

解説

アパタイト核を用いた表面改質による生体活性材料機能の構築

藪塚 武史*

京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻, 〒606-8501 京都市左京区吉田本町.

Materials Design for Bioactive Function by Surface Modification with Apatite Nuclei

Takeshi YABUTSUKA*

Department of Fundamental Energy Science, Graduate School of Energy Science, Kyoto University,
Yoshida-honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

Received January 31, 2020; Revised February 17, 2020; Accepted February 19, 2020

ABSTRACT

When bioinert materials with fine pores were immersed in simulated body fluid with higher pH in comparison with conventional SBF and subsequently temperature of this SBF was raised, fine particles of calcium phosphate, which we named 'apatite nuclei', were precipitated on the surface and in the pores of the substrate. Thus-treated substrate showed high hydroxyapatite formation ability in SBF and will be utilized for bioactive functional materials in orthopedic or dental fields. In our present studies, SUS316L steel, CoCr-based alloy and polyetheretherketone, which cannot bond to living bone spontaneously in living body nevertheless they are attractive artificial bones from a viewpoint of mechanical properties, showed high hydroxyapatite formation ability by applying the above surface modification process. By utilizing hydroxyapatite formation ability of apatite nuclei, in addition, hydroxyapatite capsules could be synthesized.

KEY WORDS

bioactive functional materials, apatite nuclei, artificial bone, hydroxyapatite capsule

1 生体活性骨置換材料の設計指針

超高齢社会に突入した今日、疾患等で損傷した骨や関節の治療を支援する骨置換材料の需要がますます高まっている。一般に、人工材料を骨置換材料として体内で用いる場合、埋植後に想定される炎症反応やアレルギー反応の発現の有無等、物質の安全性を考慮することが必要不可欠である。しかし、たとえ骨置換材料として体内に埋植する物質が無害であっても、生体は通常、体内に埋植された材料を免疫反応によって周辺組織から隔離するように働くため、材料と骨との界面で緩みが生じ、骨欠損部での材料の固定が妨げられてしまう¹⁾。したがって、人工股関節等の骨置換材料の多くは交換手術が必要とされ、患者への侵襲性の点で多くの課題が残っている。

1970年代、米国のHenchらによって、骨と結合するセラミックス (Bioglass[®])²⁾ が世界に先駆けて発明された。Bioglass[®]の画期的な発明を皮切りに、焼結ヒドロキシアパタイト (HAp;

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)³⁾、結晶化ガラス A-W (Cerabone[®])⁴⁾ 等、体内で骨と自発的に一体化する「生体活性セラミックス」が国内外で開発され、実用化に至った。これら生体活性セラミックスの多くは、体内で材料表面に骨の主要な無機成分であるHApの層を自発的に形成し、材料と骨との間に繊維組織が介在することなく材料が骨と結合することが明らかにされている^{5,6)}。体内において材料表面にHApの層が形成されると、HApは骨の主成分であることから、細胞がこれを異物として認識しない。そのため、骨がHApの層と化学的に一体化し、埋植した材料が骨欠損部で固定される¹⁾。

上述の生体活性発現メカニズムを、骨置換を対象用途とした材料機能設計指針の一つとして捉えることで、骨欠損部で自然に骨と一体化する新規生体活性骨置換材料の開発につながる。すなわち、体内において表面にHApの層が自発的に形成する性質を材料に付与する表面改質技術の構築が、臨床応用へ向けた課題解決策の一つであると考えられる。

体内における生体活性材料表面でのHAp層の形成反応は、小久保らによって提案された擬似体液 (Simulated body fluid;

* Corresponding author, E-mail: yabutsuka@energy.kyoto-u.ac.jp

SBF) 中で再現できる^{7,8)}。SBFは無機イオン濃度とpHをヒトの血漿とほぼ等しくするように調整した水溶液であり、生体活性セラミックスの多くは体内と同様の反応により、SBF中で表面にHApを自発的に形成する。SBF浸漬による材料の生体活性評価は、動物実験を実施する前段階で材料の骨結合能をある程度予測できることから有用であり、国際標準規格(ISO 23317)に定められている⁹⁾。

2 アパタイト核を用いた生体活性機能設計

上述の生体活性セラミックスは優れた臨床成績を取めたが、セラミックスは耐衝撃性に乏しいという課題があり、セラミックス単独からなる骨置換材料は適用可能な損傷部位が限定的である。とりわけ、大荷重のかかる股関節、膝関節等へのセラミックス単独での適用は困難であるのが現状である。したがって、機械的強度に優れる金属材料や、さらには軽量かつ耐衝撃性の観点で長所を発揮する高分子材料への生体活性付与が可能となれば、材料科学のみならず臨床医学への大きな波及効果が期待される。

