原 著

フッ化物処理ハイドロキシアパタイト表面への タンパク質吸着とそのぬれ性状

阪 本 充 川 崎 弘 二 神 原 正 樹

大阪歯科大学口腔衛生学講座（主任：神原正樹教授）

〔受付：平成10年8月3日，受理：平成11年1月25日〕

Adsorption of Proteins onto Hydroxyapatite Treated with Fluoride and Its Wettability

Mitsuru Sakamoto, Koji Kawasaki and Masaki Kambara

Preventive and Community Dentistry, Osaka Dental University

(Chief : Prof. Masaki Kambara)

8-1, Kuzuhahanazono-cho, Hirakata-shi, Osaka 573-1121, Japan

[Received on August 3, 1998 ; Accepted on January 25, 1999]

Key words : fluoride/hydrophobicity/hydroxyapatite/serum albumin/wetting

Abstract : We developed a new method (Dropping Time Method ; DTM) to investigate the wettability of protein layer surfaces adsorbed onto glass plates in an aqueous solution. In this study, we extended the method to optically non-transparent materials such as hydroxyapatite plates. The adsorption behavior of human serum albumin (HSA) on the APF treated hydroxyapatite plate in water was studied using this method. At higher concentrations of HSA, the surfaces of adsorbed HSA were fairly hydrophilic. At lower concentrations of HSA, the hydrophilicity of the HSA layer depended on the treated APF concentration. It was found that improved DTM can be applied to optically non-transparent solid plates.

抄録：液膜落下法は固体に吸着したタンパク質を乾燥させることなく，吸着タンパク質表面のぬれ性状の測定が可能である(特許第2782502号)。しかし，従来の液膜落下法は光を透過する固体のみ吸着媒として使用可能であった。そこで液膜落下法を改良し，光不透過の酸性フッ素リン酸（APF）溶液処理ハイドロキシアパタイト（HAp）上に吸着したヒト血清アルブミン（HSA）表面のぬれ性状の違いを検討した。改良液膜落下法により，光不透過の固体においても吸着タンパク質表面のぬれ性状の測定が可能であり，高濃度 HSA 水溶液に浸漬した場合，HAp 吸着 HSA 表面は，APF 溶液処理濃度に関わらず親水性であることがわかった。低濃度 HSA 水溶液に浸漬した場合，APF 溶液処理濃度により HAp 吸着 HSA 表面のぬれ性状は異なる変化をすることが明らかとなった。また，この方法により APF 溶液処理の違いによって，HSA が固体表面に吸着した後に起こるコンホメーション変化を観察できることがわかった。

緒 言

歯垢の形成はハイドロキシアパタイト（HAp）により

構成されている歯エナメル質表面にタンパク質が吸着し，このタンパク質被膜上に微生物が付着することから始まる¹⁻³⁾。そのため，歯垢が原因となって引き起こされる口腔内の二大疾患，すなわちう蝕や歯周疾患^{4,5)}を予防するためには，エナメル質表面を改質し，歯面環境を変えることによりタンパク質や微生物の吸着・付着を阻止

することが考えられ、その観点から多くの試みがなされてきている⁶⁻¹⁰⁾。しかし、エナメル質表面の改質による、吸着・付着の阻止および除去はこれまでの研究から困難であり、吸着タンパク質を除去してもタンパク質はただちに吸着するため¹¹⁾、歯面は常にタンパク質が吸着した状態である。そのため、微生物の付着機構の理解には、固体表面に吸着したタンパク質表面性状の解明が必要である。

一方、フッ化物応用が腐蝕予防に有効であることは、現在までの数多くの疫学的研究および実験的研究から明らかである^{12,13)}。フッ化物処理はエナメル質表面のタンパク質吸着量および吸着形式に影響を及ぼすことがわかっているが^{14,15)}、フッ化物処理を行った固体表面にタンパク質が吸着した結果、その吸着タンパク質表面の性状がどのように変化し、微生物の付着にどのような影響を与えるのか明らかになっていない。

