

## 참치뼈로부터 제조한 Hydroxyapatite 소결체의 랫드에 대한 급성피하독성시험

김세권\* · 박표잠 · 김용태<sup>1</sup>

부경대학교 화학과  
<sup>1</sup>오클라호마 의학연구소

### Study on Acute Subcutaneous Toxicity of Hydroxyapatite Sinter Produced from Tuna Bone in Sprague-Dawley Rats

Se-Kwon Kim\*, Pyo-Jam Park and Yong-Tae Kim<sup>1</sup>

Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea  
<sup>1</sup>Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma, Ok 73104, USA

#### Abstract

This study was performed to evaluate the acute subcutaneous toxicity of hydroxyapatite sinter produced from tuna bone in Sprague-Dawley (SD) rats. Hydroxyapatite sinter was administrated at dose levels of 5000, 2500, 1250, 625, 312.5 and 0 mg/kg. After single subcutaneous administration to both sexes of SD rats, we observed rats for 14 days. Hydroxyapatite sinter did not induce any toxic signs in mortalities, clinical findings, body weights and gross findings of the rats. In view of result, it was impossible to estimate LD<sub>50</sub> values in SD rats. In conclusion, these results suggest that hydroxyapatite sinter produced from tuna bone has no effect on acute subcutaneous toxicity in SD rats.

**Key words** – Acute subcutaneous toxicity, hydroxyapatite, tuna bone, Sprague-Dawley rat

#### 서 론

생체 이식재료 (bio-implant materials)는 신체기관의 노후화, 질병 및 교통사고 등으로 손상을 입은 신체기관의 기능을 대신하거나, 원래의 기능으로 수복할 수 있는 물질들을 총칭하는 것으로 최근 금속 및 인산 칼슘계 세라믹스인 hydroxyapatite가 치과용 치아, 정형외과용 뼈 등으로 사용이 가능할 것으로 기대되어 이들에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는 실정이다[1,6,10-13]. 그러나, 이들 재료 중에서 금속재료는 주위의 뼈보다 강도가 높고, 가공

성이나 복잡한 형상을 부여할 수 있는 장점은 있으나, 이를 고정시키는데 사용되는 시멘트와 금속이 생체의 세포 손상을 야기시키는 것으로 알려져 사용에 제한을 받고 있다[5]. 이에 반하여 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>로 구성된 아파타이트계 물질들은 손상된 인체 뼈를 수복시킬 수 있고, 이식재료와 생체세포간의 친화성이 좋아 뼈와 강한 화학적 결합을 할 수 있다는 사실이 밝혀지면서 이러한 아파타이트계의 물질들을 출발물질로 하여 생물학적인 친화성 및 인체 뼈의 강도와 유사한 인조 대응물로서 활용이 가능한 세라믹스를 제조하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[4]. 이러한 바이오세라믹스의 제조 방법은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 첫째는 현재 일반적으로 사용되고 있는 화학시약을 이용한 침전법, 가수분해법 및 수열합성법으로

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 82-51-620-6375, Fax : 82-51-628-8147  
E-mail : sknkim@mail.pknu.ac.kr

뼈의 생물학적 상 (phase)인 아파타이트를 제조하는 것이고, 물체는 천연소재로부터 바이오세라믹스의 출발물질을 얻는 것이다. 그러나, P와 Ca의 원소비율에 의해 화학적으로 합성하는 아파타이트보다 생선뼈와 같은 생물체로부터 추출한 hydroxyapatite가 P와 Ca의 주요 성분 이외에 Mg, K, Zn, Na 및 Fe 등과 같은 미량원소가 함유되어 있어 생체 친화성이 더 우수하다고 보고되어져 있다[3,12].

참치뼈로부터 천연 hydroxyapatite를 추출하고 이를 이용하여 건식법 및 습식법으로 hydroxyapatite 세라믹 복합체를 합성하여 그 특성을 검토한 결과, 이들의 결정상, 미세구조, 강도 및 인공체액에서의 생체 친화성 등에서 우수한 결과를 얻어 화학적으로 합성한 hydroxyapatite의 대체물질로 사용이 가능할 것으로 판단되었다[2,7-9,15].

따라서 본 연구에서는 참치뼈로부터 제조한 hydroxyapatite 소결체를 생체 이식재료로 활용하기 위한 기초연구의 일환으로 랫드에 대한 급성피하 독성효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

시험방법은 식품의약품안전본부의 의약품 등의 독성시험기준 (식품의약품 안전본부, 고시 제 96-8호)에 준하여 실시하였다.

