

# 생쥐 치아의 화학적 조성, 미세구조 및 Hydroxyapatite 구조 분석

김은경<sup>1</sup>, 전태훈<sup>1</sup>, 김창연<sup>1</sup>, 남승원<sup>2</sup>, 송 경<sup>3</sup>, 이상길<sup>3</sup>, 김윤중<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 분석과학기술대학원, <sup>2</sup>충남대학교 생명과학과,

<sup>3</sup>한국기초과학지원연구원 전자현미경연구부

## Analysis of Chemical Composition, Microstructure and Hydroxyapatite Structure for Mouse Teeth

Eun Kyung Kim<sup>1</sup>, Tae Hoon Jeon<sup>1</sup>, Chang Yeon Kim<sup>1</sup>, Seung Won Nam<sup>2</sup>,  
Kyung Song<sup>3</sup>, Sang Gil Lee<sup>3</sup>, Youn-Joong Kim<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Analytical Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>3</sup>Division of Electron Microscopic Research, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-333, Korea

(Received August 28, 2010; Revised September 27, 2010; Accepted September 28, 2010)

### ABSTRACT

The aim of this study is to determine microstructure, chemical composition and crystal structure of hydroxyapatite for mouth teeth using optical microscopy and electron microscopy as well as electron probe micro-analysis (EPMA). Enamel, a protective cover to the teeth, consisted of rods oriented in regular and had relatively higher crystallinity and Ca component. In contrast, dentin showed a sponge-like microstructure with circular holes which were passages of dentinal tubules, and had higher Mg component than the enamel region due to its higher organic content. Hydroxyapatite crystals appeared as large rods in enamel, but as small needles in dentin. Their electron diffraction patterns were different by their crystallinity as well as by the organic content of the matrix.

**Keywords** : Chemical composition, Dentin, Electron diffraction pattern, Enamel, Hydroxyapatite

### 서 론

치아는 음식을 분쇄하여 신체 내부로의 흡수를 도움으로써 삶을 영위하는 데 절대적인 영향을 미치는 조직으로 인간을 제외한 동물들에게 있어서는 타 생물에 대한 공격 수단이자 자신을 방어하는 무기로도 사용된다. 이에 치아는

생물의 종(species)이나 용도 등에 따른 특성을 중점적으로 진화되어 육안으로 구분할 수 있는 일반적인 차이 이외에도 내부적으로 구조 및 화학적 조성 등의 차이를 가지고 있다.

치아의 구조는 크게 법랑질(enamel)과 상아질(dentin) 그리고 치수강(pulp)으로 나눌 수 있다. 치아의 외곽부분을 둘러싸고 있는 법랑질은 약 1% 미만의 유기질과 95~97%의 무기질로 이루어져 있어 생체 내에서 가장 단단하며 치아의

본 연구는 교육과학기술부의 특화전문대학원 연계 학연협력 지원사업(2009-008146)과 한국기초과학지원연구원 기관고유사업(2010년)의 재정 지원을 받아 수행하였습니다.

\* Correspondence should be addressed to Dr. Youn-Joong Kim, Division of Electron Microscopic Research, Korea Basic Science Institute, 52 Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Korea. Ph.: (042) 865-3596, Fax: (042) 865-3939, E-mail: y-jkim@kbsi.re.kr

내부 조직을 보호한다(Palmer et al., 2008; Tamerler et al., 2008). 또한 혈관과 신경 등의 유기조직이 거의 존재하지 않아 외부충격에 의한 파쇄가 일어나기 쉽고 성숙한 법랑질의 경우 뼈나 상아질에 비해 상대적으로 높은 결정도와 방향성으로 견고히 형성되어 있다. 법랑질 내부에 자리한 상아질은 약 30%의 유기질과 70%의 풍부한 무기질을 포함하고 있으나, 무기질의 결정도가 낮아 법랑질에 비해 상대적으로 강도는 약한 편이다(Elliott, 2002). 하지만 결정도가 낮음으로써 치수강과 연결되어 있는 상아세관(dentinal tubules)이 원활하게 법랑질의 충격을 흡수 및 완화하여 치아의 파쇄를 방어한다. 유기질의 구성 성분이 뼈와 동일한 type-1 collagen으로 이루어져 있는 상아질은 미세구조 측면에서도 뼈와 유사한 특성을 가지고 있으며(Kinney et al., 2005; Nalla et al., 2005), 연령에 따른 구조 변화가 뚜렷하게 나타나 법의학적으로도 연령을 추정하는 데 많이 활용되고 있다(Suk & Kim, 1982). 치아의 가장 내부 중심에 위치한 치수강은 턱뼈부터 치아뿌리 속으로 들어온 신경과 혈관으로 채워져 있는 유기조직으로 치아에 영양과 지각을 공급한다.

이 중, 치아 내에 무기질을 다량 포함하고 있는 법랑질과 상아질의 주요 구성성분은 Ca과 P으로 이들은 석회화(calcification) 또는 무기화(mineralization)라 불리는 침착과정을 통해 인회석(apatite)을 형성하여 치아의 구조를 이루고 있으며(Mann, 1988), 그 중에서도 생체 내에 다량 함유되어 있는 hydroxyapatite (HAp;  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ )는 뼈에는 70%, 치아에는 96%에 이르는 높은 구성율을 가지고 있다(Leventouri et al., 2009). 다른 apatite에 비해 생체 친화성이 높은 HAp는 손상된 생체 내의 무기조직을 대신하여 이식할 수 있는 소재로 각광받으면서 현대 의학 및 여러 분야에서 합성 및 생체 내로의 이식 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 실제 생체 내에 존재하는 HAp가 생성부터 침착에 이르기까지 각각의 환경 및 기능 등의 복합적인 구성에 따라 같은 조직 내에서도 구조 및 화학적인 차이를 가지고 있는 것에 비해 대부분의 HAp 연구는 일반적이면서도 보편적인 구조를 중심으로 진행되고 있다. 때문에 안정적인 생체 내의 이식 재료로 HAp가 활용되기 위해서는 생체 내의 HAp의 구조와 화학적 구성을 면밀히 분석하고 이를 바탕으로 연구가 진행되는 것이 중요하다.

