다공성 3차원 Ti 지지체의 제조 및 알칼리처리에 따른 생체활성 평가

안상현 · 김승언 · 김교한* · 윤희숙 · 현용택[†]

한국기계연구원 부설 재료연구소, *경북대학교 치과대학 치과재료학교실

Fabrication of Porous 3-Dimensional Ti Scaffold and Its Bioactivity by Alkali Treatment

Sang-Hyun An, Seung-Eon Kim, Kyo-Han Kim*, Hui-Suk Yun and Yong-Taek Hyun[†]

Korea Institute of Materials Science, 531 Changwon-daero, Changwon, Korea

*Dept. of Dental Biomaterials, School of Dentistry, Kyungpook National Univ. Daegu, Korea

(2009년 6월 18일 접수 : 2009년 6월 30일 최종수정 : 2009년 6월 30일 채택)

Abstract Ti scaffolds with a three-dimensional porous structure were successfully fabricated using powder metallurgy and modified rapid prototyping (RP) process. The fabricated Ti scaffolds showed a highly porous structure with interconnected pores. The porosity and pore size of the scaffolds were in the range of 66~72% and 300~400 μm , respectively. The sintering of the fabricated scaffolds under the vacuum caused the Ti particles to bond to each other. The strength of the scaffolds depended on the layering patterns. The compressive strength of the scaffolds ranged from 15 MPa to 52 MPa according to the scaffolds' architecture. The alkali treatment of the fabricated scaffolds in an aqueous NaOH solution was shown to be effective in improving the bioactivity. The surface of the alkali-treated Ti scaffolds had a nano-sized fibre-like structure. The modified surface showed a good apatite forming ability. The apatite was formed on the surface of the alkali treated Ti scaffolds within 1 day. The thickness of the apatite increased when the soaking time in a simulated body fluid (SBF) solution increased. It is expected that the surface modification of Ti scaffolds by alkali treatment could be effective in forming apatites in vivo and can subsequently enhance bone formation.

Key words Ti scaffold, alkali treatment, SBF, bioactivity, rapid prototyping.

1. 서 론

최근 손상된 골 조직을 재생 또는 치료하기 위하여 조직공학을 응용한 연구들이 활발히 진행 되고 있다. 손상된 골 조직의 재생을 위해서는 조직 세포의 성장, 분화가 이루어 질 수 있도록 하는 지지체의 개발이 필요하다. 지지체는 조직세포의 부착과 성장이 용이한 구조를 가져야 하며, 인체 내 대사물질의 전달이 가능하도록 적절한 크기의 기공과 이들 기공들이 서로 연결된 다공성 구조를 갖는 것이 바람직하다. 또한 지지체를 체내에 이식할 경우 지지체와 생체조직 사이에 면역반응이 일어나지 않아야 하며, 세포부착, 증식 및 분화가 용이하도록 적절한 표면형상을 가져야 한다.¹⁻³⁾ 현재 조직공학용 지지체 재료로 polylactide (PLA), polyglycolide (PGA), polycaprolactone (PCL) 등과 같은 생분해성 고분자 재료를 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 이러한 고분자 재료는 낮은 물리적 강도로 인해 비교적 큰 하

중을 받는 뼈나 연골재생에 응용하기에는 매우 제한적이다.^{4,5)} 이러한 이유로 경량이면서 우수한 생체친화성과 내식성, 높은 피로강도 및 비강도를 가지고 있는 타이타늄 등을 이용한 다공성 금속 생체재료에 대한 관심이 높아지고 있다. 다공성 금속을 제조하는 방법에는 크게 주조법과 분말야금법이 있는데, 일반적으로 주조법으로 제조된 다공성 금속은 기공간의 상호 연결성과 지지체의 형태학적인 제어가 어렵기 때문에 닫힌 기공 (closed pore) 구조가 생성되고, 이로 인하여 지지체의 내부까지 충분히 세포와 조직의 성장이 되지 않는 단점이 있다. 분말야금법은 기공들이 상호 연결된 열린 기공 (open pore) 구조를 갖는 다공성 금속 제조가 비교적 용이하여 생체조직이 다공질체 내부로 잘 성장하게 할 수 있다. 최근에는 쾌속조형법을 응용하여 3차원적인 형태와 기공 구조 등의 제어가 용이한 다공성 지지체 제조 방법이 보고되고 있다.^{3,6,7)}

