

다양한 형태의 다공질 Calcium Polyphosphate의 생분해성에 관한 장기적인 연구

양승민^{1,2} · 설양조^{1,2} · 계승범^{1,2} · 이인경¹ · 이철우¹ · 김석영³ · 이용무¹
구 영¹ · 한수부¹ · 정중평¹ · 최상묵¹ · 류인철¹

¹서울대학교 치과대학 치주과학교실

²성균관대학교 의과대학 치과학교실

³영남대학교 공과대학 재료금속공학부

I. 서론

파괴된 치조골을 재생시키고 결합조직 부착을 회복시키는 것은 여전히 치주치료에 있어서 관심분야 중의 하나이다. 치주조직재생을 도모하기 위한 전통적인 기술방법으로는 여러 가지 골이식재를 이용한 골이식술이 오래 전부터 이용되고 있다. 현재 임상에서 일반적으로 사용되고 있는 골이식재는 합성골, 이종골, 동종골, 및 자가골로 나눌 수 있다. 자가골 이식술은 수년간 치조골 결손부위 사용시 임상적으로 성공적인 결과를 나타내었으나¹⁾, 추가적인 수술부위가 필요하고^{2,3)}, 결손부가 여러 부위이거나 큰 경우 충분한 양을 얻을 수 없다는 제한점이 있다. 동종골의 경우도 골유도능을 가진 골형성단백(bone morphogenetic protein)의 존재에 의한 골재생효과를 기대하고 있지만 그 존재 및 효과에 대해서는 불명한 실정이며⁴⁾, 일부 질환의 전염가능성을 완전히 배제하지 못한 등의 단점이 있다. 이러한 문제들 때문에 충분한 양을 쉽게 얻을 수 있고 질병의 전염 가능성이 없는 인공합성골이 오래 전부터 개발되어 사용되고 있다. 대표적인 인공합성골로서 인산칼슘계 이식재와 poly-

mer⁵⁾, bioglass⁶⁾, calcium carbonate⁷⁾등의 이식재들이 사용되고 있고, 이들을 이용한 일부 성공적인 임상결과들이 보고되고 있다. 하지만, 이들에 대한 최근의 평가들을 보면, 조직학적으로 이들은 진정한 의미의 골유도성은 없는 것으로 확인되고 있으며 대부분 결합조직 개재에 의해 골조직과는 분리되는 단순히 '생 적합성이 있는 충전재'(biocompatible filler)에 불과한 것으로 인정되고 있다⁸⁾. 따라서 골친화성이 보다 우수하고 골재생에 맞추어 적절히 흡수되어 재생골로 치환될 수 있는 흡수성 골이식재가 필요한 상황이다.

동종골 이식재와 더불어 현재 치주조직재생에 가장 흔히 사용되는 것이 bioceramics 제재이다. 그 중 화학적으로, 결정구조학적으로 골의 무기물과 유사한 calcium phosphate 계통에 관심이 모아지고 있으며⁹⁾ 이는 생체 적합성이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 그렇지만, 골에 비해서 선천적으로 부서지기 쉬운 점¹⁰⁾과 골이 remodeling될 때 흡수가 일어나지 않는¹¹⁾ 단점 등으로 그 사용이 제한되어져 왔다. 그러나 골의 화학구조와 유사하며 상대적으로 강한 경도를 가지는 Calcium Polyphosphate (CPP;[Ca(PO₃)_n])는 무기질 고분자로서 4개 이상의 동질이상(α β γ, δ)이

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

있고 모두 [O-P-O-]를 골격으로 하는쇄상구조를 갖는다. 이 중에서쇄상의 길이가 가장 길고 생화학적으로 가장 안정한 β 형의 CPP는 열처리 방법에 따라 무결정질 혹은 결정질을 얻을 수 있고 제조방법 혹은 CPP상에 따라 생분해 속도를 조절할 수 있다¹²⁻¹⁴. 이전 실험에서 단기적인 관찰이긴 하지만 신생골의 형성이 이식재 주위에서 일어나고 이식재의 흡수가 진행되고 있음을 관찰하였다¹⁵.

