

## 불소의 농도와 Seed Material이 Crystal Growth에 미치는 영향

연세대학교 치과대학 보존학교실

오승연 · 정일영 · 금기연 · 이찬영

Abstract

### EFFECTS OF FLUORIDE CONCENTRATION AND SEED MATERIAL ON SEEDED CRYSTAL GROWTH

Seung-Yeon Oh, Il-Young Jung, Kee-Yeon Kum, Chan-Young Lee  
*Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University*

The present study was undertaken to investigate the crystal growth onto human enamel mineral and synthetic hydroxyapatite(HA) seeds in media resembling the enamel fluid composition. Effects of fluoride at high concentrations on the precipitation were also examined in a bench-top crystal growth model adopting a miniaturized reaction column. The Ca, P and F concentrations and pH values of the inlet and outlet solutions were determined. The recovered solid samples were weighed to assess the amount of minerals precipitated during the experimental period, and finally viewed under a scanning electron microscope.

Remarkable findings were that 1) both biological and synthetic seeds with the same total surface areas yielded similar amounts of crystal growth, 2) the amount of crystal growth was accelerated in a manner depending on fluoride concentrations in the media, 3) SEM observations disclosed that without the addition of fluoride, precipitation of thin, plate-like OCP crystals became prominent, but by increasing the fluoride concentration(beyond 1ppm F), rod-like crystals having a pointed edge were most frequently observed, without any evidence for precipitation of the plate-like crystals. Furthermore, the dimension of rod-like crystals was increased in proportion to fluoride concentrations, 4) there was no difference in the morphological feature of precipitated mineral phase upon seeding between human enamel seed and synthetic HA seed. The overall results support the view that the seeded crystal growth model is of value to gain insight into the mechanism of enamel crystal growth under fluoride regimens.

## I. 서 론

1926년 X-ray diffraction(XRD)을 이용한 연구결과<sup>12, 16)</sup> 인체 경조직(enamel, dentin, bone)의 mineral은 apatite crystal의 구조를 갖는 calcium-phosphate인 것으로 밝혀졌다. 특히 hydroxyapatite {HA,  $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ }가 이러한 mineral의 prototype으로<sup>6, 14, 31)</sup> 간주되므로 calcium phosphate(Ca-P)의 침전에 관한 대다수의 문헌이 HA에 관한 것이다.

그러나 아직까지도 경조직의 inorganic phase에 대한 보다 실제적인 구성 성분이나 구조, 광화작용에 대한 기전 등을 명백히 밝히지 못하고 있다.

이들에 대한 총괄적 개념을 얻기 위해서는 이미 밝혀진 synthetic Ca-P의 in vitro formation을 연구할 필요가 있었고 따라서 Ca-P의 생성과정이 다양한 실험방법 및 실험조건 하에서 실시되어 왔다<sup>11, 20, 21, 24)</sup>. 그러나 Ca-P의 in vitro system을 통한 연구는 실험조건과 실험방법에 의하여 상이한 결과를 초래할 수 있으므로 이의 연구결과를 biological system에 그대로 적용시켜 해석하는 것은 매우 조심스러운 일이다.

따라서 많은 연구자들은 어떠한 실험모형이 biological apatite의 생성과정 연구에 가장 적절한 것인지에 대하여 큰 관심을 기울여 왔다. 이중 법랑질 결정의 광화작용을 연구하는데 있어 HA나 다른 Ca-P를 seed로써 이용한 “seeded crystal growth” 실험모형이 가장 적절한 것으로 평가되고 있다<sup>5, 19, 23, 35, 36, 37)</sup>.

한편 Ca-P crystal의 성장에는 열역학적(thermodynamic) 상황이 반드시 고려되어야 한다. 즉 온도, pH, 이온 농도와 같은 용액의 특정 조건하에서 안정된 Ca-P phase의 특정 유형이 변하게 되므로 Ca-P의 결정성장과정에 미치는 다양한 factors들의 영향을 분석하기 위해서는 실험조건을 일정하게 유지시킬 필요가 있다. 결정의 자발적 침전실험과정(spontaneous precipitation)에서는<sup>15, 38)</sup> 실험용액의 조건을 통제하기가 어려운 반면, seeded crystal growth 실험모형을 통해서 이러한 실험조건을 통제

가능하므로 결정의 광화과정에 대한 연구에 널리 이용되고 있다.

법랑질의 생물학적 광화작용(mineralization)을 조절하는 중요인자로 유기질 성분, mineral을 둘러싸고 있는 유체(fluid)의 이온 조성, 그리고 mineral의 침전 역학(precipitation kinetics)에 영향을 끼치는 여러 조절 인자들이 있다.

법랑질의 결정성장과정을 촉진시키기 위해 합성된 hydroxyapatite(HA) seed나 다른 calcium phosphates를 seed로 사용한 “seeded crystal growth” 실험 모형이 이러한 법랑질의 crystal growth 과정 및 그 조절기전의 연구에 유용한 것으로 평가되고 있다<sup>5, 19, 23, 35, 36, 39)</sup>.

법랑질 형성과정에서 발생하는 법랑질의 광화과정은 다음과 같은 일련의 성장단계를 거친다는 가설이 최근의 연구들<sup>10, 19, 26, 40)</sup>에서 제시되고 있다. 즉, 초기에는 thin, plate-like한 octacalcium phosphate(OCP)이 먼저 침전된 후, OCP표면상에 편평한 팔각단면을 갖는 판(plate)의 형태로 Ca-P crystal이 성장해 가는 것으로 일치된 소견을 보이고 있다. 따라서 소결정체(crystallites)의 크기는 증가하나 수는 증가하지 않는 것으로 특징지워진다. 치아 경조직이나 치석, 우식병소에 대한 XRD 분석결과에서도 병적인 석회화과정에서는 다양한 Ca-P phases가 공존하였으나 정상적인 경조직에서는 한가지 phase(apatite)만 존재하고 있어 석회화 과정중 몇몇 Ca-P phase(non-apatitic)가 biological apatite 형성단계의 precursor라고 믿게 되었다<sup>7, 8, 9)</sup>.

이러한 법랑질 소결정체의 형성과정으로 인하여 그 전구체인 OCP를 내부구조로 포함할 가능성이 제기되고<sup>19, 30, 32, 39)</sup> 있으나, 실제 법랑질 광화과정에서 OCP가 형성된다는 확실한 증거는 아직 확보되지 않은 상태이다<sup>4, 30, 34)</sup>.

