천연 및 인공원료로부터 제조한 생체친화형 하이드록시아파타이트 세라믹스

이종국[†] · 고영화 · 이난희

조선대학교 신소재공학과

Biocompatible Hydroxyapatite Ceramics Prepared from Natural Bones and Synthetic Materials

Jong Kook Lee[†], Young Hwa Ko and Nan Hee Lee

BK21 Education Center of Mould Technology for Advanced Materials & Parts, Department of Advanced Materials Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(2012년 5월 22일 접수 : 2012년 5월 30일 최종수정 : 2012년 5월 31일 채택)

Abstract Hydroxyapatite (HA) is well known as a biocompatible and bioactive material. HA has been practically applied as bone graft materials in a range of medical and dental fields. In this study, two types of dense hydroxyapatite ceramics were prepared from natural bones and synthetic materials. The biocompatibility of HA ceramics for supporting osteoblast cell growth and cytotoxicity using an in vitro MG-63 cell line model were respectively evaluated. Artificial hydroxyapatite shows relative density of 93% with 1-2 μm after sintering, but a hydroxyapatite compact derived from bovine bone has low sintered density of 85% with a small content of MgO. Irrespective of the starting raw materials, both types of sintered hydroxyapatite displayed similar biocompatibility in the tests. FE-SEM observations showed that most MG-63 cells had a stellar shape and formed an intercellular matrix containing fibers on sintered HA. The cells were well attached and grown over the HA surface, indicating that there was no toxicity.

Key words hydroxyapatite, biocompatibility, natural bones, synthetic materials.

1. 서 론

최근 각종 사고 및 산업재해가 증가함에 따라 골절환자의 수가 급격히 늘어나고 있으며, 이에 따라 인공 뼈 등 근 골격계 임플란트를 이식하는 환자의 수도 매년 증가하는 추세를 보이고 있다. 생체재료는 손상된 인체의 일부 장기를 대체하거나 치료를 위하여 인체에 삽입하는 재료를 일컫는데, 인체에 삽입되는 임플란트용 생체재료는 생체 적합성을 보유해야만 한다.^{1,2)} 일반적으로 생체재료에서 요구되는 생체적합성이란 재료나 장치가 몸속에서 기능을 하는 동안 생리학적으로 독성이 없는 성질을 말하는데, 현재까지 개발된 재료 중 생체적합성이 가장 좋은 인공 뼈 대체용 소재는 인체 내 뼈 구성성분 중 약 70%를 차지하는 하이드록시아파타이트계 생체재료로 알려져 있다.³⁾

하이드록시아파타이트(Hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 이하 HA로 표기함)는 인산칼슘계 세라믹스 화합물 중 하

나로 생체친화성이 우수하기 때문에 인공치아, 인공뼈 등의 생체용 세라믹 재료로 널리 활용되고 있으며, 최근에는 표면활성, 생체친화성 및 조직유연성을 이용하여 약물전달물질로 활용하는 연구가 활발하게 진행되고 있고, 그 활용성 및 사용범위가 급격히 증가하고 있다.^{4,6)}

현재 HA의 합성법으로는 습식 침전법과 건식법이 가장 많이 사용되고 있는데,^{7,8)} 침전법으로 합성된 HA 분말은 약 20~50 nm 정도의 미세한 입자가 얻어지는 장점이 있으나 온도, pH, 출발원료의 조성 등 합성조건에 따라 Ca/P 몰비가 달라지며, 이론 조성(Ca/P 몰비 = 1.67)에 맞지 않는 하이드록시아파타이트가 합성되었을 경우 열처리 도중 $\beta\text{-TCP}(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ 와 같은 이차상으로 분해되는 단점이 있다. 건식법은 조성의 제어는 용이하지만 분체특성 면에서 입자가 크고 불규칙한 단점이 있으며, 수열법은 결정성이 뛰어난 분체가 얻어지지만 미세한 입자를 얻는 것은 어려운 것으로 알려져 있다.⁹⁾

