수산화인회석과 인산삼칼슘 및 1형 콜라젠 혼합골의 전자빔 조사 효과

박정민² · 김성민^{1,2} · 김민근³ · 박영욱³ · 명 훈^{1,2} · 이병철⁵ · 이종호^{1,2} · 이석근⁴

서울대학교 치의학대학원 ¹구강악안면외과학교실, ²치학연구소, 강릉원주대학교 치과대학 ³구강악안면외과학교실, ⁴구강병리학교실, ⁵한국원자력연구원 양자과학기술개발부

Abstract

Effect of Electron-beam Irradiation on the Artificial Bone Substitutes Composed of Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Mixtures with Type I Collagen

Jung Min Park², Soung Min Kim^{1,2}, Min Keun Kim³, Young Wook Park³, Hoon Myoung^{1,2},
Byung Cheol Lee⁵, Jong Ho Lee^{1,2}, Suk Keun Lee⁴

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ²Dental Research Institute, School of Dentistry, Seoul National University, ³Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ⁴Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, ⁵Quantum Optics Laboratory, Korea Atomic Research Institute

Purpose: The aim of this study is to evaluate the effect and potential of electron beam (E-beam) irradiation treatment to the synthetic bony mixtures composed of hydroxyapatite (HA; Bongros[®], Bio@ Co., Korea) and tricalcium phosphate (β -TCP, Sigma-Aldrich Co., USA), mixed at various ratios and of type I collagen (Rat tail, BD Biosciences Co., Sweden) as an organic matrix.

Methods: We used 1.0~2.0 MeV linear accelerator and 2.0 MeV superconductive linear accelerator (power 100 KW, pressure 115 kPa, temperature $-30\sim 120^{\circ}\text{C}$, sensor sensitivity 0.1~1.2 mV/kPa, generating power sensitivity 44.75 mV/kPa, supply voltage 5 ± 0.25 V) with different irradiation dose, such as 1, 30 and 60 kGy. Structural changes in this synthetic bone material were studied *in vitro*, by scanning electron microscopy (SEM), elementary analysis and field emission scanning electron microscope (FE-SEM), attenuated total reflection (ATR), and electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA).

Results: The large particular size of HA was changed after E-beam irradiation, to which small particle of TCP was engaged with organic collagen components in SEM findings.

Conclusion: The important new *in vitro* data to be applicable as the substitutes of artificial bone materials in dental and medical fields will be able to be summarized.

Key words: Bone regeneration, Hydroxyapatite, Tricalcium phosphate, Electron beam

원고 접수일 2012년 11월 5일, 원고 수정일 2012년 12월 20일,
게재 확정일 2013년 1월 24일

책임저자 김성민
(110-768) 서울시 종로구 대학로 101, 서울대학교 치의학대학원 구강악안면외과학교실
Tel: 02-2072-0213, 3813, Fax: 02-766-4948, E-mail: smin5@snu.ac.kr

RECEIVED November 5, 2012, REVISED December 20, 2012,
ACCEPTED January 24, 2013

Correspondence to Soung Min Kim
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Seoul National University
101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-768, Korea
Tel: 82-2-2072-0213, 3813, Fax: 82-2-766-4948, E-mail: smin5@snu.ac.kr

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

인체내 골조직은 강도와 석회화 성분을 유지할 수 있는 70%의 무기질 성분과 9% 정도의 수분을 포함한 제1형 콜라겐(type I collagen)과 같은 유기질 성분으로 이루어져 있다. 인체내 여러 골결손부에 대해 골이식과 관련된 세계적인 추세는 합성골을 제작하고자 하는 노력으로 진행되어 왔으며, 이를 위해 생체친화적이면서 충분한 양을 저렴한 가격에 얻을 수 있는 수산화인회석(hydroxyapatite, HA)과 인산삼칼슘(tricalcium phosphate, TCP)을 이용한 연구가 최근 많이 이루어져 왔으며 저자들도 지난 2007년도부터 관련된 분야를 전임상적으로 진행해 왔다[1,2].

치의학 및 의학 분야에 있어서 골조직 재생, 창상 치유를 위한 골이식재에 대한 수요가 급증하고 있으며 현재까지 무기질로만 구성된 합성골의 사용은 있으나 유기질을 포함한 합성골의 사용은 드물었다. 즉, HA와 주로 베타형의 TCP를 혼합하여 골화시키는 방법으로 Fig. 1과 같이 여러 종류의 혼합재가 각각의 고유한 성분 비율대로 상품화되어 왔으며, 주로 HA가 70% 또는 60%이고, TCP가 30% 및 40%인 혼합 형태가 최근에 합성골로서 많이 추천되어 왔으며, 이러한 합성골 모두는 대부분 유기질 성분이 없는 무기질 성분만을 포함하고 있었는데, 본 연구에서는 유기질로서 추가한 1형 콜라겐에 혼합된 합성골에 전자빔을 조사하여

무기질과 유기질 모두의 성상을 변화시키고자 하였다.

