生体セラミックスの表面機能化技術の開発

Surface modification of bioceramics

紋川 亮 (Akira MONKAWA)*

Hydroxyapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp] is a major inorganic component of bone and teeth tissues and has the excellent biocompatibility and high osteoconductivity. The interactions between HAp and protein or cell have been studied. The HAp related bioceramics such as bone substitute, coating substance of metal implants, inorganic-polymer composites, and cell culture. We described two methods; (1) surface modification of HAp using organosilane; (2) fabrication of HAp ultra-thin layer on gold surface for protein adsorption analyzed with QCM-D technique. The interfacial interaction between collagen and HAp in a nano-region was controlled by depositing the organosilane of n-octadecyltrimethoxysilane (ODS: $-\text{CH}_3$) or aminopropyltriethoxysilane (APTS: $-\text{NH}_2$) with a chemical vapor deposition method. The morphologies of collagen adsorbed on the surfaces of HAp and HAp deposited with APTS were similar, however that of the surface with ODS was apparently different, due to the hydrophobic interaction between the organic head group of $-\text{CH}_3$ and residual groups of collagen. We present a method for coating gold quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) sensor with ultra-thin layer of hydroxyapatite nanocrystals evenly covering and tightly bound to the surface. The hydroxyapatite sensor operated in liquid with high stability and sensitivity. The in-situ adsorption mechanism and conformational change of fibrinogen on gold, titanium and hydroxyapatite surfaces were investigated by QCM-D technique and Fourier-transform infrared spectroscopy. The study indicates that the hydroxyapatite sensor is applicable for qualitative and conformational analysis of protein adsorption.

Keywords: Hydroxyapatite, Collagen, Organosilane, QCM-D, Fibrinogen

I. はじめに

高齢化社会を迎え、「ヒト細胞」と「細胞の足場材料」を用いて試験管内で再生する「再生医療」に期待が寄せられている (Langer *et al.*, 1993; Ducheyne *et al.*, 1999; Stanton *et al.*, 2003)。その実現に向けて「移植医療・組織工学」分野の研究が活発化している。これらの研究では、細胞を分離・選別し、その分化・増殖を制御する“細胞工学”とナノテクノロジーによる新しい“材料科学”を融合させて移植用臓器を再生することを目的としている。分子生物学の進歩により、細胞内でのカスケードであるシグナル伝達機構やシグナルタンパク質・糖タンパク質の分離・精製が進められている。しかし、分子生物学や細胞工学の進歩だけでは複雑な組織や臓器さらに骨の機能再生は不可能であり、細胞に積極的に働きかける(細胞機能を活性化する)足

場材料の開発が求められている。

生体材料と細胞の接着には、その界面に存在するタンパク質の種類・形体が細胞内へのシグナル伝達に重要である。材料を移植した際に生じる最初の生理現象はタンパク質の材料表面への吸着であり、細胞は、そのタンパク質を介して材料を認識する。この反応は複雑であり、詳細な検討が始まったばかりである。

近年、細胞機能を活性化するサイトカインに関する研究が進められてきているが、過剰な免疫反応や炎症反応など、安全性の面で課題が多い。この問題を解決するためには、薬理効果の高いタンパク質を材料表面に安定に固定化させることが必要である。また、これらのタンパク質は、高価であるため最小量で最大限の効果を引き出すことが求められている。

これまで筆者は、整形外科領域で臨床応用されているハ

doi: 10.2465/gkk.111201

(平成 23 年 12 月 1 日受付, 平成 23 年 12 月 23 日受理)

* 東京都立産業技術研究センター バイオ応用技術グループ, 〒135-0064 東京都江東区青海 2-4-10

* Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute, 2-4-10 Aomi, Koto-Ku, Tokyo 135-0064, Japan E-mail: monkawa.akira@iri-tokyo.jp