임플란트 표면과 골 사이 계면의 골유착 정도는 성공적인 시술을 위한 중요한 요소 중의 하나로 알려져 있다. 성공적인 골유착을 위해 타이타늄 임플란트의 표면을 개선하기 위한 다양한 연구들이 제안되고 연구되어 왔

[†]Corresponding author

E-Mail : ythyun@kims.re.kr (Y. T. Hyun)

Fig. 1. Schematic of modified rapid prototyping machine to fabricate the porous Ti scaffolds.

Fig. 2. Schematics of (a) type 1 and (b) type 2 scaffolds.

다. 표면처리 방법으로는 크게 표면에 다른 물질을 붙이는 방법, 표면 자체의 미세구조를 조절하거나 화학적 특성을 조절하는 방법 등이 있다. 초기에는 타이타늄 표면에 다른 물질들을 붙여서 접촉면적을 넓히고자 하는 연구가 진행되었는데, 한 예로 타이타늄 분말을 고온으로 용융하여 용착시키는 TPS (titanium plasma spay coating) 법은 표면의 거칠기를 증대시킬 수 있으나 부분 또는 완전 용융된 타이타늄 입자로 인하여 표면이 매우 불규칙한 양상을 보인다. 표면에 하이드록시 아파타이트 (hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)를 코팅하는 방법은 생체친화성이 우수하고 골과 구성 성분이 비슷하여 화학적으로 골과 직접 결합하기 때문에 초기 골유착에는 좋은 것으로 알려져 있다. 그러나 시간이 경과하면서 장기적으로 사용될 경우 코팅층과 타이타늄의 표면층 계면에서 박리가 일어나는 것으로 보고되고 있다.^{8,9)} 이러한 문제점으로 인해 최근에는 알칼리 용액을 이용한 화학적 처리 방법이 많이 연구되고 있다. 예를들면, NaOH를 이용하는 알칼리 처리는 수산화기에 의해 Ti의 산화막을 부식시켜 티탄산염 (titanate) 수산화겔 층을 생성하고 불규칙한 기공의 망상 구조를 가지게 된다. Kokubo 등^{10,11)}은 순수 타이타늄을 알칼리 용액에 침적시킨 후 유사체액 (SBF)에 침적시키면 표면과 용액 내 이온과의 정전기적 반응으로 골과

유사한 아파타이트 (apatite)가 생성되고, 이러한 아파타이트의 생성은 골세포의 생성능력을 향상시킬 수 있을 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 분말야금법과 3차원 적층 조형 기술을 이용하여 다공성의 타이타늄 지지체를 제조하고, 제조된 지지체의 생체활성을 부여하기 위하여 알칼리처리를 수행하여 그에 따른 기계적특성과 지지체의 생체활성을 평가하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1 다공성 Ti 지지체 제조

다공성의 Ti 지지체를 제조하기 위해서 클로로포름 (99.0%, DUKSAN, Korea)에 생분해성 고분자 polycaprolactone (PCL, Mw 80,000, Sigma-Aldrich, USA)를 용해시킨 후 약 $45\ \mu\text{m}$ 의 입자크기를 갖는 순수 Ti 분말 (99.0%, Sigma-Aldrich, USA)을 혼합하여 슬러리 형태로 제조하였다. 슬러리 제조에 사용된 고분자와 타이타늄 분말의 비율은 1:4의 질량비로 혼합하였다. 제조된 슬러리를 적층조형장비의 압출용 실린더에 장입 후 일정 압력으로 노즐을 통하여 압출하면서 특정 형상으로 적층하여 Fig. 2에 나타난 것과 같은 형상의 예비 성형 지지체를 제조하였다. 이와 같이 예비 성형된 지지체를 고온 진공 소결로를 이용하여 5×10^{-6} torr의 진공분위기에서 $1200\ ^\circ\text{C}$ 로 2시간 소결하여 3차원 구조를 갖는 다공성 지지체를 제조하였다.