본 연구에서는 전자빔 조사를 통해 합성골의 안정성과 생활성 작용을 기대하였는데 전자빔 조사에 의해 유기질인 콜라겐의 내부 섬유들의 배열을 변화시키고, 골이식재의 멸균 효과 및 성상 변화를 동시에 얻음으로써 새로운 성상변화에 의한 기존의 인체내 적용 합성골과 다른 새로운 합성골의 개발을 시도해보고자 진행하여 *in vitro* 결과 내용을 중심으로 보고하고자 한다.

연구방법

서로 다른 혼합비율인 108개의 시편에 대해 36개의 다른 조건으로 전자빔 조사를 시행하였는데, 합성골의 혼합 비율에 따른 골형성 정도를 평가하기 위하여 1형 콜라겐(BD Biosciences Co., Stockholm, Sweden)을 혼합한 HA (Bongros[®], Bio@Co., Korea)와 TCP (β -TCP[®], Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)의 비율을 각각 100:0, 70:30, 60:40, 40:60, 30:70, 0:100 등의 6개 군으로 구분하여 Fig. 2와 같이 분류하였다. 전자빔 조사를 위해 고체 분말을 젤화된 형태로 시료준비를 하였으며 시편의 크기는 직경 1.5 cm 크기의 전자빔 투과용기를 자체 제작하여 아래와 같이 합성골의 6개 군을 넣어서 사용하였다. 합성골 6개 군을 이용하여 전체 36개 군의 실험군 및 대조군을

Fig. 1. Commercially used synthetic bone materials according to the mixed ratio of HA and TCP. HA, hydroxyapatite; TCP, tricalcium phosphate.

Fig. 2. Artificial bony mixtures used in this study, composed of different ratio of hydroxyapatite (HA, Bongros[®]) and tricalcium phosphate (β -TCP[®]) with type 1 collagen (rat tail).

만들고, 각 시편은 3개씩 전자빔 조사를 시도하여 모두 108개의 시편을 만들어서 진공포장하였다(Fig. 3).

한국원자력연구원의 전자빔 가속기를 활용하여 6개의 시편을 포함하는 전자빔 목적장치에 시편을 준비하였으며, 전체 가속기의 각 구성부의 연결 상태 및 작동 상태를 점검하는 화면을 보면서 각 6개 이상의 홀더의 세부 조사량을 계산할 수 있는 조절기를 보면서 조사량을 확인하였다. 조사 에너지는 1.0 MeV와 2.0 MeV의 상전도 선형가속기를 사용하였으며, 조사량 Dose는 각 에너지별로 1 kGy, 30 kGy 및 60 kGy의 세 조건으로 조사하였다. 이처럼 서로 다른 36가지 조건으로 시행하여 1 MeV, 2 MeV의 두 조건의 전자빔 세기로 전류량 0.03 mA로 하여 서로 다른 Scan Speed (mm/Rev)를 부여하였다. 각각의 조사가 끝난 후 알루미늄 플레이트 샘플 밑 바닥에 B3 필름을 부착하여 Table 1에서와 같이 실험 선량을 측정하였으며, 1.0~60.0 kGy의 측정 가능 선량을 예상하였으나 실질적으로 65 kGy 이상은 측정 불가수치인 over range (OR)로 표시되었다(Fig. 4).

이상과 같이 다양하게 조사된 시편들은 1) 전계방출 주사전자현미경 분석(field emission scanning electron microscope, FE-SEM)을 위해 S-4200[®] (Hitachi Co., Tokyo, Japan) 기종을 사용하여 시료 표면의 미세한 구조를 정성 및 정량 분석하였으며, 2) Monochromatic Al-Ka선을 광원으로 사용하는 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) 분석 장치인 AXIS NOVA[®] (Kratos Analytical Ltd., Manchester, UK)를 이용한 표면화학

분석(electron spectroscopy for chemical analysis, ESCA)을 시행하고, 3) 45° Dia crystal에 의한 single bounce attenuated total reflection (ATR) 원리의 Nicolet 5700 FT-IR[®] (Thermo electron Co., Waltham, MA, USA) atomic absorption spectrophotometer를 이용하여 감쇠전반사 적외선분광기를 이용한 투과도(attenuated total reflection infrared, ATR-IR) 검사를 진행하였으며, 4) 분석표면을 삼차원으로 분석하기 위해 LSM 5 PASCAL[®] (Carl Zeiss Co., Feldbach, Switzerland)을 이용한 공초점 레이저 주사현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM) 검사, 5) 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM) 분석은 입자의 삼차원적 형상과 입자 표면의 형상을 관찰하기 위해 다각도로 시행하여 전자빔 조사 전, 후의 합성골편의 미세구조 분석을 진행하였다.

결 과

전자빔 조사 후 각각의 합성골 시편은 육안적인 색 변화나 성상의 변화는 없었으며 응고되지 않고 쉽게 떨어지거나 분쇄되는 경향 등도 관찰되지 않아서, 전자빔 조사 전후의 육안적인 형태(macroscopic structure)에서는 차이점을 보이지 않았다.

