骨類似ナノアパタイトをコーティングした 高分子微小球の創製

Preparation of polymeric microspheres coated with bone-like nanoapatite

05101

研究者 東北大学特定領域研究推進支援センター

准教授 川 下 将 一 Masakazu Kawashita

Bioactive polymeric microspheres can be produced by coating with a calcium silicate solution and the subsequent soaking in a simulated body fluid (SBF). Such combination should allow for the development of bioactive microspheres for several applications in the medical field including tissue engineering. Four types of polymeric microspheres with different sizes were used: (i) ethylene-vinyl alcohol co-polymer ($20\text{--}30\text{ }\mu\text{m}$), (ii) polyamide 12 with 10% of hematite ($100\text{ }\mu\text{m}$), (iii) polyamide 12 ($10\text{--}30\text{ }\mu\text{m}$) and (iv) polyamide 12 ($300\text{ }\mu\text{m}$). These microspheres were soaked in a calcium silicate solution at 36.5°C for different periods of time under several conditions. Afterwards, they were dried in air at 60 and 100°C for 24 hrs. Then, the samples were soaked in SBF for 1, 3 and 7 days. Fourier transformed infrared spectroscopy, thin-film X-ray diffraction, and scanning electron microscopy showed that after the calcium silicate treatment and the subsequent soaking in SBF, the microspheres successfully formed a apatite layer on their surfaces in SBF within 7 days due to the formation of silanol (Si-OH) groups effective for apatite formation.

研究目的

表面に骨類似アパタイト層を被覆した高分子微小球は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) における薬物担体や注射器で注入可能な骨セメントのフィラーなどとしてきわめて有用である。しかし、高分子微小球の表面に均一な骨類似アパタイトを形成させる手法は、国内外を問わず、未だ確立されていない。一方、水酸アパタイトのみからなる球状粒子が既に提案されているが、その比重がやや大きいため、用途が限定される。また、水酸アパタイトの組成や構造は生体骨中のアパタイトのそれらと若干異なるので、より生体親和性に優れた表面を有する微小球が求められている。そこで、本研究は、種々の高分子微小球の表面にカルシウムシリケート (CS; CaO-SiO_2) のゲル層を均一

に被覆し、これをヒトの体液とほぼ等しい無機イオン濃度を有する擬似体液 (SBF) に浸漬する手法により、表面にナノサイズの骨類似アパタイトが均一に被覆された高分子微小球を創製することを目的とする。

研究成果の概要

1. 緒言

水酸アパタイトは、骨や歯の無機成分であり¹⁻³⁾、しばしば骨修復材料や骨伝導材料として用いられている⁴⁾。その優れた生体親和性¹⁻³⁾と硬組織や軟組織との適合性⁵⁾により、水酸アパタイトは、この数十年間、様々な形状で用いられてきた。また、骨とアパタイトとの界面を詳細に解析すると、同界面は生体骨のリモ

デリング部位で見られるセメント線と形状的に似通っていることが明らかとなった⁶⁾。以上のように、その優れた骨伝導材料としての物理化学的特性および生物学特性のため、最近では、水酸アパタイトだけでなく、バイオガラス[®]、三リン酸カルシウムなどといったリン酸カルシウム系セラミック材料を薬剤徐放システムへ応用する可能性が検討され始めてきた⁷⁾。

骨修復分野においては、これらのリン酸カルシウム系セラミック材料は、通常、粉状あるいはバルク体として用いられる⁸⁾。粉状のセラミック材料は、複雑な形状の骨欠損部に埋入できるという利点を有するが、骨組織の成長が始まるより以前での埋入部位からの逸脱や、逸脱に伴う目的部位への治療薬剤の不到達といった問題点もある^{8,9)}。また、バルク体では、複雑形状の骨欠損部への充填が困難であるという問題点がある¹⁰⁾。これらの問題点を解消するには、骨伝導を示しつつ、その場での治療薬剤の溶出をも実現する新たな材料を見出す必要がある。

