原	著
---	---

骨欠損部への BMP-12 遺伝子導入による欠損部組織の再生

後 藤 暢 大

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学系専攻

摂食機能回復学講座 インプラント・口腔再生医学分野

(主任・指導：春日井昇平教授)

(指導：黒田真司助教)

(2007 年 12 月 6 日 受付)

Tissue Regeneration Induced by a Transgene for Bone Morphogenetic Protein-12 (BMP-12) in a Bone Defect

GOTO Nobuhiro

Oral Implantology and Regenerative Dental Medicine, Department of Masticatory Function Rehabilitation,

Division of Oral Health Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. KASUGAI Shohei)

(Director : Assist. Prof. KURODA Shinji)

BMP-12, other than BMP-2, 4, and 7, is known to induce the formation of tendon/ligament-like tissues. However, the role of the protein in the process of bone or cartilage healing has not been adequately examined. The purpose of the present study was to examine if a plasmid vector encoding BMP-12 would induce tendon/ligament formation in a rat bone defect model. A lyophilized atelocollagen pellet with 100 μ g of a plasmid vector encoding BMP-12 or BMP-2 was implanted in a bone defect of a rat femoral metaphysis. The samples were retrieved at 2, 4 and 8 weeks post-operation and subjected to histology and real-time PCR analysis. BMP-12 transgene indicated prominent fibrogenesis at 2 weeks. Consequently, the tissue was substituted by bone at 8 weeks. The gene expression of collagen type III was up-regulated by BMP-12 gene transfer after 2 weeks, followed by an increase of elastin and Six1 genes after 4 weeks. These genes, which are intimately related to tendon/ligament formation, decreased in expression at 8 weeks in preparation for osteogenesis afterward. On the other hand, the BMP-2 transgene quickly induced the synthesis of bone-related genes such as collagen type I and ALP. It is concluded that BMP-12 can initiate the development of tendon/ligament-like tissue in a rat bone defect at early healing stages. Maintaining such generation of tissue on bone could be useful for modifying periodontal tissue engineering.

I. 結 言

Bone morphogenetic proteins (BMPs) は、Transforming Growth Factor β Super Family に属し、動物実験において皮下に移植した際、骨を異所性に誘導するタンパク質として発見された¹⁾。その後、10 以上の相同性をもつ異なった BMPs が発見されているが、特になかでも BMP-2, 4, 7 はそれぞれ未分化間葉系細胞の分化を促進することで、骨や軟骨の形成を導くことができる^{2~4)}。多くの BMPs は骨や軟骨を異所性に誘導する能力を有しているが、BMP-12 (GDF-7/CDMP-3), BMP-13 (GDF-6/CDMP-2), BMP-14 (GDF-5/CDMP-1) は

BMP-2, 4, 7 とは異なり、腱や靱帯様の結合組織を誘導することが報告されている⁵⁾。その後多くの培養細胞を用いた実験、動物実験において、BMP-12 による腱や靱帯様組織の誘導が報告されているが^{6~11)}、腱・靱帯の再生のみならず、骨や軟骨の再生に対してどのような役割をするのかは明らかとなっていない。また骨欠損における骨再生においても、欠損内部あるいは再生骨表層にて腱や靱帯様組織を導くことができれば、歯周組織再生法の足がかりとなる。

BMPs は組織の再生に有効であると考えられるが、一般にリコンビナントタンパクの臨床応用の際にはそのコストの高さが障害となる。またリコンビナントタンパク

は体内に移植された際、早期に分解されてしまい長期間における効果が期待できない。そこでリコンビナントタンパクによる長期間の効果を得るために、そのリコンビナントタンパクを徐放する材料の開発や、タンパク質の代わりに遺伝子を用いて細胞内に導入する方法が考えられている。

細胞内への遺伝子導入はいくつかの種類が存在しており、ウイルスを用いた方法が一般的である。ウイルスを用いた遺伝子導入はその導入効率が高いという利点はあるが、その反面、高い抗原性や、ウイルスを用いることによる未知の危険性、高い導入効率がゆえの効率調節の難しさなど、解決しなければならない問題も多く存在する。一方、プラスミドベクターを用いた遺伝子導入方法は¹²⁾、細胞自身が直接遺伝子を取り込むエンドサイトーシスによるため、遺伝子導入効率は低いが、前述した危険性を著しく軽減した安全な遺伝子導入方法だと考えられる。

