

PMMA를 이용한 다공질 β -TCP 골충진제 제조 및 생체적합성 평가

송호연 · 윤민호** · 김영희 · 민영기* · 양훈모* · 이병택**†
순천향대학교 의과대학 미생물학교실, *생리학교실, **의공학교실

Fabrication of Porous β -TCP Bone Graft Substitutes Using PMMA Powder and their Biocompatibility Study

Ho-Yeon Song, Min-Ho Youn**, Young-Hee Kim, Young-Ki Min*, Hun-Mo Yang* and Byong-Taek Lee**†

Department of Microbiology, *Department of Physiology and
**Department of Biomedical Engineering & Materials, School of Medicine, Soonchunhyang University,
366-1 Ssangyoung-dong, Cheonan City, Chungnam, 330-090, Republic of Korea

(2007년 6월 13일 받음, 2007년 6월 19일 최종수정본 받음)

Abstract Porous β -tricalcium phosphate (β -TCP) bioceramic was fabricated by pressureless sintering using commercial HAp and different volume percentages of PMMA powders (30-60 vol.%). The range of spherical pore size was about 200-250 μ m in diameter. By increasing the PMMA content, the number of pores and their morphology were dramatically changed as well as decreased the material properties. In case of using 60 vol.% PMMA content, network-type pores were found, due to the necking of the PMMA powders. The values of relative density, elastic modulus, bending strength and hardness of the 60 vol.% PMMA content sample, sintered at 1500°C, were about 46%, 22.2 GPa, 5 MPa and 182 Hv respectively. Human osteoblast-like MG-63 cells and osteoclast-like Raw 264.7 cells were well grown and fully covered all of the porous β -TCP bodies sintered at 1500°C.

Key words bone graft substitute, β -TCP, porous body, biocompatibility.

1. 서 론

최근, hydroxyapatite(HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), β -tricalcium phosphate (β -TCP, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 생체세라믹들은 인간 뼈의 무기물 구성요소와 매우 유사하여 임플란트와 인체내 주변조직 사이의 결합을 유도하는 생체재료로 광범위하게 활용되고 있다.¹⁻⁴⁾ 특히, 이들 중에서 TCP의 용해가 국소적으로 과포화된 칼슘과 인산 이온의 분해력을 증가시킬 뿐만 아니라 생물학적 아파타이트의 용이한 핵생성을 일으키는 등의 물리화학적 특성 및 생체적합성이 HAp보다 우수하기 때문에 많은 연구가 진행되고 있다.⁵⁾ 이와 같은 생체흡수성 세라믹은 표면 상의 생물학적 활성 뼈와 비슷한 아파타이트 층을 자연적으로 형성하여 살아 있는 뼈 조직에 용이하게 결합 될 수 있다는 것은 잘 알려진 사실이다.⁶⁻⁸⁾ 그러나 인체의 관절부분과 치과용 임플란트 같은 load bearing 부분의 적용에는 낮은 강도와 낮은 파괴인성이 가장 큰 문제점이 되고 있다.⁹⁻¹⁰⁾ 그러므로 하중이 요구되는 정형·신경외과 영역의 골결

손 및 치과용 임플란트 적용을 위해, 치밀한 β -TCP 골충진제들이 일반적으로 요구되고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 그러나 효과적인 골 충진제를 제조하기 위해서, 생체재료는 일반적으로 뼈모세포와 파골세포들의 성장거동을 향상시키기 위해 내부에 망상구조로 연결성이 좋은 개 기공 구조여야 한다. 따라서 뼈모세포와 파골세포들이 다공성 구조를 통해 골 충진제 내부로 원활히 성장해 들어가기 위해서는 200-300 μ m의 기공크기를 갖는 다공질 소결체가 요구되며 또한 수개월에 걸친 골충진제의 점진적인 생분해가 요구된다.¹⁴⁻¹⁵⁾

따라서 본 연구에서는 다공질 β -TCP 소결체를 제조하기 위하여 골 시멘트에 사용되고 있는 PMMA 생체고분자를 탈지 및 소결 공정 간에 인체 무해한 기공형성제로 사용하였다. 특히 β -TCP는 생체적합성이 매우 우수하여 골 충진제의 주성분으로 활용되어 왔으며¹⁶⁻¹⁸⁾ PMMA의 첨가량에 따른 다공질 소결체를 제조하였다. 본 연구에서는 골 충진제로서의 PMMA의 첨가량에 따른 미세조직과 이들 다공질 β -TCP 소결체의 생체적합성을 평가하기 위하여 MTT 법 및 MG-63 뼈모세포와 Raw 264.7 파골세포를 사용하여 미세조직 유착과 성장거동을 관찰하였다.