イドロキシアパタイト(以下 HAp; 骨組織に存在する無機主成分)に着目し, 材料自身が直接細胞の機能発現を誘導する材料開発やセンシング技術を用いた材料特性の基礎的知見の取得に取り組んできた。本稿では, HAp 焼結体を用いた表面改質・タンパク質の吸着特性制御技術の開発と QCM-D 測定用 HAp センサーの開発に関して紹介する。

II. 有機シランによる HAp 焼結体表面の改質

生体材料の表面特性は, 生体内における細胞の接着, 増殖と分化のために非常に重要である。材料表面の機能化は, 組織工学において必要である足場材料の開発に欠かせない技術である (Luk *et al.*, 2000; Svedhem *et al.*, 2003)。細胞が材料表面に接着するためには, その足場となるタンパク質を材料表面に誘導する必要がある。タンパク質の吸着は, 表面の親・疎水性や化学構造によって, 大きく影響を受ける (Faucheux *et al.*, 2004; Keselowsky *et al.*, 2004)。そのため, 材料表面の特性を制御することは, 生体材料の設計のためには必須である。これまで, 筆者は, Dewetting 現象を用いたタンパク質のナノ構造制御技術を用いて, コラーゲンナノホールパターン of 作製に成功している (Monkawa *et al.*, 2006a)。この際, HAp 表面のぬれ性を制御することにより, 孔径を制御できることを明らかにした。本研究は, 有機シランを用いて HAp 表面のぬれ性を変化させ, コラーゲンの吸着挙動を観察した (Monkawa *et al.*, 2007)。

HAp とタンパク質の固定化には, 有機シランを用いた。有機シランは, 有機物とケイ素から構成される化合物で, 通常では非常に結びつきにくい有機材料と無機材料を結ぶバインディング材として用いられている。この特性を利用し, 複合材料の機械的強度, 耐水性, 接着性の改良, 樹脂改質, 表面改質などに利用されている。有機シランの末端に, 様々な官能基 ($-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ など) を用いることで, 表面のぬれ性を制御したり, タンパク質との間に化学結合を導入したりすることが可能である。本研究では, HAp 焼結体表面にオクタデシルトリメトキシシラン (ODS: $-\text{CH}_3$) とアミノプロピルトリエトキシシラン (APTS: $-\text{NH}_2$) の自己組織化単分子膜を形成させ, 細胞の足場材料として知られているコラーゲンの吸着形体を観察した。

有機シランによる HAp 表面のコーティング法として, 化学蒸着 (CVD) 法を用いた (Sugimura *et al.*, 2002; Mouroux, *et al.*, 1998)。CVD 法は, テフロン容器内に, HAp 焼結体と 0.1 ml 程度の有機シラン溶液を入れ, 150 °C に加熱することにより有機シランを気化させ, 焼結体表面に有機シラン薄膜を形成させた。CVD 法の利点は, つきまわり性が良く, 複雑な形状の材料であっても均一な薄膜を形成できる点にある。有機シランで改質された HAp の表面特性は, ゼータ電位測定, 接触角測定および X 線光電子分光スペクトル (XPS) により明らかにした。

さらに, コラーゲンの吸着特性を原子間力顕微鏡 (AFM) 観察により示した。

ゼータ電位測定の結果, HAp 焼結体は, -35.2 ± 2.9 mV であった。この理由は, HAp の表面が部分的に電離し, 負の電荷を持つ (PO_4) $^{3-}$ および OH^- が存在しているためであると予想される。ODS コーティング HAp (ODS-HAp) の電位は, -25.43 ± 3.2 mV に変化した。これは, 有機シランが, HAp 表面の OH 基と脱水縮合した結果, 負に帯電している OH 基が減少したためだと考えられる。一方, APTS コーティング HAp (APS-HAp) は, 10.2 ± 2.8 mV であり, 表面電位が負から正に変化した。これは, HAp 表面に正の電荷を持つアミノ基が導入されたことを示唆している。

有機シランコーティングによる表面特性の変化は, 接触角測定からも明らかである。HAp, ODS-HAp, APS-HAp の接触角は, それぞれ, $67 \pm 2^\circ$, $100 \pm 1^\circ$, $73 \pm 2^\circ$ であった。ODS コーティングの結果, HAp 表面が疎水性に変化したことを示している。これは, ODS が末端に疎水基を有しているためであると考えられる。一方, APS-HAp の接触角は, HAp とほとんど変わらなかった。

