

생분해성 Calcium Metaphosphate 골이식재의 골조직재생효과에 관한 연구

채한승¹, 이용무¹, 양승민^{1,2}, 천성수³, 김석영³, 구 영¹, 정종평¹, 한수부¹, 최상묵¹, 류인철¹

¹서울대학교 치과대학 치주과학교실

²성균관대학교 의과대학 치과학교실

³영남대학교 공과대학 재료공학교실

I. 서론

골 결손부의 회복을 위해 자가골이나 동종골을 이식하는 방법은 오래 전부터 이용되어 왔고 현재에도 가장 일반적인 골이식술의 방법이 되고 있다. 자가골의 경우는 공여부위의 이차적 수술이 필요하고 충분한 양의 골을 얻기가 쉽지 않다는 단점이 있고, 동종골의 경우에도 가능성은 적은 것으로 알려지고 있지만 일부 전염성질환의 전이가능성이 여전히 상존해 있다. 이러한 문제들 때문에 충분한 양을 쉽게 얻을 수 있고 질병의 전염가능성이 없는 인공합성골이 오래전부터 개발되어 사용되고 있다. 대표적인 인공합성골로서 hydroxyapatite (HA)¹⁻³, tricalcium phosphate (TCP)^{4, 5} 등의 인산칼슘계 이식재와 polymer⁶⁻⁸, bio-glass⁹, calcium carbonate^{10, 11} 등의 이식재가 사용되고 있고, 이들을 이용한 일부 성공적인 임상결과들이 보고되고 있다. 최근의 연구결과에서, 조직학적으로 골유도성이 없는 것으로 확인되고 있으며 대부분은 결합조직 개재에 의해 골조직과는 분리되는 단순히 '생적합성 충전재' (biocompatible filler)에 불과한 것으로 생각되고 있다¹²⁻¹⁴. 따라서 골친화성이 보다 우

수하고 골재생에 맞추어 적절히 흡수되어 재생골로 치환될 수 있는 흡수성 골이식재가 필요한 상황이다.

최근에 새로운 개념의 조직재생기술방법으로 조직공학의 개념과 기술이 제안되고 있는데, 이것은 재생을 필요로 하는 조직으로부터 세포를 분리, 배양하고 적절한 생체재료에 접종하여, 증폭, 배양함으로써 인공적으로 조직을 형성하는 기술이다¹⁵⁻¹⁷. 조직공학의 기법을 위해서는 해당 조직세포를 접종, 배양할 세포지지체가 필요하며 이는 조직적합성이 뛰어나며 세포접착성이 우수한 생체재료이어야 한다. 현재 골형성을 위한 세포지지체로서 교원질 matrix^{18, 19}, polyglycolic acid mesh(PGA)^{20, 21}, poly(lactic-co-glycolic acid) foam(PLGA)²², calcium phosphate ceramics²³⁻²⁵, poly (lactide/glycolide) /hydroxyapatite (PLGA/HA)²⁶ 및 polyphosphazenes²⁷ 등이 있지만, 이들 역시 아직은 해결되지 않은 문제들이 있어서 추가적인 연구가 필요하다.

Hydroxyapatite(HA) ceramic계 무기질은 골의 기본성분으로서 생체적합성 및 골친화성이 우수하여 손상된 골조직을 대체할 목적으로 오래전부터 연구

*이 연구는 1997년도 서울대학교병원 지정연구비(02-1997-251-0) 지원으로 수행되었음

교신 저자: 류인철, 서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 110-768

되어 왔고 여러 상품화된 골이식재로 사용되고 있다. 하지만 HA는 분해속도가 너무 느리기 때문에 이식부위에 새로이 재생되는 골조직의 성장에 오히려 장애요인이 될 소지가 있다. 따라서 생체적합성 및 골친화성 뿐만아니라 외과적 이식후에 일정기간 골조직재생에 맞추어 분해, 흡수되면서 재생골로 치환될 수 있어야 이상적인 골이식재로서의 기능을 할 수 있는 것이다.

Calcium metaphosphate (CMP; $[Ca(PO_3)_2]_n$)는 monocalcium phosphate $[Ca(H_2PO_4)_2]$ 를 열분해시켜 얻을 수 있으며 무기질 고분자로서 4개이상의 동질 이상(α , β , γ , δ)이 있고 모두-O-P-O-를 골격으로 하는 쇄상구조를 이루고 있다. 이 중에서 쇄상의 길이가 가장 길고 생화학적으로 가장 안정한 β 형의 CMP는 열처리 방법에 따라 비정질 혹은 결정질을 얻을 수 있고 제조방법이나 CMP상에 따라 생분해속도를 조절할 수 있다^{28, 29)}. 이전의 연구에서 CMP를 이용한 골이식재와 골조직공학을 위한 세포지지체로서의 가능성을 확인한 바 있다³⁰⁻³³⁾. 이 연구의 목적은, CMP의 흡수속도를 증진하고 골전도성이 강화된 CMP골이식재의 생체적합성, 골친화성, 골전도성 및 생분해성에 관해 조사하는 것이다.

II. 실험재료 및 방법

1. K₂O 또는 Na₂O가 첨가된 CMP골이식재의 제조

CMP의 생분해성을 증진하기위해 Na₂O와 K₂O를 일정량 치환시킨 변형 CMP 골이식재를 고안하였다. 무수 $Ca(H_2PO_4)_2$ 를 출발물질로 하여 가열함으로써 생분해성 다공성의 beta상의 $[Ca(PO_3)_2]_n$ (CMP)를 제조하였다. $Ca(H_2PO_4)_2$ 분말을 백금도가니에 넣고 전기로에서 3°C/min씩 1050°C까지 승온하여 용융하고 용융상을 8시간동안 유지하여 용융물의 균질성을 높였다. 이 용융물을 900°C에서 3시간동안 재결정화시킨 후 3°C/min의 냉각속도로 냉각시키고 분쇄하여 CMP 분말을 얻었다.

Na₂O 또는 K₂O가 첨가된 CMP를 얻기 위해

$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$, $Na(H_2PO_4) \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4 를 출발물질로 P₂O₅의 몰 비를 50%로 고정하고 CaO를 5 mol%, 10 mol% Na₂O와 K₂O로 치환시킨 시료를 제조하였다. 시료를 만들기 위해서 원료를 정량하고 혼합한 다음 백금도가니에 담아 SiC 전기로를 사용하여 1100°C에서 용융시키고 두시간 후 증류수에 급랭시켜 비정질의 시료를 얻었으며 비정질의 시료를 결정화 처리하여 결정질의 시료를 얻었다. 비정질 CMP의 결정화는 조성에 따라 각기 다른 온도에서 실시하였는데 순수 CMP는 5°C/min의 속도로 800°C까지 승온한 뒤 5시간 유지한 후 3°C/min의 속도로 냉각하였고, 5 mol%Na₂O와 10mol%Na₂O를 첨가한 시료는 5°C/min의 속도로 700°C까지 승온한 뒤 5시간 유지한 후 3°C/min의 속도로 냉각하였으며, 5 mol%의 K₂O를 첨가한 시료는 3°C/min의 속도로 640°C까지 승온하여 3시간 유지한 후 3°C/min의 속도로 냉각하였다. 또한, 10 mol%의 K₂O를 첨가한 시료는 3°C/min의 속도로 630°C까지 승온한 뒤 3시간 유지한 후 3°C/min의 속도로 냉각하였다. 순수 CMP 및 Na₂O 또는 K₂O가 첨가된 CMP시료들은 체가름을 통해 125 ~ 150 μ m 크기의 시료를 준비하였고 시료표면에 묻은 미분을 제거하기 위하여 알코올로 세척하였다.