본 연구에서는 전자현미분석기(EPMA)를 이용하여 치아 내의 무기조직인 법랑질과 상아질의 화학적 조성을 분석하고, 광학현미경(OM)과 전자현미경(EM)을 이용하여 치아의 미세구조 및 각 조직에 따른 HAp의 결정구조를 분석하였다.

## 재료 및 방법

시료는 6주령의 ICR-mouse (Samtako-Bio Korea)로부터 앞니를 적출하여 PBS buffer (phosphate buffered saline)에

담가 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

시료의 수분을 제거하기 위하여 PBS buffer에 15분씩 2번 세척한 후, 50%의 에탄올에서 점차 농도를 10%씩 늘려가며 30분씩 탈수과정을 진행하였다. 마지막 에탄올 100% 처리 과정에서는 시료를 30분씩 3번 처리한 후, propylene oxide (EMS) 100%에 30분씩 2번 처리하였다. 수분을 제거한 시료는 Caldofix resin과 hardner (Struers)를 각기 1:0.3의 비율로 섞어 만든 경화제에 넣어 50°C에서 하루 동안 경화하였다. 경화된 시편의 표면을 연마기(ALLIED, High Tech Products Inc.)를 이용하여 연마한 후, 전자현미분석기(Shimadzu 1610)를 이용하여 치아의 화학적 조성을 분석하였다.

현미경 관찰을 위한 시료는 단백질 분해효소인 proteinase K (SIGMA)와 1%의 SDS를 혼합한 용액에 48시간을 처리한 후, 3차 증류수에 6시간 동안 세척하였다. 그 후, 치아 내의 수분을 제거하기 위해 아세톤을 이용하여 2시간씩 3회, 48시간 1회 처리하여 탈수하였다. 마지막으로 diethyl ether (SIGMA)로 24시간 처리하여 지방질을 제거한 다음, 진공 펌프가 달린 챔버에서 12시간 보관하였다.

유기물을 제거한 치아는 wire-saw (Model 3242, Well)를 이용하여 70  $\mu\text{m}$  두께로 절단하여 시편을 제작한 후, 슬라이드 위에 올려 광학현미경(Eclipse 80i, Nikon)으로 관찰하였다.

치아의 단면을 관찰하기 위해 액체질소를 이용하여 치아를 순간 동결시킨 후, 힘을 가하여 횡으로 부러뜨렸다. 이를 카본테이프를 이용하여 슬라이드에 고정시켜 금을 코팅한 후, 주사전자현미경(LEO 1455VP, Zeiss)을 이용하여 단면을 관찰하였다.

유기물이 제거된 치아를 propylene oxide로 2회 30분씩 처리하고 Epon812 embedding resin (Glauert, 1974)을 사용해 치환 및 포매한 후, 60°C에서 경화시켰다. 경화된 시료는 다이아몬드칼과 초박절편기(Powertome X, RMC)를 이용하여 90 nm 두께의 초박절편을 제작하였다. 제작한 절편을 formvar막이 올려진 400 mesh grid 위에 수습한 후, 시편의 전도성과 전자의 투과력을 높이기 위하여 코팅기(DV-502A, Denton Vacuum)로 탄소를 코팅하여 200 kV field emission TEM (FE-TEM, JEM-2100F, JEOL)으로 관찰하였다.

분말시편의 TEM 관찰을 위하여 막자사발로 치아를 분말로 분쇄하고 100% 에탄올이 담긴 1.5 mL 튜브에 넣은 후, 초음파세척기(Model 3510, Branson)를 이용하여 1시간 동안 분산시켰다. 분산된 용액은 carbon막이 올려진 400 mesh grid 위에 10  $\mu\text{L}$ 을 떨어뜨려 하루 동안 건조시켰다. 제작된 시편은 탄소를 코팅한 후, FE-TEM으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

1. 광학 및 주사전자현미경을 이용한 치아의 미세구조 분석  
광학현미경으로 치아의 외곽부분을 둘러싼 법랑질과 내부

의 상아질, 그리고 치수강으로 추정되는 빈 공간이 형성하고 있는 치아의 구조를 관찰하였다(Fig. 1). 또한 쥐 치아의 구조에서 치아의 외부를 둘러싸고 있는 법랑질이 한 부분에서만 특징적으로 발달되어 있는 형태임을 파악하였다. 이는 앞니를 이용하여 사물을 씹어먹는 쥐의 특성상 치아를 보호하기 위하여 외부로 노출되는 부분의 법랑질이 다른 부분에 비해 자연적으로 두텁게 형성된 것으로 생각된다. 광학 현미경의 시편을 제작하는 방법으로는 기존의 연마기를 이용하는 것보다 wire-saw를 사용함으로써 넓은 범위 내에서 원하는 두께의 시편 제작이 빠르고 간편했지만, wire로 인한 시편의 손상으로 인해 일반적인 치아의 구조 이외의 법

