

미세다공성 Biphasic calcium phosphate ceramics의 골이식 대체재로서의 기본특성에 대한 비교연구

박광범¹, 박진우^{2*}, 안연옥¹, 양동준¹, 최석규¹, 장일성³, 여신일², 서조영²

1. (주) 메가젠
2. 경북대학교 치과대학 치주과학교실
3. 경북대학교 치과대학 약리학교실

I. 서론

감염성 질환이나 외상, 임플란트 식립과 관련하여 잔존골량이 부족한 경우 결손된 골조직을 회복하기 위해 골이식술을 이용한 재건수술이 시행되어진다. 이를 위해 골유도재생술과 동반하거나 또는 단독으로 사용되는 여러 종류의 이식재중 자가골이 골형성, 골유도, 골전도의 성질을 모두 가진 이상적인 이식재로 평가되지만, 채득을 위한 부가적인 수술부위가 필요하고, 이로 인한 환자 불편과 합병증의 가능성이 증가하는 단점을 가진다¹⁻³⁾. 이러한 문제점으로 인하여 자가골을 대체하기 위한 여러 종류의 골이식재에 대해 많은 연구가 이루어져왔다. 이중 부분적으로 골유도능을 가지는 것으로 알려진 탈회동결건조골을 이용한 골이식술이 많이 시행되어져 왔다^{4,5)}. 하지만 골유도능을 가지는 것으로 알려진 골형성 단백질의 존재와 양에 대해 의문이 제기되었고, 질병 전염의 가능성을 전혀 배제할 수 없다는 문제점을 가지며, 또한 임상에서 사용시 부적절한 흡수율과 강도가 단점이 될 수 있다⁶⁻⁹⁾. 동종골 이식재와 더불어

어 최근에는 우골에서 단백질을 제거한 이종골 이식재¹⁰⁾, 생체유리와¹¹⁾ 여러 조성의 인산칼슘염과^{12,13)} 탄산칼슘염¹⁴⁾ 등의 질병전염의 가능성이 전혀 없는 합성골 이식재에 대한 연구가 광범위하게 이루어져 왔다.

특히 합성골 이식재에 관한 연구가 광범위하게 이루어지고 있으며, 전세계적으로 골재건수술에서 사용되는 이식재의 상당부분을 합성골 이식재가 차지하는 것으로 보고되었다¹⁵⁾. 합성골 대체재로 가장 일반적으로 이용되어지는 세라믹 재료중 인산칼슘계 재료는 골조직과 치아의 성분 및 구조와 유사하며, 생체친화성을 가지고 있기 때문에 골이식 재료로서 많은 연구가 이루어져 왔다^{16,17)}. 인산칼슘계 세라믹스중 수산화인회석(hydroxyapatite, HA)과 삼인산칼슘(tricalcium phosphate, TCP) 혹은 이 두 상을 혼합한 이상인산칼슘(biphasic calcium phosphate, BCP)은 우수한 생체친화성과 골전도성, 그리고 생분해성을 가지고 있어 현재까지 광범위하게 연구보고되고 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 이중 가장 안정적인 HA상과 용해도가 높은 β -TCP상이 혼합된 BCP가 치과와 정형외

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (A060412)

* 교신저자 : 박진우, 대구광역시 중구 삼덕동 2가 188-1 경북대학교 치과대학 치주과학교실, 700-412 (전자우편 : jinwoo@knu.ac.kr)

과에서 성공적인 골이식 대체재로 사용되고 있다^{19,20)}. BCP는 체내에서 점진적으로 분해되며 체액으로 방출된 칼슘, 인산염 이온이 국소적인 부위에서 체액의 과포화상태를 유발하여 세라믹 표면에 생물학적 아파타이트의 침전을 이루는 것으로 알려졌다^{21,22)}. 이러한 아파타이트층이 골형성 세포의 부착을 조장하고 BCP의 골전도성에 기여하는 것으로 보고되었다.

상기의 합성골 이식재들은 생체내에서의 흡수성이 물리화학적 성질에 따라 다르며, 이식재의 표면적, 미세형태, 다공성(porosity)의 정도와 결정화도(crystallinity)에 따라 분해 속도가 다르게 나타난다²³⁾. 일반적으로 결정화도가 유사한 경우 개개 이식재의 입자 크기가 큰 경우, 흡수와 관련하여 생체내 잔존기간이 비교적 길고, 치밀한 소결체가 아니면 마모입자(wear debris) 형성시 대식세포 반응을 유발하여 이로 인한 골 용해(osteolysis)발생의 가능성을 전혀 배제할 수는 없다²⁴⁾.

골이식재 자체에 존재하는 macropore가 골재생에 긍정적인 역할을 하는 것으로 알려졌지만, 골이식재 자체의 macropore의 크기나 수가 커질수록 골충진재의 강도가 감소할 수 있다는 단점을 가지며, macroporous structure외에 이식재의 조성, 마이크론 단위의 표면형태 등의 특성이 골재생에 영향을 미치는 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려졌다

^{25,26)}. 이와 관련하여 골이식재의 표면특성과 관련된 최근의 연구는 마이크론 단위의 미세다공성구조의 중요성을 강조하고 있다. 직경 10 μm 이하의 micropore는 이식재내부로의 체액순환을 용이하게 하여 용해와 분해에 영향을 미치고 골재생 과정에서 단백질 흡착, 세포부착과 광물화를 촉진하여 골조직 재생을 향상하는 가장 중요한 표면특성의 하나인 것으로 알려졌다.

