

Hydroxyapatite Bioceramics 의 생체 친화성에 관한 연구 : (II)
인공 체액에서의 거동 및 생체 친화성

김양수* · 고형열 · 송종택** · 최상훈

한양대학교 무기재료공학과

*단국대학교 화학과

**단국대학교 재료공학과

(1990년 4월 4일 접수)

Study on the Biocompatibility of Hydroxyapatite Bioceramics : (II)
Behavior in Simulated Body Fluid and Biocompatibility

Y.S. Kim*, H.Y. Ko, J.T. Song** and S.H. Choi

Dept. of Inorg. Mats Eng., Hanyang Univ.

*Dept. of Chemistry, Dankook Univ.

**Dept. of Mats. Sci. and Eng., Dankook Univ.

(Received April 4, 1990)

요 약

Hydroxyapatite 를 침전법으로 $Ca/P=1.67$ 로 pH11에서 합성하고 소결하여 인공 체액 증에서의 거동, 세포 독성 시험 및 동물 반응시험 등 생체 친화성을 검토하였다.

인공 체액 증에서 hydroxyapatite ceramics 는 구조적으로 안정하였다. Hydroxyapatite 는 세포 증식을 저해하지 않았으며, 세포 독성을 나타내지 않았다. Sprague-Dawley 계 백서 복부피하에 hydroxyapatite 를 메식한 실험에서 hydroxyapatite 는 그 주위의 연조직에 대한 거부반응은 관찰할 수 없었다.

ABSTRACT

Hydroxyapatite powders were synthesized with $Ca/P=1.67$ and $pH=11$ by precipitation method, after characterization of these specimen, behavior in Ringer's solution and biocompatibility of hydroxyapatite, such as cytotoxicity test and implantation test, were investigated.

The hydroxyapatite ceramics had structural stability in Ringer's solution. and hydroxyapatite ceramics did not prevent cell growing and exhibit any cytotoxic effects. In implantation of hydroxyapatite ceramics into muscle under abdome of guinea pig, hydroxyapatite ceramics did not show any symptom of rejection for cellular texture

1. 서 론

Hydroxyapatite는 생체 내의 환경에서 생체를 구성하고 있는 성분과 비슷하여 implant 제로로서 활용 가능성이 매우 높게 평가되므로 많은 관심을 갖고 연구되고 있으며¹⁻⁵⁾, 저자들은 견보에서 hydroxyapatite 소결체의 특성과 인공 체액에서의 반응성을 검토 보고하였다⁶⁾.

Implant 재료로서의 연구는 생물학적 안정성을 확인하기 위한 독성 연구⁷⁾, 생체 환경 내에서의 표면 활성 연구⁸⁾ 근육 세포조직에서의 이식 재료의 거동 연구^{9,10)} 및 치아조직에 대한 연구¹¹⁾ 등 많은 생체 친화성 연구도 행하여지고 있다

Hydroxyapatite는 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 의 화학식을 갖고 있으나, 비 화학양론성으로서^{6,12-14)}, Ca/P 몰비가 낮은 화합물(일반식: $Ca_{10-z}(HPO_4)_z(PO_4)_{6-z}(OH)_{2-z} \cdot nH_2O$; $z=0-1$, $n=0-2$)은 구조 유연성 및 표면 활성이 크며, Ca/P 몰비가 이론치 1.67에 가까운 조성물은 고온까지 안정하여 고밀도의 소결체를 얻을 수 있다

본 연구에서는 견보⁶⁾에 이어 hydroxyapatite 소결체의 인공 체액 속에서의 거동과 세포 배양 및 독성 시험, 그리고 동물 이식 실험 등을 통하여 생체 친화성을 검토하였다.

2. 실험방법

2.1. Hydroxyapatite의 합성

Calcium nitrate와 diammonium hydrogen phosphate를 출발 물질로 견보와 같은 방법⁶⁾으로, Ca/P 몰비 1.67, 온도 40°C, pH11로 2시간 숙성하여 합성한 hydroxyapatite 분말을 사용하였다. 합성한 hydroxyapatite 분말을 4×1cm의 bar mold를 사용하여 200kg/cm²의 압력으로 1차 성형한 후 지름이 3.2cm인 cold isostatic mold를 사용하여 1370kg/cm²의 압력으로 정수 가압 성형하고 1150°C의 전기로에서 1시간 소성한 후 노냉하여 hydroxyapatite 소결체 시편을 만들었다