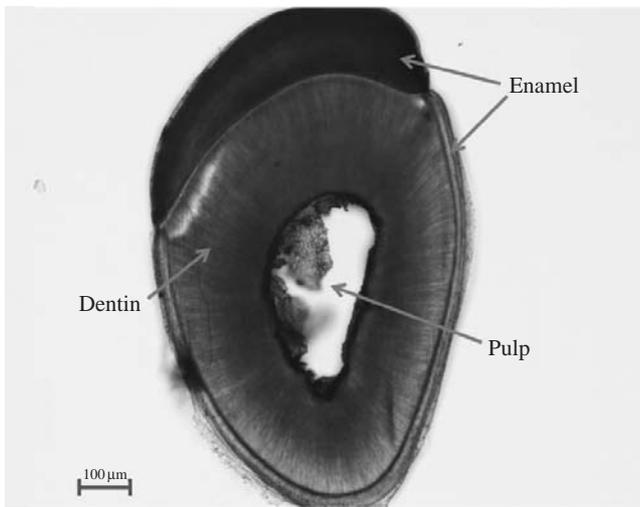
랑질과 상아질 내부의 세밀한 구조는 확인할 수 없었다.

이 때문에 치아를 동결 및 파쇄하여 시편을 제작한 후, 주사전자현미경을 통하여 법랑질과 상아질의 단면을 관찰하였다(Fig. 2). 법랑질에서는 막대형태의 결정(법랑소주; enamel rod 또는 enamel prism)들이 일정한 방향으로 배열되어 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2(a)). 특히, 이미지의 상단과 하단 부분에 표시된 화살표 부분의 법랑소주들이 c축 방향으로 자라난 법랑소주들과 서로 교차되는 구조임을 파악하였다. 각각의 법랑소주들이 서로 교차하면서 계층적으로 이루어진 법랑질의 구조를 볼 때, 이는 시편을 파쇄하기 전, a축 방향으로 자라난 법랑소주들과 c축 방향의 법랑소주들이 서로 교차하여 구조를 형성하고 있었음을 추측할 수 있다(Fong et al., 2003). a축 방향으로 자라난 법랑소주들은 시편 준비과정에서 횡단면으로 파쇄할 때, 손상되어 손실된 것으로 생각된다. 때문에 획득한 이미지에서의 법랑소주는 평균적으로 약  $2\mu\text{m} \times 18\mu\text{m}$ 의 너비와 길이를 가지고 있으나 시편의 파쇄로 인한 손상을 감안하면, 실제 법랑소주의 두께와 길이는 파악한 수치와 차이가 있을 것으로 생각된다.

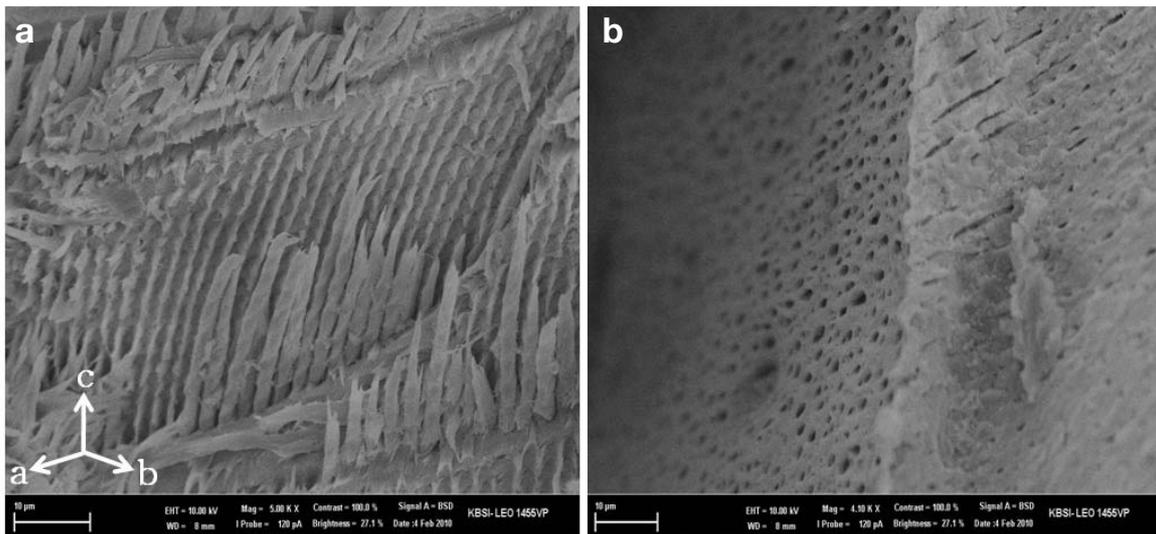
상아질은 약  $0.1 \sim 2\mu\text{m}$ 의 다양한 크기를 가진 작고 검은 구멍들이 곳곳에 분포하여 마치 스펀지와 같은 형태의 구조이다(Fig. 2(b)). 이 구멍은 치수강과 상아질을 연결하는 상아세관이 자리하는 곳으로 치아가 받는 충격을 흡수하여 완화시키는 기능을 담당한다고 알려졌다(Nalbandian et al., 1960; Boyde & Lester, 1967; Habelitz et al., 2005).