一方、高分子微小球は、抗がん剤、生理活性物質、抗生物質、抗菌剤等の担体として様々な医療分野で用いられている¹¹⁾。さらに、骨修復の分野で高分子微小球を用いれば、同微小球は患部に注入可能な生体材料を設計する上で有用であると期待される¹²⁾。また、強磁性体を含む高分子微小球は、交流磁場の元に置かれると発熱するので、体内深部のがんの温熱療法に有用であると期待される。このような新規な微小球を設計するには、微小球の表面を適当な官能基等により修飾する必要がある。さらに、生体骨と骨伝導材料表面との強固な結合も必要である。もし高分子微小球の表面をアパタイト層でコートすることができれば、同微小球は骨伝導を示しつつ、薬剤の徐放性をも併せ示すと期待される。

これまでに、高分子表面に形成されたシラノール(Si-OH)基が、ヒトの体液とほぼ等しい無機イオン濃度を有する擬似体液(SBF)中でアパタイトの核形成を誘起することが既に明らかになっている¹³⁻¹⁵⁾。また、シランカップリング処理後、カルシウムシリケート(CS; CaO-SiO₂)溶液処理したエチレン-ビニルア

ルコール共重合体(EVOH)をSBFに浸漬すると、その表面に骨類似アパタイト層が形成されることが明らかとなっている^{16,17)}。しかし、生体活性な高分子微小球を得るには至っていない。そこで本研究では、高分子微小球をCS溶液に浸漬し、さらにこれをSBFに浸漬する方法により、骨伝導を示しつつ、薬剤の徐放性をも併せ示す生体活性微小球を得ることを試みた。

2. 実験方法

2.1 高分子微小球

本研究では、以下のような、異なった粒径を有する4種類の高分子微小球を用いた。

- (1) 粒径の20~30 μm のエチレン-ビニルアルコール共重合体微小球(EVOH)
- (2) 粒径100 μm の、ヘマタイト(Fe₂O₃)を10%含むポリアミド12微小球(Fe₂O₃-PA100)
- (3) 粒径10~30 μm のポリアミド12微小球(PA10-30)
- (4) 粒径300 μm のポリアミド12微小球(PA300)

2.2 カルシウムシリケート(CS)溶液処理

テトラエトキシシラン(TEOS: Si(C₂H₅)₄)、超純水(H₂O)、エタノール(C₂H₅OH)、1.0 M-塩酸(HCl)および塩化カルシウム(CaCl₂)を氷浴中で10分間混合し、CS溶液を作製した。CS溶液は、表1に示するような2種類のモル比のものを作製した。

条件Iでは、2.1の種々の高分子微小球を36.5℃のCS-1溶液に毎分120回転の速度で2時間浸漬し、条件IIでは、168時間前に作製しておいたCS-2に高分子微小球を毎分120ストロークの速度で5分間浸漬した。その後、試料をろ過し、60および100℃で24時間乾燥させた。

2.3 擬似体液(SBF)への浸漬

2.2で得られた微小球をヒトの体液とほぼ等しい無機イオン濃度(Na⁺ 142.0, K⁺ 5.0, Ca²⁺ 2.5, Mg²⁺ 1.5, Cl⁻ 147.8, HCO₃⁻ 4.2, HPO₄²⁻ 1.0, SO₄²⁻ 0.5mM)を有する、36.5℃の擬似体液(SBF) 20mL中に置き、毎分120ストロークの速度で7日間までの種々の期間浸漬した。その後、試料をSBFから取り出し、蒸留水で洗浄し、

表1 カルシウムシリケート(CS)溶液の組成(モル比)

作製条件	TEOS	H ₂ O	C ₂ H ₅ OH	HCl	CaCl ₂
条件I	1.0	4.0	4.0	0.014	0.20
条件II	1.0	2.0	1.0	0.014	0.20

クリーンベンチ内で乾燥させた。

2.4 構造解析

2.3のCS処理前後の高分子微小球表面の構造変化を、エネルギー分散型X線分析装置(EDS)付走査型電子顕微鏡(SEM)、薄膜X線回折(TF-XRD)およびフーリエ変換赤外全反射分光法により調べた。また、試料浸漬に伴うSBFの元素濃度変化を高周波誘導結合プラズマ発光分析法(ICP)により調べた。