Figure 1 に XPS 分析の結果を示す。Si (2p) において, HAp では検出されなかった Si (2p) のピークが, ODS-HAp および APS-HAp において検出された。Si (2p) のピーク位置 (102.2 eV) は, シロキサン ($\text{CH}_3\text{-Si-O-Si-CH}_3$) と一致しており, 有機シランの特徴的な分子構造の一つである。N (1s) のピークは, APS-HAp のみで検出された。このピークは, 400.5 eV のアミノ基のピークと一致している (Mertig *et al.*, 1997)。

Figure 2 にコラーゲンを吸着させた HAp (Col/HAp), ODS-HAp (Col/ODS-HAp), APTS-HAp (Col/APTS-HAp) の表面を AFM により観察した結果を示す。コラーゲン吸着層は, 基板の上に $7 \mu\text{g/ml}$ のコラーゲン溶液を滴下し, 30 分間静置することで成膜した。AFM 測定の結果,

Fig. 1. XPS spectra of Si(2p) and N(1s) of HAp, ODS-HAp and APTS-HAp disks. The Si(2p) peaks were detected at 102.2 eV, the N(1p) peak at 399.6 eV. Modified from Monkawa *et al.* (2007).

Fig. 2. AFM images of the collagen adsorbed on the HAp, ODS-HAp and APTS-HAp disks. Filamentous collagen molecules were observed on the HAp and APTS-HAp disks. The collagen molecules with the felt-like structure were observed on the ODS-HAp. Modified from Monkawa *et al.* (2007).

APS-HAp に吸着したコラーゲン層は、HAp 表面全体を被覆しており、線維状のコラーゲン分子が重なり合い積層していた。これは、HAp 表面に吸着したコラーゲン分子の AFM 像とよく似ている。一方、ODS-HAp 表面に吸着したコラーゲンは、フェルト状に点在していた。また、コラーゲン分子の被覆率は 30% 未満であった。

Col/HAp, Col/ODS-HAp と Col/APTS-HAp の接触角は、 $46 \pm 1^\circ$ 、 $80 \pm 1^\circ$ と $48 \pm 1^\circ$ であり、コラーゲン吸着前の基板の結果と比較すると明らかに減少している。これらの結果は、すべての表面のぬれ性がコラーゲン吸着によって親水性に変化したことを示している。Col/HAp と Col/APTS-HAp 表面の接触角は、これまでに測定されたコラーゲン薄膜の結果 (Trabelsi *et al.*, 2005) と類似しており、均一なコラーゲン層の存在を支持している。一方、Col/ODS-HAp は、疎水性を維持したままであり、コラーゲン層で完全に覆われず、ODS 層が表面に存在していることを示唆している。本研究の結果、表面のぬれ性を

変化させることにより、表面に吸着したコラーゲンの形体が大きく異なることが明らかになった。

III. 水晶振動子 (QCM-D) 測定用ハイドロキシアパタイトセンサーの開発

固液界面でのタンパク質の吸着は、その生体親和性に影響を及ぼすので生物学的、医学的そして工業的に重要である。生体材料を生体内に移植した場合、長期間の移植の間に血栓形成、免疫反応、炎症反応等の異物反応が発生する可能性が高い。これらの反応は、生体組織を傷つけ、材料表面の機能を低下させる。この問題を解決するために、医用材料は、生体にうまく馴染む性質である生体適合性を有することが求められている。一般に、人工材料が生体内に取り込まれた場合、材料表面上に水やイオンが真っ先に吸着する。次いで、生体内のタンパク質が材料表面上に吸着する。最終的な生体反応は、材料表面上で構造変化した吸着タンパクを介して、細胞が付着することで起こる。吸着