2.2 알칼리처리 및 생체활성 평가

제조된 Ti 지지체의 골유착 능력을 향상 시키기 위하여 5M의 NaOH 용액에 24시간 동안 알칼리처리를 하였다. 알칼리처리가 끝난 Ti 지지체는 증류수에 담귀 초음파세척기를 이용하여 세정하였다. 세정 후 진공건조기에서 $40\ ^\circ\text{C}$ 에서 24시간 건조시켰다.

알칼리처리 된 Ti 지지체의 생체활성을 평가하기 위해 pH와 이온 농도를 인체의 혈장과 유사하게 제조한 유사체액 (Na^+ , $1.42 \times 10^{-1} \text{K}^+$, $5.81 \times 10^{-3} \text{Mg}^{2+}$, $8.11 \times 10^{-4} \text{Ca}^{2+}$, $1.26 \times 10^{-3} \text{Cl}^-$, $1.45 \times 10^{-1} \text{HPO}_4^{2-}$, $7.78 \times 10^{-4} \text{SO}_4^{2-}$, 8.11×10^{-4} and CO_3^{2-} , $4.17 \times 10^{-3} \text{mol/l}$)에서 침적시험을 실시하였다. 다공성 Ti 지지체를 테프론 용기에 넣어 1, 3, 7, 21일 동안 침적 하여 표면변화를 관찰하였다. 유사체액의 pH는 7.40, 온도는 $36.5\ ^\circ\text{C}$ 로 하였고, 유사체액의 농도 변화를 최소화하기 위해 일정한 간격으로 용액을 교환하였다.

2.3 특성평가

본 연구에서 제조된 다공성 Ti 지지체의 적층구조에 따른 기계적 성질을 조사하기 위하여 압축시험을 실시하였

Fig. 3. SEM image of (a) Type 1 (liner structure) (b) Type 2 (crossed structure) and (c) Type 2, obvious at high magnification.

다. 압축시험은 Micro-Load System (UMA, Unitech, Korea)를 이용하여 크로스헤드 속도 0.5 mm/min, 200 kgf 로드셀을 이용하여 60% 변형률까지 수행 하였다. 기공도는 수은압입법 (mercury intrusion porosimetry (Auto - pore IV 9500, Micromeritics Instruments, Norcross, USA))을 사용하여 측정하였다.

알칼리처리한 시편과 유사체액에 1, 3, 7, 21일 동안 침적한 각 시편의 표면관찰을 위하여 주사전자현미경 (SEM, JSM-5800, Jeol, Japan)을 이용하였고, 시편 표면에 형성된 아파타이트의 화학적 조성 및 결정상은 에너지 분산 분광기 (EDS, JXA-8600, Jeol, Japan)와 X-선 회절기(XRD, miniplex, Rigaku Japan)를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 다공성 Ti 지지체의 특성

제조된 다공성 Ti 지지체의 진공소결 후 표면형상 및 소결조직을 주사전자현미경으로 관찰한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 제조된 다공성의 Ti 지지체는 진공소결을 통하여 고상확산에 의한 neck 성장으로 입자들 간에 견고한 결합을 얻을 수 있었다. 진공소결 후 지지체는 소결 전에 비하여 수직방향으로 $0.6 \pm 1.0\%$, 수평방향으로 $11.5 \pm 1.1\%$ 정도의 수축이 발생하였다.

3차원 지지체에서 기공 크기와 기공도는 골유착 (osteo-integration)의 중요한 인자로 인식되고 있다. 골유착 능력이 재료의 생체적합성 (biocompatibility)과 생체기능성 (biofunctionality)을 좌우한다. In vitro상에서 골 조직을 재생하는데 있어 몇몇 연구자들은 3차원의 지지체의 경우 기공 크기가 200~400 μm 일 때가 가장 이상적이라고 보고하였고, Yoshikawa 등은 500 μm 의 기공 크기를 갖는 지지체에서 성공적인 결과를 얻은 바 있다.^{12,13)} 그리고 Hutmacher¹⁴⁾는 조직공학용 지지체의 경우 기공도는 70% 이상, 기공크기 400~900 μm 의 조건을 만족해야 한다고 하였다. 본 연구에서 제조된 Type1, Type2의 지지체의 경우 각각 72%, 66%의 기공도를 나타냈으며 기공 크

기는 모두 약 300~400 μm 범위의 크기를 가지고 있어 조직 대체용 다공성 지지체로 적합한 기공 크기와 기공도를 가짐을 알 수 있었다.

