

チタンと生体組織の界面構造

村上 晃一・鵜飼 英實*

石川島播磨重工業株式会社航空宇宙事業本部技術開発センター ☎ 188-8555 東京都田無市向台町 3-5-1

*石川島播磨重工業株式会社技術開発本部基盤技術研究所 ☎ 135-8732 東京都江東区豊洲 3-1-15

(1999年6月5日受付; 1999年8月5日掲載決定)

The Interface Structure between Titanium and Living Cell MC3T3-E1

Kouichi MURAKAMI and Hidemi UKAI*

Research & Engineering Centre, Materials Technology Department, Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd.
3-5-1 Mukoudaicho, Tanashi, Tokyo 188-8555

*Research Institute, Materials Technology Department, Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd.
3-1-15 Toyosu, Koutou-ku, Tokyo 135-8732

(Received June 5, 1999; Accepted August 5, 1999)

The interface between metallic materials, especially titanium, and living cells (osteogenic cell) was investigated using a high-resolution transmission electron microscope, in order to establish the mechanism of the bio-compatibility for metals. At the titanium/cell interface there is an intermediate layer whose thickness is several ten nm involving not only metallic elements but also cell original elements. The intermediate layer does not have long/short range order or is rather complex structure. It is concluded that this intermediate layer is a mixture of titanium oxide and organic materials, which precipitates during cell culture. This precipitation of mixture is one of the advantages for titanium's bio-compatibility. It is not cleared that calciumphosphate, one of the main composition of bone, precipitation on the surface on the material has any responsibility for bio-compatibility.

1. 緒 言

人工骨、関節、歯根など生体内に埋入される硬組織代替生体材料として臨床的に成功している金属材料の多くは生体環境において優れた耐食性を有している。言い換えれば、金属→生体への影響、生体→金属の影響などの問題が顕著ではなく、互いに独立して存在しうる材料が生体用金属材料として選択されてきた。ゆえに従来、生体用金属材料と生体とは互いに不可侵 (bio-inert) であると理解され、耐食性と生体親和性はほとんど同義に使われてきた。しかし近年、金属材料の中でも経験的に生体になじみのよいチタンについて、その生体親和性の由来について研究が進み、単なる耐食性だけが生体親和性の由来ではないことが明らかになってきた。すなわち材料の生体親和性は生体液中における材料の表面反応と密

接な関係がある¹⁻³⁾。チタンでは生体内で材料表面に骨の無機主成分リン酸カルシウム (CaP) が析出し、このCaPを介して生体組織、特に骨組織と弱いながらも化学的に結合する可能性が指摘されている⁴⁻⁵⁾。ただし析出するCaPは、通常X線光電子分光分析 (XPS) など表面に敏感な分析手法を用いないと存在が確認できないため、nm以下のオーダーの析出厚さであると予想されている。この生体組織と結合する能力 (bio-activity) に関する研究はCaPを成分として含有するセラミックス系の材料で精力的に行われている。これらの材料では材料表面に析出した厚さ μm オーダーのCaPを介して骨組織と結合することが、透過電子顕微鏡による直接観察によって証明されている^{6, 7)}。セラミックス系の材料では材料からのCaP溶出と再析出がそのメカニズムとして提唱されているが、Ti表面でのCaP析出メカニズムは、CaPを成分として含有するセラミックスとは原理的に異なっていると考えるのが妥当であろう^{8, 9)}。近年著者は十

E-mail: murakami_k@ihi.co.jp

数種類の純金属を模擬生体液中に浸漬し、その表面反応を詳細に調べた結果、4a, 5a, 6a 遷移金属、特に Ta, Hf などチタンと同様、生体液中で表面に酸化性不働体皮膜を形成する金属では CaP の析出が顕著に認められることを明らかにした¹⁰⁾。この反応は電気化学的に著しく貴であるがゆえに生体液中で耐食的である Au, Pd, Pt などの硫化反応や何も析出しないといった挙動とは本質的に異なっており、チタンの不働態被膜の変化、触媒的性質などが CaP 析出と密接に関っていると考えられている。しかしそのメカニズムについては不明な点が多い。

チタンではこの先験的に備わっている CaP 析出能力を高め、bio-activity を向上させるための種々の表面処理方法が開発されている^{11~14)}。

ところで生体内にインプラントされたチタン周囲の細胞組織を透過型電子顕微鏡にて生体組織学の観点から注意深く観察したいいくつかの報告によれば、チタンと生体組織の間には 10-50 nm 程度の生体組織に比してきわめてコントラストが濃く、内部構造の見られない均質な層の存在が確認されている^{15, 16)}。この層は生物学的に意味のある構造や器官が認められないために「生物学的無構造層」と呼ばれ、この層を介して生体組織がチタンと接していることが予想されている^{15, 16)}。しかし、この層と上記に述べた材料表面に析出する CaP との関係は必ずしも明らかとはなっていない。少なくともこの「生物学的無構造層」における CaP の存在を示した例を著者は知らず、この層の本質的な理解もなされていないようである。したがって生体用として用いられている金属材料における生体親和性の由来は CaP の析出以外にも何らかのメカニズムが働いている可能性がある。

金属材料では材料と生体組織の機械強度、物理的・化学的強度が大きく異なるため材料/生体組織界面を含み、かつ電子線が透過できる十分な薄さの試料の作成がきわめて困難である。そのため金属蒸着膜上での細胞培養試料以外、未だ材料・生体組織界面の直接的な観察は行われていない¹⁵⁾。蒸着膜の表面はバルク試料の表面を必ずしも再現しているとはいえ、さらにこれらの観察例も生物組織学の観点から行われたものがほとんどであり、材料と生体組織の原子レベルでの観察ではない。したがって金属材料と生体組織との化学的な結合はセラミックス系の材料のように直接証明されているわけではない。CaP の析出があったとしてもその量はきわめて少量でありチタンが直接生体と結合している可能性には否定的な意見も少なくない。