한편 법랑질의 biological apatite에는 0.01~7.0wt%의 농도로 존재하는 minor elements(1F, Cl, CO<sub>3</sub>, Mg, Sr 등)가 함유되어 있는데 이들이 biological apatite의 형성 및 화학적 안정화에 어느 정도 관여할 것으로 추측된다<sup>22)</sup> 특히 불소이온은 생물학적인 광화작용의 중요한 조절

인자로서 특히 OCP precursor의 가수분해(hydrolysis)를 촉진시키고<sup>30, 36)</sup> apatite crystal의 침전역학에 영향을 끼치며<sup>27)</sup> 법랑질 mineral의 안정화에 기여한다고<sup>14)</sup> 알려져 왔다. 최근 Mura-Galelli 등<sup>30)</sup>은 소형의 반응주(miniaturized reaction column)를 이용한 단순한 crystal growth 실험모형을 개발하였으며, 법랑질 광화과정에서 OCP 전구체의 침전과 가수분해에 대한 불소 농도의 영향을 연구하여 불소 농도 0.3ppm까지는 OCP 전구체의 침전을 관찰하였고, 0.4ppm 이상의 농도에서는 OCP 전구체의 가수분해가 더 우세하여 OCP의 침전이 관찰되지 않는 결정성장의 불소 농도 역치(threshold)를 밝힌 바 있다. 이 등<sup>40)</sup>은 동일한 실험모형상에서 합성된 HA crystal과 pig enamel (EN) crystal을 seed로 이용하였을 때 각각의 결정성장량에 미치는 불소 농도의 영향을 연구하였다. 그러나 이들은 모두 1ppm 이하의 저농도에서 불소의 영향을 밝힌 것이며 1ppm 이상의 고농도에 대한 불소의 영향은 동일 실험모형상에서 아직까지 연구된 바가 없다.

또한 synthetic HA seed와 biological seed 간에 존재하는 조성, 구조, 성질 등의 차이로 인하여 결정성장의 역학(kinetics)이나 침전 광물의 성질에 미칠 수 있는 영향—특히 법랑질 결정 속에 함유된 소량의 유기질 성분이 결정 성장에 미치는 영향—에 대해서도 최근 이 등<sup>40)</sup>에 의한 연구가 있으나 구체적인 해답을 구하지 못하고 있다.

이러한 생각을 바탕으로, 저자는 법랑질 광화작용에 있어 불소 농도의 변화가 crystal growth에 미치는 영향을 밝히고자 본 연구를 시행하였으며 또한 human enamel seed(EN)와 synthetic HA seed를 이용하였을 때 이들 seed type간의 성분, 형태, 그리고 특이 표면적(specific surface area)의 차이 등이 결정성장에 미치는 영향을 아울러 평가해 보고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 시편제작

두 종류의 seed 재료를 이용하였다.

(1) 합성된 HA seed : HA 현탁액(Sigma Co., 분자량 1004.6)에 초순수 증류수를 넣고 원심분리기(Jouan MR 1812, France)를 이용하여 3회 이상 반복 세척시킨 뒤 냉동 건조시켜 사용하였다.

(2) 인간의 EN seed : 발치한 지 30일 이내의 영구치아를 대상으로 하였다. 우식이나 법랑질 결함이 없는 치아를 선택하여 치아에 부착된 물질을 치주용 curette으로 제거하고 불소가 함유되지 않은 pumice로 치면을 연마하였으며 초음파 세척기에서 10분간 세정 후 증류수로 세척, 건조시켰다. 5cc용 주사기를 절단하여 만든 tube에 치과용 아크릴 레진을 이용하여 치근 부위만 매몰 한 뒤, 노출된 치관부를 약 2mm 두께로 치아 장축에 평행하게 절단하고 다시 CEJ 부위를 절단하여 치관부 절편만 취하였다. 치관부 절편은 고속 엔진의 diamond bur와 carbide round bur로 외부 법랑질 층만 남기고 내부의 상아질 층을 확대경으로 확인하면서 모두 제거하였다. 이렇게 수집된 법랑질 층을 증류수로 2~3회 세척한 후 실온에서 건조시킨 뒤 mortar & pestle을 이용하여 미세한 분말 형태로 분쇄시켰다.

EN seed 및 HA seed의 특이 표면적을  $N_2$  adsorption을 이용한 B.E.T 평가법으로 측정하여 본 결과, 각각 11.2 와 98.2  $m^2/g$ 의 특이 표면적(specific surface area)이 산출되었다.

### 2. 실험모형 제작

실험모형은 Mura-Galelli<sup>30)</sup>가 개발한 것과 동일하며 Fig. 1에 자세히 도식화 하였다. 실험모형은 원래의 실험용액을 담은 vessel A, 파포화된 실험용액을 일정한 속도로 운반해주는 infusion pump(Sage-365, ATI Orion, USA), seed가 놓인 plastic column(0.5 ml in

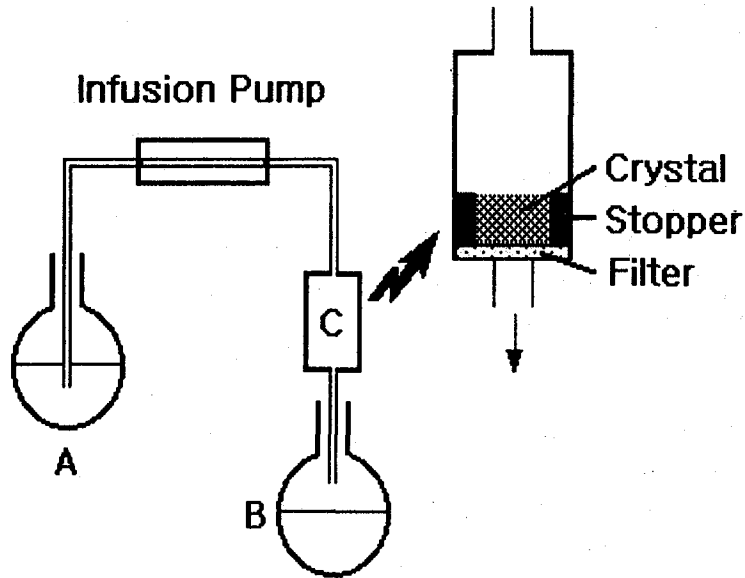


Fig.1. Schematic illustration of experimental set-up seed crystals

volume)으로 제작된 반응실(reaction chamber), 그리고 column을 통과한 실험 용액을 모으기 위한 vessel B로 구성되어 있다. 각각의 부위는 Tygon tube(Norton Co., R-3603, USA)로 연결하였으며 반응주(column)의 바닥부위에는 paper filter(1Toyo, Japan)를 위치시켜 이 filter 위로 결정이 침전되도록 하였다. Paper filter를 고정시키기 위하여 micropipette tip을 절단하여 만든 plastic 'O' ring을 반응주 바닥의 filter위에 위치시켰다. 실험과정중 반응주(reaction column)는 stand에 수직되게 고정하였다.