タンパク層を介して、材料と細胞は相互作用し、その後の生体反応が生じる。よって、材料表面上へのタンパク質吸着をいかに理解し制御するかが、生体材料を設計することにおいて重要な課題の一つである。

材料表面におけるタンパク質の吸着挙動は、これまで、放射性標識法、エリプソメトリー、AFM、分光分析、抗原抗体法で解析されている。(O'Connor *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Ta *et al.*, 1998; Sit *et al.*, 1999; Cacciafesta *et al.*, 2000; Marchin *et al.*, 2003)。これらの方法は、吸着量、膜厚、吸着形態を解析することはできるが、リアルタイムに吸着挙動を観察することが難しい。一方、水晶振動子法(QCM) 表面プラズモン共鳴法(SPR)は、タンパク質の吸着挙動をリアルタイムに測定できる(Höök *et al.*, 1998, 2001; Hemmersam *et al.*, 2001; Kallio *et al.*, 2004)。特に、QCM 技術を基盤とした QCM-D 法はセンサー表面に吸着した物質の重量と振幅の減衰からセンサーと溶液の間の粘弾性を測定することができる。このような特性から、QCM-D 法は、水分を含むタンパク質層の構造的な変化を捉えることができ、より生体内に近い環境下でタンパク質の吸着挙動を解析することが可能である(Rodahl *et al.*, 1997)。

本研究の目的は、細胞培養用足場材料やドラッグデリバリーシステム用担体の開発のために必要である材料とターゲット間の吸着・脱着機構を解明することにある。そこで、QCM-D 測定用の HAp センサーを開発し、HAp と Ti, Au 表面における吸着挙動の違いを比較した。HAp のコーティング方法としては、レーザーアブレーション法(Cheang *et al.*, 1996) やスパッタリング法(Wang *et al.*,

2000)等が挙げられる。これらの方法は、つきまわり性の悪さから、複雑な材料への均一な薄膜の形成やバイオセンサー基板への均一なナノ薄膜の形成が困難であった。本研究では、この課題を解決するために、電気泳動堆積法(EPD 法)を用いた(Zhitomirsky *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2005)。EPD 法は、液体中のナノ粒子が電気泳動現象によって、電極表面に堆積することを利用したコーティング方法である。この方法は、生体セラミックス結晶を複雑な形状のものでも均一にコーティングすることが可能であるが、薄膜化が課題であった。本研究は、これらの問題点を克服するために HAp ナノ結晶を用い、EPD 法と超音波処理の組み合わせにより、100 nm 以下の厚さを持つ均一なナノ薄膜を有した QCM-D 用センサーの作製に成功した(Monkawa *et al.*, 2006b, 2006c)。

HAp 薄膜を有した QCM-D 用センサーの作製方法を以下に示す。HAp ナノ結晶は、合成温度を 80°C に調整し、湿式法により合成した。得られた HAp 懸濁液をエタノールで完全に置換し、エタノールに対する HAp の重量比を 1% に調節した。この溶液を 5 分間超音波処理した。HAp ナノ粒子は、懸濁液を超音波処理することで、粒子間の摩擦によりプラスに帯電する。超音波処理により正の電荷を帯びた HAp ナノ粒子は、負電極側の金表面に引き寄せられ HAp 層を形成する。電極は、正負両極とも QCM-D 用(Q-sense AB)の金センサーを用い、電極間距離を 15 mm に保ち 10 V および 100 V の電圧を各 5 分間印加した。そして、HAp 膜作製後、エタノール中で超音波処理により基板表面の大部分の HAp 層を剥離させ、HAp ナノ薄膜を作製した。Figure 3 に印加電圧に対する HAp 薄膜層の

Fig. 3. Schematic picture of the secondary structure of fibrinogen. The detailed characteristics of the labeled domains are described in the text. Modified from Monkawa *et al.* (2006c).