プラスミドベクターはその構造特性から化学的に安定しており、体内において代謝回転が速いことから、局所的なプラスミドベクターの導入および拡散は、全身に対する毒性がきわめて低く安全であると考えられる。また、プラスミドベクターを用いた過去の研究においては、アテロコラーゲンを足場とし、BMP をコードさせたプラスミドベクターを遺伝子として骨欠損部に移植し、骨の再生を導くことに成功している^{4,13,14)}。Kuroda らは、アテロコラーゲン・プラスミドベクター・リン酸カルシウムの複合体をラット皮下に移植し、高い遺伝子導入効率を得ることができたと報告した¹⁵⁾。また BMP-2 がコードされたプラスミドベクターを用いて同様の方法で複合体を作製し、ラットの区域切除された腓骨に移植すると、効果的な骨再生が確認されている¹⁶⁾。

アテロコラーゲンは、ペプシン処理により抗原性を低くした collagen type I を高純度に精製したものであり、組織工学においては骨形成の足場として利用されている。またアテロコラーゲンは、生体内における分解性と低抗原性を示し、その優れた生体適合性は臨床において有用であると考えられている。

本研究の目的は、腱および靱帯を誘導する BMP-12 をコードしたプラスミド遺伝子とアテロコラーゲンをを用い、BMP-12 遺伝子を骨欠損部で強制発現させた場合に誘導される組織について明らかにすることである。

II. 方 法

本研究は、東京医科歯科大学組換え DNA 実験委員会と実験動物委員会の承認を受け、両委員会のガイドラインに従って行った。

1. 移植体の作製

東京医科歯科大学インプラント・口腔再生医学分野鈴木ミチ子技官によって、MG3 ヒト骨肉腫細胞より hBMP-12 cDNA がクローニングされた (Accession No. AB158468, GenBank)。さらに pEGFP-N1 (CLONTECH, USA) ベクターの制限酵素 EcoRI 認識部位に挿入し、発現プラスミドベクターとしてコンストラクトを作製した。また、hBMP-2 cDNA のクローニングは、ヒトの抜去歯歯髄から行い¹⁷⁾同様にコンストラクトを作製した。それぞれのプラスミドベクターを 100 μ g 作製し、等量の 2% アテロコラーゲン (高研) と混ぜてエッペンドルフチューブの蓋を容器として凍結乾燥し、それぞれ BMP-2, BMP-12 の移植体とした (図 1)。また、pEGFP-N1 ベクターを用いて同様に移植体を作製し、本実験と同様の埋入実験および組織学的評価を行い、発現する蛍光タンパクおよび BMP-12 群における hBMP-12 RNA の発現によって遺伝子導入を確認した (図 2)。アテロコラーゲンの凍結乾燥体は抜歯窩の止血や創傷部の止血など、止血剤として一般に利用されている^{18~20)}。本実験では、BMP-12 あるいは BMP-2 を混合したアテロコラーゲン凍結乾燥体のほかに、アテロコラーゲンのみを凍結乾燥した移植体も用いた。

2. 埋入実験

実験は、8 週齢の雄のウィスター・ラット 96 匹を 4 群に分けて使用した。2 ml/kg のキシラジン・ケタミン・アセプロマジン (それぞれ 4, 50, 1 mg/ml) 麻酔下にあるラットの右側大腿骨遠位部の成長板骨幹側に、歯科用ラウンドバーにて直径 3 mm の骨欠損を作製後 (図 3, 4)、上記の移植体を移植し、BMP-12 群、BMP-2 群、アテロコラーゲン群とした。またコントロールとしては骨欠損のみを作製した sham 群を用いた。埋入後、2, 4, 8 週でラットをクロロホルム麻酔下にて安楽死させ、右側大腿骨を取り出した。屠殺した各時間においてそれぞれの群より 2 匹の大腿骨を組織学的分析のための脱灰切片用とし、6 匹の大腿骨は遺伝子発現の分析に用いた。

