

투영기반 마이크로 광조형 기술을 이용한 3 차원 인산칼슘 인공지지체 제작 및 골 분화 영향§

설영준* · 박주영* · 조동우*,**†

* 포항공과대학교 기계공학과 쾌속조형기반장기프린팅연구단, ** 포항공과대학교 융합생명공학부

Fabrication of Calcium Phosphate Scaffolds Using Projection-based Microstereolithography and Their Effects on Osteogenesis

Young-Joon Seol*, Juyoung Park* and Dong-Woo Cho**,**†

* Dept. of Mechanical Engineering, Center for Rapid Prototyping Based 3D Tissue/Organ Printing, POSTECH

** Division of Integrative Biosciences and Biotechnology, POSTECH

(Received June 13, 2011 ; Revised August 10, 2011 ; Accepted August 13, 2011)

Key Words: Bone Tissue Regeneration(골 조직 재생), Calcium Phosphate(인산칼슘), Scaffold(인공지지체), Solid Freeform Fabrication(자유형상제작)

초록: 인산칼슘 재료는 하이드록시 아파타이트(Hydroxyapatite)와 트리칼슘 포스페이트(Tricalcium-phosphate)를 포함하고 있으며, 인체 골 조직의 무기성분으로 세포 독성이 없고 생체 적합한 성질을 가지고 골 전도성이 있다. 또한 두 재료가 혼합되어 있는 이상 인산칼슘(Biphasic calcium phosphate) 재료는 골 유도성이 있다고 알려져 있다. 이러한 골 조직 재생에 많은 장점을 가지고 있는 인산칼슘 재료는 파우더 타입으로, 3 차원 자유형상의 인공지지체를 제작하는 데 어려움이 있어 고분자 재료에 첨가하여 사용되었다. 본 연구에서는 자유형상 제작 기술을 이용하여 원하는 내/외부 형상을 가지는 3 차원 인산칼슘 인공지지체를 제작하고, 골 조직 재생용 인공지지체로의 사용이 적합한지를 확인하기 위해 MC3T3-E1 를 이용한 세포 증식, 골 조직 분화 실험을 수행하였다.

Abstract: Calcium phosphates are very interesting materials for use as scaffolds for bone tissue engineering. These materials include hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP), which are inorganic components of human bone tissue and are both biocompatible and osteoconductive. Although these materials have excellent properties for use as bone scaffolds, many researchers have used these materials as additives to synthetic polymer scaffolds for bone tissue regeneration, because they are difficult to manufacture three-dimensional (3D) scaffolds. In this study, we fabricated 3D calcium phosphate scaffolds with the desired inner and outer architectures using solid freeform fabrication technology. To fabricate the scaffold, the sintering behavior was evaluated for various sintering temperatures and slurry concentrations. After the fabrication of the calcium phosphate scaffolds, in-vitro cell proliferation and osteogenic differentiation tests were carried out.

1. 서 론

조직 공학을 이용하여 조직을 재생하기 위한 주요 3 요소는 세포, 인공지지체, 성장 인자이다. 이중 인공지지체는 세포가 조직으로 성장하는 동안

세포 성장에 적합한 공간을 제공해 주고, 조직 재생 속도에 맞춰 생분해 되어야 하며, 목적 조직에 맞는 충분한 기계적 강도를 가지고 있어야 한다.^(1,2) 많은 연구자들은 다양한 생체 적합성 재료를 이용하여 조직의 특성에 맞는 인공지지체 제작을 위한 연구를 수행하고 있다.⁽²⁻⁴⁾

특히 골 조직 재생을 위한 3 차원 인공지지체 제작을 위해 천연 고분자, 합성 고분자 및 인산칼슘 재료가 많이 사용되고 있다. 이 중, 인산칼슘 재료는 하이드록시 아파타이트(Hydroxyapatite-HA)와 트리칼슘 포스페이트(Tricalcium phosphate-TCP)