界面における親水性/疎水性、すなわちぬれ性状は、タンパク質などの高分子や微生物などが吸着・付着する際の重要なファクターである¹⁶⁾。固体へのタンパク質吸着および微生物の付着は、新しいバイオマテリアルの開発、ドラッグデリバリーシステム、化粧品、食品など固液界面における吸着・脱離現象に係わる多様な分野において研究されてきている¹⁷⁻²⁰⁾。しかし、吸着タンパク質表面の性状を intact に明らかにすることは方法論的に確立されていない。一般的に固体表面のぬれ性状は、液滴法による接触角測定²¹⁾などが用いられるが、in situ における固液界面現象の解明には適していない。その理由は、液滴法および傾斜法などの従来の接触角測定法による吸着タンパク質表面の測定は、吸着タンパク質層を乾燥して測定するためタンパク質のコンホメーション変化が起これと考えられ、また静泡法では気泡の液相/気相界面へのタンパク質吸着が起これるため、正しい接触角測定ができないと考えられているためである。

筆者らが開発した液膜落下法は吸着タンパク質表面を乾燥させることなく、ぬれ性状の測定が可能であり（特許第 2782502 号）^{11,22)}、飽和吸着した種々のタンパク質表面のぬれ性状の違いを非破壊で観察できること、また、それぞれのタンパク質の吸着過程に対するぬれ性状の時間変化を測定できることを明らかにした。しかし、液膜落下法はマッハツェンダー光干渉計を用い、光干渉縞の変化により落下時間を計測し、そのぬれ性状を測定するものであったため、吸着媒として用いることができるサンプルは光を透過するものに限られていた。そこで今回われわれは従来の液膜落下法を改良し、光を透過しない HAp ブロックを吸着媒として使用した際の測定方法の

開発と、この改良液膜落下法を用いて、フッ化物処理 HAp 上に吸着したタンパク質表面のぬれ性状について検討した。

材料および方法

1. フッ化物溶液

フッ化ナトリウム (Product No. S-1504, Lot No. 45 H 0936, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) および 85% 正リン酸 (キシダ化学, 大阪) に蒸留水を加え、フッ素濃度を 9,000 ppm, pH 3.4 に調整したものと、フッ素濃度を 90 ppm (pH 3.86) に調整したものを酸性フッ素リン酸 (APF) 溶液として用いた。

2. ハイドロキシアパタイト

無処理 HAp は HAp ブロック (20×40×5 mm; 旭工学, 東京) を洗浄用界面活性剤 R.B.S.-25 (純正化学, 東京, Lot No. 3 J 1011) に浸漬し、15 分間超音波洗浄したのちに蒸留水で洗浄し、オープン内で乾燥して調整した。APF 溶液処理 HAp は無処理 HAp ブロックをそれぞれの APF 溶液に 5 分間、室温 (25°C) で浸漬したのちに蒸留水で洗浄し、自然乾燥して作製した。

また、吸着媒の接触角と改良液膜落下法による測定結果との関係を調べるために、0.1 N 塩酸 5 秒間の酸処理を行い、表面をやや親水性にした HAp ブロックサンプルと、表面に親水性のシリカガラスを貼付した HAp ブロックサンプルを用意した

3. タンパク質

実験に用いたタンパク質はヒト血清アルブミン (以下 HSA と略す。Product No. A-7638, Lot No. 79 F 9303, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA: PI=4.7, M.W.=68,000) である。蒸留水に溶かし、吸着等温線で飽和吸着を与える濃度 1 mg/ml (pH 8.7) および飽和吸着量を与えない 0.01 mg/ml の濃度 (pH 9.1) で使用した。

4. 改良液膜落下法による測定

液膜落下法の改良点について説明する。レーザー光 (He-Ne laser; green, 543.5 nm; Melles Griot) の光路に HAp ブロックを置き、反射したレーザー光をディテクターにより捉える。HAp ブロックをタンパク質水溶液の入ったセルに浸漬し、任意の時間吸着処理後、液相/気相界面をろ紙で掃き、液相/気相界面に吸着したタンパク質を除去したうえで、タンパク質水溶液の入ったセルを瞬時に引き下げる。セルを引き下げた直後は HAp ブ

Fig. 1 An experimental set-up for measuring the motion of liquid film on a solid surface.

