

原 著

バイオミメティック法によるチタンインプラントへの炭酸含有アパタイト  
コーティングに対する官能基の影響

松原 誠<sup>1)</sup> 足立 正徳<sup>2)</sup> 住友 伸一郎<sup>3)</sup> 土井 豊<sup>2)</sup>

Influence of functional groups on biomimetic carbonate apatite coating onto  
titanium implants

MATSUBARA MAKOTO<sup>1)</sup>, ADACHI MASANORI<sup>2)</sup>, SUMITOMO SHINICHIRO<sup>3)</sup> and DOI YUTAKA<sup>2)</sup>

自己組織単分子成膜 (SAM) によるバイオミメティック法を利用し、骨アパタイト様の炭酸含有アパタイト (CA) でチタン基板をコーティングした。血清中の炭酸イオンの約2倍の濃度 (60mM) の炭酸イオンを含有する準安定リン酸カルシウム溶液を浸漬液とし、官能基としてスルホ基に加え、リン酸基、カルボキシル基および水酸基の CA 沈着能について FTIR を用いて検討した。いずれの官能基においても CA の沈着が確認できたが、一日浸漬後での CA 沈着量はリン酸基、カルボキシル基、水酸基に比べスルホ基で優位に多く、単位時間で比較すると CA 析出能はスルホ基が一番優れることが明らかとなった。SAM 末端基に官能基としてスルホ基を導入すると、浸漬溶液に1日浸漬するだけで均一な CA コーティングが可能となることが示唆できた。

キーワード：炭酸含有アパタイト、チタンインプラント、SAM 処理、官能基

*Biomimetic coatings of carbonate apatite (CA), which more closely resembles bone apatite than hydroxyapatite, were produced on titanium substrate surfaces using a self-assembled monolayer (SAM) technique. A metastable calcium phosphate solution containing 60 mM of carbonate, about twice the concentration as that of the blood serum, was employed as an immersion solution, and functional end groups of sulfonic acid ( $-SO_3H$ ), phosphate ( $-PO_4H_2$ ), carboxyl ( $-COOH$ ) and hydroxyl ( $-OH$ ) were investigated in terms of their effectiveness at inducing precipitation of CA on the surface. X-ray diffraction and FT-IR analyses confirmed the deposition of CA on the SAM-Ti surface with all functional end groups. The amount of CA, however, was the greatest with the sulfonic acid end group when compared after immersion for one day, indicating that sulfonic acid is the most potent end group to induce CA precipitation. With the sulfonic acid end group, a thin, uniform layer consisting of a single phase of CA was formed on SAM-Ti surfaces after one day in the immersion solution.*

Key words: Carbonate apatite coating, titanium implant, self-assembled monolayer, functional end group

緒 言

口腔領域において歯の喪失後の機能回復には歯科用インプラントの有用性は広く知られるとことになってき

た。1981年に Adell らの Brånemark PI のグループが、チタンを基材とする骨接合型インプラントを報告し<sup>1)</sup>、現在、臨床で使用される歯科用インプラントの基材はチタンおよびチタン合金が主流である。

<sup>1)</sup> 社会医療法人宏潤会大同病院歯科口腔外科  
457-0818 愛知県名古屋南区白水町9番地

<sup>2)</sup> 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座 歯科理工学分野

<sup>3)</sup> 朝日大学歯学部口腔病態医療学講座 口腔外科学分野  
501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

<sup>1)</sup> Department of Oral Maxillofacial Surgery and Special Care Dentistry,  
Daido Hospital  
9 Hakuuicho, Minami-Ku, Nagoya Aichi 457-0818, Japan

<sup>2)</sup> Department of Dental Materials Science, Division of Oral Functional  
Science and Rehabilitation

<sup>3)</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Oral  
Pathogenesis and Disease Control  
Asahi University School of Dentistry  
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan  
(平成28年1月13日受理)

チタンインプラントは生体親和性が高く、光学顕微鏡レベルでは骨組織と結合したように観察される<sup>2)</sup>。しかし界面には20-40nm程度の非晶質層が存在し、決して骨とは結合していない<sup>3)</sup>。インプラント体表面は、滑面に比べ粗面の方が骨新生は早く、早期に骨接合が得られることから、酸処理<sup>4)</sup>、プラズマ処理<sup>5-6)</sup>、チタン粒子のプラズマ溶射<sup>9,10)</sup>、レーザーを用いた機械加工<sup>11)</sup>などの方法で表面の粗面化が計られている。骨との結合状態は表面性状に加え、物理的および化学的処理による表面組成にも依存する。チタン酸カルシウム<sup>12)</sup>およびチタン酸マグネシウム<sup>13)</sup>の導入も早期結合に有効であると報告されている。