AFM 像を示す。HAp ナノ結晶はいずれの電圧条件下においても観察されたが、10 V でのコーティングでは、水酸アパタイト結晶がまばらに存在し、均一なコーティングの形成は観察できなかった。一方、100 V の高電圧条件下で作製した HAp 層は一様に全体を覆っていた。印加電圧 100 V における HAp 層の膜厚は、AFM により直接測定した。膜厚は 15~20 nm であり、QCM-D 測定に必要とされる薄膜層の厚さ (100 nm 以下) を十分満たしていた。

作製した HAp センサーを用いてモデルタンパク質としてフィブリノーゲンを用いて吸着挙動を QCM-D により測定した。Figure 4 にフィブリノーゲンの構造図を示す (Hall *et al.*, 1959)。フィブリノーゲンは、分子量が 340 kDa である血液に含まれるタンパク質である。その構造は、ダンベル型であり、中心部に疎水部である D ドメイン、両末端に同じく疎水部である E ドメインが存在する。これらのドメインは、中性溶液中では、負に帯電している。D ドメインの先には、 α C ドメインが存在している。 α C ドメインは、正の電荷を持ち、D、E ドメインと比較して親水性が高く、比較的自由に動くことができる。

金センサー、生体材料としてよく利用されている Ti センサーは、HAp センサーとの吸着挙動の違いを比較するために用いた。Figure 4a と 4b に、金、チタンと HAp センサー表面にフィブリノーゲン溶液 (1 mg/ml) を導入した際の共振周波数 (Δf) と消散 (ΔD) の変化を示す。いずれのセンサーにおいても、急激な Δf の減少と ΔD の増加が観察された。水晶振動子センサーは電圧をかけると一定の周波数で振動する。その上にタンパク質などが吸着すると試料の質量に応じて周波数の減少が起こる。急激な Δf の減少は、センサー表面にフィブリノーゲン分子が強い相互作用により吸着していることを示している。一方、 ΔD は、吸着した物質の粘弾性を算出するための値である。振動中のセンサーの電流を切ると、振動が急激に減少する。QCM-D は、この消散エネルギーをモニターすることで D 値を得ている。粘弾性の高い (軟らかい) 物質は、振動を吸収するため減衰はより早くなり、 ΔD 値は大きくなる。 ΔD の増加は、粘弾性の高い物質が吸着したことを示している。

Fig. 4. AFM and Z-range images of HAp film deposited on gold surface prepared at (a) 10 V and (b) 100 V. The HAp nanocrystals deposited at 10 V are not homogeneously covering the surface, while at 100 V the nanocrystals are evenly distributed and form a film of 10–20 nm thickness. Modified from Monkawa *et al.* (2006c).

Figure 4c に、 Δf と ΔD の相関関係を示す。 $\Delta D/\Delta f$ 値は、センサー表面物質の構造変化を表している。HAp センサーの場合、 Δf が -20 Hz までは、 $\Delta D/\Delta f$ 値 ($\times 10^{-8}$) が -7.8 、 $-20 \sim -100$ Hz までは、 $\Delta D/\Delta f$ 値 ($\times 10^{-8}$) が -3.9 、 Δf が -100 Hz 以上の場合は、 -34.5 と変化する。金センサーでは、 Δf が -60 Hz までは $\Delta D/\Delta f$ 値 ($\times 10^{-8}$) が -3.5 、それ以上では、 $\Delta D/\Delta f$ 値 ($\times 10^{-8}$) が -8.4 になる。Ti センサーでは、 Δf が -70 Hz までは $\Delta D/\Delta f$ 値 ($\times 10^{-8}$) が -3.6 、それ以上では、 $\Delta D/\Delta f$ 値 ($\times 10^{-8}$) が -4.8 になる。センサーごとに $\Delta D/\Delta f$ 値の挙動が変化する理由は、それぞれの表面に対するフィブリノーゲンの吸着特性が異なるためである。

