シランカップリング剤によるバイオセラミックスの表面改質とその評価

西澤かおり・鈴木高広*・河本ゆかり・鳥山素弘・横川善之・永田夫久江・多井 豊・亀山哲也

名古屋工業技術研究所, 462-8510 愛知県名古屋市北区平手町 1-1

*東京理科大学, 278-8510 千葉県野田市山崎 2641

Surface Modification of Bioceramics by Silane Coupling Agent and Their Evaluation

Kaori NISHIZAWA, Takahiro SUZUKI*, Yukari KAWAMOTO, Motohiro TORIYAMA**,
Yoshiyuki YOKOGAWA, Fukue NAGATA, Yutaka TAI*** and Tetsuya KAMEYAMA

National Industrial Research Institute of Nagoya, 1-1, Hirate-cho, Kita-ku, Nagoya-shi, Aichi 462-8510

*Science University of Tokyo, 2641, Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278-8510

The surface of β -tricalcium phosphate ceramics (β -TCP) was modified by exposing ceramic disks to a silane coupling agent for different periods of time. The number of organic groups introduced was determined as a function of exposure time. These results suggest that zeta potential, cell adhesion and growth, and adsorbed protein concentration can carefully be controlled by silane treatment.

[Received March 11, 1998; Accepted May 19, 1998]

Key-words: Surface modification, Bioceramics, Zeta potential, Silane coupling agent, L929 cell adhesion and growth, Protein adsorption

1. 緒 言

セラミックスをバイオマテリアルとして利用するためには、良好な生体親和性を示すことが重要となる。骨や歯の無機主成分である水酸アパタイト (HAp) やリン酸三カルシウム (TCP) 等のリン酸カルシウムセラミックスは、生体との親和性に優れた材料として注目を集めている。

これまでに、このようなセラミックスの表面粗度や表面組成、又はその結晶性と骨付着力、骨形成能との関係について、in vivo での研究成果が数多く報告されている。例えば、HAp の結晶性と骨形成能の関係においては、結晶性が低い場合の方が初期の骨形成能が良好であると報告されている¹⁾。また、HAp、リン酸四カルシウム (TeCP)、 α -TCP のような組成の違う3種類のリン酸カルシウムセラミックスの骨形成能、ならびに骨付着力との関係においては、骨との付着強度は HAp > TeCP > α -TCP の順になること、更に、HAp と TeCP は優れた骨形成能を示すが、 α -TCP は骨との接触が不十分であることが明らかにされている²⁾。これはセラミックスの溶解性の差異に基づくものであると考察されている。更に、表面がなめらかな材料よりも表面が粗い材料の方が骨との付着強度が強いことも報告されている³⁾。

このように、生体親和性は材料表面と生体との間の相互作用によって決まる。既に、リン酸カルシウムセラミックスの表面層は水溶液中で溶けだし、その表面特性が変化することが報告されており、リン酸カルシウム系セラミックスの骨形成促進効果には、表面の溶解性やイオン性が大きく関与していることが示唆されている⁴⁾。更に、HAp の表面溶解性が結合組織や骨組織再生に効果的であることを組織化学的な観点から示唆する報告もある^{5)~7)}。同様に、バイオアクティブなガラス生体材料の場合でも、表面構造の変化が細胞付着性・増殖性に影響を及ぼすことや、表面の溶出成分が結合組織の付着性を低下させることが報告されている⁸⁾。

一方、著者らは HAp と β -TCP の組成比を段階的に調整した複合焼結体を用いて、両者の組成比が細胞の付着性・増殖性に影響を与えることを明らかにし、材料表面の溶解性や濡れ性

と密接に関係するものと考察した^{9),10)}。そこで、細胞の付着や増殖に対するセラミックス担体の濡れ性やゼータ電位の効果を系統的に調べるために、リン酸カルシウムセラミックスの表面を化学的に改質し、表面の濡れ性が高い担体ほど、また、より大きなマイナスのゼータ電位を示す担体ほど細胞の初期付着率が高くなる傾向があることを明らかにした^{11),12)}。このようなセラミックス担体の濡れ性は、表面層における水酸基密度と相関関係があることを光電子分光法により明らかにした¹³⁾。これらの結果から、HAp-TCP の表面特性は表面の溶解性に依存した構造変化による影響が大きく、表面構造が安定な場合に細胞の付着性が促進されるということが明らかになった^{14),15)}。

