異なる溶質イオンを含有する種々の水溶液中で作製した陽極酸化 TiO₂ 皮膜の表面親水性と骨伝導性^{*1}

山本 大^{1,*2} 飯田 崇史^{1,*2} 有井 一志^{1,*2} 黒田 健介²
市野 良一² 興戸 正純² 関 あずさ³

¹名古屋大学大学院工学研究科マテリアル理工学専攻

²名古屋大学エコトピア科学研究所

³ハムリー株式会社

J. Japan Inst. Met. Mater. Vol. 77, No. 8 (2013), pp. 311–317

© 2013 The Japan Institute of Metals and Materials

Surface Hydrophilicity and Osteoconductivity of Anodized Ti in Aqueous Solutions with Various Solute Ions

Dai Yamamoto^{1,*2}, Takanori Iida^{1,*2}, Kazushi Arii^{1,*2}, Kensuke Kuroda²,
Ryoichi Ichino², Masazumi Okido² and Azusa Seki³

¹Department of Materials Science & Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya 464–8603

²EcoTopia Science Institute, Nagoya University, Nagoya 464–8603

³Hamri Co., Ltd., Tokyo 110–0005

Surface hydrophilicity is considered to have a strong influence on the biological reactions of bone substituting materials. However, the relationship between hydrophilicity and osteoconductivity has not been discussed quantitatively. In this study, Ti substrates were coated with TiO₂ having different water contact angles, using anodizing in aqueous solutions containing different types of solute ion, and the quantitative relationship between hydrophilicity and osteoconductivity was investigated.

All of the anodized coatings were anatase-type TiO₂ with a fine surface roughness. Most of the solute ions were included in the coatings, but they did not influence the hydrophilicity of the anodized coatings. However, the surface hydrophilicity of the anodized coatings depended on the pH of the aqueous solution. The amount of hard tissue formed on TiO₂-coated specimens (denoted as R_{B-I}) depended on the water contact angle on their surface. For water contact angle between 20° and 55°, the value of R_{B-I} increased as water contact angle decreased. On the other hand, for water contact angle between 55° and 70°, the value of R_{B-I} increased as water contact angle increased. [doi:10.2320/jinstmet.J2013016]

(Received March 11, 2013; Accepted May 7, 2013; Published August 1, 2013)

Keywords: anodizing, titanium dioxide, anion, cation, pH, water contact angle, osteoconductivity

1. 緒 言

骨あるいは歯の欠損部において、骨セメントを介さずに金属製インプラントと生体骨を一体化させるためには、インプラント表面において積極的な骨形成を促す必要がある。一般に、材料が体液や細胞培養液と接触したとき、初期の細胞接着挙動にタンパク質の吸着が重要な役割を果たすことはよく知られている。これまでに種々の *in vitro* 試験において、材料表面に存在する化学種¹⁾、表面電荷²⁾、ならびに表面形態³⁾によって、その表面へのタンパク質吸着および細胞接着挙動が大きく異なることが報告されている。また、表面親水性とそれらの生体組織の吸着挙動に関しては、多くの研究報告例がある^{4–7)}。例えば、タンパク質の種類によって、吸着

に最適な表面親水性は異なり、水滴接触角が低下するにつれて、フィブロネクチンの吸着量は増加するが、アルブミンの吸着量は減少することを Wei らは報告している⁶⁾。一方で、*in vivo* での骨伝導性と表面親水性との関係については不明な点が多い。これまでに、親水性表面において骨が形成しやすい傾向が見出されているものの^{8,9)}、測定された接触角範囲が限定的であり、広範囲の接触角領域における表面親水性と骨伝導性との定量的な関係はいまだ示されていない。