2.2. 인공 체액 중에서 Hydroxyapatite 거동 실험

인공 체액 중에서 합성한 hydroxyapatite의 거동을 보기 위하여 응출 시험을 하였다. Polyethylene 병에 인공 체액⁶⁾ (Ringer's solution) 100ml와 100°C, 1150°C, 1200°C, 1250°C의 온도에서 소성한 hydroxyapatite 분말을 2g 넣고 물 중탕에서 온도를 37°C로 조절하여 1, 7일

및 1, 3개월 동안 응출 시험을 하였다. 또한 완충 용액으로 pH를 각각 5, 7, 9로 조절한 인공 체액 100ml에 hydroxyapatite 2g씩 넣고 동일한 시험을 하였다. 각 시료는 소정 기간 후 G4 glass filter를 사용하여 여과하였다. Ca²⁺는 EDTA에 의한 직접 적정법(NN 지시약)으로, PO₄³⁻는 몰리브덴 청[염화 주석(II)] 흡광도법(KSM 0114)으로 정량하였다. 고상분은 60°C로 9시간 건조 후 X-선 회절분석, 적외선 흡수 분광 분석 및 주사전자 현미경 관찰을 하였다.

2.3. 세포 독성 실험

세포의 기동에 미치는 hydroxyapatite의 영향을 검토하기 위하여 hydroxyapatite가 존재하는 배양액 내에서 세포의 배양 상태를 관찰함으로써 독성 검사를 하였다.^{15,16)}

사용된 세포는 아프리카 green monkey kidney 유래 Vero-E₆ 세포로서 10% FBS(fetal bovine serum)와 Eagle의 DMEM(Dulbecco's minimal essential medium) 및 0.02% EDTA 용액을 등량씩 가하여 5% CO₂를 공급한 37°C로 조절된 incubator에서 3~4일 동안 배양하여 세포 단층이 정상적으로 형성되어 있는지를 파악한 후 실험 재료로 사용하였다.

Hydroxyapatite 시편을 10×4×0.3(mm³)의 크기로 하여 자의선에 15분간 조사 소독하여 사용하였다

세포 배양 상태는 hydroxyapatite 시편을 세포로 성장시킨 배양액이 들어 있는 Leighton tube 바닥 중앙에 놓은 후 37°C로 조절된 incubator에서 48시간 배양 후에 위상차 현미경으로 세포를 관찰하였다. 또한, 세포의 증식은 1.5cm²에 들어있는 세포(약 1.5×10⁶개)를 같은 조건에서 배양시켜 1, 2, 3, 4, 5일간 계수하여, 같은 조건으로 배양한 hydroxyapatite를 넣지 않은 대조군과 비교 검토하였다.

2.4. 동물 조직 반응 실험

Hydroxyapatite 시편에 대한 생체 조직의 반응을 보기 위하여, 시편을 동물 조직에 매입시켜 동물 조직 반응 시험을 하였다.

실험 동물은 체중 250g 내외의 Sprague-Dawley계의 백서를 사용하였으며 시판 고형의 사료를 공급하여 사육하였다. 매식한 hydroxyapatite 시편은 5×2×0.7(mm³)으로 정형(trimming)하여 사용하였다.

2.4.1. Hydroxyapatite 매식 수술

실험은 pentobarbital sodium (nembutal) 30mg/kg

을 복강 내 주사하여 진신 마취를 시행한 후 복부 피부를 2cm 길이로 수술용 메스를 사용하여 절개한 후 피하 조직을 undermining 시키고 hydroxyapatite 시편을 생리식염수에 충분히 침적시켜 함수시킨 후 피하에 삽입하고 silk 로 봉합하였다. 매식 수술 후 감염을 방지하기 위하여 항생제로 Licomycin HCl 30mg/kg/day 를 3일간 피하 주사하였다. 실험 동물은 매식 후 3일, 1주, 2주, 4주, 8주 간격으로 3마리씩 희생시킨 후 hydroxyapatite 매식 부위를 절제하여 10% 중성 formalin 에 48시간 고정하였다

2.4.2. 표본 제작

중성 formalin 에 고정된 조직을 다시 절개하여 hydroxyapatite 를 제거후 수세하여 70%, 80%, 90%, 95%, 100% ethyl alcohol 로 탈수하고 xylen 을 거쳐 paraffin 에 포매하였다. Paraffin 포매 조직을 4-6 μ m 두께의 paraffin 절편을 제작하여 탈 paraffin 을 시킨 후 Hematoxylin-Eosin 으로 중 염색을 시행하여 현미경 조직 표면을 제작 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 인공 체액 중에서 hydroxyapatite 의 거동