본 연구에서는 macropore는 가지지 않지만, 골재생 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 삼차원적으로 연결된 micropore구조를 가진 결정화도가 높은 HA와 β -TCP상의 혼합된 조성을 가진 구형의 골이식 대체재를 제작하여, 동일한 조성의 BCP인 MBCP(Biomatlante, 프랑스)를 포함하여 현재 골증강술에 광범위하게 사용되고 있는 두 종류의 우골유래 이종골 이식재와 비교하여 향후 골이식 대체재로서의 적용을 위해 기본적인 물리화학적인 표면특성과 세포적합성을 평가하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. BCP의 제조

본 실험에 사용될 BCP분말(MGSB로 명명)은 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{HPO}_4$ 를 사용하여 침전법

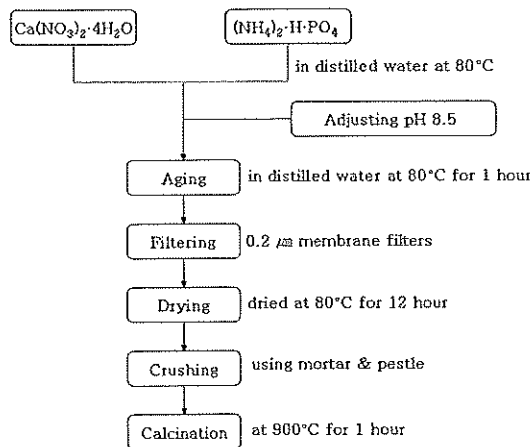


Figure 1. Flow chart of chemically precipitated BCP preparation procedure

(precipitation method)으로 제조하였다(Figure 1). BCP 분말을 합성하기 위하여 칼슘수용액에 인산수용액을 적하하면서 교반하였다. HA/TCP의 비율이 60 : 40이 되도록 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 분말과 $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{HPO}_4$ 분말을 Ca/P 비율에 적합하도록 사용하였다. HA/TCP에 다양한 비율로 제조된 BCP에 관해 많은 보고가 되고 있지만^{20,27}, 아직까지는 최적의 비율에 관해서는 알려져 있지 않다. 하지만 일반적으로 현재 정형외과 및 치과영역에서 많이 사용되어지는 비율은 HA = 60%, TCP = 40%의 비율이 많이 사용되어지는데, 이러한 비율에서 TCP의 용해성과 HA의 scaffold로서의 기계적 강도에서 좋은 조건이 된다는 보고를 참고하여 제조하였다^{16,19,20}. 각각의 분말을 완전히 용해시킨 후, 암모니아수를 첨가하여 pH를 8.5로 조절하였다. 혼합된 두 용액을 80°C에서 교반하면서 숙성시켰으며, pH 조절에 사용한 암모니아수를 제거하기 위하여 세척한 후, 0.2 μm 미세 필터에 통과시켰다. 이렇게 채득한 분말을 충분한 건조 후, 분쇄하였다. 분쇄된 분말은 전기로에서 900°C로 1시간동안 하소하여 BCP 분말을 제조하였다.

2. 글이식 대체제

상기의 과정을 통해 제작된 이식체인 MGSB를 동일한 BCP성분의 MBCP(Biomatlante, 프랑스)를 포함하여 아래와 같이 상용의 두 종류의 이중골 이식재와 물리화학적 특성 및 세포적합성을 비교, 평가하였다.

- ① MGSB(메가젠, 한국); 1 mm입자크기, 구형의 미세다공성 이식재, BCP
- ② MBCP(Biomatlante, 프랑스, lot number; 0803E106,); 1~2 mm입자크기, 다공성 이식재, BCP
- ③ Bio-Oss(Geistlich-Pharma, 스위스, lot number; 300401); 250~1000 μm 입자크기, 우골유래 망상골 이식재
- ④ BBP(오스코텍, 한국, lot number; 040603); 400~600 μm 입자크기, 우골유래 망상골 이식재

3. 평가 항목

1) 주사전자현미경 관찰

주사전자현미경(scanning electron microscope (SEM); S-4200, Hitachi, 일본)을 이용하여 이식재의 미세한 형태학적 특성을 관찰하였다.

2) 결정상과 구성 분석

평가에 사용된 이식재의 결정상을 평가하기 위하여, X-선 회절분석기(X-ray diffractometry(XRD); DMAX-2500, Rigaku Co, Ltd., 일본)를 사용하여 $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$)로 10° ~ 60° 까지 5°C/min의 속도로 측정하였고, 푸리에변환 적외선분광분석(Fourier-transform infrared spectroscopy(FTIR); DPX300, Bruker Co, Ltd., 독일)을 이용한 구조분석을 시행하였다.

3) 이식재내 칼슘/인산염의 비율

각기 이식재의 Ca와 P의 비율을 조사하기 위하여 유도결합 플라즈마 원자방출 분광분석기(Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP-AES); OPTIMA 3000, Perkin Emer Co, Ltd., 미국)를 사용하여, 표준용액으로 Ca 1000 (1004 mg/l), P 1000 (1006 mg/l) (Kanto Chem, Co, Inc, 일본)를 사용하여 정량분석 시행하였다.

4) 표면적 측정

시료의 표면적을 측정하기 위해 Brunauer-Emmett-Teller(BET)법을 이용한 비표면적/기공도 분석기(High Speed Gas Sorption Analyzer; Nova 2000-version 7.02, Quantachrome, 미국)를 이용하여 고온, 진공하에서 표면에 부착된 불순물을 제거한 시료에, 질소가스를 흡착시킨 후 흡착등온선으로부터 단위 질량당 표면적을 측정하였다.