以上のように、リン酸カルシウム系材料の表面特性が細胞の挙動に重要な役割を果たしていることは明らかとなりつつあるが、材料の表面特性と生体親和性や骨誘導性との関係はまだまだ十分には解明されていない。より優れた生体材料を開発するためには、材料の表面を分子レベルで設計した材料を用いて細胞に及ぼす効果を明確に示す必要がある。そこで本研究では、化学的手法により β -TCP の表面を定量的に改質する方法について検討を行った。

2. 実 験

2.1 セラミックスの表面改質と表面分析及び表面特性評価

円板状の β -TCP セラミックス (直径30 mm, 厚さ1 mm, オリンパス光学工業製)、及びこれを粉砕して作った粉体を乾燥トルエン中、120°Cのオイルバス中でシランカップリング剤 LS1090 (化学式: $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$, 信越化学工業製) とともに、反応時間を段階的に設定し、加熱還流した。試料を汙別後、トルエンで洗浄、80°Cの乾燥器で24h 乾燥した。これを170°Cで2h 乾熱滅菌し、細胞培養に供した。

試料中の炭素含有量を炭素分析装置 (LECO 社製, WR-12) を用いて測定し、比表面積測定装置 (Micromeritics 社製, Flow Sorb II 2300) を用い、BET 法により比表面積を求めた。これらの値をもとに試料1 cm²当たりの表面に導入された有機官能基の数と、この反応の反応速度定数を計算によって

求めた。

走査型プローブ顕微鏡 (Digital Instruments 社製, Nano Scope III) を用いて, 改質したセラミックス担体表面の原子間力顕微鏡 (AFM) 観察を行った。

セラミックス担体のゼータ電位の測定は, 粉末試料を用いて pH 7, 25°C のときの値を測定した。

2.2 細胞培養

10% の牛胎児血清 (FBS) を含むイーグル MEM 培地を用い, マウス結合組織由来 L929 細胞を 6.5×10^4 cells/cm² の密度になるように表面改質したセラミックス担体上に播種した。これを 37°C, 5% 濃度の CO₂ インキュベーター中で培養し, 先に報告した方法¹⁰⁾ で細胞初期付着率 (R_{ia}), 細胞の付着力 ($F_{a.enz}$) を求めた。 R_{ia} , $F_{a.enz}$ の定義は次のとおりである。

$$R_{ia}(\%) = 100 \times N_{a.cell} / N_{t.cell}$$

$$F_{a.enz}(\%) = 100 \times (1 - N_{r.cell} / N_{t.cell})$$

ここで, $N_{a.cell}$ は担体に付着した細胞の数, $N_{t.cell}$ は総細胞数を表す。 $N_{r.cell}$ はトリプシンを加えて 10 min 後にはがれた細胞の数である。また, 細胞初期付着率は培養 1h 後, 細胞の付着力は 3d 後の測定値により算定した。

また, 培養 1h 後, 7d 後に L929 細胞がこれら担体上に付着している様子を走査型電子顕微鏡 (SEM; 日立 S-2300S 型) を用いて観察した。

2.3 培地中におけるセラミックスの挙動

おのおのの担体を 10% FBS を含む培地 3 ml 中に浸漬し, 37°C で, 1, 24, 46, 71, 88h 静置した。静置後, 上澄みを集め, 誘導型プラズマ発光分析装置 (セイコー電子製, ISM-7000S 型 ICP) を用いて, その中に存在する Ca²⁺, PO₄³⁻ 濃度を求めた。また, 一定時間静置後の各担体を 3 ml の PBS で 3 回ずつ洗浄し, これに 2 ml の 0.5 N NaOH 水溶液を加えて 37°C で 10 min 静置, 担体表面に吸着した血清タンパク質を溶解させた。このようにして得たアルカリ溶液中のタンパク質濃度をローリー法¹⁶⁾ によって求めた。

また, 培地浸漬前, 浸漬 1h 後, 7d 後の担体表面の SEM 像を観察した。また, X 線マイクロアナライザー (堀場製作所製, EMAX-2200) を用いた元素分析, 及び光電子分光法 (XPS; Kratos 製, XSAM-800) により担体表面の Ca と P の比を求めた。XPS の X 線源には Mg K α 線を用い, 印加電圧 15 kV, 印加電流 10 mA の測定条件で分析した。更に, モノクロメーターにより単色化した Cu K α 線, 印加電圧 40 kV, 印加電流 20 mA, 走査速度 2°/min の測定条件で, 培地浸漬前, 浸漬 1h 後, 7d 後の担体の表面結晶相を薄膜 X 線回折法 (マックスイエンス製, MXP³) により同定した。