ロック表面にタンパク質水溶液膜が付着しているため、HAp ブロック上で反射したレーザー光の光路が異なり、ディテクターに到達する光の強度が変化する。タンパク質水溶液膜がレーザー光の反射部位を越えると、再びタンパク質水溶液浸漬前の強度でレーザー光がディテクターにより捉えられる。すなわち、液膜の有無によるレーザー光反射光路のわずかな差が、ディテクターへの光照射面のずれを生ずることを利用し、液膜が6ミリメートルの距離を落下する時間（これを落下時間と呼び指標とする）を、レーザー光の反射特性の変化により測定した（Fig. 1）。

Fig. 2 にタンパク質吸着サンプル上に液膜が落下する様子を示す。液膜の落下速度は、液膜に働く重力（ f_g ）、液膜の粘性力（ f_h ）、液膜/基板/気相間の界面張力（ f_i ）によって、 $f_g - (f_i + f_h) = 0$ という式により決定される。定常状態では式 1 が成り立つ。

$$\mu l h \left(\frac{d^2 v}{dy^2} \right) dy = l h \rho g dy - \gamma_1 \cos \theta l dy / D^* \dots\dots\dots (1)$$

これを吸着タンパク質表面と液膜表面での境界条件を用いて解き、液膜の平均高さの時間変化について整理すると式 2 が得られ、落下速度と接触角が関係づけられる²²⁾。

$$\Delta t / \Delta h = -1/A + (B/A) \cos \theta \quad (\Delta t / \Delta h) \dots\dots\dots (2)$$

これらの式で、 l は液膜の幅、 h は液膜の水面からの高さ、 y は液膜の厚み方向の座標、 ρ は液体の密度、 g は重力加速度、 γ_1 は気相/液相の界面張力、 θ は接触角、 dy は液膜の厚さ、 μ は粘性係数、 dv/dy は液膜の厚さ方向の速度勾配、 D^* は液膜の仮想厚み、 v は吸着層表面での速度である。落下運動が定常状態になった二点間距離（ Δh ）を通過するのに要する時間（ Δt ）を疎水/親水性の指標とすることができる。また、 A 、 B は事実上一定と考えてよい²²⁾。

今回の実験では 2 種類の APF 溶液処理 HAp および

無処理 HAp を、1、5、10、30、60 分間 HSA 水溶液に浸漬したのち、改良液膜落下法による測定を行った。なお、測定時の温度は 25°C とした。

5. 液滴法による接触角測定

液滴法による接触角の測定は ODU 式接触角測定装置¹⁵⁾を用い、Sessile Drop Method 法²³⁾（SDM 法）により行った。蒸気で飽和させた測定室内において、試料表面の約 1 センチメートル上方から 1 μ l の蒸留水をマイクロピペットを用いて滴下し、CCD カメラを通してコンピュータ画面に取り込んだ画像を画像解析装置でデジタル化し、液滴の接触半径、接触高を求め、その値から接触角をコンピュータによって自動的に算出した。なお、測定時の温度は 25°C とした。

結 果

1. 改良液膜落下法による落下時間と液滴法による接触角との関係

蒸留水に浸漬した場合、Fig. 3 に示すようにシリカガラス貼付 HAp の接触角は 10 度程度と小さく、落下時間は約 250 秒であった。無処理 HAp の接触角は約 65 度であり、落下時間は表面が疎水性であるために約 10 秒程度と非常に短かった。酸処理 HAp の接触角は約 40 度で、落下時間は約 80 秒であった。

2. 改良液膜落下法による HSA 水溶液浸漬後の各種 HAp の落下時間

無処理 HAp において、1 mg/ml の HSA 水溶液浸漬後の落下時間は、すべての吸着処理時間において 140 秒から 160 秒の範囲であった。0.01 mg/ml の濃度では、浸漬時間の増加とともに落下時間は増加し、その飽和値は

Fig. 2 (a) The schematic representation of a liquid film dropping along the plate surface. The dropping motion is determined by three forces: gravitational (f_g), viscous (f_h), and force due to interfacial tension (f_i). (b) Some geometrical quantities are shown.

