

가토 두개골 결손부에 이식된 새로운 합성 골이식재의 골치유능력

노규섭 · 한세진 · 김철환 · 김경욱
단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:464-469)

BONE HEALING CAPACITY OF THE NEW FLUORIDATED HYDROXYAPATITE IN THE RABBIT CRANIUM DEFECT

Kyu-Seop Rho, Se-Jin Han, Chul-Hwan Kim, Kyung-Wook Kim
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University

The bone graft materials are grossly divided into autogenous bone, allogenic bone, xenogenic bone, and alloplastic material. Among the various allogenic graft materials, hydroxyapatite($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA), the main inorganic phase of human hard tissue, is widely used as a repair material for bones. When HA applied to bony defect, however, it may be encapsulated with fibrous tissue and floated in the implanted area by the lack of consolidation.

Fluoridated hydroxyapatite($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, FHA), where F- partially replaces the OH- in the hydroxyapatite, is considered as an alternative material for bone repair due to its solubility and biocompatibility.

This study was designed to find out the bone healing capacity of FHA newly produced as a nanoscale fiber in the laboratory. We implanted HA and FHA in the rabbit cranium defect and histologically analysed the specimen.

The results were as follows.

1. In the 4 weeks, fibrous connective tissue and little bone formation around materials of the experimental group I implanted HA were observed. In the experimental group II implanted FHA, newly formed bone around materials were observed.
2. In the 8 weeks, the amount of newly formed and matured bone of the experimental group II was more than the experimental group I and control group.

From the results obtained, we suggest that FHA, newly synthesized, is relatively favorable bone substitute with biocompatibility and has better bone healing capacity than pure HA.

Key words: Bone graft, Alloplast, Calvaria

I. 서 론

임플란트가 치과 진료의 중요한 부분으로 자리 잡게 되면서 골 결손부에 대한 치료 방법 및 생체 이식 재료에 대한 연구도 활발히 이루어져 왔다. 골 이식재료의 종류로는 자가골, 동종골, 이종골, 합성 골이식재로 나뉘어 질 수 있으며, 이러한 골 이식재료들은 즉시 사용이 가능하고, 면역반응을 일으키지 말아야 하며, 빠른 골생성 및 재혈관화를 촉진하여야 하며, 또한 골의 지지와 연속성을 유지하는 등의 기본적인 조건을 만족시

킬 수 있어야 한다¹⁾.

그 중 합성 골이식재 중 대표적인 것으로는 수산화인회석(hydroxyapatite, HA)을 꼽을 수 있다. Hydroxyapatite($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)이하 HA)는 인간의 신체 중 경조직을 구성하는 주요 무기질로써, 우수한 생체 적합성이 특징으로 매식부에 광물 저장기(mineral reservoir)로 작용하여 오래전부터 뼈에 대한 대체 이식재로 사용되어왔다. 하지만, HA는 임상적으로 적용 시 때 때로 섬유조직에 의한 피낭화가 일어나고 생리적 하중을 받는 상태에서 인접골과의 접촉면으로부터 괴리되는 문제점을 가지고 있다^{2,6)}.

따라서, 근간에 이러한 단점을 극복하기 위한 생체 재료들의 개발이 활발히 이루어져 왔으며, 최근에는 순수한 HA를 기본으로 하여 일련의 과정을 통해 합성한 Fluor-hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)이하 FHA)가 개발되었다. FHA는 순수한 HA의 수산화기(OH⁻)를 부분적으로 불소이온(F⁻)이 대체한 fluoridated form이다. FHA는 생체 적합성이 우수하며 HA에 비해 더

김 경 욱

330-716 충남 천안시 안서동29

단국대학교 치과대학 부속병원 구강외과

Kyung-Wook Kim

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University,

29 Amseodong, Choenan, Chungnam, 330-715, Korea

Tel: 82-41-550-1994 Fax: 82-41-551-8988

E-mail: kkwoms@dku.edu

높은 화학적, 열 안정성을 가질 뿐만 아니라, 불소 이온(F⁻) 방출로 인해서 조골 세포 등의 증식 및 세포 활성도를 촉진시키는 장점을 갖고 있다^{7,11)}.

FHA는 이미 상용화 되어 사용되고 있는 이식재이며 powder, coating, bulk bodies, fibers 등 다양한 형태로 제작이 가능하지만, 이 중 fiber 형태가 세포 생착 및 세포 활성도(bio activity)에 가장 유리한 구조라고 알려져 있고 최근 관심을 받고 있는 나노 섬유 형태의 더욱 더 좋은 세포 활성도를 제공하고 보고 되고 있다¹²⁾.