SBFの調製では、ISO23317で規定された無機塩類を純水に溶解して作製した水溶液に、トリスヒドロキシメチルアミノメタンを溶解して水溶液のpHを上昇させた後、塩酸を用いて最終的な生理的pHに調整される^{8,9)}。一方、過剰なトリスヒドロキシメチルアミノメタンをSBFに溶解させると、SBFがリン酸カルシウムに対してより過飽和になるため、SBF中にリン酸カルシウムの微粒子が析出する。八尾らは、この微粒子が生理的条件下に調整した通常のSBF中で早期にHAp形成を誘起することを見出し、この微粒子をアパタイト核(Apatite nuclei)と名付けた¹⁰⁾(以後、ApNと呼称する)。さらに筆者らはこの現象を応用し、前もって表面に孔を形成させた基材の孔内に上述のApNを析出させることで、金属材料から高分子材料にいたる多種多様な材料に高いHAp形成能を付与できることを見出した(Fig. 1)¹¹⁾。筆者らはこの表面改質法を用いることで、純Ti¹²⁾、Ti基合金¹³⁾等の、生体活性の発現に長期間を要する骨置換材料のHAp形成能が大幅に向上されること、さらにはSUS316L鋼¹⁴⁾、CoCr基合金¹⁵⁾、ポリエーテルエーテルケトン(PEEK)^{16,17)}、ポリ乳酸¹⁸⁾等の、骨と結合しない生体不活性な骨置換材料へのHAp形成能付与も可能になることを見出した。本稿では、この表面改質法の生体不活性骨置換材料への適用例として、SUS316L鋼、CoCr基合金、PEEKへのHAp形成能付与につ

いて解説するとともに、さらにApNを用いたHApカプセルの開発についても紹介する。

3 SUS316L鋼へのアパタイト形成能付与

SUS316L鋼はコスト面での汎用性や加工性に優れ、医療の現場でも骨置換材料として用いられている。体内において、SUS316L鋼は表面の不動態皮膜にCaやPを取り込むことでリン酸カルシウムを形成するが、光学顕微鏡レベルで骨と密着する性質(オッセオインテグレーション)は有していない¹⁹⁾。この点は、最も広く使用されているTi基合金製骨置換材料と決定的に異なる点である。したがってSUS316L鋼は、埋植後の抜去が容易である一方、骨と強固に結合することができない。SUS316L鋼に骨と自発的に結合する生体活性が付与されれば、臨床での適用範囲が拡大されると予想される。

金属材料への生体活性付与手法の代表例として、HApのプラズマ溶射コーティングが挙げられる^{20,21)}。しかし、この手法は10,000°C以上の高温プロセスを伴うため、HApの分解による疲労強度の低減や、長期の使用において骨との界面で緩みが生じるという課題がある。また、純TiもしくはTi基合金をNaOH水溶液で処理した後、加熱処理を行うことでチタン酸ナトリウムの層を形成し、純TiおよびTi基合金の生体活性を大幅に改善する手法が国内で開発され、一部は実用化に至っている²²⁻²⁴⁾。しかし、SUS316L鋼や後述のCoCr基合金に同様の処理を施しても、材料に生体活性を付与することはできない²³⁾。そこで筆者らは、粒径の大きな研削剤でブラスト加工を行ない、さらに粒径の小さな研削剤で再度ブラスト加工を行う「多段階ブラスト加工」²⁵⁾によりSUS316L鋼表面にマイクロな凹凸を形成し、その後、表面および孔内でApNの形成を行うことで、SUS316L鋼にHAp形成能を付与する研究を行った¹⁴⁾。

まず、SUS316L鋼表面にマイクロな凹凸を形成させるため、SUS316L鋼表面に平均粒径14μmのアルミナ研削剤で1段階目のブラスト加工を行い、さらに平均粒径3μmのアルミナ研削剤を用いて2回目のブラスト加工を行った。材料表面を三次元レーザー顕微鏡で観察したところ、未処理SUS316L鋼の表面は平滑であったが、上述の多段階ブラスト加工を行うことでSUS316L鋼表面にマイクロレベルの凹凸が形成したことがわかった(Fig. 2)。また、多段階ブラスト加工を行ったSUS316L鋼の表面粗さ(R_a)は平均1.44μm、

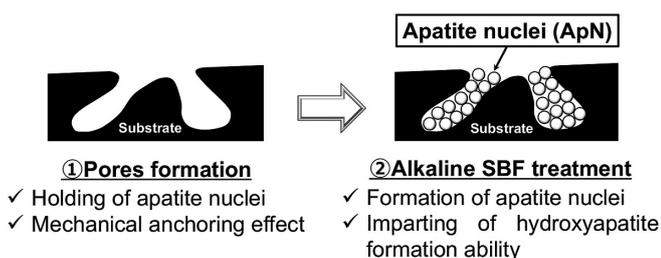


Fig. 1 Schematic illustration of fabrication of bioactive functional materials by alkaline SBF treatment.