以上の背景をもとに本研究では生体環境におけるチタンの表面状態の変化を高分解能透過電子顕微鏡による直接観察ならびに EDX による成分分析によって解析し、

その良好な生体親和性の由来を明らかにすることを目的とした。生体環境としては骨芽細胞様細胞培養を用いた。細胞培養試験はいわゆる *in-vitro* 試験（生体外試験）であり厳密な意味では生体内の環境とは異なる。しかし、以下詳述するように、バルク状チタンの表面構造を生体細胞が付着したまま直接観察しうる試料作成が可能な方法であり、これを試みた。

2. 実験方法

実験に供した試料は厚さ 0.5 mm の商用純チタン (ASTM Grd. 1: Table 1) である。耐水エメリー紙で #1200 まで研磨後、0.3 mm ダイヤモンドペーストにて鏡面研磨した。研磨後の試料はアセトン、エタノール、純水でそれぞれ 0.6 ks 以上超音波洗浄後、Ar ガス吹き付けにより乾燥、細胞培養までの間、シリカゲルとともに密閉容器にて保管した。チタン試料は細胞播種直前に 393 K に加熱したオートクレーブにて 0.6 ks 滅菌した。

滅菌後のチタン試料を、チタン試料と同様のオートクレーブ滅菌処理を行ったペトリディッシュに静置し、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を 10^4 Cell cm^{-2} 播種、牛胎盤を含有する α -MEM 細胞培養液を用いて試料上で培養した。細胞播種後 5% CO_2 を含む空気中で 310 K に保持、集密後 1.21 (14 days) Ms 培養した。培養後の細胞は臨界点乾燥、上昇エタノール系列で脱水、2% オスミウム酸で固定した。この一連の処理において培養細胞はチタン試料より剥離することはなかった。

脱水固定された細胞の付着しているチタン試料を無蒸着にて低電圧走査型電子顕微鏡 (HITACHI: S-800) を用いて、加速電圧 5-10 kV で細胞の形態および試料表面を観察した。

また細胞の付着したままの試料をマイクロームに装着し、ダイヤモンドナイフを用いて厚さ約 20 nm の透過型電子顕微鏡用薄片を作成した。薄片試料は Cu メッシュ上に静置し、細胞付着面に平行な方向からの高分解能透過型電子顕微鏡 (HITACHI: HF-2000) 観察に供した。観察は加速電圧 200 keV で行った。顕微鏡内で結像された情報は通常の銀塩写真として記録するほかに 120 万画素のスロースキャン CCD カメラからオンラインでコンピュータに記録し、解析に用いた。また微小領域の元素分析を EDX にて行った。分析に用いた電子線プローブサイズは直径約 1.5 nm である。また試料表面の分析を XPS (PHI: ESCA-5560) によって適宜行った。

Table 1 Chemical composition (wt %).

H	C	N	O	Fe	Ti
0.001	0.005	0.01	0.07	0.04	bal.

3. 実験結果

3.1 チタンの表面構造

Fig. 1 A は研磨のみを行った後 Ar 気流中で乾燥させた試料表面（以下無処理材とよぶ）の高分解能透過電子顕微鏡像である。表面より約 5 nm の範囲には長範囲の規則構造が見られないが、より深い領域では格子間隔 0.224 nm の明瞭なチタン格子像（110）が観察される。この表面近傍の不規則構造領域のフーリエ変換（FFT）パワースペクトルをとるとブロードながらリング状の像が現れる（Fig. 1 B）。この領域の EDX 分析を行うと Ti および O が検出される。先のパワースペクトルの解析と合わせるとこの不規則構造層はアモルファス状ルチル構造の TiO_2 と同定できる。この TiO_2 層の厚さ（約 5 nm）は、チタン表面に生成する自然生成 TiO_2 厚さとほぼ等しい。 TiO_2 と金属 Ti の界面は比較的直線的であり、明

瞭である。

3.2 Ti 表面上の細胞の形態

チタン表面で細胞培養を行った場合の MC3T3-E1 の典型的な組織形態（走査型電子顕微鏡 2 次電子像）を Fig. 2 に示す。図はわかりやすいように単独の細胞が存在する場所を示したが、MC3T3-E1 細胞は培養中に互いに重なりあって集積していく性質を有している。図では触手状あるいは繊維状の組織がよく発達しているのがわかる。触手状の細胞組織が薄く広がっている部分では細胞組織と基材であるチタンの明瞭な区別が付きにくい部分が観察される（Fig. 2：矢印）。細胞周囲の試料表面を詳細に観察すると、試料表面は細胞培養前とは異なり研磨傷が目立たなくなっているが数十 nm の微細な凹凸が観察されるようになる。この細胞培養後の試料表面は、あたかもコーティングが施されたようにも見える。このような表面は、細胞を外力によって引き剥がし、細胞下