チタンの骨伝導性向上のための表面処理として、水酸アパタイト薄膜^{10–17)}と同様に、チタニア (TiO₂) 薄膜のコーティング^{18–23)}が有望視されている。しかし TiO₂ の骨伝導性は、その成膜手法や処理後の表面形状によって著しく異なることが示唆されている。例えば、骨伝導性の良好な TiO₂ 皮膜の作製には高温酸化処理よりも陽極酸化処理の方が効果的であること²⁰⁾や、サブミクロンオーダーの表面粗さでは粗雑表面よりも平滑表面の方が骨伝導に有効であること²¹⁾などがわかっている。Ti 基板に陽極酸化処理を施す場合、電圧印

^{*1} Mater. Trans. **53**(2012) 1956–1961 に掲載

^{*2} 名古屋大学大学院生 (Graduate Student, Nagoya University)

加による TiO_2 皮膜の成長時に皮膜内部に水溶液中の溶質イオンが取り込まれることが知られている^{20,22,24,25}). これらのイオンが皮膜の最外層に存在する場合, イオンの種類によって表面の親水性に少なからず影響することが推測され, それにともなって骨伝導性の変化があるものと考えられる. すでに著者らは, 異なる水溶液中で作製した陽極酸化 TiO_2 皮膜が異なる骨伝導性を有することを報告しているが, 使用した水溶液中のイオンによる影響については十分な議論がなされていない¹⁹). そこで本研究では, 異なる溶質イオン種を含有する種々の水溶液中で Ti を陽極酸化することで, その表面に親水性の異なる TiO_2 皮膜の作製を試み, さらにこれら TiO_2 被覆試料の動物埋植試験を実施し, 表面親水性と骨伝導性との関係を定量的に考察した.

2. 実験方法

2.1 前処理

工業用チタン(cp-Ti)の板材(表面積 1.13 cm^2)および丸棒材($\phi 2 \times 5 \text{ mm}$)を, それぞれ皮膜分析用ならびに *in vivo* 試験用の基材として用いた. これらをエメリー紙で一定方向に湿式研磨した後, 粒径 $0.05 \mu\text{m}$ の Al_2O_3 粉末を用いてバフ研磨を行い, 基材の表面粗さを一定とした. 研磨後は, 基材表面を蒸留水で洗浄し, エタノールで脱脂した後, 表面以外をエポキシ樹脂で被覆し, 陽極酸化処理に供した.

2.2 陽極酸化処理

Ti 基材を作用極, Pt コイルを対極とした 2 極法にて陽極酸化処理を施した. 陽極酸化処理に使用した水溶液種, ならびにその他の陽極酸化条件を Table 1 に示す. 印加電圧を 0 V から 0.1 Vs^{-1} にて上昇させ, 所定の電圧に到達した後, ただちに水溶液中から試料を取り出し, 蒸留水にて洗浄し, 空气中で温風乾燥させた. 表面の化学的性質に対する膜厚の影響を除外するために, すべての水溶液種において, 黄色い干渉色を呈する膜厚 120 nm 程度の陽極酸化皮膜となるように最終印加電圧を決定した²⁶). 電圧印加中は一定速度にて

水溶液を攪拌し, 恒温槽中にて 298 K に保持した. 作製したすべての試料をオートクレーブ滅菌器内で 394 K にて 20 min 滅菌処理した後, 各種分析評価および *in vivo* 試験に供した. 以降, 各陽極酸化処理材は, 使用した水溶液の種類によって Table 1 に示す略称で記す. また, 以降の図中で使用するアルファベット記号は, Table 1 におけるアルファベット記号と対応させている.

2.3 皮膜の分析

走査型電子顕微鏡(SEM)にて皮膜の表面形態を観察し, 薄膜 X 線回折装置(XRD)および電子線回折装置にて生成物の結晶構造の同定を行い, さらに X 線光電子分光装置(XPS)にて皮膜表面の定性および定量分析を行った. 共焦点レーザー顕微鏡を用いて算術平均表面粗さ Ra (分析範囲 $150 \mu\text{m} \times 112 \mu\text{m}$)を測定した. オートクレーブ滅菌の 24 h 後に, 1 つの試料につき 3 ケ所において $2 \mu\text{L}$ の水滴と試料との接触角を測定し, その平均値を静的水滴接触角として使用した.