### 3. 실험용액의 조제

Secretory enamel fluid의 조성<sup>3)</sup>과 유사하게 하기 위하여 1mM의 Ca, 3mM의 total P, 100 mM의 Tris로 구성된 실험용액(working solution)을 background electrolyte로서 사용하였다.

(1) 염화칼슘분말(Sigma Co., 분자량 111)로부터 10mM의 용액을 조제하여 이를 염화칼슘용액의 stock solution으로 하였다.

- (2) 인산칼륨분말(Sigma Co., 분자량 136.1)로부터 30mM의 용액을 조제하여 이를 인산칼륨용액의 stock solution으로 하였다.
- (3) Tris분말(Sigma Co., Trizma<sup>®</sup>Base(C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>), 분자량 121.1)로부터 500mM의 용액을 조제하여 이를 Tris용액의 stock solution으로 하였다.
- (4) 불화나트륨(NaF)분말(Sigma Co., 분자량 41.99)로부터 100 ppm (5.26mM)의 용액을 조제하여 이를 불소용액의 stock solution으로 하였다.
- (5) 실험용액조제 : 1mM Ca, 3mM total P, 100 mM Tris 및 다양한 농도(0, 1, 2, 4ppm)의 불소로 구성된 실험용액을 조제하기 위하여 각각의 stock solution으로부터 계산된 양 만큼의 용액을 취한 다음, 희석된 NaOH 및 HCl (1N)을 이용하여 pH가 7.2인 500 ml의 working solution을 만들고, 이 용액의 Ca 및 P 이온농도를 자동 분석기(Hitachi 736-20, Japan)를 이용하여 다시 정량 분석하였다.

#### 4. 실험조건 및 평가방법

모든 결정침전반응 실험은 대기압하의 실온에서 행하여졌으며 실험용액의 feeding rates는 2~3ml/h 범주로 조절하여 유지되었다.

침전실험은 약 48시간동안 지속되었으며 실험을 마친 후에는 실험전 용액(vessel A)의 Ca, P, F의 농도 및 pH를 측정하여 실험전,후의 변화를 비교하였다. 결정침전 반응후에 얻어진 결정표본은 다시 냉동 건조시킨 뒤 무게를 측정하고, 이 무게로 부터 seed 무게를 빼면 순수하게 성장한 결정만의 무게를 산출할 수 있다. 이후 고체의 결정을 다시 원심분리기에 넣고 증류수로 3회 세척한 뒤 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 성장한 결정형태를 관찰하였다. SEM (Hitachi, S-800, Japan, 20kV)의 관찰은 표본을 aluminum stubs에 고정시킨 뒤 진공 상태에서 도금처리 후 시행하였다.

#### III. 실험성적

Table 1은 실험에 쓰인 HA 및 EN seed 각각에 행한 실험 전후의 pH 및 이온조성변화와

침전된 결정의 무게변화를 분석한 결과 표이다.

Fig. 2, 3, 4, 5 는 첨가된 불소 농도에 따른 Ca, P의 농도감소량( $\delta Ca$ ,  $\delta P$ ) 및 침전결정체의 성장량( $\delta wt$ )을 비교하여 나타낸 도표이다. 이 들로부터 얻어진 중요한 소견은 모든 실험조건하에서 첨가된 불소의 농도가 높을수록 반응후 Ca, P, F의 농도 감소량이 커졌고 아울러 결정체의 성장량도 증가하였다. 이는 각 이온들이 침전반응에 더 많이 이용되었음을 의미한다. 그리고 불소농도가 1ppm일 때 소모된 각 이온의 농도 감소가 가장 급격하였고, 2ppm에서의 농도 감소는 상대적으로 완만하였으며, 4 ppm에서 다시 다소 급격한 농도 변화를 보여주었다. 그리고 침전반응에 이용된 seed의 무게가 많을수록 (즉, 2mg일 때 보다 4mg일 때) 결정성장에 소요된 이온의 농도 변화가 더 뚜렷하였고 침전된 결정체의 성장량(mg)도 더 컸다 (Fig. 2~4). Fig. 5는 불소농도 1ppm하에서 seed material type에 의한 Ca 및 P의 농도 변화를 비교한 도표이다. EN seed와 HA seed를 동일량 (2mg)으로 하여 crystal growth를 시행한 결과 HA seed의 반응이 EN seed의 반응보다 훨씬 뚜렷하게 나타난 반면 seed crys-

Table 1. Typical results of precipitation reactions taking place in the crystal growth model

Seed (mg)	F (ppm)	Ionic composition in inlet/outlet solutions				Amounts of solid in mg				
		[Ca] (mM)	[P] (mM)	$\delta Ca/\delta P$	pH	[F] ( $\times 10^{-5}M$ )	(a)	(b)	(b-a)	
HA(2)	0	0.92/0.86	3.01/2.98	1.50	7.22/7.20	***/**	2.03	2.14	0.11	
HA(2)	1	0.91/0.61	3.00/2.82	1.66	7.21/7.20	3.3/1.0	2.01	3.01	1.00	
HA(2)	2	0.97/0.60	3.02/2.82	1.85	7.20/7.16	6.4/4.9	2.02	3.12	1.10	
HA(2)	4	0.98/0.58	3.03/2.76	1.48	7.21/7.19	14.1/10.4	2.06	3.37	1.31	
HA(4)	0	0.92/0.77	3.01/2.92	1.66	7.22/7.18	***/**	4.06	4.20	1.98	
HA(4)	1	0.91/0.52	3.00/2.75	1.56	7.21/7.15	3.2/0.8	4.03	6.38	2.35	
HA(4)	2	0.92/0.44	3.02/2.70	1.50	7.20/7.13	6.1/1.9	4.06	7.84	3.78	
HA(4)	4	0.92/0.29	3.02/2.59	1.46	7.20/7.10	10.7/5.7	4.02	9.89	5.87	
EN(2)	1	0.94/0.89	2.99/2.95	1.25	7.20/7.10	1.8/1.6	2.04	2.23	0.19	
EN(18)	1	0.94/0.62	2.99/2.79	1.60	7.20/7.11	1.8/0.8	18.02	20.03	2.01	

[주] (a) ; Amounts of seed crystals originally placed in the reaction column.