## 2. 전자현미분석기를 이용한 치아의 화학조성 분석

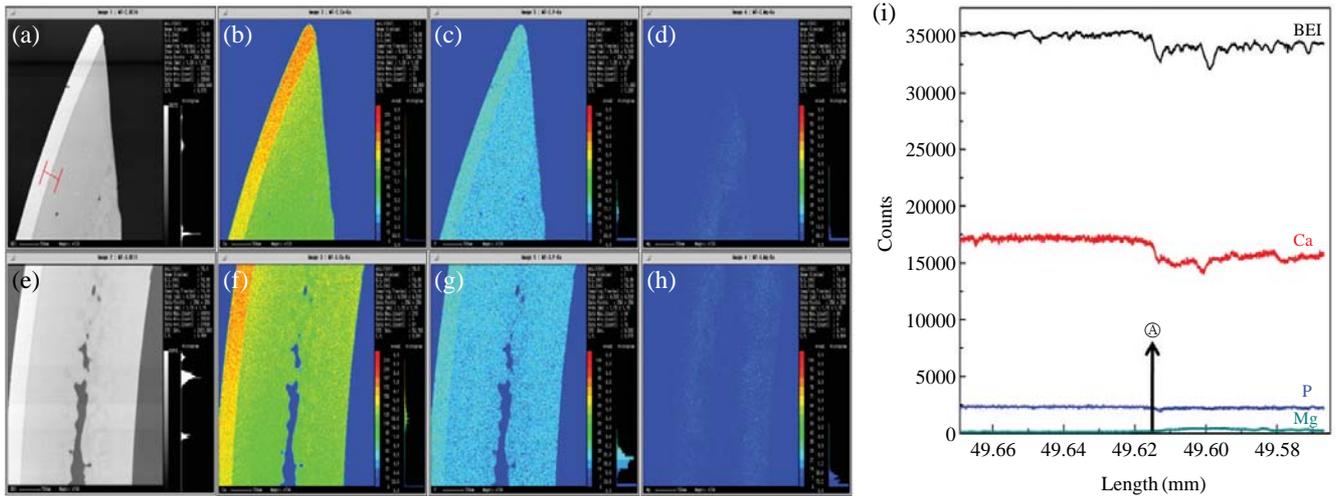
시편 내 구조 및 미소영역에서 원소의 정량적인 분석을 동시에 가능하게 하는 전자현미분석을 이용하여 치아의 구



**Fig. 1.** Microstructure of mouse teeth observed by optical microscopy. Enamel is a protective cover to the teeth, which is significantly thicker in the upper part of the image.



**Fig. 2.** SEM image of the freeze fractured samples: (a) enamel, (b) dentin. An arbitrary axis explaining orientations of enamel rods is designated in (a).



**Fig. 3.** (Left) EPMA elemental mapping of mouse teeth: (a) and (e) BSE image, (b) and (f) Ca-mapping, (c) and (g) P-mapping, (d) and (h) Mg-mapping. (Right) EPMA line profile of the enamel and dentin along the mark in (a).

조에 따른 전반적인 화학적 조성의 분포를 알아보았다. 치아의 정성분석을 수행한 결과 치아를 이루고 있는 주요 성분이 Ca, P 및 Mg임을 파악하였다. 앞서 파악한 주요 성분 이외에도 치아에는 F, Na, Zn 등의 성분들도 존재하나 이들은 치아 내 미세조직에 따라 극소량으로 분포되어 있어 본 실험의 정성분석에서는 검출되지 않았다(Tjaderhane et al., 1995). 본 연구에서 사용된 쥐 치아 내의 정성분석을 통해 파악한 세 성분을 중점으로 화학조성 분석을 시행하였다.

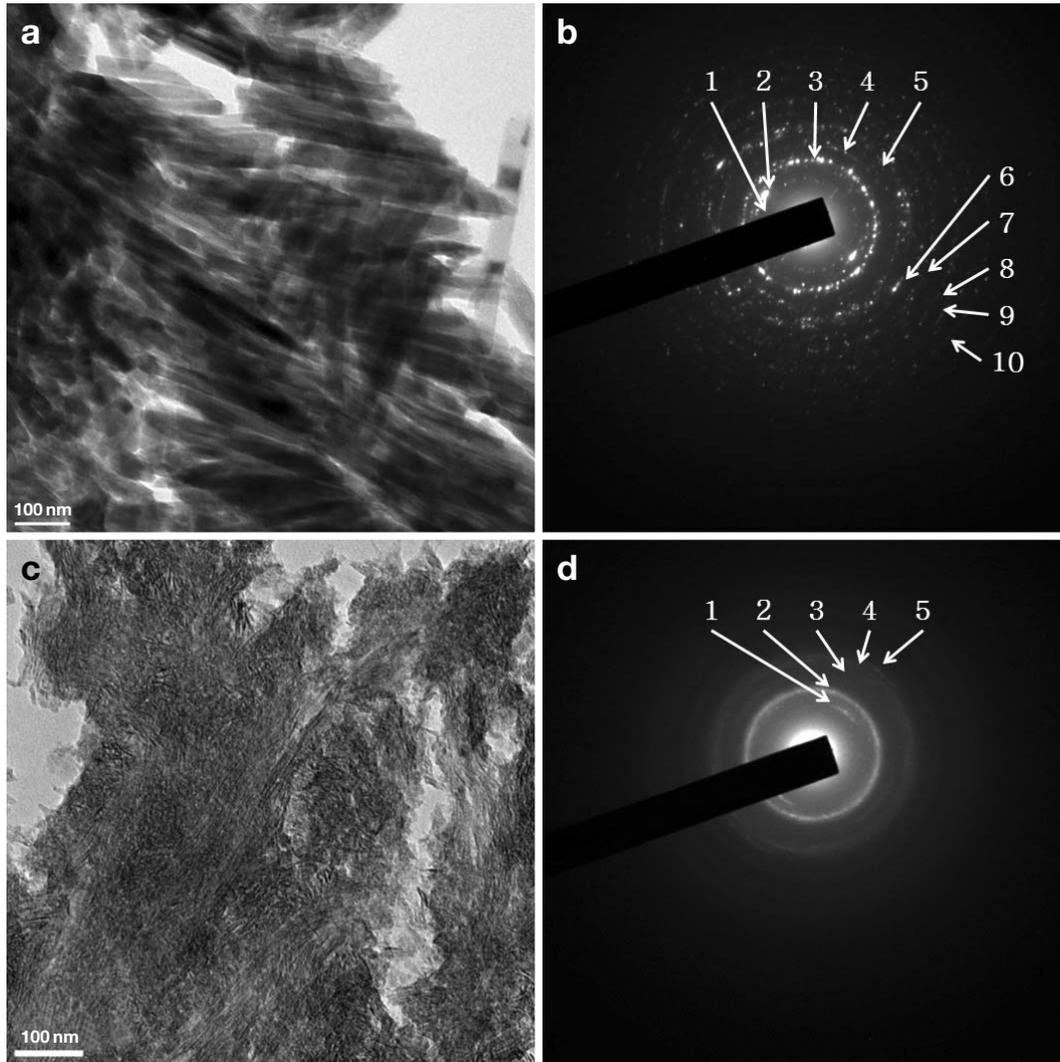
치아를 이루고 있는 각 성분의 분포를 좀 더 면밀히 파악하기 위해 치아의 끝 부분과 중간 부분을 mapping하여 농도를 측정하였고(Fig. 3), 그 중 back-scattering electron image (BEI)에서 치아의 외곽부분을 두껍게 둘러싸고 있는 법랑질과 내부의 상아질 및 치수관의 구조를 확인하였다(Fig. 3(a)와 3(e)). 각각의 구조에 따른 화학적 성분의 농도 분포를 측정하기 위하여 Fig. 3(a)에 표시된 부분을 따라 line profile을 수행하여 Fig. 3(i)에 나타내었다. 측정한 line profile의 BEI 결과에서 시편을 연마하는 동안 일어난 시료 표면의 손상을 통하여 법랑질과 상아질의 상대적인 강도를 파악하였다. 법랑질은 표면상태의 변화가 미미한 것에 비해 상아질은 상대적으로 손상도가 높고 표면이 거칠게 나타나 결정질로 이루어진 법랑질이 유기물을 포함하고 있는 상아질에 비해 견고하고 단단하게 이루어져 있음을 파악하였다. 또한 농도 측정 결과에서 P의 농도는 전체적으로 균일한 반면 ①부분을 경계로 치아의 물리적 성향에 영향을 주는 Ca과 Mg의 농도가 서로 상대적으로 나타나 이를 통해 ①부분이 법랑질과 상아질의 경계면임을 알 수 있었다. Ca은 상아질보다 법랑질에서의 함유량이 더 많으면서도 끝 부분에서 가장 높게 나타났는데, 이는 석회화 과정을 통한 법랑질에서의 HAp의 침착과 결정도가 상아질보다 더 높은 동시