### 재료

참치뼈는 (주)동원산업 (창원)의 수산가공 공장에서 참치의 어육가공 처리 후 남은 부산물을 구입하여 사용하였다.

### 시험물질의 제조

시험물질로 사용한 hydroxyapatite 소결체는 강도가 가장 우수한 것으로 Kim 등[8]의 방법에 따라 참치뼈를 1% NaOH 수용액에 첨가한 후 80℃에서 7시간 반응시켜 참치뼈에 포함되어 있는 유기물 등을 제거한 후, 2시간 흐르는 물에서 수세하여 건조하였다. 이를 850℃에서 3시간 하소 (calcination)하여 추출한 hydroxyapatite를 체가름 (200 mesh, 75 μm)하여 3일 동안 습식밀링 (wet milling)한 것을 사용하였다. 피하독성시험을 위한 시험물질은 실험당일 생리식염수 10 ml 당 5000 mg의 농도로 현탁시켜 121℃에서 20분간 멸균한 후 랫드의 체중 (kg) 당 5000, 2500, 1250, 625, 312.5 mg의 농도로 각각 멸균 처리된 생리식염수로 희석하여

사용하였다. 대조군은 주사용 생리식염수만을 주사하였다.

### 실험동물 및 사육조건

본 실험에 사용한 동물은 한국화학연구소 안전성 연구부 실험동물육종실 (대전)로부터 입수한 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 5~6주령의 암·수 각각 40마리를 입수한 후 1주일간 검역과 순화 사육을 거쳐 건강한 암·수 각각 30마리를 선별해 시험에 사용하였다. 본 실험은 온도 23±2℃, 상대습도 50±5%, 환기 회수 10~12 times/hr, 조명시간 12시간 및 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시하였다. 사료는 실험 동물용 고형사료 (삼양사료주식회사, 천안)를 사용하였으며, 물은 상수도수를 자유 섭취시켰다.

### 시험군의 구성

시험군의 구성은 Table 1과 같이 6~7주령의 암·수 각각 30마리의 동물을 군간 체중이 고르게 배치한 후, 대조군 및 hydroxyapatite 소결체 5개 용량군으로 군당 암·수 각각 5마리씩 분리하였다. 체중범위는 암컷은 체중이 130~160 g, 수컷은 150~180 g 정도였다.

### 주사방법 및 주사시간

Hydroxyapatite 소결체는 경구내 치아와 정형외과의 인조뼈로서 이식 가능하므로 임상적용 경로와 가까운 피하경로를 택하여 주사하였다. 주사액량은 hydroxyapatite가 랫드의 체중 (kg) 당 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 0 mg의 농도로 포함되게 주사용 생리식염수로 희석하여 10 ml가 되게 하였으며, 실험개시 시의 체중측정 결과에 따라 hydroxyapatite의 양을 산출하였다. 주사는 등배부의 일정부위에 1회 실시하였다.

### 일반상태 및 폐사의 관찰

주사 당일은 12시간까지 매시간 일반상태를 관찰하고, 주사 다음날부터 14일까지는 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성, 외관, 자율신경 및 사망동물의 유무를 주의 깊게 관찰하였다.

### 체중변화

투여직전과 투여 7일 후 및 부검직전인 14일에 3회 체중을 측정하였다.

Table 1. Mortality in SD rats treated with hydroxyapatite sinter produced from tuna bone

Sex	Dose (mg/kg)	Hours after treatment								Days after treatment										Final Mortality				
		1	2	3	4	5	6	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12	13	14	
M	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	312.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
F	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	312.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	Con.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

M, Male; F, Female.

부검

실험종료시 랫드는 에테르 마취로 방혈치사시킨 다음 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

사망한 동물에 대한 병리조직적 소견

사망한 동물에 대한 병리조직학적 소견은 모든 장기를 10% 중성포르말린액에 고정시킨 후 일반적인 파라핀 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 한 후 그 소견을 관찰하였다.

통계학적 분석

체중에 대한 유의성 검정법으로 one-way analysis of variance (ANOVA)에서 유의차가 인정되는 F값이 관찰될 때 대조군과 각 용량군과 비교하기 위하여 Dunnett's t-test를 실시하였으며, 발생병변의 빈도는 X<sup>2</sup> (chi-square) 검정을 하였다.