3. 組織学的観察

組織学的分析のために採取したラット大腿骨は、10% ホルマリン緩衝液にて固定した後、EDTA にて脱灰した。続いて標本のアルコール脱水・キシレン透徹・パラフィン包埋を経た後、実験部位を含む 5 μ m の矢状断切片を作製し、HE 染色およびマッソントリクローム染色を行った。

4. 遺伝子発現分析

次に、残ったラットの右側大腿骨からは、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出した。RNA は、大腿骨遠位骨端における軟骨内骨化の著しい部分である成長板骨端側を除外した後に抽出した。PCR

図1 凍結乾燥したアテロコラーゲンペレット

図3 ラット大腿骨遠位部における骨欠損の模式図

図2 (a) BMP-12 群における hBMP-12 RNA 発現, (b) レーザー顕微鏡下における組織像: pEGFP-N1 プラスミドベクターを骨欠損部に移植した際の GFP タンパクの発現

図4 実験術式

(a) 大腿部を切開, (b) 大腿骨遠位部を剖出, (c) 大腿骨遠位部に皮質骨欠損を作製, (d) 作製した骨欠損部に移植体を埋入

図5 埋入2週後の各群における組織学的所見（マッソントリクローム染色）
 sham 群では骨形成を認める。アテロコラーゲン群ではアテロコラーゲンの残留を認める。
 BMP-2 群では骨形成を認める。BMP-12 群では規則的なコラーゲン線維の配列を認める。
 A：アテロコラーゲン，NB：新生骨，NF：新生コラーゲン線維

を行うにあたり遺伝子配列を GenBank (National Center of Biotechnology Information, NIH, USA) より入手し、いくつかの遺伝子 (Six1 および elastin: 腱・靱帯に発現が認められる遺伝子; collagen type I および III, 腱・靱帯などの結合組織に関連する遺伝子; alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin: 骨に関連する遺伝子) に対して PCR プライマーを設計した。そして逆転写酵素 (SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen, USA) により作製した cDNA を、各 PCR プライマーおよび SYBR グリーン蛍光色素を用いて real-time PCR (95°C-30s for denaturing; 60°C-30s for annealing; 72°C-30s for extension; 40 cycles) によって増幅した (Applied Biosystems, USA)。PCR による遺伝子発現の評価は、各群の GAPDH 遺伝子にて標準化した後、sham 群のそれぞれの遺伝子発現を基準とする比較定量によって行った。

5. 統計

分析においては、まず Smirnov-Grubbs テストを用いて不適切な数値を除去した。その後、Kruskal-Wallis テストを行い、多重比較検定は Tukey-Kramer 法を用いた。また、有意水準は 5% とした。

III. 結 果

1. 組織学的観察

移植体埋入後 2 週の組織標本において、BMP-12 群では骨欠損部にコラーゲン線維の形成が認められ、BMP-2 群では残留するコラーゲンに混ざって骨の形成が認められた。アテロコラーゲン群では、残留するアテロコラーゲンが欠損の大部分を占めていた。また sham 群では欠損のほとんどを満たす骨の再生が認められた (図 5)。

埋入後 4 週の組織像は、BMP-12 群では束状のコラーゲン線維の形成が認められ、その走行は欠損内部から外側に向かって一定であった。その他の群では足場であるアテロコラーゲンが減少し、骨形成が観察された。移植体を埋入したどの群においても、依然として足場のアテロコラーゲンが認められた (図 6)。

さらに埋入後 8 週になると、BMP-12 群以外のすべての群において、骨欠損部を埋めるほぼ完全な骨形成が認められた。BMP-12 群においても骨欠損部を埋める骨形成を認めるものの、吸収過程にある束状のコラーゲン線維とそれが骨に置換した組織像が観察された (図 7)。

2. 遺伝子発現

埋入後 2 週の mRNA 発現量に関しては、BMP-12 群

図6 埋入4週後の各群における組織学的所見（マッソントリクローム染色）
sham 群では骨欠損部がほぼ治癒している。アテロコラーゲン群では依然としてアテロコラーゲンの残留を認める。BMP-2 群では骨形成を認める。BMP-12 群では規則的なコラーゲン線維の配列を認める。