3. 結果

3.1 CS処理による微小球の表面構造変化

図1に条件IおよびIIでCS処理した微小球のFT-IRスペクトルを示す。いずれの条件の場合も、CS層がコートされていることが分かる。CS処理後、シリカゲルに特有の水酸(OH)基およびシラノール(Si-OH)

基に加え、シロキサン(Si-O-Si)結合に帰属されるピークも観察された。これは、TEOSが加水分解および重縮合してそれぞれSi-OH基およびSi-O-Siネットワークを形成したためと考えられる。Si-O-SiおよびSi-OHのピーク強度は、条件Iよりも条件IIの方が大きくなった。Si-O-Si結合の増加は、コーティング層の高い気孔率に関係していると考えられる¹⁸⁻²⁰⁾。さらに、 3336cm^{-1} から 3360cm^{-1} 付近に見られるOH基のピーク強度についても、条件Iよりも条件IIの方が大きくなった(データは省略)。これは、TEOSが完全に加水分解され、Si-OH基を形成したためと考えられる。

3.2 SBF浸漬による微小球の表面構造変化

図2に、条件IあるいはIIでCS処理後、SBFに7日間浸漬した種々の高分子微小球表面のTF-XRDパターンを示す。何れの試料の場合も、CS処理によっては微小球の表面構造は変化せず、未処理と同様の

図1 条件IあるいはIIでCS処理した種々の高分子微小球のFT-IRスペクトル

図2 条件IあるいはIIでCS処理後、SBFに7日間浸漬した種々の高分子微小球のTF-XRDパターン

図3 条件IあるいはIIでCS処理後, SBFに種々の期間浸漬したPA-300のSEM-EDSプロファイル

図4 条件IあるいはIIでCS処理後, SBFに種々の期間浸漬したFe₂O₃-PA100のSEM-EDSプロファイル

図5 条件IあるいはIIでCS処理後, SBFに種々の期間浸漬したEVOH(a)あるいはPA10-30(b)のSEM-EDSプロファイル

TF-XRDパターンが観察された。また, Fe₂O₃-PA100においては, CS処理後にはヘマタイトに帰属されるピークは観察されなくなった。これは, 微小球表面が完全にCS層で覆われたためである。SBFに7日間浸漬した微小球のTF-XRDパターンでは, 何れのCS処

理条件の場合も, アパタイトに帰属されるピークが観察された。

図3～5に, 条件IあるいはIIでCS処理後, SBFに浸漬した種々の高分子のSEM写真およびEDSスペクトルを示す。CS処理後, 微小球表面に平滑な層が

形成されていることが分かる。図1および図3～5に示したFT-IRおよびEDS測定の結果によれば、この層はカルシウムシリケートであると考えられる。また、条件IIで作製したCS層は膜厚で多孔構造を有していた。条件IIでCS処理した場合は、何れの微小球も、図3～5に示すように、SBF浸漬1日以内に微細な針状結晶からなるアパタイト層を形成した。しかし、条件IでCS処理した微小球については、図3(a)に示すように、PA-300だけが、SBF浸漬3日以内にその表面にアパタイト層を形成した。このアパタイト形成能の違いは、条件IおよびIIでの、CS溶液の加水分解および重縮合の進行度の違いによるものと考えられる。

条件IでCS処理したPA-300は、SBF浸漬3日以内にその表面にアパタイト層を形成したが、図2(a)のTF-XRDパターンから推察されるように、このアパタイト層は薄く、緻密ではなかった。Fe₂O₃-PA100については、図4(a)に示すように、SBF浸漬7日後にもアパタイトは形成されなかった。一方、条件IIでCS処理したPA-300、Fe₂O₃-PA100、EVOHおよびPA10-30は、図3(b)、4(b)、5(a)および5(b)に示すように、SBF浸漬1日以内にその表面に緻密なアパタイトを形成した。また、PA10-30微小球表面に形成されたアパタイトは、他の微小球表面に形成されたアパタイトに比べて、あまり緻密ではなかった。さらに、EVOH表面に形成されたアパタイト層は緻密であったが、CS処理およびSBF浸漬による微小球の凝集が顕著に見られた。