3.1.1. 소성 온도를 달리한 hydroxyapatite 의 거동

Ca/P 몰비 1.67로 pH11에서 형성하여 소성 온도를 달리한 hydroxyapatite 의 인공 체액에 대한 Ca²⁺ 및 PO₄³⁻ 의 용출 또는 흡착량을 Fig. 1과 2에 나타내었다. 인공 체액 중에서는 본래 Ca²⁺가 116.8 μ g/ml, PO₄³⁻가 42.2 μ g/ml 를 포함하고 있으므로 미리 농도 계산에 고려하였다.

전체적으로 hydroxyapatite 분말에서의 용출은 같은 경향을 보이고 있다. 즉, Ca²⁺의 농도는 전반적으로 초기에는 Ca²⁺가 용출되었다가 1일 지나서 부터는 서서히 hydroxyapatite 에 흡착되고 있다. PO₄³⁻의 경우는 인공 체액으로 부터 hydroxyapatite 에 일단 흡착된 후, 7일에는 용출되었다가 그 후는 Ca²⁺와 마찬가지로 서서히 흡착 현상을 나타내고 있다. 여액의 액상 농도로 부터 Ca/P 몰비를 계산해 보면, Table 1에 보인 바와 같이 초기에는 Ca/P 몰비가 커졌다가 1개월을 전후로 해서 거의 같아지게 되고 있는데 이것은 hydroxyapatite 의 "incongruent solubility"의 용해 특성을^{13,17)} 나타낸 것이다. 이러한 현상은 hydroxyapatite 표면에 칩화합물[Ca₂(HPO₄)(OH)₂]의 생성이니, 인공체액에 공존하는 다른 이온의 영향에 의해서 용해도의 저하가 일어나는 등, 여러 가지의 인자에 의한 것으로 설명되고 있으며¹⁸⁾, 또 Ca²⁺, PO₄³⁻의 hydroxyapatite 에 대한 흡착으로 [Ca₂(HPO₄)(OH)₂]에 의한 수화층(hydration layer)이 생긴 것으로

Table 1 Variation of Ca/P Concentration with Times When Sintered Hydroxyapatite was Soaked in Ringer's Solution.

sintering period \ temp	1000 $^{\circ}$ C	1100 $^{\circ}$ C	1150 $^{\circ}$ C	1200 $^{\circ}$ C	1250 $^{\circ}$ C
1 day	7.56	9.02	18.41	19.69	18.41
7 days	3.29	3.21	5.59	5.48	5.17
30 days	4.47	4.13	5.47	7.51	5.28
90 days	4.44	4.37	5.13	5.79	4.96

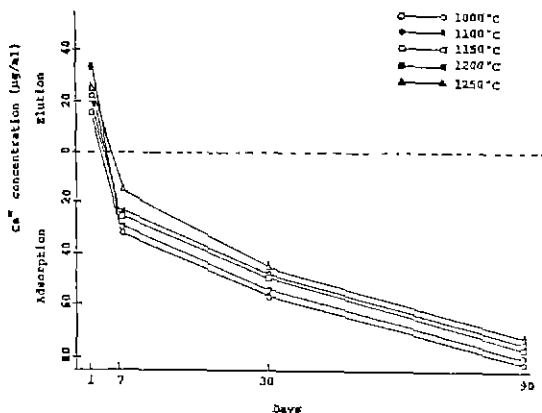


Fig 1. Ca²⁺ ion concentration in Ringer's solution.

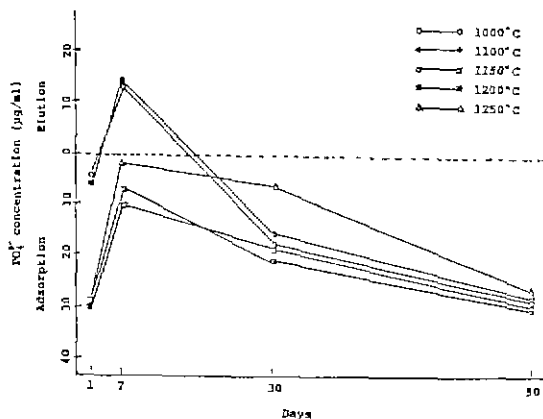


Fig 2. PO₄³⁻ ion concentration in Ringer's solution.