A：アテロコラーゲン，NB：新生骨，NF：新生コラーゲン線維

図7 埋入8週後の各群における組織学的所見（マッソントリクローム染色）
sham 群では完全に治癒している。アテロコラーゲン群では、若干のアテロコラーゲンの残留が認められるがほとんど治癒している。BMP-2 群・BMP-12 群では、欠損部はほぼ完全に治癒している。BMP-12 群の一部ではコラーゲン線維の骨への置換を認める。

NB：新生骨，RA：アテロコラーゲンの残留，RF：新生コラーゲン線維の残留

と BMP-2 群における collagen type III がアテロコラーゲン群のものに比べ有意に高く、特に BMP-2 群では、collagen type I, ALP, Six1 の発現量が他のすべての群における発現量に比べ有意に高かった (図 8)。

埋入後 4 週では、BMP-12 群における Six1 の mRNA 発現量は他のすべての群に比べて有意に高かった (図 8)。

埋入後 8 週の mRNA を比較すると、BMP-2 群、BMP-12 群の ALP の発現量は sham 群の発現量より高いものの、アテロコラーゲン群を下回った (図 8)。

IV. 考 察

多くの BMPs が間葉系細胞の骨芽細胞や軟骨細胞への分化誘導を示すのに対し、BMP-12 は間葉系細胞の腱や靱帯への分化誘導という、異なった方向への分化誘導を示すことが報告されている^{2,7,8)}。また、骨や軟骨の再生に対する BMP-12 の研究報告は数少ない。そこで本実験では、ラット大腿骨遠位部における骨欠損モデルを使い、骨再生において BMP-12 がどのように関与するのかを検討した。

組織学的観察より、各群が各時点において異なった組織像を示した。一般的に、骨に特異的な遺伝子の発現変化は、骨再生の段階を知るのに非常に有効である。Collagen type I, ALP は骨芽細胞分化の初期における指標となるが、それぞれの実験群の real-time PCR および組織染色の結果からも骨形成が示された。BMP-2 群における ALP 発現量のピークは埋入後 2 週で観察されたのに対して、BMP-12 群ではその発現量は実験期間を通して大きな変化を示さなかった。BMP-2 群と BMP-12 群の collagen type I の発現量を経時的に解析すると、ALP の経時変化と相関していた。特に BMP-2 群における埋入後 2 週の collagen type I と ALP の強い発現は、その時点における骨再生の開始を示唆している。一方 BMP-12 群では、collagen type I, ALP とともに、実験期間を通していずれも高い発現は認められなかった。このような結果は、たとえば、C3H10T1/2 細胞や腱細胞への BMP-12 の遺伝子導入においても ALP の発現量は変化しなかったことや^{7,8)}、あるいは動物皮下への BMP-12 の遺伝子導入によって、骨形成ではなく腱や靱帯が誘導された⁵⁾、というような過去の報告を支持するものである。しかしながら本実験では、埋入後 8 週で骨欠損部における腱・靱帯様組織の吸収とともに骨形成も確認された。これはアテロコラーゲンの吸収とともに BMP-12 プラスミドベクターが減少し、遺伝子導入の効果が減少したことによって、骨組織・骨再生の場に形成された腱・靱帯様組織の吸収および骨への置換が惹起されたと考えられる。

近年、断裂したアキレス腱では collagen type III の産生がみられることが報告されている^{21,22)}。断裂した腱や靱帯における collagen type I の原線維形成は必須であるが^{23,24)}、腱や靱帯の治癒過程において collagen type III も重要な役割を果たしていると考えられている²⁵⁾。本実験結果においても、埋入後 2 週で BMP-12 群の collagen type III の発現は顕著であり、腱・靱帯様組織が形成された。さらに BMP-12 群では、BMP-2 群で認められたような骨形成の指標となるマーカー遺伝子の発現の上昇がみられないこと、また、BMP-12 によって誘導された collagen type III が腱・靱帯の形成に重要な働きをする可能性のあることが示唆された。

臨床の場合でも応用されているアテロコラーゲンは、生体内ではゆっくりと吸収されていく。それゆえアテロコラーゲン群では骨欠損部に残存するアテロコラーゲンのために、骨治癒が遅延することが予測された。術後 8 週における BMP-12 群では、BMP-12 発現の足場としてのアテロコラーゲンが吸収されていくと、形成された腱・靱帯様組織は徐々に新生骨に置換された。一方 BMP-2 群においては、足場であるアテロコラーゲンの吸収は他群と同様にもかかわらず、埋入後 4 週の時点で欠損の大部分は治癒していた。これはアテロコラーゲンをういて導入した BMP-2 遺伝子の作用と考えられる。