EDS測定によれば、図3(a)に示すように、条件IでCS処理後、SBFに3日間浸漬したPA-300の表面に

はカルシウムやリンに帰属されるEDSピークが検出された。条件IあるいはIIでCS処理したFe₂O₃-PAでは鉄に帰属されるEDSピークが検出され、このことは図2(c)に示したTF-XRD測定の結果と矛盾しない。条件IIでCS処理した微小球では、カルシウムとリンの顕著なピークが観察された。また、図3(b)、4(b)、5(a)及び5(b)に示すように、条件IIでCS処理した他の微小球では、EDS測定により、SBF浸漬わずか1日後にもカルシウムとリンのピークが確認され、SBF浸漬期間が長くなるにつれ、これらのピーク強度は著しく高くなった。しかし、条件IIでCS処理したPA10-30では、SBF浸漬1日後にカルシウムとリンのEDSピークは検出されたものの、それらの強度は浸漬7日後にも増大しなかった。

以上のEDSおよびFT-IR測定の結果から、表面にカルシウムイオンおよびSi-OH基を多量に有するCS層が何れの微小球上にも形成されたことが分かった。また、ケイ素のEDSピーク強度は、条件Iよりも条件IIでCS処理した微小球の方が大きかった。

図6に、条件IあるいはIIでCS処理した種々の微小球からSBF中に溶出したカルシウム、リンおよびケイ素の濃度を示す。条件IおよびIIで処理したPAおよびFe₂O₃含有PA微小球において、カルシウム濃度は浸漬初期に増大し、その後減少したが、リン濃度は浸漬期間が長くなるにつれ、徐々に減少した。カルシウム濃度の上昇は試料表面からのカルシウムイオンの溶出によるものであり、その後のカルシウムおよびリン濃度の減少はアパタイトの核形成および成長によるものである。また、何れの試料の場合も、ケイ素濃度の上昇が観察された。これは、CS層からのケイ素の溶

図6 条件IあるいはIIでCS処理した種々の高分子微小球の浸漬によるSBFのカルシウム、リンおよびケイ素の濃度変化

出によるものであり、ケイ素溶出の結果、アパタイトの核形成に有効なSi-OH基が試料表面に形成する。シリカゲルあるいはカルシウムシリケートゲルの溶解はシリカの水和反応により生じる^{14,15)}ので、試料表面に形成されるSi-OH基の量は、SBFへのシリカの溶出速度によって説明される。

4. 考察

図2～5に示すように、条件ⅡでCS溶液処理した微小球はSBF中で1日以内にアパタイトを形成した。しかし、図6に示すように、これらの微小球表面ではSBF浸漬初期のうちに多量のリンイオンが消費されるので、そのアパタイト層はきわめて薄く、浸漬期間が長くなっても膜厚はあまり増大しなかった。

図1に示すように、アパタイトの核形成に有効なSi-OH基の数は、CS溶液のH₂O/TEOS比に関わらず、ほぼ一定であったが、CS溶液のH₂O/TEOS比が減少すると、ゲル化時間が短くなると考えられる²⁶⁾。従って、条件ⅡのCS溶液は高い粘度を有し、結果として均一なCS層が微小球表面に形成されたと考えられる。さらに、高いゲル化速度が多孔構造を与える²⁷⁾ので、図3および4に示したように、条件Ⅱで得られたCS層は条件Ⅰよりも多孔質な構造を有している。これらの結果は、条件ⅡにおいてSi-O-Siピークの強度が高かったという、FT-IR測定の結果(図1(a)および(b))と矛盾しない。アパタイトの核形成に関しては、シリカゲルの多孔構造が好ましいことが既に明らかになっている^{22,23,28)}。もし気孔が核形成サイトになるのであれば、気孔内部のイオン濃度は表面のイオン濃度よりも高く、不均一核形成に要する過飽和な状態が気孔内部においてより達成されやすくなる²⁸⁾。以上より、条件Ⅱで作製したCS層では、条件Ⅰで形成したCS層よりも、アパタイトの核形成に要する期間が短くなったと考えられる。ICPの結果から、条件Ⅱで作製したCS層からのSiの溶出量は、条件Ⅰで作製したCS層からのそれよりも高かった。これらの結果は、試料表面での多量のSi-OH基の形成以外に、形成プロセスに依存して変化するCS層の構造がアパタイト形成能に影響を及ぼしていることを示唆している。コーティング層の形状特性に起因する核形成サイトの数や気孔内へのイオンの拡散は核形成速度を制御するパラメータである²⁸⁾ので、多孔構造はアパタイト核の形成の誘導期間を短縮し得ると考えられる。