§ 이 논문은 2011 년도 대한기계학회 바이오공학부문 춘계 학술대회(2011. 4. 28.-30., 포항공대) 발표논문임

† Corresponding Author, dwcho@postech.ac.kr

© 2011 The Korean Society of Mechanical Engineers

를 포함하고 있으며, 골 조직을 구성하는 무기성분이 다. 인산칼슘 재료는 생체 적합성(Biocompatibility), 골 전도성(Osteoconductivity), 생분해성(Biodegradability)을 가지고 있어 골 조직 재생을 위한 인공지지체 재료로 적합하다. 또한 HA 와 TCP 중 TCP 가 빠른 분해 속도를 가지며, 분해되면 Ca^{2+} 와 PO_4^{3-} 이온을 방출한다. 이때 Ca^{2+} 이온이 골 조직 분화를 활성화 시키는 역할을 하기 때문에, 위 인산칼슘 재료는 골 유도성이 있다고 알려져 있다.⁽⁵⁻⁷⁾

한편, 골 조직 재생을 위한 많은 장점을 가지고 있는 인산칼슘 재료는 파우더 타입으로 이루어져 있어 이 재료를 직접 이용하여 3 차원 인공지지체를 제작하기에 많은 어려움이 따른다. 따라서 현재까지 개발된 인산칼슘 인공지지체는 gravity sintering, porogen leaching, freeze casting 과 같은 제작 방법을 이용하였고, 이 방법을 이용하여 제작된 인공지지체는 내부 공극의 연결성이 떨어지며, 원하는 내/외부 형상의 인공지지체를 제작하기 힘들다는 어려움이 있다.⁽⁸⁻¹⁰⁾ 따라서 골 조직 재생에 많은 장점을 가지고 있는 인산칼슘 재료를 자유형상 제작 기술(Solid Freeform Fabrication technology)로 제작한 인공지지체에 사용하기 위해 많은 연구자들은 PCL, PLGA 와 같은 고분자에 인산칼슘 파우더를 첨가하여 인공지지체를 제작하거나, 제작된 인공지지체의 표면을 인산칼슘으로 코팅하는 방법을 사용하였다.⁽¹¹⁻¹³⁾

본 연구에서는 인산칼슘 재료와 자유형상 제작 기술을 이용하여 자유형상의 3 차원 인산칼슘 인공지지체를 제작하였다. 또한 HA 와 TCP 재료의 혼합으로 인한 골 조직 분화의 영향을 확인하기 위해 HA, TCP, HA/TCP 재료를 이용하여 인공지지체를 제작하고 세포 증식 및 골 조직 분화를 확인하였다.

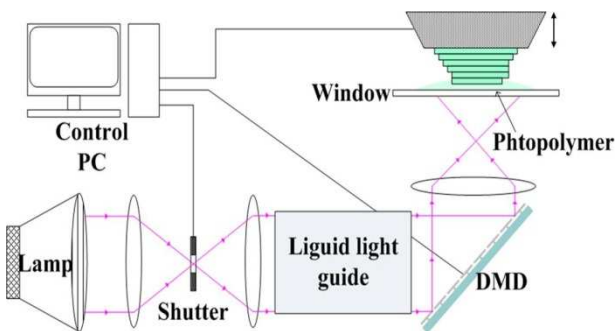


Fig. 1 Schematic diagram of projection based micro-stereolithography system

2. 재료 및 방법

2.1 투영기반 마이크로 광조형 시스템

골 조직 재생을 위한 인공지지체를 제작하기 위해 자유형상 제작 기술 중 하나인 투영기반 마이크로 광조형 시스템(Projection based Micro-stereolithography)을 이용하였다. Fig. 1 은 본 연구팀에 의해 구축된 투영기반 마이크로 광조형 시스템의 개략도이다. UV(Ultra Violet) 램프와 광학계를 이용하여 350~380 nm 파장의 UV 광원을 DMD(Digital Micromirror Device) 전달하며, DMD 를 통해 한번의 조사로 2 차원 단면 형상을 제작할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 규제액면 (constraint surface) 방식을 적용하여 층 두께를 일정하게 제어할 수 있으며, 3 차원 구조체를 제작하기 위해 사용하는 광경화 수지의 양을 절약할 수 있다는 장점도 가지고 있다. 본 시스템은 빔프로젝터에 있는 DMD 모듈과 광학계를 사용하였고, 광원인 UV 램프에서 DMD 까지 UV 빛의 전달을 UV light guide 를 이용하여 초기 셋팅을 위해 소비되는 시간을 절약할 수 있다.