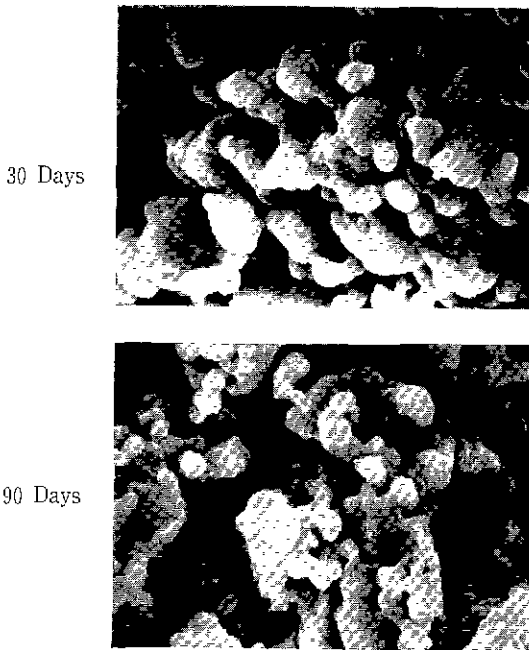


Fig 3. SEM photographs of hydroxyapatite powder soaked in Ringer's solution

생각되고 있다¹⁹⁾. Hydroxyapatite의 incongruent solubility를 나타내는 거동은 그 표면 상태 및 구조, 그리고 생체 환경에서의 반응 등에 주요한 구실을 할 것이다.

Fig. 3은 1150°C에서 소성한 hydroxyapatite 분말을 인공 체액에서 처리한 시편의 주사 전자 현미경 사진으로,

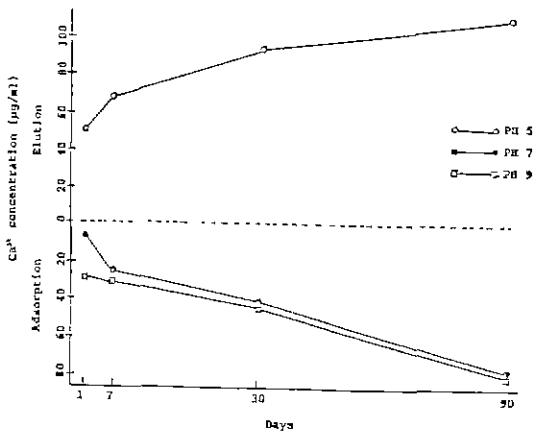


Fig.4 Ca²⁺ ion concentration in Ringer's solution.

hydroxyapatite와 인공 체액과 반응한 양상을 보여주고 있는데, 수회층¹⁹⁾을 확인할 수는 없었다. 고상분의 X-선 회절도에서는 인공 체액과 90일간의 반응에서도 hydroxyapatite의 구조에 별 차이를 보이지 않고 있으며, FT-IR 분석 결과에서도 반응 전 시료와 90일간 반응 시료 역시 별 차이 없이 632cm⁻¹, 3573cm⁻¹에서 OH⁻에 의한 흡수, 570cm⁻¹, 601cm⁻¹, 964cm⁻¹, 1045cm⁻¹, 1091cm⁻¹ 등에서 PO₄³⁻에 의한 흡수를 보이고 있다. 또, 인산칼슘염에 대한 용해도²⁰⁾에서도 pH 7 근처에서는 β-tricalcium phosphate보다는 hydroxyapatite가 안정한 것 등으로 보아 인공 체액 중에서 hydroxyapatite 소결체는 안정한 것으로 보인다.

3.1.2. pH를 조절한 인공체액 중에서 hydroxyapatite의 거동

원충 용액으로 pH를 5, 7, 9로 조절한 인공 체액 중에서 hydroxyapatite에 대한 Ca²⁺ 및 PO₄³⁻의 액상 농도를 Fig. 4, 5에 나타내었다. pH 7과 9로 조절한 인공 체액 중에서의 hydroxyapatite에 의한 Ca²⁺와 PO₄³⁻의 액상 농도 변화는 pH를 조절하지 않았을 때의 그것과 비슷한 경향을 나타내고 있다. pH 5에서는 pH 7과 9의 경우와는 달리, 처음부터 Ca²⁺ 및 PO₄³⁻가 용출되어 서서히 증가하고 있다. 이것은 hydroxyapatite가 산성에서는 화학적 안정성이 약하다는 것을 시사하고 있으나, 고상분의 X-선 회절결과에서 보면 3개월 처리시까지 hydroxyapatite의 결정 구조는 본래의 것과 거의 변화가 없으며, FT-IR 분석결과도 역시 반응 전과 별 차이를 찾아볼 수 없었다. Fig. 6은 pH를 달리한 인공 체액에서 처리한 hydroxya-