이번 연구의 목적은 골친화성 및 골전도성이 우수한 CPP로 제조공정의 변화를 통해 형성한 다양한 형태의 CPP에 대해서 장기적인 관찰기간 동안 흡수가 일어나면서 완전히 신생골로 치환되는지의 여부와 생체 반응을 조직학적으로 관찰하는 것이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료 및 대상

1) 다공질 Calcium Polyphosphate의 제조

무수 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$ 를 condensation하여 무결정의 $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ 를 얻고 이를 용융하고 냉각시킨 후 분쇄하여 450-550 μm 의 크기를 가지는 CPP powder를 얻었다¹⁶. 이렇게 제작한 CPP powder에 10%와 15%의 Na_2O 를 첨가하였다. 다공성의 CPP 블록은 이와 김¹⁷)이 기술한 바의 polyurethane(PU)스펀지를 이용하여 PU를 소환하는 방법으로 sponge 형태의 0.3-1mm의 소공의 크기를 가지는 다공질 CPP블록을 제작하였다.

2) 실험동물

생후 3세된 체중 15kg의 수컷 비글견을 사용하였고 실험 전 치주조직은 임상적으로 양호하였고 전신적 질환이 없는 상태였다. 실험시작 전 5일간 spiramycin과 metronidazole을 전신투여하였다.

2. 실험방법

1) 실험동물의 준비

실험동물은 Ketamine HCl(Ketalar[®], 유한양행, 한국)5mg/kg을 죽근내에 주사하여 진정시키고 5% lac-

tated Ringer's solution(100cc/hour)를 죽근정맥에 외과적 술식이 끝날때까지 투여하였으며 전신마취의 유지를 위해 Ketamine HCl(0.1mg/kg, IV)과 Xylazine HCl(Rompun[®], 한국 바이엘, 0.1mg/kg, IM)을 평균 20분 간격으로 투약하였다.

2) 외과적 수술과정

전신마취후 상악 제2, 3 소구치부위와 하악 제2, 3, 그리고 제4소구치 부위에 치은열구 절개를 하여 전층 판막을 거상하고 Carborundum disc와 dental bur를 이용하여 치근이개부를 분리한 후, 치근과 주위 치조골이 파절되지 않도록 하여 발치하였다. 발치와는 큐렛을 이용하여 남아있는 치주인대를 모두 제거하였고 발치와의 근심은 대조군으로 남겨두었고 원심에는 생체재료를 이식하였다. 판막으로 이식재와 발치와를 충분히 덮을수 있도록 한 후 Mersilk[®] (Ethicon Co., U.K.)를 이용하여 봉합하였다. 술후 감염방지를 위하여 이틀간 세팔로스포린(15mg/kg, b.i.d.)를 근육 주사하고 술후 2주후에 봉합사를 제거하였다.

3) 조직학적 검사

실험동물은 수술 12개월에 전신마취하여 희생시켰다. pH 7.4 phosphate buffer를 이용한 2% paraformaldehyde와 2.5% glutaraldehyde의 혼합액을 이용해 두부를 관류 고정하고 실험부위를 포함한 악골절편을 적출하여 다시 위의 혼합액에서 고정하였다. 통법에 따라 수세 및 탈수하고 spurred low viscosity media (Polyscience Inc., USA)로 포매한 후 Exakt cutting and grinding system(Exakt-Apparab, Germany)으로 절단,연마하여 30 μm 두께의 비탈회 연마표본을 제작하였다. 제작된 표본은 multiple 염색 및 HE 염색을 시행한 후 광학현미경하에서 조직학적 관찰을 실시하였다.

III. 결과

1. 대조군

전 실험기간 동안 대조군에서는 육안적인 염증이

없었으며 정상적인 치유상태를 보였다. 발치와는 골형성이 관찰되었고 결합조직의 계재는 보이지 않았다.

2. CPP powder와 블록

두 표본 모두에서 신생골의 형성이 관찰되었으며, CPP powder 표본에서는 CPP 블록 표본에 비해서 다량의 신생골이 형성되었다. CPP 블록에서는 이식재 주변으로 결합조직의 계재가 관찰되었고 고배율 관찰결과 염증세포의 침윤이 이식재 주위에서 거의 나타나지 않았다.

3. 10% Na₂O CPP granules

3개월과 12개월 조직소견에서 염증세포의 계재없이 정상적인 치유상태를 보였다. 신생골의 형성이 뚜렷이 발견되었고 이식재 주위로 많은 신생골이 형성되어 이식재를 둘러싸고 있고, 12개월 표본에서는 이식재 주위에 골수 조직이 다량 분포하고 있는 것이 관찰되었다. 고배율 관찰결과 이식한 CPP granule 주위로 염증세포의 침윤이 3개월 표본에서는 거의 관찰되지 않으나 12개월 표본에서는 이식재 주위로 염증세포가 다량 관찰되는 것이 보인다(Figure 4, 5, 6).