5) 세포활성도/세포증식 평가

Mouse calvaria에서 유래한 MC3T3-E1 세포를 사용하여, 각기 이식재에 대한 세포활성도를 평가하

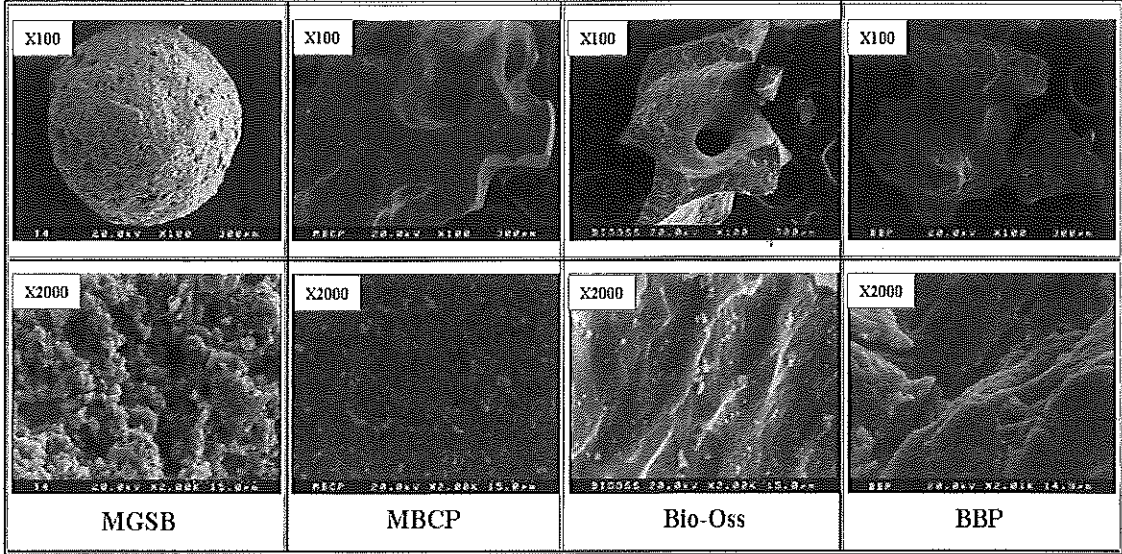


Figure 2. SEM images of different bone substitutes at magnifications of $\times 100$ (upper) and $\times 2,000$ (lower).

기 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazol blue) assay를 시행하였다. 배양된 세포를 well당 25 mg의 이식재가 함유된 24 well plate에 2×10^4 개로 세포를 접종하여 CO_2 배양기에서 37°C 에서 1, 4 일간 배양하였다. 각기 해당일에 배양액을 제거하고 인산완충생리식염수로 2회 세척하였다. 각기 well당 37°C 의 MTT용액 250 μl 를 첨가하고 같은 조건에서 3시간동안 배양하였으며, 750 μl 의 dimethyl sulfoxide를 첨가하여 혼합한 후 150 μl 씩의 용액을 이식재를 포함하지 않은 새로운 96 well plate로 옮기고 ELISA reader(Precision Microplate Reader, Molecular Devices, 미국)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포증식 평가를 위해 상기와 동일한 방법으로 3, 5, 7 일간 배양한 후 trypsin-EDTA처리후 세포를 수집하여 hemocytometer를 이용하여 증식된 세포수를 측정하였다.

각기 이식재에 대한 세포 활성도와 증식세포수의 차이에 있어서의 유의성을 one-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 통계분석 시행하였다.

III. 결과

1. 이식재의 주사전자현미경 관찰조건

각기 이식재의 주사전자현미경을 이용한 미세 형태학적 관찰에서 이식재 표면은 서로 다른 형태학적 특성을 나타냈다(Figure 2). 저배율 관찰조건에서 ($\times 100$) Bio-Oss, MBCP, BBP는 유사한 거시적 형상을 보여주며, macropore가 관찰된다. MGSB는 이와는 다른 완전한 구형을 보여주고 있다. 고배율의 소견에서($\times 2,000$) MGSB는 표면의 micropore가 삼차원적으로 서로 연결된 기공형태로 형성된 것을 관찰할 수 있고, MBCP에서보다 크고 명확한 마이크로 단위의 구조적 특징을 나타내었다.

2. 이식재의 결정상과 구성

X-선 회절분석의 결과 MGSB와 MBCP는 HA와 β -TCP가 혼합된 BCP 고유의 상을 나타내었고, Bio-Oss와 BBP에서는 HA의 상을 관찰할 수 있었다(Figure 3). MBCP는 보고되어진 것처럼 60 : 40의 HA와 β -TCP의 비율을 나타내었으며, MGSB도 MBCP와 유사한 비율을 나타내었다. 합성된 MGSB

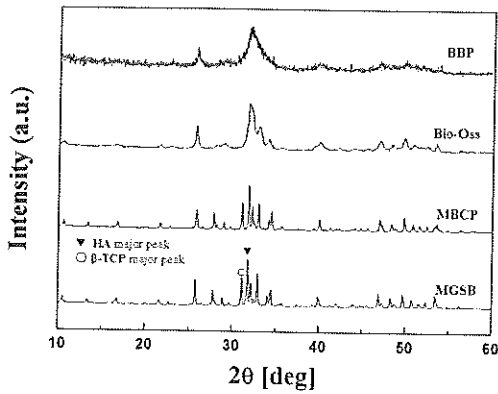


Figure 3. XRD patterns of different bone substitutes

의 경우 다른 2차상이 나타나지 않았으며, MBCP 역시 α -TCP 및 calcium oxide의 peak을 관찰할 수 없었다. Bio-Oss와 BBP는 HA의 peak을 보여주지만, BBP의 경우 결정화도가 Bio-Oss에 비해 낮은 것을 볼 수 있다.