3. 結果と考察

図 1 に, 改質時間と表面に導入された有機官能基数との関係を示した。改質時間とともに表面に導入される有機官能基数は多くなっており, 20h を超えるころには一定の導入量を示すようになった。また, この改質反応は最初の数時間で速く, その後徐々に遅くなっていた。

この改質反応の速度式は以下のようにして求めた。すなわち, この反応が (1) 式で表される単純な 2 分子反応であると仮定すると (2) 式に示した関係が成り立つ。

ここで, CR: シランカップリング剤

RS: セラミックス表面の活性サイト

PT: 生成物

Fig. 1. The number of the organic groups introduced on the calcium phosphate ceramics modified with LS1090 as a function of modification time.

k : 反応速度定数

$$[PT] = [RS]_0 (1 - e^{-[CR]_0^k t}) \quad (2)$$

ここで, $[CR]_0$: CR の初期濃度

$[RS]_0$: RS の初期値

$[PT]$: t 時間反応後の PT の生成量

(2) 式をもとに最小二乗法を用いて反応時間と生成物の濃度の関係をプロットしたところ, 図 2 に示したように $k=2.9$ mol⁻¹·l·h⁻¹ $\approx 1.0 \times 10^4$ mol⁻¹·l·s⁻¹ のときに, 実測値との良い一致がみられた。また, この反応における拡散反応の速度定数 (K_d) は, $K_d \approx 10^9 \sim 10^{10}$ mol⁻¹·l·s⁻¹ と求まる。この値は実測値のフィッティングから求めた反応速度定数と比較するとかなり大きいことから, この反応の律速過程は拡散反応ではなく, 反応可能距離内に入った後に起こる分子同士の反応過程にあると推定される。これまでに, 表面をフッ化水素 HF でエッチングしたシリコン単結晶とシランカップリング剤オクタデシルトリクロロシランとの反応において, 反応開始 30 min 以内で完全にシリコン表面が改質されるという報告例があるが¹⁷⁾, 今回の結果はこの反応と比較するとかなり遅いことが分かる。この反応で報告されているシリコン単結晶の表面には約 8×10^{-10} mol/cm² の水酸基が存在しており, この値は今回著者らが実験に用いた β -TCP の推定表面水酸基量約 5×10^{-10} mol/cm² の値とほぼ同じであった。それにもかかわらず, 反応速度に大きな違いが見られたのは, 両者の表面性状の差異に基づくものと考えられる。すなわち, 表面に多数の細孔を有する焼結体の β -TCP¹²⁾ では, シリコン単結晶表面に比べて反応

Fig. 2. The product yield as a function of reaction time. ■ Experimental data, — Theoretical fit.

の際の立体障害が大きくなるために、分子同士が会ってから反応するまでに時間がかかるものと推察された。また、この反応の際の立体障害は反応が進むほど大きくなると考えられるため、反応はますます遅くなっていくと考えられる。このように、多孔質材料の表面改質を行う場合には、その反応が遅いために改質時間を調整することで表面改質率を制御できることが分かった。

図3に改質したセラミックス担体のAFM観察像を示す。今回の改質反応に用いたセラミックスは、1辺が約570 nmの六方晶の粒子からなり、その粒界部が陥没していた。改質後のカップリング剤の導入量は、改質時間が長くなるほど多くなっており、図1の結果を支持していた。更に、反応に用いた改質剤はこのセラミックスの表面に均一には導入されておらず、この陥没部位に集中して入り込んでいる様子が観察された。また、導入された改質剤は、平均すると L 150 nm $\times$ W 100 nm $\times$ H 50 nm程度の大きさをしていて、現時点ではこの理由は明らかではないが、カップリング剤1分子の大きさから考えるとこの大きさはかなり大きな値となっているため、1分子ずつがその表面に均一に導入されていないことだけは明らかである。また、改質剤が陥没部位に選択的、もしくは優先的に導入されていく理由についても現時点では明らかではないが、陥没部位に集中的に導入されていくことが、反応速度が遅くなっている原因の一つになっているものと考えられる。

図4に改質時間とゼータ電位との関係を示した。今回用いた試薬の場合には、改質時間が長くなるに従ってゼータ電位の値が負側に増加していくことが分かった。この傾向は、有機官能基導入量の増加傾向に対応していることから、反応時間を調整することで表面に導入する有機官能基の数を制御することができ、セラミックスのゼータ電位値を制御できることが明らかとなった。