(b) ; Weighed amounts of solid sample recovered at the end of experimental period.

(b-a) ; Difference between (b) and (a)

\*\*\* ; No fluoride was added to the experimental solutions.

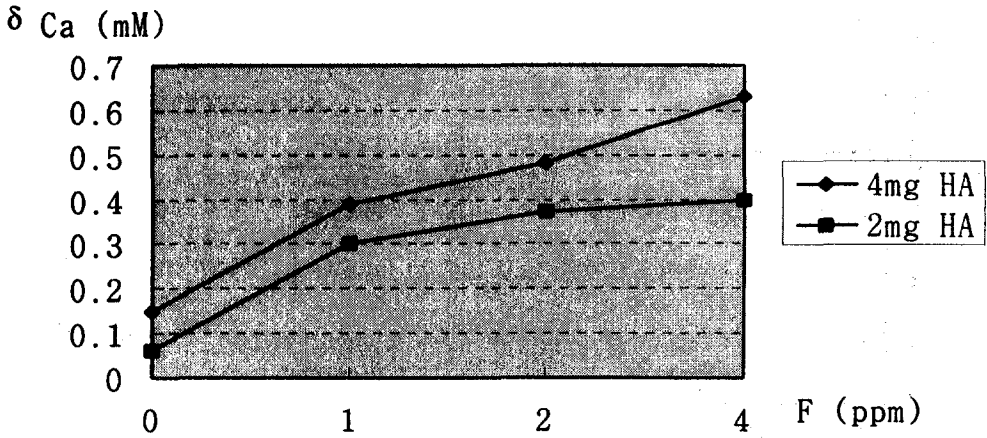


Fig. 2. Relationship between consumed Ca and various F concentrations in solution.

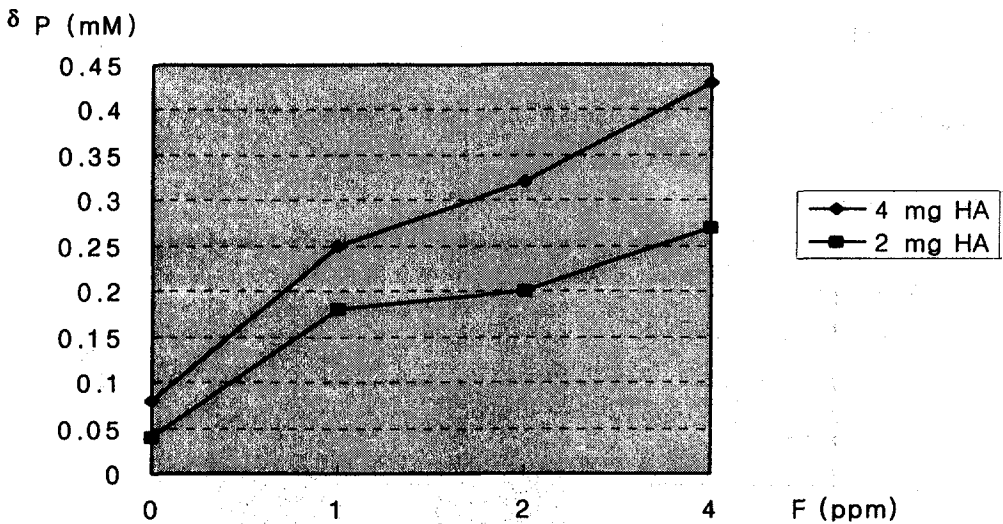


Fig. 3. Relationship between consumed P and various F concentrations in solution

tal의 총표면적을 같이 하였을 때 즉, EN seed 18mg과 HA seed 2mg을 이용한 실험에서는 crystal growth의 효과가 유사하였다.

Fig. 6~12는 반응전의 original seed crystal과 침전반응실험 후 얻어진 결정표본을 주사전자현미경으로 관찰한 소견이다. Original EN seed의 결정형태(Fig. 6)는 amorphous하고 platy한 형태를 보인 반면 original HA seed(Fig. 7)는 middle-like한 가는 rod의 형태를 취하고 있다. 또한 불소 농도 0ppm의 용액에서 성장한 결정에서는 thin, plate-like한 OCP crystal의

형태가 관찰되었으며(Fig. 8), 1ppm이상의 불소가 첨가된 용액에서 성장한 결정은 모두 pointed edge를 지닌 길다란 rod-like apatite crystal의 형태를 보였고 plate-like OCP crystal은 나타나지 않았다(Fig. 9~12). 불소농도가 1ppm이상의 경우, 불소농도에 따른 결정형태가 유사하였고 다만 불소농도가 커질수록 결정의 크기가 커지는 경향을 보였다. 특히 결정의 길이 성장이 뚜렷하였다 (Fig. 9~11).

한편 EN seed을 이용한 실험(F 농도 1ppm)에서 얻은 결정의 형태는(Fig. 12) HA seed로

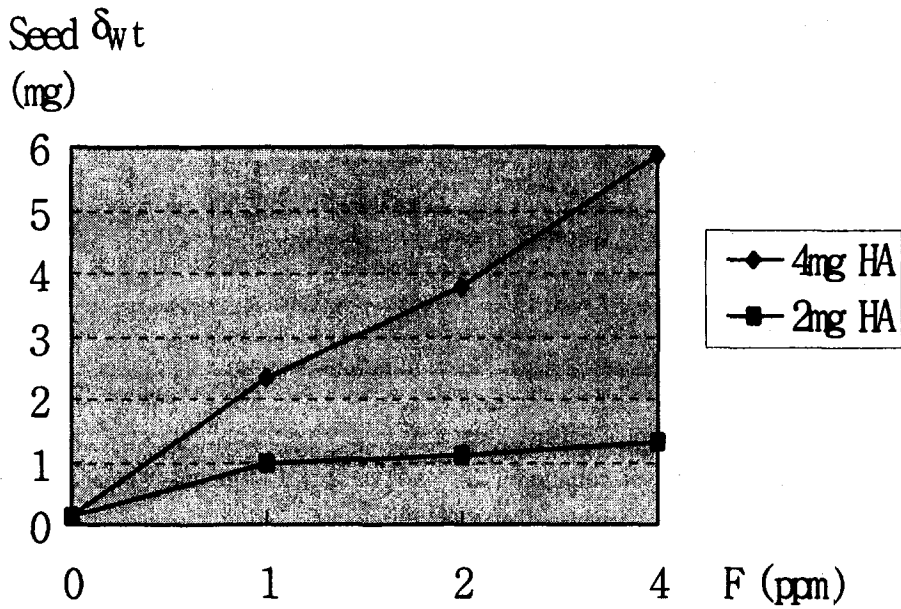


Fig. 4. Relationship between amount of crystal growth and various F concentrations.