1. 전계방출 주사전자현미경 분석

기본적인 HA, TCP 및 7:3 혼합체를 기준으로 전체적인 기본 원소 성분의 변화를 확인할 수 있었는데, 전자빔을 조사한 에너지의 양에 따라 C 성분이 급격 또는 완만히 증가하고, O 성분은 조사량에 따라서도 증가하며, Na, Mg, Al, 및 P 성분들이 새롭게 발견되거나 또는 소량씩 증가하는 양상을 보였다(Fig. 5). 또한, Ca과 P 성분의 비율(Ca/P ratio)에 있어서 HA 2.248, TCP 2.102

Fig. 3. Prepared synthetic bony mixtures for the electron beam irradiation. HA, hydroxyapatite; TCP, tricalcium phosphate.

Table 1. Comparisons of practical radiation doses by using of B3 film[®] measurement, OR over the 65 kGy

	Dose (kGy)	1	30	60
Scan speed	1 MeV	1.2	33	65
(mm/MeV)	2 MeV	0.7	21	40

OR, over range.

Fig. 4. (A) Linear accelerator, (B) target apparatus of electron beam including 6 items, and (C) B3 film[®] for the measurement of practical radiation doses in this study.

Fig. 5. Basic elementary analysis and their comparisons between HA, TCP, and their 7:3 ratio's mixtures under electron beam irradiations of 1~2 MeV, 1~60 KGy, in the field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) by using of S-4200[®] (Hitachi Co., Japan). HA, hydroxyapatite; TCP, tricalcium phosphate.

값에 비해 전자빔 에너지와 조사량에 따라 전반적으로 Ca의 양이 적어지고, 반면에 상대적으로 P 성분의 양이 증가하는 일관된 추세를 보였다(Table 2). 이는 전자빔 조사에 의한 골이식재 혼합물의 구조 개선 및 개질의 효과가 탄소결합을 파괴하고 대신 그 자리에 산소가 부착한다는 유기화합물의 산화 반응효과가 주로

발현된 것으로 해석되었다.

2. 표면화학 분석

ESCA 분석을 통한 표면화학 검사에서는 전자빔 조사 전, 후의 차이점은 관찰되지 않았으며, 특징적인 화학적 이동(chemical

Fig. 5. Continued.

Table 2. Comparisons of Ca/P ratio in the field emission scanning electron microscopy

HA:TCP	Mixtures	1 MeV~1 kGy	1 MeV~30 kGy	1 MeV~60 kGy	2 MeV~1 kGy	2 MeV~30 kGy	2 MeV~60 kGy
10:0	2.744	2.302	2.065	1.932	2.154	2.043	1.752
7:3	1.621	2.058	1.882	1.914	1.627	2.150	1.795

HA, hydroxyapatite; TCP, tricalcium phosphate.

shift) 현상도 관찰되지 않았다. 특히, 액상 및 젤상인 1형 콜라겐은 분석이 불가능하였는데, 합성골 복합체도 진공 상태에서 감염원을 제거해야 하는 세심한 취급이 필요하여 여러 시행착오를 거쳤으나, 유의성 있는 결과는 얻지 못하였다.

3. 감쇠전반사 적외선분광기를 이용한 투과도 검사

HA 및 TCP의 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) 분석은 고체분말 시료에 준하여 KBr Pelletizing을 사용하여 진행하였는데, 전자빔 조사전의 HA의 파장 범위(group frequencies)는 1014.1, 566.1 cm^{-1} (wavenumbers)였는데, 조사 후의 파장범위는 1,023.2~1,025.4, 562.3~566.9 cm^{-1} 등으로 확인되었고, 전자빔 조사 전의 TCP는 1,023.2, 560.2 cm^{-1} 임에 비해 조사 후의 TCP는 1,022.8~1,024.1, 560.0~560.4 cm^{-1} 와 같이 나와서 큰 차이점은 발견되지 않았다. 또한, 1형 콜라겐의 FT-IR 분석은 액체시료에 준하여 NaCl cell을 사용

하여 진행하였는데, 조사 전의 1형 콜라겐은 3,450 및 1,650 cm^{-1} 였는데 조사 후에도 같은 값을 보여서 HA, TCP 및 1형 콜라겐 자체의 전자빔 조사 전, 후의 특이할 만한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 6).

합성골 혼합체에서의 FT-IR 분석은 고체분말 시료에 준한 KBr Pelletizing과 액체시료에 준한 NaCl cell을 사용하여 동시에 진행하였는데, 전자빔을 조사하기 전의 여러 차례 시행한 스펙트럼에서는 7:3의 비율로 HA의 성분을 많이 포함한 시편에서 1,024.3, 560.9 cm^{-1} 을 보였는데, HA의 1,014.1 및 566.1 cm^{-1} , TCP의 1,023.2 및 560.2 cm^{-1} 등에 비해 약간 높은 스펙트럼을 보였으며, 이는 전자빔을 조사한 HA 입자의 범위인 1,023.2~1,025.4, 562.3~566.9 cm^{-1} 의 범주에 드는 것으로 파악되었다. 이는 TCP 입자의 범위인 1,022.8~1,024.1, 560.0~560.4 cm^{-1} 의 범주와는 다른 것이어서 전자빔을 조사하기 전의 스펙트럼은 혼합한 구성성분이 많은 쪽에 좌우됨을 알 수 있었으며, 많은