2. 골이식재의 분해능 측정

Tris-buffer 용액 및 유사 체액(Simulated body fluid)내에서 125~150 μ m 크기의 순수 CMP, Na₂O-CMP, 및 K₂O-CMP 이식재 시료의 침적시간에 따른 중량변화를 30일간 측정하였다.

3. 골이식재시료의 생체내 이식 및 평가

1) 동물

동물은 5-7kg의 웅성 가토(Newzealand white rabbit) 24마리를 사용하였고, 대조군에 8마리, 실험군에 16마리를 배정하였다. 각 동물에 염산 자일리진(Rumpun®, 한국바이엘, 한국)과 염산 케타민(Ketalar®, 유한양행, 한국)을 혼합한 마취액을 kg당 30mg을 복강내 주사하여 전신마취하였으며 두부의

정수리부위(bregma)의 털을 깎고 potadine과 hibi-tane으로 소독한 후 2% 리도카인으로 수술 부위를 침윤마취하였다.

2) 실험군

실험동물은 대조군과 실험군으로 구분하였으며 대조군은 이식재를 이식하지 않는 음성대조군과, deproteinized bovine bone(DPBB: Bio-Oss)을 양성 대조군으로 하였고 실험군은 순수 CMP, 5% Na₂O-CMP, 10% Na₂O-CMP, 및 5% K₂O-CMP 이식제등 4 군으로 구분하였으며, 각 군에 4마리씩 배정하였다.

3) 두부 골결손부 형성 및 골이식재 이식

메스로 두피에 전후방향으로 직선의 절개선을 가 하여 두피와 골막을 절개하고, 좌,우로 젖혀 두개골을 노출시킨 후, 10 mm 직경의 trephine bur를 이용하여 뇌막이 손상되지 않도록 주의하면서 좌측과 우측의 두정골에 각각 원형 골 결손부를 형성하였다. 실험군에 각각 4마리씩, 총 8개의 원형 골결손부에 각 이식재를 이식하고 골막 및 두피를 각각 층상봉합하였다.

4) 동물의 희생 및 조직표본의 제작

이식재를 각 동물에 이식한 후 3개월과 6개월 후에 각각 2마리씩을 희생하였다. 두개골 이식재 이식부를 두피와 함께 절제한 후 중성포르말린에 고정하였고 통법에 의해 조직표본을 제작하였으며 표본의 paraffin 포매직전에 치과용 X-ray를 이용하여 표준 구내필름 및 교합필름으로 방사선 촬영을 하였다.

통법에 따라 수세하고 alcohol로 탈수한 후 spurred low viscosity media (Polyscience Inc, USA)로 포매하였다. 그리고 Exakt cutting and grinding system (Exakt-Apprateb, Germany)으로 절단·연마하여 30 μm 두께의 비탈회표본을 제작하였다. 표본을 hematoxylin-eosin 이중 염색을 시행한 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

5) 조직계측에 의한 골이식재 이식군의 신생골 형성량 측정

광학현미경하에서 조직소견을 관찰하고, 조직계측학적 분석을 위하여 광학현미경하에서 조직표본상을 digital color camera 를 통해서 컴퓨터 모니터 상에 재현한 후 영상분석 조직계측 프로그램 (Bildanalyssystem AB, Sweden)을 이용하여 골결손 부위에 재생된 신생골의 면적을 측정하였다.

4. 통계처리

조직단면상에서 조직계측프로그램으로 측정된 신생골의 양을 ANOVA분석 및 Turkey의 사후 검정법으로 각 실험기간에서 골이식제군간의 비교를 하였고, 이들간의 유의성은 student t-test 방법으로 검증하였다.

IV. 연구결과

1. 순수 CMP와 Na₂O-CMP, K₂O-CMP 이식재시료의 침적시간에 따른 중량변화

침적실험 전·후에 시료의 무게를 측정한 중량변화는 비정질 재료가 결정질 재료보다 높은 분해특성을 보였고, K₂O를 첨가한 결정질 재료가 다른 결정질 재료보다 더 많은 중량변화를 보였다.

침적 30일 후, 5가지 조성의 비정질 시료는 모두 약 75 wt% 전후의 무게감소를 보였다. 비정질 시료에서 첨가물의 영향은 모든 시료가 7일까지 급격한 무게의 감소를 보였고, 21일까지 지속되다가 이후 다소 둔화되었다. 순수한 시료에 비해 첨가 시료는 Na₂O의 첨가량 증가에 따라 조금 증가되었고, K₂O 첨가 시료는 초기에 중량이 증가되다가 21일까지 지속적인 감소를 하였다. 이상의 결과에서 비정질 시료에 대한 알칼리족 금속산화물(MO)의 첨가효과는 다소 다른 분해양상을 보이긴 했지만 경미하다고 판단된다. 결정질 시료의 경우, 전혀 다른 분해양상을 알 수 있었다. 순수한 시료와 Na₂O를 첨가한 시료는 중량의 감소가 거의 나타나지 않았지만, K₂O를 첨가한 시료는 첨가량의 증가에 따라 분해된 양이 증가되었다. 30일 이후 5 mol% K₂O를 첨가한 시료는 약

Table 1. in vitro weight change of CMP materials according to soaking time(mean±SD).

Wt. change (wt%) Type			Period				
			day1	day3	day7	day21	day30
Amorphous	Soaking in trisbuffer	pure	-0.25±0.27	0.38±4.16	-54.95±9.57	-75.48±10.85	-71.71±6.12
		5 mol% Na ₂ O	-0.39±0.53	2.75±2.47	-51.96±6.18	-72.50±6.95	-70.90±2.98
		10 mol% Na ₂ O	-0.19±0.08	-8.99±4.27	-67.14±6.39	-74.50±4.88	-72.43±2.46
		5 mol% K ₂ O	7.95±1.27	1.63±1.05	-56.55±2.09	-78.02±0.70	-76.34±1.80
	Soaking in SBF	pure	-0.14±0.04	-8.99±3.12	-50.18±3.49	-76.64±8.08	-70.25±3.53
		5 mol% Na ₂ O	-0.60±0.57	-10.79±9.68	-46.49±3.20	-78.78±7.65	-70.17±1.87
		10 mol% Na ₂ O	-0.24±0.11	-6.31±1.49	-62.85±12.56	-79.99±4.88	-69.37±5.07
		5 mol% K ₂ O	12.97±0.32	1.06±0.45	-47.48±2.79	-74.59±0.65	-75.34±1.80
Crystalline	Soaking in trisbuffer	pure	-2.71±0.24	-10.52±4.18	-3.37±1.33	-0.83±3.28	1.92±0.54
		5 mol% Na ₂ O	-2.71±0.24	-9.97±5.29	-2.94±1.87	-3.47±1.87	1.08±0.39
		10 mol% Na ₂ O	-2.14±0.68	-9.67±5.31	-4.17±1.86	-8.53±7.88	2.166±0.42
		5 mol% K ₂ O	-2.79±0.07	-4.50±0.11	-10.31±0.54	-24.86±0.70	-27.61±0.81
	Soaking pure in SBF	pure	-2.18±0.28	-9.43±4.13	-5.36±7.19	1.09±4.14	2.95±0.81
		5 mol% Na ₂ O	-1.80±0.51	-9.39±5.85	-2.96±1.17	0.21±0.62	3.68±0.52
		10 mol% Na ₂ O	-1.99±0.36	-8.91±2.59	-0.47±5.93	-2.83±3.04	3.66±0.64
		5 mol% K ₂ O	-3.43±1.30	-5.08±0.44	-11.33±0.06	-24.19±0.84	-25.61±0.81