図5に、表面改質したセラミックス担体を用いてL929細胞を培養したときの表面改質時間と細胞の初期付着率 (R_{ia})、及び培養3d後に測定した細胞の付着力 ($F_{a.enz}$)との関係を示した。この結果より、改質時間が長い担体ほど R_{ia} の値が大きくなる傾向が見られた。これは、図4に示したセラミックスのゼータ電位の傾向と良い相関が見られ、ゼータ電位がより大きなマイナスの値を示す担体ほど R_{ia} が良くなるという結果を示

していた。一方、 $F_{a.enz}$ の値は、改質時間が9h, 18hのセラミックスのときに良好な値を示しており、ゼータ電位の傾向とは特別な相関は認められなかった。

ゼータ電位と細胞の付着との関係を図6に示した。培養初期の R_{ia} の値とゼータ電位との間には良い相関が見られるが、培養3d後の $F_{a.enz}$ の値とゼータ電位との間には特別な相関は認められない。表面のイオン結合性が高いセラミックス担体上に細胞が付着する場合には、初期の段階では静電的な力がより大きな効果を及ぼしているものと考えられるが、培養時間が長くなると静電的な相互作用以外の要因、例えば吸着蛋白質の関与の方がより大きな影響を及ぼしてくるものと考えられる¹¹⁾。

そこで、培地中の血清タンパク質の影響を検討するために、改質したセラミックス担体を10%FBSを含む培地中に浸漬し、その表面に吸着したタンパク質量の経時変化を調べた。結果を

Fig. 4. Zeta potential at 25°C and pH 7 for the calcium phosphate ceramics modified with LS1090 as a function of modification time.

Fig. 5. Initial cell anchoring ratio (R_{ia} , ●) and adhesive strength ($F_{a.enz}$, ○) for the calcium phosphate ceramics modified with LS1090 versus modification time.

Fig. 6. Initial cell anchoring ratio (R_{ia} , ●) and adhesive strength ($F_{a.enz}$, ○) plotted against zeta potential.

Fig. 3. AFM images of the calcium phosphate ceramics modified with LS1090. Modification time: 0h, 4h, 9h and 72h. Note increase of organic groups on the ceramic surface at 72h.

図7に示す。改質時間の違う担体同士で比較すると、改質した担体の場合にはいずれも未改質のものに比べて吸着量は多くなっており、特に、改質時間が9h, 18hの担体の場合にタンパク質の吸着量が多くなっていた。図5の $F_{a,enz}$ の結果と良い相関を示していることから、細胞の付着にはタンパク質の吸着が大きな影響を及ぼしているものと考えられる。また、各担体の吸着量の経時変化を見てみると、いずれも浸漬1h後における吸着量が一時的に多くなっており、その後いったん減少はするものの、後は経時的に増加していく傾向が見られた。

この原因を検討するために、改質したセラミックス担体を10%FBSを含む培地中に浸漬したときの培地中の Ca^{2+} 、及び PO_4^{3-} の濃度の経時変化を調べた。図8に結果を示す。いずれの担体の場合にも、浸漬1h後に Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 両イオン濃度が増加しており、担体表面からこれらのイオンが溶け出していることが推察された。その後、両イオン濃度も経時的に減少していることから、両イオンが再結合していることが予想される。図7の結果と併せて考えると、培地浸漬1h後にタンパク質の吸着量が一時的に増えているのは、担体表面から Ca^{2+} が大量に溶け出し、これが培地中のタンパク質をキレート的に捕捉、表面に吸着した結果ではないかと推察できる。またその後、いったん減少はするものの吸着タンパク質量が経時的に増加しているのは、 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} の再結合の結果、担体表面にHApが析出し、タンパク質が吸着しやすくなったためではないかと考えられる。更に、改質時間の違う担体同士で比較すると、わずかな差ではあるが改質時間が短い担体ほど浸漬1h後の両イオンの溶けだし量が多くなっている傾向が見られ、未改

質の担体の場合が一番多くなっていた。これは、有機官能基導入量の差異に基づくものと考えられ、導入量が多い担体ほど表面からのイオンの溶けだしは起こりにくいものと思われる。この結果は、図4に示したゼータ電位の結果と良い相関を示しており、表面の溶解性が担体のゼータ電位に大きく影響していることが推察される¹⁵⁾。すなわち、表面改質することによりそのゼータ電位値が変化するのは、導入された官能基の性質による影響ばかりでなく、官能基を導入することによって生じる表面の溶解性の変化が原因の一つになっていると推察できる。