100 秒程度であった (Fig. 4)。

APF 溶液処理 HAp において, 1 mg/ml の HSA 水溶液漬浸後の落下時間は, 90 ppmAPF 溶液処理および 9,000 ppmAPF 溶液処理の, すべての吸着処理時間においてほぼ 130 秒から 150 秒の範囲であった。しかし, 特に吸着初期段階では, その落下時間にばらつきがみられ, 90 ppmAPF 溶液処理 HAp では, 吸着飽和時の落下時間がやや短かった。0.01 mg/ml の濃度では処理した APF 溶液の濃度により異なる結果が得られた。90 ppmAPF 溶液処理 HAp では, 浸漬時間の増加とともに落下時間は増加した。しかし, その落下時間には大きなばらつきが観察された。9,000 ppmAPF 溶液処理 HAp では, その落下時間は, 1 mg/ml の HSA 水溶液に漬浸した場合と

比較して変化がみられなかった (Figs. 5, 6)。

考 察

1. 各種 HAp と蒸留水の系における改良液膜落下法と接触角法との比較

今回実験に使用した HAp ブロックは, 下村⁹⁾が X 線回折測定, 電子顕微鏡観察, X 線光電子分光分析, 接触角, ゼータ電位などの面から分析を行い, タンパク質吸着実験にエナメル質代用試料として使用可能であることが明らかな材料である。まず, 改良液膜落下法の落下時間とぬれとの関係を明らかにするために, 接触角法で測定したぬれ特性が高・中・低と異なる 3 種類の表面ぬれ

Fig. 3 Contact angles of a water drop for treated hydroxyapatite by the SDM versus dropping times by the DTM in water for treated hydroxyapatite.

(■) silica glass pasted hydroxyapatite, (●) acid treated hydroxyapatite, (▲) untreated hydroxyapatite. Three trials are shown in the figure.

Fig. 4 Dropping times of the liquid film on untreated hydroxyapatite in HSA aqueous solutions.

(◆) 1 mg/mL, (○) 0.01 mg/mL. Three trials are shown in the figure.

Fig. 5 Dropping times of the liquid film on 9,000 ppm APF solution treated hydroxyapatite in HSA aqueous solutions.

(◆) 1 mg/mL, (○) 0.01 mg/mL. Three trials are shown in the figure.

Fig. 6 Dropping times of the liquid film on 90 ppm APF solution treated hydroxyapatite in HSA aqueous solutions.

(◆) 1 mg/mL, (○) 0.01 mg/mL. Three trials are shown in the figure.

特性をもつ HAp の落下時間を測定した。

無処理 HAp のように, SDM による測定において高い接触角をもつ, すなわち疎水性表面をもつ場合では, 改良液膜落下法による落下時間は非常に短く, シリカガラス貼付 HAp のように低い接触角をもつ, すなわち親水性表面をもつ場合では落下時間は長い。また, 中間の接触角をもつ酸処理 HAp では, 落下時間は中間の値を示した。このことから, 接触角と改良液膜落下法による落下時間は, 接触角が大きくなる(疎水性)ほど落下時間が短くなるという逆相関関係にあることが分かった。

以上の結果から, 接触角と改良液膜落下法による落下時間は強い相関をもつことがわかる。このことから, 改良液膜落下法により, 光を透過しない固体表面が疎水性であるか親水性であるかを判定できることを確認した。

2. 1 mg/mL HSA 水溶液浸漬後の吸着タンパク質表面のぬれ性状の変化

1 mg/mL の高濃度の HSA 水溶液に浸漬した場合, HAp 吸着 HSA 表面は, APF 溶液処理濃度および浸漬時間にかかわらず非常に親水性となるという結果が得ら