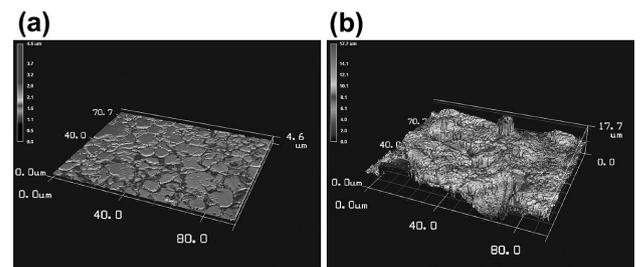


Fig. 2 Three-dimensional microscopic images of the surfaces of (a) untreated SUS316L and (b) that after multi-step sandblasting process.

1種類の研削剤のみを用いた単段階ブラスト加工を行った SUS316L 鋼の表面粗さ (R_a) は、平均粒径 $14\ \mu\text{m}$ の研削剤を用いた場合で平均 $0.47\ \mu\text{m}$ 、平均粒径 $3\ \mu\text{m}$ の研削剤を用いた場合で平均 $0.95\ \mu\text{m}$ であった。このことから、多段階ブラスト加工では単段階ブラスト加工よりも大きな表面粗さが得られることがわかった。

次いで、SBF にトリスヒドロキシメチルアミノメタンを溶解することで pH を上昇させ、 25.0°C で pH = 8.4 に調節した。以後、この水溶液を「アルカリ SBF」と称する。多段階ブラスト加工後の SUS316L 鋼をアルカリ SBF に浸漬し、静水圧処理によりアルカリ SBF を孔内に圧入した。その後、電磁誘導加熱によりアルカリ SBF 中の SUS316L 鋼を加熱した。以上の操作により得られた生体活性 SUS316L 鋼は、表面全体がアモルファスリン酸カルシウム (ACP) の層で覆われていた (Fig. 3 (a))。電磁誘導加熱により SUS316L 鋼近傍のアルカリ SBF が優先的に加熱され続けることで、孔内および表面に形成した ApN が成長し、ACP の層を表面に形成したと考えられる。一方、純 Ti および Ti 基合金に同様の電磁誘導加熱処理を行っても、形成した ApN が ACP の層まで成長するには至らなかった^{12,13)}。これは、Ti とステンレス鋼の体積磁化率 (Ti : 182×10^{-6} 、ステンレス鋼 : 3500×10^{-6})^{26,27)} に起因する温度上昇の違いにより、基板表面近傍におけるリン酸カルシウム形成の反応速度が異なることが原因ではないかと考えられる。

得られた生体活性 SUS316L 鋼の HAp 形成能を、SBF 浸漬試験⁸⁾により調べた。SBF 浸漬1日後の生体活性 SUS316L 鋼表面を電界放出型走査電子顕微鏡 (FE-SEM) で観察したところ、SBF 中で形成する HAp に特徴的な鱗片状結晶が表面全体に形成していることが明らかになった (Fig. 3 (b))。また、生体活性 SUS316L 鋼表面の薄膜 X 線回折 (XRD) 測定を行ったところ、SBF 浸漬1日後に HAp の回折ピークが検出された (Fig. 3 (c))。SUS316L 鋼表面の ACP が SBF 浸漬1日以内に HAp へと結晶成長し、SUS316L 鋼表面全体が HAp

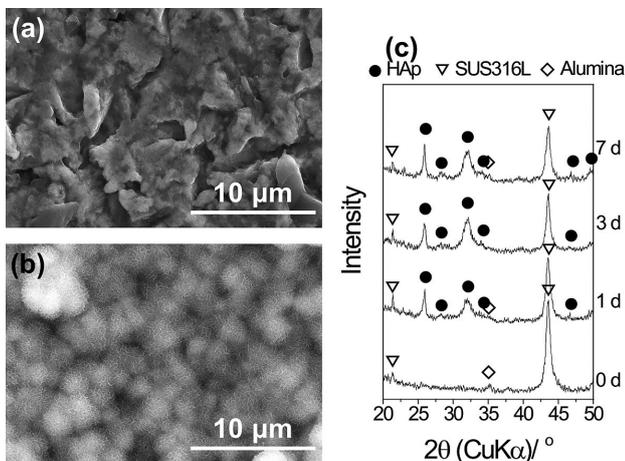


Fig. 3 (a, b) FE-SEM images of the surfaces of bioactive SUS316L (a) before and (b) after soaking in SBF for 1 day and (c) thin film XRD profiles of the surface of bioactive SUS316L before (denoted as '0 d') and after soaking in SBF for 1 day, 3 days and 7 days.