이러한 문제점 때문에 합성 인산칼슘계 세라믹이 포함된 임플란트 소재는 시술 후 HA 코팅 층의 박리나 입자이탈이 일어나 기계적 성질 및 생체 내 안정성이 크게 나빠지고, 이로 인해 임플란트로서의 기능이 약화되

[†]Corresponding author

E-Mail : jklee@chosun.ac.kr (J. K. Lee)

거나 몸 속에서 임플란트의 일부가 파괴되어 염증유발 등 부작용을 나타내게 된다.¹⁰⁾

이에 비하여 동물 뼈 등 천연 인산칼슘계 원료로부터 얻는 HA는 각종 미량 금속원소가 포함되어 조성이 사람의 뼈와 거의 동일할 뿐 만 아니라 생체적합성이 매우 뛰어나고, 제조하기가 비교적 쉬우며, 대량으로 싸게 만들 수 있다는 장점이 있다. 또한 그동안 우려되었던 2차 감염에 대한 문제는 동물 뼈를 1000-1200°C의 고온에서 열처리하여 제조함으로써 해결하고 있으며, 이로 인해 최근 의·공학 분야에서 동물 뼈로부터 추출한 HA 분말 및 임플란트에 대한 각종 특허가 급증하고 있다.¹¹⁾

동물 뼈로부터 고온으로 하소하여 제조한 HA 분말의 경우 인조 합성된 HA 분말에 비해 입자크기가 크고, 불규칙한 형태를 나타내기 때문에 고밀도의 치밀한 HA를 제조하는데 어려움을 가지고 있으나 수용액이나 SBF 용액 내에서 장기간 유지하여도 기계적인 열화현상에 의한 균열생성이 적고, 균열 생성으로 인한 강도 감소나 경도 감소가 매우 낮은 것으로 보고된 바 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 이들의 연구 결과에 의하면 동물 뼈에서 제조된 하이드록시아파타이트 소결체의 경우 인공합성된 하이드록시아파타이트에 비하여 수용액이나 SBF 용액에서의 용해도가 매우 낮아 입계간 용해가 억제되기 때문에 생체안정성이 매우 큰 것으로 보고되었다. 반면에 인공합성 하이드록시아파타이트의 경우 조성의 불균질성에 의해 용해가 쉽게 일어나는 TCP 상이 입계에 주로 생성되어 수용액에 의한 입계 용해 및 균열이 생성되고, 이들 균열이 시편 내부로 전파되면서 기계적 성질이 급격히 약화되는 것으로 나타났다. 그러므로, 동물 뼈 등 천연 석회질 원료로부터 하이드록시아파타이트를 제조할 경우 저밀도 소결체는 하중이 크지 않은 부위에 사용할 수 있으며, 하중이 크게 걸리는 임플란트의 경우에는 가압소결 등의 방법으로 고밀도, 고강도의 소결체를 제조하여 적용하는 것이 가능하나 현재까지 이들 소결체에 대한 생체 친화성 실험은 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 동물 뼈에서 추출한 HA 분말 및 인공합성으로 제조한 HA 분말을 사용하여 HA 소결체를 제조한 다음 생체 내부 환경과 유사한 in vitro 조건에서 조골세포와 HA 재료와의 부착능 실험을 통하여 생체친화성을 비교해 보고자 하였다.

2. 실험 방법

천연 HA 원료 물질로는 음식점에서 발생하는 소뼈를 수거하여 사용하였다. 수거된 소뼈는 방해 요소인 유기물과 염분 등을 제거하기 위하여 일차적으로 물로 세척하고 칫솔로 시료 표면의 큰 유기물들을 제거하였다. 이

후, 80°C로 가열된 0.1%의 NaOH 수용액에 투입한 다음 4시간 교반하여 소뼈에 포함되어 있는 잔여 유기물 등을 제거하였다. 유기물이 제거된 소뼈는 흐르는 물에 48시간 동안 수세하여 소뼈에 부착된 Na 이온 등을 제거하였다.