Figure 5 にそれぞれの表面におけるフィブリノーゲンの吸着形態の違いを示す。金表面でのフィブリノーゲンの吸着挙動を Fig. 5a に示す。金センサー表面の接触角は、 $90.1 \pm 1.7^\circ$ と高く疎水表面である。そのため、金表面に吸着したフィブリノーゲンは、疎水性相互作用により吸着していると考えられる。最初は、フィブリノーゲンの D、E ドメインが金表面に疎水性相互作用により吸着している。この時吸着した分子の形態は side-on モデルで示すことができる。吸着初期における低 $\Delta D/\Delta f$ 値は、硬い層の存在を示唆しており、このモデルと一致する。吸着量の増加と共にタンパク質分子間の反発が強くなり、D もしくは E ドメインが金表面から離れ、吸着形態が変化する。そのため、吸着層の粘弾性が大きくなり、 $\Delta D/\Delta f$ 値が大きくなる。この際の吸着形態は、逆 V 字さらには end-on 吸着であると予想される。

Ti 表面でのフィブリノーゲンの吸着挙動を Figure 5b に示す。Ti 表面は、接触角が小さく、負に帯電している。そのため、フィブリノーゲンは、静電相互作用で吸着すると思われる。最初は、正の電荷を持つ α C ドメインが、負の電荷を持つ Ti 表面に静電相互作用により吸着する。この際、 α C ドメインが E ドメインの下にもぐりこむように存在するか、横に開いた形で存在するかと考えている。このモデルは、吸着初期における低 $\Delta D/\Delta f$ 値によって支持される。吸着量の増加に伴い分子間の反発が強くなり逆 V 字形体をとる。この際 α C ドメインが Ti 表面から離れることはなく、V 字の中心角を小さくすることでより多くのフィブリノーゲンを吸着することができる。これは、他の表面と比較して緩やかに変化する $\Delta D/\Delta f$ 値の挙動と一致する。

HAp 表面でのフィブリノーゲンの吸着挙動を Figure 5c に示す。HAp 表面は Ca^{2+} と PO_4^{3-} と 2 つの異なる吸着部位を持っている。そのため、正負両方のドメインを静電的に吸着することができる。吸着初期においては、負の電荷を持つ D、E と正の電荷を持つ α C ドメインが HAp 表面と吸着する。これは、低 $\Delta D/\Delta f$ 値によって説明することができる。吸着量の増加とともに、タンパク質間の反発により、end-on 吸着へと変化する。これは、 $\Delta D/\Delta f$ 値が

Fig. 5. Frequency shifts, Δf , and adsorption mass changes (a) and dissipation shifts, ΔD shift, (b) recorded against time for fibrinogen adsorption on gold, titanium and HAp surfaces. 1 mg/ml of the fibrinogen solution was introduced at $t=15$ min. (c) Δf and ΔD plots using the data of (a) and (b). The horizontal solid arrows mean the zero lines of ΔD at $\Delta f=0$ for using gold, titanium and HAp. The dashed lines with arrows are the original data points showing the difference of slopes ($\Delta D/\Delta f$ value) at two different adsorption regions. Modified from Monkawa *et al.* (2006c).

急激に大きくなることと一致する。

IV. 終わりに

本稿で紹介した表面界面制御技術を用いた生体材料表面の機能化技術は、バイオテクノロジー分野ばかりでなく、触媒や環境など幅広い分野で利用することが可能である。有機シランを用いたセラミックスの改質技術は、バイオセンサー用認識部位の固定化に利用している。本論でも述べたように有機シランは、無機材料と有機材料のバインディング材の役割を果たすため、認識部位となる糖鎖や抗体を化学結合により強固に固定化することが可能である。また、有機シランは、電荷や濡れ性などの表面特性の改質にも利用されている。この技術を利用し、メソポーラスシリカなどの多孔質材料表面の改質に用いることで、有用・有害物質の選択的吸着物質の開発に取り組んでいる。QCM-Dを用いたタンパク質の吸着挙動解析は、有害ガスの検出や生体の変化の指標となるタンパク質であるバイオマーカーの探索に利用することが可能である。