Fig. 6. (A) FT-IR spectrums of HA, (B) after 1 MeV ~ 1 KGy, (C) after 2 MeV ~ 60 KGy electron beam irradiation using KBr Pelletizing. (D) FT-IR spectrum of TCP, (E) after 1 MeV ~ 1 KGy, (F) after 2 MeV ~ 60 KGy electron beam irradiation using KBr Pelletizing. (G) FT-OR spectrum of type 1 collagen, (H) after 1 MeV ~ 1 KGy, (I) after 2 MeV ~ 60 KGy electron beam irradiation using NaCl cell. All specimens were analyzed by using of Nicolet 5700 FT-IR[®] (Thermo electron Co., USA) atomic absorption spectrophotometer, 45° Dia crystal with single bounce ATR principle. FT-IR, Fourier transform infrared spectroscopy; HA, hydroxyapatite; TCP, tricalcium phosphate; ATR, attenuated total reflection.

양이 섞인 입자의 파장을 따르는 것을 확인할 수 있었다.

4. 공초점 레이저 주사현미경 검사

Raman 스펙트럼에서는 파장(wavenumbers)에 따른 상대적인 강도(relative intensity)인 라만 강도를 비교하게 되는데, HA 입자의 라만 강도는 1,000 cm⁻¹ 이하에서 몇 개의 peak를 보였고, 950 cm⁻¹ 전, 후에서 최고 peak를 보였는데 이는 전자빔 조사

후에도 유사하였다. TCP 입자에서는 처음 180~210 cm⁻¹에서 높은 peak를 보였는데, 1 MeV의 에너지에서는 유사하였으나 2 MeV~60 KGy에서는 상대적으로 peak가 감소하고 넓게 분포하는 모습을 보였다. 액상인 1형 콜라겐에서는 peak를 관찰할 수 없었으며, 7:3 비율의 합성골에서는 1 MeV~1 KGy 및 2 MeV~60 KGy 모두에서 peak가 증가하고 분포파장도 다양해짐을 확인할 수 있었는데, 이는 입자성분에서 무기질 성분의 입자화가 진행되고 이들 입자화가 넓게 퍼진 양상을 보여주었다(Fig. 7).

Fig. 7. Raman spectrum of (A) HA, (B) after 1 MeV~1 KGy, and (C) after 2 MeV~60 KGy, raman spectrum of (D) TCP, (E) after 1 MeV~1 KGy, and (F) after 2 MeV~60 KGy, raman spectrum of (G) type 1 collagen, (H) after 1 MeV~1 KGy, and (I) after 2 MeV~60 KGy, and raman spectrum of (J) 7:3 ratio's mixtures, (K) after 1 MeV~1 KGy, and (L) after 2 MeV~60 KGy electron beam irradiations by using of LSM 5 PASCAL[®] (Carl Zeiss Co., Swiss) confocal laser scanning microscope. HA, hydroxyapatite; TCP, tricalcium phosphate.

Fig. 8. Some particulations of HA in the SEM findings of HA under the 1 MeV~30 KGy, 1 MeV~60 KGy, 2 MeV~1 KGy, and 2 MeV~30 KGy under the electron beam irradiations, $\times 35$, $\times 500$, $\times 1,000$, $\times 5,000$, $\times 10,000$, $\times 30,000$, and/or $\times 50,000$ magnifications, individually. HA, hydroxyapatite; SEM, scanning electron microscopy; TCP, tricalcium phosphate.

5. 주사전자현미경 분석

5.0 mm 및 6.2~6.4 mm 입자인 HA 입자에 대해 1 MeV 및 2 MeV의 에너지로 1~60 KGy의 전자빔을 조사하면 5,000배 이하의 해상도에서는 전반적으로 큰 변화는 관찰되지 않았으나, 5,000배 이상의 확대에서는 입자의 성상이 약간씩 흐릿해지는 전조 현상이 관찰되었다. 이는 에너지의 양이 크고, 조사량도 증가할 경우 일관된 모습을 보였다. 특히, HA와 TCP의 혼합률이 10:0인 시편에서 2 MeV~1 KGy의 전자빔 조사 시 합성골 혼합체의 결정 구조는 파괴되는 양상을 보였으며, 조사량이 증가한 2 MeV~30 KGy, 2 MeV~60 KGy의 조사량에서는 무기질 결정체가 여러 조각으로 나뉘는 경우가 보다 많이 관찰되었다 (Fig. 8).