†Corresponding author
E-Mail : lbt@sch.ac.kr (B. - T. Lee)

2. 실험 방법

본 연구에는 다공질 β -TCP 소결체를 제조하기 위하여 평균 입자크기가 10-15 μm 의 상용 HAp 분말(Stream Chemical, USA)과 기공형성제로 약 200-250 μm 의 입자크기를 갖는 polymethyl methacrylate(PMMA, LG MMA, Korea) 분말을 초기 재료로 사용하였다. 기공률이 증가함에 따른 용이한 다공질 소결체를 제조함에 앞서 HAp 분말과 성형보조제인 polyethylene glycol(PEG, Dusan Chemi, Korea)를 5 wt.% 사용하여 밀폐용기 내에 알콜을 첨가하여 24시간동안 알루미늄 불을 이용하여 습식 불밀을 수행한 후 건조단계를 거쳤다. 다공질 지지체로 사용되는 상기의 HAp 혼합분말과 기공형성제인 PMMA 분말을 각각 30, 40, 50, 60 vol.%로 알루미늄 불을 사용하여 24시간동안 밀폐용기 내에서 건식불밀로 균일하게 혼합하였다. 이 균일한 혼합물을 일축압축기에 장입시켜서 디스크형태(15 \times 5 mm)의 성형체를 제작하였다. 이들 성형체는 튜브로에서 700°C(heating rate = 6°C/min)의 온도 범위로 공기 중에 2시간 동안 탈지처리를 하여 유기결합제인 PMMA를 제거하였다. 소결 시 조건은 1500°C(heating rate = 6°C/min)로 공기 중의 전기로에서 2시간 동안 수행되었다. 기공형성제인 PMMA에 따른 소결체의 미세조직 변화와 파단면 및 소결 온도에 따른 결정상 분석은 주사전자현미경 (FE-SEM, JSM-635F, Jeol, Japan)과 X-선 회절분석기(XRD, D/MAX-250, Rigaku, Japan)을 이용하여 분석하였다. 또한 상대밀도는 아르키메데스법을 이용하여 측정하였다. 그리고 탄성계수 및 굽힘 강도는 탄성계수측정, 만능시험기(UnitechTM, R&B, Korea)를 이용하여 4점 곡강도 법으로 측정하였으며 소결체의 경도는 비커스경도계(Akashi. HV-112, Japan)를 이용하여 1.0 Kg의 하중에 의해 측정하였다.

세포독성을 확인하기 위한 세포의 성장 거동 및 형태학적 변화는 PMMA를 이용하여 제작된 다공성 β -TCP 골충진제를 1g/ml의 비율로 세포 배양 배지로 첨가하여

37에서 72시간 용출하여 얻은 용출액을 희석하여 사용하였다. 3일 동안 배양된 MG-63 뼈모세포의 배양액에 100 μl 의 MTT(Thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma) 용액 (5 mg/ml in PBS, Sigma M2128)을 첨가시켜 4시간 동안 배양한 후 200 μl 의 DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma)를 넣어 반응을 억제시켜 MTT 법에 의해 살아 있는 세포수를 측정하였다. 또한 다공질 β -TCP 소결체에서의 MG-63 뼈모세포와 Raw 264.7 파골세포의 성장 거동 및 형태학적 소견 관찰을 위해 0.025% trypsin-EDTA(pH 7.2) 용액을 처리한 MG-63 뼈모세포와 Raw 264.7 파골세포들을 24-well 배양 용기에 5×10^3 세포를 넣어 24 시간 동안 배양하였다. 그리고 0.1 M PBS 완충용액(pH 7.2)으로 세 차례 수세한 후 배양배지로 10^3 - 10^6 배로 희석된 다공질 β -TCP 소결체를 첨가 한 후 10 일 동안 10% 우혈청(FBS, #SH30088, Hyclone)과 항생제(antibiotic-antimycotic solution, #15240-062, Gibco)가 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양시켰다. 상기의 대조군으로는 다공질 β -TCP 소결체가 첨가되지 않은 배양배지에서 자란 뼈모세포와 파골세포를 금 코팅을 한 후 주사전자현미경(SEM, JSM-541-LV, Jeol)으로 비교 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 기공형성제로 사용된 구형 PMMA 분말의 SEM조직(a)과 입도분포(b) 결과이다. PMMA 분말의 입자크기는 약 75 μm 에서 250 μm 의 분포를 보였으며 구형임을 확인 할 수 있었다. 한편 PMMA의 정량적인 입도 분석 결과Fig. 1(b)에 나타낸 바와 같이 평균입도는 200 μm 에서 250 μm 임을 알 수 있다.