2.2 세라믹 슬러리

투영기반 마이크로 광조형 시스템을 이용하여 3 차원 구조체를 제작하기 위한 재료는 광경화 특성을 가지고 있어야 한다. 광경화 특성을 가지고 있지 않은 인산칼슘 재료를 이용하여 3 차원 인공지지체를 제작을 위해 인산칼슘 파우더(Hydroxyapatite, Tricalcium phosphate, Berkeley Advanced Biomaterials Inc.)를 광경화 수지(FA1260T, SK Cytec Inc.)와 혼합하여 인산칼슘 슬러리(slurry)를 준비하였다. 인산칼슘 슬러리는 인산칼슘과 광경화 수지를 부피 비율 (10~20%, v/v)로 혼합하였고, 균일하게 혼합된 인산칼슘 슬러리를 얻기 위해 교반기(stirrer)를 이용하여 24 시간 이상 혼합을 하였다.

2.3 인산칼슘 인공지지체 제작

3 차원 인산칼슘 인공지지체 제작을 위해 다음과 같은 공정을 이용하였다(Fig. 2). 준비된 인산칼슘 슬러리와 투영기반 마이크로 광조형 시스템을 이용하여 인공지지체 형상의 3 차원 구조체를 제작하였다. 이때 제작된 구조체는 인산칼슘 파우더와 광경화 수지가 혼합된 상태로, 광경화 수지의 결합으로 3 차원 형상을 유지하고 있다. 광경화 수지를 제거하고 인산칼슘 파우더끼리의 결합을 유도하여 인산칼슘으로 이루어진 인공지지체 제작

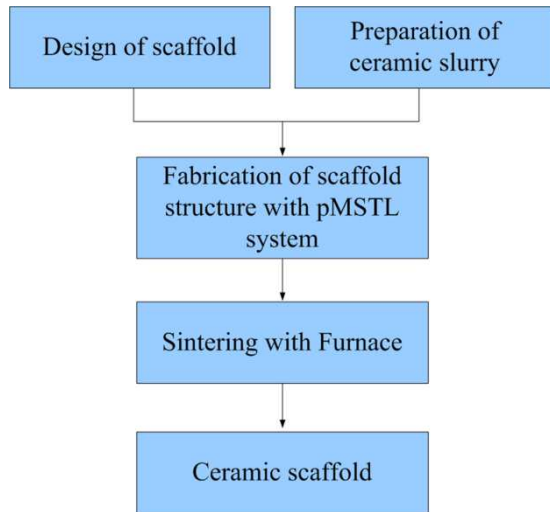


Fig. 2 Fabrication procedure of calcium phosphate scaffold

을 위해 소결로(Furnace, Lenton)를 이용하여 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 가열하였다. 1000°C 이상의 소결 최고 온도로 올라가는 과정에서 광경화 수지는 제거되고, 인산칼슘 파우더는 서로 결합되며 성장하게 된다. 최고 온도가 도달하였을 때 2 시간의 유지 시간을 주어 인산칼슘 파우더의 소결이 충분히 이루어지도록 하였다

2.4 수축률 테스트

3 차원 인산칼슘 인공지지체를 제작하기 위해 소결 공정을 이용하게 된다. 이때 광경화 수지가 제거되고 인산칼슘 파우더의 접합 및 성장으로 인해 수축이 일어나게 된다. 이러한 인공지지체 제작 공정에서 발생하는 수축이 등방성을 가지고 있지 않으면 원하는 3 차원 형상 제작에 많은 어려움이 따르게 된다. 이를 확인하기 위해 10, 20% 하이드록시 아파타이트 슬러리를 이용하여 간단한 형상의 인산칼슘 구조체를 제작하여 모든 방향의 수축률을 확인하였다.

$$\text{Linear shrinkage} = \frac{L_0 - L_1}{L_0} = \frac{D_0 - D_1}{D_0} \quad (1)$$

이때 선형 수축률을 이용하였고, 수식 (1)에서 L_0, D_0 는 소결 전 초기 구조체의 길이 및 지름, L_1, D_1 은 소결 후 제작된 구조체의 길이 및 지름을 나타낸다. 이를 이용하여 인산칼슘의 농도와 소결 공정의 최고 온도에 따른 수축률 변화를 확인하였다.