一方、骨組織の無機成分と同組成の水酸化アパタイト（以下、HAとする）のチタンインプラント体表面へのコーティングも早期骨結合に有効であり、プラズマ溶射やフレイム溶着などのオーティング方法<sup>14,15)</sup>が用いられている。現在市販されているHAコーティングチタンインプラントは、固着強度に優れたプラズマ溶射が主流である。HAコーティングにより骨との早期結合は可能となったが、埋入後25週でインプラント周囲の新生骨量はHAコーティングをしないチタンインプラントで有意に多く、HAコーティングが必ずしも有効でないとする報告<sup>16-18)</sup>もある。

プラズマ溶射による方法ではHAの熱分解が避けられず、より溶解しやすい相が生じる。また、インプラント体とHAでは化学的ならびに機械的特性が異なり、固着強度も十分とは言えず、組織内でHAコーティング層が剥離する危険性も指摘されている<sup>19)</sup>。剥離したHA層は細菌の宿主となりそれを排除しようとするマクロファージ系細胞の浸潤に伴う炎症のため近傍の骨組織の破壊、コーティング層の吸収、剥離を繰り返し、最終的にはインプラントの撤去と言う事態に陥る<sup>20,21)</sup>。

これらの問題点を克服するためには熱分解を伴うことなく、かつHA層を可及的に薄くコーティングする手法を創製する必要がある。Campbellらは自己組織単分子成膜（以下、SAMとする）によるバイオミメティック法を利用し、HAでチタンインプラントをコーティングできることを示した<sup>22)</sup>。一方、Yamaguchiら<sup>23)</sup>はSAM処理チタン基板を血清中の炭酸イオン濃度（約27mM）に匹敵するかそれ以上の濃度の炭酸イオンを含む準安定リン酸カルシウム浸漬溶液に浸漬すると骨アパタイト様の炭酸含有アパタイト（以下、CAとする）でチタン基板をコーティングできる可能性を示した。一般にCAはHAに比べ骨伝導性ならびに吸収性に優れた<sup>24,25)</sup>ため、HAに代わりCAでチタンインプラントをコーティングできればより骨伝

導性に優れた新規インプラントを創生できる可能性がある。Yamaguchiら<sup>23)</sup>の手法では浸漬溶液の底に板状チタンが静置された為、溶液中で自発生成したCAがチタン基板に沈殿、堆積し、その結果CAコーティングが認められた可能性もある。本研究では板状に代わりより臨床応用に適した棒状チタンを用い、さらに浸漬溶液中に吊るすことで、沈殿、堆積によるCAコーティングの可能性を排除した状態でCAコーティングを試みた。さらに、官能基としてCampbellら<sup>22)</sup>、Yamaguchiら<sup>23)</sup>のスルホ基に加え、リン酸基、カルボキシル基、リン酸基及び水酸基の可能性についても検討を加えた。

## 材料ならびに方法

### 1. チタンインプラント体の作製

JIS 2種チタン（99.5%）棒（3mmΦ）を長さ10mmに切断したものをインプラント体とした。インプラント体表面への水酸基導入はNanciらの方法<sup>26)</sup>に準じて導入した。すなわち、97%濃硫酸と30%過酸化水素水を1:1で混合させた溶液に、25℃で1時間浸漬させ表面に水酸基を導入した。室温で一昼夜乾燥し、その後120℃で2時間乾燥した（以下、コントロールインプラント体とする）。

### 2. 自己組織化単分子膜（SAM）成膜

溶液からの自発沈殿、その堆積によるCAコーティングの可能性を排除するために水酸基を導入したインプラント体に0.5mmΦのチタンワイヤーをNd-YAGレーザー（ALPHALASER, セレック, 大阪）で固定し（図1）、蒸留水で洗浄後にアセトンですすぎ乾燥させ、以降の実験でインプラント体表面に触れないよう留意した。ワイヤー固定のインプラント体をスペクトル用99.5%エタノールで1%まで希釈した10-ウンデセルジメチルクロロシラン（以下、UDMCSとする）溶液に、37℃で24時間浸漬させ表面にUDMCS単分子成膜した。その後スペクトル用99.5%エタノールで3回（各回10分程度浸漬し、その後新たな溶液と交換）と蒸留水で3回（各回10分程度浸漬し、その後新たな蒸留水と交換）洗浄して乾燥したものをSAM処理インプラント体とした。