Fig. 4는 적층방식이 서로 다른 두 종류의 Ti 지지체의 압축시험에 대한 결과이다. 축방향의 압축강도는 Type1의 시편의 경우 약 40 MPa 정도인 반면 Type2 시편은 이보다 낮은 약 15 MPa 정도의 값을 나타내었다. 횡방향의 압축강도는 Type1의 시편의 경우 52 MPa의 값을 보였으며, Type2의 시편은 약 40 MPa의 값을 나타내었다. 이와 같은 지지체의 기계적성질의 차이는 적층방식에 따른 변형형태의 차이에 기인한 것으로 여겨진다.

Choi 등¹⁵⁾은 화학적인 방법으로 합성한 hydroxyapatite/PCL 고분자 복합 지지체의 경우 hydroxyapatite 입자가 균일하게 분산된 복합재료를 제조할 수 있었으며, 이 입자의 함량을 10~40 wt.%로 변화시킴에 따라 강도는 2.4 MPa에서 3.7 MPa의 범위에 있는 것을 확인하였다. Lee 등¹⁶⁾은 동결건조방법으로 높은 기공도를 갖는 hydroxyapatite 생체세라믹 지지체를 제조하였는데 제조된 지지체는 56~65%의 기공도를 가졌으며, 기공도에 따라 0.94~17 MPa의 압축강도를 갖는 것을 확인하였다. 일반적으로 생체 세라믹 지지체와 고분자 지지체는 기공도가 큰 경우 매우 낮은 강도를 나타내지만 본 연구에서 제조한 타이타늄 다공성 지지체는 66~72%의 높은 기공도에서도 비교적 높은 강도를 갖는 것으로 나타났다.

3.2 알칼리처리 특성

의료용 임플란트에서 골유착 기간을 단축하는 것은 성공적인 결과를 얻기 위한 중요한 요소이다. 골유착 기간은 임플란트의 표면 특성과 밀접한 관계가 있다. 따라서 3차원 다공성 지지체가 가지고 있는 조직학적 이점에 표면 특성을 변화시켜 골유착 기간을 보다 더 단축시킬 수 있는 가능성을 검토하기 위하여 5 M의 NaOH용액에 지지체를 침적 시킨 후 60 °C에서 24시간 처리하였다. 이렇게 처리된 시편의 표면 형상을 Fig. 5에 나타내었다. 다공성 Ti 지지체 표면에 200~500 nm 간격으로 미세한 3차원의 그물망 형태의 티탄산염 수산화물 층이 생성된

Fig. 4. Compressive strength of Ti scaffolds with different structure; (a) axial load, (b) transverse load.

Fig. 5. Surface morphology of Ti scaffold alkali-treated at 60 °C for 20 hours; (a) $\times 10$ k (b) $\times 30$ k.

것을 알 수 있다. 골유착시 임플란트의 표면과 결합을 하는 조직인 하이드록시 아파타이트 결정 (길이 20~80 nm, 두께 4~6 nm)과 콜라겐 (길이 300 nm)이 나노단위의 구조를 이루고 있기 때문에 임플란트 표면에 나노단위의 구조를 형성시키는 표면처리법이 각광을 받고 있다. 따라서 이러한 나노단위의 구조를 표면에 형성시켜 줌으로써 골유착이 잘 일어난다고 보고되고 있다.^{17,18)} 또한 PCL scaffold의 표면을 나노구조를 갖도록 제어하면 세포의 부착과 증식이 우수하며, 또한 alumina, titania, HA와 같은 세라믹에서도 그들의 결정 크기를 나노스케일로 형성시킨 결과 세포의 부착과 증식이 우수한 것으로 보고되고 있다.¹⁹⁾

Ti 지지체를 화학적 처리방법인 NaOH 수용액 중에서 알칼리처리를 할 경우 다음과 같은 반응으로 표면의 산화막을 변화시킨다.