埋入後 8 週では、すべての群において骨欠損部のほぼ完全な骨再生が確認されたが、この治癒過程を骨再生の側面から捉えてみると、各群の間に大きな違いがあった。特に BMP-12 群においては埋入後 2 週から 4 週に束状の腱・靱帯様組織が認められ、埋入後 8 週ではこれらの線維性組織が徐々に骨へ置換されていたのに対して、BMP-2 群では早期から骨形成が認められた。またアテロコラーゲン群ではアテロコラーゲンの吸収とともに、骨形成が認められた。他の研究においても、アカゲザルの皮下に移植されたアテロコラーゲンは移植後 26 週から 32 週まで残存していたことが報告されており²⁶⁾、本実験におけるアテロコラーゲンの動向と類似している。これらの結果から、アテロコラーゲンには足場としての理想的な送達系の機能が備わっていることが示され、特に他の組織の侵入を阻止することができる理想的なスペースキーパーとしての働きを期待できる。本実験においては、骨欠損部での BMP-12 による一時的な腱・靱帯様組織形成はアテロコラーゲンの足場としての特性を利用した結果とも考えられる。骨の再生後においても、この腱・靱帯様組織が骨表面で維持されることが可能となれば、歯周組織再生や歯根膜付人工歯根の開発へと繋がると考えられる。

図8 遺伝子発現
有意差 $p < 0.05$ ($n = 6$)。a: sham との比較; b: 群間での比較

V. 結 論

ラット大腿骨に作製した骨欠損部への BMP-12 の遺伝子導入により、埋入後 2 週から 4 週にかけて、腱・靱帯の形成に関連する遺伝子発現の上昇とともに、骨欠損部に腱・靱帯様組織である均一なコラーゲン線維を観察した。8 週にはこの形成された腱・靱帯様組織は、その特異的な遺伝子発現の減少とともに大部分が骨性の組織に置換された。以上のことから、早期の骨組織再生部位において、BMP-12 による腱・靱帯様組織形成の可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学系専攻摂食機能回復学講座インプラント・口腔再生医学分野 春日井昇平教授、黒田真司助教に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究に際してご助言、ご教授いただきました本学生体硬組織再生学講座硬組織薬理学分野の大谷啓一教授、下川仁弥弥准教授、さらに、種々なご援助、ご協力をいただきました本学摂食機能回復学講座 インプラント・口腔再生医学分野の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