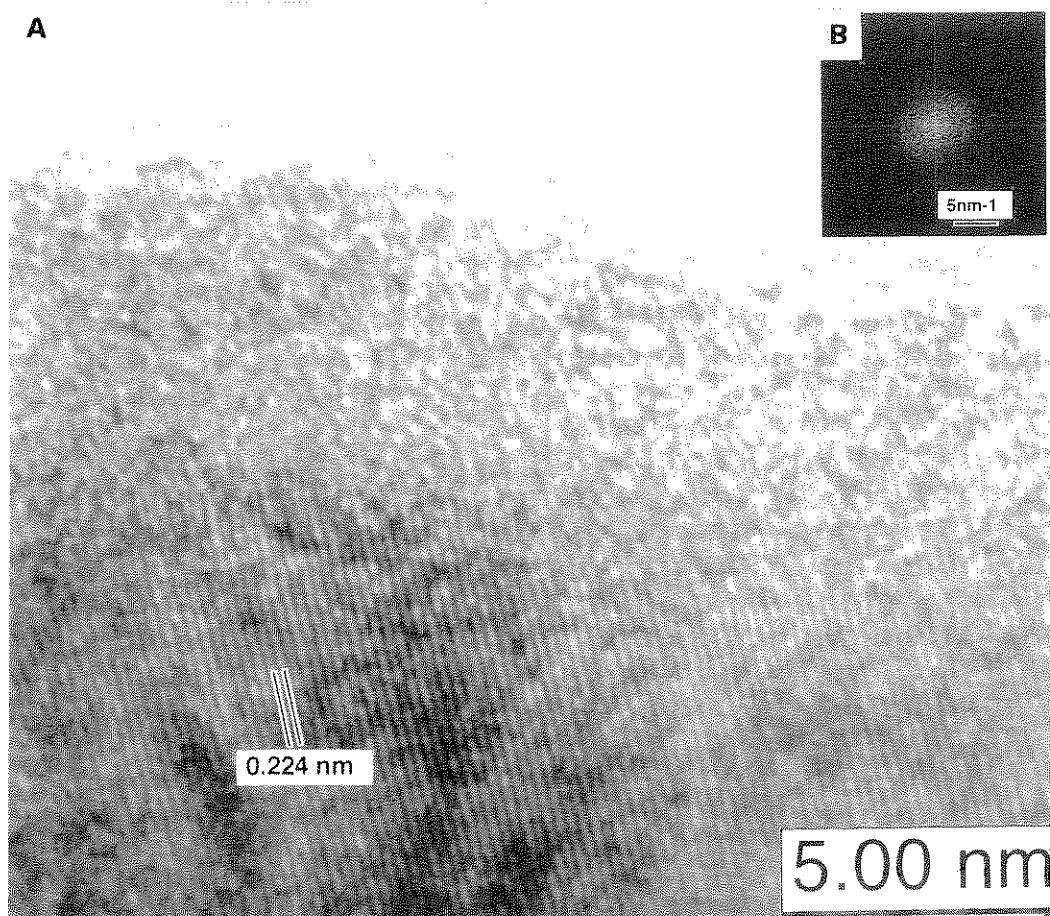


Fig. 1 A: High resolution TEM structure with a lattice image of titanium and amorphous TiO_2 . B: Fast fourier transformation image from the amorphous TiO_2 in the photo A.

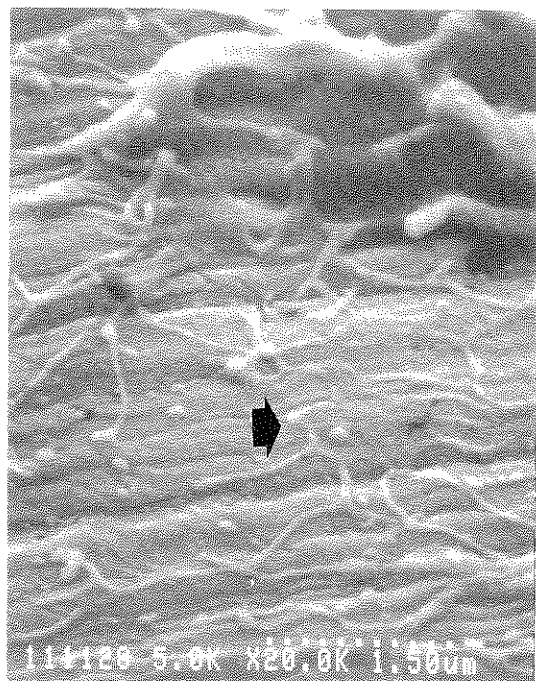


Fig. 2 SEM structure of an osteogenic cell cultivated on the surface of titanium. Arm like structures are well developed, distinguishing cell and substrate is rather difficult (arrow). The titanium surface is seemed to be covered with some precipitates.

のチタン表面を観察しても同様に見える。

3.3 チタンと細胞の界面

Fig. 3 は細胞培養後チタン試料切片の表面近傍の透過型電子顕微鏡像である。コントラストの差としておよそ 3 層、図中下から最も濃いコントラストの層 (A 層)、厚さ 20~30 nm の中間層 (B 層) およびコントラストの薄い C 層が観察される。中間層 B はさらに不明瞭ながら 2 層 (A 層に近い内層、C 層に近い外層) に分けられるように見える。Fig. 3 中の P1-P7 は EDX 分析点を示す。図中の丸の大きさは電子線プローブ径に相当する。EDX 分析結果から O, C, Cu を除いて検出された元素を相対原子百分率で示したものが Fig. 4 である。O, C を除いたのは厚さ 30 nm 以下の薄片試料では大気中での表面汚染や酸化の影響を無視できないためである。また試料を載せた Cu グリッドからの Cu がバックグラウンドとしてほとんど全ての分析点に現れるためこれも除いた。図中に示された元素以外はいずれの試験片においても Trace 程度しか検出されなかった。