れた。川崎¹¹⁾によると、タンパク質が吸着した表面を一旦乾燥させると、タンパク質のコンフォメーションが変化し疎水性残基が外側にあらわれるため、その表面性状は疎水性となるが、液膜落下法による測定では、固体表面に飽和吸着したタンパク質は、その吸着媒にかかわらず、親水性表面をもつと報告している。筆者らの今回の報告においても、HAp に飽和吸着したタンパク質表面は親水性であるという結果が得られている。すなわち、吸着タンパク質表面を乾燥させることなく、非破壊で測定可能な改良液膜落下法は、ネイティブに近い状態での測定が可能であるためこのような結果が得られたと考えている。

Ericson ら²⁴⁾は、HAp よりフッ化物処理 HAp の方が唾液由来タンパク質の吸着が少ないことを報告し、平塚ら²⁵⁾も、HAp を APF 処理することによって、タンパク質吸着は抑制されると報告している。一方、Kandori ら²⁶⁾は、HAp を高濃度フッ化ナトリウムで処理することによって、ウシ血清アルブミンの吸着量が急激に増大することを報告しており、太口ら²⁷⁾はフッ化第二スズ処理により、タンパク質吸着量が増加すると報告している。

今回、吸着 HSA 表面が親水性を示したことは、HSA の吸着量が APF 処理溶液処理によって減少しても、吸着 HSA 表面のぬれ性状にはあまり変化を与えないことを意味している。Norde²⁸⁾、Haynes ら²⁹⁾はタンパク質が固体表面に吸着することによって α -helix 構造が破壊され、溶液中の分子構造とは違った形態を示すことを報告しており、Kondo ら³⁰⁾は、ウシ血清アルブミンがシリカガラス上に吸着すると、そのコンホメーションが変化することを報告している。すなわち、タンパク質は吸着することによって、そのコンホメーションがさまざまなケースにおいて変化することがわかっている。今回吸着 HSA 表面が親水性を示したことは、HAp 吸着 HSA がコンホメーション変化を起こした結果であり、固体吸着タンパク質の自由表面のぬれ性状が親水性であるという、これまでの報告にはみられなかった傾向を示すものであると考えている。

3. 0.01 mg/ml HSA 水溶液浸漬後の吸着タンパク質表面のぬれ性状の変化

0.01 mg/ml の低濃度の HSA 水溶液に浸漬した場合においては、無処理 HAp と 90 ppmAPF 溶液処理 HAp は、ともに浸漬時間の増加に伴い、その落下時間も増加する結果が得られた。この結果より吸着処理時間の増加に対応したぬれ性状の変化が改良液膜落下法により測定可能であることがわかった。また、90 ppmAPF 溶液処理

HAp の場合では、無処理 HAp の場合と比べ、その落下時間にややばらつきがみられるが、これは、90 ppmAPF 溶液処理では、HAp 表面が均一に処理されず、一様な表面が得られていないことに起因すると考えている。

9,000 ppmAPF 溶液処理 HAp では、その落下時間は浸漬時間に依存せず、1 mg/ml の HSA 水溶液に浸漬した場合と近似し、非常に長い落下時間を示した。平塚ら²⁵⁾は、HAp を高濃度 APF 処理することによって、タンパク質吸着は抑制されると報告しており、森野ら³¹⁾による原子間力顕微鏡観察では、APF 溶液処理 HAp 表面の形態は球状を示し、また、加藤³²⁾による報告では表面にフッ化カルシウムが形成されることが明らかとなっており、Kambara ら³³⁾の報告からもその表面は大きく変化することがわかっている。吸着 HSA 表面のぬれ性状が、無処理のものと比べ、非常に親水性であることが示されたことは、高濃度 APF 溶液処理した HAp 表面にフッ化カルシウムが生成されたことにより、形態的および構造的にダイナミックな変化を示し、HSA 吸着後のコンホメーションに大きな変化を与えたものと考えている。