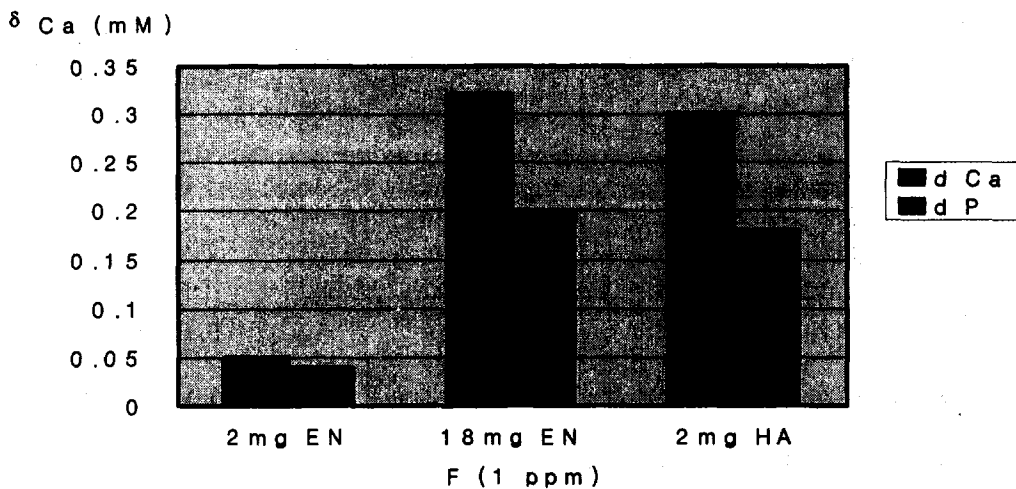


Fig. 5. Effects of seed material type and its total surface area.

부터 얻은 결정의 형태와(Fig. 9) 비교시 매우 유사하였다. 즉 모두 pointed edge를 지닌 길다란 rod-like apatite crystal의 형태를 보였다.

#### IV. 총괄 및 고찰

본 실험은 과포화된 실험용액을 seed crys-

tal이 놓인 소형의 반응주(reaction column)에 일정한 속도로 통과시킴으로써 범랑질의 crystal growth에 미치는 효과들을 평가한 것으로 본 연구결과 이러한 방법이 crystal growth의 반응조절인자들을 밝히는데 유용하였다. 따라서 이러한 실험실 모형을 이용한 다양한 실험을 통하여 범랑질의 crystal growth 과정 및 그

기전을 밝히고 이에 대한 우리의 지식과 이해를 넓히는데 도움을 줄 것으로 생각된다.

이 실험모형은 secretory ameloblast에 인접한 좁은 부위에서 발생하는 광화과정<sup>40)</sup>, 즉 이미 형성된 법랑질 결정이 일정 농도의 lattice ion을 공급해 주기위해 일정 속도로 흐르는 유액(fluid)에 노출되는 과정을 재현한 것이다. 또한 인위적으로 용액을 저어주지 않기 때문에 생리적 환경과 유사하다고 볼 수 있으나, 다른 한편으로는 반응주(reaction column)의 국소 부위에 따라 침전을 위한 용액조성이나 driving force가 다를 수 있으므로 seed crystal의 침전 역학(kinetics)을 정확히 규명하기가 어렵다는 단점도 있을 수 있다. 그러나 본 연구를 통해 어느정도 실험의 일관성을 보이고 있어 이러한 제한적 요소는 무시할 만하다고 여겨진다.

지금까지 calcium phosphates의 침전반응에 관한 연구들에는 대체로 두가지 접근방법이 이용되었다. 그 중 하나는 자발적인 침전반응 실험(spontaneous precipitation)이고, 다른 하나는 침전반응을 촉진시키기위해 seed를 이용한 "seeded crystal growth" 방법이다.

그러나 자발적인 침전실험방법은<sup>15, 38)</sup> 실제 생리적으로 존재하는 것보다 훨씬 고농도의 실험용액을 요구하므로 생리적 광화과정을 재현하는데 적용하기가 어려운 반면, seeded crystal growth 방법은 일정한 이온 농도와 일정한 pH 수준을 유지시킬 수 있으므로 보다 조절된 실험조건하에서 다양한 인자들의 영향을 분석하는데 보다 유용하다.

따라서 1970년 Nancollas 등<sup>31)</sup>의 실험 이후 많은 결정성장을 보이는 실험들<sup>5, 19, 23, 35, 36, 37)</sup>에서 이러한 "seeded crystal growth" 방법을 적용하고 있다.

한편, 본 연구의 예비실험과정을 통하여 다음과 같은 사실을 얻을 수 있었다. 1) 가장 높은 불소 농도(4ppm)의 실험 용액에서도 자발적인 결정의 침전과정은 보이지 않았으며 2) 실험 용액의 feeding rate을 약간 변화시켜도 결정의 침전과정에는 크게 영향을 미치지 않았고 3) 4ml/h 이상의 feeding rate에서는 Tygon tube의 연결부위에서 용액의 누출이 발견되었다. 단,

EN seed 18mg에서는 seed의 양이 많아 3ml/h 이상의 feeding rate시 용액의 누출이 관찰되었다. 따라서 전 실험과정을 통하여 2~3ml/h의 feeding rate을 유지시켰다.

Table 1 및 Fig. 2, 3, 4에서의 분석 결과를 바탕으로 실험의 전반적인 반응과정을 결론지어 보면, 결정체의 주요한 lattice ion( 즉 [Ca], [P], [F])이 실험 전의 용액에 비해 실험 후의 용액에서 그 농도가 모두 감소함을 보이고 있어 결정성장반응에 이들 주요 이온들이 관여하고 있음을 알 수 있다. 반면 pH 수치의 변화는 매우 미미한 것으로 보아 (OH-)이온이 결정구조속에 포함되는 것은 거의 무시할 만하다.

Fig. 2, 3, 4에서 실험용액의 불소 농도가 증가할수록  $\delta Ca, \delta P$ (이온 소모량) 및 결정성장량(mg)이 증가하였으며, 이러한 결과는 Varughese<sup>37)</sup>, Mura-Galelli<sup>30)</sup>, 이<sup>40)</sup> 등의 실험결과와 일치하였다. 따라서 불소 이온이 결정성장과정의 촉진인자라는 사실을 확인할 수 있었다. Ca-P crystal growth에 관한 불소이온의 효과는 다양한 실험을 통하여 연구되어 왔으며 다소의 이견들이 제시되고 있다. Meyer 등<sup>25)</sup>과 Amjad 등<sup>1)</sup>은 1 or 2ppm이하의 불소농도에서 초기광화속도가 감소하고 이보다 높은 농도에서는 증가함을 보였다.