2.5 인산칼슘 재료에 따른 세포 증식 평가

제작된 인산 칼슘 인공지지체를 이용하여 인산칼슘의 재료에 따른 세포의 증식 영향을 확인하기

위한 실험을 수행하였다. 인산칼슘 인공지지체는 HA, TCP, HA/TCP (7:3 wt) 세 종류 20% 인산칼슘 슬러리를 사용하여 제작하였다. 세포는 mouse 두 개골에서 유래한 osteoblast like cell 인 MC3T3-E1(Riken cell bank, Japan)을 이용하였다. 세포 증식 평가를 위한 충분한 양의 세포를 확보하기 위해 2~3 일마다 세포 배양액 α -MEM(+10% FBS, 5% penicillin-streptomycin)을 교환하며, 5% CO_2 환경에서 세포를 배양하였다. 충분한 양의 세포가 준비된 후, 준비된 인공지지체에 세포(5×10^4 cells/scaffold)를 식종하였고, 2~3 일에 한번씩 세포 배양액을 교환하였다. 7 일 동안 배양을 하며 1, 4, 7 일에 인공지지체에서 증식된 세포에서 DNA 를 추출하여 DNA 정량을 수행하였고, 이를 통해 세포 증식을 확인하였다.

2.6 인산칼슘 재료에 따른 세포의 골 조직 분화 평가

인산칼슘 재료의 골 유도성을 확인하기 위해 HA, TCP, HA/TCP 으로 제작된 인공지지체와 MC3T3-E1 세포를 이용하여 골 조직 분화 실험을 수행하였다. 각 인공지지체에 세포(5×10^4 cells/scaffold)를 식종하고, 14 일 동안 세포 배양액과 골 조직 분화 배양액(α -MEM+ascorbic acid(50ug/ml), β -glycerophosphate (10mM), Dexamethasone(10nM)) 환경에서 배양을 하였다. 14 일 후 배양된 세포에서 RNA 를 추출하여 real time PCR(Polymerase chain reaction)을 수행하였으며, 골 조직으로 분화할 때 발현되는 대표적인 gene 중, ALP(Alkaline phosphatase), OCN (Osteocalcin), Runx2 (Runt-related transcription factor 2)를 확인하였다.

2.7 통계학적 분석

MC3T3-E1 세포를 이용한 인산칼슘 인공지지체에서의 증식 및 골 조직분화 실험 결과에서 인공지지체의 재료에 따른 세포의 증식과 분화의 차이를 비교 분석하기 위해 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)를 이용하였고, Tukey test 를 이용하여 사후 검증하였다. 통계학적 분석을 위해 각 실험군별로 3 개(N) 샘플을 이용하였고, 유의 수준은 95% 로 설정하였다.

3. 결 과

투영기반 마이크로 광 조형 시스템과 인산칼슘 슬러리를 이용하여 3 차원 구조체를 제작하였다. 소결공정을 통한 인산칼슘 구조체를 제작하기 위해 다양한 온도에서 소결하였으며 1000°C 이상

의 온도에서 3 차원 인산칼슘 구조체를 제작할 수 있음을 확인하였다. 다양한 형상의 구조체를 이용하여 수축률을 확인해본 결과 같은 조건(슬러리의 인산칼슘 비율, 소결 온도)에서 모든 방향의 수축이 일정하게 발생하였다(Fig. 3).

본 연구에서 제시한 인산칼슘 인공지지체 제작 공정을 이용하여 3 차원 인공지지체를 제작하였다. 또한 슬러리에 포함된 인산칼슘 파우더의 비율이 높으면 수축률은 낮아지고, 소결 온도가 높으면 수축률이 높아지는 것을 확인하였다(Fig. 4). 20%의 인산칼슘 슬러리를 이용하여 1400 °C 온도로 소결을 하였을 경우 가장 높은 수축률을 보였고, 이는 다른 조건에서 제작된 인산칼슘 구조체와 비교할 때, 인산칼슘 파우더의 결합 및 파우더 성장이 많이 일어나 구조체의 밀도가 높음을 유추할 수 있다.