수세된 소뼈는 건조기 내에서 80°C로 건조하여 수분을 제거하였고, 소 뼈 내부에 잔류하는 유기물을 완전히 제거하기 위해 고온으로 하소시키는 방법을 통하여 분말을 제조하였다. 소 뼈의 열분해 거동을 관찰하기 위하여 1200°C의 온도 까지 DTA-TG 분석과 육안관찰에 의한 색상분석을 행하였으며, 이들 실험결과를 바탕으로 소뼈의 분쇄물을 800°C에서 1시간 동안 하소하여 최종적인 HA 분말을 제조하였다. 하소된 분말을 48시간 동안 attritor 볼 밀을 한 후 80°C의 온도에서 건조하였으며, 하소된 분말의 상분석은 X선 회절분석을 통하여 수행하였다.

천연 원료로부터 제조된 분말의 생체친화성을 비교 관찰하기 위한 인공합성 원료로는 시중에서 상용 HA 분말을 구입하여 출발물질로 사용하였는데 이 분말은 일본 신요사에서 침전법을 통하여 제조된 분말로 입자크기가 20-50 nm였으며, Ca/P비는 1.67이고 순수한 하이드록시아파타이트 상을 갖는 분말이었다. 각각의 분말을 일축가압으로 성형하여 실린더형 성형체를 제조한 다음, 220 MPa의 압력으로 정수압성형을 행하여 고밀도의 성형체를 제조하였다. 소결은 수증기 분위기에서 1200°C의 온도로 1시간 동안 행하였으며, 소결 후 밀도분석, 상분석, 미세구조 분석을 행하였다.

세포 반응성 실험에 사용된 MG-63 세포는 조골세포의 세포배양 실험을 통하여 얻었다. human osteoblast-like cell line인 MG-63 세포는 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 내에서 배양되었으며, 배양은 37°C의 온도에서 CO₂가 5% 공급되는 환경조건에서 실시하였다. DMEM 배양액에는 10% fetal bovine serum (16000-044, Gibco)와 항생제로서 1%(v/v) antibiotic antimycotic solution(15240-0620, Gibco)을 첨가하였으며, completed media는 2일에 한 번씩 정기적으로 교체하였다.

HA 소결체의 세포반응성 실험을 위해서 우선 소결체의 표면을 다이아몬드 정반에서 1 µm까지 연마한 다음, Autoclave 내에서 121°C로 멸균하였다. 멸균한 HA 시편은 건조 후 24 well plate에 연마된 부분이 위를 향하도록 배치한 다음, MG-63 세포를 well 당 1×10⁴개 씩 분주하고 인큐베이터 안에서 배양하였다.

MG-63 세포는 단위면적 1 cm²당 약 6×10⁴개 정도일 때 거의 포화된다고 보고된바 있는데,¹⁵⁾ 단위 면적당 세포 개체 수 및 세포의 doubling time을 고려하여 각각 1, 3, 5일 되는 시점에 증식 실험을 수행하였다. 세포 배양 후 일정 시간이 지나면 배양액을 제거하고, 인산완충용액

(dulbecco's phosphate buffer saline, 21600-010, Gibco)을 첨가한 다음, 다시 제거하는 과정으로 반복하여 세척하였다. 시편 위에서 세포의 성장 및 증식을 알아보기 위하여 세척한 시편을 24well에 옮긴 후 4% Paraformaldehyde를 2시간동안 반응 후 제거하고, 그런 다음 50, 60, 70, 80, 90, 100% 알콜에 10분씩 시편을 침적시켜 4% paraformaldehyde를 세척하였다. 마지막으로 isoamyl acetate에 3시간 이상 담근 후 실온에서 건조시켜 주사전자현미경(SEM, H-4800, HITACHI)으로 관찰하였다. 조골세포의 성장은 MTS assay로 측정하였는데, 세척된 시편 위에 MTS 시약을 분주한 다음 96 well plate로 옮긴 후 microplate reader를 이용, 490 nm에서 흡광도를 측정하여 각 조건에 따른 상대적인 부착능을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