에 가장 먼저 침착이 이루어진 치아의 끝부분에서 Ca의 농도가 높은 것으로 생각된다. 이와 반대로 Mg은 HAp의 침착을 용해시켜 무기질의 결정도를 떨어뜨리고 세포와 밀접한 관계를 맺고 있기 때문에 치수관과 세관으로 연결되어 있는 상아질의 구조상 법랑질보다 상아질에서의 Mg의 농도가 상대적으로 더 높게 측정된 것으로 생각된다(Nishizawa et al., 2006).

### 3. 투과전자현미경을 이용한 HAp 결정구조 분석

치아를 구성하고 있는 apatite의 결정구조 분석을 위해 유기물을 제거하였다. 유기물은 결정구조를 분석하는 데 있어 사용되는 전자회절패턴에서 피크 강도(intensity) 및 패턴에 영향을 주어 구조 분석에 오류를 가져올 수 있다. 유기물이 제거된 치아를 embedding resin을 이용하여 포매한 후, 법랑질과 상아질의 초박절편을 제작하였다. 초박절편은 다른 투과전자현미경 시편 제작 방법에 비해 간편하고 시료의 손상을 최소화할 수 있으며, 투과전자현미경을 통한 관찰시보다 넓은 영역을 관찰할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

투과전자현미경을 이용하여 관찰한 법랑질과 상아질 내의 HAp 결정구조를 Fig. 4에 나타내었다. 법랑질을 이루고 있는 HAp는 약 41 nm 너비의 방향성을 가진 긴 막대형 구조이고(Fig. 4(a)), 상아질에서의 HAp는 법랑질에 비해 크기가 훨씬 작은 침상형 구조임을 확인하였다(Fig. 4(c)). 두 부분 모두 일정 방향으로의 배열을 가지고 있는 HAp를 관찰할 수 있었으나 법랑질에 비해 상아질의 방향성이 상대적으로 낮게 나타났다. 상아세관과의 상대적인 위치에 따라 상아질의 내부조직인 관간 상아질(intertubular dentin)과 관주 상아질(intratubular dentin)에서도 HAp의 배열 및 구조적인 차이가 있지만(Porter et al., 2005), 본 시편에서는 치아



**Fig. 4.** Bright field TEM images and electron diffraction patterns of mouse teeth: (a) and (b) enamel; (c) and (d) dentin. The numbers in (b) and (d) correspond to diffraction planes analyzed and listed in Table 1.

의 초박절편을 제작하는 중에 일어나는 상아질의 손상으로 인하여 상아세관의 위치를 명확히 분간할 수 없었기에 일반적인 상아질 내의 HAp 구조로 분류하여 법랑질과 비교 분석하였다.