培地中におけるTCP担体の表面状態を調べるために、培地浸漬前、浸漬1h、及び7d後の担体表面のSEM観察を行い、図9に結果を示した。SEM観察によると、浸漬1h後(図9(b))にはその表面が溶解し、浸漬前(図9(a))と比較すると粒界が少しはっきりと見えるようになっている。浸漬7d後(図9(c))には、浸漬前(図9(a))とはその表面状態がかなり変化している様子が観察され、新たな繊維状結晶の存在も確認された。

そこで、SEM/EDX、及びXPSを用いてこれら担体表面の元素分析を行い、表面のCaとPの比を求めた。結果を表1に示す。SEM/EDX、XPSどちらの測定においても、浸漬時間とともにCa:Pの比が大きくなっていることが分かり、その表面がTCP組成からHAp組成に変わってきているものと推測された。特に、SEM/EDXを用いて、浸漬7d後の担体表面に新たに認められた繊維状結晶のみのCa:P比を求めたところ、HAp組成に近い1.70であった。以上の分析結果から、培地中ではTCP担体表面は溶解し、その際に溶け出した Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} が新たに繊維状のHApとして析出してきているものと考えられた。

Fig. 7. Time-course of medium protein adsorption on calcium phosphate ceramics modified with LS1090 after soaking in 10% FBS/MEM. The modification time: —●— 0h, —◇— 1.5h, —□— 4h, —△— 9h, —■— 18h, —▽— 72h.

Fig. 8. Time-dependent profiles of Ca^{2+} and PO_4^{3-} concentration in 10% FBS/MEM by soaking the calcium phosphate ceramics modified with LS1090. The modification time: —○— 0h, —◇— 1.5h, —□— 4h, —△— 9h, —■— 18h, —▽— 72h.

Fig. 9. SEM images of surface modified calcium phosphate ceramics before and after soaking in 10% FBS/MEM. The soaking time: (a) 0h, (b) 1h, (c) 7d.

Table 1. Ca : P Ratio of the Surface Modified Calcium Phosphate Ceramics before and after Soaking in 10%FBS/MEM Determined by SEM/EDX and XPS Data

Soaking time of sample	Ca : P ratio (EDX)	Ca : P ratio (XPS)
0 h	1.50	1.32
1 h	1.67	1.44
7 d	1.70 *	1.60

* Only fibrous crystals in SEM image of Fig.9-(c) were analyzed.

図10に培地浸漬前、浸漬1h、及び7d後のTCP担体表面の薄膜X線回折図を示した。浸漬前(図10(a))、及び浸漬1h後(図10(b))の回折図形は β -TCPの回折パターンと一致していたが、浸漬7d後(図10(c))の場合には、わずかではあるがHAp由来の回折ピーク、すなわち●印で示した(211)に相当するピークが新たに認められた。この結果は図8、図9、表1の結果を支持するものと考えられ、TCP担体表面上にHApが析出していることが確認された。

改質したセラミックス担体上でのL929細胞の付着・増殖の様子をSEM観察し、図11、図12に示した。図11は培養1h後における細胞の付着の様子である。図11(a)より、改質時間が長い担体ほど付着細胞数が増えている様子がうかがえ、細胞の拡大図(図11(b))からも、改質時間が長い担体ほど細胞が偽足を伸ばし、成長している様子が観察された。図12は培養7d後における細胞の付着の様子である。図12(a)を培養1h後のSEM像(図11(a))と比較すると、いずれも良好に増殖していることが分かり、また、改質時間が長い担体の方が細胞付着数が増えていることが分かった。細胞の拡大図(図12(b))からも細胞分裂の活発な様子が観察され、特に改質時間9h、18hの担体の場合にその様子は顕著だった。図7の結果と併せて考えると、これはタンパク質の吸着量の影響によるものと考えられる。このようなSEM観察の結果は、図5の結果と良い一致を示していた。

今回、シランカップリング剤LS1090を用いてリン酸カルシウムセラミックスの表面を分子レベルで改質することを可能にした。本手法は、LS1090のみならず、他のシランカップリング剤を用いた場合にも有効な知見を提供するものと考えられる。

Fig. 10. Thin film XRD patterns of surface modified calcium phosphate ceramics before and after soaking in 10% FBS/MEM. The soaking time: (a) 0h, (b) 1h, (c) 7d, Δ β -TCP, $\bullet$ HAp.