A 層では Ti 以外の元素はほとんど検出されない (Fig. 4: P6, P7)。Fig. 3 の A 層と B 層の境界領域の拡大像

を Fig. 5 に示す。ここでは金属格子の明瞭な部分から、はっきりとした界面が見られないまま、アモルファス状組織に移行している。これは Fig. 1 で細胞培養しない金属チタンの格子部分と酸化チタンの領域が比較的明瞭に直線的にわかれていたのとはかなり異なって見える。A 層の格子像の FFT パワースペクトル像を解析すると Ti が同定される (Fig. 6: A)。B 層中には不明瞭ながら格子像が見られる場所 (Fig. 5: B1 枠で囲った領域) と、ほとんど構造の見られない場所 (Fig. 5: B2 枠で囲った領域) が混在している。領域 B1 を FFT 解析するとルチル構造の TiO_2 が同定できる (Fig. 6: B1)。また領域 B2 の FFT 解析ではハローと不明瞭ながら 5 nm 前後の格子間隔をもつ構造の存在が確認できる (Fig. 6: B2)。しかし EDX 分析結果と合せてその詳細な構造解析はできなかった。これらの構造解析結果は、無処理材のアモルファス状の酸化チタンのリング状 FFT パワースペクトルとかなり異なって見え、この B 層が自然酸化皮膜のアモルファス TiO_2 とは異なっていることがわかる。

Ti の量は A 層すなわち金属 Ti の領域から遠ざかるにつれて減少し、C 層の外側 (P1) では trace 程度になる。A 層ではまったく検出されなかった Os が B 層では検出され、A 層から離れるに従いその量は増加している。この Os は細胞固定に用いたオスミウム酸由来である。オスミウム酸は細胞壁の脂質成分と結合し細胞固定を行うとされている。したがって Os の存在は間接的に細胞壁の存在を意味している。ところで細胞培養後の試料は主として生物組織観察に必要な化学処理が施される。そのため細胞培養以外の化学処理 (滅菌、 α -MEM 浸漬、脱水、固定) によってチタン酸化膜が変化し、Os が検出された可能性を否定できない。そこで細胞培養以外の上記一連の化学処理を (細胞培養のかわりに牛胎盤を含む α -MEM への浸漬を 2 週間実施) 細胞培養材とまったく同様に行った試料について XPS 分析を行った (Fig. 7)。図では Os 2p の結合エネルギー領域のスペクトルを示すが、その存在は確認できない。したがって細胞培養液浸漬から組織観察にいたる一連の化学処理を行っても、Os と Ti は結合することはないと結論できる。したがって Os の存在は細胞組織の存在を間接的に証明しているといえる。また細胞培養には牛胎盤を添加しているため、この牛胎盤の脂質吸着により Os が検出されるのであり、細胞の存在とは無関係である可能性もあるが、Fig. 7 の結果はこの可能性を否定している。したがってこの B 層はチタン表面と生きた細胞の反応生成物である考えることが妥当であろう。

Fig. 8 は B 層と C 層の境界部分の拡大と各々の層の代

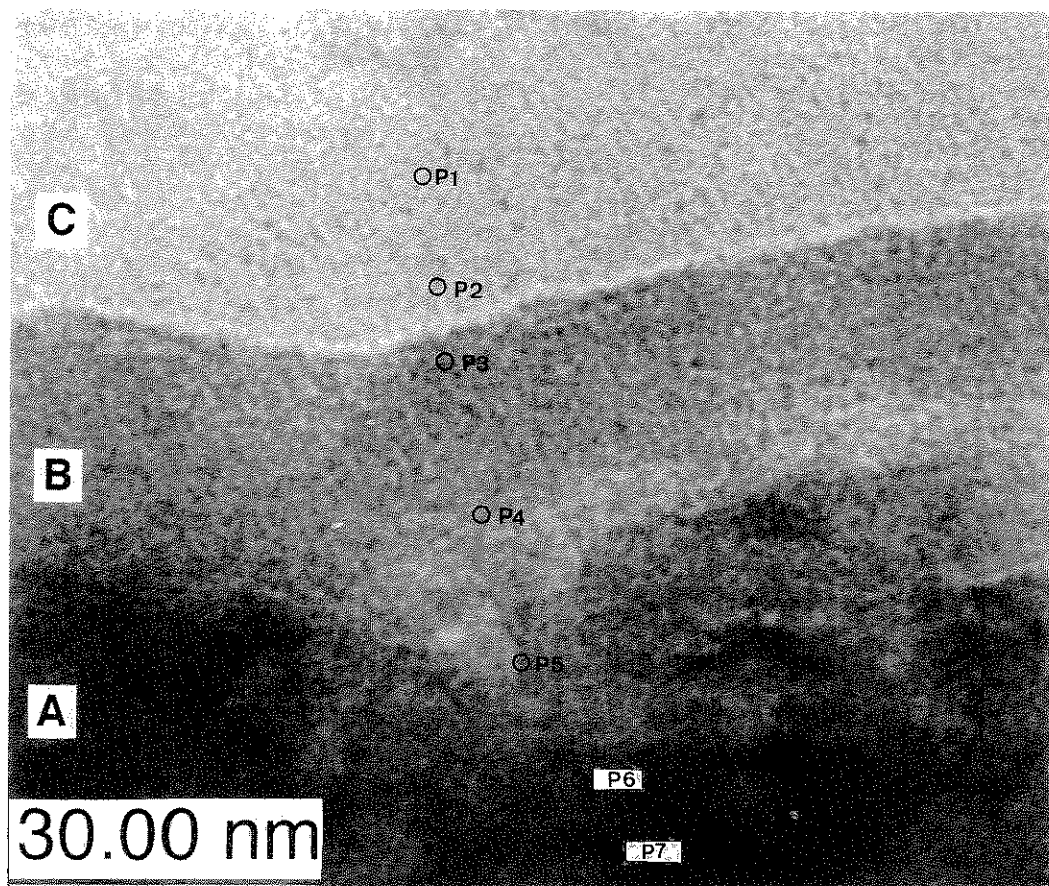


Fig. 3 TEM image of the titanium surface after cell culture. Electron beam is parallel to the surface. Mainly three layers (A, B and C) are found. P 1-P 7 with circles indicate EDX analyzed points.

