한국현미경학회지 제40권 제3호 2010
Korean J. Microscopy 40(3), 155~162(2010)

광학현미경과 투과전자현미경을 이용한 토끼와 닭 대퇴골의 미세구조 분석

김창연[1], 김은경[1], 전태훈[1], 남승원[2], 김윤중[1,3,*]
[1]충남대학교 분석과학기술대학원, [2]충남대학교 생명과학과,
[3]한국기초과학지원연구원 전자현미경연구부

Microstructure Analysis of Rabbit and Chicken Femurs by Light Microscopy and Transmission Electron Microscopy

Chang Yeon Kim[1], Eun Kyung Kim[1], Tae Hoon Jeon[1],
Seung Won Nam[2], Youn-Joong Kim[1,3,*]
[1]Graduate School of Analytical Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
[2]Department of Bioscience and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
[3]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

Bone is a hierarchically structured composite material which has been well studied by the materials engineering community because of its unique structure and mechanical properties. Bone is a laminated organic-inorganic composite composed of primarily hydroxyapatite, collagen and water. The main mineral that gives bone's hardness is calcium phosphate, which is also known as hydroxyapatite. Light microscopy (LM) and transmission electron microscopy (TEM) were used to study the structure of femurs from chicken and rabbit. The elemental analysis was used to search variation in the distribution of calcium, potassium and oxygen in the femur. Current investigation focused on two structural scales: micro scale (arrangement of compact bone) and nano scale (collagen fibril and apatite crystals). At micro scale, distinct difference was found in microstructures of chicken femur and rabbit femur. At nano scale, we analyzed the shape and size of apatite crystals and the arrangement of collagen fibril. Consequently, femurs of chicken and rabbit had very similar chemical property and structures at nano scale despite of their different species.

Keywords : Chicken femur, Rabbit femur, Microstructure, Electron diffraction pattern, Hydroxyapatite

서 론

뼈는 다양한 기계적, 화학적 기능을 하는 요소들의 복합체이며 인체 지지, 보호, 미네랄 이온의 항상성에 기여하고 있다 (Rho et al., 1998). 또한 뼈는 다층구조로 콜라겐 (collagen), apatite, 물 (water)로 구성되어 있으며 이중에서 apatite는 뼈의 65 wt.%를 차지함으로써 뼈의 강도에 영향을 미친

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

다(Olszta et al., 2007). Apatite 결정의 구조, 형태, 크기 및 공간적 분포는 뼈의 기계적 특성에 영향을 미치는데 성숙한 뼈에서는 hydroxyapatite (HAp)인 calcium phosphate 결정들이 $Ca_5(PO_4)_3OH$의 화학조성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

투과전자현미경을 이용하여 HAp 결정들이 50～100 nm의 길이와 25～50 nm의 폭의 크기로 존재한다는 것이 밝혀져 있다(Robinson et al., 1952; Landis et al., 1993). 이 결정은 뼈의 콜라겐과 연관되어 있는데 HAp 결정의 생성 및 변화와 이에 따른 콜라겐과의 공간배열 관계는 아직도 명확히 밝혀지지 않았지만 Landis 등이 TEM을 이용한 토모그래피로 apatite 결정이 콜라겐 사이에 거의 평행하게 위치해 있다는 것을 밝혀냈다(Landis et al., 1993). 뼈의 구성성분과 구조, 기계적·화학적 현상을 다양한 범위에서 해석한다면 각 요소들 사이의 관계를 이해하는데 도움이 될 것으로 사료되어 실험을 진행하였다.

본 실험에서는 토끼와 닭 대퇴골(femur)의 구조와 조성의 차이점을 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 밝혀보고자 하였다. 시료 준비 과정에서 본래 가지고 있는 뼈의 성분과 구조에 변형이 일어나는 것을 최소화하기 위해서 뼈 속 혈관 내 혈액만을 제거한 후 탈회(decalcification) 등 다른 화학적 처리를 하지 않고 광학현미경 및 전자현미경 관찰을 실행하였다. 실험은 크게 10～500 μm의 범위와 20 nm～10 μm의 범위로 구분지어 연구를 진행하였다. 10～500 μm의 범위는 광학현미경을 이용하여 토끼와 닭 대퇴골의 섬유주 구조(trabecula structure), 하버시안 관(haversian canal) 및 골원(osteon)을 관찰하였고, 20 nm～10 μm의 범위에서는 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 콜라겐 섬유의 배열, HAp 결정 및 성장 방향을 알아보았다.

재료 및 방법

본 연구에서는 9주령 New Zealand white rabbit 암컷(Samtako-Bio Korea)을 사용하였으며 닭은 20주령 토종닭 암컷을 사용하였다. 기능에 따라 뼈는 크게 장골(long bone)과 편평골(flat bone), 단골(short bone), 불규칙 골(irregular bone)으로 나뉘는데 본 실험에서는 장골인 대퇴골을 사용