FTIR 분석의 결과에서 이러한 2차상의 유무와 결정화 정도를 재확인할 수 있다(Figure 4). Bio-Oss와 BBP, MGSB와 MBCP가 전체적으로는 유사한 FTIR spectra를 형성하고 있다. 3000~3570 cm^{-1} 부근에서 모두 H_2O 의 흡수밴드(OH의 stretching vibration)를 관찰할 수 있지만, Bio-Oss와 BBP가 더 많이 형성되어져 있는 것을 보여준다. 특히, BBP의 경우 1640 cm^{-1} 부근에서도 H_2O 의 흡수밴드(OH의 bending vibration)가 관찰되었다. MGSB와 MBCP는 3573 cm^{-1} 와 631 cm^{-1} 에서 OH의 흡수밴드(stretching, bending vibration)를 관찰할 수 있는데, 이는 일반적으로 합성한 시료에서 볼 수 있는 전형적인 모습이다. 시료 모두 940~1120 cm^{-1} , 566 cm^{-1} , 603 cm^{-1} 에서 orthophosphate(PO_4)를 관찰할

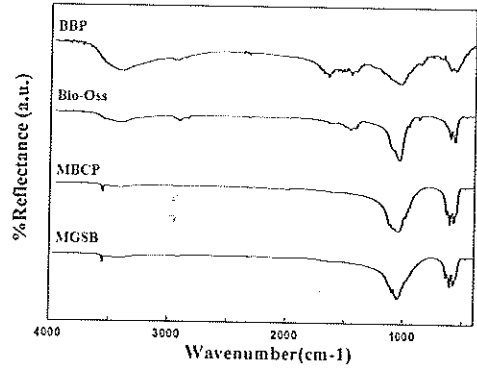


Figure 4. FTIR spectra of different bone substitutes

수 있지만, 이식제간의 차이점은 HPO_4 흡수밴드에서 확연히 구별된다. 880 cm^{-1} 영역에서 Bio-Oss와 BBP는 HPO_4 흡수밴드를 볼 수 있지만, MGSB와 MBCP는 이러한 흡수밴드를 관찰할 수 없다. HPO_4 흡수밴드는 비화학양론적인 HA가 존재하거나, 결정화도가 낮은 경우에서만 관찰할 수 있다. 또한, Bio-Oss와 BBP는 1450 cm^{-1} 에서 CO_3^{2-} 의 흡수밴드를 관찰할 수 있는데, carbonated apatite인 이중골 이식제와 합성에 의해 제작된 MGSB, MBCP와의 차이점을 FTIR spectra에서 확인할 수 있다.

3. 이식제내 칼슘/인산염의 비율

각기 시료내의 Ca와 P의 비율을 조사한 ICP-AES의 결과, X-선 회절분석 결과에서, HA의 상을 지니고 있는 Bio-Oss와 BBP가 MGSB 및 MBCP에 비해 다소 높은 Ca/P 비율을 형성하고 있는 것을 나타내었다(Table 1). Bio-Oss와 BBP는 동일한 우골 유래의 골이식 대체재이지만, Ca/P 비율이 차이가

Table 1. ICP-AES results of different bone substitutes

	Calcium concentration (mg/L)	Phosphorous concentration (mg/L)	Ratio of Ca to P
MGSB	18,13	8,404	1,687
MBCP	17,04	7,859	1,676
Bio-Oss	18,57	7,962	1,803
BBP	13,37	6,015	1,718

나며 이는 이식재 제작에 사용된 우골의 종(species), 나이, 골 유형에 의존하는 것으로 보고되었다²⁸⁾. MGSB와 MBCP는 HA의 화학양론적 비율인 1.67에 근접하지만, 이 재료들이 이상인산칼슘(biphasic calcium phosphate)인 것을 감안하면, 그 결과치가 어느 정도 높게 나온 것으로 추정할 수 있다.

4. 표면적 측정

BET법을 이용한 분석결과 이식재의 단위 질량당 표면적은 MGSB는 1.52 m²/g, MBCP는 3.04 m²/g, Bio-Oss는 75.21 m²/g, BBP는 2.79 m²/g로 측정되었다.

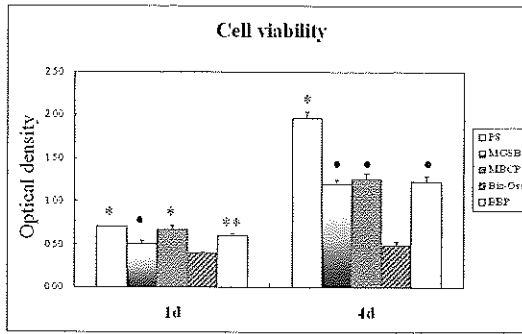


Figure 5. The optical density measured after 1 and 4d of culture at a wavelength of 570 nm by ELISA reader (n = 5 per group).