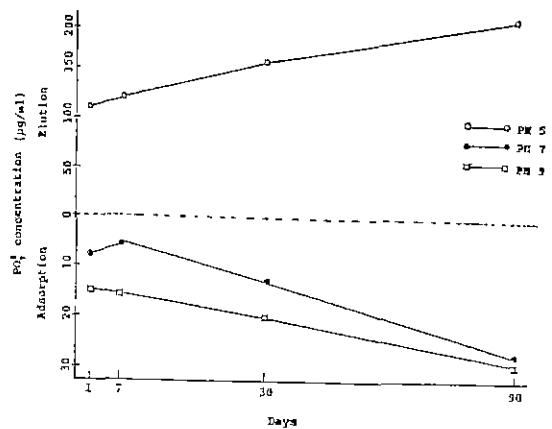


Fig 5. PO₄³⁻ ion concentration in Ringer's solution.

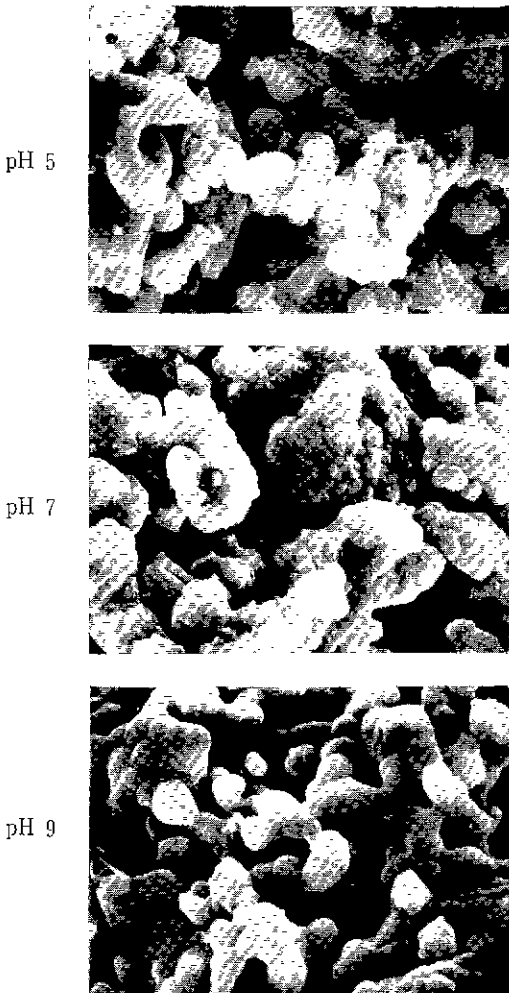


Fig.6 SEM photographs of hydroxyapatite powder soaked in Ringer's solution (90 days).

patite 소결체의 주사 전자현미경 사진으로, 역시 인공 체액 자체로 처리하였을 때 (Fig.3)와 비슷한 양상을 보이나, 다만 pH 5에서는 Ca^{2+} 및 PO_4^{3-} 의 용출이 많음을 보이고 있다. 따라서 pH 9, pH 7에서는 일부 상분의 용출 및 흡착은 있었으나 hydroxyapatite 소결체는 구조적으로 변화가 없음을 알 수 있다.

3.2. 세포 독성 시험

hydroxyapatite가 존재하는 배양액 내에서 세포의 배양 상태⁷⁾를 관찰하였다 Fig.7은 hydroxyapatite 시편을 incubator에 넣어서, 48시간 후에 세포의 형태 변화를 관찰한 사진이다 Hydroxyapatite 시편 주위에 방추형의

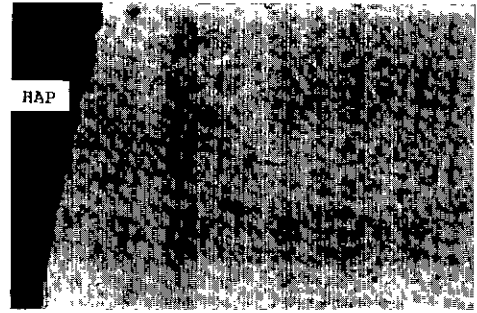


Fig.7. Phase-contrast micrograph of monolayer cultured vero-E₆ cells around a plate of hydroxyapatite(×400)