4. 15% Na₂O CPP granule

10% Na₂O CPP granules과 마찬가지로 염증세포의 계재없이 정상적인 치유상태를 보였다. 이식재 주위 신생골의 형성은 12개월 표본에서 3개월 표본에 비해 두드러졌고, 골면과 이식재의 융합이 보이지 않는 부분은 골수 조직으로 대체되었다. 고배율에서는 10% Na₂O CPP granules 조직소견과는 달리 3개월 표본에서 염증세포의 침윤이 다량 관찰되었다(Figure 7, 8, 9).

IV. 고찰

치주질환 치료의 궁극적인 목적은 파괴적으로 진

행된 치주염에 의해 상실된 치주조직의 재생이라고 할 수 있다. 치조골 결손부에 사용되는 이식재의 선택에 있어서 Schallhorn¹⁸⁾은 생물학적 적합성, 예측성, 임상적 실행가능성, 최소한의 수술 위험성 및 후유증 등의 조건을 내세웠으나 이상의 모든 조건을 만족시키는 이식재를 찾는다는 것은 어렵다고 하였다. 골이식재료는 기본적으로 면역반응이나 염증반응을 야기하지 않는 생적합성, 재생골로 적절히 치환될 수 있는 흡수성, 골전도성이나 골유도성, 소독가능성, 방사선 불투과성, 골과 비슷한 강도, 경제성 등이 요구된다. 이러한 이유에서 골과 화학적 성분이 유사한 재료를 찾게 되었고 HA나 TCP등의 인산칼슘계 세라믹 재료가 합성골 이식재료로서 가장 많이 개발, 사용되고 있다.

본 연구에서 시험된 CPP는 [-O-P-O-]를 골격으로 하는쇄상구조를 갖는 무기질 고분자이다. 이는 열처리 방법과 제조공정에 따라 여러 가지 형태로 가공이 가능하고 흡수속도도 조절이 가능하다¹²⁻¹⁴⁾. 이전 연구¹⁵⁾의 결과 CPP granules은 골친화성 및 골전도성이 우수하고 별다른 이물반응이나 염증반응 없이 조직과 잘 융화되는 소견을 보였다. 그러나 기존의 세라믹 재료와 마찬가지로 흡수속도가 지나치게 느리다는 단점을 보완하기 위해서 제조공정의 변화를 통해 흡수속도를 증진시킬 필요가 제기되었다.

본 실험에서 아무 첨가물이 없는 CPP powder와 블록의 표본에서 신생골의 형성이 관찰되었다. 이것은 CPP 자체가 가지는 골유도성과 골전도성을 나타내는 것이라 할 수 있다. CPP powder와 블록은 모두 느린 흡수를 보인다. CPP powder에 비해서 CPP 블록은 신생골의 형성이 적고 결합조직의 계재를 보이는데 이것은 블록의 크기가 CPP powder에 비해 커서 이식재가 골결손부위로의 골전구세포유주를 물리적으로 방해할 가능성과, 치밀한 재생골의 확장에 오히려 장애가 되기 때문으로 생각된다.

아무 첨가물이 없는 CPP의 흡수를 촉진시키기 위해서 본 실험에서는 Na₂O를 첨가하였다. 10% Na₂O CPP granules와 15% Na₂O CPP granules를 비교했을 때 두 군 모두 신생골의 형성이 관찰되었고 흡수 소견도 보였다. 그러나 첨가된 Na₂O의 함량에 비례하

여 신생골의 형성이 차이가 나지만²¹⁾ 흡수속도는 비례하지 않았다. 10% Na₂O CPP granules 표본에서는 3개월에 비해서 12개월에 염증세포의 침윤이 지속적으로 이루어지는 것으로 보아 지속적인 흡수가 발생한 것을 알 수 있으나, 15% Na₂O CPP granules에서는 오히려 3개월 소견에서 염증세포의 침윤이 많이 관찰되고 12개월에서는 흡수의 소견이 거의 관찰되지 않았다. CPP의 분해속도는 calcium phosphate의 침착과 관련이 있으며, 결정성 CPP에서는 calcium phosphate의 침착이 거의 일어나지 않는다. 이번 연구에서 제조과정 중에 CPP granules에 Na₂O를 첨가한 것은 무결정의 CPP비율을 증가시키기 위함이고, 이렇게 증가된 무결정 CPP의 분해는 결정성 CPP에 비해서 빠르다. calcium phosphate의 침착이 무결정의 CPP에서 일어나므로 신생골의 형성이 촉진되나 분해속도는 Na₂O의 첨가로는 해결되지 않았다.