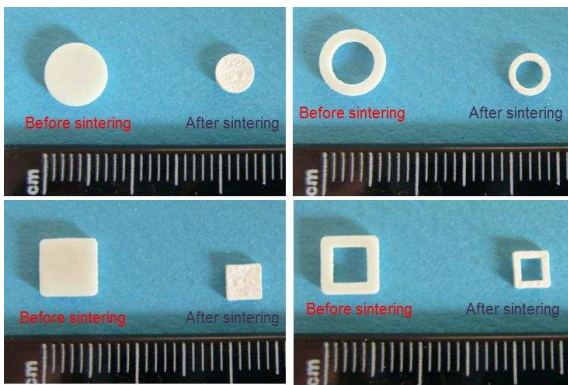


Fig. 3 Images of simple shape structures: (left) structure before sintering, (right) structure after sintering

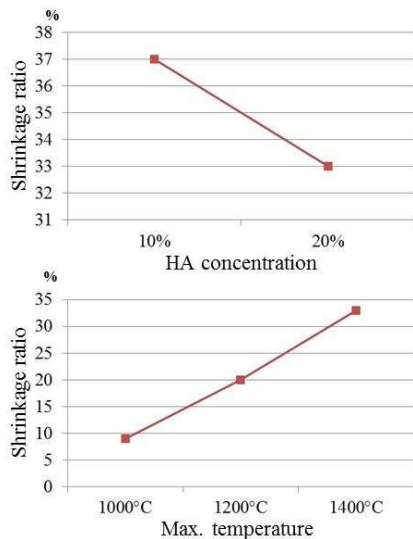


Fig. 4 Shrinkage ratio of calcium phosphate structure: (a) according to different HA concentration in slurry at 1400°C, (b) according to different maximum sintering temperature using 20% slurry

Fig. 5 는 20% 인산칼슘 슬러리와 1400 °C 의 소결 온도 조건을 이용하여 제작한 3 차원 인공지지체를 보여준다. 모든 방향으로 공극이 연결되어 있고 선폭 및 공극의 크기는 약 250 μm 임을 확인하였다. 제작된 인공지지체는 소결 전과 비교하여 약 34%의 수축률을 보였고 이는 수축률 테스트 결과에서 보인 20vol% 인산칼슘 파우더 농도, 1400 °C 의 소결 온도 조건에서 제작한 구조체의 수축률과 동일함을 확인하였다.

Fig. 6 은 7 일 동안 3 차원 인산칼슘 인공지지체에서 MC3T3-E1 세포의 증식 결과를 보여주는 그래프이다. 각각의 HA, TCP, HA/TCP 로 제작된 인공지지체 환경에서 초기 세포 부착률과 증식률을 확인한 결과, 세 종류의 인공지지체에서 비슷한 세포 부착률을 보였다. 이후 7 일 동안 세포 증식을 보면 HA 인공지지체에서 증식률이 가장 높게 나왔고, TCP 인공지지체와 HA/TCP 인공지지체는 비슷한 수준의 세포 증식을 보였다. 각 인공지지체에서의 1, 4, 7 일 세포 증식을 확인하면, HA 와 HA/TCP 인공지지체에서 꾸준한 증식을 보인 반면, TCP 인공지지체에서는 1 일에서 4 일 까지는 증식을 보였으나 4 일에서 7 일로 진행되는 과정에서 세포 증식의 큰 차이를 보이지 않았다.