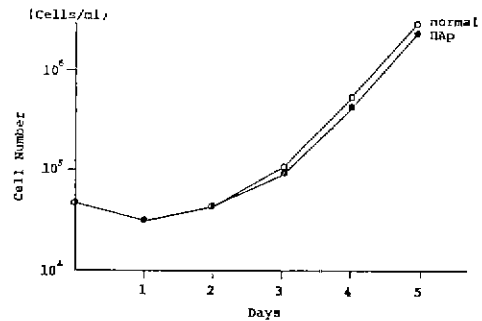


Fig.8. Growth of Vero-E₆ cell.

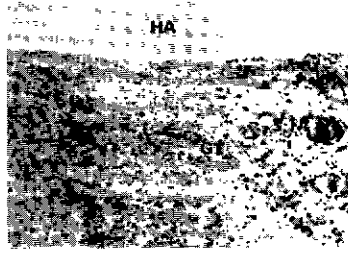
다형질 세포와 유사 분열형 세포가 관찰되었으며, 세포의 부스러기, 세포막의 파괴는 전혀 찾아볼 수 없었다. 이와 같이 hydroxyapatite는 전혀 독성을 나타내지 않는 것을 알 수 있었다.

Fig.8은 incubator 내의 세포수를 경시적으로 산정하여 나타낸 개포 증식 곡선이다. Hydroxyapatite를 첨가한 경우의 증식 곡선은 무첨가의 대조군의 증식 곡선과 겹치며, hydroxyapatite의 소결체는 개포의 증식을 저해하지 않았다.

3.3. 동물 조직 반응

Hydroxyapatite의 생체 반응을 관찰하기 위하여 Sprague-Dawley 계 백서 복부 피하에 hydroxyapatite를 메식하고, 조직 적합성을 경시적으로 관찰하였다(Fig 9)

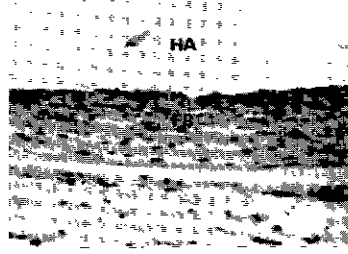
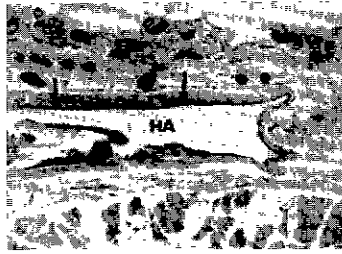
메식 3일 후, 수술 부위의 메식체 hydroxyapatite 주위에는 혈빙과 육아조직(granulation tissue)으로 구성되어 있다. 육아조직은 섬유아세포(fibroblast)와 혈관 내피 세



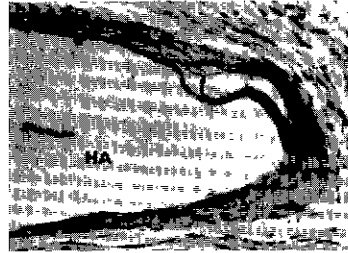
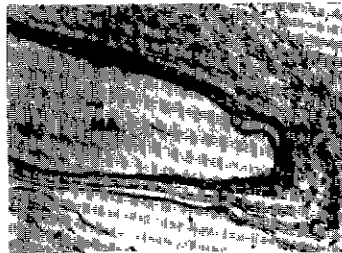
3 days after
The granulation tissue (GT) surrounds the HAp implant.



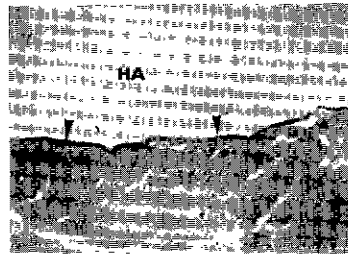
1 week after
The tissue reveals paralleling arranged fibroblasts(arrow) and slight round cell infiltration (arrow head)



2 weeks after
The thick fibrous band(arrow) surrounds the HAp implant.



4 weeks after
The fibrous band(FB) is thinner than the former experimental group.



8 weeks after
The thin fibrous capsule(arrow head) surrounds the HAp implant.

(a)

(b)

Fig.9. (a) Photomicrograph of hydroxyapatite implantation($\times 4$. 3 days, 1 week and 2 weeks, $\times 32$ 4 weeks and 8 weeks) and (b) High power magnification of (a) ($\times 100$).