Table 2. Amount of new bone in cranial bone defects(mm²) (mean±SD)

	Control	DPBB (Bio-Oss)	순수CMP	5% K ₂ O-CMP	5% Na ₂ O-CMP	10% Na ₂ O-CMP
Week 12	1.19±0.64	6.53±0.39*	4.14±0.74* [†]	5.51±0.78*	4.53±0.89*	3.80±0.39*
Week 24	2.70±1.78	7.65±0.23*	6.19±0.40*	5.96±0.95*	6.21±0.76*	6.50±0.60*

P<0,01: significantly different from control

*: P<0,01: significantly different from control

†: P<0,01: significantly different from DPBB

25 wt% 감소하였으며, 10 mol% K₂O를 첨가한 시료는 약 45 wt% 감소하였고, 30일까지 무게감소가 계속 지속되었다. 비정질 시료 표면에 구형의 새로운 상이 나타났다. 순수한 시료와 Na₂O를 첨가한 시료의 표면은 약간의 균열이 관찰되었지만 K₂O를 첨가한 시료는 상의 용출 흔적과 작은 구형의 상이 관찰되었다(Table 1).

2. 두개골결손부위에서 골이식재의 신생골 형성량

두개골결손부위에 이식재를 이식한 후 신생골형성량의 조직계측에서, 모든 이식재는 이식하지 않은 음성대조군에 비해 유의한 골형성촉진을 보였다 (Table 2).

이식 12주 후의 측정결과, 모든 이식재군이 대조군에 비하여 유의하게 높은 신생골형성을 보였다 (P<0,01). CMP 군간에는 유의한 신생골형성량의 차이를 보이지 않았고, DPBB는 순수CMP, 5%K₂O-

CMP, 10%Na₂O-CMP보다는 높았으나(P < 0.01), 5%Na₂O-CMP와는 유의한 차이가 없었다(P > 0.01).

이식 후 24주는 모든 이식재군이 대조군에 비하여 유의하게 높은 신생골형성을 보였다(P < 0.01). 모든 이식재군간 즉, 순수CMP 군, 5%K₂O-CMP, 5%Na₂O-CMP, 10%Na₂O-CMP 및 DPBB 군간의 차이는 유의성이 없었다 (P)0.01).

3. 골결손부위에서 골이식재의 조직학적 소견

이식재를 이식하지 않은 대조군에서는 골결손부위의 12주 및 24주 모두에서 신생골이 별로 관찰되지않았다(Figure 1). 시험이식재를 이식한 결손부는 이식재 이식에 의한 골전도성 증진으로 상당량의 신생골이 관찰되었다. CMP이식재는 재생된 신생골에

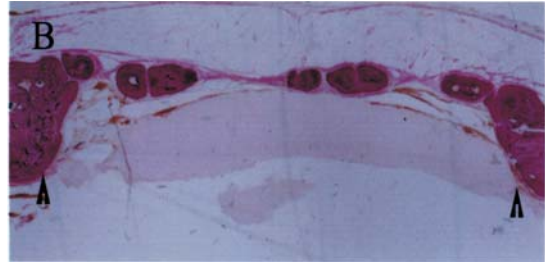
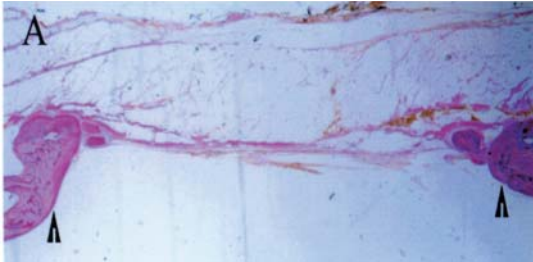


Figure 1. Control defect group

A. 12 weeks after surgery

B. 24 weeks after surgery

Arrow heads : Original border (Hematoxylin-Eosin, × 10)

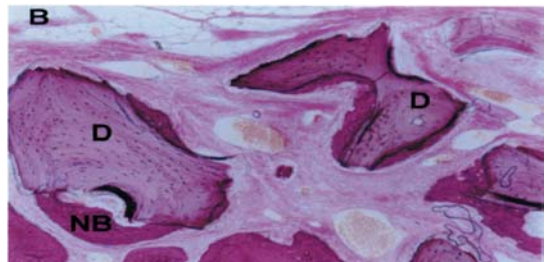
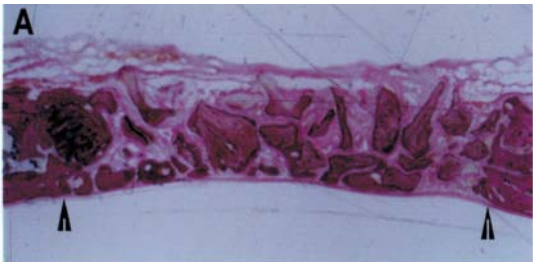


Figure 2. DPBB(Bio-Oss) group, 12 weeks after surgery

A. Whole defect, arrow heads : Original border (Hematoxylin-Eosin, × 10)

B. Tissue in the defect, D : DPBB, NB : New bone (Hematoxylin-Eosin, × 100)

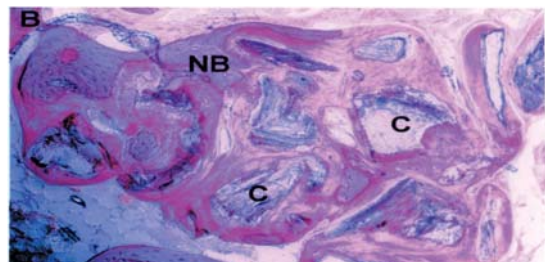
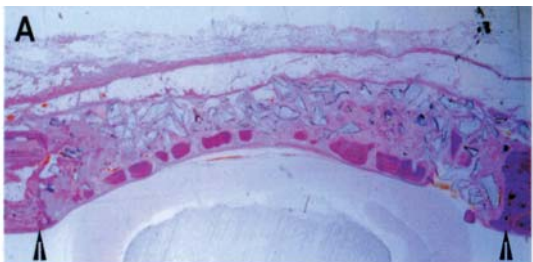