で覆われたと考えられる。これらの結果から、一連の処理を施した SUS316L 鋼が高い HAp 形成能を有することがわかった。また、SBF 試験で SUS316L 鋼表面に形成した HAp 層の接着強度を引張試験²⁰⁾により測定したところ、多段階ブラスト加工は単段階ブラスト加工よりも HAp 層が高い接着強度を示すことがわかった。これは、ブラスト加工条件により生じた表面粗さの違いに起因しており、SBF 中で形成された HAp 層の接着は、アンカー効果の寄与によるものであると考えられる。以上より、アルカリ SBF 処理により、生体不活性 SUS316L 鋼へ高い HAp 形成能を付与することが可能であることがわかった。

4 CoCr 基合金へのアパタイト形成能付与

CoCr 基合金は、Ti 基合金、SUS316L 鋼と並ぶ代表的な金属製骨置換材料の一種である。とりわけ CoCr 基合金は耐摩耗性に長所を発揮するため、整形外科における人工膝関節の摺動部のほか、歯科における金属床義歯としても幅広く臨床応用されている。

CoCr 基合金は SUS316L 鋼と同様、材料表面に酸化クロムの不動態皮膜を形成するため、耐腐食性に優れる。また、SUS316L 鋼と同様に体内で不動態皮膜表面にリン酸カルシウムを形成するが、その形成能は SUS316L 鋼と同様に極めて低い¹⁹⁾。そこで筆者らは、多段階ブラスト加工によりマイクロな凹凸を形成させた CoCr 基合金の表面および孔内に ApN を析出させ、CoCr 基合金に HAp 形成能を付与する研究を行った¹⁵⁾。

まず CoCr 基合金表面にマイクロな凹凸を形成するため、CoCr 基合金に平均粒径 $14\ \mu\text{m}$ の SiC 粒子を用いて1段階目のブラスト加工を行い、さらに平均粒径 $8\ \mu\text{m}$ の SiC 粒子を用いて2段階目のブラスト加工を行った。材料表面を FE-SEM で観察したところ、多段階ブラスト加工を行うことで、CoCr 基合金表面にもマイクロレベルで粗化されていることがわかった (Fig. 4)。

多段階ブラスト加工後の CoCr 基合金をアルカリ SBF に浸漬し、静水圧を加えてアルカリ SBF を CoCr 基合金表面の孔内に圧入した。その後、CoCr 基合金を浸漬したアルカリ SBF を 70.0°C で 24 時間静置した。以上の操作により、生体活性 CoCr 基合金を作製した。得られた生体活性 CoCr 基合金には、表面に ApN が析出していることがわかった (Fig. 5 (a))。

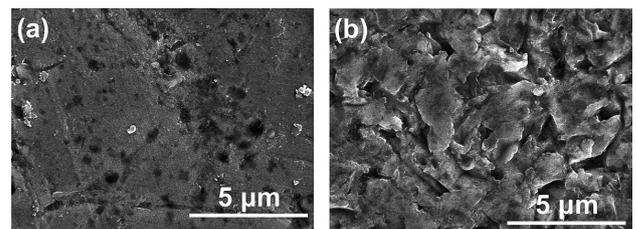


Fig. 4 FE-SEM images of the surfaces of (a) untreated CoCr-based alloy and (b) that after multi-step sandblasting process.