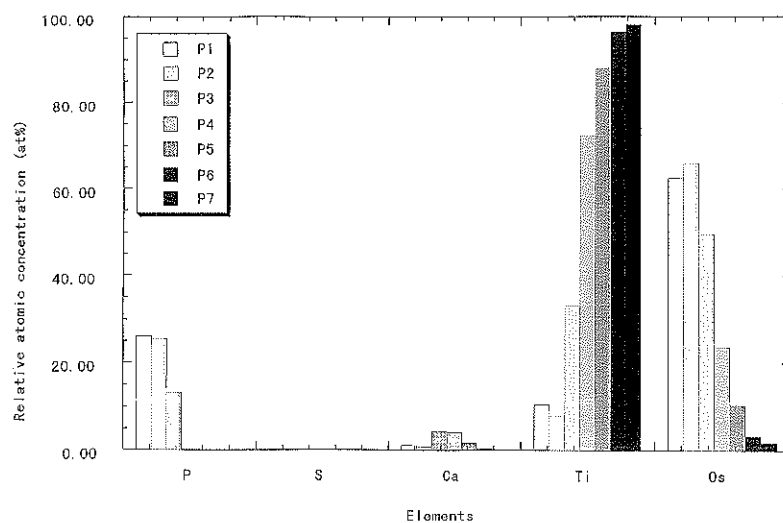


Fig. 4 The summary of the EDX analysis in the area Fig. 3.

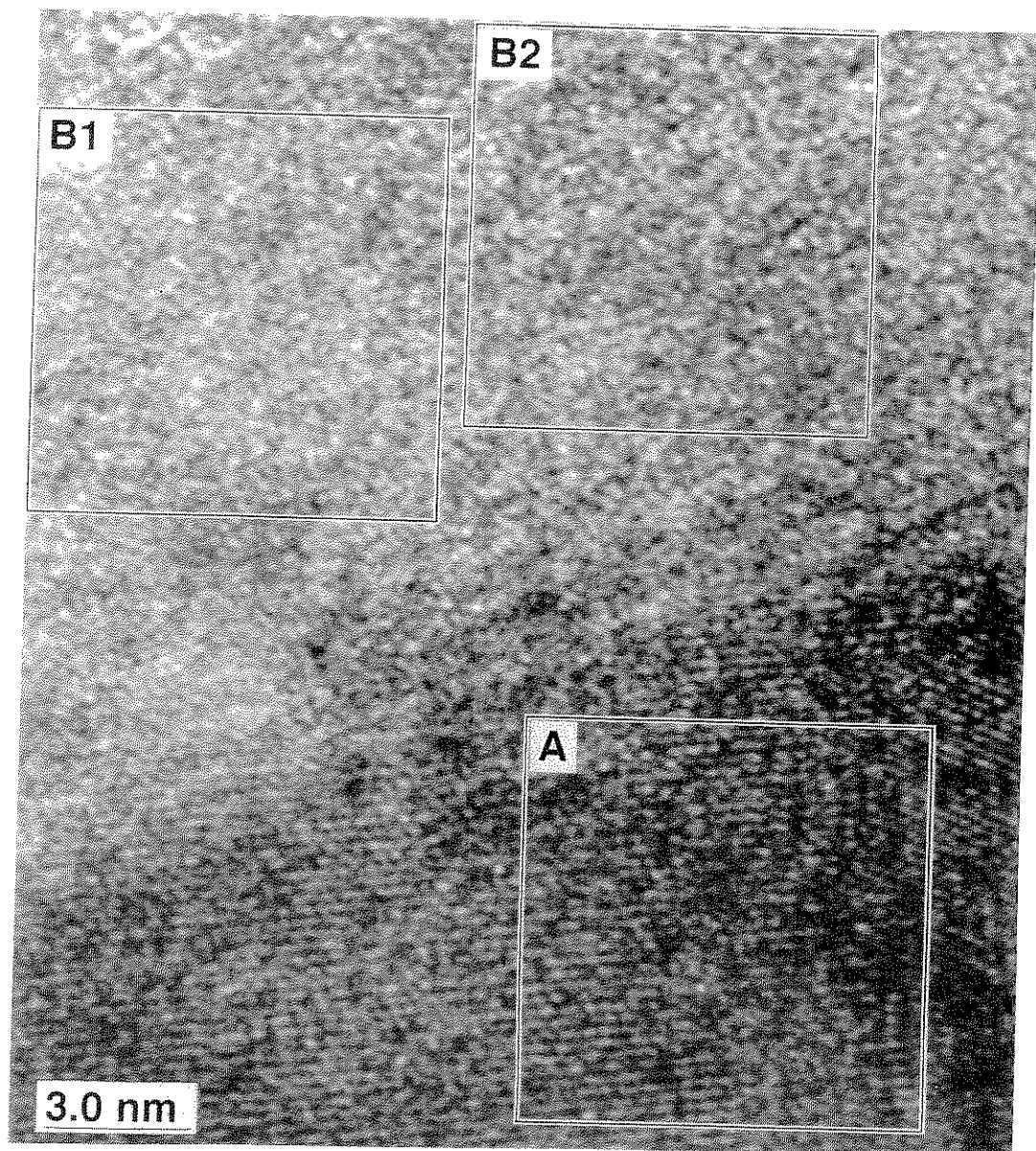


Fig. 5 High resolution TEM image at the interface of the layer A and layer B in Fig. 3. The squared areas A, B 1 and B 2 are FFT analyzed, the results are illustrated in Fig. 7.