また、Busscher ら¹⁰⁾は、アミノフルオリドなどで歯の表面を処理して表面張力を 50 dyn/cm 以下にすれば、微生物の吸着がエネルギー的に進まなくなると報告している。今回、高濃度 APF 溶液で HAp を処理すると、低濃度 HSA 溶液に浸漬した場合でも、その上に吸着したタンパク質の表面性状が非常に親水性であったという結果を得たが、これは、固体表面と微生物間のインタラクションだけではなく、固体表面に吸着した高分子と微生物との間に働くインタラクションについて重要な情報を与えるものであると考えている。

結 論

1. 改良液膜落下法は、光を透過しない固体表面に吸着したタンパク質の表面性状の測定が可能であること、また、吸着初期段階の時間変化に対応するぬれ性状の変化についての情報も得ることができることが明らかにになった。

2. 高濃度の HSA 水溶液に浸漬した場合、APF 溶液処理濃度および浸漬時間にかかわらず HAp 吸着 HSA 表面のぬれ性状は、親水性の表面をもつことがわかった。この結果は、タンパク質を乾燥させることなく、非破壊で測定可能な改良液膜落下法を応用したことによると考えている。

3. 低濃度の HSA 水溶液に浸漬した場合では、処理した APF 溶液の濃度により、HAp 吸着 HSA 表面のぬ

れ性状は異なる変化をすることが明らかとなった。低濃度 APF 溶液処理 HAp および無処理 HAp においては、浸漬時間の増加とともに落下時間が増加し、吸着量に対応するぬれ性状の変化が測定可能であることがわかった。高濃度 APF 溶液処理 HAp では、高濃度 HSA 水溶液に浸漬した場合とぬれ性状の差がみられず、吸着量が低下しても高濃度 APF 溶液処理によって、HSA の吸着後のコンホメーションに大きな変化を及ぼすことがわかった。

本研究の一部は、文部省科学研究費基盤研究 (B) (2) (課題番号 06454589) によった。

稿を終えるにあたり、ご懇切なるご指導、ご校閲を賜った通産省工業技術院電子技術総合研究所超分子部 松村英夫主任研究官に感謝いたします。

文 献

- Hay, D.I. : The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. Arch. Oral. Biol. **18** : 1517—1529, 1973.
- Mayhall, C.W. : Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth. Arch. Oral. Biol. **15** : 1327—1341, 1970.
- Gibbons, R.J. and Fitzgerald, R.J. : Dextran-induced agglutination of *streptococcus mutans*, and its potential role in the formation of microbial dental plaques. J. Bacteriol. **98** : 341—346, 1969.
- Loe, H., Theilade, E. and Jensen, S.B. : Experimental gingivitis in man. J. Periodontol. **36** : 177—187, 1965.
- von der Fehr, F.R., Loe, H. and Theilade, E. : Experimental caries in man. Caries. Res. **4** : 131—148, 1970.
- 安藤昌俊：合成ハイドロキシアパタイトへのタンパク質吸着に及ぼすフッ素系界面活性剤の影響。歯科医学 **56** : 1—16, 1993.
- 岩井信幸, 三宅達郎：フッ化物処理ハイドロキシアパタイト—細菌間の表面ポテンシャルエネルギー。口腔衛生会誌 **45** : 276—295, 1995.
- 生内信男, 三宅達郎：Mutans streptococci に関する界面電気化学的研究—表面特性に影響を及ぼす因子について—。歯科医学 **59** : 179—192, 1996.
- 下村光延：アパタイト平板の表面性状とタンパク質吸着様相。歯科医学 **59** : 193—201, 1996.
- Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., van der Mei, H.C., van Pelt, A.W.J., de Jong, H.P. and Arends, J. : Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. Appl. Environ. Microbiol. **48** : 980—983, 1984.
- 川崎弘二：フッ素系界面活性剤処理をしたガラス表面へのタンパク質吸着とそのぬれ性状。歯基礎誌 **39** : 605—613, 1997.
- Dean, H.T., Arnold, F.A. and Elvove, E. : Domestic water and dental caries, II, A study of 2832 white children, aged 12—14 years of eight suburban Chicago communities. US. Pub. Health. Rep. **56** : 761—799, 1941.
- Backer-Dicks, O., Houwink, B. and Kwant, G.W. : The results of 6 1/2 years of artificial fluoridation of drinking water in the Netherlands. The Tiel Culemborg experiment. Arch. Oral. Biol. **5** : 284—300, 1961.
- Rolla, G., Hsu, S.D. and Bowen, W.H. : The influence of fluoride on the uptake of protein by hydroxyapatite. Caries Res. **11** : 308—312, 1977.
- 岡西昭典, 熨斗秀光：歯表面の接触角測定および表面自由エネルギーに関する研究。歯科医学 **55** : 19—36, 1992.
- 須沢利郎：吸着・付着。：高分子表面の基礎と応用 (上)。(筏 義人編)pp.247—270, 化学同人, 京都, 1986.
- Bonfield, T.L., Colton, E. and Anderson, J.M. : Protein adsorption of biomedical polymers influences activated monocytes to produce fibroblast stimulating factors. J. Biomed. Mater. Res. **26** : 457—465, 1992.
- Chandy, T. and Sharma, C.P. : Effects of lipoproteins on protein/platelet interaction on polymers. J. Biomed. Mater. Res. **25** : 1085—1094, 1991.
- Merritt, K. and Brown, S.A. : Effect of proteins and pH on fretting corrosion and metal ion release. J. Biomed. Mater. Res. **22** : 111—120, 1988.
- Marshall, K.C. and Cruickshank, R.H. : Cell surface hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interface. Arch. Microbiol. **91** : 29—40, 1973.
- 高分子学会高分子表面研究会：表面現象の解析：高分子表面技術。(高分子学会高分子表面研究会 編) pp. 113—116, 日刊工業新聞社, 東京, 1987.
- Matsumura, H., Kawasaki, K. and Kambara, M. : Wetting of protein-adsorbed solid surfaces studied by a dynamic method. Colloids & Surf B : Biointerfaces **8** : 181—188, 1997.
- Dimitrov, A.S., Kralchevski, P.A., Nikolov, A.D., Noshi, H. and Matsumoto, M. : Contact angle measurements with sessile drops and bubbles. J. Colloids Interfaces Sci. **145** : 279—282, 1991.
- Ericson, T. and Ericson, Y. : Effect of partial fluo-