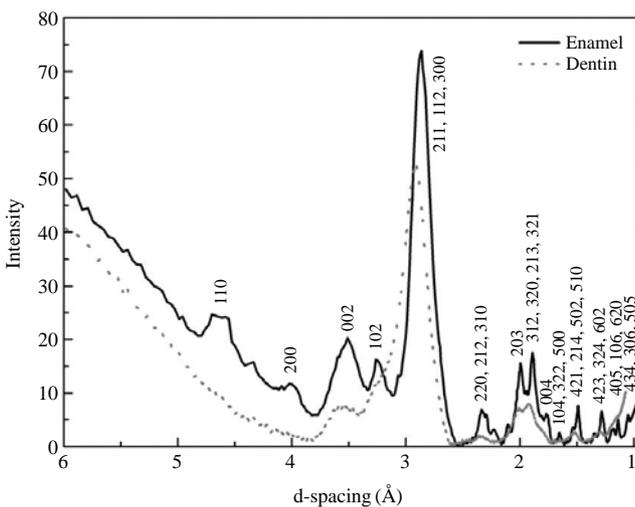
HAp의 결정구조를 분석하기 위해 제한시야 전자회절(SAED)을 이용하여 법랑질과 상아질을 관찰한 결과, 둘 다 원형의 회절패턴(ring pattern) 내외부에 짧은 아크(arc) 형태의 회절이 나타나는 구조를 확인하였다(Fig. 4(b)와 4(d)). 이는 전형적인 HAp의 회절패턴으로 각각의 회절패턴에서 분석한 법랑질과 상아질의 회절면(plane)은 Table 1에 나타내었다.

유기물이 적은 법랑질에서의 회절패턴은 상아질에 비해 피크 강도(intensity)가 세고 뚜렷하며, 고차회절패턴에 의한 구조 정보를 다량으로 얻을 수 있었지만, 상아질에서의 회

절패턴은 유기물(type-1 collagen)로 인한 결정의 피크 강도가 약해 얻을 수 있는 구조 정보에 한계가 있었다. 이는 Fig. 5에 나타난 법랑질과 상아질의 피크 강도 그래프에서 더 명확히 알 수 있었다. 법랑질에서는 전자회절패턴에서 근접한 거리로 인해 하나의 패턴으로 보여 명확히 구분하지 못했던 회절면을 피크 강도를 통하여 파악할 수 있었던 반면, 상아질은 피크 강도가 낮고 완만하여 회절패턴에서 파악한 결과 이상의 회절면을 볼 수 없었다. 또한, 이전의 뼈와 상아질에서의 전자회절에서는 약 3.44 Å, 즉 (002) 이상의 면간거리(d-spacing)를 갖는 회절면은 투과빔과의 거리가 근접하여 투과빔의 강한 intensity에 의해 관찰하기 어려웠던 반면 결정도가 높고 유기물로 인한 노이즈가 낮은 법랑질에서는 (002)보다 투과빔과 가까운 위치에 존재하는 회절패턴도 관찰할 수 있었다. 상아질의 전자회절에서는 약 1.93 Å의

**Table 1.** Lists of distances between the transmitted beam and the diffracted beams (R), corresponding d-spacings and hkl planes for enamel and dentin displayed in Fig. 4(b) and (d).

#	Enamel			Dentin		
	R (mm)	d (Å)	hkl	R (mm)	d (Å)	hkl
1	1.54	4.583	110	2.03	3.517	002
2	2.06	3.510	002	2.49	2.898	211, 112, 300
3	2.55	2.828	211, 112, 300	3.08	2.391	220
4	3.10	2.335	220, 212, 320	3.78	1.937	222
5	3.61	1.998	203	4.22	1.761	004
6	4.10	1.765	004	—	—	—
7	4.86	1.489	421, 214, 502, 510	—	—	—
8	5.62	1.286	423, 324, 602	—	—	—
9	6.14	1.180	405, 106, 620	—	—	—
10	6.88	1.138	434, 306, 505	—	—	—

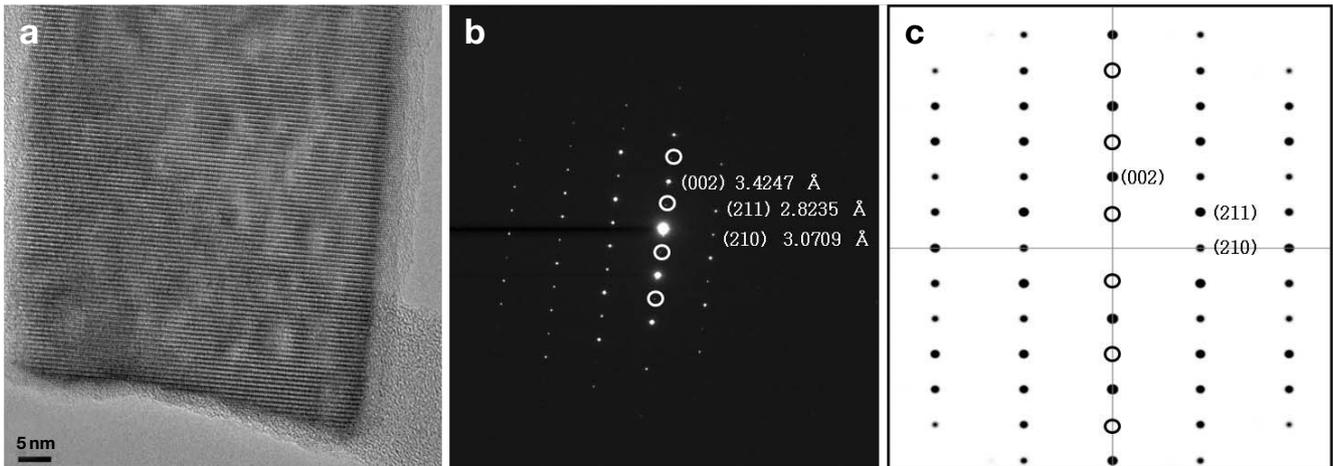
**Fig. 5.** Intensity profile of the diffraction patterns of enamel and dentin shown in Fig. 4(b) and 4(d).