Figure 3. Pure CMP group, 12 weeks after surgery

A. Whole defect, arrow head : Original defect border (Hematoxylin-Eosin, × 10)

B. Tissue in the defect, C : CMP, NB : New bone (Hematoxylin-Eosin, × 100)

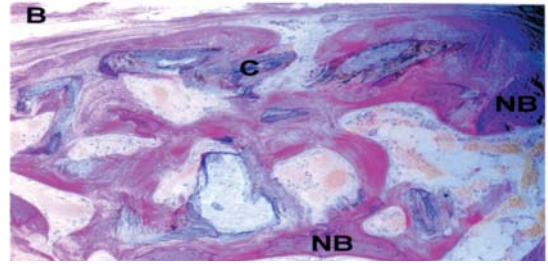
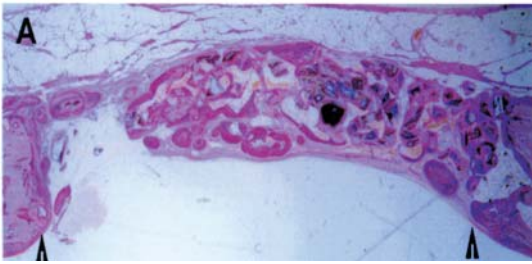


Figure 4. 5% K₂O-CMP group, 12 weeks after surgery
 A. Whole defect, arrow heads : Original defect border (Hematoxylin-Eosin, × 10)
 B. Tissue in the defect, C : CMP, NB : New bone (Hematoxylin-Eosin, × 100)

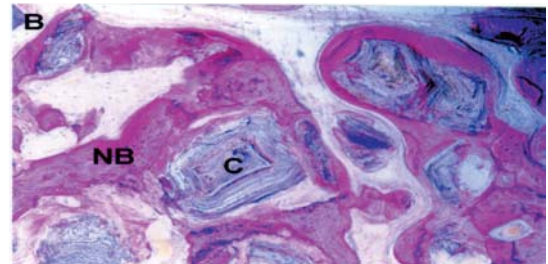
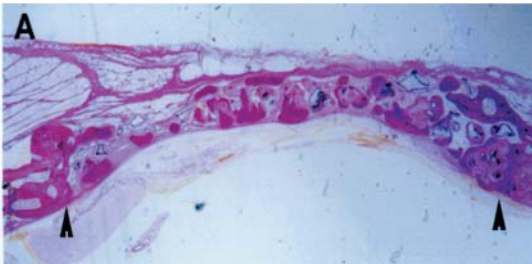


Figure 5. 5% Na₂O-CMP group, 12 weeks after surgery
 A. Whole defect, arrow heads : Original defect border (Hematoxylin-Eosin, × 10)
 B. Tissue in the defect, C : CMP, NB : New bone (Hematoxylin-Eosin, × 100)

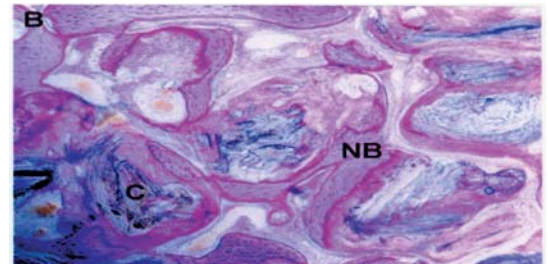
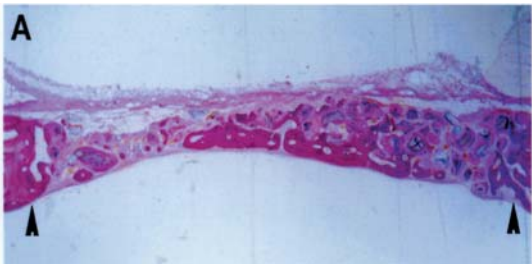


Figure 6. 10% Na₂-CMP group, 12 weeks after surgery
 A. Whole defect, arrow head : Original defect border (Hematoxylin-Eosin, × 10)
 B. Tissue in the defect, C : CMP, NB : New bone (Hematoxylin-Eosin, × 100)

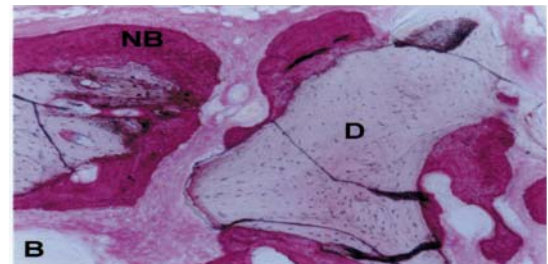
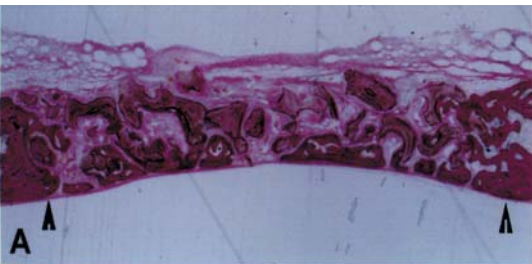


Figure 7. DPBB(Bio-Oss) group, 24 weeks after surgery
 A. Whole defect, arrow head : Original border (Hematoxylin-Eosin, × 10)
 B. Tissue in the defect, D : DPBB, NB : New bone (Hematoxylin-Eosin, × 100)

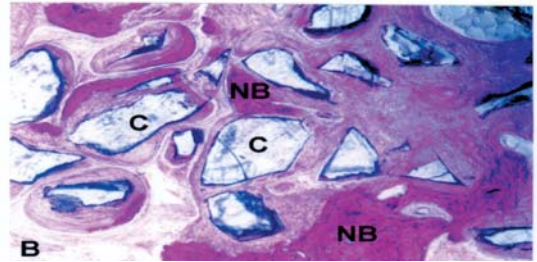
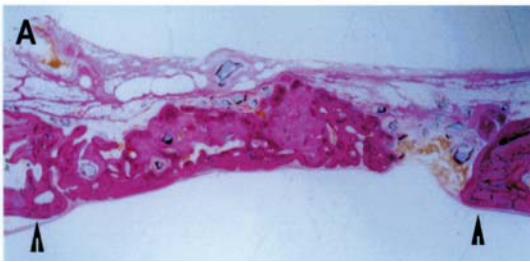


Figure 8. Pure CMP group, 24 weeks after surgery
 A. Whole defect, arrow head : Original defect border (Hematoxylin-Eosin, $\times 10$)
 B. Tissue in the defect, C : CMP, NB : New bone (Hematoxylin-Eosin, $\times 100$)