* statistically significant difference compared to other groups (p < 0.05),
 ** statistically significant difference compared to MGSB and Bio-Oss groups (p < 0.05),
 • statistically significant difference compared to Bio-Oss group at 1d of culture (p < 0.05), statistically significant difference compared to Bio-Oss group at 4d of culture (p < 0.05)

5. 세포활성도 평가

MTT assay를 이용한 세포활성도 평가에서 모든 군에서 1일에 비해 4일에 세포활성도의 증가 양상을 관찰할 수 있었다(Figure 5). 4일째 각 이식재에 대한 optical density는 polystyrene culture plate (PS)를 제외하면, MGSB, MBCP, BBP에서 유사한 수치를 나타내었으며, Bio-Oss는 다른 모든 이식재에 비해 현저히 낮은 optical density를 나타내었다 (p < 0.05).

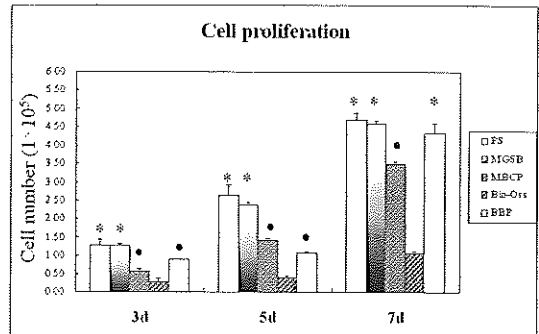


Figure 6. Cell proliferation measured at 3, 5 and 7d of culture (n = 3 per group).

* statistically significant difference compared to other bone substitutes at 3, 5 and 7d of culture (p < 0.05)
 • statistically significant difference compared to Bio-Oss group at 3, 5, and 7d of culture (p < 0.05)

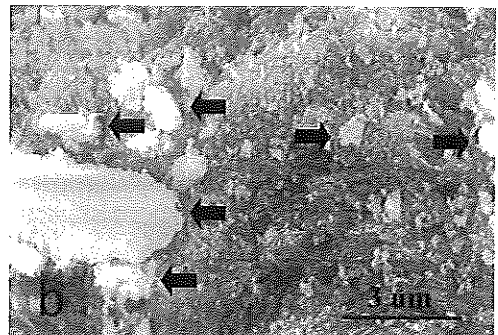
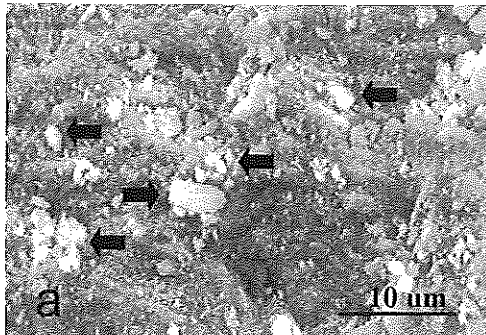


Figure 7. SEM images of Bio-Oss at magnifications of × 3,000(a) and × 10,000(b). Numerous microparticles(arrow) can be seen on the surfaces of Bio-Oss.

6. 세포증식 평가

각기 이식재에 대한 세포증식을 평가한 결과 3, 5, 7일의 배양기간동안 증식세포수는 시간이 경과함에 따라 증가하는 양상을 보였으며, Bio-Oss는 배양기간에 따른 세포증식이 가장 낮은 것을 나타내었다(Figure 6). 3, 5, 7일의 모든 평가기간에서 Bio-Oss는 다른 모든 이식재에 비해 현저히 낮은 증식세포수를 보였고($p < 0.05$), MGSB는 3, 5, 7일의 배양기간에서 PS와 유사한 증식세포수를 나타내었다. 동일한 조성의 BCP인 MGSB와 MBCP에 있어서 증식세포수는 각기 배양일에서 MGSB에서 더 높은 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$).

IV. 고찰

상실된 치아를 회복하기 위한 임플란트 시술의 증가와 더불어 골재건수술의 필요성 또한 증가한다. 임상에서 장기간의 성공적인 기능을 위해서 적절한 크기의 임플란트의 식립이 요구되며 이를 위해서 여러 종류의 골이식재를 사용한 골재건수술이 위촉된 치조제를 증강하기 위해 시행된다. 가장 이상적인 이식재인 자가골 이식재는 채득을 위한 부가적인 시술부위가 필요하며 이와 연관된 단점으로 인해 여러 종류의 골 대체재에 관해 많은 연구가 이루어져 왔다. 골유도능을 가지는 것으로 알려진 탈회동결건조 골과 우골에서 단백질 성분을 제거한 이종골 이식재를 사용한 골재건 수술에서 성공적인 결과가 보고되고 있으나 질병전염의 가능성을 전혀 배제할 수는 없다는 문제점을 가진다⁶⁻¹⁰. 골이식재와 관련된 최근의 연구는 이러한 문제점이 없는 합성골 이식재에 관해 광범위하게 진행되고 있는 추세이다.

일반적으로 골형성능이나 골유도능이 없이 단지 골전도성만 지니는 것으로 알려진 합성골 이식재는 신생골 형성을 증진하기 위하여 자가골과 적절한 비율로 혼합사용하는 것이 권장되었지만, 특히 임플란트 시술과 연관한 상악동 골이식술에서의 사용과 연관한 최근의 보고에서 합성골 이식재를 단독으로 사

용하더라도 자가골 단독사용이나 혼합사용시와 유사한 성공적인 결과를 얻을 수 있음이 보고되었다²⁹⁻³¹.