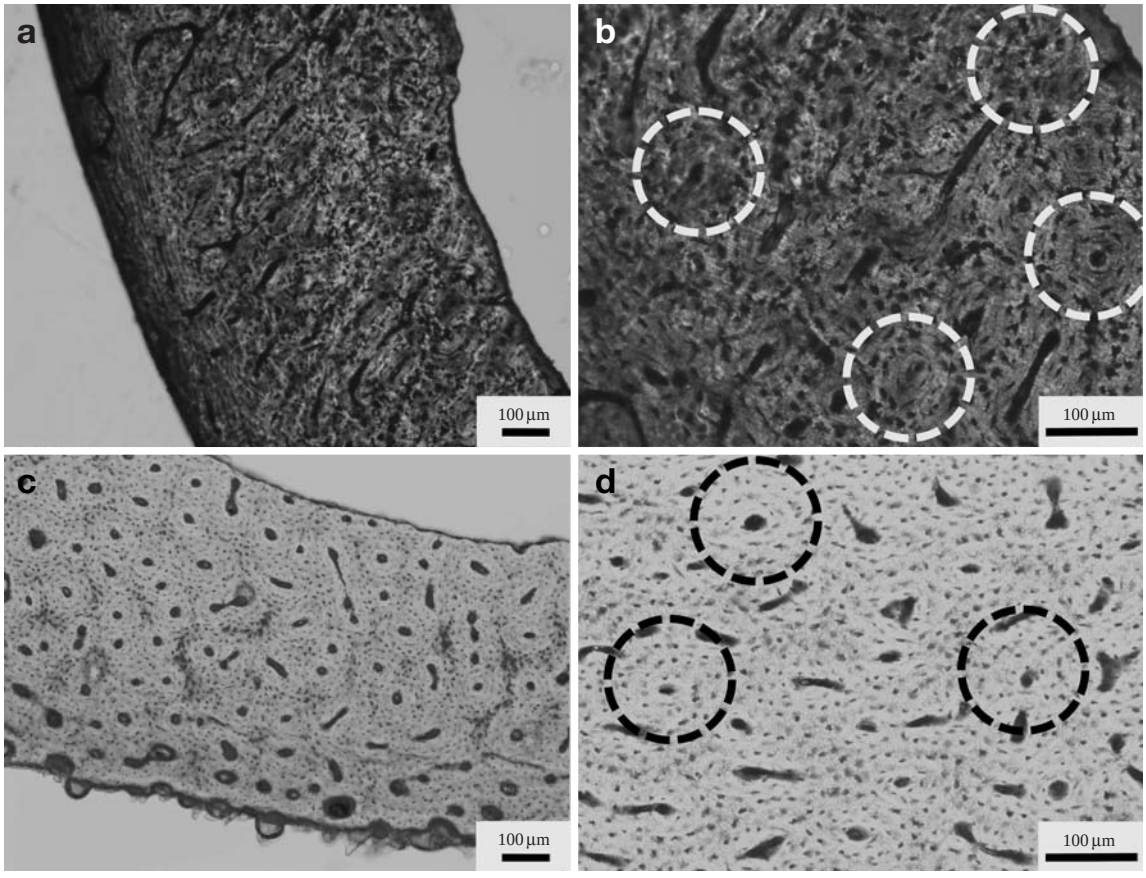


Fig. 1. Light microscope images: (a) and (b) rabbit femur; (c) and (d) chicken femur. Circles indicate differences in osteons between rabbit and chicken femurs.

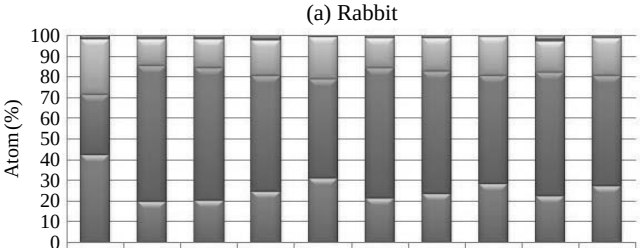
하였다. 각각의 뼈를 발취하여 4% paraformaldehyde (PFA) 용액에 고정하였다.

토끼와 닭 뼈를 화학처리하지 않고 그대로 광학현미경 시료로 제작하기 위해서 microsaw (Precision saw, BUEHLER)와 시편 연마기를 이용하였다. 먼저 microsaw를 이용해서 뼈를 1 cm로 자르고 wax를 이용하여 시편 연마기에 부착한 후 다이아몬드 필름 (diamond film)을 이용하여 90 μm 이내의 두께로 연마하여 시편을 관찰하였다.

TEM 분말 시편 준비는 막자사발을 이용하여 실험동물의 대퇴골을 분쇄하여 에탄올에 넣은 뒤 ultrasonic cleaner (model 3510, Bransonic)를 이용하여 분산시킨 후 탄소막을 입힌 300 mesh copper grid에 떨어뜨렸다. 그리고 습도 조절 desiccator에서 10시간 이상 건조시킨 후 탄소 코팅을 하여 시료를 관찰하였다. 초박 시편 준비는 토끼와 닭 대퇴골을 epoxy인 caldofix resin (Struers)과 caldofix hardener (Struers)를 10 : 1 비율로 혼합하여 시료에 고정시킨 후 oven을 이용하여 60°C에서 12시간 이상 보관하였다. Ultramicrotome (UT, Powertome X, RMC)를 이용하여 초박 시편을 제작하고 300 mesh copper grid에 수집하여 탄소 코팅을 한 후 TEM 분석을 하였다. TEM은 field emission TEM (FE-TEM, JEM 2100F, 200 kV, JEOL)과 energy filtering TEM (EF-TEM, EM 912 Omega, 120 kV, Zeiss)을 이용하였다.

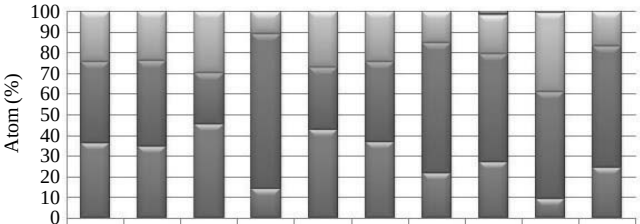
분말 X-ray diffraction (XRD, D8 advance, Bruker)용 시편의 경우 토끼와 닭의 대퇴골을 막자사발로 분쇄하고 XRD holder에 채운 후 시료 내부에 빈공간이 생기지 않게 압축시키고 높이를 일정하게 유지해 준 후 분석하였다.