### 3. SAM末端基への官能基の導入

UDMCS成膜では末端基はビニル基で疎水性のためそのままではCAの沈着は起こらない。そのため末端基に親水性、極性を持った官能基を導入する必要がある。本論文では以下の3種の官能基を検討した。

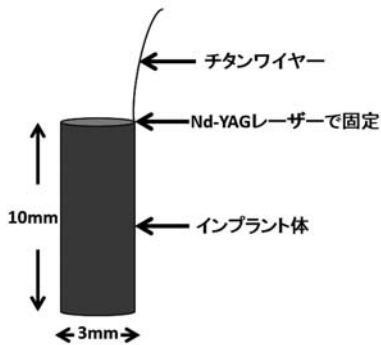


図1. チタンインプラント頭部へのチタンワイヤーの固定の模式図  
Nd-YAGレーザーでチタンワイヤーを固定した。

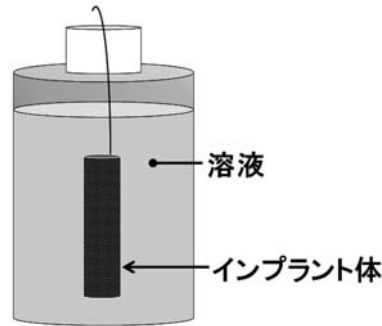


図2. CAコーティングの模式図  
インプラント体を準安定リン酸カルシウム溶液に1日浸漬（模式図）

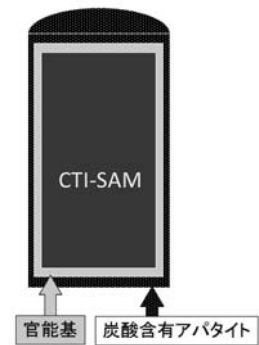


図3. 作製したインプラント体の模式図  
CTI-SAMに官能基を導入して炭酸含有アパタイトを沈着

### 3.1 スルホ基

SAM処理後のインプラント体を30%発煙硫酸に4分暴露させ末端のビニル基をスルホ基化した<sup>27)</sup>。スルホ基の確認はX線光電子分光 (X-ray photo spectroscopy, 島津製作所, 京都) によるSの確認で判定した。

### 3.2 リン酸基

Katoらの方法に準じて<sup>28)</sup>導入した。6mlの0.1M-NaOHと5mlの30% $H_2O_2$ を混和させた溶液に、SAM処理後のインプラント体を5分間浸漬させた。その後0.2M- $POCl_3$ と2, 4, 6コリジンを脱水アセトニトリルに加えた溶液に、上述のインプラント体を25°Cで1時間浸漬させ末端基にリン酸基を導入した。

### 3.3 カルボキシル基

25°Cの過マンガン酸カリウムにSAM処理後のインプラント体を5分間浸漬させ末端基にカルボキシル基を導入した<sup>27)</sup>。

## 4. CAコーティング

官能基を導入したチタンインプラントに固定したワイヤーを保持しインプラント体が浸漬溶液中に宙づりになるようにした (図2)。浸漬溶液は37°CでpH7.00に調整した炭酸イオンを含有する準安定リン酸カルシウム溶液 (1.57mM-Ca, 30mM- $CO_3^{2-}$ , 0.94mM- $PO_4$ ) で、インプラント体1本あたり10mlの浸漬溶液に1日浸漬し、インプラント体表面にCAを沈着させCAコーティングした (図3)。沈着したCAの確認は、全反射型赤外共鳴吸収装置 (FTIR-8400S, 島津製作所, 京都) を用い、インプラント体表面に析出した相を線形吸収モードで測定し (図4)、得られたスペクトルで行った。比較としてコントロールインプラント

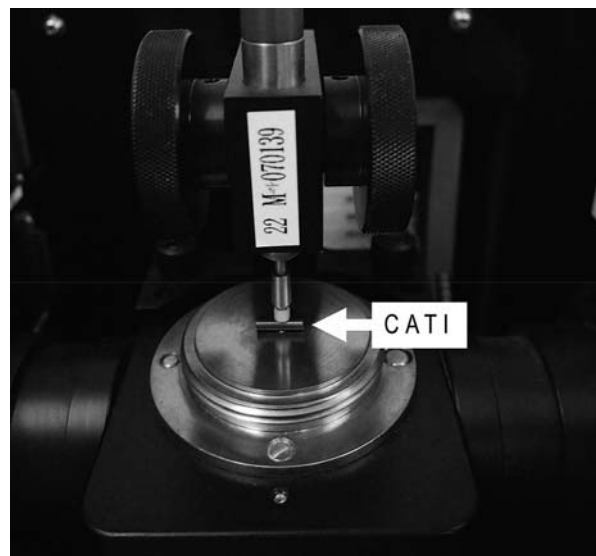


図4. FTIR線形吸収スペクトルの測定  
全反射型赤外共鳴吸収装置 (ATR-FTIR, 島津製作所, 京都) を用い、インプラント体表面に析出した相を線形吸収モードで測定