골이식재의 골유도능과 관련된 일련의 연구에서 이식재가 이소성골형성(ectopic bone formation)을 유도하기 위해서 화학적 조성 외에, 미세다공성의 표면구조(microporous surface structure)를 포함한 특정한 표면형태가 중요한 인자로 작용함이 제시되었다^{32,33}. 특정한 다공성 구조를 가지는 인산칼슘계 이식재가 골형성 세포나 골형성단백질의 첨가 없이도 중동물의 extraskeletal site에서 골형성을 유도하는 것으로 알려졌다³⁴⁻³⁶. 골형성과정에서 macroporous structure의 중요성과 더불어 Yuan 등³⁷은 macropore내면에 존재하는 micropore가 인산칼슘계 세라믹의 골유도능에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였다. 현재까지 이식재의 골유도능에 관한 정확한 기전은 설명되지 않았지만 칼슘과 인을 함유하는 인산칼슘계 세라믹의 화학적 조성, 상술한 이식재의 미세다공성구조와 적절한 용해도가 이에 기여하는 것으로 여겨진다. 인산칼슘계 세라믹의 화학조성은 생체환경내 존재하는 성장인자 등의 표면흡착을 조장하여 차후 표면에 부착된 골형성 전구세포들의 조골세포로의 분화를 촉진할 수 있는 것으로 제시되었고³⁸, 이식재 내면의 microporous structure역시 골형성 과정에 영향을 미치는 성장인자 등의 흡착과 흡입을 증가시켜 국소적인 부위에서 골형성에 영향을 미치는 특정수준까지의 골형성 인자들의 농도상승에 기여하는 것으로 알려졌다. 또한 타이타늄 임플란트에서의 연구에서와 같이 분화를 포함한 골형성세포의 반응이 이러한 미세구조(microstructure)에 영향을 받는 것은 잘 알려진 사실이다^{39,40}.

Daculsi 등^{21,22}은 용해도가 높은 β -TCP와 안정된 HA가 혼합된 micropore를 가진 BCP의 표면에 생물학적 아파타이트의 침전을 보고하였으며, 생체 내에서 이러한 아파타이트상에 골형성 전구세포에 의한 골형성이 촉진됨을 보고하였다. 상기의 많은 연구에서 알 수 있듯이 골이식재의 표면특성중 내면의 micropore의 존재는 골재생과정에 관여하는 중

요한 인자로 작용한다. 본 평가의 주사전자현미경 소견에서 관찰할 수 있듯이, MGSB는 수백 마이크로 직경의 macropore를 포함하는 macrostructure는 부여되지 않았지만, 삼차원적으로 잘 연결된 특징적인 micropore의 구조는 골형성 과정에서 성장인자 등의 내부 흡입을 촉진하여 이식재주위로의 국소적인 농도를 증가함으로써 골형성을 증진할 수 있는데 기여할 것으로 기대된다.

이상적인 골이식재는 이식부에서 신생골에 의해 완전히 대체되어야 하고, 이를 위해 적절한 생분해성과 골전도성이 합성골 이식재에서 요구된다. 이러한 이유로 인해 인산칼슘계 세라믹중 가장 안정된 상인 HA는 생체에서 용해율이 너무 낮고, 반면 β -TCP는 용해율이 너무 높아 단독사용시 적절한 골재생의 결과를 얻을 수 없는 것으로 알려졌다. 인산칼슘계 세라믹중 두 가지 상의 장점이 혼합된 BCP가 생체내에서 최적의 골전도성을 나타내기 위한 HA와 β -TCP의 혼합비에 대해서는 명확히 알려지지 않았으나, 동일한 혼합비를 가진 경우에서보다 65 : 35와 85 : 15의 조성일 경우 뛰어난 골전도성이 보고되었으며²⁰⁾ 대략 60 : 40의 HA와 β -TCP의 비율이 적절한 것으로 알려졌다.^{25,41,42)} 본 연구에서 이식재의 특성평가를 통해 MGSB는 MBCP와 유사한 혼합비를 가진 것으로 나타났다.

이식재의 표면적 측정을 위해 시행된 BET분석결과 Bio-Oss는 다른 문헌에서⁴³⁾ 보고된 $79.7\text{m}^2/\text{g}$ 과 유사한 수치인 $75.21\text{m}^2/\text{g}$ 를 나타내어 가장 높은 표면적을 보였고, 이는 지난 연구에서보다 높은 값을 나타내어 측정에 사용된 제품별로 어느 정도의 차이가 있음을 보여주었다⁴⁴⁾. 이에 비해 Bio-Oss와 동일하게 우골에서 유래한 이종골 이식재인 BBP의 표면적은 $2.79\text{m}^2/\text{g}$ 으로 Bio-Oss와 비교시 현격한 차이를 나타내었다. MBCP는 문헌상 보고된 $1.8\text{m}^2/\text{g}$ 보다 다소 높은 $3.05\text{m}^2/\text{g}$ 의 표면적을 나타내었고, MGSB는 이보다 낮은 $1.52\text{m}^2/\text{g}$ 의 표면적 수치를 나타내었다. 이는 문헌에서 보고된⁴³⁾ 다른 합성골 이식재인 생체활성유리인 Biogran의 $0.2\text{m}^2/\text{g}$, Perioglass의 $0.6\text{m}^2/\text{g}$, β -TCP인 Cerasorb의 $1.2\text{m}^2/\text{g}$ 보다는

높은 수치이지만 동일한 성분인 MBCP와 비교시 낮은 수치로 이러한 차이는 MGSB가 MBCP에서의 macroporous structure를 부여하지 않은 구형 입자인 거시적구조의 차이에서 기인하는 것으로 생각된다. 한편 동일한 구형의 이식재인 Cerasorb보다 증가된 표면적 수치는 두 이식재간 micropore의 구조적 차이와 연관이 있을 것으로 생각되지만, 향후 이와 관련된 추가적인 분석이 필요할 것으로 생각된다.