CS層を形成させた微小球をSBFに浸漬すると、CS層からカルシウムイオンが溶出し、CS層表面にSi-OH基が形成されると同時に、溶出したカルシウムイオンが周囲の液のアパタイトに対する過飽和度を高める。Si-OH基はアパタイトの核形成を誘起し、カルシウムイオン溶出により高められた過飽和度はアパタイトの核形成を促進する。SBFはアパタイトに対して既に過飽和な状態にあるので、一旦アパタイト核が試料表面に形成されると、それは周囲の液からカルシウムイオンやリン酸イオンを取り込み、自然に成長する²⁹⁾。このことは、SBFのカルシウムおよびリンの濃度変化測定の結果(図6)から示唆される。このようにして得られた高分子微小球は、骨修復分野だけでなく、骨感染症を予防・治療する抗生物質の担体などとしても有用であると期待される。

5. まとめ

高分子微小球をH₂O/TEOS比が2/1のカルシウムシリケート溶液で処理した後、SBF浸漬に1日間浸漬すれば、同微小球表面に骨類似アパタイト層を均一にコートできることが分かった。また、本方法によれば、その表面にカルシウムイオンとSi-OH基を多量に有する、多孔質なカルシウムシリケート層が形成されることが分かった。このようにして得られた、高いアパタイト形成能を有する高分子微小球は、骨修復および骨再生分野において有用であると期待される。

今後の研究の見通し

本研究により、高分子微小球に骨類似アパタイトをコートする手法に関する基礎的知見が得られた。しかし、一部の高分子微小球においては、カルシウムシリケート処理および擬似体液浸漬中に微小球の凝集が生じた。今後、カルシウムシリケート処理および擬似体液浸漬プロセスを更に改良することにより、単分散の骨類似アパタイト被覆高分子微小球を得る条件を見出すことが必要である。このような製造プロセスの改良により所望の骨類似アパタイトコート高分子微小球が得られれば、同微小球の骨修復材料としての有効性を動物実験等により確かめることも必要であると思われる。