得られた生体活性 CoCr 基合金の HAp 形成能を SBF 浸漬試験により調べた。SBF 浸漬 3 日後の生体活性 CoCr 基合金表面を FE-SEM で観察したところ、鱗片状結晶が CoCr 基合金表面全体を被覆していることがわかった (Fig. 5 (b))。また、薄膜 XRD 測定を行ったところ、SBF 浸漬 3 日後に HAp に帰属する回折ピークが検出された (Fig. 5 (c))。これらの結果から、アルカリ SBF 処理により形成した ApN が SBF 浸漬 3 日以内に HAp 形成を誘起し、CoCr 基合金表面全体が HAp で覆われたと考えられ、CoCr 基合金も HAp 形成能を示すことがわかった。また、SBF 試験で表面に形成した HAp 層の接着強度は、平均 10.0 MPa であった。SUS316L 鋼と同様に、CoCr 基合金においても、HAp 層の接着強度はアンカー効果によって得られたと考えられる。以上より、CoCr 基合金をアルカリ SBF で処理することにより、SUS316L 鋼のみならず CoCr 基合金においても高い HAp 形成能の付与が可能であることがわかった。

5 PEEK へのアパタイト形成能付与

生体骨のヤング率は、緻密骨で約 20 GPa、海綿骨で 4~10 GPa 程度であるとされる²⁸⁾。それに対し、金属製骨置換材料として広く使用されている Ti 基合金、SUS316L 鋼、CoCr 基合金のヤング率は 100 MPa 以上であり¹⁹⁾、生体骨とかけ離れた高い値を取る。ヤング率の高すぎる材料を骨欠損部に長期的に埋入した場合、材料周囲の骨には通常の骨よりも適切な荷重が掛かりにくいため骨代謝が妨げられ、材料周囲の骨が吸収される懸念がある。この現象はストレスシールドと呼ばれる。骨置換材料の緩みや再置換時の再骨折の懸念が指摘されている²⁹⁾。

スーパーエンジニアリングプラスチックの一種であるポリエーテルエーテルケトン (PEEK) は、優れた機械的強度、耐衝撃性、耐摩耗性、耐疲労性を有している。また、PEEK は高分子材料であるため、成形加工性に富み、錆びることも

ない。さらに、PEEK のヤング率は 4 GPa³⁰⁾ と、金属材料と比べ骨に近い値をとるため、ストレスシールドの課題を克服することも可能である。

このように低ヤング率でありながら高い機械的性質を有する PEEK は、既存の金属製骨置換材料の代替材料として注目を集めており、整形外科では人工椎間板として実用化に至っている。最近では、その軽量性を活かした歯科補綴部材としての応用も検討されている。

しかし先述の SUS316L 鋼や CoCr 基合金と同様に、PEEK も生体不活性であるため、骨と自発的に結合することができない。そのため人工椎間板では、周辺骨と癒合させるために自家骨 (患者自身の他の部位から切除した骨) を充填するための孔が設けられている。PEEK の材料自体に高い HAp 形成能を付与することで、PEEK を用いた自家骨の移植に頼らない低侵襲治療が可能になる。そこで筆者らは、ApN を用いた生体活性処理を PEEK にも適用し、細孔を形成させた PEEK の表面および孔内に ApN を析出させ、アパタイト形成能を付与する試みを行った^{16,17)}。

まず PEEK 表面に孔を形成するため、PEEK に H₂SO₄ 処理を施し、表面に孔径約 0.5~1 μm の孔からなる海綿構造を形成した (Fig. 6 (a))。次いで、PEEK に O₂ プラズマを照射して表面を親水化させ (Fig. 6 (b))、アルカリ SBF に浸漬した。その後、PEEK を浸漬したアルカリ SBF を 70.0°C で 24 時間静置した。以上の操作により得られた生体活性 PEEK の表面には、ApN が形成されていることがわかった (Fig. 7 (a))。

得られた生体活性 PEEK の HAp 形成能を SBF 浸漬試験により調べた。SBF 浸漬 1 日後の生体活性 PEEK 表面を FE-SEM で観察したところ、鱗片状結晶が表面全体を被覆していた (Fig. 7 (b))。さらに、表面の薄膜 XRD 測定を行ったところ、SBF 浸漬 1 日後に HAp の回折ピークが検出され、SBF 浸漬 7 日後にはピーク強度の増大とピーク数の増加が観察された (Fig. 7 (c))。これらの結果から、アルカリ SBF 処理により PEEK の表面に形成した ApN が SBF 浸漬 1 日以内に HAp 形成を誘起し、PEEK 表面全体が HAp で覆われたと考えられ、PEEK においても高い HAp 形成能を付与できることがわかった。さらに正本らは、上述の生体活性 PEEK を日本白色家兎の脛骨に埋入し、材料表面における骨結合能を調べた³¹⁾。その結果、生体活性 PEEK 表面における骨インプラント接触率および骨との接着強度は未処理 PEEK の値を有意に上回り、生体活性 PEEK がきわめて良好な骨結合能を示すことが明らかとなった。