표면 유기물을 제거한 소뼈는 노란색을 나타내었는데, 열처리 온도가 증가함에 따라 색상이 점차 변화하였다. 열처리 온도에 따른 소 뼈의 열분해 특성을 알아보기 위하여 TG/DTA 분석을 행한 결과(Fig. 1), 250°C에서부터 600°C 까지 유기물의 연소에 의한 발열피크와 중량감소가 나타났으며, 특히 280°C 및 430°C부근에서 큰 발열피크가 관찰되었다. 한편 중량분석 결과를 보면, 100°C까지는 수분의 증발에 따른 소량의 중량 감소를 보였고,

Fig. 1. TG/DTA analysis of bovine bone.

Table 1. The color of bovine bone calcined up to 800°C for 1 h.

Temperature (°C)	Color
Before calcination	Yellow
500	Brown
600	Grey
700	Bright grey
800	White

250-600°C 사이에서는 유기물의 분해에 의해 급격한 무게 감소를 보이고 있다. 그러나 600°C 이후에는 미세한 무게 감소만 있을 뿐 커다란 무게 감소가 관찰되지 않았다. 500-1200°C의 온도 구간에서 1시간 동안 각각 하소하여 하소온도에 따른 소뼈의 색상을 육안으로 살펴본 결과(Table 1), 500°C에서는 갈색, 600°C에서는 회색, 700°C에서는 밝은 회색, 그리고 800°C 이상에서는 모두 흰색을 나타내었다.

이것으로 미루어 소뼈는 열처리 시 600°C까지는 대부분의 유기물의 분해가 이루어지고, 분말 내에 잔류된 일부 탄소도 800°C에서 대부분 분해가 끝나 모두 제거되는 것으로 판단되었다. 따라서 본 실험에서는 하소 온도를 800°C로 정하였으며, 하소시간은 1시간으로 고정하여 하이드록시아파타이트 분말을 최종적으로 제조하였다.

인공 합성된 HA 분말 및 소 뼈를 800°C로 1시간 하소하여 제조한 HA 분말의 미세구조 및 X선 회절 분석 결과를 Fig. 2 및 Fig. 3에 나타내었다. 인공합성된 HA 분말의 경우 구성 입자가 약 20-50 nm의 크기를 갖는 미세한 구형 분말이었으며, 입자 간에 약간의 응집을 나타내었다. 또한 X선 회절 분석결과 TCP, CaO 등 제2상이

Fig. 2. (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of synthetic HA powders after calcination at 800°C for 1 h.

Fig. 3. (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of bovine bone derived-HA powders after calcination at 800°C for 1 h.

존재하지 않는 순수한 하이드록시아파타이트 피크만 존재하였다.

이에 비하여 소뼈를 하소하여 제조한 HA 분말은 0.6-0.7 μm의 비교적 큰 크기를 나타냈으며, 하소 과정 중 입자와 입자 간에 부분적인 결합이 이루어진 강한 응집입자 특성을 나타내었다(Fig. 3). X-선 회절 분석 결과 2θ가 42.5도 근처에서 MgO를 나타내는 작은 피크가 관찰되었으며, 이를 제외하고는 모두 HA 특성 피크를 나타내었다. 천연 뼈로부터 제조된 XRD 회절 피크의 폭과 강도를 인공합성 HA 분말의 것과 비교해 보면 전체적으로 피크의 폭은 넓고 피크 강도는 낮은 것을 확인할 수 있는데, 이는 SEM 사진에서 보이는 분말 입자가 나노크기의 일차 미립자가 응집된 이차입자이기 때문인 것으로 보인다.¹⁶⁾

일반적으로 생물학적 동물의 뼈에는 하이드록시아파타이트를 구성하는 Ca 및 P 원소 외에도 많은 미량 원소들이 존재하는데, 대표적인 원소로는 Mg, Na, Si, Zn 등이 있으며, Ca/P 비는 사람의 뼈와 유사한 1.73을 나타내는 것으로 보고되었다¹¹⁾ 이러한 미량 성분들은 하이드

Fig. 4. (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of synthetic HA ceramics after sintering 1200°C for 1 h.