体を用いた。各インプラント体は5個ずつ作製し、任意の3本ずつについて各3か所測定した。

## 結 果

官能基としてリン酸基 ( $-PO_3H$ )、カルボキシル基 ( $-COOH$ ) 及びスルホ基 ( $-SO_3H$ ) を導入したチタンインプラント体の炭酸イオン含有準安定リン酸カルシウム溶液1日浸漬後のFTIR線形吸収は、同じようなスペクトルが得られているため、代表的なものを図5に示す。いずれの官能基でも $1000cm^{-1}$ 近傍にリン酸イオンに由来するピークと、 $1400\sim 1550cm^{-1}$ 領

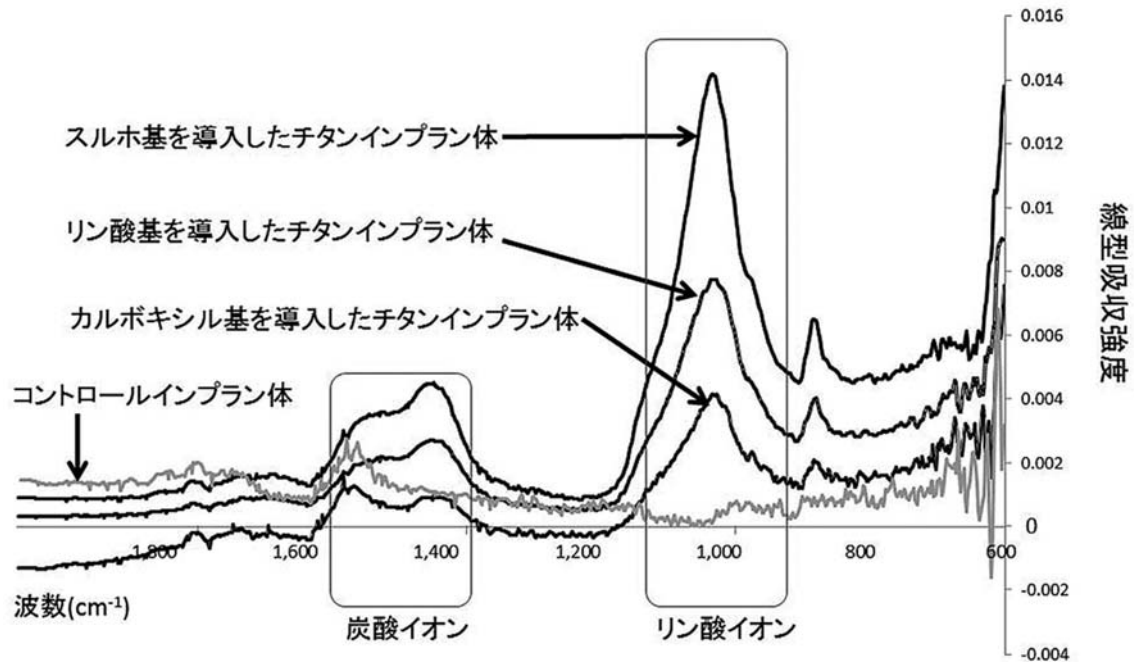


図5. スルホ基、リン酸基およびカルボキシル基を導入したチタンインプラント体にCAをコーティングしたCAインプラントのFTIRスペクトル。比較としてコントロールインプラント体のスペクトルも示した。

域に炭酸イオン由来する吸収ピークが確認でき、析出相がCAであることがわかる。測定した数カ所の部位でのIRスペクトルの波形、強度が同様であったためCA層が厚さ、分布において均一であった。図5からわかるようにCAコーティングの量(相対的には厚さ)は官能基としてスルホ基を導入した場合が最も多かった。

## 考 察

歯科インプラントや人工股関節などの荷重負担となる部位の外科用インプラントの主成分はチタンである。チタンは極めてイオン化しやすい卑金属の一つであるが、その最表層は二酸化チタンなどの緻密な酸化被膜(不動態被膜)で覆われ<sup>29)</sup>、組織との界面ではセラミックとして振る舞われる<sup>30)</sup>。