2.4 *In vivo* 試験

本研究で行った *in vivo* 試験の実験手順は, 過去の報告¹⁴)と同様であるので, ここでは簡潔に記述することとする. 埋植前に, すべての試料を蒸留水で洗浄し, グルコン酸クロロヘキシジン溶液に浸漬させて消毒した. 被検体には 10 週齢の雄性の Sprague-Dawley ラット(日本チャールス・リバー株)を用いた. まず, 脛骨骨幹部において, 低速回転ドリルにて骨を貫通しないように試料の直径よりわずかに大きい穴を開け, 試料を皮質骨と海綿骨に接触するように挿入し, 皮下組織および皮膚を縫合した後, 消毒した. 埋植 14 d 後, 埋植した試料をその周辺の組織とともに取り出し, 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定し, エタノールにて脱水処理後, メチルメタクリレートにて包埋した. その後, 各試料を皮質骨部, 海綿骨部のそれぞれで骨の長軸方向に沿って切断した後, 切片の厚さが $20 \mu\text{m}$ となるまで研磨し, トルイジンブルーにて組織染色を行ったものを組織観察用の標本とした.

Table 1 Anodizing conditions of the Ti substrates for forming anatase-type TiO_2 films with a thickness of *ca.* 120 nm .

	Denotation	Anodizing conditions			
		Electrolyte	Concentration/mol L ⁻¹	pH	Applied voltage/V
(a)	SA	H ₂ SO ₄	0.1	1.0	100
(b)	PA	H ₃ PO ₄	0.1	1.6	100
(c)	LA	CH ₃ CH(OH)COOH	0.1	2.3	70
(d)	SaA	C ₆ H ₄ (OH)COOH	0.013	2.6	75
(e)	AA	CH ₃ COOH	0.1	2.9	70
(f)	NS	Na ₂ SO ₄	0.1	6.3	65
(g)	NP	Na ₂ HPO ₄	0.1	9.0	70
(h)	MO	Mg(OH) ₂	0.0002	10.1	150
(i)	NH	NH ₃	0.1	11.1	80
(j)	CO	Ca(OH) ₂	0.02	12.2	70
(k)	KO	KOH	0.1	12.8	80
(l)	NO	NaOH	0.1	13.3	80

作製した標本の骨-インプラント界面の観察には光学顕微鏡を用いた。インプラント側面に硬組織が接触している部分の長さを合計し、インプラント側面の全長に対する割合(骨-インプラント接触率, R_{B-I})を皮質骨部, 海綿骨部に分けて算出した。骨-インプラント接触率の有意差は, Tukey-Kramer 法²⁷⁾を用いて統計的に分析し, $p < 0.05$ で判定した。本動物実験はすべて, 国際実験動物管理公認協会により認定された施設にて行った。

3. 実験結果

3.1 陽極酸化皮膜の性質

Fig. 1 に陽極酸化試料の XRD パターンを示す。陽極酸化前後の試料表面の SEM 像を Fig. 2 に示す。Fig. 3 では, 無機水溶液中陽極酸化試料について, 陽極酸化に使用した水溶液中のアニオン・カチオンの主要構成元素の XPS スペクト

Fig. 1 XRD patterns of: (a) Specimen SA, (e) Specimen AA, (g) Specimen NP, and (j) Specimen CO. Key: ○ = α Ti, and ● = anatase.

Fig. 2 Surface SEM images of: (a) Specimen SA, (c) Specimen LA, (e) Specimen AA, (f) Specimen NS, (i) Specimen NH, (l) Specimen NO, and (m) an as-polished Ti specimen.

Fig. 3 XPS spectra of: (a) Specimen SA, (b) Specimen PA, (f) Specimen NS, (g) Specimen NP, (h) Specimen MO, (j) Specimen CO, (k) Specimen KO, and (l) Specimen NO.

ルを示す. Fig. 4 に, 有機酸性水溶液中で陽極酸化した試料の FT-IR スペクトルを示す. これらのデータに加えて, TiO₂ の結晶構造, 膜色, *Ra*, ならびに XRD パターン中の $2\theta=25.2^\circ$ におけるアナターゼに起因するピークの半値幅(以下, 単に「半値幅」と称する)を Table 2 に示す.