HA와 TCP의 혼합률이 7:3인 시편에서는 Fig. 9와 같이 1 MeV~1 KGy의 에너지와 조사량에도 무기질 결정체의 나뉘임이 관찰되었으며, 1,000배 이상에서는 TCP의 성분이 보다 많이 관찰되면서 많은 입자들이 HA 바탕 성분 혼합되어 산재되는 양상을 보였다. 이는 전자빔을 조사하지 않은 입자들에서는 관찰되지 않는 소견이었는데, 서로 연결되는 구조의 무기질들이 내공은 50~500 μm 와 같이 다양한 크기를 보이면서 많이 산재되어 있는 양상을 보였다. 이러한 소견은 HA와 TCP의 혼합률이 7:3인 합성골 시편의 여러 조건의 전자빔 조사 후에 대부분 유사하게 관찰되었는데, 특히, 10,000배 및 50,000배의 사진에서는 이상적인 골이 식재의 소견으로 판단할 수 있을 정도로 크고 작은 입자결정들의 조화로운 윤곽을 보여주었다.

10,000배 및 50,000배 사진에서는 HA 바탕 결정체에 미세하

Fig. 9. Mixed particulations of HA with small TCP particles in the SEM findings of 7:3 ratio's of HA and TCP under the 1 MeV~1 KGy and 1 MeV~30 KGy electron beam irradiations, $\times 35$, $\times 500$, $\times 1,000$, $\times 5,000$, $\times 10,000$, $\times 50,000$, and $\times 100,000$ magnifications, individually. HA, hydroxyapatite; TCP, tricalcium phosphate; SEM, scanning electron microscopy.

게 TCP 입자들이 혼합되어 고정되어 있는 모습이 관찰되었고, 이러한 모습은 전반적으로 전자빔 조사가 이루어지지 않은 시편 및 앞서 설명된 1 MeV의 에너지로 조사된 시편에서는 관찰되지 않았다. 이는 비록 1형 콜라겐의 구체적인 변화가 주사전자현미경 하에서는 관찰되지 않았어도 이러한 전반적인 균일하고 조밀한 형태의 합성골의 형태가 관찰되었다.

고 찰

방사선 조사는 의료용 소재개발에 있어서 매우 유용함에도 불구하고 일반 대중에게는 위험한 물질로 인식되고 있는데, 전자빔 조사는 비록 방사선 조사에 국한될 수 있으나, 시설장비의 안전한 구축을 통해 현재 국내에서도 3~5곳의 국가 지정 또는 시설 운용되는 곳이 소개되고 있다. 의학용보다는 이공계 및 물리학적으로 보다 알려진 전자빔은 공학용 전자빔 가속기인 경우는 대개 10 MeV에서 100 MeV의 높은 에너지를 이용함으로써 적외선, 자외선 등의 전자파 에너지에 비해 훨씬 높은 물체에 투과되는 성질을 지니게 된다(Fig. 10). 흔히 알려져 있는 가시광선 또는 자외선과는 달리 높은 에너지로 가속된 전자빔은 중합 반응 및 경화 반응에서 광개시제(photo initiator) 또는 광증감제(photo sensitizer) 등이 필요하지 않으며, 투과 깊이에 있어서 조사처리물의 평면 밀도에 해당하는 '밀도×두께'에 관계되고 조사처리물의 투명도와도 무관한 것으로 알려져 있다[1,3-5]. 이에 본 연구에서는 기존의 합성골에 이러한 높은 투과에너지를 지니는 전자빔 조사를 통하여 인체내 이식하기 위한 합성골의 성상을 변화시키고 보다 좋은 골재생 효과를 얻고자 진행하여 변화된 성상을 여러 분석 방법을 통해 분석하였다.

본 연구진은 수산화인회석과 인산삼칼슘 복합체의 혼합물에 따른 골재생 효과에 대한 연구를 지난 수년간 진행해 왔으며 기존 보고에서 백서 두개골 결손부에서 수산화인회석과 인산삼칼슘의 조성을 달리하고 제1형 콜라겐을 이용하여 이식하였을 때 새로운 골의 형성과 치유과정을 평가한 바 있었다[6]. 이는 기존의 합성골은 강도가 커서 골재생에 있어 유리하지만, 세포의 침투와

정착을 위한 적절한 환경을 제공하지 못하는 단점이 있어 왔기에 세포의 침투와 성장이 유리하도록 여러 물질을 조사하여, 골기질의 기저막을 이루는 제1형 콜라겐을 수산화인회석과 인산삼칼슘에 혼합하여 골재생의 과정을 비교하고자 한 것으로 4주 및 8주 후 희생된 백서에서 방사선적, 조직학적 분석 및 원소분석 등에서 1형 콜라겐을 같이 섞어 진행한 경우 골재생의 효과가 우수함을 입증한 바 있었다[6].