不動態被膜は数nmと極めて薄いためセラミック本来の曲げなどに対する脆性は失われ、母体のチタンならびにチタン合金が変形しても、破壊で破断面が露出しない限り、表層から剥離することはない。生体親和性はこの不動態被膜による。機械的特性は母体の金属チタンが担い、チタンインプラントは優れた生体適合性および機械的特性を有することになる。しかし、現実的にはこれらチタンインプラントを骨組織に埋入しても骨と結合するには時間を要する。インプラント体

周囲の新生骨の生成はその表面性状に加え表面組成にも依存することが知られている<sup>27)</sup>。

一般に滑面に比べ粗面の基材の方が骨芽細胞および破骨細胞は分化・増殖しやすく<sup>31,32)</sup>、早期骨結合を期待してインプラント体表面の粗造化が計られている。ねじ切りによる凹凸<sup>33)</sup>、表面へのチタン顆粒の焼結もしくは溶着<sup>9,10)</sup>、プラスト処理<sup>5-8)</sup>、酸処理<sup>4)</sup>、陽極酸化<sup>34)</sup>ならびにこれらの組み合わせた方法で粗造化されている。粗造化が計られても最表層は不動態被膜である二酸化チタンからなるセラミックである。

最表層相の二酸化チタンを修飾してチタン酸カルシウム<sup>12)</sup>やチタン酸マグネシウム<sup>35)</sup>にしたチタンインプラントも開発されその有効性が報告されている。一般的にはこれらセラミックに比べリン酸カルシウム(Ca/P)セラミックの方が生体親和性、骨伝導性は高く、種々の方法でチタンインプラント体へのCa/Pコーティングがなされている<sup>36-39)</sup>。

現在市販されているHAコーティングチタンインプラント(以下、HAインプラントとする)のほとんどは、プラズマ照射により製造されたもので、他の方法に比べHAのインプラント体への固着強度は強く、早期に骨結合が可能とされている<sup>14)</sup>。事実、インプラント体と新生骨との接触率はHAをコーティングしていないインプラントに比べHAインプラント

で有意に高く、HA が骨伝導性に優れることがわかる<sup>40)</sup>。しかし、長期観察でインプラント体周囲の新生骨量を評価すると、HA インプラントでは有意に少なく、必ずしも HA コーティングが有効ではないとする報告もある<sup>40)</sup>。プラズマ照射炎は10,000°C 以上にも達し、溶射のために HA の熱分解は避けられず、一部は溶解しやすい他の相に変化してしまう<sup>41,42)</sup>。技術革新に伴いコーティング層の厚さは軽減されてきているがそれでも30-50 μm はあり、本実験の CA コーティング層の数 nm<sup>23)</sup> と比較すると厚すぎる。HA インプラントを埋入した実験系で、引き抜き後のチタン表面にはコーティング層は殆ど固着しておらずインプラント体と HA コーティング層の界面で剥離が生じ、コーティング層の固着強度は必ずしも十分でないとする報告が多い<sup>36)</sup>。この剥離の原因として、上述した溶解性の高い他の相の存在、被膜厚さが厚すぎる、かつ固着強度が不十分であることが上げられている<sup>36)</sup>。またその装置の特異性からアンダーカット部への溶射は不可能で、複雑な形状や多孔質のインプラントにはプラズマ溶射コーティング法は適していない。この問題を解決するためには高熱を必ずしも必要としないコーティング技術を考える必要がある。

化学的手法では、高熱での処理は必ずしも必要ではなく、生体環境に近い環境化（バイオミメティック法）での HA コーティングが試みられている<sup>37-39)</sup>。これらの方法では表面性状に関係なくコーティングができるため、粗造性に富む多孔性表面への HA コーティングも可能となるが、HA とインプラント体との固着強度には疑問が残るのも事実である。Campbell ら<sup>22)</sup>は、リン酸カルシウムの核形成に有効なスルホ基を Ti 表面に化学結合したシランカップリング材の末端基に導入し、そのインプラント体を準安定リン酸カルシウム溶液に浸漬し効率よく HA を沈着コーティングできることを示した。また、このようにして得た HA インプラントで早期骨結合が得られたと報告している<sup>44)</sup>。また、Mao ら<sup>45)</sup>は、シランカップリング材として短鎖型ビニルトリエトキシシランを使用し、チタンの表面にカルボキシル基とヒドロキシル基を導入し、両方の官能基がアパタイト形成の核となることを示した。これらの結果は、表面官能基が Ca/P 核形成を誘導する上で重要な役割を果たしてことを示唆している。