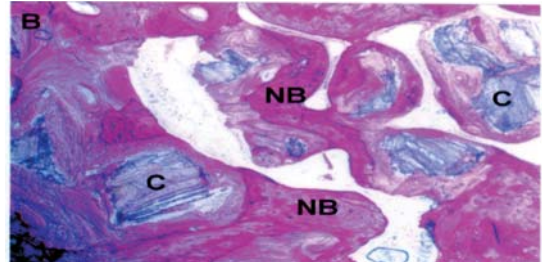
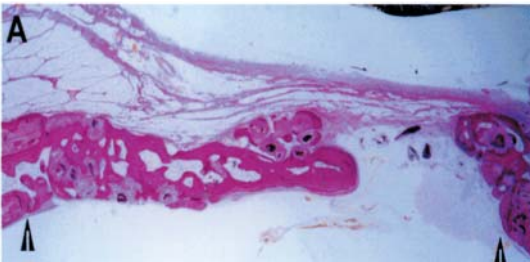


Figure 9. 5% K_2O -CMP group, 24 weeks after surgery
 A. Whole defect, arrow heads : Original defect border (Hematoxylin-Eosin, $\times 10$)
 B. Tissue in the defect, C : CMP, NB : New bone (Hematoxylin-Eosin, $\times 100$)

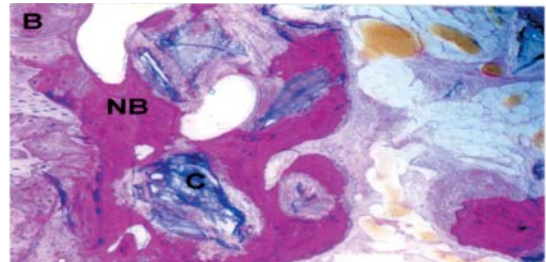
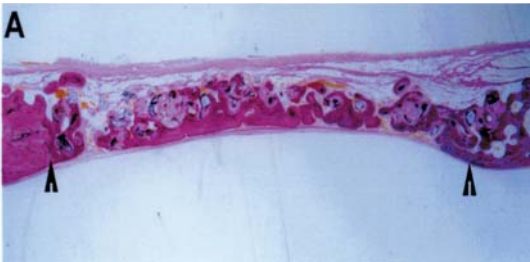


Figure 10. 5% Na_2O -CMP group, 24 weeks after surgery
 A. Whole defect, arrow heads : Original defect border (Hematoxylin-Eosin, $\times 10$)
 B. Tissue in the defect, C : CMP, NB : New bone (Hematoxylin-Eosin, $\times 100$)

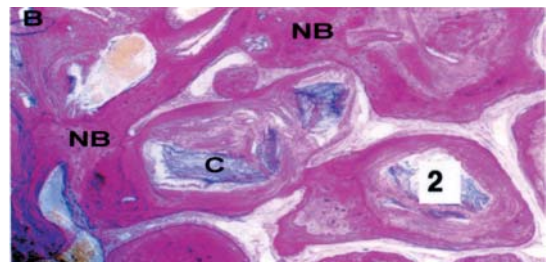
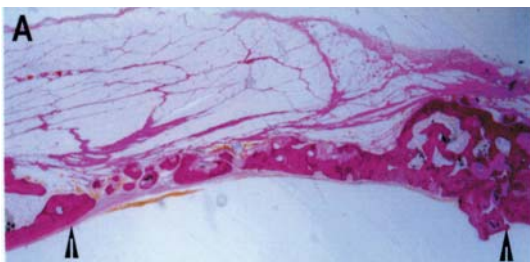


Figure 11. 10% Na_2 -CMP group, 12 weeks after surgery
 A. Whole defect, arrow head : Original defect border (Hematoxylin-Eosin, $\times 10$)
 B. Tissue in the defect, C : CMP, NB : New bone (Hematoxylin-Eosin, $\times 100$)

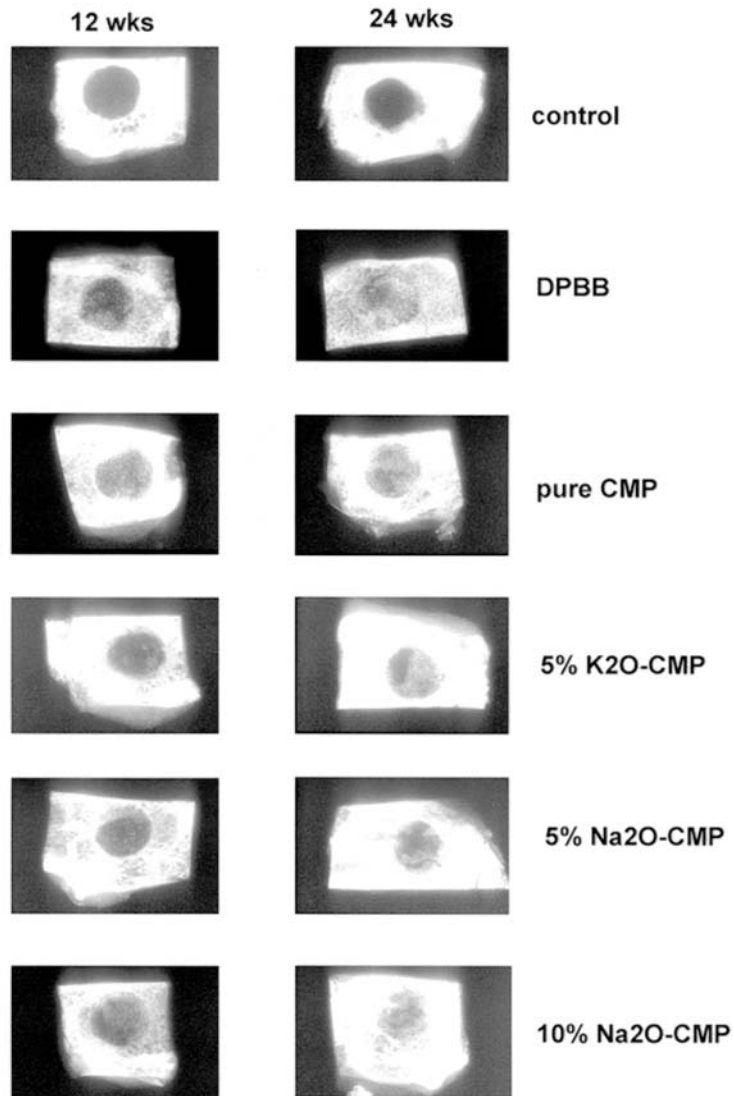


Figure 12. Radiographic findings of defect healing at 12 and 24 weeks after surgery

직접접촉하여 신생골과의 융합이 나타나고 있었으며, 이물반응이나 염증반응도 관찰되지 않았다. 이식 후 12주는 CMP 이식재들 주위로 신생골이 형성되면서 신생 골조직 또는 골양조직에 의한 직접적인 골접촉에 의한 골재생이 이루어지고 있는 소견이 관찰되었고, 이식 후 24주는 5%K₂O-CMP, 5%Na₂O-CMP, 10%Na₂O-CMP 군들에서 이식재 입자주위의 신생골확장과 더불어 이식재 입자들의 분해양상이 동시에 관찰되었다(Figure 3~6, 8~11).

DPBB의 경우는 이식재입자주위의 직접적인 골접촉에 의한 신생골의 형성으로 인한 결손부의 융합이 관찰되기는 하나 이식24주까지는 DPBB 입자의 어떠한 분해상도 관찰되지 않으며 원재료인 우골의 골미세구조를 그대로 유지 하고 있었다(Figure 2, 7).