포(endothelial cells)가 증식을 보이고 신생 혈관(newly formed capillaries)들과 형질 세포(plasma cell)와 림프구(lymphocytes)로 구성된 소원형 세포의 침윤을 보인다.

1주 후에는 매식체를 둘러싸고 있는 주위 육아 조직은 매식 3일 군에 비하여 혈관이 현저히 감소되고 섬유아세포도 방추상(spindle form)으로 더욱 성숙되고 치밀화 하더, 매식체의 의형에 평행한 배열을 하며, 염증세포의 침윤도 현저히 감소되고, 대식세포(macrophage)들이 혼재되어 있다. 표층 진피층에서 봉합사를 둘러싼 이물거대세포(foreign body giant cells)가 수 개 출현하나 매식체 주변에서는 이물반응(foreign body reaction)이나 이물거대세포들은 볼 수 없다.

2주 후에는 매식체 주위 조직은 치밀한 섬유 결합 조직(fibrous connective tissue)으로 이루어지고, 매식 1주에 비하여 성숙된 섬유 결합 조직이 대상(bond form)을 이루며, 매식체 외형에 평행히 주행하며, 이 섬유대(fibrous band)에는 혈관이 거의 소실되고 교원성 섬유(collagen fibers)가 증가되어 있다.

4주 후에는 매식체 주위의 두께가 일정하고 치밀한 교원 섬유(collagen bundle)로 싸이고 이 섬유 결합 조직막(fibrous connective tissue membrane)과 주위 피하 진피층의 소성 결합 조직(loose connective tissue)과는 경계가 명료하다. 매식체에 대한 이물 반응은 없다.

8주 후에는 매식체 주위는 얇은 결체조직막(fibrous connective tissue membrane)으로 피개되어 있고, 이 피막과 주위 조직과는 명확한 경계를 이루며 염증 세포 침윤, 이물 반응은 없다.

매식체인 hydroxyapatite를 삽입 후 3일에서는 외과적 손상에 대한 염증반응이 유발되고, 치유기 전으로 섬유아세포와 혈관 내피세포의 증식과 더불어 육아조직형성이 시작되며, 수술 후 1주에서는 절상(incisional wound)의 치유는 완료되나 매식체 주위에 비교적 성숙된 육아조직이 형성되며 매식체를 둘러싼다 이 육아조직은 3일 군에 비하여 혈관이 적고 방추상의 섬유 세포로 구성되고, 염증세포의 침윤이 현저히 감소되고 hydroxyapatite에 대한 생체의 거부반응은 없어 이물거대세포의 출현이나 변형된 대식세포(modified macrophage, epithelioid cell)의 증식도 없다. 수술 후 4주와 8주에서는 점차 매식체 주위의 결체조직이 교원섬유 속으로 이루어진 피막(membrane)이 매식체를 둘러싼다.

이러한 결과들은 hydroxyapatite가 거부반응을 일으키지 않는 생체합성(histo-compatibility)이 비교적 양호한 물질로 간주된다.

4. 결 론

Hydroxyapatite를 침전법으로 Ca/P 몰비를 1.67로 pH를 11에서 2시간 숙성, 합성하고, 소결하여 hydroxyapatite bioceramics를 제조한 후, 인공 체액에서의 거동, 세포 독성 시험 및 동물 반응 시험 등 생체 친화성을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Hydroxyapatite 소결체는 인공 체액 내에서 비조화 용해 특성을 나타내며 Ca^{2+} , PO_4^{3-} 를 응출 및 흡착하나 구조적으로 안정하였다.

2) 세포 배양 시험 결과 hydroxyapatite 시편 주위에서 세포의 파괴는 관찰되지 않았다. Hydroxyapatite ceramics는 세포 독성은 나타나지 않았으며 세포의 증식을 방해하지 않았다.

3) Sprague-Dawley 계 백서 복부 피하에 hydroxyapatite ceramics를 매식한 후 조직적 합성을 경시적으로 관찰한 결과 매식 후 3일에는 염증 반응을 보였으나 기일이 경과함에 따라 염증은 소실되고 매식체는 섬유성 결체 조직으로 이루어진 피막으로 둘러싸여 hydroxyapatite ceramics에 대한 생체의 거부 반응은 관찰할 수 없었다.