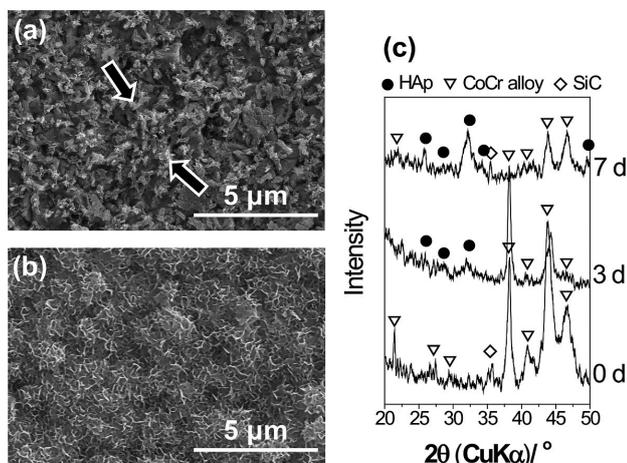


Fig. 5 (a, b) FE-SEM images of the surfaces of bioactive CoCr-based alloys (a) before and (b) after soaking in SBF for 3 days and (c) thin film XRD profiles of the surface of bioactive CoCr-based alloys before (denoted as '0 d') and after soaking in SBF for 3 days and 7 days. In (a), black arrows indicate ApN.

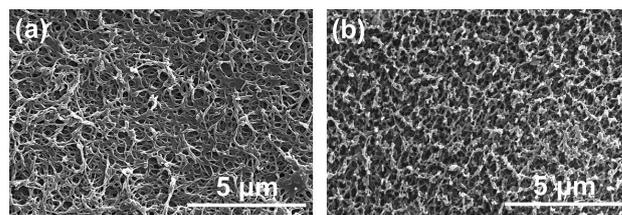


Fig. 6 FE-SEM images of the surfaces of PEEK (a) treated with H₂SO₄ and (b) subsequently treated with O₂ plasma.

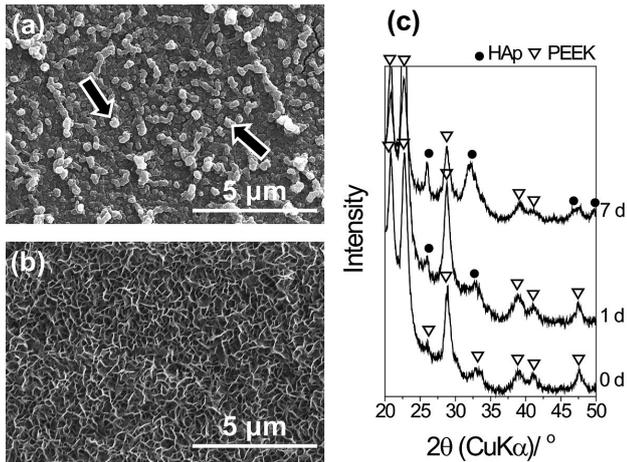


Fig. 7 (a, b) FE-SEM images of the surfaces of bioactive PEEK (a) before and (b) after soaking in SBF for 1 day and (c) thin film XRD profiles of the surface of bioactive PEEK before (denoted as '0 d') and after soaking in SBF for 1 day and 7 days. In (a), black arrows indicate ApN.

6 ヒドロキシアパタイトカプセルの開発

ApNを用いた表面改質法は、バラエティーに富む材質の基材に適用可能であるだけでなく、様々な形状の基材にも適用が可能であり、バルク体のみならず微粒子へのHAp形成能付与にも有効である。微粒子の表面にApNを付着させ、さらにこの微粒子をSBFに浸漬することにより、微粒子表面のApNによりHAp形成が誘起される。その結果、微粒子をHApで被覆したHApカプセルを作製することができる (Fig. 8)³²⁾。この手法は高温熱処理を必要としないため、医薬品や遺伝子等、熱で変性してしまう物質をHApで被覆することも可能である³³⁾。

一例として筆者らは、アガロースゲルを内包したHApカプセルの開発に着手している³⁴⁾。粒子状のアガロースゲルを調製し、その表面にApNを付着させ、次いでこのアガロースゲルをSBFに浸漬した。濾別されたアガロースゲルを吸引濾過により回収し、FE-SEMで観察したところ、無数の鱗片状結晶で構成されるマイクロレベルの微小球が観察された (Fig. 9 (a))。また、エネルギー分散型X線分析により、得られた微小球の表面からHApの主成分であるCaとPが検出された (Fig. 9 (b))。さらに、粉末XRD測定により、この微小球が低結晶性のHApを含むことが明らかとなった (Fig. 9 (c))。得られた析出物の形状が球状であったことから、粒子状のアガロースゲル表面でApNがHApの形成を誘起し、その結果、アガロースゲル表面がHApで被覆されたと考えられる。アガロースゲルおよびHApは生体に対する安全性がきわめて高いため、ドラッグデリバリーシステムキャリア等への応用が期待される。さらに筆者らは、HApカプセルの内部に磁性微粒子を内包することで、HApの生体高分子に対する高い親和性に着目した固定化酵素キャリアの開発にも着手している³⁵⁾。