最終印加電圧は, 陽極酸化処理に使用した水溶液種によって異なるが, いずれの水溶液を使用した場合でも生成した陽極酸化皮膜の膜厚は等しく, 酸化物としてはアナターゼのみが検出され (Fig. 1), その半値幅はほぼ同程度を示した (Table 2). これらの陽極酸化皮膜の表面粗さはいずれも $Ra/\mu\text{m}=0.1$ 程度を示し, 陽極酸化を施しても表面粗さは初期状態からほとんど変化せず, 平滑表面を維持できていることがわかる (Table 2, Fig. 2). XPS を用いた表面分析結果から, 水溶液として無機酸性水溶液 (Fig. 3(a), (b)) を用いた場合には皮膜中に各水溶液中のアニオンが含まれること, Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , あるいは Na^+ を含むアルカリ性水溶液 (Fig. 3(h), (j), (k), (l)) を用いた場合には皮膜中にカチオンが含まれることがわかる. さらに, 中性水溶液中 (Fig. 3(f), (g)) を用いた場合には, アニオン・カチオンともに皮膜中に存在する. Yamamoto と Baba によれば²⁸⁾, IR 測定にお

いてカルボキシル基の吸収は 1560 cm^{-1} および 1460 cm^{-1} 付近に認められており, 本研究で分析した有機酸中陽極酸化試料の中では, SaA 試料のみカルボキシル基の IR 吸収が認められた. ただし, 使用した水溶液種によって皮膜中へのアニオン・カチオンの混入しやすさは異なるものと考えられるが, 各陽極酸化皮膜の膜厚および表面粗さが一定となるように酸化条件を決定しているため, 本研究で作製した皮膜中のアニオン・カチオン濃度は制御されておらず, ここではその影響については議論できない.

3.2 表面親水性

Fig. 5(1) に, 各陽極酸化試料における静的水滴接触角を示す. 各試料表面における水滴接触角は, 陽極酸化処理に使用した水溶液種ごとに異なる値を示した. ただし, いずれの試料においても, 測定点ごとの接触角の誤差は $\pm 6^\circ$ 以内と小さく, 以降の議論に影響するものではなかった. 陽極酸化処理に使用した水溶液の pH によって各試料の水滴接触角は異なり, $\text{pH}<3$ の酸性水溶液を使用した場合は pH が低くなるほど, $\text{pH}>12$ のアルカリ性水溶液を使用した場合は pH が高くなるほど, 低い水滴接触角を示す傾向が認められた. ただし, $3<\text{pH}<12$ の中性水溶液を使用した場合, pH に関係なく, 水滴接触角はほぼ一定の値を示した. 酸化皮膜中に SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Na^+ をそれぞれ含有する SA, PA, および NO は, その他の陽極酸化試料よりも低い水滴接触角を示した. 一方で, SO_4^{2-} と Na^+ のいずれも皮膜中に含有する NS 試料の場合, 水滴接触角は 50° 程度であり, 同様のイオンを皮膜中に含有する SA, NO 試料よりも高い値を示した. 同様のことが, NP 試料と PA, NO 試料を比較した場合においても言える. これは, 水溶液中に取り込まれるアニオン・カチオンの種類によって水滴接触角を整理することはできないことを示している. また, その他の陽極酸化試料の水滴接触角については, 皮膜中に含まれる溶質イオン種に関係なくいずれも 60° 程度の高い値を示し, これらの溶質イオン種の違いによる水滴接触角への影響はほとんどないことを表している. ただし, 上述のように皮膜中の溶質イオン濃度は試料ご

Fig. 4 FT-IR spectra of: (c) Specimen LA, (d) Specimen SA, and (e) Specimen AA.

Table 2 Surface roughness, *Ra*, and FWHM values of the anodized specimens.