謝 辞 今回、日本鉱物科学会応用鉱物科学賞に推薦いただいた東北大学金属材料研究所杉山和正教授にお礼を申し上げますとともに、御選考いただいた選考委員の先生方に

深く感謝いたします。また、本研究の御指導をいただいた田中順三教授、生駒俊之準教授には、この場を借りてお礼を申し上げます。また、学生時代から今日まで御指導いただいた宮本正道教授、三河内岳準教授、村上 隆教授、小暮敏博準教授、鍵 裕之教授をはじめ、これまで研究を支えてくださったすべての方々にお礼を申し上げます。最後に本稿を執筆する機会を与えてくださった日本鉱物科学会に感謝を申し上げます。

引用文献

- Cacciafesta, P., Humphris, A.D.L., Jandt, K.D. and Miles, M.J. (2000): Human Plasma Fibrinogen Adsorption on Ultraflat Titanium Oxide Surfaces Studied with Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, **16**, 8167-8175.
- Cheang, P. and Khor, K.A. (1996): Influence of powder characteristics on plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Therm. Spray Technol.*, **5**, 310-316.
- Ducheyne, P. and Qiu, Q. (1999): Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, **20**, 2287-2303.
- Faucheux, N., Schweissb, R., Lutzowa, K., Werner, C. and Groth, T. (2004): Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials*, **25**, 2721-2730.
- Hall, C.E. and Slayter, H.S. (1959): The Fibrinogen Molecule: Its