表的な領域の FFT パワースペクトル像である。ここに示された B 層は外層側である。この B 層外層部では A、C 層には Trace 程度しか検出されない Ca が検出される (Fig. 4:P3)。また、この B 層外層部には P も検出される。すなわち B 層外層部は Ca と P が同時に存在する唯一の領域である。この領域の FFT パワースペクトルはハローが見られるのみであり短範囲周期構造も有しない無秩序構造である。したがって B 層における Ca と P の

同時存在はリン酸カルシウムの存在を示唆しているもののリン酸カルシウムの存在を示す構造は確認できないと結論される。

B 層と C 層の間は比較的明瞭なコントラストの差が観察される。しかし C 層の FFT パワースペクトルにもハローが見られるだけであり特に目立った構造は見られない。C 層は Os と P がその主たる構成元素である。Os は先に述べたように細胞壁の存在を間接的に意味してい

る。またPはリン脂質などの形で細胞壁に特に多く含まれている。したがってOs, Pがその主成分であり, Tiなどが含まれていないこの層が細胞壁の一部である可能性は高い。

性は高い。

これらの観察結果より金属Tiと細胞の間にはチタン酸化物と細胞脂質の混合物(あるいは化合物)であるB層が厚さ20-30 nm程度存在していることがわかった。したがってこのB層がインプラントされたチタンと細胞の境界に認められると報告されている, 生物学的に無構造な層(厚さ: 10-50 nm程度)と同等である可能性はきわめて高い。

以上に示したようにチタンと細胞の界面は, 従来考えられていたような「酸化チタンの不働体皮膜の上に生体分子が吸着し, その上に細胞が横たわる」といった単純な構造ではなく, 金属チタン上に脂質とTiO₂を構成物質とする境界層が生成し, その上に細胞が横たわっている, という構造になっている (Fig. 9)。

4. 考 察

チタンやステンレス鋼の保護性酸化皮膜は, 生体中でCaとPを特異的にとりこみながら成長することが*in-vitro*だけでなく*in-vivo*でも報告されている。例えば長期間実際に人体に埋入されたチタンやステンレス鋼をAESで表面分析すると, 表面酸化皮膜中にCaとPが多量に検出される⁹⁾。よく知られているようにチタン表面に生成する不働体皮膜は, 生体環境のようにCl⁻等の攻撃性アニオンが存在する環境においては必ずしも不変のものではなく, 皮膜の局所的破壊とその修復が繰返されている。したがって生体中ではその皮膜修復過程においてCaとPを取り込んでいることが予想される。生体液はCaPに過飽和であるから核生成サイトの提供と駆動力が与えられればCaPは容易に析出することができる。したがって酸化皮膜の破壊と修復反応が析出の駆動力となっている可能性がある。

本研究ではチタン酸化皮膜の破壊と修復過程において

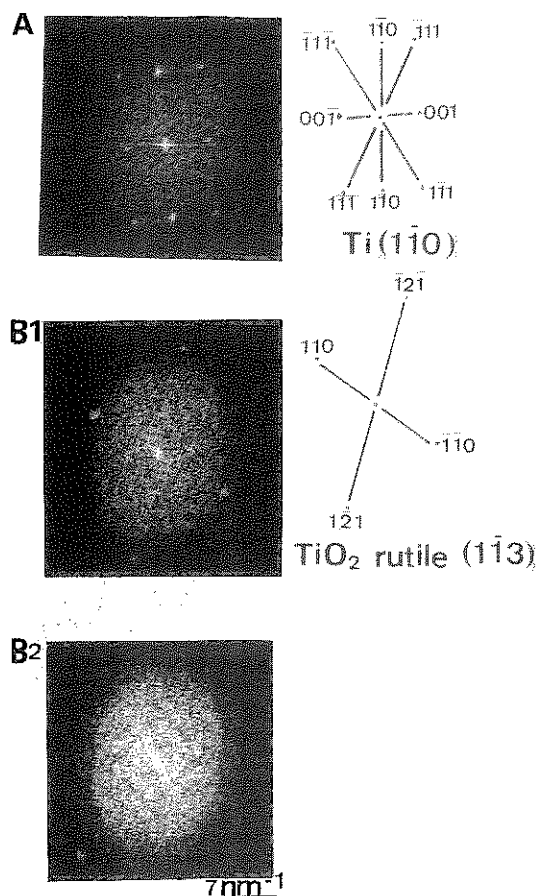


Fig. 6 FFT power spectra from Fig. 6 squared areas.
A: Ti. B 1: TiO₂ rutile. B 2: unidentified.

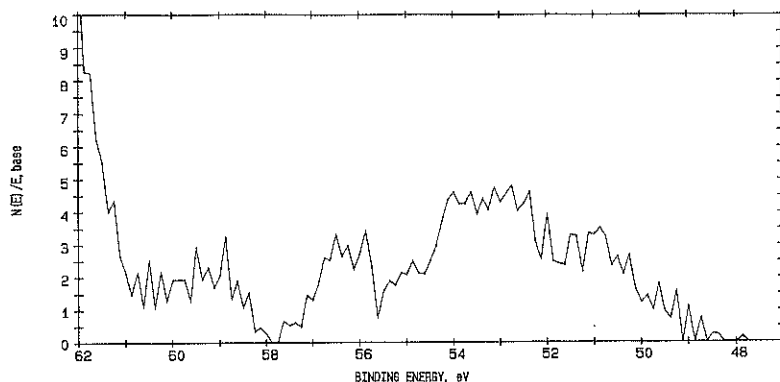


Fig. 7 XPS spectrum around the Os P2p binding energy from the titanium surface having each chemical treatment to observe cell/titanium interface except cell culture.