(a) Rabbit



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Si	2.05	1.64	1.84	2.35	0.92	1.27	1.39	0.62	2.64	1.18
P	26.45	13.29	13.98	17.06	20.29	14.57	16.03	19.01	15.37	18.36
O	29.4	65.11	63.76	55.92	48	62.64	58.85	52.28	59.53	53.13
Ca	42.1	19.97	20.41	24.67	30.79	21.52	23.73	28.09	22.47	27.33

(b) Chicken



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Si	0.23	0.51	0.43	0.69	0.33	0.21	0.49	1.93	0.94	0.39
P	24.49	23.64	29.84	10.72	27.25	24.4	15.22	18.75	38.15	16.54
O	39.04	41.47	24.57	74.32	29.61	38.46	62.49	52.2	51.88	59
Ca	36.24	34.39	45.17	14.28	42.81	36.93	21.8	27.12	9.03	24.08

Fig. 2. Bar graphs showing TEM-EDS data of rabbit femur (a) and chicken femur (b). Ten different points were analyzed from each specimen.

결과 및 고찰

토끼와 닭의 대퇴골 형태를 Fig. 1(a)와 1(c)의 저배율 이미지에서 비교해 보았을 때 토끼 뼈에서 닭 뼈보다 더 뚜렷하게 치밀골 내부에 세관(細管)의 층상 구조 (lamella structure)가 관찰되었다. 토끼 뼈에서 확인 할 수 있는 층상 구조는 초기 하버시안 관이 빨리 성장하는 조직에 의해 발생한 균열들로 일정한 방향으로 평행하게 배열하여 방사형으로 뻗어나가는 형태로 성장하면서 발생한 것으로 사료된다 (Rensberger et al., 2000).

이에 비해 닭 뼈의 경우 비교적 불규칙적인 구조를 보였다. 다시 말해 세관이 토끼에 비해 방사형으로 형성되지 않고 세관의 구조나 분포가 더 불규칙한 형태로 성장하는 것으로 사료된다. 최근 연구에 의하면 조류 뼈의 특징은 하버시안 관 주변에 보다 광범위하게 층상 구조가 다양한 각도로 형성되는 특징을 보인다고 알려졌다 (Liu et al., 1996).

고배율 이미지인 Fig. 1(b)와 1(d)의 원을 보면 토끼의 대퇴골은 골원의 간격이 넓고 일정하며 원주를 형성하는 반면 닭의 대퇴골은 골원의 간격이 좁고 불규칙적인 특징을 보였다.

토끼와 닭 대퇴골의 화학조성 및 구성물질을 알아보기 위해서 TEM-EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) 분석과 XRD 분석을 하였다. 먼저 EDS 분석의 경우 토끼와 닭 대퇴골의 분말 시편에서 각각 10 point를 선택하여 각 부분의 성분 분석을 한 결과 Fig. 2와 같이 나타났다. 분석 위치에 따라 조성 변화를 보이지만 Ca, P, O, Si로 구성되어 있는 것을 확인 할 수 있었는데 이는 뼈를 구성하고 있는 HAp의 주성분인 Ca, P, O가 나타나는 것을 알 수 있었다. Carlisle (1970)의 연구에 의해 뼈 형성 초기단계에 Si 이온이 효과적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌는데 Si 성분의 검출은 실험에 사용된 토끼와 닭이 완전한 성체로 자란 것이 아닌 성장단계에 있는 것을 예측할 수 있었다.

각 분말의 구성물질을 알아보기 위해서 XRD 분석을 한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 모두 apatite 결정인 것으로 나타났다. Fig. 3은 x-선의 2θ값과 상대강도 (intensity)를 나타낸 그래프로 면간거리를 계산하여 주요 정상 피크들의 면을 분석할 수 있었다. 주요 정상점으로 (002)면과 (211),