세포의 증식 결과에서는 HA 인공지지체에서 가장 좋은 결과를 얻었지만, 14 일 동안의 골 분화 결과에서 HA 인공지지체에서의 골 분화가 다른 TCP, HA/TCP 인공지지체에서의 골 분화보다 낮은 수준으로 일어남을 확인할 수 있다. 일반 세포 배양액 환경에서는 골 조직 분화 gene 인 ALP, OCN

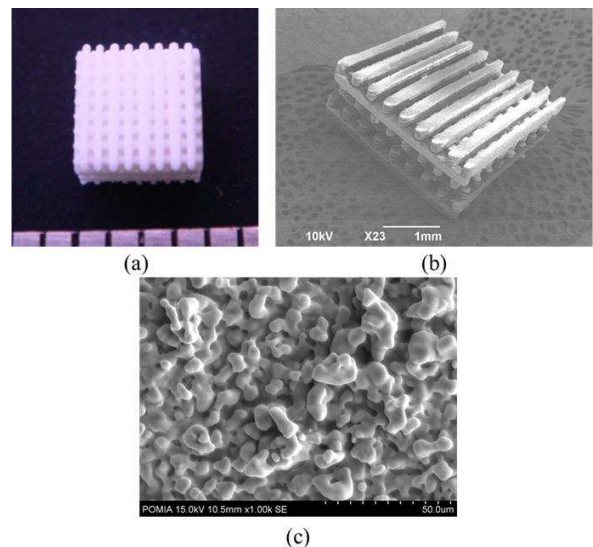


Fig. 5 Images of fabricated calcium phosphate scaffold ((a) and (b)) and surface of fabricated scaffold ((c))

이 TCP > HA > HA/TCP 순으로 발현됨을 확인할 수 있었으며, Runx2 의 경우 HA > TCP > HA/TCP 순으로 발현됨을 확인하였다(Fig. 7). 골 조직 분화 배양액 환경에서는 TCP ≈ HA/TCP > HA 순으로 ALP, OCN 발현을 보였고, Runx2 의 경우 HA/TCP > TCP > HA 순으로 발현되었다(Fig. 8).

4. 토의 및 결론

인산칼슘 재료와 자유형상 제작 기술을 이용하여 원하는 형상의 3 차원 인산칼슘 인공지지체를 제작하였다. 본 연구에서 제시한 인산칼슘 인공지지체 제작 기술을 이용하면, 원하는 공극의 크기 및 선폭, 100%의 내부 공극 연결성을 가지며, 결손 된 환자의 골 조직 형상에 맞는 맞춤형 인공지지체 제작이 가능하다. 또한 수축률 테스트 결과에서 소결 온도가 높을수록 수축률이 높음을 알 수 있었다. 소결은 파우더의 표면 에너지가 줄어드는 방향으로 일어나며, 이때 파우더끼리 결합되어 표면적이 줄어들게 된다. 즉, 파우더 사이에 생기는 공극의 크기가 줄어들고 인산칼슘 구조체의 상대 밀도는 높아지는 방향으로 소결이 되기 때문에, 수축률이 높다는 것은 소결이 많이 진행되었음을 의미한다.

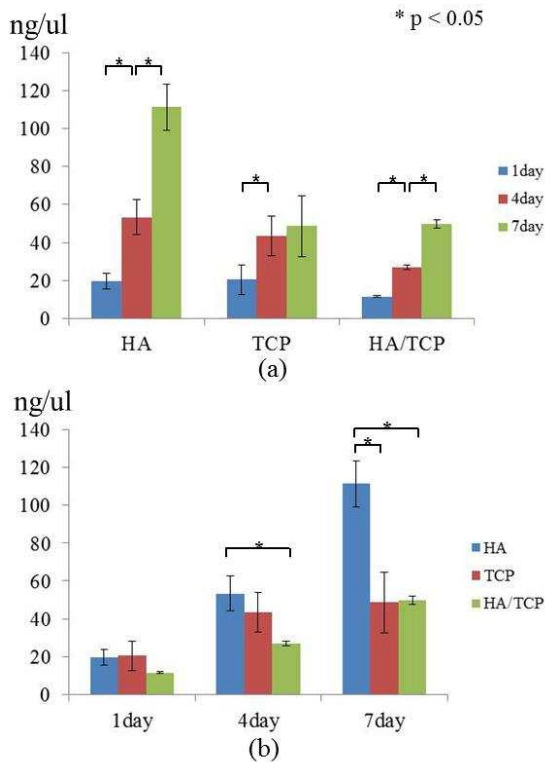


Fig. 6 Cell proliferation result: (a) according to scaffold materials, (b) according to evaluation time