Denotation		Film preoperties		
		Crystal structure of TiO ₂	Film color	
			<i>Ra</i> /μm	FWHM (deg.)
(a)	SA	Anatase		0.08
(b)	PA			1.14
(c)	LA			0.92
(d)	SaA			1.07
(e)	AA			1.06
(f)	NS		Yellow (film thickness: 120 nm)	1.15
(g)	NP			1.00
(h)	MO			0.92
(i)	NH			1.04
(j)	CO			0.95
(k)	KO			0.99
(l)	NO			0.86

Fig. 5 Relationship between (1) pH and WCA, (2) pH and R_{B-I} values in the cortical bone part and (3) in the cancellous bone part. The R_{B-I} values of healthy cancellous bone and an as-polished Ti specimen are shown as the dashed-dotted line and dotted lines, respectively. * $p < 0.05$.

とに異なるため、その影響は明らかではない。

表面に存在する化学種の中で、表面 OH 基は接触角の低下に寄与するものと考えられる。それとは反対に、大気中からのコンタミネーションとして表面に吸着した炭化水素は、表面親水性を低下させることが知られている²⁹⁾。そこで、XPS にて試料表面の O 1s および C 1s スペクトルを分析し、過去の報告^{30,31)}をもとに試料表面への吸着水分子、表面 OH 基、ならびに炭化水素の吸着量を算出した結果を Fig. 6 に示す。SA, PA, NS, および NP については、硫酸イオンあるいはリン酸イオンに起因するピークと OH 基に起因するピークの分離が困難なため、両イオンを含んだ値として表面 OH 基量を算出した。表面に存在する吸着水量と水滴接触角には明確な相関関係は認められず、吸着水分子中の OH 基による表面親水性への寄与は少ないと考えられる。Fig. 6 (2) より、表面親水性の高い陽極酸化試料 SA および PA ((a) および (b)) は、表面 OH 基量が高いことがわかる。一方で、SA, PA, NP 表面での OH 基量はいずれも高いものの、吸着炭化水素量の少ない SA および PA の水滴接触角は低く、それとは逆に吸着炭化水素量の高い NP の水滴接触角

Fig. 6 The intensity ratio of (1) adsorbed water molecule H_2O , (2) OH group binding to Ti atom, and (3) adsorbed hydrocarbon (C-H) on the surface of anodized specimens, against TiO_2 . The intensities of adsorbed H_2O , OH group, C-H, and TiO_2 were calculated from O1s, C1s, and Ti2p XPS spectra, respectively.

は高い傾向が認められた (Fig. 6(2))。ただし、SA 表面でも C-H に起因するピークが強く検出されているものの、これは吸着した炭化水素よりもむしろ皮膜中の含有有機アニオンによると考えられるが、その有機アニオンを含有しても水滴接触角が顕著に上昇する傾向は認められなかった。以上の結果は、表面 OH 基および吸着炭化水素が、陽極酸化 TiO_2 の水滴接触角に強く影響することを示唆している。

3.3 In vivo 試験

各水溶液中で作製した陽極酸化試料の骨-インプラント接触率 (R_{B-I}) を Fig. 5(2) および (3) に示す。埋植した試料によって骨伝導性が異なり、皮質骨部と海綿骨部で同様の傾向が認められるが、試料間の R_{B-I} 値の差は皮質骨部の方がより顕著であった。これは、海綿骨の骨代謝周期が皮質骨よりも速く、14 日間の埋植期間ではすでに十分な量の骨が形成されており、埋植初期の硬組織生成量、すなわち陽極酸化皮膜表面の効果を必ずしも反映していないためと考えられる。それゆえ、以降の議論では皮質骨部の結果を用い、表面の化学的性質が骨伝導性に与える影響を考察した。

Fig. 7 Relationship between R_{B-I} values in the cortical bone part and (1) WCA, (2) the XPS spectrum intensity ratio of OH group against TiO₂, and (3) the XPS spectrum intensity ratio of adsorbed hydrocarbon against TiO₂. Keys: ● = anodized, and ○ = thermally oxidized.