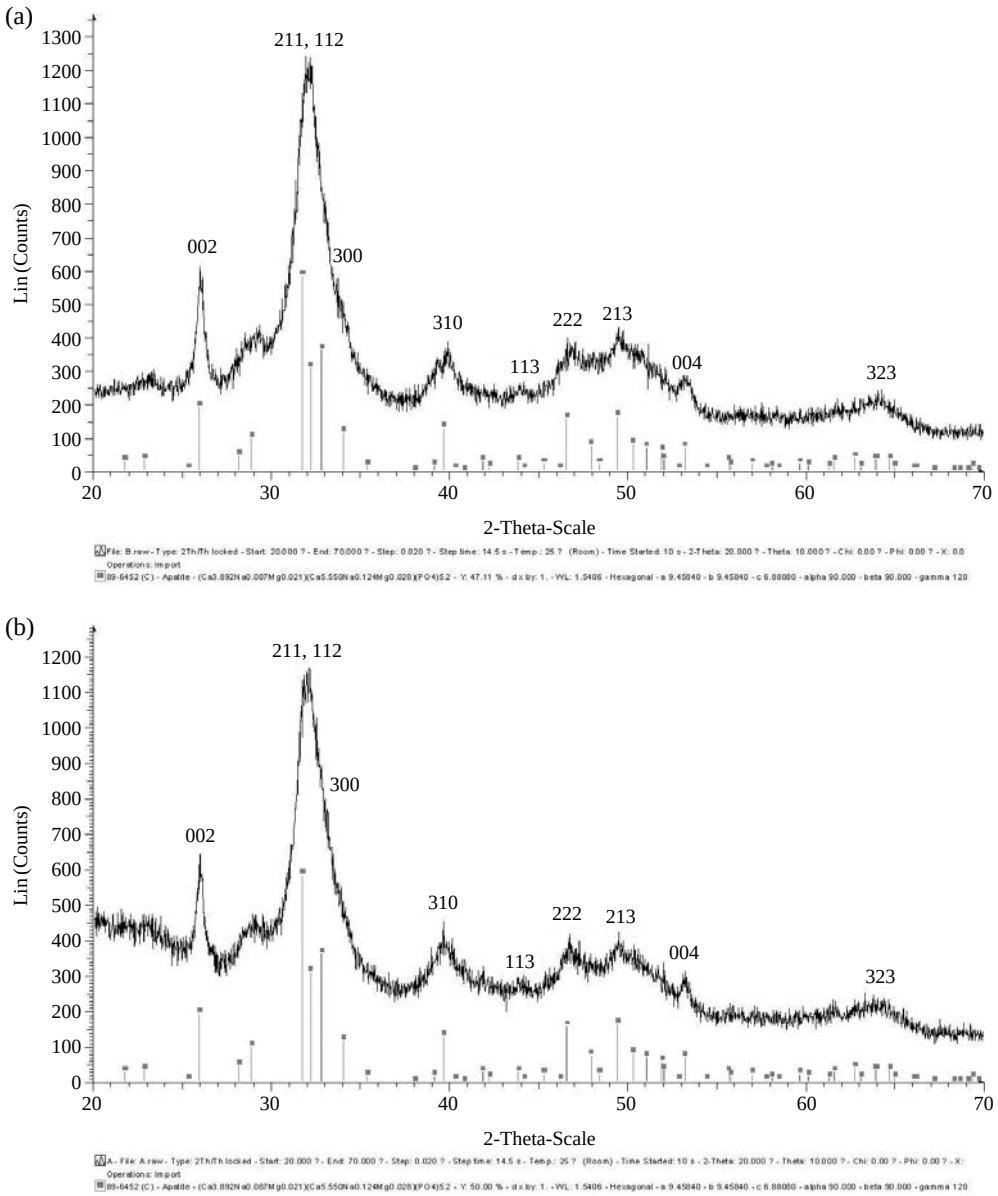


Fig. 3. Powder XRD data of rabbit femur (a) and chicken femur powder (b). Red lines indicate the calculated XRD intensities of hydroxyapatite planes.

(112), (300)면이 겹쳐지는 부분이 가장 강한 상대강도를 보였고 그밖에 (310), (222), (213), (004)면의 정상점들이 두드러지게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 전자현미경을 이용한 전자회절도형에서도 XRD 자료를 바탕으로 각 면에 대한 강도를 유추할 수 있었다.

분말 시편의 경우 나노입자로 이루어져 있기 때문에 고분해능에 유리한 FE-TEM을 이용하여 이미지를 관찰하였고, UT 시편의 경우 energy filter를 통하여 전자회절도형 분석에 유리한 EF-TEM을 이용하여 시편을 관찰하였다. 토끼와 닭의 대퇴골 분말시편을 TEM 명시야상으로 보았을 때 Fig. 4(a)와 4(c)에서 보는 바와 같이 약 200 nm와 100 nm 폭의 콜라겐 다발이 각각 관찰되었다. 각 콜라겐 사이에 위치한 무기질인 HAp는 전자회절도형을 통해서 파악되었는데 Fig. 4(b)와 4(d)의 회절도형에서 HAp의 (002)면과 (004)면의 회절이 연속된 원형이 아닌 아크형으로 나타남을 알 수 있다. HAp의 공간군 $P6_3/m$의 c축을 따라 형성되는 회전축(screw axis) 때문에 (001)면과 (003)면의 회절점이 보이지 않은 것도 특징적이다.

다른 회절점들은 임의의 삼차원 배열을 나타내는 원형의 회절도형을 보이는 반면 (002)면과 (004)면만 뚜렷한 방향성을 나타내는 아크형 회절도형을 보이는 것은 판상의 나노 결정인 HAp가 튜브형의 나선형(helix) 구조를 가지고

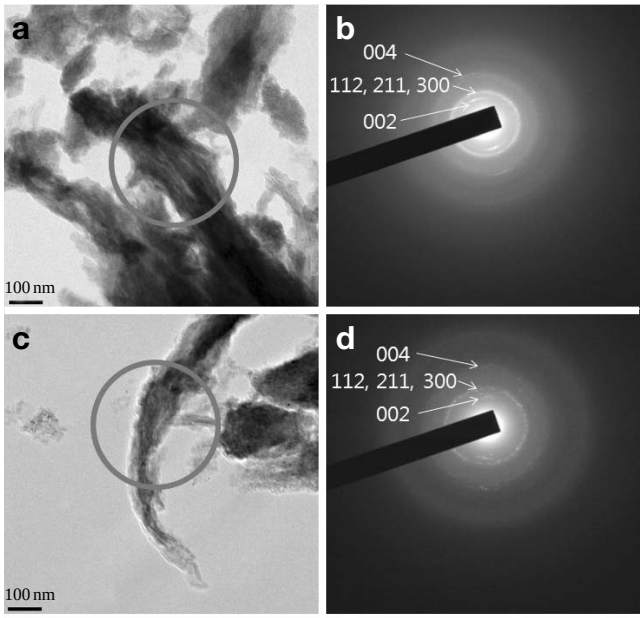


Fig. 4. Bright field TEM images and electron diffraction patterns from the powder samples: (a) and (b) rabbit femur; (c) and (d) chicken femur. Circles indicate the areas observed by the selected area aperture.