이에 나노 단위 제작 기술을 이용하여 연구실에서 직경 1.55 μm -240nm의 FHA 나노섬유가 제작되었고 이렇게 제작된 이식재의 생체 적합성 및 활성 능력을 알아보기 위해 저자는 순수한 HA와 새로이 합성된 FHA를 가토 두개골 결손부에 이식하여 그 조직학적 골치유능력을 비교 평가하고자 하였다¹³⁾.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

실험동물로는 일정기간동안 동일 조건에서 사육된 체중 3kg 내외의 자성 가토 13마리를 사용하였다. 대조군 3마리, 실험 I군 5마리, 실험 II군 5마리 씩 분류하였으며, 이식 재료로는 hydroxyapatite(Alfa Aesar®, Ward Hill)와 fluoridated hydroxyapatite (synthesized in Lab)를 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 동물 실험

실험 I, II군 대조군 공히 Ketamine hydrochloride(Ketalar®, 유한양행) 10mg/kg 및 0.15ml/kg의 2% xylazine hydrochloride (Rumpun®, 한국바이엘)을 근주하여 마취시키고 두개부에 털을 제거하고 베타딘 용액으로 소독한 후, 지혈을 목적으로 1:100,000의 epinephrine이 함유된 0.2% 염산 리도카인(광명제약)을 침윤 주사하였다. 절개 후 두개골을 노출시켜 버를 이용하여 직경 10mm의 결손부를 형성한 후 실험 I군은 HA를 매식하였고 실험 II군은 FHA를 매식하였다. 매식 후 흡수성 봉합사로 층별 봉합을 시행하였으며 모든 실험은 통상적인 방법에 따라 무균적으로 시술하였다.

2) 희생

대조군, 실험 I, II군을 각각 4주, 8주 째에 나누어 희생시킨 후 결손 부위 노출 후 결손부를 포함한 두개골 전체를 채취하였고, 10% 중성 포르말린에 고정하였다.

3) 표본 제작

10% 중성 포르말린에 고정시킨 채취 표본을 5% 질산으로 3일 동안 탈회를 시행하고 통상적인 방법에 따른 탈수, 명화 과

정을 거쳐 4 μm 파라핀 절편을 제작한 후 H&E 및 MT 염색을 시행하였고, 광학현미경하에서 골치유 과정을 관찰하였다.

III. 연구 결과

1. 육안 소견

1) 대조군

4주에는 섬유성 조직으로 채워진 골결손부를 얇은 막의 형태로 골막이 덮고 있었으며, 8주에는 골막 하방으로 골양 조직이 관찰되었다.

2) 실험 I군(HA 매식군)

4주에는 결손부위에 채워진 이식재 입자로 여겨지는 부분이 관찰되었으며 정상골과의 경계부가 대체로 명확하였으며, 연조직의 개입도 없었다. 8주에도 마찬가지로 이식재의 입자로 여겨지는 부분이 관찰되었지만, 정상골과의 경계는 4주에 비해 다소 불분명하였다.

3) 실험 II군(FHA 매식군)

4주에는 골막의 연속성은 유지되었으며, 연조직의 개입도 관찰되지 않았다. 8주에는 이식재 입자가 관찰되기는 하였으나 4주째와 비교하여 정상골과의 경계부가 더 불분명하게 관찰되었다.

2. H & E 염색 소견

1) 대조군

4주째에는 혈관이 존재하지만 상당히 치유가 진행되어 혈관이 정상적인 형태를 보여주며, 섬유성 결합조직으로 결손부를 덮고 있다. 염증소견은 관찰되지 않았다. 8주째에는 4주에 비해 성숙된 골의 형태가 관찰되었다(Fig. 1).

2) 실험 I군(HA 매식군)

4주째에는 HA가 조직편 제작 시 탈회에 의해 빠져나간 공간과 이식재 주변에 섬유성 결합 조직이 형성된 소견을 보였으며 조직 내 미분화 간엽세포 침윤이 관찰되었다. 염증 소견은 보이지 않았다. 8주에는 4주째와 비교하여 이식부 주변 결합조직에 큰 변화는 없었고 결합조직 내에 골조직 형성 또한 미약함이 관찰되었다(Fig. 2, 3).