면간거리를 가지는 회절패턴이 육안으로는 한 개의 ring pattern으로 보이지만 법랑질과의 비교분석을 통해 실제로는 가깝게 위치한 여러 ring pattern이 근접하게 위치하고 있음을 파악하였다. 따라서 collagen이 포함된 상아질에서의 정량적인 분석을 수행하기 위해서는 energy filtering, 카메라 길이 및 노출 시간 조정 등의 실험조건을 최적화하는 것이 중요함을 알 수 있다. 법랑질과 상아질의 피크 강도 그래프를 통하여 HAp 회절패턴의 특징을 파악한 결과, 다른 ring pattern에 비해 (211), (112), (300)의 ring pattern의 피크 강도가 강하고 뚜렷하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이는 HAp 결정 구조상 (211), (112), (300)의 결정면이 구조상에서 중요한 역할을 하고 있음을 시사하며, 특히 면간거리가 가까운 세 면의 회절패턴은 각각 아크 형태이지만 서로 중복되어 연속적인 링 형태를 보일 수도 있다는 보고도 발표되었기에 이에 정량적인 분석의 필요성을 증대시키며 면밀한 분석이 요구된다(Olszta et al., 2007).

일반적으로 생체 내의 HAp의 구조 및 성장에는 collagen이 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Palmer et al., 2008). Collagen 사이사이에 존재하는 HAp는 c축으로 성장하는 collagen의 장축을 따라 납작하고 길게 성장하기 때문에 type-1 collagen을 포함하고 있는 뼈나 상아질에서의 전자회절패턴 대부분은 c축 방향으로의 회절패턴이 뚜렷하게 나타난다. 일반적인 HAp의 전자회절에서 아크형태로 나타나는 회절패턴이 c축 방향의 회절면인 (002)와 (004)면을 나타내며, 아크의 정도를 통하여 뼈나 상아질에서의 collagen과 HAp의 배열도 추측할 수 있다(Glimcher, 2006). 하지만 collagen이 존재하지 않는 법랑질 내의 HAp 전자회절패턴에서도 뚜렷한 (002)와 (004)면을 확인할 수 있었기에 이 구조를 파악하기 위해서는 법랑질의 형성과 성장에 관여하는 단백질인 amelogenin을 연계하여 관련성을 분석해야 한다(White et al., 2001). 하지만 본 연구에서는 순수 HAp만의 구조 분석에 중점을 두고 연구를 수행하기 위하여 유기물 제거를 시행하였기에 유기물과의 상호관계에 관한 연구는 추후 진행할 예정이다.

HAp의 구조 분석을 위한 전자회절패턴에서 사용되는 제한시야 조리개의 최소 크기는 0.5 μm이다. 때문에 주변의 다른 조직을 포함하지 않은 상태에서 HAp만의 구조 분석을 하기에는 어려움이 있어 초박절편에 비해 두께가 얇은 분말시편으로 고분해능 이미지를 획득하여 구조를 파악하였다(Fig. 6). 앞서 제시된 데이터에서 볼 수 있듯 법랑질과 상아질을 이루고 있는 HAp는 크기 및 모양 등에서 큰 차이를 보이지만 실제 고분해능 관찰을 통해 관찰한 치아 내 HAp의 결정들은 단일방향으로 주기적인 배열을 갖는 것을 볼 수 있다. 이는 HAp의 구조 분석에 있어 주변 유기조직과의 상호관계에 대한 중요성을 보여준다.

분석결과를 점검하기 위해 E-map 프로그램(Oleynikov)을 이용하여 Fig. 6(b)의 결과를 토대로 계산된 정대축 방향의 전산모사를 수행하여 나타내었다(Fig. 6(c)). 실험결과와 전산모사를 통한 결과는 매우 유사하게 나타났지만 HAp의



**Fig. 6.** A HRTEM image of a particle of teeth (a) and corresponding electron diffraction pattern (b), which indicates  $[-120]$  zone axis of hydroxyapatite, as shown as the simulated kinematical electron diffraction pattern in (c).

결정구조( $P6_3/m$ )상 나선축에 의해 소멸조건(extinction condition)이 형성되어 나타날 수 없는 (001), (003) 등의 회절면이 실험결과에서 관찰되어 이론적인 패턴과 차이가 있었다. 이는 전자가 시편을 투과하면서 생기는 이중산란이나 시편 내의 결함으로 인하여 나타날 수 있기 때문에 전자회절패턴을 이용한 결정의 구조분석에서는 전산모사를 통한 점검이 필요하다.

본 연구의 결과에서 볼 수 있듯이 치아는 각각의 구조에 따른 화학적 조성의 차이와 미세구조의 차이를 가지고 있다. 전자현미분석을 통한 화학적인 분석 이외에도 생체 내의 각 구조에 따른 미세구조 분석을 위해서는 energy dispersive spectrometer (EDS) 및 electron energy loss spectroscopy (EELS)를 통한 Ca과 P의 정량적인 비율 분석이 중요한 역할을 담당한다. 또한, 치아 내 HAp는 아크 또는 링 형태의 회절패턴을 보여 일반적인 회절패턴 분석만으로는 정확한 결정구조 정보를 얻기 힘들기 때문에 세차전자회절(precession electron diffraction) 분석 등의 최신 개발된 기법을 이용한 연구가 필요하며 이와 같은 기술을 통하여 HAp의 정량적인 결정구조 분석이 가능할 것으로 기대된다.