부동태 피막인 TiO_2 는 NaOH 용액과 반응하여 티탄산염 수산화물을 형성한다. 이러한 NaOH 처리는 Na^+ 이온이 체내의 H_3O^+ 이온과 이온교환 반응이 일어나 Ti-OH 가 표면에 형성된다. 이렇게 형성된 표면은 체내의 Ca^{2+} 이온과 반응하여 비정질의 calcium titanate를 형성한다. 이러한 구조는 체내에서 P^- 이온과 반응하여 비정질의 calcium phosphate를 생성하는데 이는 아파타이트 형태로 바뀌어서 우리 몸의 뼈를 이루고 있는 성분과 강하게 결합한다.

생체활성의 타이타늄을 기초로 하는 재료는 일반적으로 체내에 식립하였을 경우 섬유조직에 의한 뼈와의 분리가 일어나지 않는다. 또한 타이타늄 표면에 아파타이트 층이 형성되면서 섬유성 조직 없이 골형성이 일어난다. 그러므로 식립시 생체재료의 아파타이트 생성능력은 생체활성을 평가하는 중요한 항목 중 하나이다.^{10,11)} 유사체액을 이용하여 in vivo상의 아파타이트 생성 능력을

Fig. 6. SEM image of alkali treated after soaking in SBF for (a) 1 day (b) 3 days (c) 7 days (d) 14 days and (e) 21days.

in vitro상에서 평가가 가능하다. 그래서 본 실험에서는 5 M의 NaOH에서 60 °C로 24시간 알카리처리한 지지체의 생체활성을 평가하기 위하여 유사체액에서 1, 3, 7, 14, 21일간 침적 후 표면의 아파타이트 생성 여부를 관찰을 하였다. Fig. 6에 나타난 것과 같이 유사체액에 침적 후 1일, 3일차에 지지체 표면에 아파타이트가 얇게 형성된 것을 알 수 있다. 유사체액에 침적 후 7일차에서는 표면에 침상의 아파타이트가 형성되었으며, 14일차의 표면은 침상의 아파타이트가 합쳐져 반구모양의 형태로 형성되었다. 21일차 침적한 지지체의 표면에서는 아파타이트 층이 두껍게 형성되었고, 일부 아파타이트들은 표면에 균열이 발생하는 것이 관찰되었는데, 이는 대기 중에서 건조 중에 발생한 것으로 사료된다. 이와 같이 알카리처리한 지지체는 빠른 시간 내에 표면에 아파타이트가 생성되며, 시간이 경과함에 따라 시편전체에 걸쳐 균

일하고 치밀한 아파타이트가 생성되는 것을 알 수 있다.

Fig. 7은 1일, 21일간 침적 후 표면의 EDS 분석 결과이다. 1일간 침적한 시편에서는 Ca와 P의 성분이 낮은 얇은 아파타이트 층이 형성되었음을 알 수 있고, 21일간 침적시킨 지지체의 표면에서는 Ca, P 성분이 높은 두꺼운 아파타이트 층이 형성되었음을 알 수 있다. 유사체액에서 21일간 침적 후 표면의 XRD 관찰 결과를 Fig. 8에 나타내었는데, 표면에 생성된 아파타이트는 하이드록시 아파타이트임을 알 수 있다. Hanawa 등²⁰⁾은 아무런 처리를 하지 않은 TiO₂의 표면에서 아파타이트가 생성되는데 60일이상이 소요된다고 보고하였다. 또한, 양극산화에 의한 나노 기공 사이즈를 가지는 시편의 경우에는 7일 이상 걸린다고 하였다. 본 실험에서 수행한 알카리처리를 통한 타이타늄 지지체의 경우 매우 빠르게 아파타이트가 생성된 것으로 보아 생체적합성이 우수할 것으

Fig. 7. EDS pattern after SBF-treatment for (a) 1day and (b) 21days.

Fig. 8. XRD pattern of the sample after soaking in SBF for 21 days.