결과 및 고찰

Hydroxyapatite 소결체의 생체내 안전성 검토는 Sprague-Dawley 랫드를 대상으로 피하에 1회 주사한 후 14일간 관찰하는 식품의약품안전본부의 의약품 등의 독성시험기준 (식품의약품 안전본부, 고시 제 96-8호, 1996. 4. 16)에 준하

여 실시하였다.

암·수 각각 5마리씩의 랫드에 시험물질을 투여 가능한 최고용량인 체중 kg당 5,000 mg까지 투여하여도 모든 실험 동물군에서 사망한 예는 전혀 관찰되지 않았다 (Table 1).

실험 전기간을 통하여 hydroxyapatite 소결체를 주사한 랫드에서 특이한 임상증상은 전혀 관찰되지 않았으며 (Table 2), 체중변화 또한 실험 전기간을 통하여 주사한 각 랫드의 암·수 투여군 모두에서 대조군과의 유의성 있는 차이는 전혀 관찰되지 않았다 (Table 3).

한편, 생존동물의 부검에서 투여부위인 피하에 있어서 본 시험물질의 주사에 기인된 염증 소견 또는 이상 소견은 전혀 관찰되지 않았으며, 주사부위에 그대로 잔류하고 있었으며 주위 조직으로의 침식 및 흡수는 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 전혀 관찰되지 않았다. 또한, 생존동물의 부검에서 본 시험물질의 주사에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 병리조직학적 소견은 관찰되지 않았다 (Table 4, 5).

이들의 결과에서 알 수 있듯이, 참치뼈에서 제조한 hydroxyapatite 소결체에 대한 피하독성시험에서는 아무런 이상 증상을 발견하지 못하였다.

지금까지 hydroxyapatite는 생체내의 환경에서 생체를 구성하는 뼈의 성분과 비슷하여 생체이식재료 (bio-implant materials)로서 활용 가능성이 매우 높게 평가되어 많은 관심을 갖고 연구되고 있는데, Day와 Day[4] 및 Hench[5]는

Table 2. Clinical findings in SD rats treated with hydroxyapatite sinter produced from tuna bone

Sex	Dose (mg/kg)	Finding	Hours after treatment						Days after treatment														
			1	2	3	4	5	6	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
M	5,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2,500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	312.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	5,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2,500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	312.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

M, Male; F, Female; -, No abnormality detected; n=5.

Table 3. Changes of body weights in SD rats treated with hydroxyapatite sinter produced from tuna bone

Sex	Days after treatment	Dose (mg/kg B.W.)					
		5,000	2,500	1,250	625	312.5	0
M	0	157.34 ± 3.24	158.51 ± 2.68	156.78 ± 2.37	159.34 ± 2.59	158.62 ± 3.06	157.83 ± 2.88
	7	200.78 ± 3.54	198.62 ± 2.86	201.36 ± 2.85	198.57 ± 2.76	199.63 ± 3.25	198.62 ± 2.96
	14	247.65 ± 3.89	248.37 ± 2.90	249.68 ± 3.08	247.84 ± 3.49	247.59 ± 3.24	249.87 ± 3.32
F	0	138.75 ± 2.54	138.45 ± 2.76	140.70 ± 2.38	139.52 ± 2.67	139.81 ± 2.59	138.64 ± 3.04
	7	163.27 ± 3.76	162.54 ± 3.45	161.39 ± 2.98	161.74 ± 3.06	161.69 ± 3.23	163.16 ± 3.65
	14	178.56 ± 4.24	178.53 ± 3.88	178.49 ± 3.69	177.23 ± 3.52	179.74 ± 3.43	179.53 ± 3.97

M, Male; F, Female; n=5. Values are mean ± S.D.

All values in the same column are not significantly different at 5% level.

Table 4. Gross findings of necropsy in tissues of male SD rats treated with hydroxyapatite sinter produced from tuna bone

Organ	Dose (mg/kg B.W.)					
	5,000	2,500	1,250	625	312.5	0
Brain	-	-	-	-	-	-
Kidney (left)	-	-	-	-	-	-
Kidney (right)	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-
Lung	-	-	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	-	-
Liver	-	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-	-
Intestine	-	-	-	-	-	-
Pancreas	-	-	-	-	-	-
Adrenal gland (left)	-	-	-	-	-	-
Adrenal gland (right)	-	-	-	-	-	-
Pituitary gland	-	-	-	-	-	-
Testis (left)	-	-	-	-	-	-
Testis (right)	-	-	-	-	-	-
Other organs	-	-	-	-	-	-

-, not observed; n=5.