「감사의 글」

이 연구는 88년도 문교부 신소재분야 연구지원 (Ministry of Education Reserch Fund for Advanced Materials)에 의해 이루어진 것의 일부로서, 이에 감사드립니다.

본 연구에서 세포독성시험을 도와주시고 도움 말씀을 주신 단국대학교 미생물학교실의 이연태 교수님, 그리고 동물연조직 시험을 하여주시고 도움 말씀을 주신 서울대학교 구강병리학교실의 임창윤 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

1. 이석근, 고형열, 이구종, 최성훈, "Hydroxyapatite Bioceramics의 합성 및 물성에 관한 연구," 요업학회지, 26 (2) 171 (1989).
2. 홍순호, 이효용, "Pt-Co 자석이 매몰된 Hydroxya-

- patite Bioceramics 이식체에 의한 성견 치조골 조직 반응에 관한 연구," 대한 치과 의사 협회지, **26** (9) 847 (1988).
3. A N. Cranin, E. Ronen, R. Shpuntoff, G Tobin, J B. Dibling, "Hydroxyapatite Particulate Versus Cones as Post-Extraction Implants in Humans," *J. Biomed. Mater. Res.*, **22**, 1165 (1988).
 - 4 S Niwa, "Hydroxyapatite in Orthopaedic Surgery," *Gypsum and Lime*, No. 211, 27 (1987)
 5. M Akao, "Hydroxyapatite and Related Calcium Phosphate as Bioceramics," *Ceramics Japan*, **20** (12) 1096 (1985).
 - 6 고흥일, 김양수, 송종택, 최성환, "Hydroxyapatite Bioceramics 의 생체 친화성에 관한 연구 (I) 인공체 엑에서의 Hydroxyapatite Bioceramics 간의 결합," 요업학회지, **27** (3) 311 (1990).
 7. M. Akao, H. Aoki, K. Kato, A. Sato, "Dense Polycrystalline β -Tricalcium Phosphate for Prosthetic Applications." *J Mater. Sci.* **17**, 343 (1982).
 8. P Ducheyne, K. de Groot, "In Vivo Surface Activity of Hydroxyapatite Arveolar Bone Substitute," *J. Biomed. Mater. Res*, **15**, 441 (1981).
 - 9 B.R McAuslan, G. Johnson, "Cell Responses to Biomaterials," *J Biomed. Mater. Res* **21**, 921 (1987).
 - 10 H.W. Denissen, K de Groot, P.Ch. Makkes. A. van den Hooff, P.J. Klopper, "Tissue Response to Dense Apatite Implants in Rat," *J. Biomed Mater. Res* **14**, 713 (1980).
 11. S. Yanagizawa, M. Ono et al. "Alreoloaug-mentation with the Synthesized Hydroxyapatite," *Shikahyoron Japan*, No.502, 99 No.503, 83, No. 504, 69, No.505. 74 (1984).
 12. 김수룡, 박순자, "Effect of Additives on the Hydrolysis of Dicalcium Phosphate Dihydrate," *Gypsum and Lime*, No 221, 203 (1989).
 - 13 T. Kanajawa, T. Umegaki, H Monma, K. Yamashita, "Materials Chemistry of Apatites," *Gypsum and Lime*, No. 210, 3 (1987).
 14. H Monma, J. Tanaka, S. Ueno, "Thermal Behavior of H₂O in Non-Stoichiometric Hydroxy- and Fluor-Apatite," *Gypsum and Lime*, No.165 60 (1980).
 15. M. Akao, N. Miura, H. Aoki, "Fracture Toughness of Sintered Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate," *J. Cer. Soc. Japan*, **92** (11) 672 (1984).
 16. H.U. Cameron, I. Macnab, R.M Pilliar, "Evaluation of a Biogradable Ceramic," *J. Biomed. Mat Res.* **11**, 179 (1977).
 17. G J. Levinkas, W F Neuman, "The Solubility of Bone Mineral, I. Solubility Studies of Synthetic Hydroxyapatite," *J Phys. Chem* **59**, 164 (1955).
 18. T. Kanazawa, H. Monma, "Chemistry of Calcium Phosphate," *Kagakuno Ryoiki*, **27** (9) 752 (1973).
 19. S. Chader, D.W Feurstenau, "Adsorption and Surface Chemistry of Hydroxyapatite," D.N Misra ed, Plenum Press, p.29~49 (1984).
 - 20 J. Lemaitre, A Murtchi, A. Mortier, "Calcium Phosphate Cements for Medical Use," *Silicates Industrials*, 141 (1987).