Fig. 5(2)は、 R_{B-I} 値が水溶液の pH に依存して変化することを示している。また、Fig. 5(2)と Fig. 5(1)を比較すると、pH の変化に対して、 R_{B-I} 値と水滴接触角が同様の变化を示すことが認められる。すなわち、Fig. 7(1)に示すように、水滴接触角に応じて R_{B-I} 値が変化しており、その傾向は水滴接触角が 55°程度を境として変化することがわかる。水滴接触角が 55°以下の場合、接触角の低下とともに R_{B-I} 値が増大する傾向が認められた。Wei らによると、アルブミンとフィブロネクチンの競争吸着において、親水性表面ではフィブロネクチンの方が積極的に吸着し、骨芽細胞の接着に寄与することが報告されており、このことは本研究の結果とよく一致している⁶⁾。これとは反対に、水滴接触角が 55°以上の場合には、水滴接触角の上昇とともに R_{B-I} 値は増大する傾向が認められるが、その結果に対応するような *in vitro* 試験結果はなく、原因は明らかではない^{4,32)}。Fig. 6 で示したように、水滴接触角が表面化学種の影響を強く受ける一方で、 R_{B-I} 値と表面 OH 基量、あるいは吸着炭化水素量に明確な依存性は認められなかった (Fig. 7(2)および(3))。すなわち、各陽極酸化試料の R_{B-I} 値は、表面に存在する OH 基あるいは吸着炭化水素のいずれかに依存するわけではなく、それらの存在量のバランスに依存するために、水滴接触角によって整理できるものと考えられる。

4. 結 言

本研究では、異なる溶質イオン種を含有する種々の水溶液中で Ti を陽極酸化することで、その表面に親水性の異なる

TiO₂ 皮膜を作製した。さらに、骨伝導性評価として作製した試料を動物埋植試験に供し、表面親水性と骨伝導性の関係について定量的に考察し、以下の知見が得られた。

(1) いずれの水溶液中で Ti を陽極酸化した場合も、表面が平滑で、膜厚の等しいアナターゼ単相の陽極酸化皮膜の作製が可能であった。陽極酸化皮膜中には、水溶液中のアニオン・カチオンが取り込まれたが、これらの含有溶質イオンによる表面親水性への影響は認められなかった。

(2) 陽極酸化皮膜の表面親水性は、陽極酸化処理に使用した水溶液の pH に強く依存して変化した。

(3) 作製した TiO₂ 皮膜表面における硬組織生成量は、水滴接触角に応じて変化する傾向が認められた。すなわち、水滴接触角が 55°近傍のときに硬組織生成量は最も低く、それよりも水滴接触角が上昇、あるいは低下するほど硬組織生成量は高くなり、特に親水性の高い表面では高い骨伝導性を示すことがわかった。

本研究の一部は、文部科学省グローバル COE プログラム (マイクロ・ナノメカトロニクス教育研究拠点)、文部科学省科学研究費補助金 特別研究員奨励費 (No. 2310401) および基盤研究 (C) (No. 21560719) の助成を受けて行った。

文 献

- 1) Y. Arima and H. Iwata: *Biomater.* **28** (2007) 3074–3082.
- 2) S. Bodhak, S. Bose and A. Bandyopadhyay: *Acta Biomater.* **5** (2009) 2178–2188.
- 3) M. Bigerelle, K. Anselme, B. Noel, I. Ruderman, P. Hardouin