Fig. 2는 기공형성제인 PMMA를 60 vol.% 첨가한 후 탈지와 소결 공정을 거친 다공질 HAp 소결체의 SEM (a) 이미지이다. Fig. 2(b)에서 탈지와 소결 공정에 의해 기공 형성제 부분은 완전히 제거되어 폐기공과 개기공이

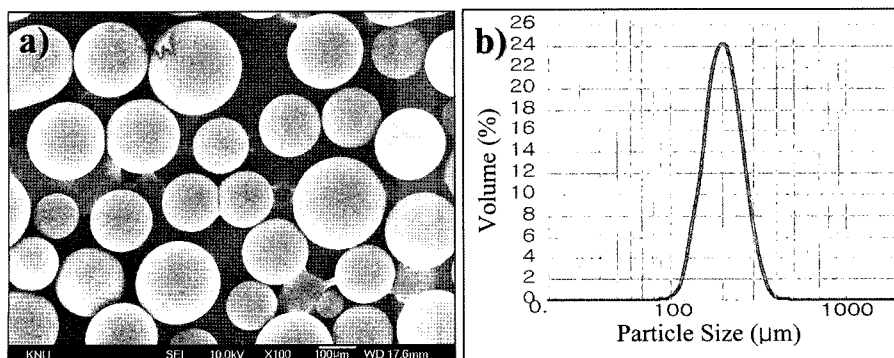


Fig. 1. SEM micrograph (a) and particle size distribution (b) of PMMA powder.

형성된 HAp 다공질체임을 알 수 있으며 이는 기공형성제인 PMMA분말입자들의 necking 여부에 기인한다. 이들 직경은 약 250 μm로 균일한 분포를 하고 있다. 기공의 형태는 초기에 혼합된 기공형성제의 형태에 의해 자유롭게 제어할 수 있으며, 기공형성제의 첨가량에 따라 기공률 또한 임의로 제어될 수 있다. 이는 뼈조직 안에서의 osteoconductivity와 세포성장거동에 중요한 인자로 작용한다.¹⁹⁾ 또한 소결온도가 증가함에 따라 결정립의 현저한 입성장 거동을 보였으며 1200°C (c) 및 1500°C (d)에서 이들 평균 결정입도는 각각 30 μm와 50 μm로 성장하였다.

Fig. 3은 소결온도 변화에 따른 상변화 과정을 XRD로 분석한 결과이다. 1200°C에서 소결한 다공질 HAp 소결체의 경우(b), 초기 원료로 사용되었던 HAp (a)상이 검출되었으며 초기 원료 분말의 결정화도 향상에 기인하여

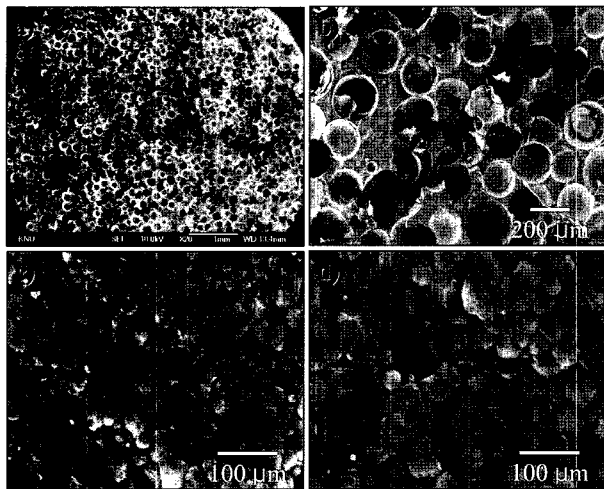


Fig. 2. SEM images of (a,b) porous HAp body sintered at 1200°C using 60 vol.% PMMA content. Enlarged images of pore frame sintered at 1200°C (c) and at 1500°C (d).

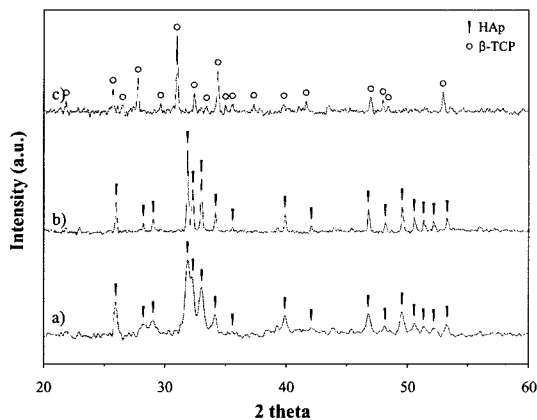


Fig. 3. XRD profiles of HAp powder (a) and porous sintered bodies sintered at 1200°C (b) and 1500°C (c).