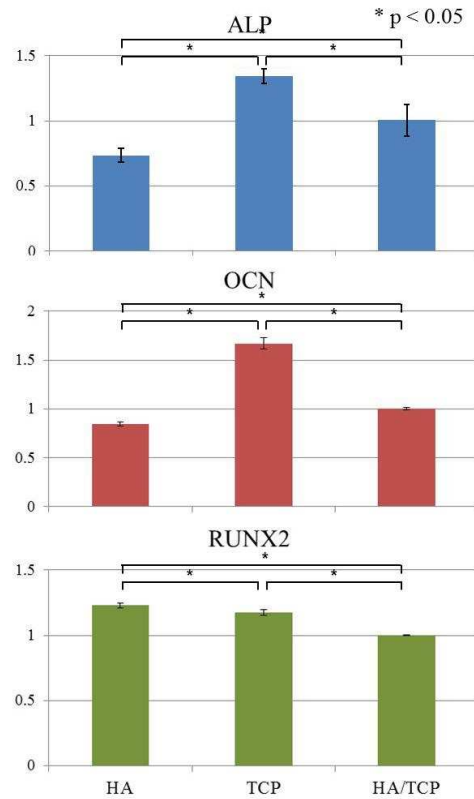


Fig. 7 Real time PCR result under normal medium condition for 14 days

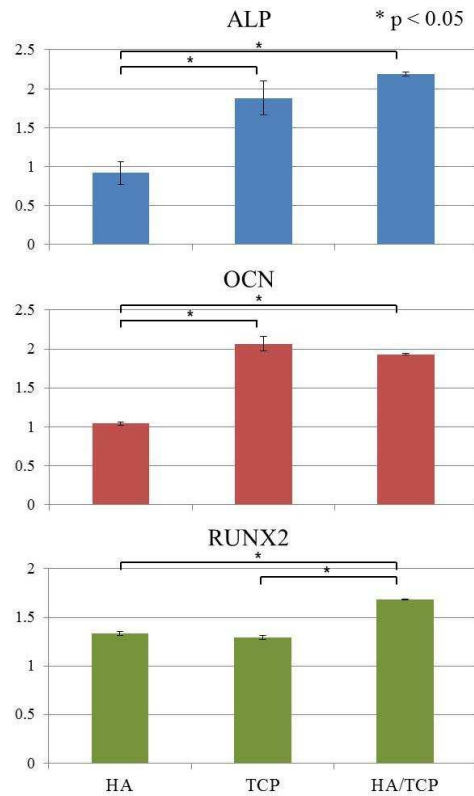


Fig. 8 Real time PCR result under osteogenic medium condition for 14 days

이를 통해 20% HA 슬러리를 이용하여 1400°C 조건에서 제작한 인공지지체의 기계적 특성이 다른 조건에서 제작한 인공지지체 보다 우수할 것이라고 예측할 수 있다. 또한 SEM(Scanning Electron Microscopy) 사진을 통하여 인산칼슘 인공지지체의 표면을 관찰하여 보면 파우더의 영향으로 표면 거칠기가 있어 세포 식종 시 세포 부착률을 향상할 수 있음을 예상할 수 있다.

본 연구에서 사용한 HA, TCP 인산칼슘 재료는 큰 생분해 속도 차이를 보인다. TCP 가 HA 보다 빠른 생분해 속도를 가지고 있다. 이러한 인산칼슘 재료는 생분해 되면서 Ca^{2+} , PO_4^{3-} 이온이 방출되며, 이중 Ca^{2+} 이온의 영향으로 일반 배양액 환경에서는 Ca^{2+} 의 농도가 높은 TCP 인공지지체의 골 분화 정도가 높게 나왔다. 하지만 골 분화 배양액 환경에서는 Ca^{2+} 농도뿐 아니라, 배양액에 포함되어 있는 골 분화 유도 물질이 복합적으로 영향을 주게 된다. 이러한 골 분화 배양액 환경은 생체 내 골 결손 부위의 환경으로 생각할 수 있으며, HA/TCP 인공지지체가 생체 내 골 조직 재생에 더욱 효과적이라고 예상할 수 있다.