있는 콜라겐과 상호 방향성을 가지면서 형성되고 성장됨을 지시하고 있다(Rubin et al., 2004; Gupta et al., 2008).

Fig. 5(a)와 5(c)에서 보는바와 같이 UT 절단을 한 TEM 시편을 명시야상으로 보았을 때 콜라겐에서 볼 수 있는 특유의 줄무늬를 확인할 수 있었다. 이는 콜라겐과 HAp 간의 배열에 따른 특징임을 알 수 있다. 분말 시편에서는 시편준비 과정에서 콜라겐의 배열이 무너진 결과 HAp가 아크형태로 나타난 부분을 관찰하기 어려웠고 콜라겐에서 나타나는 줄무늬도 확인하기 어려웠다. 하지만 콜라겐의 배열이 뚜렷한 UT 시편의 경우 (002)면과 (004)면이 대부분 명확하게 아크형태를 띄는 것을 Fig. 5(b)와 5(d)에서 확인할 수 있었다. 이는 콜라겐의 배열을 따라서 HAp 결정이 (002) 방향으로 성장하는 것임을 추정할 수 있다.

실험에서 전자회절도형을 보았을 때 HAp를 기반으로 한 hkl 면의 d-spacing 값이 실제로 측정한 값과 미세한 차이를 보였는데 이는 측정 오차 외에도 인체 내에 있는 HAp가 Ca, P, C, O, OH뿐만 아니라 치환 및 침입한 Si^{2+}와 Mg^{2+}이온과 같은 다른 인자들로 인하여 순수한 $P6_3/m$ 구조인 HAp의 면간거리 및 구조에 영향을 주었을 가능성도 있다.

콜라겐 섬유에 따른 HAp 결정의 성장방향 및 배열을 알

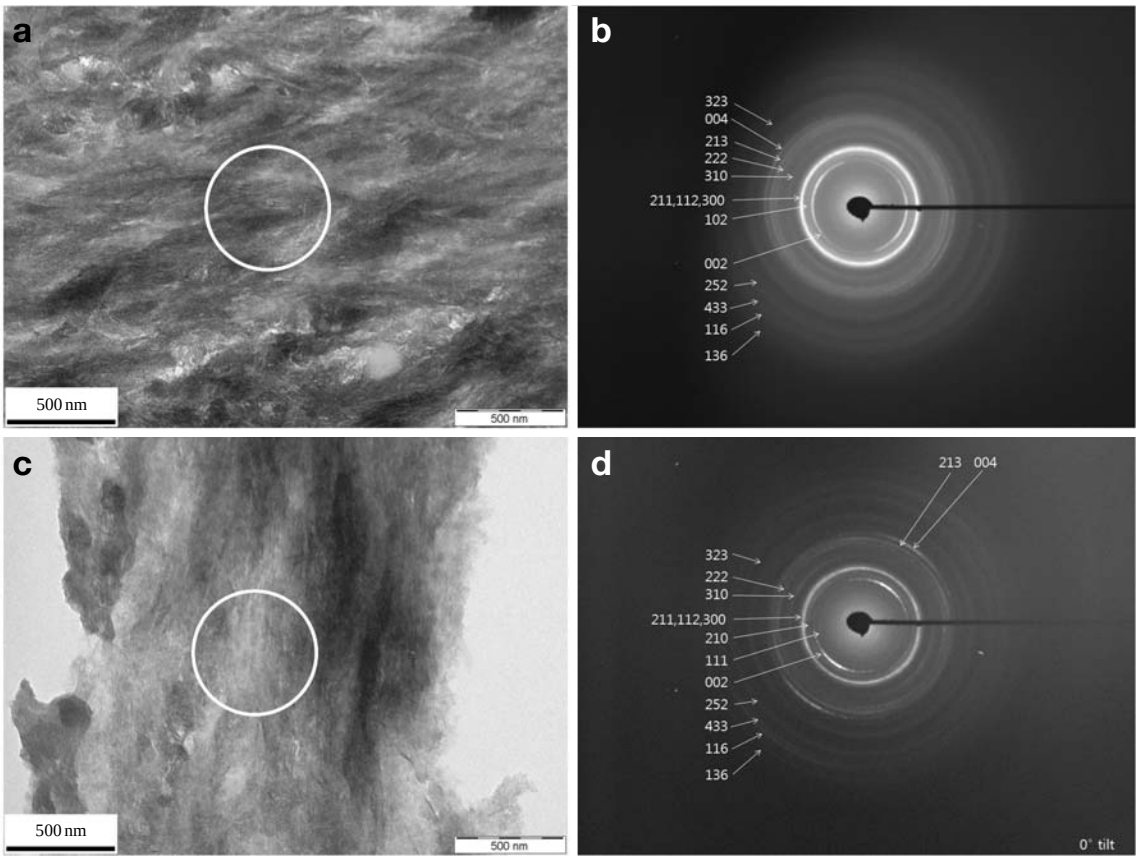


Fig. 5. Bright field TEM images and electron diffraction patterns from the UT samples: (a) and (b) rabbit femur; (c) and (d) chicken femur. Circles indicate the areas observed by the selected area aperture.

