: J. Mater. Sci.: Mater. Med., **23** (2012) 245-258.
- 15) N. Trcera, S. Rossano, M. Tarrida: J. Raman Spectrosc., **42** (2011) 765-772.
- 16) H. Yamashita, H. Yoshino, K. Nagata, I. Yamaguchi, M. Okawa, T. Maekawa: J. Ceram. Soc. Japan, **106** (1998) 539-544.
- 17) H. Aguiar, E. L. Solla, J. Serra, P. González, B. León, F. Malz,

- C. Jäger: J. Non-Cryst. Solids, **354** (2008) 5004-5008.
- 18) A. Dietzel: Z. Elektrochem, **48** (1942) 9-23.
- 19) A. Pedone, T. Charpentier, G. Malavasi, M. C. Menziani: Chem. Mater., **22** (2010) 5644-5652.
- 20) M. A. Karakassides, A. Saranti, I. Koutselas: J. Non-Cryst. Solids., **347** (2004) 69-79.
- 21) I. Wactawska, M. Szumera: J. Therm. Anal. Calorim., **84** (2006) 185-190.
- 22) S. J. Watts, R. G. Hill, M. D. O'Donnell, R. V. Law: J. Non-Cryst. Solids, **356** (2010) 517-524.
- 23) L. C. Chow: J. Ceram. Soc. Japan, **99** (1991) 954-964.
- 24) A. Hoppe, N. S. Güldal, A. R. Boccaccini: Biomaterials, **32** (2011) 2757-2774.
- 25) S. Maeno, Y. Niki, H. Matsumoto, H. Morioka, T. Yatabe, A. Funayama, Y. Toyama, T. Tagushi, J. Tanaka: Biomaterials, **26** (2005) 4847-4855.
- 26) P. Han, C. Wu, Y. Xiao: Biomater. Sci., **1** (2013) 379-392.
- 27) H. Zreiqat, C. R. Howlett, A. Zannettino, P. Evans, G. Schulze-Tanzil, C. Knabe, M. Shakibaei: J. Biomed. Mater. Res., **62** (2002) 175-184.
- 28) S. Yamada, A. Obata, H. Maeda, Y. Ota, T. Kasuga: Front. Bioeng. Biotech., **3** (2015) Article 195 (9 pages).
- 29) S. Yamada, Y. Ota, A. Obata, T. Kasuga: Bio-Med. Mater. Eng., **28** (2017) 47-56.
- 30) R. Jugdaohsingh, K. L. Tucker, N. Qiao, L. A. Cupples, D. P. Kiel, J. J. Powell: J. Bone Miner. Res., **19** (2004) 297-307.
- 31) A. Obata, N. Iwanaga, A. Terada, G. Jell, T. Kasuga: J. Mater. Sci., **52** (2017) 8942-8956.
- 32) A. Obata, T. Ogasawara, S. Yamada, T. Kasuga: Ceramic Engineering and Science Proceedings, **37** (2017) 107-112 (Proceedings of The 40th International Conference on Advanced Ceramics and Composites (ICACC), ed. J. C. LaSalvia, R. Narayan, P. Colombo, M. Fukushima, A. Gyekenyesi, The American Ceramic Society, OH, 2017)
- 33) A. Obata, T. Ogasawara, T. Kasuga: J. Biomed. Mater. Res. Part A, **107A** (2019) 1042-1051.