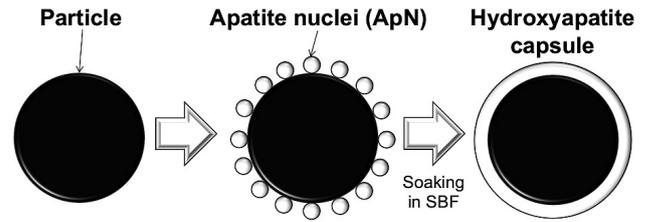


Fig. 8 Schematic illustration of fabrication of hydroxyapatite capsules.

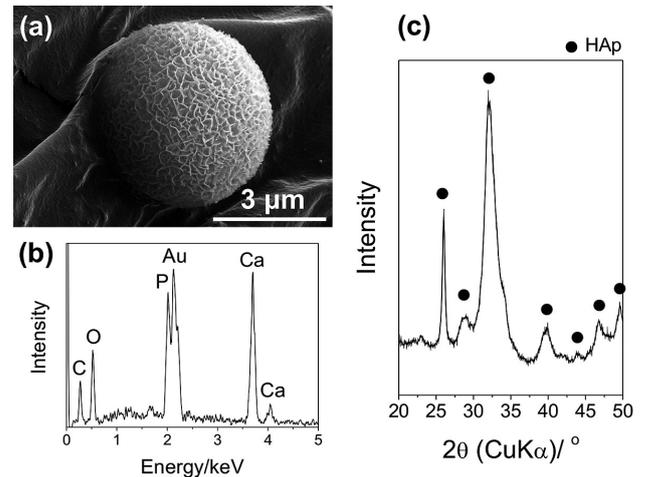


Fig. 9 (a) FE-SEM image, (b) EDX spectrum and (c) powder XRD profile of hydroxyapatite capsule encapsulating agarose gel.

7 結 語

骨と結合する材料は一部のセラミックスに限られるため、金属材料や高分子材料に高い生体活性を付与する試みはこれまでも数多く試みられてきた。しかし、これまで報告されてきた手法の多くは対象材料が限られているケースがほとんどであり、SUS316L鋼やCoCr基合金、PEEK等の多種多様な材料への生体活性処理法の研究例は、Ti基合金と比較するとまだまだ少ない。本稿で提案した、ApNを用いる表面改質法は、骨置換材料として使用する上で魅力的な物性を有する各種マテリアルに、新たな息吹を吹き込むことができる。また、ApNを用いた表面改質処理は、バルク体のみならず微粒子にも適用が可能であるため、整形外科領域や歯科領域のみならず、製剤化技術や遺伝子工学、さらには環境科学等への波及効果も期待される。今後、優れた生体機能を有するApNと様々な機能性材料を融合する本手法をさらに発展させ、次世代型バイオマテリアルの設計指針構築へ貢献していくことが期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は、科学研究費補助金基盤研究B (19H02442)、科学研究費補助金若手研究B (16K16401)、京都発革新的医療技術研究開発助成事業、村田学術振興財団研究助成、大倉和親記念財団研究助成、および京都大学リサーチ・ディベロップメントプログラム「いしづえ」により遂行した。