3) 실험 II군(FHA 매식군)

4주째 표본에서는 탈회 제작과정에서 이식재가 빠져나간 공간과 그 사이로 형성된 결합조직이 관찰되며 염증 소견은 관찰되지 않았다. FHA가 있던 인접주위에 신생골의 침착 및 흡수가 진행되고 있는 소견을 보였다. 8주째에는 4주에 비해 이식재 주변으로 골조직이 형성된 것이 관찰되었다(Fig. 4, 5).

3. MT 염색 소견

1) 대조군

4주째에는 미세한 콜라겐 섬유가 결손부에 형성된 소견과 그 하부에서 미성숙된 골이 형성되거나 개조(remodeling)되는 소견을 보였다. 8주째에는 4주에 비하여 결손부 인접골로부터 성숙된 골이 증가하였다(Fig. 6, 7).

2) 실험 I군(HA 매식군)

4주째에 이식재 사이 공간으로 미세한 콜라겐 섬유가 형성되어 있으며 결손부 하부로부터 골의 형성이 진행되고 있는 양상을 보였다. 8주째에는 4주에 비해 주변 골조직의 더 성숙해져있는 소견을 보였지만, 이식재 주변으로는 골의 형성이 미미하였다(Fig. 8, 9).

3) 실험 II군(FHA 매식군)

4주째 소견으로 이식재 주변으로 골조직이 형성되는 양상을 보이나, 이식재와는 미세한 결합조직으로 분리되어 있었다. 8주째는 4주와 비교하여 다량의 성숙된 골의 형성이 관찰되었다(Fig. 10, 11).

IV. 총괄 및 고찰

전통적으로 선천적인 기형 또는 외상이나 질환에 의한 골 결손부의 심미적, 기능적 회복을 위하여 다양한 이식재가 사용되어 왔다. 최근에는 임프란트 식립을 위해 적당한 골의 형태가 요구되면서, 골이식재들에 대한 많은 관심이 쏟아지고 있다. 골이식재들로서는 자가골, 동종골, 이종골, 합성 골이식재들이 사용되고 있으며 매식된 이식재는 크게 세 가지 과정을 거쳐 골을 형성한다. 골형성(osteogenesis)은 이식재 안에 살아남아있는 조골세포(osteoblast)와 전조골세포(preosteoblast)가 매식부 주위에서 골화반응(osteogenic response)을 일으킬 수 있는 능력을 가짐으로써 신생골이 형성되는 것을 말하며 자가골이 이에 해당한다. 골유도(osteinduction)는 매식부 내의 화학주성을 가진 물질이 매식부 인접 조직의 미분화 간엽세포(undifferentiated mesenchymal cell)들을 조연골세포(chondroblast) 또는 조골세포로 변환, 유도하여 골형성이 이루어지게 하는 것이다. 마지막으로 골전도(osteoconduction)는 이식부 주위 골의 분화된 간엽세포(differentiated mesenchymal cell)들이 조연골 세포, 조골세포들을 제공하여 이식된 물질을 기질로 하여 골을 형성하는 것을 말하며 합성 골이식재가 이에 해당한다. 골전도의 목적을 이루기 위해서는 매식부 주위의 정상골과 분화된 간엽세포가 필수적이다¹⁴⁻¹⁹.

골 이식재료들은 즉시 사용이 가능하고, 면역반응을 일으키지 말아야 하며, 빠른 골생성 및 재혈관화를 촉진하여야 하며, 또한 골의 지지와 연속성을 유지하는 등의 기본적인 조건을 만족시킬 수 있어야 한다⁹. 이러한 조건을 만족시킬 수 있는 가장 좋은 골이식재는 자가골이지만, 채취할 수 있는 골량의 한

계성, 공여부의 추가적인 수술이 필요하다는 점, 술 후 흡수량을 예측하기 어렵다는 여러 단점이 있어 다른 골이식재료들에 대한 연구 개발이 활발히 진행되어 왔다.

그 중 합성 골이식재로 대표적인 것으로 수산화인회석(hydroxyapatite, HA)을 꼽을 수 있다. Hydroxyapatite($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)(이하 HA)는 인간의 신체 중 경조직을 구성하는 주요 무기질로써, 우수한 생체 적합성이 특징으로 매식부에 광물 저장기(mineral reservoir)로 작용하여 오래전부터 뼈에 대한 대체 이식재로 사용되어왔다. 하지만, HA는 임상적으로 적용시 때때로 섬유조직에 의한 피낭화가 일어나고 생리적 하중을 받는 상태에서 인접골과의 접촉면으로부터 괴리되는 문제점을 가지고 있다²⁰.