록시아파타이트의 결정구조 내에서의 격자 위치가 정확히 밝혀지지 않았지만 수용액 내에서 이들 미량 원소들의 작용에 의해 하이드록시아파타이트 입자들이 음의 제타 전위를 띠게 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 미량원소들은 전기화학적 반응 외에도 세포와의 반응이나 뼈의 기계적 물성에도 큰 영향을 미칠 것으로 예상되는데, 이에 대한 상세한 연구결과는 미미한 실정이다. 대체적으로 동물 뼈에 포함된 하이드록시아파타이트 입자는 길이 40 nm, 두께 1.5~3 nm의 막대상으로 이루어져 있으며, 나노입자가 일정한 배열을 한 상태에서 이들 사이를 콜라겐이 채우고 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 생물학적인 뼈는 이와 같은 복합 나노구조 덕분에 10-20 GPa의 탄성계수 및 100 MPa의 강도를 가지며, 강하면서도 유연성을 나타낼 뿐만 아니라 화학적으로도 안정하여 몸속에서 기계적 성질의 열화 없이 장기간 유지되고 있다.^{20,21)}

Fig. 4와 Fig. 5에는 1200°C 온도에서 1시간동안 소결한 후, 세포배양을 위해 표면을 1 μm의 다이아몬드 미립자로 연마한 HA의 표면 사진 및 소결체 상분석 결과를 나타내었다. 상용 HA 소결체의 경우 약 93%의 소

Fig. 5. (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of bovine bone derived-HA ceramics after sintering at 1200°C for 1 h.

결밀도를 나타냈으며, 입자크기는 1-2 μm 크기로 구성되어 있었다. 소결밀도가 비교적 높아 표면에는 적은 양의 기공만 존재하였다. X-선 회절에 의한 소결체의 상 분석 결과, 분말의 XRD와 유사한 특성을 나타내었으며, 소결 시 TCP로의 상분해나 상전이는 일어나지 않는 것을 알 수 있었다.

소뼈로부터 추출된 분말을 사용하여 제조된 HA 소결체의 경우 약 85%의 낮은 소결밀도를 나타내었는데, 이는 분말의 이차 입자 크기가 크고 응집이 비교적 큰 상태인 분말로 성형하여 소결을 행했기 때문에 나타난 결과로 보인다. 이에 따라 연마한 시편의 표면에는 그림에서 보여주듯이 많은 연결 기공이 존재하였다. 소결된 시편의 상분석 결과, 앞서의 경우와 마찬가지로 상분석시 나타나는 TCP상이나 CaO 상은 관찰되지 않았는데, 분말의 XRD와 같이 HA 상이 대부분이었고, 이외에도 MgO의 미세 피크가 관찰되었다.

연마된 HA 표면에 MG-63 cell을 well 당 1×10^4 개를 분주시킨 다음, 공기 중 5%의 이산화탄소를 포함하고 37°C로 유지시킨 인큐베이터 내에서 1, 3, 5일 증식 실험

Fig. 6. FE-SEM micrographs of adherent cells on synthetic HA ceramics with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days.

을 수행하였으며, 그 결과를 SEM으로 고찰하여 Fig. 6과 Fig. 7에 나타내었다. 그림에서 보듯이 MG-63 세포는 두 시편 위에 잘 부착되어 성장하였는데, 둥근 형태의 핵으로 강조되는 세포들은 별 모양으로 잘 뻗어 자라는 모습이며, 시간이 지남에 따라 둥근형태의 핵이 선명하게 드러날 뿐 아니라 세포질이 끼리 잘 연결되어 있음을 알 수 있었다.