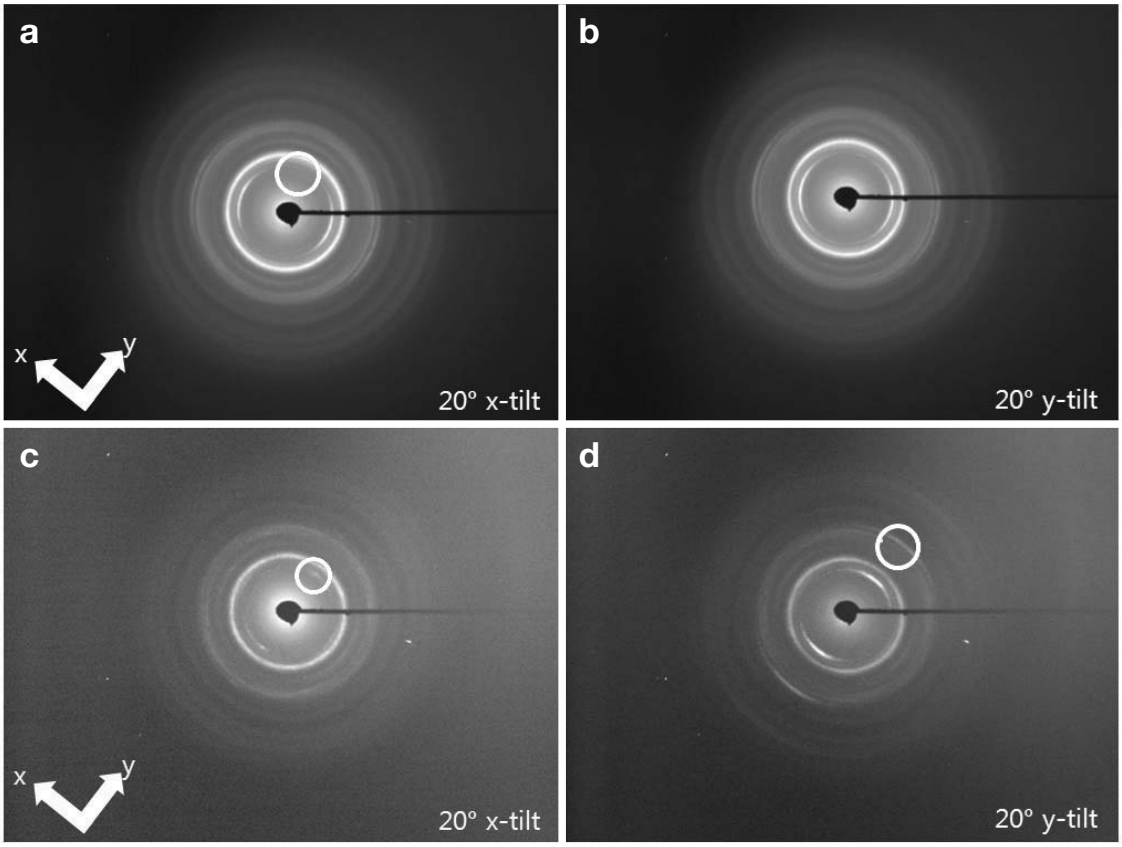


Fig. 6. Electron diffraction patterns obtained by tilting the sample along the x or y direction of EF-TEM: (a) and (b) rabbit femur; (c) and (d) chicken femur. Circles indicate major changes in electron diffraction patterns by the tilting experiments.

아보기 위해 Fig. 5의 동일한 부분에서 EF-TEM의 x, y tilting을 이용하여 전자회절도형을 관찰하였다. 토끼 대퇴골의 경우 Fig. 6(a)에서 x-tilting을 함에 따라 원 안의 (002)면이 0° tilting image에 비해 고리(ring) 형태에서 호(arc) 형태로 가까워지는 것을 확인할 수 있었고, Fig. 6(b)에서는 y-tilting을 함에 따라 전자회절도형이 크게 변화하지 않는 것을 확인할 수 있었다. x-tilting을 하였을 때에는 투과빔이 판상형태인 HAp 결정에 수직한 방향에 가까워짐에 따라 전자회절도형이 고리 형태에서 호 형태인 texture pattern에 가까워지는 것을 알 수 있었다. 또한 HAp 결정의 전자회절도형이 호 형태를 나타내는 것은 판상형태의 HAp 결정이 콜라겐을 따라서 성장하였지만 콜라겐이 뼈 전체에서 완전히 평행한 형태로 나열되어 있지 않았기 때문에 fibril axis를 기준으로 호 형태를 띠는 것이 Glimcher (2006)에 의해 설명되었다. y-tilting을 하였을 때에는 0° tilting일 때보다 c축 방향인 (002)면 방향이나 c축에 수직한 방향이 아닌 방향으로 tilting되어 회절강도에 특징을 보이지 않고 전체적으로 회절강도가 낮아진 것을 알 수 있다.

닭 대퇴골의 경우 Fig. 6(c)에서 보는 바와 같이 x 방향으로 tilting함에 따라 (002)면이 긴 호 형태에 가까웠던 전자회절도형이 원에서 보는 것과 같이 점(spot)형태에 가깝게 변화하였다. 이는 x 방향으로 tilting함에 따라 판상형태인 HAp 결정과 수직인 방향에 가까워졌기 때문에 점형태로 변화한 것을 알 수 있다. Fig. 6(c)와는 반대로 y 방향으로 tilting하게 되면 Fig. 6(d)에서 보는 것과 같이 투과빔과 평행한 방향에 가까워져서 (002)면과 (004)면을 나타내는 전자회절도형이 길게 변화하였다. 즉 Fig. 6의 data를 통하여 Fig. 5의 토끼 대퇴골과 닭 대퇴골이 x 방향으로 tilting하였을 때 정대축(zone axis)에 가장 가까운 texture pattern을 보이는 것을 알 수 있다.