본 연구를 통해 골 조직 재생을 위해 인산 칼슘 파우더를 이용하여 원하는 형상의 3 차원 인산 칼슘 인공지지체를 제작할 수 있었으며, TCP 를 포함한 인산칼슘 인공지지체가 골 조직 재생에 효과적인 것을 확인하였다. 인산 칼슘 인공지지체에서 방출되는 Ca^{2+} 이온의 영향을 확실하게 확인하기 위해 세포가 없는 일반 배양액 환경에서 인공지지체에서 방출되는 Ca^{2+} 이온 양을 측정하는 실험 및 *in vivo* 환경에서 골 조직 재생을 확인하기 위해 rat calvaria 모델을 이용한 동물 실험을 수행할 것이다.

후 기

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MEST) (No. 2010-0018294) and the World Class University (WCU) program through the National Research Foundation of Korea funded by the Ministry of Education, Science and Technology (R31-2008-000-10105-0 or R31-10105).

참고문헌

(1) Hutmacher, D. W., 2000, "Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage," *Biomaterials*, Vol. 21, pp. 2529~2543.

- (2) Lan, P. X., J Lee, W., Seol, Y.-J. and Cho, D.-W., 2009, "Development of 3D PPF/DEF Scaffolds Using Micro-Stereolithography and Surface Modification," *J Mater Sci: Mater Med*, Vol. 20, pp. 271~279.
- (3) Ifkovits, J. L. and Burdick, J. A., 2007, "Review: Photopolymerizable Biomaterials for Tissue Engineering Applications," *Tissue Engineering*, Vol. 13, No. 10, pp. 2369~2385.
- (4) Schieker, M., Seitz, H., Drosse, I., Seitz, S. and Mutschler, W., 2006, "Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering," *European Journal of Trauma*, Vol. 32, No. 2, pp. 114~124.
- (5) Lu, J., Descamps, M., Dejoui, J., Koubi, G., Hardouin, P., Lemaître, J. and Proust, J.-P., 2002, "The Biodegradation Mechanism of Calcium Phosphate Biomaterials in Bone," *J Biomed Mater Res*, Vol. 63, No. 4, pp. 408~412.
- (6) Jung, G.-Y., Park, Y.-J. and J Han, -S., 2010, "Effects of HA Released Calcium Ion on Osteoblast Differentiation," *J Mater Sci: Mater Med*, Vol. 21, pp. 1649~1654.
- (7) Zayzafoon, M., 2006, "Calcium/Calmodulin Signaling Controls Osteoblast Growth and Differentiation," *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 97, pp. 56~70.
- (8) Kandel, R.A., Grynopas, M., Pilliar, R., Lee, J., Wang, J., Waldman, S., Zalzal, P., Hurtig, M. and CIHR-Bioengineering of Skeletal Tissue Team, and Han, J.-S., 2006, "Repair of Osteochondral Defects with Biphasic Cartilage-Calcium Polyphosphate Constructs in a Sheep Model," *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 4120~4131.
- (9) Barralet, J.E., Grover, L., Gaunt, T., Wright, A.J. and Gibson, I.R., 2002, "Preparation of Macroporous Calcium Phosphate Cement Tissue Engineering Scaffold," *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 3063~3072.
- (10) Deville, S., Saiz, E. and Tomsia, A. P., 2006, "Freeze Casting of Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 5480~5489.
- (11) Kim, S.-S., Park, M. S., Jeon, O., Choi, C. Y. and Kim, B.-S., 2006, "Poly(lactide-co-glycolide)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 1399~1409.
- (12) Rezwani, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J. and Boccaccini, A. R., 2006, "Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/Inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering," *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 3413~3431.
- (13) Zhang, Y. and Zhang, M., 2000, "Synthesis and Characterization of Macroporous Chitosan/Calcium Phosphate Composite Scaffolds for Tissue Engineering," *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 55, pp. 304~312.