반면 Moreno 등<sup>26)</sup>은 0.1ppm이하의 불소농도시 apatite crystal의 성장속도가 증가한다고 하였다. 이러한 이견들 속에서도 불소이온의 농도가 1~2ppm 이상에서 HA-seeded crystal growth의 촉진인자라는 견해가 꾸준히 제시되어왔고<sup>1, 13, 28)</sup> 본 연구의 실험방법을 통해서도 입증되었다.

불소의 crystal growth 촉진 효과에 대한 기전은 불소 이온이 apatite결정의 격자구조 속으로 포함되면서 apatite crystal의 열역학적 용해도가 감소하고, 이로 인하여 fluoridated apatite crystal의 침전을 일으킬 수 있는 용액의 driving force 즉, 용액의 포화도가 증가하기 때문이라고 설명할 수 있다.<sup>30, 37)</sup>

또한 결정성장과정의 중간생성물인 non-apatite calcium phosphates(OCP)의 가수분해가 불소 이온에 의하여 가속화됨으로써 결정성장이



촉진된다는 견해도 많은 연구들에서 제시되고 있다.<sup>8, 25, 30, 36)</sup>

한편 Fig. 2~5에서 보여주 듯이 HA seed가 2mg 이용된 경우보다 4mg 이용된 경우에 결정의 성장량이 증가하였으며 EN seed 역시 2mg 이용된 경우보다 18mg 이용된 경우에 그 성장량이 크게 증가하였다. 즉 seed의 종류에 상관없이 seed의 양이 많을수록 결정의 성장량도 증가하였으며 이는 침전반응에 관여하는 seed crystal의 총표면적이 증가하기 때문이라고 추측된다. 그러나 Fig. 4에서는 Fig. 2, 3에 비하여 2mg과 4mg HA seed 간의 결정성장량에 현격한 차이를 보이고 있는데 이는 seed의 무게측정시 극소량의 결정을 원심분리기로 세척하고 냉동 건조시키는 과정에서 발생한 실험상의 오류라고 생각된다.

성장한 결정의 SEM소견(Fig. 6~12)을 관찰한 결과, original EN seed의 결정형태(Fig. 6)는 amorphous하고 platy한 형태를 보이는 반면 original HA seed(Fig. 7)는 가는 middle-like rod의 형태를 취하고 있다. 그리고 불소 이온이 첨가되지 않은 용액이 HA seed를 통과한 후의 결정형태는 thin, plate-like한 OCP crystal의 형태를 보이고 있어, 법랑질의 결정 성장시 OCP precursor가 초기에 일시적으로 형성되었다가 불소 이온의 작용에 의해 가수분해되면서 apatite결정이 성장하게 된다는 가설<sup>8, 25, 30, 36)</sup>을 뒷받침하고 있다. 한편 Mura-Galelli 등<sup>30)</sup>은 불소 이온의 농도가 0.3 ppm 이하에서는 OCP crystal의 침전이 apatite crystal과 함께 관찰되었으나 0.4 ppm 이상의 농도에서는 OCP의 빠른 가수분해로 인하여 apatite crystal만 성장하는 것으로 보고하고 있는데, 본 연구의 SEM소견(Fig. 8~11)에서도 불소농도 0 ppm에서만 OCP crystal의 형태가 나타났고 1 ppm이상의 고농도에서는 OCP crystal의 형태가 관찰되지 않았다.

불소농도가 1ppm이상인 경우(Fig. 9~11)에는 불소농도에 따른 결정형태의 큰 차이는 발견되지 않았고 다만 불소농도가 커질수록 결정의 크기가 커지는—특히 rod의 길이가 길어지는—경향을 보였다. 한편 biological crystal

seed와 synthetic crystal seed 간에는 성분과 구조가 다르므로 결정성장의 역학과 침전체의 성질에도 상이한 결과를 초래할 것으로 예측되었다. 특히 EN seed내에 존재하는 극소량의 유기질 성분이 결정의 침전반응에 어떠한 영향을 줄 수 있을 것으로 생각되었다. 본 연구 결과에서는(Fig. 5), EN seed와 HA seed의 무게를 같이 하였을 때는 HA seed가 EN seed에 비해 결정성장 반응이 훨씬 활발하게 일어났으며, 각 seed의 총표면적을 같게 하기위해 무게를 달리하였을 때는(즉, EN seed 18mg, HA seed 2mg) 결정성장의 반응결과가 유사하였다. (Fig. 5) SEM 소견으로도 동일한 불소농도의(1 ppm) 실험용액에서 EN seed(Fig. 12)와 HA seed(Fig. 9)간에 성장한 결정의 형태가 유사하였는데 즉, 결정의 성장량 및 결정의 형태가 seed material에 관계없이 주로 seed의 총표면적에 의해 좌우된다고 결론내릴 수 있다. 이는 enamel이 함유하고 있는 organic matrix가 thixotropic gel과 같은 성질을 가지므로<sup>16, 33)</sup> crystal의 크기 및 형태에 영향을 줄 수 있다고 보고한 Fearhead 및 Nylen 등의 의견과는 상반되며, 오히려 법랑질의 유기질 성분이 결정의 침전역학에 전혀 작용하지 않는다고 평가한 이등<sup>40)</sup>의 실험과 일치하고 있다.

결론적으로, 본 연구에 사용된 실험모형이 crystal growth의 반응기전을 평가하는데 유용하다고 생각되며 또한 seed의 type에 따라 그 특이표면적, 형태, 성분등이 다르더라도 총표면적을 같이 하였을 때 결정성장량에 미치는 효과는 유사하였다. 즉, seeded crystal growth의 결정성장량은 실험용액의 초기 동력학적인 힘(HA에 대한 용액의 포화도)과 함께 seed의 총표면적에 의해 주로 영향 받고 있으며 이는 Aoba 등<sup>2)</sup>의 주장과 일치하였다. SEM 소견상으로도 EN seed와 HA seed로부터 형성된 결정의 형태가 유사하게 관찰되므로 enamel의 organic matrix성분이 crystal growth의 침전역학에 작용하지 않는다고 생각되며 따라서 seed material보다는 사용된 seed의 총표면적이 결정의 성장량과 성장형태를 좌우한다고 결론지을 수 있다.