Tanahashi ら<sup>50)</sup>は、種々の官能基を末端に有するアルカンチオールを使用し、チタンに代わり金の基盤上で自己組織化単分子層 (SAM) をつくり、Ca/P 核形成能を比較した。その結果、 $-PO_3H_2$ 基が最も強い核生成能を有し、次いで $-COOH$ 基であり、 $-CONH_2$

(アミド) 基、 $-OH$  基および $-NH_2$  (アミン) 基の核生成能は弱いと報告している。カルボキシル基よりリン酸基の方が核形成能に優れるとする結果は本研究でも認められたが、彼らの浸漬液では Ca/P が沈着するには、数日間以上静置する必要がある<sup>28,45-47)</sup>。

本実験では、3種類の官能基を用いて HA に代わり CA によるコーティングを行った。リン酸カルシウム溶液に炭酸イオンが存在すると HA の核形成ならびにそれ以降の結晶成長は阻害されることは周知の事実として知られているが、本研究結果が示すように、いずれの官能基においても CA の沈着が確認できた。一日浸漬後での CA 沈着量はリン酸基、カルボキシル基、水酸基に比べスルホ基で優位に多く、1日あたりで比較すると CA 析出能は官能基としてスルホ基が優れることが明らかとなった。このように官能基としてスルホ基を導入すると、浸漬溶液に1日浸漬するだけで均一な CA コーティングが可能となることが示唆できた。しかし、このように他の官能基に比べスルホ基を導入するとより多くの CA 沈着が可能となったがその理由は不明である。ただ、文献に報告されている接触角を比較すると、水酸基、カルボキシル基、リン酸基に比べスルホ基で小さいことが示唆されている<sup>23)</sup>。極性が強くなると接触角は小さくなるのが容易に想像でき、カルシウムとの結合もより有効的になり得る。カルシウムとの結合は CA 沈着の前段階として重要と推察されるが、カルシウムとの結合性に関する実験データはない。また、先ほどの水酸基、カルボキシル基、リン酸基で接触角と HA の沈着量に関してもその関連性を論じた報告は未だない。本研究でもスルホ基の導入は SAM 処理後発煙硫酸に4分間暴露して行っている。暴露時間が短くなればスルホ基化が下がり未反応なビニル基 (疎水性) が残る。ただ暴露時間が4分間で全てのビニル基がスルホ基に変わった保障はない。このことは液相反応で水酸基、カルボキシル基、リン酸基を導入した場合にも言え、各反応でどの程度官能基が導入されているか、逆にいえば未反応ビニル基がどの程度残っているかは不明である。現実的には基盤に何モルの単分子が製膜されているかさえも不明である。導入されている官能基の分子数、ならびにその分布も同じであれば、官能基の違いによる評価はより厳密に可能となると思われる。上述したように残存する疎水性のビニル基の量も分布も把握できていないため、各官能基の CA 沈着に及ぼす影響を論じることはできないのが現実である。疎水性のビニル基の分布は分子レベルにおける表面性状に影響し、接触角にも影響し CA 沈着にも影響することは容易に想像できる。そのためスルホ基を除き、これまでの多くの報

告でも、例えば接触角と官能基の関連性、または、HA沈着能と官能基の関連性を官能基の違いで論じることはできなかったのが実情である。このため、本研究でもより厳密な表現はスルホ基を導入したインプラント体ではCA沈着がより有効的に行えたと考えられた。

### 結 語

チタンインプラント体に有機単分子膜 (SAM) を成膜し、末端部にスルホ基、カルボキシル基、リン酸基を修飾するとCAを析出沈着でき、殊にスルホ基で修飾したインプラント体でCAを効率よくコーティングできた。