전계방출 주사전자현미경 분석인 FE-SEM 분석을 통해서 SEM 조사를 통한 형태학적인 분석과 동시에 원소분석의 상태를 알 수 있는데, 상태도란 여러 가지 조성의 합금을 용융상태로부터 응고되어 상온에 이르기까지 상태의 변화를 나타낸 그림을 의미하는 것으로 본 연구에서는 합성골편의 시편 상태를 비교하여 분석하였다[1,7,8]. 즉, 시편의 성분비율과 온도에 따른 상태를 나타내는 그림으로서 횡축에는 조성인 %를 나타내고, 종축에는 온도인 °C가 표시된다. 횡축의 조성에서 성분비율을 나타내는 데에는 중량 비율인 wt%이 보통 사용되지만 경우에 따라서는 원자비율인 at%로도 나타낼 때도 있어서 본 연구에서는 두 가지 비율을 같이 얻도록 하였다. 전자빔을 조사하면 조사된 에너지의 양에 따라 C 성분이 급격 또는 완만히 증가하고, O 성분은 조사량에 따라서도 증가하며, Na, Mg, Al, P 성분들이 새로이 존재하거나 또는 소량씩 증가하는 양상을 보였다. 이러한 대체적인 결과는 전자빔 조사에 의한 화합물의 구조 개선 및 개질의 효과가 탄소 결합을 파괴하면서 대신 산소가 부착한다는 유기화합물의 산화 반응 효과가 주로 발생하였다고 해석할 수 있었다(Fig. 6, Table 2). 따라서, 이러한 연구 결과에서 유추할 수 있는 중요한 화학적 변화로 HA인 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 와 TCP인 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 의 주된 성분 변화를 요약하면, 아래와 같다.

전자빔 조사로 HPO_4^{2-} 이온의 탈수 현상이 발생하여,
 $2\text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{P}_2\text{O}_7^{4-} + \text{H}_2\text{O}$, 여기에 CO_3^{2-} 이온이 반응하여,
 $\text{CO}_3^{2-} + 2\text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{PO}_4^{3-} + \text{H}_2\text{O}$ 의 반응과
 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow 2\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_2$ 의 반응이 일어나게 되는 것으로 생각된다.

표면화학 분석은 전자를 이용한 표면분석 방법인 ESCA 분석을

Fig. 10. Schematic drawing of basic electron beam accelerator (under the permission from Quantum Optics Laboratory in Korea Atomic Research Institute).

진행하였는데, 표면의 원소 구성(elemental composition)과 각 원소의 화학결합상태(chemical bonding state)까지 알아낼 수 있는 유용한 분석법으로 본 연구에서는 전자빔 조사 전, 후의 합성골편의 표면 화학적 성분을 비교하기 위해 시도하였다. 모든 원소들의 전자는 K각, L각 등 각(shell) 구조를 이루고 있으며, 그 내각 전자들은 각각 독특한 에너지 준위(binding energy)를 가지는데, 예를 들면, 산소의 1s 전자는 결합에너지가 531 eV이고, 탄소의 1s 전자의 결합에너지는 284 eV, 실리콘 원자의 2p 전자는 99 eV의 결합에너지를 가진다. 이처럼 각 원소마다 내각 전자들의 결합에너지가 다르기 때문에 내각 전자들의 결합에너지를 측정하면 어떤 원소가 있는지를 유추할 수 있게 된다[9-11].

같은 원소라도 화학결합상태가 다르면 내각 전자의 결합에너지도 조금씩 변화하는데 이를 화학적 이동이라 하며, 이 현상은 화학결합에 의해 최외각 전자의 분포가 바뀌므로 이러한 화학적 이동 현상을 이용하면 전자의 결합에너지를 정확히 측정함으로써 원소의 성분만이 아니라 그 원소의 화학결합상태까지도 알아낼 수 있는 것으로 설명되고 있다. 본 연구의 표면화학적 분석에서는 전자빔 조사 전, 후의 차이점은 관찰되지 않았으며, 특징적인 chemical shift 현상도 관찰되지 않았다. 특히, 액상 및 젤상인 1형 콜라겐은 분석이 불가능하였는데, 합성골 복합체도 진공 상태에서 감염원을 제거해야 하는 세심한 취급이 필요하여 여러 시행착오를 거쳤으나, 유의성 있는 결과는 얻지 못하였다.

감쇠전반사 적외선분광기를 이용한 투과도 검사는 ATR-IR 분석법으로 일반적인 투과법인 FT-IR 분석을 위한 시료 제작이 어려운 고무 및 플라스틱 성형물, 복합재료 및 코팅 용품에 사용될 수 있는 감쇠전반사법에 의한 FT-IR 분석법을 의미한다. 즉, 시료의 화학적 조성이 부분적으로 불균일할 수 있는 본 과제의 인공골 합성체 내부로 전반사하여 통과하면서 분석할 수 있으며 선택적으로 분석하는 single bounce ATR 및 코팅 재료 분석을 위해 주로 사용하는 multiple bounce ATR 등으로 검사하게 된다[11-14]. 본 연구에서는 한국화학연구원 신뢰성평가센터의 45° Dia crystal에 의한 single bounce ATR 원리의 Nicolet 5700 FT-IR® (Thermo electron Co., Madison, WI, USA) atomic absorption spectrophotometer를 사용하였으며, 측정 범위는 400 ~ 4,000 cm⁻¹의 Mid-infrared spectral range, cooled DTGS (Deuterated triglycine sulfate) detector 및 scimitar series를 사용하였다. 본 검사에서도 아미드 결합의 진동성 원인을 확인하는 과정으로 진행하여 helical 또는 extended conformation 구조를 확인하였는데 비슷한 대조군의 데이터를 얻을 수 있었으며, 동시에 1 MeV ~ 1 K Gy의 전자빔 조사를 시행한 후에 얻은 파장범위에서는 조사전의 파장범위와 유사하였으며, 1형 콜라겐도 유사한 값을 보였다. 합성골 혼합체에서의 FT-IR 분석은 고체 분말 시료에 준한 KBr Pelletizing과 액체시료에 준한 NaCl cell