한편 실험용액내 주요 이온성분들(Ca, P, F)의 농도가 실험 후 얻은 용액에서 감소하고 있어 이들이 결정성장시 결정구조에 관여함을 알 수 있었고, 특히 불소이온의 농도가 높을수록 lattice ions의 실험후 소실량이 더욱 증가했고 SEM소견상 결정의 크기도 성장하였으므로 불소가 결정성장 반응과정의 주요한 촉진인자임이 확인되었다. 또한 SEM 소견상 불소이온이 첨가되지 않은 0ppm의 용액에서 thin, plate-like OCP precursor의 형태가 관찰된 반면 1ppm 이상의 용액에서는 rod-like apatite crystal만 발견됨으로써, 결정성장과정 초기에 OCP precursor가 먼저 생성되었다가 불소이온의 작용으로 OCP의 가수분해가 촉진되면서 apatite 결정이 성장한다는 가설을 뒷받침해 주고 있다.

따라서 앞으로 이와 같은 실험모형을 이용하여 다양한 실험조건을 적용시킨다면 enamel crystal growth의 기전을 밝혀가는데 유용할 것으로 사료된다.

한편 본 연구에서는 추출된 표본의 양이 제한되어 이용하지 못하였으나, calcium phosphates 결정의 특성을 보다 정확히 분석하기 위하여 X-ray diffraction, FTIR, HREM(high resolution electron microscopy) 등의 평가방법이 이후의 실험에서는 추가되어야 할 것이다.

## V. 결 론

Enamel fluid 성분과 유사한 실험용액을 조제하여 2~3ml/h의 일정한 속도로 EN 및 HA seed가 놓인 반응주를 통과시켜 결정의 성장을 유도하였다. crystal growth 실험 후 얻어진 결정체는 다시 냉동건조시켜 무게 및 형태를 관찰하였고 실험 전, 후 용액의 성분 변화를 비교 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. seeded crystal growth의 결정성장량은 seed material의 type과 상관없이 seed의 총표면적에 의해 주로 영향 받는다.
2. 불소이온의 농도가 높을수록 결정의 성장량도 증가하고 결정의 크기도 커지므로 불소가 결정의 성장반응에 있어 주요한 촉진인자임을

확인하였다.

3. 불소이온이 첨가되지 않은 0ppm의 용액에서 thin, plate-like OCP 전구체의 형태가 SEM 소견에서 관찰된 반면 1ppm이상의 용액에서는 rod-like apatite 결정만 발견되었다.
4. EN seed와 HA seed를 이용하여 얻어진 결정의 형태에는 거의 차이가 없었다.

이를 종합하여 보면, 본 연구에 사용된 실험 모형은 seed crystal을 이용한 crystal growth 반응과정을 평가하는데 유용하였으며 seed의 총표면적이 클수록, 불소이온의 농도가 높을수록 결정성장량이 증가하였다. 한편 seed의 type보다는 seed의 총표면적이 결정의 성장속도에 더 중요한 조절인자로 평가되었고, seed의 type에 따른 결정의 형태도 유사한 것으로 관찰되었다. 그러나 이에 대한 보다 진전된 실험적 평가가 추후 필요할 것으로 사료되는 바이다.

## 참 고 문 헌

1. Amjad F., Nancollas G.H. : Effect of fluoride on the growth of hydroxyapatite and human dental enamel, Caries Res, 12 : 250-258, 1979.
2. Aoba T., Moreno E.C. : Preparation of hydroxyapatite crystals and their behavior as seeds for crystal growth, J Dent Res, 63 : 874-880, 1984.
3. \_\_\_\_\_ : The enamel fluid in the early secretory stage of porcine amelogenesis. Chemical composition and saturation with respect to enamel mineral, Calcif Tissue Int, 41 : 86-94, 1987.
4. \_\_\_\_\_ : Changes in the nature and composition of enamel mineral during porcine amelogenesis, Calcif Tissue Int, 47 : 356-364, 1990.
5. Aoba, T., Yoshioka C., Yagi T. : Seeded crystal growth of calcium apatite and inhibitory activity of small organic molecules.
6. Boskey A.L., Posner A.S. : Formation of

- hydroxyapatite at low supersaturation, *J Phys Chem*, 80 : 40–45, 1976.
7. Brown W.E., Chow L.C. : Thermodynamics of apatite crystal growth and dissolution, *J Crystal Growth*, 53 : 31–41, 1981.
  8. Brown W.E., Eidelman N., Tomazic B. : Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation, *Adv Dent Res*, 1 : 306–313, 1987.
  9. Brown W.E., Matthew M., Tung M.S. : Crystal chemistry of octacalcium phosphate, *Prog Crystal Growth Charact*, 4 : 59–87, 1981.
  10. Cusinier F.J.G., Steuer P., Frank R.M., Voegel J.C. : High resolution electron microscopy of young apatite crystals in human fetal enamel, *J Biological Buccale*, 18 : 149–154, 1990.
  11. Dawes C. : The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human submandibular saliva, *Arch Oral Biol*, 19 : 887–896, 1974.
  12. De Jong W.F. : La substance minerale deans les os, *Tec Trav Chim*, 45 : 445–458, 1926. (cited from Ref. 22)
  13. Eanes, E.D. : The influence of fluoride on the seeded growth of apatite from stable supersaturated solutions at pH 7.4, *J Dent Res*, 59 : 144–150, 1980.
  14. \_\_\_\_\_ : The interaction of supersaturated calcium phosphate solutions with apatite substrates, *Calcif Tiss Res*, 20 : 75–89, 1976.
  15. Eanes E.D., Gillessen I.H., Posner A.S. : Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite, *Nature(Lond.)*, 208 : 365–367, 1965.
  16. Fearnhead R.W. : Matrix-mineral relationships in enamel tissue, *J Dent Res*, 58(B) : 909–915, 1979.
  17. Fejerskov O., Yaeger J.A., Thylstrup A. : Microradiography of the effect of acute and chronic administration of fluoride on human and rat dentine and enamel, *Archs Oral Biol*, 24 : 123–130, 1979.
  18. Gross R. : Die kristalline Struktur von Dentine und Zahnschmelz, *Festschr Zahnmed Inst Univ Greifswald*, 1926. (cited from Ref. 22)
  19. Iijima M., Tohda H., Moriwaki Y. : Growth and structure of lamellar mixed crystals of octacalcium phosphate and apatite in a model system of enamel formation, *J Crystal Growth*, 116 : 319–326, 1992.
  20. Lagerlof F. : Effects of flow rate and pH on calcium phosphate saturation in human parotid saliva, *Caries Res*, 17 : 403–411, 1983.
  21. Larsen M.J. : Degrees of saturation with respect to apatites in parotid saliva at various pH values, *Scand J Dent Res*, 83 : 7–12, 1975.
  22. LeGeros R.J. : Calcium phosphates in oral biology and medicine, *Karger*, 52–62, 1991.
  23. Margolis H.C., Varughese K., Moreno E.C. : Effect of fluoride on crystal growth of calcium apatites in the presence of a salivary inhibitor, *Calcif Tissue Int*, 34 : S33–S40, 1982.
  24. Meyer J.L., Fleish H. : Determination of calcium phosphate inhibitor activity, *Miner Electrolyte Metab*, 10 : 249–258, 1984.
  25. Meyer J.L., Nancollas G.H. : Effect of stannous and fluoride ions on the rate of crystal growth of hydroxyapatite, *J Dent Res*, 51 : 1443–1450, 1972.
  26. Miake Y., Shimoda S., Fukae M., Aoba T. : Epitaxial overgrowth of apatite crystals on the thin-ribbon precursor at early stages of porcine enamel mineralization, *Calcif Tissue Int*, 53 : 249–256, 1993.