또 단기간의 관찰보다 장기간의 관찰에서 지방세포로 이루어진 골수 조직이 다량 관찰되었는데 이것은 이식재의 흡수가 일어나면서 완전히 신생골로 치환되지 않은 것을 암시한다.

이러한 결과에도 불구하고 CPP는 골유도성과 골전도성을 보이는 골이식재로서의 가능성을 보여 주었으며, 적절한 첨가물과 이에 알맞은 혼합비를 결정하여 흡수속도를 조절할 수 있도록 좀 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

V. 결론

본 연구에서 시험된 CPP는 [-O-P-O-]를 골격으로 하는쇄상구조를 갖는 무기질 고분자이다. 이는 열처리 방법과 제조공정에 따라 여러 가지 형태로 가공이 가능하고 흡수속도도 조절이 가능하다. 이번 연구의 목적은 골친화성 및 골전도성이 우수한 CPP로 제조공정의 변화를 통해 형성한 다양한 형태의 CPP에 대해서 장기적인 관찰기간 동안 흡수가 일어나면서 완전히 신생골로 치환되는지의 여부와 생체 반응을 조직학적으로 관찰하는 것이다. CPP는 골친화성 및 골전도성이 우수하다는 것이 알려져 있고 흡수가 일어나고 있다는 것을 알 수 있다. Na₂O의

첨가는 신생골의 형성을 촉진시키나 분해속도는 조절되지 않았다.

이 연구의 결과 CPP가 단순한 조직적합성을 가지는 충전재이기 보다는 골이식재로서의 가능성을 보여 주었으며, 적절한 첨가물과 이에 알맞은 혼합비를 결정하여 흡수속도를 조절할 수 있도록 좀 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

VI. 참고 문헌

1. Brunsvold MA, Mellonig JT. Bone grafts and periodontal regeneration, *Periodontol* 2000, 1:80-91, 1983
2. Hiatt MA, Schallhorn RG, Aaronian AJ. The induction of new bone and cementum formation:IV. Microscopic examination of the periodontium following human bone and marrow allograft, autograft, and non-graft regenerative procedures, *J Periodontol*, 49:495-512, 1978
3. Shallhorn RG. Postoperative problem associated with iliac transplant, *J Periodontol* 43:3-9, 1972
4. Mellonig J, Schwartz Z, Carnes D, De La Pontaine J, Cochran D et al. Ability of commercial DFDB to induced new bone formation, *J Dent Res* 1995;74(special issue): 97
5. Yukna RA. Clinical evaluation of HTR polymer bone replacement grafts in human mandibular Class II molar furcations, *J Periodontol* 65:342-349, 1994
6. Zomet JS, Dabar UR, Griffiths GS, Bulman JS, Bragger U et al. Particulate bioglass as a grafting material in treatment of periodontal infrabony defects, *J Clin Periodontol* 24:410-418, 1997
7. Yukna RA. Clinical evaluation of coralline carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects, *J Periodontol* 65:177-185, 1994
8. Garrett S. Periodontal regeneration around natural teeth, *Ann Periodontol* 1:621-666, 1996

9. Vivek S, Han T. Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. *Dent Clin North Am* 521, 1991(July)
10. Ratner BK, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, Hench IL. *Biomaterial Science*. Academic Press 1996
11. Yamamuro T, Hench IL, Wilson J, Davies JF, Brady J. *Handbook of Bioactive Ceramics 2*. CRC Press 1990
12. Andriano KP, Daniels AJ. Biocompatibility and mechanical properties of an totally absorbable composite material for orthopedic fixation devices. *J Appl Biomat* 3;197-206 1992
13. Latour RA. Fiber-reinforced composites biomaterials for orthopedic implant applications. *Encyclopedia of Biomaterials and Bioengineering* 359-382 1995
14. Gross JM, Lickfield GC, Latour RA. Calcium phosphate reinforced bioabsorbable polymer composites. *Prec 23rd meeting of biomat* 159 1997
15. 양승민, 이영규, 한은영, 김석영, 계승범 등 다공질 Calcium Polyphosphate의 생분해성에 관한 연구 *대한치주과학회지* 31(3); 555-564 2001
16. Lee J, Kim S. In transaction of 5th world biomaterials congress. University of Toronto Press. 53 1996
17. Lee J, Kim S. In Transaction of 5th World Biomaterials Congress, Toronto, May, 1996, University of Toronto Press, Toronto 1996. p53
18. Schallhorn RG. Present status of osseous grafting procedures. *J Periodontol* 48;570-576 1977
19. Lim Y, Kim SY, Lee IS, Kim S. *Bioceramics* 12 383-386 1999
20. Chun SS, Jeong JH, Lee IS, Kim S. *Key Engineering Materials* 192-195;131-134
21. Yang SM, Lee SJ, Kim SY, Lim YT, Seol YJ et al. Evaluation of Calcium Polyphosphate as an Implant Material : an Animal Study. *The Journal of Korean Academy of Periodontology* in press.