로 기대된다. 이는 뛰어난 생체적합성을 가지는 하이드록시 아파타이트를 Ti 지지체에 전기화학적 방법으로 코팅한 시편과 유사한 아파타이트 형성 능력을 가졌다.²¹⁻²²⁾

4. 결 론

본 연구에서는 타이타늄 분말을 이용하여 적층조형공정으로 우수한 기계적 강도를 가지는 다공성 타이타늄 지지체를 제조하였다. 제조된 지지체에 생체활성을 부여하기 위하여 알카리처리 후 유사체액에서 *in vitro*상의 생체활성을 평가하였다. 2가지 형태로 제작된 Ti 지지체는 66-72%의 기공도를 가졌으며, 압축강도는 축방향의 경우 Type1 시편의 경우 40 MPa, Type2 시편의 경우는 약 15 MPa 정도의 값을 나타내었고, 횡방향의 압축시험에서는 Type1 시편의 경우 52 MPa, Type2 시편의 경우에는 40 MPa의 값을 나타내었다. 다공성 타이타늄 지지체에 5 M의 NaOH 용액으로 알카리처리를 수행한 결과 표면에 미세한 3차원의 그물망 형태의 티탄산염 수산화겔 층이 생성되었다. 알카리처리를 수행한 타이타늄 지지체의

생체적합성 평가를 위해 유사체액에서 침적시험을 수행한 결과, 1일 침적 후 시편에서부터 표면에 얇은 아파타이트가 형성되었고, 시간이 경과함에 따라 점차 치밀하고 두꺼운 층의 아파타이트가 형성되었다. 이와 같은 결과로부터 본 연구에서 제조된 다공성 타이타늄 지지체와 이의 생체활성 표면처리 방법으로 수행한 알카리처리는 골 조직재생 및 대체용으로 유용할 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. M. Long and H. J. Rack, *Biomaterials*, **19**, 1621 (1998).
2. D. M. Liu, *Ceram. Int.*, **24**, 441 (1998).
3. J. Zhao, S. Xiao, X. Lu, J. Wang and J. Weng, *J. Biomed. Mater.*, **1**, 188 (2006).
4. H. Chliephake, F. Tavassol, M. Gelinsky, M. Dard, A. Sewing and W. Pompe, *Clin. Oral Implants Res.*, **15**, 112 (2004).
5. S. S. Kim, M. S. Park, O. Jeon, C. Y. Choi and B. S. Kim, *Biomaterials*, **27**, 1399 (2006).
6. S. F. Yang, K. F. Leong, Z. H. Du and C. K. Chua, *Tissue Eng.*, **8**, 1 (2002).
7. I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan and S. H. Teoh, *Biomaterials*, **23**, 1169 (2002).
8. G. Altankov, F. Grinnell and T. Groth, *J. Biomed. Mater.*, **30**, 385 (1996).
9. J. H. Lee, H. B. Lee and J. D. Andrade, *Pro. Poly. Sci.*, **20**, 1043 (1995).
10. T. Kokubo, H. Kushitani, S. Kitsugi and T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater.*, **24**, 721 (1990).
11. H. M. Kim, T. Kokubo, S. Fujibayashi, S. Nishiguchi and T. Nakamura, *J. Biomed. Mater.*, **52**, 553 (2000).
12. B. D. Boyan, T. W. Hummert, D. D. Dean and Z. Schwartz, *Biomaterials*, **17**, 137 (1996).
13. T. Yoshikawa, H. Ohgushi and S. Tamai, *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**, 481 (1996).
14. D. W. Hutmacher, *Biomaterials*, **21**, 2529 (2000).
15. D. Choi, K. G. Marra and P. N. Kumta, *Mater. Res. Bull.*, **39**, 417 (2008).
16. E. J. Lee, Y. H. Koh, B. H. Yoon, H. E. Kim and H. W. Kim, *Materials Letters*, **61**, 2270 (2007).

17. E. T. Den Braber, J. E. De Ruijter, H. T. J. Smits, L. A. Ginsel, A. F. Von Recum and J. A. Jansen, *J. Biomed Mater. Res.*, **29**, 511 (1995).
18. G. Andrei, H. Tsuchiya, J. M. Macak and P. Schmuki, *Electro. Com.*, **7**, 505 (2005).
19. A. Bagno and C. Di Bello, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **15**, 935 (2004).
20. T. Hanawa, *Mater. Sci. Eng.*, **A 267**, 260 (1999).
21. R. Beranek, H. Hidelbrand, P. Schmuki, *Electrochem. Solid-State Lett.*, **6**, B12 (2003).
22. H. Ishizawa and M. Ogino, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 1071 (1995).