MTT assay를 이용한 세포 생활력 평가에서 Bio-Oss를 제외한 세 종류의 골이식재는 시간경과에 따른 optical density의 명확한 증가를 관찰할 수 있었으며, polystyrene culture plate를 제외하면, MGSB, BBP, MBCP는 배양 4일째 세포생활력에서 유사한 결과를 나타내었다. 이에 비해 Bio-Oss에서는 1, 4일에서 다른 이식재에 비해 현저히 낮은 optical density를 나타내었고, 특히 배양 4일째에서 1일에서와 비교시 큰 차이를 나타내지 않았다. 이는 세포증식평가의 결과에서도 유사한 양상을 나타내어 3, 5, 7일의 배양기간 동안 뚜렷한 세포수 증식을 나타낸 다른 이식재에서와 달리 Bio-Oss에서는 그 증가양상이 완만하였고, 각기 배양일에서의 증식세포수 또한 다른 이식재와 비교시 현저히 낮은 것을 관찰할 수 있었다. 이는 다른 이식재에서와는 달리 Bio-Oss표면의 무수한 잔존 microparticle의 존재가 적절한 세포부착과 증식을 저해한 결과인 것으로 보인다(Figure 7). MGSB는 증식세포수에 있어 polystyrene culture plate와 유사한 수치를 나타내었으며, Bio-Oss를 제외한 다른 이식재에서와 같이 시간이 경과함에 따라 증가된 세포활성도와 세포증식을 보여 조골세포의 성장에 적절한 환경을 제공하는 것으로 평가된다.

본 연구에서는 향후 상약동 골이식술을 포함한 비교적 많은 부피의 골증강술이 필요한 부위에서 사용하기 위해 HA와 β -TCP가 60 : 40의 비율로 혼합된 삼차원적으로 연결된 micropore의 특징적인 구조를 가진 구형의 BCP인 MGSB를 제조하여 그 특성을 평가하였다. MGSB의 골이식 대체재로서의 기본 특성을 평가하기 위하여 동일한 조성의 MBCP와 현

재 골증강수술에서 많이 사용되고 비교적 우수한 결과가 보고되고 있는 우골유래 이중골이식제인 Bio-Oss와 이와 유사한 BBP를 이용하여 물리화학적 표면특성과 세포생활력을 포함한 세포적합성을 비교, 평가한 결과 MGSB가 골이식 대체재로서의 적절한 요구조건을 충족하는 것으로 나타났다. 하지만 제조된 골이식제인 MGSB에 부여된 삼차원적인 연결상을 가진 micropore의 생물학적 효과와 동물실험을 통한 골재생능의 평가를 위해 향후 추가적인 연구가 요구된다.

V. 결론

삼차원적으로 잘 연결된 micropore의 구조가 부여된 60 : 40의 HA와 β -TCP의 조성을 가지는 BCP인 MGSB는 골이식제로 사용하기 위한 적절한 물리, 화학적 특성을 나타내었으며 골형성세포의 성장에 적합한 생물학적 환경을 제공하였다. 본 연구에서의 시험관적 평가는 비교적 단기간의 제한적 평가로 좀더 진전된 평가가 필요하며, 특징적인 형태와 연결성을 가진 micropore가 부여된 BCP의 생체 내 골재생 과정에서 생물학적 효과를 확인하기 위해, 향후 동물 실험을 통해 신생골 형성을 포함한 골재생양상의 평가가 요구된다.

VI. 참고문헌

1. Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1995;15:10-29.
2. Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003;5:154-160.
3. Marx RE, Morales MI. Morbidity from bone harvest in major jaw reconstruction: a randomised trial comparing the lateral anterior and posterior approaches to the ilium. *J Oral Maxillofac Surg* 1988;48: 196-203.
4. Mellonig JT. Bone allografts in periodontal therapy. *Clin Orthop* 1996;324:116-125.
5. Rosenberg E, Rose LF. Biologic and clinical consideration for autografts and allografts in periodontal regeneration therapy. *Dent Clin North Am* 1998;42:467.
6. Quattlebaum JB, Mellonig JT, Hensel NF. Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft in human periodontal defects. *J Periodontol* 1988;59:394-397.
7. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol* 1996;67:918-926.
8. Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependant on donor age but not gender. *J Periodontol* 1998;69:47-478.
9. Summitt MC, Reisinger KD. Characterization of the mechanical properties of demineralized bone. *J Biomed Mater Res* 2003;67: 742-750.
10. Zitzmann NU, Scharer P, Marinello CP, Schupbach P, Berglundh T. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: A histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001;21:289-295.
11. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polack JM. Ionic dissolution products of bioactive glass increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:461-465.