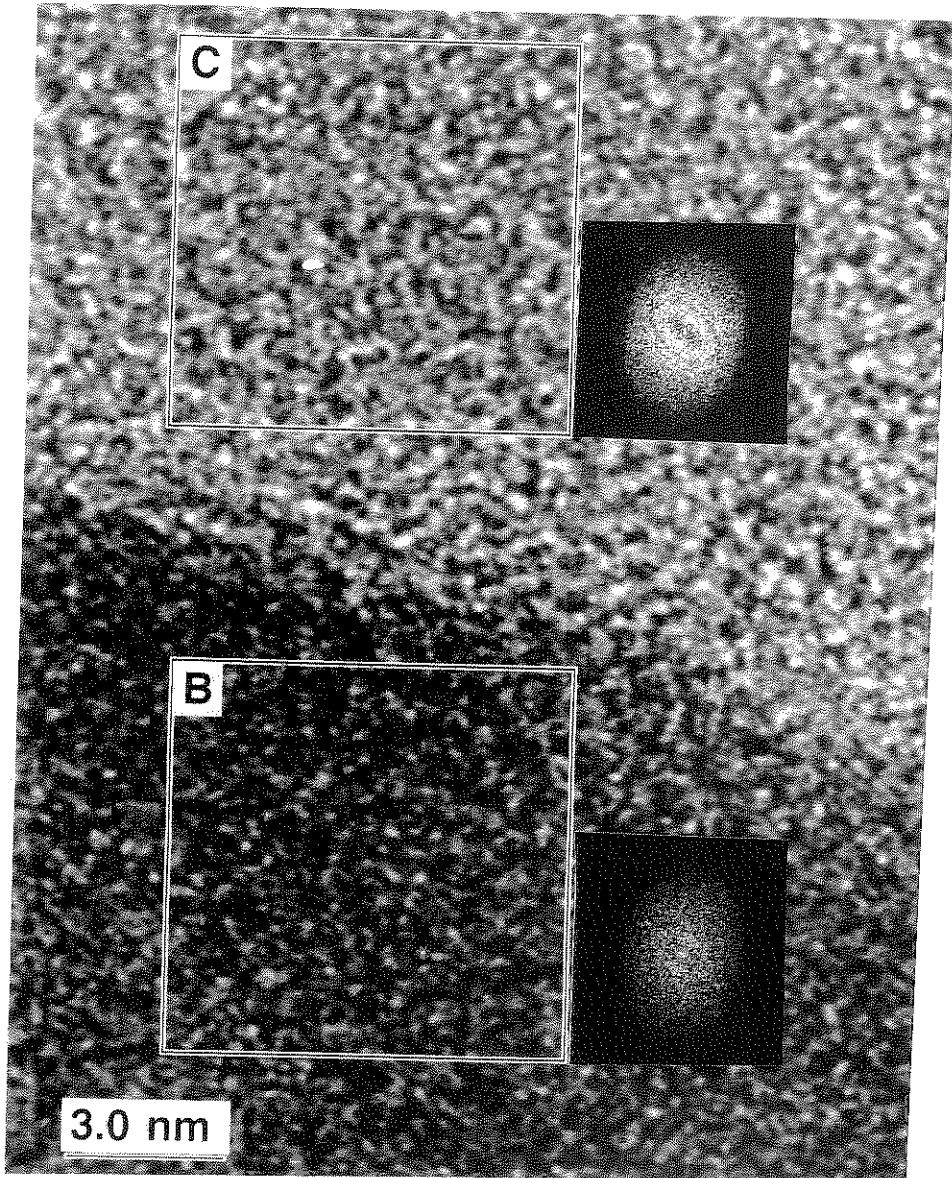


Fig. 8 High resolution TEM image at the interface of the layer B and layer C in Fig. 3. The squared areas B and C are FFT analyzed, the results are illustrated besides the squared areas in the figure.

上記の CaP といった無機成分のみならず有機成分の取り込みも生じている可能性を明らかにした。しかもこの反応は単純に有機物を含むだけの液への浸漬では生じない。生体細胞の関与がある時に限り細胞/金属チタンの界面に TiO_2 と脂質の混合物と考えられる界面層が生成するのである。この界面層には Ca と P が存在するが、その量は僅かでありかつきわめて薄い層にのみ局在しており、Ca や P がリン酸カルシウムとして存在するかどうかは確認できなかった。また脂質が酸化物/金属界面

の極近傍、原子レベルでほぼ接するところまで存在しているという結果は、チタン表面に当初存在していた酸化皮膜は細胞培養中に完全に破壊され再構築（修復）されているということを意味している。

ゆえに本研究結果は脂質のような生体高分子の取り込みが酸化物成長の過程で大規模に行われており、Ti の良好な生体親和性の由来は CaP の析出よりも生体高分子の取り込みの方がより本質的であるということを強く示唆している。そこで以下にこの酸化皮膜の破壊修復 ki-

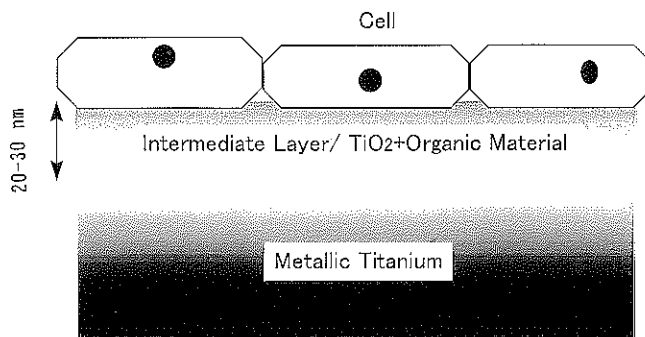


Fig. 9 Schematic illustration of the cell/titanium interface at the nano meter scale.