사진부도 설명

- Figure 1. After 12 months of healing. (A) CPP powder (B) CPP block (Multiple stain, original magnification $\times 20$)
- Figure 2. After 12 months of healing. New bone formation around implant materials. (A) CPP powder (B) CPP block (Multiple stain, original magnification $\times 100$)
- Figure 3. After 12 months of healing. A few inflammatory cells around implant materials. (A) CPP powder (B) CPP block (H&E stain, original magnification $\times 400$)
- Figure 4. 10% Na₂O CPP granules in extraction site. (A) 12 weeks healing (B) 12 months healing (Multiple stain, original magnification $\times 20$)
- Figure 5. 10% Na₂O CPP granules in extraction site. Some of them were surrounded with fibrous tissue and bone marrow. (A) 12 weeks healing (B) 12 months healing (Multiple stain, original magnification $\times 100$)
- Figure 6. 10% Na₂O CPP granules in extraction site. Inflammatory cells were infiltrated more in (B). (A) 12 weeks healing (B) 12 months healing (H&E stain, original magnification $\times 400$)
- Figure 7. 15% Na₂O CPP granules in extraction site. Bone marrow space was seen. (A) 12 weeks healing (B) 12 months healing (Multiple stain, original magnification $\times 20$)
- Figure 8. 15% Na₂O CPP granules in extraction site. More bone formation around implant materials was seen in (B). (A) 12 weeks healing (B) 12 months healing (Multiple stain, original magnification $\times 100$)
- Figure 9. 15% Na₂O CPP granules in extraction site. A few inflammatory cells were seen in (B). (A) 12 weeks healing (B) 12 months healing (H&E stain, original magnification $\times 400$)

사진부도 (1)



Figure 1A



Figure 1B

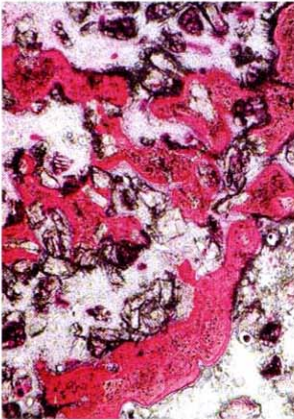


Figure 2A



Figure 2B

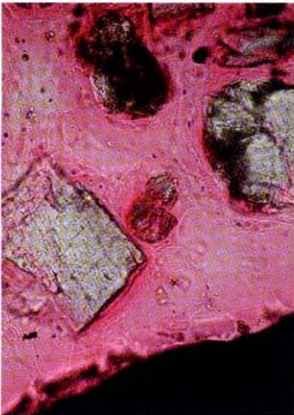


Figure 3A



Figure 3B

사진부도 (II)

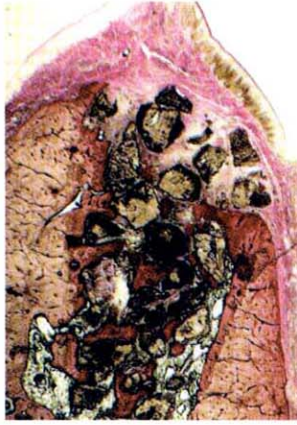


Figure 4A



Figure 4B



Figure 5A



Figure 5B

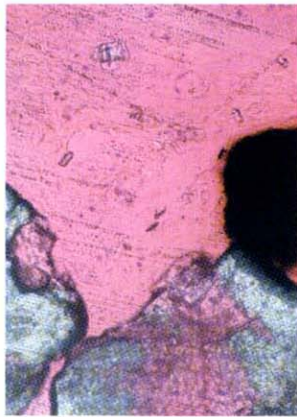


Figure 6A

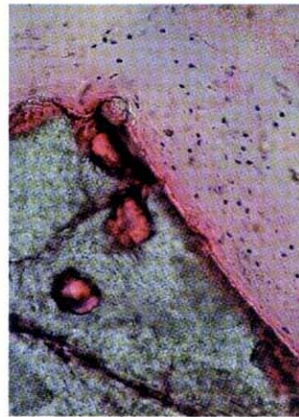


Figure 6B

사진부도 (III)