이러한 결과로 미루어 출발원료와 관계없이 인공합성 HA와 소뼈로부터 제조된 HA는 인산칼슘계 세라믹스로 이루어져 있기 때문에 생체친화성이 크고, 이로 인하여

Fig. 7. FE-SEM micrographs of adherent cells on bovine bone derived-HA ceramics with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days.

세포의 부착 및 증식이 잘 이루어진 것으로 보이며, 이것으로 미루어 본 실험에서 제조된 HA 소결체 내에는 세포에 대한 독성이 없으며, 생체 친화성이 큰 것으로 확인되었다. 두 종류의 시편 모두 세포의 부착력은 비교적 높게 나타났지만, 부착형태 및 퍼짐 형상은 약간의 차이를 보였는데 그 차이는 미세하였다. 전체적으로 인공합성 HA와 소뼈로부터 제조된 HA 시편의 표면에서는 증식 시간이 증가함에 따라 MG-63 세포가 수 및 퍼짐 현상이 증가하였다. 특히 5일이 지난 후에는, 세포의 성장으로 인하여 HA 표면에 세포가 밀집되어 있는 것이 관찰되었다.

Fig. 8. Cell proliferation measured as absorbance using MTS assay after cell culture for 1, 3 and 5 days on the synthetic HA and bovine bone derived-HA ceramics.

Fig. 7에는 세포 증식과 생존능력을 MTS assay로 측정한 결과를 나타내었다. 세포배양 1일, 3일이 지난 후, 인공합성 HA의 경우 소뼈로부터 제조된 HA보다 세포의 증식량이 많았지만 5일이 지난 후에는 인공합성 HA와 소뼈로부터 제조된 HA 표면에서 세포의 증식양이 유사하여 거의 같은 흡광도 값을 나타내었다. 하이드록시아파타이트 표면에 부착되는 세포의 양은 보통 표면의 형상과 비표면적, 그리고 화학적 조성등에 따라 변할 수 있는데, 기공의 양보다는 표면적이나 표면 거칠기에 더 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있는데,²²⁾ 똑 같은 조성의 하이드록시아파타이트에서 표면 거칠기가 다른 경우 세포의 부착 및 증식된 양이 달라졌는데, 표면거칠기가 증가할수록 세포의 부착량이 증가하였다. 본 실험의 경우 인공합성 HA의 경우 배양 초기 부분적인 입체용해가 진행되면서 표면거칠기가 커지고, 이에 따라 세포의 초기 부착능이 다소 증가한 것으로 예측된다. 표면 거칠기 등 물리적 특성 외에도, 표면의 조성이나 용해특성에 따라 세포의 부착능과 증식량이 달라질 수 있는데, 천연 뼈로부터 만들어진 하이드록시아파타이트의 경우 배양 실험 시 표면의 제타 전위가 음으로 나타나 세포의 부착이나 증식을 촉진하는 것으로 보고된 바 있다.²³⁾ 본 실험의 결과에서도 배양시간이 길어짐에 따라 천연 뼈로부터 만들어진 HA에서 세포의 부착과 증식이 보다 큰 것으로 관찰되었다.

4. 결 론

인공합성된 HA 분말 및 소 뼈에서 추출한 HA 분말을 사용하여 소결체를 제조한 다음, 조골세포인 MG-63 cell의 증식 및 분화실험을 통하여 출발원료에 따른 HA

재료의 생체 친화성을 고찰하였다. 인공합성 HA와 소뼈로부터 추출된 HA 분말을 사용하여 제조된 소결체는 분말 특성의 차이에 의해 입자크기, 밀도, 상 조성에서 큰 차이를 나타내었다. 그러나 두 소결체에서 세포의 성장 및 증식 실험을 수행한 결과 생체 친화성 측면에서는 거의 유사한 특성을 나타내었다. 증식실험 초기에는 인공합성 HA 소결체에서 세포의 증식이 다소 잘 이루어졌지만 증식 실험 후 5일이 지난 시편에서는 세포의 증식이 거의 동일한 수준으로 유지되었다. 따라서 소 뼈로부터 제조된 HA의 경우에도 기존의 인공합성 HA와 마찬가지로 우수한 생체친화성을 갖고 있는 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 논문은 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다(No. 2011-0027521).