Fig. 11. SEM images of L929 cells cultured on the surface-modified calcium phosphate ceramics. Modification times are 0h and 18h. The cultivation time is 1h. View of single cell in (b).

Fig. 12. SEM images of L929 cells cultured on the surface-modified calcium phosphate ceramics. Modification times are 0h and 18h. The cultivation time is 7d. View of single cell in (b).

4. 結 論

β -TCPの表面を化学的手法を用いて改質し、表面に導入する有機官能基の数を制御することを試み、以下のような結論を得た。

(1) この反応の反応速度定数は約 $1.0 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{s}^{-1}$ と求まり、拡散速度定数と比較するとかなり遅いことが分かった。そのため、改質時間を調整することによりセラミックス表面に導入する有機官能基量を調整できることが明らかとなり、その結果、ゼータ電位を系統的に制御できることが分かった。

(2) ゼータ電位は、有機官能基の導入量及び β -TCP表面からの Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} の溶出量に依存していることが分かった。

(3) 表面改質時間により、細胞の付着・増殖やタンパク質の吸着を制御できることが分かった。特に、改質時間が9h、18hの担体を用いたときに、細胞の付着・増殖、及びタンパク質の吸着が促進されていた。

本研究により、有機官能基の導入量は改質時間によって制御できることが明らかとなり、セラミックス表面を分子レベルで定量的に設計することが可能となった。本手法は、生体親和性に優れた複合材料の構築に資するものとして今後の展開が期待されている。

謝 辞 炭素分析に関してご助言頂きました名古屋工業技術研究所の柘植 明氏に感謝致します。また、SEM/EDX、薄膜XRDの測定に御尽力頂きました名古屋工業技術研究所の安部理恵子氏、伊藤晴美氏に感謝致します。

文 献

- 1) J. D. de Bruijn, Y. P. Bovell and C. A. van Blitterswijk, *Biomaterials*, **15**, 543-50 (1994).
- 2) C. P. A. T. Klein, P. Patka, H. B. M. van der Lubbe, J. G. C. Wolke and K. de Groot, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 53-65 (1991).
- 3) Y. Nakashima, K. Hayashi, T. Inadome and Y. Sugioka, *Bioceramics*, **6**, 449-53 (1993).
- 4) P. Ducheyne, C. S. Kim and S. R. Pollack, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 147-68 (1992).
- 5) C. P. A. T. Klein, P. Patka, J. G. C. Wolke, J. M. A. de Bleeck-Hogervorst and K. de Groot, *Biomaterials*, **15**, 146-50 (1994).
- 6) M. Niki, *J. Jpn. Soc. Biomater.*, **12**, 5-21 (1994).
- 7) K. Ebihara, A. Ohno, T. Fukubayashi, T. Tateishi and Y. Shirasaki, *J. Jpn. Soc. Biomater.*, **10**, 303-10 (1992).
- 8) K. Kubo, T. Kakimoto, N. Tsukasa, K. Nakayama, K. Hiwatashi, Y. Izumi, T. Sueda and N. Kaneko, *Jpn. Soc. Biomater.*, **11**, 85-89 (1993).
- 9) T. Suzuki, M. Toriyama, Y. Kawamoto, Y. Yokogawa and S. Kawamura, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 164-68 (1990).
- 10) T. Suzuki, M. Toriyama, Y. Kawamoto, Y. Yokogawa and S. Kawamura, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 450-56 (1991).
- 11) K. Nishizawa, M. Toriyama, T. Suzuki, Y. Kawamoto, Y. Yokogawa and H. Nagae, *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 435-37 (1993).
- 12) 西澤かおり, 鳥山素弘, 鈴木高広, 河本ゆかり, 横川善之, 永田夫久江, *日化*, 63-67 (1995).
- 13) 鳥山素弘, 河本ゆかり, 鈴木高広, 横川善之, 西澤かおり, 永田夫久江, *J. Ceram. Soc. Japan*, **103**, 46-49 (1995).
- 14) T. Suzuki, K. Nishizawa, Y. Yokogawa, F. Nagata, Y. Kawamoto and T. Kameyama, *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 226-32 (1996).
- 15) T. Suzuki, T. Yamamoto, M. Toriyama, K. Nishizawa, Y. Yokogawa, M. R. Mucalo, Y. Kawamoto, F. Nagata and T. Kameyama, *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**, 507-17 (1997).
- 16) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **139**, 265-69 (1951).
- 17) T. Takahagi, Y. Nagasawa and A. Ishitani, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **35**, 3542-46 (1996).