- and A. Iost: *Biomater.* **23**(2002) 1563–1577.
- 4) Y. Tamada and Y. Ikeda: *Polymer* **34**(1993) 2208–2212.
 - 5) J. H. Lee, G. Khang, J. W. Lee and H. B. Lee: *J. Colloid Interface Sci.* **205**(1998) 323–330.
 - 6) J. Wei, T. Igarashi, N. Okumori, T. Igarashi, T. Maetani, B. Liu and M. Yoshinari: *Biomed. Mater.* **4**(2009) 045002.
 - 7) A. Molenberg, F. Schwarz, M. Herten, S. Berner, M. de Wild and M. Wieland: *Materialwiss. Werkst.* **40**(2009) 31–35.
 - 8) C. Eriksson, H. Nygren and K. Ohlson: *Biomater.* **25**(2004) 4759–4766.
 - 9) J.-W. Park, J.-H. Jang, C. S. Lee and T. Hanawa: *Acta Biomater.* **5**(2009) 2311–2321.
 - 10) L. L. Hench and J. Wilson: *An Introduction to Bioceramics*, (World Scientific, Singapore, 1993).
 - 11) K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai: *J. Biomed. Mater. Res.* **59**(2002) 390–397.
 - 12) K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai: *J. Biomed. Mater. Res.* **61**(2002) 354–359.
 - 13) K. Kuroda, Y. Miyashita, R. Ichino, M. Okido and O. Takai: *Mater. Trans.* **43**(2002) 3015–3019.
 - 14) K. Kuroda, S. Nakamoto, R. Ichino, M. Okido and R. M. Pilliar: *Mater. Trans.* **46**(2005) 1633–1635.
 - 15) K. Kuroda, S. Nakamoto, Y. Miyashita, R. Ichino and M. Okido: *Mater. Trans.* **47**(2006) 1391–1394.
 - 16) K. Kuroda, M. Moriyama, R. Ichino, M. Okido and A. Seki: *Mater. Trans.* **49**(2008) 1434–1440.
 - 17) K. Kuroda, M. Moriyama, R. Ichino, M. Okido and A. Seki: *Mater. Trans.* **50**(2009) 1190–1195.
 - 18) H.-J. Song, S.-H. Park, S.-H. Jeong and Y.-J. Park: *J. Mater. Proc. Tech.* **209**(2009) 864–870.
 - 19) X. Cui, H.-M. Kim, M. Kawashita, L. Wang, T. Xiong, T. Kokubo and T. Nakamura: *Dent. Mater.* **25**(2009) 80–86.
 - 20) D. Yamamoto, I. Kawai, K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and A. Seki: *Bioinorg. Chem. Appl.* **2012**(2012) doi: 10.1155/2012/495218.
 - 21) D. Yamamoto, I. Kawai, K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and A. Seki: *Mater. Trans.* **52**(2011) 1650–1654.
 - 22) D. Yamamoto, T. Iida, K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and A. Seki: *Mater. Trans.* **53**(2012) 508–512.
 - 23) X. Liu, P. K. Chu and C. Ding: *Mater. Sci. Eng. R* **47**(2004) 49–121.
 - 24) H. S. Ryu, W.-H. Song and S.-H. Hong: *Surf. Coat. Technol.* **202**(2008) 1853–1858.
 - 25) J.-H. Lee, S.-E. Kim, Y.-J. Kim, C.-S. Chi and H.-J. Oh: *Mater. Chem. Phys.* **98**(2006) 39–43.
 - 26) S. V. Gils, P. Mast, E. Stijns and H. Terryn: *Surf Coat. Technol.* **185**(2004) 303–310.
 - 27) C. Y. Kramer: *Biometrics* **12**(1956) 307–310.
 - 28) Y. Yamamoto and N. Baba: *Thin Solid Films* **101**(1983) 329–338.
 - 29) W. Att, N. Hori, M. Takeuchi, J. Ouyang, Y. Yang, M. Anpo and T. Ogawa: *Biomater.* **30**(2009) 5352–5363.
 - 30) Y. Tanaka, M. Nakai, T. Akahori, M. Niinomi, Y. Tsutsumi, H. Doi and T. Hanawa: *Corros. Sci.* **50**(2008) 2111–2116.
 - 31) Y. Shibata, D. Suzuki, S. Omori, R. Tanaka, A. Murakami, Y. Kataoka, K. Baba, R. Kamijo and T. Miyazaki: *Biomater.* **31**(2010) 8546–8555.
 - 32) P. B. van Wachem, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J. P. Detmers and W. G. van Aken: *Biomater.* **6**(1985) 403–408.