4. 골결손부위에서 골이식재의 방사선학적 소견

이식재군에서 12주 및 24주는 모두 골결손부위의

신생골형성에 의해 현저한 방사선불투과상을 보이고 있었다(Figure 12).

순수CMP이식재군은 12주 및 24주에서 골결손부위에 이식재 입자들이 명확한 불투과상으로 구분되어 관찰되었으나, 5%K₂O-CMP, 5%Na₂O-CMP, 10%Na₂O-CMP 이식재군은 순수 CMP이식재군에 비하여 불명확한 불투과상을 보이고 있었다. 5%K₂O-CMP, 5%Na₂O-CMP, 10%Na₂O-CMP 이식재군에서 이식 24주의 방사선상은 경우, 입자들의 구분이 불명확해지면서 전반적인 방사선불투과상을 보이고 있었는데, 이는 이식재입자들의 흡수와 주위골형성이 동시에 일어나면서 흡수되는 이식재와 신생골이 융화되는 과정으로 생각된다. DPBB의 경우는 이식 12 및 24주에서 이식재 입자 자체의 모양이 뚜렷이 확인되고 있어서 이식재의 흡수가 거의 관찰되지 않았다.

IV. 총괄 및 고안

이 실험에서 사용된 수종의 CMP는 [-O-P-O-]를 골격으로 하는쇄상구조를 갖는 무기질 고분자이다. 이는 열처리방법과 제조공정에 따라 여러 가지 형태로 가공이 가능하고 흡수속도도 조절이 가능하다. 이 연구에서 사용된 다공질의 CMP 블록은 골이식재 뿐만 아니라 조직공학을 위한 세포지지체로서 응용할 목적으로 개발되었다.

골이식재료는 기본적으로 면역반응이나 염증반응을 야기하지 않은 생적합성, 재생골로 적절히 치환될 수 있는 흡수성, 골전도성이나 골유도성, 소독가능성, 방사선 불투과성, 골과 비슷한 강도, 경제성 등이 요구된다. 이러한 이유에서 골과 화학적 성분이 유사한 HA¹⁻³⁾ 나 TCP^{4, 5)} 등의 칼슘인산계 세라믹재료와 polymer^{6,8)}, bioglass⁹⁾, calcium carbonate^{10, 11)} 등의 이식재들이 사용되고 있고, 이들을 이용한 일부 성공적인 임상결과들이 보고되고 있다. 하지만 이들에 대한 최근의 평가들을 보면, 조직학적으로 골유도성은 없는 것으로 보고되고 있으며 대부분은 결합조직 개재에 의해 골조직과는 분리 되는 단순히 '생적합성 충전제(biocompatible filler)' 에 불과한 것으로 보인다¹²⁻¹⁴⁾.

생체재료로 사용되는 세라믹스중 칼슘인산계 세

라믹스는 생체에 대한 친화성이 매우 우수하고, 뼈의 화학 성분과 유사하기 때문에 생체재료로서 큰 관심을 끌고 있다. 특히, 다공질 칼슘 인산계 세라믹스와 다른 세라믹스를 이용하여 손상된 인간의 기관이나 일부 경조직을 대체할 수 있으므로 선진국에서는 이미 이 재료에 대한 연구 개발을 위해 노력을 기울이고 있으며, 이 재료를 이용하여 뼈의 조직을 배양하는 연구도 많이 진행되고 있다.

지금까지는 고분자, 금속 그리고 여러 가지 세라믹스 등이 생체재료로서 많이 이용되어 왔으나, 이들 재료들의 특성에 따라 응용되는 분야를 달리한다. 일반적으로 칼슘 인산계 세라믹스는 인체의 조직에 친화성이 매우 우수하여 이를 이용하려는 연구가 많이 진행되었으나, 이들 재료의 고유의 특성, 즉, 낮은 기계적인 특성(취성, 피로강도) 때문에 뼈의 대체 재료로 이용시 하중을 받지 않는 부위나 코팅재료로 사용되어 왔다. 그러나 Ca/P 비나 제조 방법을 달리 하면 생분해되는 재료를 제조 할 수 있다. 특히, 생분해성 인산 칼슘 세라믹스로 다공질 블록을 제조하면 뼈의 손상된 부분을 채우는 충전재로서 이용이 가능하다⁵⁾.

최근 들어 이 재료를 이용하여 새로운 뼈의 조직이 기공 내부로 성장하여 들어갈 수 있도록 기공의 크기와 연결성이 고려된 개기공 다공체 개발에 관한 연구가 진행되고 있다. CMP는 완전 산화 상태의 인(P) 원자를 갖고 있고, 화학적 변화에 매우 안정하지만 적절한 상태를 만들어 주면 모든 P-O-P 연결 부위가 깨질 수 있다. 대부분의 인산계 세라믹은 물에 대한 친화성을 갖고 있기 때문에 물에 의해 용해될 수 있으나, 그 과정은 아직까지 잘 알려지지 않았다. 이런 인산계 세라믹의 물에 대한 용해도에 영향을 주는 요소에는, PO₄ 다면체에 의해 공유된 각의 수, 온도, pH 그리고 용액의 인 농도등이 있다. Ca 이온의 반경이 Na 이온의 반경 보다 크나 Ca의 원자가(++)가 Na의 원자가(+) 보다 크므로 결합력은 Ca이 Na보다 더 크다. 결합력의 크기는 Ca²⁺> Na⁺> K⁺ 순이고, 이것은 분해성과 분해속도에 영향을 준다. 이 실험에서 K의 첨가는 양호한 분해성을 보여 주었는데, 이것은 K의 약한 결합력, 보다 높은 수화성(hydra-

tion tendency)과 이온 이동성(ion mobility)에 기인한다. 그러나 Na이 첨가된 CMP는 K이 첨가된 CMP에 비해 낮은 분해성을 보였다.

이 연구의 결과에서 순수 CMP, 5%K₂O-CMP, 5%Na₂O-CMP, 및 10%Na₂O-CMP 이식재는 재생된 신생골에 직접 접촉하여 신생골과의 융합이 나타났고 어떠한 이물반응이나 염증반응도 관찰되지 않았다. 또한 네 종류의 CMP 골이식재는 모두에서 대조군에 비해 유의하게 높은 신생골 형성을 보여주었다. 이전에 제안되어 사용되고 있는 기존의 골이식재인 HA 나 TCP 등은 골 결손부위에 이식시 결합조직개재에 의해 섬유낭에 싸이는 소견이 나타나므로 CMP는 흡수성 골이식재로서의 여러 가지 요건을 갖춘 재료로 기대되고 있다.