netics が妥当なものであるかどうか検討する。

チタンの不働態保持電流密度 i は海水程度の塩水環境では浸漬後徐々に減少することが知られ、278 K (PH 8.09–9.68) では i を浸漬時間として概ね、

$$i = 10 \times t^{-1} \quad (\text{A m}^2)$$

程度として記述できる^{17, 18)}。生体液中での不働態保持電流密度を測った例を著者は知らないが以下、上記の値と同程度であると仮定する。

この電流がすべて金属 Ti 溶解のアノード反応に費やされ、皮膜が均一に溶解するものとして、Ti の原子量 M 、密度 ρ 、電荷 n 、ファラデー乗数を F とすれば単位時間あたりの溶解深さ L は

$$L = 10 Mi (\rho n F)^{-1}$$

浸漬時間は集密+集密後 14 日間培養の合計 20 日間 (1.73 Ms) 程度、浸漬直後の i を $1 (\text{A m}^2)$ とすれば培養期間中の Ti の溶解量 (溶解深さ) L は

$$L = \int 10 M (\rho n F t)^{-1} dt \\ \approx 2.7 \times 10^{-9} \quad (\text{m})$$

すなわち 20 日間の培養中に厚さ数 nm の自然酸化皮膜は完全に破壊修復されるということは妥当であるといえる。詳細な電気化学的考察は、細胞培養中の不働態保持電流密度測定を行っていないため本稿ではこれを避けるが、いずれにせよこの酸化膜の成長と、成長に伴う生体高分子の取り込みがチタンの生体親和性の大きな鍵となっていると考えられ、チタンは生体内で生体細胞と結合できる可能性のある bio-active な材料であるといえることができる。金属チタンそのままではこれまでの臨床経験からみても nm オーダー程度の材料/細胞の結合が達成される程度のきわめてミクロな bio-activity が達成されるだけであろう。しかしチタン表面の不働態皮膜再生反応 kinetics を制御することにより生体に有益な生体由来物質をより積極的に取り込むことができれば、金属においてもマクロな bio-active な性質が獲得できる可能性が

あろう。

5. 結 論

チタンの良好な生体親和性の原因を明らかにするために生体環境 (*in-vitro* 細胞培養試験) におけるチタンの不働態皮膜の変化を高分解能透過電子顕微鏡 (HR-TEM) による直接観察ならびに EDX による成分分析によって解析した。骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を培養後の商用グレード純チタン板の表面構造を生体細胞が付着したまま細胞/金属界面が直接観察し以下の結果を得た。

- (1) チタン表面で細胞培養を行った場合の MC3T3-E1 は触手状、繊維状の組織がよく発達している。細胞培養後の試料表面はコーティングされたように見える。
- (2) 細胞培養後の Ti 切片表面近傍の高分解能電子顕微鏡組織から金属チタンと細胞組織の間に TiO_2 と細胞組織の一部が混在する厚さ 20–30 nm の層が存在する。これは通常の金属チタン表面酸化皮膜とは組成、構造ともに異なっている。
- (3) TiO_2 と細胞組織の一部が混在する組織の外層 (細胞に近い領域) では Ca と P が検出される。
- (4) 細胞培養中の Ti の酸化皮膜は生体高分子を取り込みながら成長する。この生体由来の物質のとりこみによる酸化皮膜の存在がチタンの生体親和性の由来であると推察される。

謝 辞

本稿の執筆にあたって実験・考察・ディスカッションのすべてにわたって多大なるご協力をいただいた金属材料技術研究所 堀 隆夫博士、立命館大学教授 鈴山 恵教授、徳島大学歯学部 山下菊治助教授、浅岡憲三教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 埴 隆夫：バウンダリー 2, 34 (1991).
- 2) L.M. Bjursten and P. Tengvall: "The Bone-Biomaterial Interface", ed. by J.E. Davies (University of Toronto Press, Toronto, 1991) p. 165.
- 3) 埴 隆夫：日本金属学会会報 31, 62 (1992).
- 4) T. Hanawa and M. Ota: Biomaterials 12, 767 (1991).
- 5) T. Hanawa and M. Ota: Appl. Surf. Sci. 55, 269 (1992).
- 6) 青木秀希, 赤尾 勝, 東方正章, 長谷川清一郎, 請川 洋：セラミックス 24, 614 (1989).
- 7) 木次敏明, 山室隆夫, 中村孝志, 小久保 正, 高木雅隆, 渋谷武宏：臨床整形外科 21, 1249 (1986).
- 8) 埴 隆夫, 太田 守：金属 12, 56 (1991).
- 9) J.-E. Sundgren, P. Bodo and I. Lundstrom: J. Colloid Interface Sci. 110, 9 (1986).
- 10) 鶴飼英實：平成 10 年科学技術振興調整費「QOL を指向した生体融和材料の新創出に関する研究」研究成果報告書 (1999).
- 11) 埴 隆夫, 野田坂佳伸, 鶴飼英實, 村上晃一, 浅岡憲三：生体材料 12, 209 (1994).
- 12) K. Hayashi, K. Uenoyama, N. Matsuguchi and Y. Sugioka: J. Biomed. Mater. Res. 25, 515 (1991).
- 13) 張 翀, 宮路史明, 八尾 健, 小久保 正, 大槻主税：粉末および粉末冶金 41, 664 (1994).
- 14) 大槻主税, 飯田由裕久, 小坂明義：第 16 回日本バイオマテリアル学会予稿集 (1994) p. 134.
- 15) Y. Tsuboi, T. Albrektsson, M. Gottlander, C. Johanson, L. Sennerby and A. Wennerberg: Quintessence Dental Implantology 1, 502 (1994).
- 16) K. Murai, F. Takeshita, Y. Ayukawa, T. Kiyoshima, T. Suetsugu and T. Tanaka: J. Biomed. Mater. Res. 30, 523 (1996).
- 17) 中村規子, 深谷祐一, 中山 元, 明石正恒, 植田浩義：材料と環境 '99 講演集, 99-B-310 (1999) p. 197.
- 18) 深谷祐一：未発表データ.