本研究の要旨の一部は、第 48 回歯科基礎医学会総会（平成 18 年 9 月、横浜）において発表した。

文 献

- 1) Urist, M. R. : Bone : formation by autoinduction. *Science* 150 : 893-899, 1965.
- 2) Wang, E. A., Rosen, V., D'Alessandro, J. S., *et al.* : Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 2220-2224, 1990.
- 3) Sampath, T. K., Maliakal, J. C., Hauschka, P. V., *et al.* : Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J. Biol. Chem.* 267 : 20352-20362, 1992.
- 4) Fang, J., Zhu, Y. Y., Smiley, E., Bonadio, J., Rouleau, J. P., Goldstein, S. A., McCauley, L. K., Davidson, B. L. and Roessler, B. J. : Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 5753-5758, 1996.
- 5) Wolfman, N. M., Hattersley, G., Cox, K., Celeste, A. J., Nelson, R., Yamaji, N., Dube, J. L., DiBlasio-Smith, E., Nove, J., Song, J. J., Wozney, J. M. and Rosen, V. : Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J. Clin. Invest.* 100 : 321-330, 1997.
- 6) Inada, M., Katagiri, T., Akiyama, S., Namika, M., Komaki, M., Yamaguchi, A., Kamoi, K., Rosen, V. and Suda, T. : Bone morphogenetic protein-12 and -13 inhibit terminal differentiation of myoblasts, but do not induce their differentiation into osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222 : 317-322, 1996.
- 7) Lou, J., Tu, Y., Ludwig, F. J., Zhang, J. and Manske, P. R. : Effect of bone morphogenetic protein-12 gene transfer on mesenchymal progenitor cells. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 369 : 333-339, 1999.
- 8) Lou, J., Tu, Y., Burns, M., Silva, M. J. and Manske, P. : BMP-12 gene transfer augmentation of lacerated tendon repair. *J. Orthop. Res.* 19 : 1199-1202, 2001.
- 9) Forslund, C., Rueger, D. and Aspenberg, P. : A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1, -2 and -3 for tendon healing in rats. *J. Orthop. Res.* 21 : 617-621, 2003.
- 10) Fu, S. C., Wong, Y. P., Chan, B. P., Pau, H. M., Cheuk, Y. C., Lee, K. M. and Chan, K. M. : The roles of bone morphogenetic protein (BMP) 12 in stimulating the proliferation and matrix production of human patellar tendon fibroblasts. *Life Sci.* 72 : 2965-2974, 2003.
- 11) Wang, Q. W., Chen, Z. L. and Piao, Y. J. : Mesenchymal stem cells differentiate into tenocytes by bone morphogenetic protein (BMP) 12 gene transfer. *J. Biosci. Bioeng.* 100 : 418-422, 2005.
- 12) Shea, L. D., Smiley, E., Bonadio, J. and Mooney, D. J. : DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 17 : 551-554, 1999.
- 13) Bonadio, J., Smiley, E., Patil, P. and Goldstein, S. : Localized, direct plasmid gene delivery in vivo : prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat. Med.* 5 : 753-759, 1999.
- 14) Bonadio, J. : Tissue engineering via local gene delivery. *J. Mol. Med.* 78 : 303-311, 2000.
- 15) Kuroda, S., Kondo, H., Ohya, K. and Kasugai, S. : A new technique with calcium phosphate precipitate enhances efficiency of in vivo plasmid DNA gene transfer. *J. Pharmacol. Sci.* 97 : 227-233, 2005.
- 16) Endo, M., Kuroda, S., Kondo, H., Maruoka, Y., Ohya, K. and Kasugai, S. : Bone regeneration by modified gene-activated matrix : effectiveness in segmental tibial defects in rats. *Tissue Eng.* 12 : 489-497, 2006.
- 17) Maruoka, Y., Oida, S., Iimura, T., Takeda, K., Asahina, I., Enomoto, S. and Sasaki, S. : Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35 : 957-963, 1995.
- 18) Ochiya, T., Takahama, Y., Nagahara, S., Sumita, Y., Hisada, A., Itoh, H., Nagai, Y. and Terada, M. : New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material : the Minipellet. *Nat. Med.* 5 : 707-710, 1999.
- 19) Honma, K., Ochiya, T., Nagahara, S., Sano, A., Yamamoto, H., Hirai, K., Aso, Y. and Terada, M. : Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 : 1075-1081, 2001.
- 20) Sano, A., Maeda, M., Nagahara, S., Ochiya, T., Honma, K., Itoh, H., Miyata, T. and Fujioka, K. : Atelocollagen for protein and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 : 1651-1677, 2003.
- 21) Maffulli, N., Ewen, S. W., Waterston, S. W., Reaper, J.

- and Barrass, V. : Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *Am. J. Sports Med.* 28 : 499-505, 2000.
- 22) Eriksen, H. A., Pajala, A., Leppilahti, J. and Risteli, J. : Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J. Orthop. Res.* 20 : 1352-1357, 2002.
- 23) Birk, D. E. and Mayne, R. : Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur. J. Cell Biol.* 72 : 352-361, 1997.
- 24) Liu, X., Wu, H., Byrne, M., Krane, S. and Jaenisch, R. : Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 1852-1856, 1997.
- 25) Liu, S. H., Yang, R. S., al-Shaikh, R. and Lane, J. M. : Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 318 : 265-278, 1995.
- 26) Hirasawa, T., Sano, A., Fujioka, K., Inoue, K., Miyata, K., Nakano, M., Yamashita, K. and Hayakawa, T. : Biodegradability of 'Minipellet' a new drug formulation using atelocollagen as a drug carrier material, in the rhesus monkey. *Biomed. Res.* 18 : 149-159, 1997.