을 사용하여 동시에 진행하였는데, 7:3의 비율로 HA의 성분이 많이 포함된 시편에서 성분이 높은 HA에 유사한 스펙트럼을 보여서 결론적으로 전자빔 조사에 의한 ATR-IR 결과는 큰 차이는 없었으나, 혼합된 성분의 양에 따라 많은 양이 섞인 입자의 파장 범위를 따르는 것을 알 수 있었다.

공초점 레이저 주사현미경 검사는 Raman peak와 Raman 형광 이미지를 이용하여 시료의 성분 및 분자구조, 스트레인 및 표면 구조 등을 분석하는 방법으로 기존의 형광현미경에 비해 1.4배 해상력이 높은 영상을 얻을 수 있고, 광절편을 만들어서 삼차원적 영상을 관찰할 수 있으며 살아있는 시료를 대상으로도 세포내 특정물질의 분포도 검사할 수 있는 레이저를 광원으로 하는 현미경이다. 또한, 시료의 표면 특성을 측정할 수 있으며 작은 입자의 기본적인 나노 구조를 분석하는 데 사용되는 최신 분석방법이라 할 수 있다[15-17]. Raman 스펙트라의 분석조건으로는 HA 532 nm, 2 mW, TCP 785 nm, 10 mW, 1형 콜라겐 532 nm, 2 mW 및 7:3 비율의 HA/TCP 785 nm, 10 mW로 하였으며, 모두 aperture 50×1,000 μ×20의 조건으로 시행하였다. HA 입자의 Raman 강도는 1,000 cm⁻¹ 이하에서 몇 개의 peak를 보였으며 950 cm⁻¹ 전, 후에서 최고 peak를 보였다는 전자빔 조사 후에도 유사하였다. TCP 입자에서는 처음 180 ~ 210 cm⁻¹에서 높은 peak를 보였는데, 1MeV의 에너지에서는 유사하였으나 2 MeV ~ 60 K Gy에서는 상대적으로 peak가 감소하고 넓게 분포하는 모습을 보였다. 액상인 1형 콜라겐에서는 peak를 관찰할 수 없었으며, 7:3 비율의 합성골에서는 1 MeV ~ 1 K Gy 및 2 MeV ~ 60 K Gy 모두에서 peak가 증가하고 분포파장도 다양해짐을 확인할 수 있었는데, 이는 입자성분에서 무기질 성분의 입자화가 진행되고 이들 입자화가 넓게 퍼진 양상을 보여주었다(Fig. 7).

주사전자현미경 분석은 전자빔 조사의 효과를 가장 개략적으로 보여주는데 10,000배 이상의 사진에서 주로 HA 결정체로 구성된 합성골편에 TCP 입자들이 미세하게 흩뿌려지면서 혼합되어 고정되어 있는 모습이 특징적으로 관찰되었다(Fig. 8, 9). 기존의 전자빔 조사가 이루어지기 전의 시편에서는 두 입자의 조성 비율에 따라 구조적인 조화가 보이는 구조였다면 이 구조에 1형 콜라겐이 혼합되어 입자를 서로 유기적으로 지탱해주고, 여기에 조사된 전자빔 효과에 의해 HA와 TCP 무기질 입자들이 갈라지면서 갈라진 공간 속으로 작은 TCP 입자들이 위치하면서 이를 1형 콜라겐이 형태 및 위치를 유지시키는 기능을 하는 것으로 생각되었다. 이러한 결과는 주사전자현미경 분석에서 5,000배 이상에서는 에너지의 양이 크고, 조사량도 증가할 경우 일관되게 입자의 성상이 약간씩 흐릿해지는 양상을 보였고, 전술한 표면 구조 분석에서 보다 넓게 퍼지면서 밋밋해지는 구조를 보인 결과와 일치하였다.

결론

이상의 본 연구에서는 각각의 HA와 TCP 및 서로 다른 혼합비율의 합성골 시편에 대해 두 가지의 다른 에너지 조건 및 서로 다른 조사량을 통한 전자빔 조사 효과를 분석하여 아래와 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 전계방출 주사전자현미경 분석에서는 조사된 에너지의 양에 따라 C 성분이 급격 또는 완만히 증가하고, O 성분은 조사량에 따라서도 증가하며, Na, Mg, Al, P 성분들이 새로이 존재하거나 소량씩 증가하였다.