## 결 론

본 연구에서는 치아 구조에 따른 화학적 조성의 변화와 미세 구조를 분석하였다. 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 구조 분석을 시행하였고, 화학적인 조성 분석은 전자현미분석을 이용하였다. 치아는 법랑질과 상아질의 계층적인 내부 구조로 이루어져 있으며, 각각의 구조에서 서로 상대적인 Ca과 Mg의 농도 차이를 확인하였다. 법랑질과 상아질의 미세구조를 분석한 결과, 크기는 다르지만 일정한 배

열을 지닌 HAp의 결정 구조와 회절패턴을 확인하였다. 이와 같은 결과는 치아만이 아닌 다른 생체 내의 무기 조직에서도 외부환경이나 기능에 따른 화학적 조성 및 구조적인 차이의 가능성을 시사하고 있기에 현대 의학 및 생체 분석에서 각 조직 내 미소영역에서의 정량적인 구조 및 화학 분석이 절실히 요구된다.

## 참 고 문 헌

- Boyde A, Lester KS: An electron microscope study of fractures dentinal surfaces. *Calcified Tissue Research* 1 : 122-136, 1967.
- Elliott JC: Calcium phosphate biominerals. In: Matthew JK, ed, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry. Phosphates*, pp. 427-453, Mineralogical Society of America, Chantilly, 2002.
- Fong S, White SN, Paine ML, Luo W, Snead ML, Sarikaya M: Enamel structure properties controlled by engineered proteins in transgenic mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 18 : 2052-2059, 2003.
- Glauert AM: *Practical methods in electron microscopy*. American Elsevier, New York, pp. 1-198, 1974.
- Glimcher MJ: Bone: Nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural and physical chemical mechanism in their formation. In: Nita S, ed, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry. Medical Mineralogy and Geochemistry*, pp. 223-282, Mineralogical Society of America, Chantilly, 2006.
- Habelitz S, Zartoshtimanesh S, Balooch M, Marshall SJ, Marshall GW, Denbesten PK: Structure and properties of murine and human dentin. *Materials Research Society* 874 : L5.18.1, 2005.
- Kinney JH, Nalla RK, Pople JA, Breunig TM, Ritchie RO: Age-related transparent root dentin: mineral concentration, crystallite size and mechanical properties. *Biomaterials* 26 : 3363-3376, 2005.

- Leventouri T, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V: Crystal structure studies of human dental apatite as a function of age. *International Journal of Biomaterials* 698547, 2009.
- Mann S: Molecular recognition in biomineralization. *Nature* 332 : 119-124, 1988.
- Nalbandian J, Gonzales F, Sognnaes RF: Sclerotic age change in root dentin of human teeth as observed by optical, electron, and X-ray microscopy. *Journal of Dental Research* 39 : 598, 1960.
- Nalla RK, Porter AE, Daraio C, Minor AM, Radmilovic V, Stach EA, Tomsia AP, Ritchie RO: Ultrastructural examination of dentin using focused ion-beam cross-sectioning and transmission electron microscopy. *Micron* 36 : 672-680, 2005.
- Nishizawa Y, Morii H, Durlach J: New perspectives in magnesium research. Springer, Japan, pp. 359, 2006.
- Oleynikov, P. eMap, a program for generating 3D Fourier maps and determining peak positions. *AnaliTEX* www.analitek.com/eMap.html; Oleynikov, P. http://www.analitek.com.
- Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ, Douglas EP, Gower LB: Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering R58* : 77-116, 2007.
- Palmer LC, Newcomb CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Stupp SI: Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chemical Review* 108 : 4754-4783, 2008.
- Porter AE, Nalla RK, Minor A, Jinschek JR, Kisielowski C, Radmilovic V, Kinney JH, Tomsia AP, Ritchie RO: A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin. *Biomaterials* 26 : 7650-7660, 2005.
- Suk DH, Kim CY: Determination of age in humans from root dentin transparency. *Korean Journal of Oral Medicine* 7 : 59-65, 1982.
- (Korean)
- Tamerler C, Sarikaya M: Molecular biomimetics: genetic synthesis, assembly and formation of materials using peptides. *MRS Bulletin* 5 : 504-512, 2008.
- Tjaderhane L, Hietala EL, Larmas M: Mineral element analysis of carious and sound rat dentin by electron probe microanalyzer combined with back-scattered electron image. *Journal Dental Research* 74 : 1770-1774, 1995.
- White SN, Luo W, Paine ML, Fong H, Sarikaya M, Snead ML: Biological organization of hydroxyapatite crystallites into a fibrous continuum toughens and controls anisotropy in human enamel. *Journal Dental Research* 80 : 321-326, 2001.
- Zou XD, Sukharev Y, Hovmöller S: ELD-a computer program system for extracting intensities from electron diffraction patterns. *Ultramicroscopy* 49 : 147-158, 1993.

#### < 국문 초록 >

본 연구에서는 광학 및 전자현미경 관찰과 전자현미분석을 수행하여 쥐 치아의 미세구조, 화학 조성 및 hydroxyapatite의 결정 구조를 파악하였다. 치아의 겉 표면을 둘러싸고 있는 법랑질은 막대들이 일정하게 배열된 구조이며 결정도가 높고 Ca이 많이 침착되어 있다. 그에 비해 상아질은 상아세관이 통과하는 원형의 구멍이 고루 분포되어 있는 스펀지 구조이며 유기질의 존재로 인해 Mg의 분포가 법랑질에 비해 상대적으로 높게 나타났다. Hydroxyapatite 결정들은 법랑질에서는 크기가 큰 막대 형태로 나타났으나 상아질에서는 크기가 작은 침상 형태로 나타났으며, 각 조직의 결정도와 유기질의 유무에 따라 전자회절패턴의 차이를 보였다.