최근에는 순수한 HA를 기본으로 불소이온을 결합시켜 합성된 Fluor-hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)(이하 FHA)가 개발되었다. FHA는 HA의 불소화합물로 생체 적합성이 우수하며 HA에 비해 더 높은 화학적, 열 안정성을 가질 뿐만 아니라, 불소 이온(F-) 방출로 인해서 조골 세포 등의 증식 및 세포 활성도를 촉진시키는 장점을 갖고 있다²¹.

합성 이식재를 만들 때 가장 우선적으로 고려해야 될 문제는 이식재에 대한 조직의 세포 반응이라고 할 수 있다. 이러한 세포 반응 중 매식된 이식재에 대한 가장 중요한 초기 반응은 이식재에 대한 세포생착(cell attachment)이다. 세포생착을 증가시키기 위한 많은 방법들이 연구되어 왔고 이식재의 형태나 구조적 특성이 초기 세포생착에 영향을 준다고 하였다²⁰.

FHA는 powder, coating, bulk bodies, fibers 등 다양한 형태로 제작이 가능하지만, 이 중 fiber 형태가 세포생착 및 세포 활성도에 가장 유리한 구조라고 알려져 왔다^{12,21}.

이번 연구에 사용된 FHA는 직경 1.55 μ m-240nm의 나노섬유 형태로 일련의 과정을 거쳐 합성되었다. FHA를 주성분으로 하는 sol-gel solution을 500 μ m 직경의 needle이 달린 pump syringe에 채운 후 0.2ml/h의 속도로 12kV의 고전압이 걸려있는 회전통에 주사하고 다시 700°C에서 열처리하여 결정화시켜 나노섬유 형태의 FHA가 제작되었다^{13,22-25}.

연구 결과에서처럼 순수한 HA에 비해 나노 섬유 형태의 FHA는 형상이 불규칙하고 더 넓은 표면적을 제공하기 때문에 숙주 세포 생착의 용이함과 동시에 적절한 불소 이온 방출에 따른 생활성(bioactivity)을 제공하여 골결손부에 매식 시 더 좋은 골 치유능력을 나타낸다고 생각되었다.

V. 결 론

Hydroxyapatite($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)(이하 HA)는 인간의 신체 중 경조직을 구성하는 주요 무기질로써, 우수한 생체 적합성이 특징으로 오래전부터 뼈에 대한 대체 이식재로 사용되어왔다. 최근에는 순수한 HA를 기본으로 하여 일련의 과정을 통해 합성된 Fluor-hydroxyapatite($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)(이하 FHA)가 개발되었다. 이에 저자는 순수한 HA와 연구실에서 새로이 합성된 FHA를 가토 두개골 결손부에 이식하여 그 조직학적 골치유능

력을 비교 평가하고자 하였다.

실험동물로는 일정기간동안 동일 조건에서 사육된 가토 13마리를 이용하여 두개부에 직경 10mm의 골결손부를 형성한 후 대조군, HA 매식 실험군 및 FHA 매식 실험군으로 각각 3마리, 5마리, 5마리씩 배정하고 실험 4주, 8주에 이식편을 채취하여 H&E 염색 및 MT염색을 통해 그 조직학적 양상을 비교 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 4주째 조직학적 소견에서 HA는 골의 형성 역할이 미미한 것으로 보이며, FHA 실험군은 이식재 주변으로 골질이 관찰되며 골전도 능력이 있는 것으로 관찰되었다.
2. 8주째 소견에서 HA는 대조군에 비교하여 골의 유도 능력과 형성능력이 미미하고 오히려 골의 형성을 방해하는 양상도 보였으나, FHA 실험군은 비록 골형성 능력은 없으나 골치유 능력이 있으며 주변에 형성된 골의 양은 대조군 및 HA 실험군에 비해 더 많았음을 관찰하였다.