Fig. 7에서는 Fig. 6에서의 빔 강도 자료를 그래프로 나타낸 것으로 tilting 각도와 방향에 따른 강도의 변화를 관찰할 수 있다. Tilting 각의 변화에 따른 강도의 변화는 주요 정상점인 (002), (211), (112), (300)에서 큰 변화를 관찰하기 용이하였고 상대적으로 강도가 낮은 (323), (252), (433), (116)면에서는 tilting 각도의 변화에 따른 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 토끼 대퇴골은 x 방향으로 tilting함에 따라 (211), (112), (300)면의 정상점 강도 변화가 두드러지고, y 방향으로 tilting하면서 큰 변화가 관찰되지 않았다. 이는 0° tilting에서의 이미지인 Fig. 5(a)에서 (211), (112), (300)면이 콜라

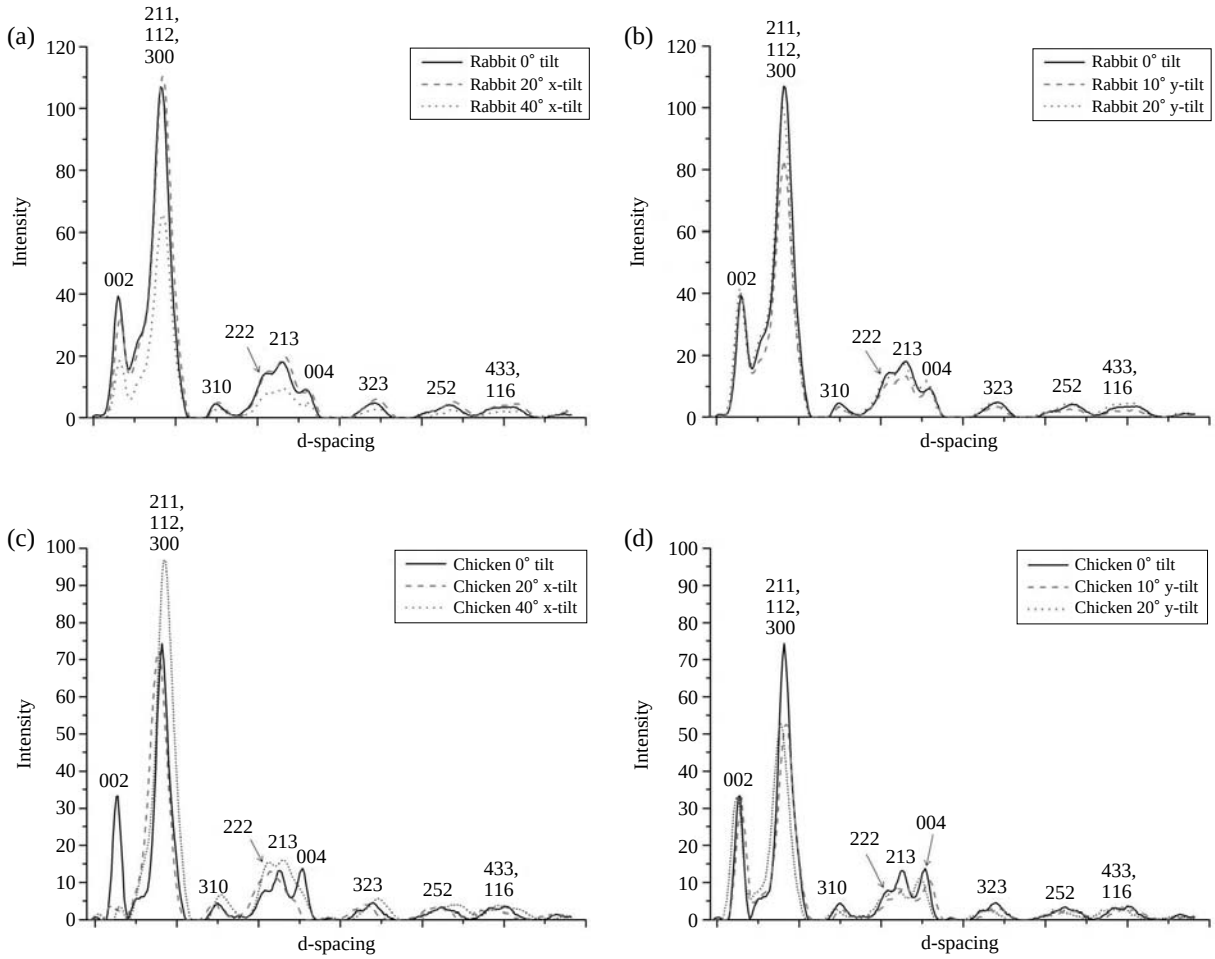


Fig. 7. Intensity profiles of electron diffraction patterns; (a) and (b) rabbit femur; (c) and (d) chicken femur. (a) and (c) graphs are results of the x-tilting; (b) and (d) graphs are results of the y-tilting.