참 고 문 헌

1. L. L. Hench, J. Am. Ceram. Soc., **74**, 1487 (1991).
2. Y. Zhang, G. Yin, S. Zhu, D. Zhou, Y. Wang, Y. Li and L. Luo, Curr. Appl. Phys., **5**, 531 (2005).
3. L. Hong, H. C. Xu and K. de Groot, J. Biomed. Mater. Res., **26**, 7 (1992).
4. H. H. Jin, D. H. Kim, T. W. Kim, H. C. Park and S. Y. Yoon, Kor. J. Mater. Res., **21**, 347 (2011) (in Korean).
5. D. S. Seo, H. Kim and J. K. Lee, Kor. J. Mater. Res., **14**, 35 (2004) (in Korean).
6. S. C. Ryu, Kor. J. Mater. Res., **14**, 786 (2004) (in Korean).
7. M. Jarcho, C. H. Bollen, M. B. Thomas, J. Bobick, J. F. Kay and R. H. Doremus, J. Mater. Sci., **11**, 2027 (1976).
8. J. A. M. Clemens, J. G. C. Wolke, C. P. A. T. Klein and K. de Groot, J. Biomed. Mater. Res., **48**, 741 (1999).
9. Y. Yokogawa, Phosphorus Research Bulletin, **20**, 33 (2006).
10. Y. Li, X. Zhang and K. de Groot, Biomaterials, **18**, 737 (1997).
11. C. Y. Ooi, M. Hamdi and S. Ramesh, Ceram. Int., **33**, 1171 (2007).
12. Y. G. Kim, D. S. Seo and J. K. Lee, Appl. Surf. Sci., **255**, 589 (2008).
13. Y. G. Kim, D. S. Seo and J. K. Lee, J. Phys. Chem. Solid., **69**, 1556 (2008).
14. A. Doostmohammadi, A. Monshi, R. Salehi, M. H. Fathi, S. Karbasi, U. Pielers and A. U. Daniels, Mater. Chem. Phys., **132**, 446 (2012).
15. J. Jeong, Y. K. Kang, H. W. Song, O. J. Han, I. Y. Ok, J. S. Jung, J. M. Oh, T. U. Park and J. H. Choy, J. Korean Orthop. Assoc., **39**, 56 (2004) (in Korean).
16. A.Y. Pataquiva Mateus, M. P. Ferraz and F.J. Monteiro, Key Eng. Mater., **330**, 243 (2007).
17. F. Chen, Z. C. Wang and C. J. Lin, Mater. Lett., **57**, 858 (2002).
18. S. M. Kuo, S. J. Chang, C. C. Ho, S. F. Chen and L. C. Lin, in Proceedings of the 27th Annual International Conference of the IEEE-EMBS 2005(Shanghai, China, September 2005) p. 1248.
19. D. A. Wahl and J. T. Czernuszka, Eur. Cell. Mater., **11**, 43 (2006).
20. D. R. Carter and D. M. Spengler, Clin. Orthop. Relat. Res., **135**, 192 (1978).
21. J. Y. Rho, L. K. Spearing and P. Zioupos, Med. Eng. Phys., **20**, 92 (1998).
22. D. D. Deligianni, N. D. Katsala, P. G. Koutsoukos and Y. F. Missirlis, Biomaterials, **22**, 87 (2000).
23. W. F. Zambuzzi, C.V. Ferreira, J.M. Granjeiro and H. Aoyama, J. Biomed. Mater. Res., **97A**, 193 (2011).