이상의 결과로 순수 HA에 비해 새로이 합성 개발된 FHA가 in-vivo 실험에서 더 활발한 골치유 능력을 나타낸다는 것을 관찰할 수 있었으며 임상에 실제로 적용 가능한 재료로 상용화를 위한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. Boyne PJ: Induction of bone repair by various bone grafting materials, hard tissue growth, repair and remineralization. Ciba Found Symp 1973;11:121.
2. Wagner JR: A 3 1/2-year clinical evaluation of resorbable hydroxyapatite osteogen (HA Resorb) used for sinus lift augmentations in conjunction with the insertion of endosseous implants. J Oral Implantol 1991;17:152.
3. Wagner JR: A clinical and histological case study using resorbable hydroxyapatite for the repair of osseous defects prior to endosseous implant surgery. J Oral Implantol 1989;15:186.
4. Costantino PD, Friedman CD: Synthetic bone graft substitutes. Otolaryngol Clin North Am 1994;27:1037.
5. Prokic B, Carranza FA, Kenny EB, et al.: Comparative clinical study of porous hydroxyapatite and decalcified freeze-dried bone in human periodontal defects. J Periodontol 1990;61:399.
6. Papay FA, Morales L, Ahmed OF, et al.: Comparison of ossification of demineralized bone, hydroxyapatite, Gelfoam, and bone wax in cranial defect repair. J Craniofac Surg 1996;7:347.
7. Okazaki M, Miake Y, Tohda H, et al.: Functionally graded fluoridated apatites. Biomaterials 1999;20:1421-6.
8. Driessens FCM: Relation between apatite solubility and anticariogenic: effect of fluoride. Nature 1973;243:420-1.
9. Moreno EC, Kresak M, Zahradnik RT: Fluoridated hydroxyapatite solubility and caries formation. Nature 1974;247:64-65.
10. LeGeros RZ, Silverstone LM, Daculsi G, et al.: In vitro caries-like lesion formation in F-containing tooth enamel. J Dent Res 1985;62:138-144.
11. Marie PJ, De Vernejoul MC, Lomfi A: Stimulation of bone formation in osteoporosis patients treated with fluoride associated with increased DNA synthesis by osteoblastic cells in vitro. J Bone Miner Res 1992;7:103-113.
12. Laurencin CT, Ambrosio AMA, Borden MD, et al.: Tissue engineering: orthopedic applications. Annu Rev Biomed Eng 01:19-46, 1999.
13. Kim H: J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006;77(2):323-8.
14. Glowacki J, Mulliken JB: Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. Plast Reconstr Surg 1980;65:553.
15. Glowacki J, Kaban LB, Mulliken JB: Treatment of jaws defects with demineralized bone implants. J Oral Maxillfac Surg 1982;40:623.
16. Glowacki J, Mulliken JB: Demineralized bone implants. Clin Plast Surg 1985;12:233.
17. Burstein AH, Einhorn TA, Kopman CR, et al.: The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. J Bone Joint Surg 1984;66:274.
18. Masters DH: Implants. Bone and bonesubstitutes. Calif Dent Assoc J 1988;16:56.
19. Jarcho M: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop 1981;157:259.
20. Dee KC, Puleo DA, Bizios R: An introduction to tissue-biomaterial interactions. New York, NY: John Wiley & Sons; 2002.
21. Kim HW, Lee EJ, Kim HE, Salih V, et al.: Effect of fluoridation of hydroxyapatite in hydroxyapatite-polycaprolactone composites on osteoblast activity. Biomaterials 2005;26:4395-4404.
22. Kim HW, Kim HE, Salih V, et al.: Hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite layered film on titanium processed by a sol-gel route for hard-tissue implants. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 2004;71B:66-76.
23. Kim HW, Li LH, Koh YH, et al.: Sol-gel preparation and properties of fluoride-substituted hydroxyapatite powders. J Am Ceram Soc 2004;87:1939-1944.
24. Li D, Xia Y: Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? Adv Mater 2004;16:1151-1170.
25. Dzenis Y: Spinning continuous fibers for nanotechnology.: Science 2004;304:1917-1919.

사진부도 ①

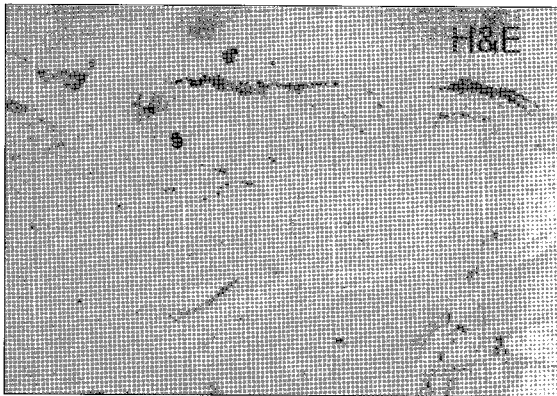


Fig. 1. H & E staining findings of control group, 4 weeks (×50).



Fig. 2. H & E staining findings of experimental group I, 4 weeks (×50).