参考文献

- 1) H. Aoki. Science and medical applications of hydroxyapatite. Tokyo: Takayama Press System Centre Co., Inc; 1991.
- 2) A. S. Posner, The mineral of bone. Clin Orthop Rel Res 1985; 200: 87-99.
- 3) H. Suh, Recent advances in biomaterials. Yonsei Med J 1998; 39: 87-96.
- 4) L. L. Hench, Biomaterials: a forecast for the future. Biomaterials 1998; 19: 1419-23.
- 5) K. A. Gross and C. C. Berndt, Thermal processing of hydroxyapatite for coating production. J Biomed Mater Res 1998; 39: 580-7.
- 6) J. E. Davies and N. Baldan, Scanning electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. J Biomed Mater Res 1997; 36: 429-40.
- 7) P. K. Bajpai and H. A. Benghuzzi, Ceramic systems for long-term delivery of chemicals and biologicals. J Biomed Mater Res 1988; 22: 1245-66.
- 8) M. Sivakumar and K. Panduranga Rao, Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres. Biomaterials 2002; 23: 3175-81.
- 9) C. V. Ragel and M. Vallet-Regi, In vitro bioactivity and gentamicin release from glass-polymer-antibiotic composites. J Biomed Mater Res 2000; 51: 424-9.
- 10) M. Sivakumar, I. Manjubala and K. P. Rao, Preparation, characterization and in-vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-chitosan composite microspheres. Carbo Polym 2002; 49: 281-288.
- 11) L. Nobs, F. Buchegger, R. Gurny and E. Allemann, Surface modification of poly (lactic acid) nanoparticles by covalent attachment of thiol groups by means of three methods. Int J Pharm 2003; 250: 327-337.
- 12) T. J. Wu, H. H. Huang, C. W. Lan, C. H. Lin, F. Y. Hsu and Y. J. Wang, Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. Biomaterials 2004; 25: 651-8.
- 13) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. J Biomed Mater Res 1990; 24: 721-34.
- 14) P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, T. Nakamura and T. Yamamuro, Process of Formation of Bone-Like Apatite Layer on Silica-Gel. J Mater Sci: Mater Med 1993; 4: 127-131.
- 15) P. Li, X. Ye, I. Kangasniemi, J. M. de Blieck-Hogervorst, C. P. Klein and K. de Groot, In vivo calcium phosphate formation induced by sol-gel-prepared silica. J Biomed Mater Res 1995; 29: 325-8.
- 16) A. Oyane, M. Kawashita, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto and T. Nakamura, Bonelike apatite formation on ethylene-vinyl alcohol copolymer modified with a silane coupling agent and titania solution. J Ceram Soc Japan 2002; 110: 248-254.
- 17) A. Oyane, M. Minoda, T. Miyamoto, R. Takahashi, K. Nakanishi, H. M. Kim, T. Kokubo and T. Nakamura, Apatite formation on ethylene-vinyl alcohol copolymer modified with silanol groups. J Biomed Mater Res 1999; 47: 367-73.
- 18) R. M. Almeida, T. A. Guiton and C. G. Pantano, Characterization of silica gels by infrared reflection spectroscopy. J Non-Cryst Solids 1990; 121: 193.
- 19) A. Fidalgo and L. M. Ilharco, The defect structure of sol-gel-derived silica/polytetrahydrofuran hybrid films by FTIR. J Non-Cryst Solids 2001; 283: 144-154.
- 20) A. Fidalgo and L. M. Ilharco, Thickness, morphology and structure of sol-gel hybrid films: I - The role of the precursor solution's aging. J Sol-Gel Sci Tech 2003; 26: 363-367.
- 21) S. B. Cho, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakamura, T. Kitsugi and T. Yamamuro, Dependence of apatite formation on silica gel on its structure: effect of heat treatment. J Am Ceram Soc 1995; 78: 1769-1774.
- 22) S. B. Cho, F. Miyaji, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga and T. Nakamura, Apatite formation on silica gel in simulated body fluid: effects of structural modification with solvent-exchange. J Mater Sci Mater Med 1998; 9: 279-84.
- 23) S. B. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki and T. Nakamura, Apatite formation on silica gel in simulated body fluid: its dependence on structures of silica gels prepared in different media. J Biomed Mater Res 1996; 33: 145-51.
- 24) P. Li, K. Nakanishi, T. Kokubo and K. de Groot, Induction and morphology of hydroxyapatite, precipitated from metastable simulated body fluids on sol-gel prepared silica. Biomaterials 1993; 14: 963-8.
- 25) P. J. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, T. Nakamura and T. Yamamuro, Apatite Formation Induced by Silica-Gel in a Simulated Body-Fluid. Journal of the American Ceramic Society 1992; 75: 2094-2097.
- 26) C. J. Brinker and G. W. Scherer. Sol-Gel Science ? The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. San Diego: Academic Press, Inc.; 1990.

発表論文

- 27) E. F. Vansant, P. Van Der Voort and K. C. Vrancken.
Characterization and chemical modification of the
silica surface. Amsterdam: Elsevier; 1995.
- 28) M. M. Pereira, A. E. Clark and L. L. Hench, Effect of
texture on the rate of hydroxyapatite formation on
gel-silica surface. J Am Ceram S °C 1995; 78:
2463-2468.
- 29) H.-M. Kim, Bioactive ceramics: challenges and
perspectives. J Ceram S°C Japan 2001; 109: S49-S57.
- 1) I. B. Leonor, F. Balas, M. Kawashita, R. L. Reis, T.
Kokubo and T. Nakamura, Biomimetic apatite
formation on different polymeric microspheres
modified with calcium silicate solutions. Key Eng.
Mater., 309-311, 279-282 (2006).
- 2) I. B. Leonor, F. Balas, M. Kawashita, R. L. Reis, T.
Kokubo and T. Nakamura, Apatite deposition on
polymeric microspheres treated with calcium silicate
solution in simulated body fluid. J Biomed Mater Res,
submitted.