### 利益相反 (COI)

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

### 文 献

- 1) Adell R, Lekholm U, Rockler and Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981; 10: 387-416.
- 2) Albrektsson T, Hansson HA and Ivarsson B. Interface analysis of titanium and zirconium bone implants. *Biomaterials.* 1985; 6: 97-101.
- 3) Albrektsson T and Hansson HA. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces. *Biomaterials.* 1986; 7: 201-205.
- 4) Buser D, Broggin N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A and Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res.* 2004; 83: 529-533.
- 5) 中田浩史, 寒河江登志朗, 町田健, 加藤仁夫, 小林喜平. プラズマ処理したインプラント周囲の骨形成パターン—ウサギ脛骨における反射電子像観察. 日口腔インプラント. 2003; 16: 477-484.
- 6) 逸見範幸. Ti 6 Al 7 Nb 及び Ti 6 Al 4 v の力学的性質, 骨結合性, 骨形成の比較検討. 生体材料. 2000; 18: 71-79.
- 7) Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C and Andersson B. Experimental study of tumbled and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials.* 1996; 17: 15-22.
- 8) Feighan JE, Goldberg VM, Davy D, Parr JA and Stevenson S. The influence of surface-blasting on the incorporation of titanium-alloy implants in a rabbit intramedullary model. *J Bone Joint Surg Am.* 1995; 77: 1380-1395.
- 9) 田中収. HA インプラントの基礎と臨床. HA プラズマコーティングインプラントを長期成績から評価する. *J Bio-Integ.* 2011; 1: 29-35.
- 10) Yoshinari M, Matsuzaka K and Inoue T. Surface modification by cold-plasma technique for dental implants: Bio-functionalization with binding pharmaceuticals. *Jpn Dent Sci Rev.* 2011; 47: 89-101.
- 11) 稲毛稔彦, 佐藤吉則, 桑田文幸, 稲毛寛彦, 藤田哲夫, 菊池久二, 鈴木里恵, 下川仁弥太. インプラント用チタン上で培養した骨芽細胞の分化に関する研究. レーザー加工による医療用ナノ表面チタンについて. 日大歯学. 2010; 84: 119-126.
- 12) Sultana R, Kon M, Hirakata LM, Fujihara E, Asaoka K and Ichikawa T. Surface modification of titanium with hydrothermal treatment at high pressure. *Dent Mater J.* 2006; 25: 470-479.
- 13) Pang KM, Lee JW, Lee JY, Lee JB, Kim SM, Kim MJ and Lee JH. Clinical outcomes of magnesium-incorporated oxidised implants: a randomised double-blind clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25: 616-621.
- 14) Yang CY, Wang BC, Chang E and Wu JD. The influences of plasma spraying parameters on the characteristics of hydroxyapatite coatings: a quantitative study. *J Mater Sci Mater Med.* 1995; 6: 249-257.
- 15) Wang BC, Lee TM, Chang E and Yang CY. The shear strength and the failure mode of plasma-sprayed hydroxyapatite coating to bone: the effect of coating thickness. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27: 1315-1327.
- 16) Dhert WJ, Klein CP, Jansen JA, van der Velde EA, Vriesde RC, Rozing PM and de Groot K. A histological and histomorphometrical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27: 127-138.
- 17) Klein CP, Patka P, Wolke JG, de Blicke-Hogervorst JM and de Groot K. Long-term in vivo study of plasma-sprayed coatings on titanium alloys of tetracalcium phosphate, hydroxyapatite and alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials.* 1994; 15: 146-150.
- 18) de Bruijn JD, Bovell YP, Davies JE and van Blitterswijk CA. Osteoclastic resorption of calcium phosphates is potentiated in postosteogenic culture conditions. *J Biomed Mater Res.* 1994; 28: 105-112.
- 19) Bloebaum RD, Merrell M, Gustke K and Simmons M. Retrieval analysis of a hydroxyapatite-coated hip prosthesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1991; 267: 97-102.
- 20) Ichikawa T, Hirota K, Kanitani H, Wigianto R, Kawamoto N, Matsumoto N and Miyake Y. Rapid bone resorption adjacent to hydroxyapatite-coated implants. *J Oral Implantol.* 1996; 22: 232-235.
- 21) Røkkum M, Reigstad A, Johansson CB and Albrektsson T. Tissue reactions adjacent to well-fixed