文 献

- 1) T. Kokubo, H.-M. Kim: *J. Surf. Finish. Soc. Jpn.*, **52** (2001) 401-405.
- 2) L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee Jr.: *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, **2** (1972) 117-141.
- 3) M. Jarcho, J. F. Kay, K. I. Gumaer, R. H. Doremus, H. P. Drobeck: *J. Bioeng.*, **1** (1977) 79-92.
- 4) T. Kokubo, M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro, S. Higashi: *Bull. Inst. Chem., Kyoto Univ.*, **60** (1982) 260-268.
- 5) M. Neo, S. Kotani, Y. Fujita, T. Nakamura, T. Yamamuro, Y. Bando, C. Ohtsuki, T. Kokubo: *J. Biomed. Mater. Res.*, **26** (1992) 255-267.
- 6) M. Neo, T. Nakamura, C. Ohtsuki, T. Kokubo, T. Yamamuro: *J. Biomed. Mater. Res.*, **27** (1993) 999-1006.
- 7) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro: *J. Biomed. Mater. Res.*, **24** (1990) 721-734.
- 8) T. Kokubo, H. Takadama: *Biomaterials*, **27** (2006) 2907-2915.
- 9) International Organization for Standardization (ISO), *Implants for Surgery - In Vitro Evaluation for Apatite-forming Ability of Implant Materials (ISO 23317:2014)*.
- 10) T. Yao, M. Hibino, S. Yamaguchi, H. Okada: Japanese Patent (2013) 5261712, US Patent (2012) 8178066.
- 11) T. Yao, M. Hibino, T. Yabutsuka: Japanese Patent (2013) 5252399, US Patent (2013) 8512732.
- 12) T. Yabutsuka, M. Hibino, T. Yao, K. Tanaka, M. Takemoto, M. Neo, T. Nakamura: *Bioceram. Dev. Appl.*, **1** (2011) D110122.
- 13) T. Yabutsuka, H. Mizuno, S. Takai: *J. Ceram. Soc. Japan*, **127** (2019) 669-677.
- 14) T. Yabutsuka, R. Karashima, S. Takai, T. Yao: *Materials*, **11** (2018) 1334.
- 15) T. Yabutsuka, H. Mizutani, S. Takai, T. Yao: *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **43** (2018) 143-147.
- 16) T. Yabutsuka, K. Fukushima, T. Hiruta, S. Takai, T. Yao: *Mater. Sci. Eng. C*, **81** (2017) 349-358.
- 17) T. Yabutsuka, K. Fukushima, T. Hiruta, S. Takai, T. Yao: *J. Biomed. Mater. Res. B*, **106** (2018) 2254-2265.
- 18) T. Yabutsuka, S. Takai, T. Yao: *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **43** (2018) 139-142.
- 19) T. Narushima: "Characteristics of metals for medicine" in "The development of artificial joints—from the history to future prospects" ed. H. Yoshikawa, T. Nakano, A. Matsuoka, Y. Nakashima, NIHON IGAKUKAN (2013) pp. 163-169.
- 20) K. de Groot, R. G. T. Geesink, C. P. A. T. Klein, P. Serekian: *J. Biomed. Mater. Res.*, **21** (1987) 1375-1387.
- 21) W. R. Lacey: "Hydroxyapatite coatings" in "An Introduction to Bioceramics, Second Edition" ed. L. L. Hench, Imperial College Press (2013) pp. 331-347.
- 22) T. Kokubo, F. Miyaji, H.-M. Kim, T. Nakamura: *J. Am. Ceram. Soc.*, **79** (1996) 1127-1129.
- 23) H.-M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Nakamura: *J. Biomed. Mater. Res.*, **38** (1997) 121-127.
- 24) T. Kokubo, S. Yamaguchi: *Acta Biomater.*, **44** (2016) 16-30.
- 25) T. Yao, T. Yabutsuka: Japanese Patent (2017) 6071895.
- 26) J. F. Schenck: *Med. Phys.*, **23** (1996) 815-850.
- 27) K. Chinzei: *BME*, **11** (1997) 72-77.
- 28) J. Y. Rho, R. B. Ashman, C. H. Turner: *J. Biomech.*, **26** (1993) 111-119.
- 29) M. Niinomi: *Materia Japan*, **52** (2013) 219-228.
- 30) D. F. Williams, A. McNamara, R. M. Turner: *J. Mater. Sci. Lett.*, **6** (1987) 188-190.
- 31) K. Masamoto, S. Fujibayashi, T. Yabutsuka, T. Hiruta, B. Otsuki, Y. Okuzu, K. Goto, T. Shimizu, Y. Shimizu, C. Ishizaki, K. Fukushima, T. Kawai, M. Hayashi, K. Morizane, T. Kawata, M. Imamura, S. Matsuda: *Acta Biomater.*, **91** (2019) 48-59.
- 32) T. Yabutsuka: *Bull. Ceram. Soc. Japan*, **53** (2018) 819-822.
- 33) T. Yao, T. Yabutsuka, Y. Shimada, S. Yamane: *World Intellectual Property Organization (WO)* (2012) 2012137967.
- 34) H. Nakamura, M. Sakaguchi, T. Yabutsuka, S. Takai, T. Yao: *Phosphorus Res. Bull.*, **31** (2016) 9-14.
- 35) M. Yamamoto, T. Yabutsuka, S. Takai, T. Yao: *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **43** (2018) 153-156.