Table 5. Gross findings of necropsy in tissues of female SD rats treated with hydroxyapatite sinter produced from tuna bone

Organ	Dose (mg/kg B.W.)					
	5,000	2,500	1,250	625	312.5	0
Brain	-	-	-	-	-	-
Kidney (left)	-	-	-	-	-	-
Kidney (right)	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-
Lung	-	-	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	-	-
Liver	-	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-	-
Intestine	-	-	-	-	-	-
Pancreas	-	-	-	-	-	-
Adrenal gland (left)	-	-	-	-	-	-
Adrenal gland (right)	-	-	-	-	-	-
Pituitary gland	-	-	-	-	-	-
Ovary (left)	-	-	-	-	-	-
Ovary (right)	-	-	-	-	-	-
Other organs	-	-	-	-	-	-

-, not observed; n=5.

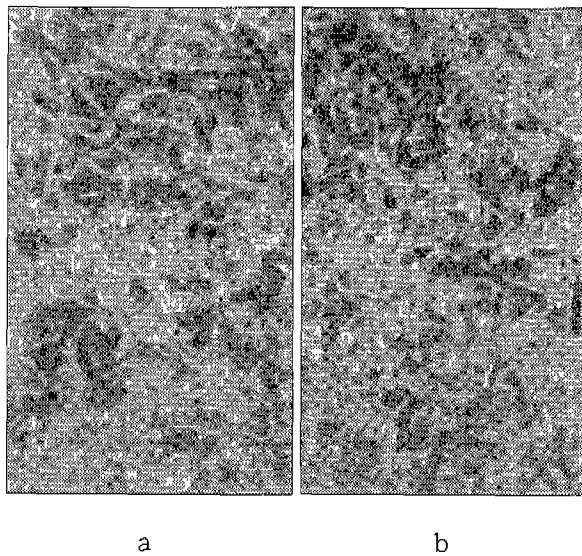


Fig. 1. Passive cutaneous anaphylaxis in rat treated with hydroxyapatite sinter produced from tuna bone. a, control; b, hydroxyapatite sinter produced from tuna bone.

Bioglass<sup>®</sup>로 명명한 Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>계 glass-ceramics가 우수한 생체 친화성을 갖는다고 하였으며, Li 등[16]은 zirconia, alumina, tricalcium phosphate 및 hydroxyapatite의 4종류의 세라믹스를 사용하여 human fibroblast cell에 대한 세포독성을 검토한 결과, alumina와 hydroxyapatite는 500 µg/ml, zirconia와 tricalcium phosphate는 50 µg/ml를 첨가할 때까지 세포독성이 없는 것으로 나타났다고 보고하였다. 또한, Kim 등[10]은 calcium nitrate와 diammonium hydrogen phosphate를 출발물질로 하여 hydroxyapatite를 합성하여 Sprague-Dawley계 rat의 복부 피하에 매식한 후 조직 접합성을 경시적으로 관찰한 결과, 매식 후 3일째에는 염증반을 보였으나 기일이 경과함에 따라 염증은 소실되고 매식체는 섬유성 결체조직으로 이루어진 피막으로 둘러싸여 hydroxyapatite에 대한 생체의 거부 반응은 관찰할 수 없었다고 보고하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 참치뼈에서 제조한 hydroxyapatite 소결체를 흰쥐의 체중 kg당 5,000 mg을 피하투여하여도 사망의 예는 물론 어떠한 이상조건도 발견되지 않았으며, 또한 병리조직학적 관찰에서도 아무런 이상증후를 발견하지 못하였다. 이상의 결과로부터 참치뼈에서 제조한 hydroxyapatite 소결체는 생체내에서 피하독성현상을

일으키지 않는 안전한 물질로 판단되며, 이를 이용하여 생체이식재료로서 치과용 치아 및 정형외과용 뼈 등에 응용이 가능할 것으로 판단된다.