- Size, Shape, and Mode of Polymerization. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**, 11–17.
- Hemmersam, A.G., Foss, F., Chevallier, J. and Besenbacher, F. (2005): Adsorption of fibrinogen on tantalum oxide, titanium oxide and gold studied by the QCM-D technique. *Colloids Surf.*, **B**, **43**, 208–215.
- Höök, F., Kasemo, B., Nylander, T., Fant, C., Sott, K. and Elwing, H. (2001): Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. *Anal. Chem.*, **73**, 5796–5804.
- Höök, F., Rodahl, M., Brzezinski, P. and Kasemo, B. (1998): Measurements using the quartz crystal microbalance technique of ferritin monolayers on methyl-thiolated gold: Dependence of energy dissipation and saturation coverage on salt concentration. *J. Colloid Interf. Sci.*, **208**, 63–67.
- Huang, S., Ou, C. and Lai, J. (1999): Surface composition and protein adsorption of polyurethane membrane. *J. Membr. Sci.*, **161**, 21–29.
- Kallio, T., Kekkonen, K. and Stenius, P. (2004): The formation of deposits on polymer surfaces in paper machine wet end. *J. Adhesion*, **80**, 933–969.
- Keselowsky, B. G., Collard, D. M. and Garcia, A.J. (2004): Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials*, **25**, 5947–5954.
- Langer, R. and Vacanti, J.P. (1993): Tissue engineering. *Science*, **260**, 920–926.
- Luk, Y.Y., Kato, M. and Mrksich, M. (2000): Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates Presenting Mannitol Groups are Inert to Protein Adsorption and Cell Attachment. *Langmuir*, **16**, 9604–9608.
- Marchin, K.L. and Berrie, C.L. (2003): Conformational changes in the plasma protein fibrinogen upon adsorption to graphite and mica investigated by atomic force microscopy. *Langmuir*, **19**, 9883–9888.
- Mertig, M., Thiele, U., Bradt, J., Leibiger, G., Pompe, W. and Wendrock, H. (1997): Scanning Force Microscopy and Geometric Analysis of Two-Dimensional Collagen Network. Formation. *Surf. Inter. Anal.*, **25**, 514–521.
- Monkawa, A., Ikoma, T., Yunoki, S., Ohta, K. and Tanaka, J. (2006a): A Dewetting Process to Nanopattern Collagen on Hydroxyapatite. *Materials Letters*, **60**, 3647–3650.
- Monkawa, A., Ikoma, T., Yunoki, S., Ohta, K. and Tanaka, J. (2006b): Electrophoretic deposition of hydroxyapatite nanocrystal. *Key Engineering materials*, **309–311**, 643–646.
- Monkawa, A., Ikoma, T., Yunoki, S., Yoshioka, T., Tanaka, J., Chakarov, D. and Kasemo, B. (2006c): Fabrication of Hydroxyapatite Ultra-thin Layer on Gold Surface and its Application for Quartz Crystal Microbalance Technique. *Biomaterials*, **33**, 5748–5754.
- Monkawa, A., Ikoma, T., Yunoki, S., Ohta, K. and Tanaka, J. (2007): Collagen coating on hydroxyapatite surfaces modified with organosilane by chemical vapor deposition (CVD) method. *J. Nanosci. Nanotech.*, **7**, 833–838.
- Mouroux, A., Zhang, S.L., Petersson, C.S., Palmans, R., Maex, K., Ahlgren, T. and Keinonen, J. (1998): An experimental study of chemical vapour deposition of tungsten on Ti/TiN adhesion bilayers: mechanical properties. *Surf. & Coat. Tech.*, **99**, 274–280.
- O'Connor, S.M., DeAnglis, A.P., Gehrke, S.H. and Retzinger, G.S. (2000): Adsorption of plasma proteins on to poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide) triblock copolymer films: a focus on fibrinogen. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **31**, 185–196.
- Rodahl, M., Höök, F., Fredriksson, C., Keller, C.A., Krozer, Brzezinski, A.P., Voinova, M. and Kasemo, B. (1997): Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. *Faraday Discuss.*, **107**, 229–246.
- Sit, P.S. and Marchant, R.E. (1999): Surface-dependent conformations of human fibrinogen observed by atomic force microscopy under aqueous conditions. *Thromb. Haemostasis*, **82**, 1053–1060.
- Stayton, P.S., Drobny, G.P., Shaw, W.J., Long, R. and Gilbert, M. (2003): Molecular recognition at the protein-hydroxyapatite interface. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **14**, 370–376.
- Sugimura, H., Hozumi, A., Kameyama, T. and Takai, O. (2002): Organosilane self-assembled monolayers formed at the vapour/solid interface. *Surf. Inter. Anal.*, **34**, 550–554.
- Svedhem, S., Dahlborg, D., Ekeröth, J., Kelly, J., Hook, F. and Gold, J. (2003): In situ peptide-modified supported lipid bilayers for controlled cell attachment. *Langmuir*, **19**, 6730–6736.
- Ta, T.C., Sykes, M.T. and McDermott, M.T. (1998): Real-Time Observation of Plasma Protein Film Formation on Well-Defined Surfaces with Scanning Force Microscopy. *Langmuir*, **14**, 2435–2443.
- Trabelsi, W., Dhouibia, L., Triki, E., Ferreirab, M.G.S. and Montemor, M.F. (2005): An electrochemical and analytical assessment on the early corrosion behaviour of galvanised steel pretreated with aminosilanes. *Surf. & Coat. Tech.*, **192**, 284–290.
- Tsai, W., Grunkemeier, J.M. and Horbett, T.A. (1999): Human plasma fibrinogen adsorption and platelet adhesion to polystyrene. *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 130–139.
- Wang, C., Chen, Z., Guan, L., Liu, Z., Wang, P., Zheng, S. and Liao, X. (2000): Structural characterization of ion beam sputter deposited calcium phosphate coatings. *Surf. Coat. Tech.*, **130**, 39–45.
- Wei, M., Ruys, A.J., Milthorpe, B.K. and Sorrell, C.C. (2005): Precipitation of hydroxyapatite nanoparticles: Effects of precipitation method on electrophoretic deposition. *J. Mater. Sci.-Mater. M.*, **16**, 319–324.
- Werner, C., Eichhorn, K., Grundke, K., Simon, F., Grahler, W. and Jacobasch, H. (1999): Insights on structural variations of protein adsorption layers on hydrophobic fluorohydrocarbon polymers gained by spectroscopic ellipsometry (part I). *Colloids Surf., A*, **156**, 3–17.
- Zhitomirsky, L. and GAL-OR, L. (1997): Electrophoretic deposition of hydroxyapatite. *J. Mater. Sci.-Mater. M.*, **8**, 213–219.