겐 섬유의 배열에 따라서 HAp가 성장하였고 판상형태의 결정임에도 (002)면의 정상점이 비교적 넓은 형태로 분포되어 있어 호 형태가 고리 형태에 가깝게 나타나는 것을 알 수 있다. x 방향으로 tilting을 함에 따라 (211), (112), (300)의 정상점이 낮아지는 것은 투과빔의 입사각이 0° tilting일 때 정렬된 상태에서 변화하여 강도가 낮아진 것으로 사료된다. 닭 대퇴골의 경우 x 방향으로 tilting하게 되면 (002)면의 강도가 급격히 낮아지고 y 방향으로 tilting하게 되면 (211), (112), (300)면의 강도가 낮아지는 것을 확인할 수 있다. 이는 x 방향을 따라 (002)면이 형성되었고 x-tilting을 함으로써 투과빔의 입사각이 변화하여 그 강도가 약해지는 것을 알 수 있다. Fig. 7의 그래프는 전자회절도형의 중심에서 동일한 거리에 있는 전자회절도형들의 평균값을 나타내기 때문에 닭 대퇴골에서 x-tilting을 함에 따라 (002)면이 점형태로 변화하여 상대적 강도가 낮아진 것을 알 수 있다. 또한 y 방향에 따라 (211), (112), (300)면이 각각 성장하였고 y-tilting을 하면 강도가 약해지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 빔 강도의 분석을 통하여 콜라겐의 성장방향을 유추할 수 있으며 Fig. 5의 이미지에서 이 사실을 확인할 수 있었다.

결 론

뼈에 대한 연구는 오랫동안 계속되어 왔지만 순수 무기질 부분에 대해서는 아직까지도 많은 연구가 필요한 실정이다. 무기질에 대한 이해를 높이기 위해 실험을 진행하였으며 그 대상으로 토끼와 닭의 대퇴골을 이용하였다. 본 실험에서 광학현미경과 투과전자현미경을 이용하여 토끼와 닭 대퇴골의 구조적, 화학적 조성 차이를 알아보았다. 광학현미경을 이용한 결과를 보았을 때 세관 균열의 방향성 및 골원의 분포 차이를 쉽게 확인 할 수 있었지만 XRD, EDS, TEM을 이용한 명시야상 및 암시야상을 보았을 때 큰 차이를 찾아보기 힘들었다. 하지만 EDS 분석을 통하여 HAp 결정의 주요 구성성분인 Ca, P, O를 확인할 수 있었고, 미량의

Si가 검출된 것으로 토끼와 닭이 성장기에 있는 것을 알 수 있었다. UT 시편의 경우 뼈 내에서 콜라겐과 HAp의 상호 유기성과 각 배열을 확인하기 용이하였다. 또한 명시야상을 통해서 토끼와 닭 대퇴골에서 모두 콜라겐의 배열을 확인할 수 있었으며 콜라겐의 배열에 따른 HAp 결정의 성장방향 및 분포는 시료를 tilting하여 변화를 주고 같은 위치의 전자회절도형을 분석하여 유추할 수 있었다.

이번 연구로 토끼와 닭의 종간 무기질의 미세구조차이를 완전히 밝히긴 어려웠다. 하지만 뼈의 유기질과 무기질을 효과적으로 분리한 후 시편관찰이 가능하다면 뼈의 HAp에 대한 이해와 연구가 더욱 활발히 진행 될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Carlisle EM: Silicon: a possible factor in bone calcification. Science 167 : 279, 1970.

Glimcher MJ: Bone: Nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation. In: Nita S, ed, Review in Mineralogy & Geochemistry 64 : 223-282, 2006.

Gupta HS, Zioupos P: Fracture of bone tissue: The ‘hows’ and ‘whys’. Medical Engineering & Physics 30 : 1209-1226, 2008.

Landis WJ, Song MJ, Leith A, McEwen L, McEwen BF: Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. Journal of Structural Biology 110 : 39-54, 1993.

Liu ZQ, Austin T, Thomas CDL, Clement G: Bone feature analysis using image processing techniques. Computers in Biology and Medicine 26 : 65-76, 1996.

Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ, Douglas EP, Gower LB: Bone structure and formation: A new perspective. Material Science & Engineering R58 : 77-166, 2007.

Rensberger JM, Watabe M: Fine structure of bone in dinosaurs, birds and mammals. Nature 406 : 619-622, 2000.

Rho JY, Kuhn-spearing L, Zioupos P: Mechnical properties and the hierarchical structure of bone. Medical Engineering & Physics 20 : 92-102, 1998.

Robinson RA: An electron microscopy study of the crystalline inorganic components of bone and its relationship to the organic matrix. Journal of Bone and Joint Surgery 34A : 389-434, 1952.

Rubin MA, Rubine J, Jasiuk I: SEM and TEM study of the hierarchical structure of C57BL/6J and C3H/HeJ mice trabecular bone. Bone 35 : 11-20, 2004.

＜국문초록＞

뼈는 단계별 (hierarchical) 구조를 가진 복합 재료이며 독특한 구조와 기계적 특성 때문에 재료공학 분야에서 많이 연구되어져 왔다. 뼈는 주로 hydroxyapatite, 콜라겐과 물로 구성된 층판형 유・무기 재료 복합체이다. 주요 무기물로써 hydroxyapatite로 잘 알려진 calcium phosphate를 통하여 뼈는 특유의 강도를 유지하게 된다. 본 실험에서는 광학 현미경 (LM)과 투과전자현미경 (TEM)을 이용하여 토끼와 닭 대퇴골의 구조를 연구하였다. 구성물질 분석은 대퇴골의 calcium, potassium, oxygen 분포 변화를 알아보는데 이용하였다. 실험은 두 구조 범위에 중점을 두었다: micro scale에서 치밀골의 배열을, nano scale에서 콜라겐 섬유와 apatite 결정을 관찰하였다. Micro scale에서 닭과 토끼 대퇴골 구조의 뚜렷한 차이점이 발견되었다. Nano scale에서는 apatite 결정의 모양과 크기 그리고 콜라겐의 배열을 비교 분석하였다. 그 결과 토끼와 닭은 종이 다름에도 불구하고 nano scale에서는 화학성분과 구조가 매우 유사한 것으로 나타났다.