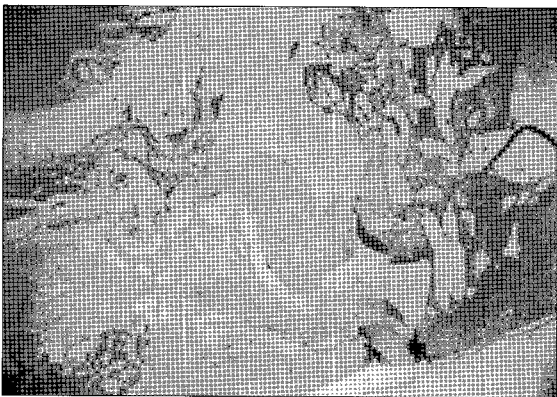


Fig. 3. H & E staining findings of experimental group I, 8 weeks (×50).



Fig. 4. H & E staining findings of experimental group II, 4 weeks (×50).



Fig. 5. H & E staining findings of experimental group II, 8 weeks (×50).



Fig. 6. MT staining findings of control group, 4 weeks (×50).

사진부도 ②

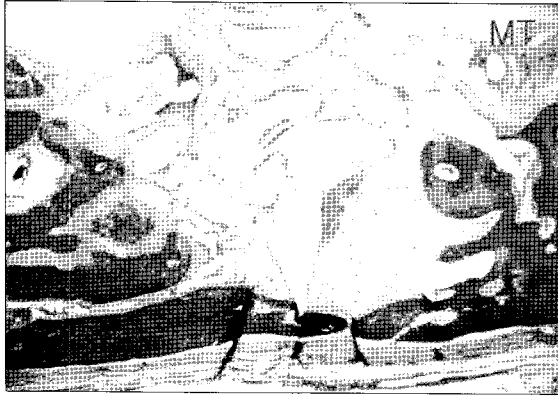


Fig. 7. MT staining findings of control group, 8 weeks (x50).

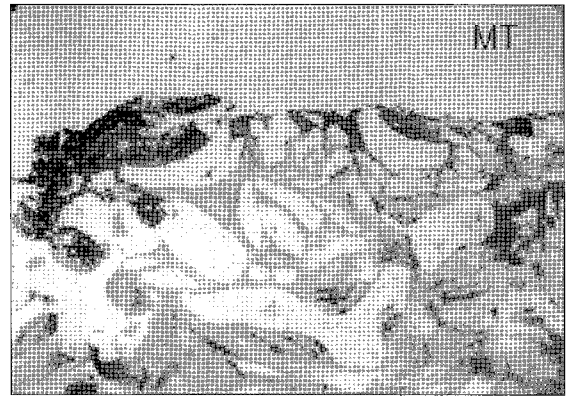


Fig. 8. MT staining findings of experimental group I, 4 weeks (x50).

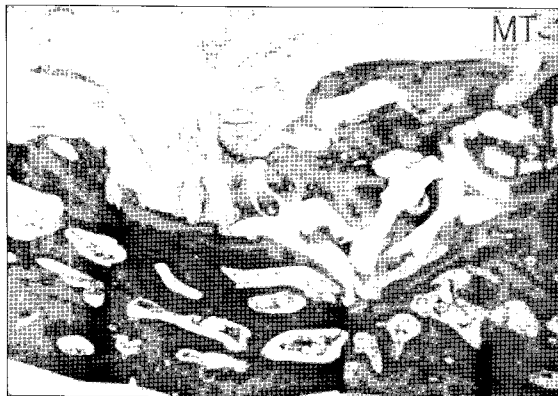


Fig. 9. MT staining findings of experimental group I, 8 weeks (x50).



Fig. 10. MT staining findings of experimental group II, 4 weeks (x50).

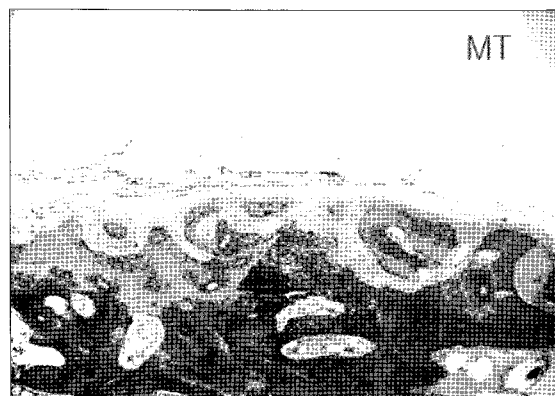


Fig. 11. MT staining findings of experimental group II, 4 weeks (x50).