2) 표면화학적 분석에서는 전자빔 조사 전, 후의 차이점은 관찰되지 않았으며, 특징적인 chemical shift 현상도 관찰되지 않았다.

3) 감쇠전반사 적외선분광기를 이용한 투과도 검사에서 1 MeV~1 KGy의 전자빔 조사를 시행한 후에 얻은 파장범위로서 HA는 1,023.2~1,025.4, 562.3~566.9 cm^{-1} , TCP는 1,022.8~1,024.1, 560.0~560.4 cm^{-1} 등을 보여 조사전의 파장범위와 유사하였으며, 1형 콜라젠도 유사한 값을 보였는데, 혼합된 성분의 양에 따라 많은 양이 섞인 입자의 파장 범위를 따르게 된다.

4) 공초점 레이저 주사전자현미경 검사에서는 7:3 비율의 합성골에서 1 MeV~1 KGy 및 2 MeV~60 KGy 모두에서 peak가 증가하고 분포파장도 다양해졌는데 무기질 성분의 입자화가 진행되고 이들 입자화가 넓게 퍼진 양상을 보였다.

5) 주사전자현미경 분석에서는 10,000배 이상의 사진에서 주로 HA 결정체로 구성된 합성골편에 TCP 입자들이 미세하게 흩뿌려지면서 혼합되어 고정되어 있었으며, 전자빔 효과에 의해 HA와 TCP 무기질 입자들이 갈라지면서 갈라진 공간 속으로 작은 TCP 입자들이 위치하면서 이를 1형 콜라젠이 형태 및 위치를 유지시키는 모습이 관찰되었다.

이상 본 연구결과, 무기질 입자의 전자빔 투과 효과는 여러 분석 방법에서 확인되었고 향후 세부적인 조건을 보다 세세히 찾아냄으로써 골형성 촉진이라는 기본적인 원래 목적에 부합하는 보다 이상적인 골이식재를 개발할 수 있을 가능성을 확인하였다고 생각된다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant of the Korean Health Technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A110920), the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MEST) (No.2012-029638).

References

1. Kim SM, Eo MY, Kang JY, *et al.* Bony regeneration effect of electron-beam irradiated hydroxyapatite and tricalcium phosphate mixtures with 7 to 3 ratio in the calvarial defect model of a rat. *Tissue Eng Regen Med* 2012;9:24-32.
2. Jiang B, Wu Z, Zhao H, *et al.* Electron beam irradiation modification of collagen membrane. *Biomaterials* 2006;27:15-23.
3. Ponader S, Vairaktaris E, Heintz P, *et al.* Effects of topographical surface modifications of electron beam melted Ti-6Al-4V titanium on human fetal osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 2008;84:1111-9.
4. Fray ME, Bartkowiak A, Prowans P, Slonecki J. Physical and mechanical behavior of electron-beam irradiated and ethylene oxide sterilized multiblock polyester. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:757-62.
5. Takahashi S, Sugimoto M, Kotoura Y, Sasai K, Oka M, Yamamuro T. Long-term changes in the haversian systems following high-dose irradiation. An ultrastructural and quantitative histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76:722-38.
6. Kim JH, Kim SM, Kim JH, Kwon KJ, Park YW. Effect of type I collagen on hydroxyapatite and tricalcium phosphate mixtures in rat calvarial bony defects. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2008;34:36-48.
7. Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2005;72:136-45.
8. Diociaiuti M. Electron energy loss spectroscopy microanalysis and imaging in the transmission electron microscope: example of biological applications. *J Electron Spectrosc Relat Phenomena* 2005;143:189-203.
9. Johansson LS, Campbell JM, Koljonen K, Stenius P. Evaluation of surface lignin on cellulose fibers with XPS. *Applied Surface Science* 1999;144-145:92-5.
10. Clark DT. Synthesis, characterization, modification and degradation of polymer surfaces as revealed by ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis). *Pure Appl Chem* 1985; 57:941-4.
11. Koljonen K, Oesterberg M, Johansson LS, Steiuns P. Surface chemistry and morphology of different mechanical pulps determined by ESCA and AFM. *Colloids and Surfaces A, Physicochem Eng Aspects* 2003;228:143-58.
12. Sivakumar M, Kumar TS, Shantha KL, Rao KP. Development of hydroxyapatite derived from Indian coral. *Biomaterials* 1996;17:1709-14.
13. Frost RL, Mills SJ, Weier ML. Peisleyite an unusual mixed anion mineral—a vibrational spectroscopic study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2005;61:177-84.
14. Fleet ME, Liu X. Coupled substitution of type A and B carbonate in sodium-bearing apatite. *Biomaterials* 2007;28:916-26.
15. Paddock SW. Confocal laser scanning microscopy. *Biotechniques* 1999;27:992-1004.

16. Brodie JC, Goldie E, Connel G, Merry J, Grant MH. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. J Biomed Mater Res A 2005;73: 409-21.
17. Nair MB, Suresh Babu S, Varma HK, John A. A triphasic ceramic-coated porous hydroxyapatite for tissue engineering application. Acta Biomater 2008;4:173-81.