## 요 약

참치뼈로부터 제조한 hydroxyapatite 소결체의 흰쥐에 대한 급성피하독성을 조사하기 위하여, hydroxyapatite 소결체를 생리식염수에 현탁시켜 암·수 각각 SD계 랫드 체중 kg당 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 0 mg의 농도로 10 ml가 되게 만든 후 피하에 1회 주사한 후 14일간 관찰하였다. 실험 기간 중 모든 실험군에서 사망이나 체중변화 및 병변 현상 등은 전혀 발견할 수 없었으며, 병리조직학적 관찰에서도 간, 신장, 폐, 위, 소장 및 소뇌 등에서 아무런 이상증상을 발견하지 못하였다. 이러한 결과로 미루어 참치뼈로부터 제조한 hydroxyapatite 소결체는 생체내 급성피하독성을 유발하지 않는 안전한 물질로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 1995년도 농림수산부 기술개발사업 중 현장에 로기술개발 사업비의 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 연구비를 지원해 준 농림수산부에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Caulier, H., J. P. C. M. Waerden, Y. C. G. J. Paquay, J. G. C. Wolke, W. Kalk, I. Naert and J. A. Jansen. 1995. Effect of calcium phosphate (Ca-P) coatings on trabecular bone response: A histological study. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 1061-1069.
2. Choi, J. S., C. K. Lee, Y. J. Jeon, H. G. Byun and S. K. Kim. 1999. Properties of the ceramic composites and glass-ceramics prepared by using the natural hydroxyapatite derived from tuna bone. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **10**, 394-399.
3. De Bruijn, J. D., C. A. Blitterswijk and J. E. Davies. 1995. Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface *in vivo*. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 89-99.
4. Day, D. E. and T. E. Day. 1993. An introduction to bioceramics, pp. 386, *In* Hench, L. L. and J. Wilson

- (ed.), *Advanced series in ceramics*. Vol. 1, World Scientific, Singapore.
5. Hench, L. L. 1991. Bioceramics from concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 1487-1510.
  6. Hulbert, J. C., L. L. Hench, J. Wilson and G. Heimke. 1986. Ceramics in clinical applications, past, present and future, pp. 189-213, *In high tech ceramics*, Vincenzini, P.(ed.), *Proceedings of the World Congress on High Tech Ceramics*, 6th CIMTEC, Milan, Italy.
  7. Kim, S. K., C. K. Lee, H. G. Byun, Y. J. Jeon, E. H. Lee and J. S. Choi. 1997. Synthesis and biocompatibility of the hydroxyapatite ceramic composites from tuna bone. (I) The sintering properties of hydroxyapatite and hydroxyapatite-containing wollastonite crushed with dry milling process. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **8**, 994-999.
  8. Kim, S. K., J. S. Choi, C. K. Lee, H. G. Byun, Y. J. Jeon and E. H. Lee. 1997. Synthesis and biocompatibility of the hydroxyapatite ceramic composites from tuna bone. (II) The sintering properties of hydroxyapatite treated with wet milling process. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **8**, 1000-1005.
  9. Kim, S. K., J. S. Choi, C. K. Lee, H. G. Byun, Y. J. Jeon, E. H. Lee and I. Y. Park. 1998. Synthesis and biocompatibility of the hydroxyapatite ceramic composites from tuna bone. (III) SEM photographs of bonding properties between hydroxyapatite ceramics composites in the simulated body fluid. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **9**, 322-329.
  10. Kim, Y. S., H. Y. Ko, J. T. Song and S. H. Choi. 1990. Study on the biocompatibility of hydroxyapatite bioceramics. (II) Behavior in simulated body fluid and biocompatibility. *J. Kor. Ceramic Soc.* **27**, 721-728.
  11. Ko, H. Y., Y. S. Kim, J. T. Song and S. H. Choi. 1990. Study on the biocompatibility of hydroxyapatite bioceramics. (I) Bonding between hydroxyapatite bioceramics in simulated body fluid. *J. Kor. Ceramic Soc.* **27**, 311-320.
  12. Kokubo, T., M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro and S. Higashi. 1982. Apatite and wollastonite-containing glass-ceramics for prosthetic application. *Bull. Inst. Chem. Res.* **60**, 3-4.
  13. Kokubo, T., S. Ito, M. Shigematsu and T. Yamamuro. 1985. Mechanical properties of a new type of apatite-containing glass-ceramic for prosthetic application. *J. Mater. Sci.* **20**, 2001-2004.
  14. Kokubo, T., T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro. 1987. Bonding between bioactive glasses, glass-ceramics or ceramics in a simulated body fluid. *J. Ceram. Soc. Jpn.* **95**, 785-791.
  15. Lee, C. K., J. S. Choi, Y. J. Jeon, H. G. Byun and S. K. Kim. 1997. The properties of natural hydroxyapatite isolated from tuna bone. *J. Kor. Fisher. Soc.* **30**, 652-659.
  16. Li, J., Y. Liu, L. Hermansson and R. Soremark. 1993. Evaluation of biocompatibility of various ceramic powders with human fibroblasts *in vitro*. *Clin. Mater.* **12**, 197-201.

(Received January 15, 2001; Accepted February 21, 2001)