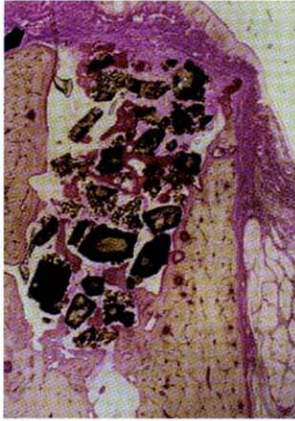


Figure 7A



Figure 7B

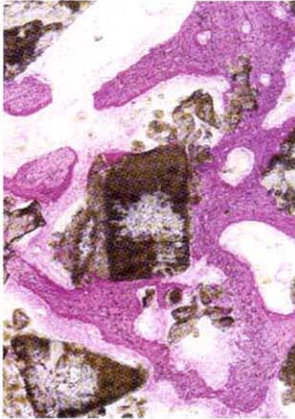


Figure 8A

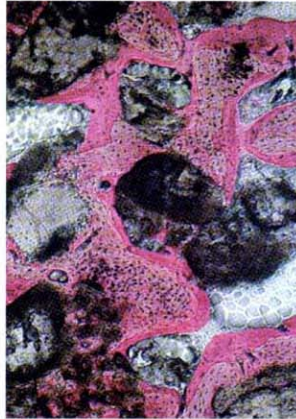


Figure 8B

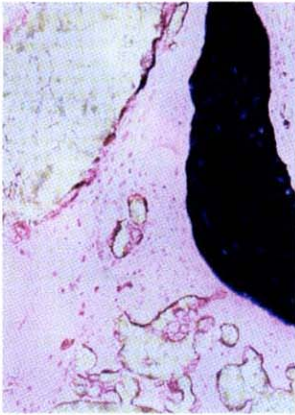


Figure 9A

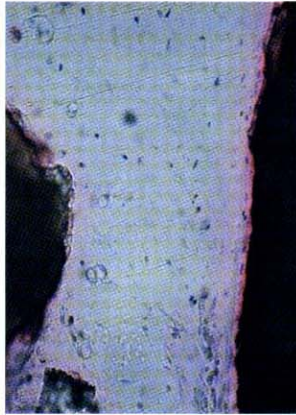


Figure 9B

Degradation rate of several types of Calcium Polyphosphate : Long term results

SM Yang^{1,2}, YJ Seol^{1,2}, SB Kye^{1,2}, IK Lee¹, CW Lee¹, SY Kim³, Y Ku¹, CP Chung¹, SB Han¹, SM Choi¹, IC Rhyu¹

¹Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

²Dept. of Periodontology Samsung Medical Center, School of Medicine, Sungkyunkwan University

³School of Materials Engineering, Yeungnam University

The purpose of this study is to evaluate the biocompatibility and the bioresorbability of several types of calcium polyphosphate made through change of manufacturing process for 12 month. To solve limitation of calcium phosphate, we developed a new ceramic, Calcium Polyphosphate(CPP), and report the biologic response to CPP in extraction sites of beagle dog. Porous CPP blocks were prepared by condensation of anhydrous $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ to form non-crystalline $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ and then milled to produce CPP powder. CPP powder, CPP block, and CPP granules added with Na_2O were implanted in extraction sockets and histologic observation were performed at 12 months later. Like 3 months results, histologic observation at 12 months revealed that CPP matrix were mingled with and directly apposed to new bone without any adverse tissue reaction, CPP powder show direct bony contact, but new bone formation and fibrous tissue encapsulation showed in CPP block. 10% Na_2O CPP granules show more inflammatory cells infiltration around graft materials compared at 3 month, but 15% Na_2O CPP granules show less. This result revealed that regardless of addition of Na_2O , CPP had a high affinity for bone and had been resorbed slowly.

From this results, it was suggested that CPP is promising ceramic as a bone substitute and addition of Na_2O help biodegradation but optimal concentration of Na_2O and other additive component to increase degradation rate should be determined in further study.