- hydroxyapatite-coated acetabular cups. Histopathology of ten specimens retrieved at reoperation after 0.3 to 5.8 years. *J Bone Joint Surg Br.* 2003; 85: 440-447.
- 22) Campbell AA, Fryxell GE, Linehan JC and Graff GL. Surface-induced mineralization: a new method for producing calcium phosphate coatings. *J Biomed Mater Res.* 1996; 32: 111-118.
  - 23) Yamaguchi Y, Adachi M, Iijima M, Wakamatsu N, Kamemizu H, Omoto S and Doi Y. Thin carbonate apatite layer biomimetically-coated on SAM-Ti substrate surfaces. *J Ceram Soc Jpn.* 2010; 118: 458-461.
  - 24) Hasegawa M, Doi Y and Uchida A. Cell-mediated bioresorption of sintered carbonate apatite in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.* 2003; 85: 142-147.
  - 25) 土井豊. 生体吸収性炭酸含有アパタイトの開発及び臨床応用への可能性. *Orthop Ceram Implants.* 2002; 22: 1-4.
  - 26) Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S and McKee MD. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res.* 1998; 40: 324-335.
  - 27) Liu Q, Ding J, Mante FK, Wunder SL and Baran GR. The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique. *Biomaterials.* 2002; 23: 3103-3111.
  - 28) Kato K, Eika Y and Ikada Y. Deposition of a hydroxyapatite thin layer onto a polymer surface carrying grafted phosphate polymer chains. *J Biomed Mater Res.* 1996; 32: 687-691.
  - 29) Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K, Lundstrom I, McQueen DH and Skalak R. The interface zone of inorganic implants in vivo: Titanium implants in bone. *Ann Biomed Eng.* 1983; 11: 1-27.
  - 30) 土井豊；永原國典編. 卒直後研修医・若い歯科医師のための歯科インプラント治療ガイドブック. 1版. 東京：クインテッセンス出版；2008：144-147.
  - 31) Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD and Boyan BD. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res.* 1999; 13: 38-48.
  - 32) Makihiro S, Mine Y, Kosaka E and Nikawa H. Titanium surface roughness accelerates RANKL-dependent differentiation in the osteoclast precursor cell line, RAW 264.7. *Dent Mater J.* 2007; 26: 739-745.
  - 33) Chowdhary R, Jimbo R, Thomsen C, Carlsson L and Wennerberg A. Biomechanical evaluation of macro and micro designed screw-type implants: an insertion torque and removal torque study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24: 342-346.
  - 34) Miura S and Takebe J. Biological behavior of fibroblast-like cells cultured on anodized-hydrothermally treated titanium with a nanotopographic surface structure. *J Prosthodont Res.* 2012; 56: 178-186.
  - 35) Sul YT, Jönsson J, Yoon GS and Johansson C. Resonance frequency measurements in vivo and related surface properties of magnesium-incorporated, micro-patterned and magnesium-incorporated TiUnite, Osseotite, SLA and TiOblast implants. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20: 1146-1155.
  - 36) Li P and de Groot K. A calcium phosphate formation within sol-gel-prepared titania in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27: 1495-1500.
  - 37) Ohtsuki C, Iida H, Hayakawa S and Osaka A. Bioactivity of titanium treated with hydrogen peroxide solutions containing metal chlorides. *J Biomed Mater Res.* 1997; 35: 39-47.
  - 38) Kokubo T, Miyaji F, Kim HM and Nakamura T. Spontaneous apatite formation on chemically treated titanium metals. *J Am Ceram Soc.* 1996; 79: 1127-1129.
  - 39) Wen HB, de Wijn JR, Liu Q, de Groot K and Cui FZ. A simple method to prepare calcium phosphate coatings on Ti-6Al-4V. *J Mater Sci Mater Med.* 1997; 8: 765-770.
  - 40) Gottlander M, Johansson CB and Albrektsson T. Short- and long-term animal studies with a plasma-sprayed calcium phosphate-coated implant. *Clin Oral Implants Res.* 1997; 8: 345-351.
  - 41) Wolke JGC, de Blicke-Hogervorst JMA, Dhert WJA, Klein CPAT and De Groot K. Studies on the thermal spraying of apatite bioceramics. *J Therm Spray Technol.* 1992; 1: 75-82.
  - 42) Maxian SH, Zawadsky JP and Dunn MG. In vitro evaluation of amorphous calcium phosphate and poorly crystallized hydroxyapatite coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27: 111-117.
  - 43) Søballe K. Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation. Mechanical and histological studies in dogs. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1993; 255: 1-58.
  - 44) Campbell AA, Song L, Li XS, Nelson BJ, Bottoni C, Brooks DE and DeJong ES. Development, characterization, and anti-microbial efficacy of hydroxyapatite-chlorhexidine coatings produced by surface-induced mineralization. *J Biomed Mater Res.* 2000; 53: 400-407.
  - 45) Mao C, Li H, Cui F, Feng Q, Wang H and Ma C. Oriented growth of hydroxyapatite on (0001) textured titanium with functionalized self-assembled silane monolayer as template. *J Mater Chem.* 1998; 8: 2795-2801.
  - 46) Tanahashi M and Matsuda T. Surface functional group

dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res.* 1997; 34: 305-315.

47) Sato K, Kumagai Y and Tanaka J. Apatite formation on organic monolayers in simulated body environment. *J Biomed Mater Res.* 2000; 50: 16-20.

---