골아세포의 3차원적 배양을 위해 세포지지체로서 교원질, PGA, PLGA copolymer, calcium phosphate ceramic 및 polyphosphazenes 등의 재료들이 이용되어 왔지만, 이들 재료도 여러 문제점이 있다. 교원질은 강도가 약하고 흡수속도를 조절하기 어렵고, 대개 이종이나 동종개체로부터 추출하여 사용하므로 면역반응을 야기할 수 있으며 100 μ m 정도의 매우 얇은 판상이어서 큰 골결손부에는 사용이 어려운 단점이 있다. PLGA copolymer는 소수성이 커서 세포지지체 심부까지 배지의 확산 및 침투가 어려운 단점이 있다. 기존의 ceramic matrix는 자연골과 유사한 화학조성 때문에 생체친화성이 좋은 장점은 있으나, 분해속도가 너무 느려 이식부위에서 형성될 골 조직에 물리적 장애요인이 될 수 있다. Polyphosphazene은 새로운 물질로서 실험중인 단계여서 아직은 더 연구가 필요한 상황이다.

이 연구에서 시험된 5%K₂O-CMP, 5%Na₂O-CMP, 10%Na₂O-CMP 이식재는 실험실적 조건에서 뿐 아니라 골결손부위의 조직학적 소견에서 순수 CMP나 DPBB보다 더 잘 분해되는 양상을 보였다. 이와같은 결과를 토대로 K₂O와 Na₂O가 첨가된 CMP 이식재가 이상적인 골이식재로 인정받을 수 있으나 장기적인 관찰에 의한 흡수과정과 인체내에서의 조직반응과 골유도성 및 생분해성에 대한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

VI. 결론

CMP의 흡수속도를 증진시키기 위해 Na₂O 및 K₂O를 첨가한 CMP 골이식재의 생체적합성, 골친화성, 골전도성 및 생분해성을 조사할 목적으로 K₂O 또는 Na₂O가 첨가된 CMP 골이식재를 제조하여 이식재의 분해능, 생체내 이식 후의 조직 반응 및 골 형성량을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. K₂O-CMP 이식재군과 및 Na₂O-CMP 이식재군은 순수 CMP이식군에 비하여 시험관내 실험과 생체내 이식의 조직학적 소견에서 빠른 분해양상을 보였다.
2. K₂O-CMP 이식재군과 Na₂O-CMP 이식재군은 골결손부위에서 이물반응 없이 양호한 생체적합성과 골전도성을 보였다.
3. 골결손부위에서 K₂O-CMP 이식재군과 Na₂O-CMP 이식재군은 DPBB 이식재군과 비교하여 통계적으로 유사한 정도의 신생골형성을 유도하였다.

이상의 결과로서 본 실험에서 조사된 K₂O 또는 Na₂O가 첨가된 CMP 골이식재는 골전도성과 생분해성이 양호한 골이식재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

VII. 참고문헌

1. Froum SJ, Kushner L, Scopp W, Stahl SS: Human clinical and histologic response to durapatite implants in intraosseous lesions. J Periodontol 1982;53:719-725.
2. Sapokos SW: The use of Periograf in periodontal defects- Histologic findings. J Periodontol 1986;57:7-13.
3. Carranza FA Jr, Kenny EB, Lekovic V, Talamante E, Valencia J and Dimitrijevic B: Histologic study of the healing of human periodontal defect after placement of porous hydroxyapatite implants. J

- Periodontol 1987;58:682-688.
4. Baldock WT, Hutchens LH, McFall WT, Simpson DM: An evaluation of tricalcium phosphate implants in human periodontal osseous defects of two patients. *J Periodontol* 1985;56:1-7.
 5. Stahl SS, Froum SJ: Histologic evaluation of human intraosseous healing response to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. *J Periodontol* 1986;57:211-217.
 6. Stahl SS, Froum SJ, Tarnow DP: Human clinical and histologic responses to the placement of HTR polymer particles in 11 intrabony lesion. *J Periodontol* 1990;61:269-274.
 7. Yukna RA: Clinical evaluation of HTR polymer bone replacement grafts in human mandibular Class II molar furcations. *J Periodontol* 1994;65:342-349.
 8. Froum SJ: Human histologic evaluation of HTR polymer and freeze-dried bone allograft. A case report. *J Clin Periodontol* 1996;23:615-620.
 9. Zamet JS, Dabar UR, Griffiths GS, Bulman JS, Bragger U, Burgin W, Newman HN: Particulate bioglass as a grafting material in treatment of periodontal intrabony defects. *J Clin Periodontol* 1997;24:410-418.
 10. Louise F, Borghetti A: Clinical evaluation of natural coral implantation in osseous periodontal defects. Results after one year. *J Parodontol* 1991;10:69-76.
 11. Yukna RA: Clinical evaluation of coralline carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1994;65:177-185.
 12. Yukna RA: Synthetic bone grafts in periodontics. *Periodontol 2000* 1993;1:92-99.
 13. Yukna RA: Synthetic grafts and regeneration. In Polson AM, eds. *Periodontal regeneration. Current status and directions*. pp103-112, Quintessence Publishing Co., Inc, Chicago, 1994.
 14. Garret S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol* 1996;1:621-666.
 15. Cooper ML, Hansbrough JF, Spielvogel RL, Cohen R, Bartel RL, Naughton G: In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Biomaterials* 1991;12:243-248.
 16. Atala A, Vacanti JP, Peter CA, Mandel JP, Retik AB, Freeman MR: Formation of urothelial structures in vivo from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds in vitro. *J Urol* 1992;148:658-662.
 17. Vacanti CA, Vacanti JP: Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches. *Otolaringol Clin North Am* 1994;27:263-276.
 18. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Itaku Y, Yamamoto S: Mineralized tissue formation by MC3T3-E1 osteogenic cells embeded in three dimensional gel matrix, In *Cell Mediated Calcification and Matrix Vesicles*. pp291-296, SY Ali ed. Elsevier Science, Oxford, UK, 1986.
 19. Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J: Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. *Calcif Tissue Int* 1990;46:46-56.
 20. Vacanti CA, Kim W, Upton J, Vancanti MP, Mooney D, Schloo B, Vacanti JP: Tissue engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc* 1993;25:1019-1021.
 21. Puelacher WC, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo B, Vacanti CA: Femoral shaft reconstruction using tissue-engineered growth of bone. *Int J Maxillofac Surg* 1996;25:223-228.
 22. Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG: Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in

- biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997;36:17-28.
23. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI: The origin of bone in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop* 1991;274-283.
 24. Goshima J, Victor MG, Caplan AI: The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop* 1991;298-311.
 25. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI: Cultured-expanded human periosteal-derived cells exhibited osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 1991;9:465-476.
 26. Laurencin CT, Attawia MA, Elgandy HE, Herbert KM: Tissue engineered bone regeneration using degradable polymers: The formation of mineralized matrices. *Bone* 1996;93-99.
 27. Laurencin CT, El-Amin SF, Ibim SE, Willough DA, Attawia M, Allock HR, Ambrocio AA: A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration. *J Biomed Mater Res* 1996;30:133-138.
 28. Kim S: Bioresorbable calcium metaphosphate ceramics: I. Preparation and preliminary in vitro study. *Biomaterials Research* 1998;2:48-52.
 29. McIntosh AO, Jablonski WL: X-ray powder patterns of the calcium phosphate. *Analytical Chemistry* 1956;28:1424-1427.
 30. 이용무, 김석영, 신승윤, 구 영, 류인철, 정종평: 생분해성 다공질 Calcium Metaphosphate 블록의 조직적합성에 관한 연구. *대한치주과학회지*, 1998;28:559-567.
 31. 설양조, 이재일, 이용무, 임윤탁, 김석영, 구영, 류인철, 함병도, 한수부, 최상목, 정종평: Biologic activities of calcium polyphosphate. *대한치주과학회지* 2000; 30:213-218.
 32. Baksh D, Davies JE, Kim S: Three-dimensional matrices of calcium polyphosphate support bone growth in vitro and in vivo. *J Mat Sci: Mater Med* 1998;9:743-748.
 33. YM Lee, YJ Seol, YT Lim, S Kim, SB Han, IC Rhyu, SH Baek, SJ Heo, JY Choi, PR Klokkevold, and CP Chung: Tissue engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices. *J Biomed Mater Res* 2001; 54: 216-223.
 34. Zander HA, Polson AM, Heijl LC. Goals of periodontal therapy. *J Periodontol* 1976;47:261-266.
 35. Han T, Carranza FA Jr, Kennedy EB. Calcium phosphate in dentistry: A review of literature. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr* 1984;10:88-108.
 36. Bissada NF, Hangorsky U. Alveolar bone induction: Alloplasts. *Dent Clin N Am* 1980;24:739-749.
 37. Frame JW, Browne RM, Brady CL. Hydroxyapatite as a bone substitute in the jaws. *Biomaterials* 1981;2:19-22.
 38. Levin MP, Getter L, Cutright DE, Bhaskar SN. Biodegradable ceramics in periodontal defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;38:344-351.
 39. Alderman NE. Sterile plaster of Paris as an implant in the intrabony environment. A preliminary study. *J Periodontol* 1969;40:11-13.
 40. Ganeles J, Listgarten MA, Evian CI. Ultrastructure of durapatite-periodontal tissue interface in human intrabony defects. *J Periodontol* 1986;57:133-140.
 41. Shaffer CD, App GR. The use of plaster of Paris in treating intrabony periodontal defects on humans. *J Periodontol* 1971;42:685-690.
 42. Ashman A, Bruin P. Prevention of alveolar bone loss postextraction with HTR grafting materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60:146-153.
 43. Kamen PR. Attachment of oral fibroblasts to HTR polymer. *Compend Supp* 1988;10:S350-S352.

44. Kwan JY, Mefert RM, Carr RF, Weir JC. Clinical and histologic evaluations of HTR alloplastic grafting material: Case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1990;10:281-287.
45. Froum SJ, Kushner L, Scopp IW, Stahl SS. Human clinical and histologic responses to durapatite implants in intraosseous lesions. Case reports. *J Periodontol* 1982;53:719-725.
46. Moskow BS, Lubarr A. Histologic assessment of human periodontal defect after durapatite ceramic implant. *J Periodontol* 1983;54:455-462.
47. Rabalais ML, Yukna RA, Mayer ET. Evaluation of durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects. I. Initial six-month results. *J Periodontol* 1981;52:680-689.
48. Jarcho M. Biomaterial aspects of calcium phosphates. *Dent Clinics N Am* 1986;30:25-47.
49. Bell R, Beime O. Effect of hydroxyapatite, tricalcium phosphate, and collagen on the healing of defects in the rat mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 1988;46:589-594.
50. Sugaya A, Minabe M, Hori T, Tatsmi J, Watanabe Y, Ikeda K, Numabe Y, Hayashi H, Kamoi K. Effects on the healing of tricalcium phosphate-collagen complex implants in periodontal osseous defects in the dog. *J Periodontol Res* 1990;25:60-63.
51. Nery EB, Eslami A, van Swol RL. Biphasic calcium phosphate ceramic combined with fibrillar collagen with and without citric acid conditioning in the treatment of periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1990;61:166-172.
52. Nery EB, Lee KK, Czajkowski S, Dooner JJ, Duggan M, Ellinger RF, Henken JM, Hines R, Miller M, Olson JW. A veterans administration cooperative study of biphasic calcium phosphate ceramic in periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1990;61:737-744.
53. Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue responses to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/BTCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1992;63:729-735.
54. White RA. Replamineform: A new process for preparing porous ceramic, metal, and polymer prosthetic materials. *Science* 1972;176:922-924.
55. Griffith, EJ. Acicular, Crystalline Calcium Metaphosphate. U.S. Patent 1982;4:360,625.
56. White EW, Weber JW, Roy DM, Owen EL, Chiroff RT, White RA. Replamineform porous biomaterials for hard tissue implant applications. *J Biomed Mater Res Symp* 1975;6:23-28.
57. White EW, Shors EC. Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. *Dent Clin N Am* 1986;30:49-65.

The effect of calcium metaphosphate bone graft materials on bone regeneration

Han-Seung Chae¹, Yong-Moo Lee¹, Seung-Min Yang^{1,2}, Sung-Soo Chun³, Suk-Young Kim³,
Young Ku¹, Chong-Pyoung Chung¹, Soo-Boo Han¹, Sang-Mook Choi¹, In-Chul Rhyu¹

¹Department of Periodontology, Graduate School, Seoul National University

²Department of Dentistry, College of Medicine, Sungkyunkwan University

³School of Material Science, College of Engineering, Youngnam University

Periodontal regeneration therapy with bone-substituting materials has gained favorable clinical efficacy by enhancing osseous regeneration in periodontal bony defect. As bone-substituting materials, bone powder, calcium phosphate ceramic, modified forms of hydroxyapatite, and hard tissue replacement polymer have demonstrated their periodontal bony regenerative potency. Bone-substituting materials should fulfill several requirements such as biocompatibility, osteogenicity, malleability, biodegradability. The purpose of this study was to investigate biocompatibility, osteo-conduction capacity and biodegradability of Na₂O, K₂O added calcium metaphosphate(CMP). Beta CMP was obtained by thermal treatment of anhydrous Ca₂(H₂PO₄)₂. Na₂O and K₂O were added to CMP. The change of weight of pure CMP, Na₂O-CMP, and K₂O-CMP in Tris-buffer solution and simulated body fluid for 30 days was measured. Twenty four Newzealand white rabbits were used in negative control, positive control(Bio-Oss), pure CMP group, 5% Na₂O-CMP group, 10% Na₂O-CMP group, and 5% K₂O-CMP group. In each group, graft materials were placed in right and left parietal bone defects(diameter 10mm) of rabbit. The animals were sacrificed at 3 months and 6 months after implantation of the graft materials. Degree of biodegradability of K₂O or Na₂O added CMP was greater than that of pure CMP in experimental condition. All experimental sites were healed with no clinical evidence of inflammatory response to all CMP implants. Histologic observations revealed that all CMP grafts were very biocompatible and osseous conductive, and that in K₂O-CMP or Na₂O-CMP implanted sites, there was biodegradable pattern, and that in site of new bone formation, there was no significant difference between all CMP group and DPBB(Bio-Oss) group. From this result, it was suggested that all experimental CMP group graft materials were able to use as an available bone substitution.

Key words ; bone substitution, K₂O-CMP, Na₂O-CMP, biocompatibility, osseous-conduction