- rine substitution on the phosphate exchange and protein adsorption of hydroxyapatite. *Helv. Odont. Acta.* **11** : 10—14, 1967.
- 25) 平塚靖規, 神原正樹 : フッ化物処理合成ハイドロキシアパタイトへのタンパク質吸着に関する界面電気化学的研究. *歯科医学* **54** : 315—332, 1991.
- 26) Kandori, K., Sawai, S., Yamamoto, Y., Saito, H. and Ishikawa, T. : Adsorption of albumin on calcium hydroxyapatite. *Colloids & Surf* **68** : 283—289, 1992.
- 27) 太口裕弘, 神原正樹 : SnF₂溶液処理ハイドロキシアパタイトの表面性状およびタンパク質吸着に関する研究. *歯科医学* **54** : 333—346, 1991.
- 28) Norde, W. : Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv. Colloids Interfaces Sci.* **25** : 267—340, 1986.
- 29) Haynes, C.A. and Norde, W. : Structures and stabilities of adsorbed proteins. *J. Colloids Interfaces Sci.* **169** : 313—328, 1995.
- 30) Kondo, A., Oku, S. and Higashitani, K. : Structural changes in protein adsorbed on ultrafine silica particles. *J. Colloids Interfaces Sci.* **143** : 214—221, 1991.
- 31) 森野与史緒, 上村参生 : エナメル質表面に生じるフッ素反応生成物に関する研究. *歯科医学* **59** : 169—178, 1996.
- 32) 加藤直樹 : リン酸酸性フッ化ナトリウム溶液処理合成ハイドロキシアパタイトの表面性状に関する研究. *歯科医学* **52** : 541—561, 1989.
- 33) Kambara, M. and Norde, W. : Influence of fluoride applications on some physicochemical surface properties of synthetic hydroxyapatite and human dental enamel and its consequences for protein adsorption. *Caries Res.* **29** : 210—217, 1995.