27. Moreno E.C., Aoba T. : Calcium binding in enamel fluid and driving force for enamel mineralization in the secretory stage of amelogenesis, *Adv Dent Res*, 1 : 245-251, 1987.
28. Moreno E.C., Kresak M., Zahradnik R.T. : Physicochemical aspects of fluoride-apatite systems relevant to the study of dental caries, *Caries Res*,(Suppl. 1) 11 : 142-171, 1977.
29. Moreno E.C., Zahradnik R.T., Glazman A., Hwu R. : Precipitation of hydroxyapatite from dilute solutions upon seeding, *Calcif Tiss Res*, 24 : 47-57, 1977.
30. Mura-Galelli M.J., Narusawa H., Shimada T., Iijima M., Aoba T. : Effect of fluoride on precipitation and hydrolysis of octacalcium phosphate in an experimental model simulating enamel mineralization during amelogenesis, *Cells Materials*, 2 : 221-230, 1992.
31. Nancollas G.H., Mohan M.S. : The growth of hydroxyapatite crystal, *Archs Oral Biol*, 15 : 731-745, 1970.
32. Nelson D.G.A., Barry J.C. : High resolution electron microscopy of non-stoichiometric apatite crystals, *Anat Rec*, 224 : 265-276, 1989.
33. Nylen M.U. : Matrix-mineral relationships. A morphologist's viewpoint, *J Dent Res*, 58(B) : 922-926, 1980.
34. Rey C., Shimizu M., Collins B., Glimcher M.J. : Resolution-enhanced FTIR spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age, *Calcif Tissue Int*, 46 : 384-394, 1990.
35. Tomazic B., Nancollas G.H. : The seeded growth of calcium phosphates. Surface characterization and the effect of seed material, *J Colloid & Interface Science*, 50 : 451-461, 1975.
36. Tung M.S., Tomazic B., Brown W.E. : The effects of magnesium and fluoride on the hydrolysis of octacalcium phosphate, *Archs Oral Biol*, 37 : 585-591, 1992.
37. Varughese K., Moreno E.C. : Crystal growth of calcium apatites in dilute solutions containing fluoride, *Calcif Tissue Int*, 33 : 431-439, 1981.
38. Walton A.G., Bodin W.J., Furedi H., Schwartz A. : Nucleation of calcium phosphate from solution, *Canad J Chem*, 45 : 2695-2701, 1967a.
39. Weiss M.P., Voegel J.C., Frank R.M. : Enamel crystallite growth. Width and thickness study related to the possible presence of octacalcium phosphate during amelogenesis, *J Ultrastruct Res*, 76 : 286-292, 1981.
40. 이 찬영, Aoba T. : Seeded crystal growth onto enamel mineral and synthetic hydroxyapatite in dilute supersaturated solutions containing low concentrations of fluoride, *대한치과보존학회지*, 20 : 818-826, 1995.

## 사진부도 설명

- Fig. 6. Scanning electron microscopic view of original enamel seed. Amorphous and platy crystals were observed.(x60,000)
- Fig. 7. Scanning electron microscopic view of original hydroxyapatite seed. It showed rod-like crystal appearance.(x60,000)
- Fig. 8. Scanning electron microscopic view of crystals precipitated on HA seed material in solution containing 0ppm F. Note that large, plate-like crystals were observed.(x170,000)
- Fig. 9. Scanning electron microscopic view of crystals precipitated on HA seed material in solution containing 1ppm F. Rod-like crystals were most frequently observed without evidence of precipitation of plate-like crystals.(x60,000)
- Fig. 10. Scanning electron microscopic view of crystals precipitated on HA seed material in solution containing 2ppm F. The crystal appearance was the same as Fig.9, but the crystal size was larger than Fig.9.(x60,000)
- Fig. 11. Scanning electron microscopic view of crystals precipitated on HA seed material in solution containing 4ppm F. The crystal size was larger than Fig. 9 and 10. It was the evidence for growing-up of crystals as a role of fluoride (x60,000)
- Fig. 12. Scanning electron microscopic view of crystals precipitated on EN seed material in solution containing 1ppm F. Note that rod-like crystals were precipitated which was the same as crystals of HA seed.(x60,000)

# 사진부도

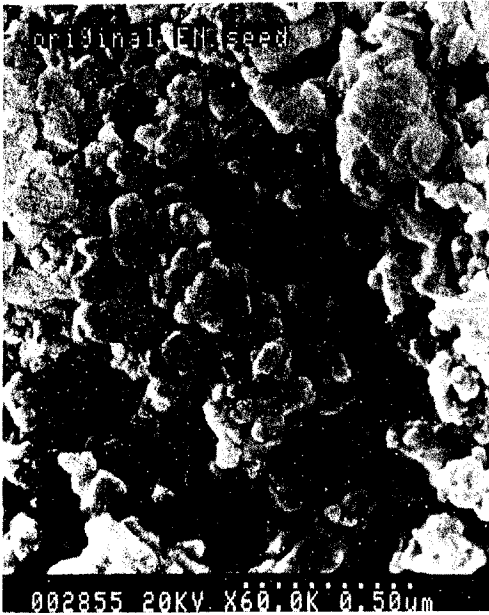


Fig. 6.



Fig. 7.



Fig. 8.



Fig. 9.



Fig. 10.



Fig. 11.



Fig. 12.