12. Mangano C, Bartolucci E, Mazzocco C. A new porous hydroxyapatite for promotion of bone regeneration in maxillary sinus augmentation: clinical and histologic study in humans. *Clin Oral Implants Res* 2003;18:23-30.
13. Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, et al. Sinus floor augmentation with β -tricalciumphosphate (β -TCP): does platelet-rich plasma promote its osseointegration and degradation? *Clin Oral Implants Res* 2003;14:213-218.
14. Papacharambous SK, Anastasoff KI. Natural coral skeleton used as onlay graft for contour augmentation on the face. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1993;22:260-264.
15. Lewandrowski K, Gresser JD, Wise DL, Trantolo DJ. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities. *Biomaterials* 2000;21:757-764.
16. Daculsi G, Passuti N, Martin S, et al. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. *J Biomed Mater Res* 1990;24:379-396.
17. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 1981;157:259-278.
18. Bagambisa FB, Joos U, Schilli W. Mechanism and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* 1993;27:1047-1055.
19. Cavagna R, Daculsi G, Bouler JM. Macroporous calcium phosphate ceramic: a prospective study of 106 cases in lumbar spinal fusion. *J Long Term Eff Med Implants* 1999;9:403-412.
20. Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta-TCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1992;63:729-735.
21. Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch L, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res* 1989;23:883-894.
22. Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int* 1990;46:20-27.
23. Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 1993;2:158-167.
24. Sun JS, Lin FH, Hung TY, et al. The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *J Biomed Mater Res* 1999;45:311-321.
25. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998;19:133-139.
26. Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous titanium metal. *Biomaterials* 2004;25:443-450.
27. Hashimoto-Uoshiina M, Ishikawa I, Kinoshita I, Weng HT, Oda S. Clinical and histologic observation of replacement of biphasic calcium phosphate by bone tissue in monkeys. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1995;15:204-213.
28. LeGeros RZ. Calcium phosphate in Oral Biology and Medicine. In Meyers H (ed). *Monographs in Oral Sciences Vol 15*. Basel, Karger 1991.
29. Froum SJ, Tarnow DP, Wallace SS, Rohrer MC, Cho SC. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix(Osteograft/N)

- with and without autogenous bone: A clinical, histologic, radiographic and histomorphometric analysis-Part 2 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18:529-543.
30. Hallman M, Sennerby L, Lundgren S. A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:635-643.
 31. Tadjedin ES, de Lange GL, Holzmann PJ, Kuiper L, Burger EH. Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:334-344.
 32. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, et al. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 2005;26:3536-3575.
 33. Yuan H, Yang Z, Li Y, et al. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:723-726.
 34. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 1995;16:31-35.
 35. Yang Z, Yuan H, Tong W, et al. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials* 1996;17:2131-2137.
 36. Yuan H, Li Y, de Bruijn JD, de Groot K, Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials* 2000;21:1283-1290.
 37. Yuan H, Kurashino K, de Bruijn JD, et al. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1999;20:1799-1806.
 38. de Groot J. Carriers that concentrate native bone morphogenetic protein in vivo. *Tissue Eng* 1998;4:337-341.
 39. Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, et al. Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21:719-725.
 40. Sammons RL, Lumbikanonda N, Gross M, Cantzler P. Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration. A scanning electron microscopic study. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:657-666.
 41. Ellinger RF, Nery EB, Lynch KL. Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramic. a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1986;6:22-33.
 42. Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998;19:133-139.
 43. Wenz B. Characteristics of Bio-Oss and Bio-Gide. In: Maiorana C & Simion M, editor. *Advanced techniques for bone regeneration with Bio-Oss and Bio-Gide*. Seoul, Daehan publishing, 2003. p. 75
 44. 박진우. 탈단백 우골의 골이식 대체재료로서의 특성에 대한 평가: 세 종류의 골 대체재의 기본 특성에 대한 비교분석. *대한치주과학회지* 2005; 35:863-875.

Comparative study on the physicochemical properties and cytocompatibility of microporous biphasic calcium phosphate ceramics as a bone graft substitute

Kwang-Bum Park¹, Jin-Woo Park², Hyun-Uk Ahn¹, Dong-Jun Yang¹,
Seok-Kyu Choi¹, Il-Sung Jang³, Shil-Il Yeo², Jo-Young Suh²

1. Megagen Co., Ltd.
2. Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyungpook National University
3. Department of Pharmacology, College of Dentistry, Kyungpook National University

Objective : The purpose of this study was to evaluate the physicochemical properties and cytocompatibility of microporous, spherical biphasic calcium phosphate (BCP) ceramics with a 60/40 hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate weight ratio for application as a bone graft substitute.

Materials and Methods : Microporous, spherical BCP granules (MGSB) were prepared and their basic characteristics were compared with commercially available BCP (MBCP; Biomatlante, France) and deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss; Geistlich-Pharma, Switzerland, BBP; Oscotec, Korea). Their physicochemical properties were evaluated by scanning electron microscopy, X-ray diffractometry, Fourier-transform infrared spectroscopy, inductively coupled plasma atomic emission spectrometer, and Brunauer-Emmett-Teller method. Cell viability and proliferation of MC3T3-E1 cells on different graft materials were evaluated.

Results : MGSB granules showed a chemical composition and crystallinity similar with those in MBCP, they showed surface structure characteristic of three dimensionally, well-interconnected micropores. The results of MTT assay showed increases in cell viability with increasing incubation times. At 4d of incubation, MGSB, MBCP and BBP showed similar values in optical density, but Bio-Oss exhibited significantly lower optical density compared to other bone substitutes ($p < 0.05$). MGSB showed significantly greater cell number compared to other bone substitutes at 3, 5, and 7d of incubation ($p < 0.05$), which were similar with those in polystyrene culture plates.

Conclusion : These results indicated the suitable physicochemical properties of MGSB granules for application as an effective bone graft substitute, which provided compatible environment for osteoblast cell growth. However, further detailed studies are needed to confirm its biological effects on bone formation in vivo.

Key words : biphasic calcium phosphate, micropore, bone substitute, surface characteristics