HAp 피크강도의 증가현상 이외에 제2상의 출현은 검출되지 않았다. 그러나 최종적으로 1500°C에서 소결한 Fig. 3(c)의 경우에는 HAp상의 피크가 소멸되고 β-TCP상만이 검출되었다. 이는 HAp상의 열분해 거동으로 인한 β-TCP로 상전이 되었음을 의미 한다.²⁰⁾ 이와 같은 XRD 분석결과로부터 1500°C에서 소결한 소결체는 완벽한 다공질 β-TCP 소결체로 판단된다.

Fig. 4는 기공형성제인 PMMA의 첨가량에 따른 1500°C에서 소결한 다공질 β-TCP 소결체의 상대밀도와 탄성계수 값을 나타내었다. 기공형성제의 첨가량이 30 vol.%에서 60 vol.%로 점차 증가함에 따라 상대밀도는 최대 72.8 %에서 44.5%로 감소하였다. 이는 기공형성제인 PMMA가 탈지와 소결과정을 거쳐 osteoconductivity에 영향을 미치는 개기공과 폐기공의 증가로 인한 것으로 판단된다. 또한 상대밀도의 감소로 인하여 탄성계수의 값은 PMMA의 첨가량에 따라 48.7 GPa에서 최소 22.2 GPa의 값으로 감소하는 경향을 보여 주었다. 이와 같은 상대밀도와 탄성계수는 높은 기공률에 기인하여 생체세라믹에서 고려해야할 중요한 인자인 저탄성계수를 나타내며 본연구의 결과는 천연뼈의 탄성계수값(10-30 GPa)과 유사한 범

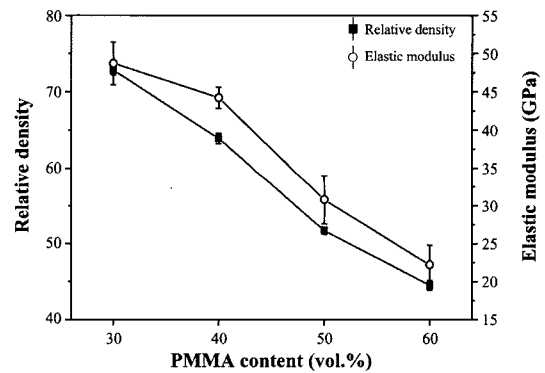


Fig. 4. Relative density and elastic modulus of porous bodies sintered at 1500°C depending on PMMA contents.

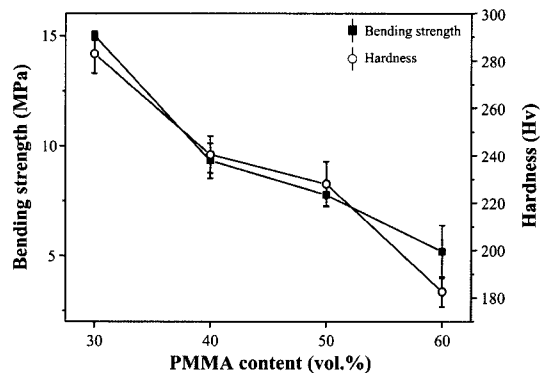


Fig. 5. Bending strength and hardness of porous bodies sintered at 1500°C depending on PMMA contents.

위임을 알 수 있다.

Fig. 5는 PMMA의 첨가량에 따른 다공질 β -TCP 소결체의 굽힘 강도와 경도 값을 나타내었다. PMMA의 첨가량이 30 vol.%의 경우에는 굽힘 강도와 경도의 값이 14.9 MPa, 283 Hv로 최대 값을 보여주었다. 기공형성체의 첨가량이 증가함에 따라 굽힘 강도와 경도 값이 감소하고 있으며 PMMA의 첨가량이 60 vol.%의 경우에는 각각 5.2 MPa, 182.5 Hv의 최소 값을 보여주었다.

Fig. 6은 1500°C에서 소결한 다공질 β -TCP 소결체 용출액을 희석하여 배양한 MG-63 뼈모세포의 세포수를 측정된 그래프이다. MG-63 뼈모세포를 다공질 β -TCP 추출액을 희석한 배양배지에 첨가하여 3일 동안 배양한 후 MTT 법을 사용하여 살아있는 세포 수를 측정하였고, 단층 배양된 세포는 트립신-EDTA를 처리한 후 trypan blue로 염색하여 haemocytometer를 이용하여 생존하고 있는 세포수를 측정하여 MTT 법에 의해 측정된 세포수와 비교하여 보정하였다. 저농도(25%)의 다공질 β -TCP 용출액을 첨가한 배지에서는 정상 배양배지에서 자란 뼈모세포와 유사한 세포성장 거동을 나타내었다. 반면, 고농도(100%)의 다공질 β -TCP 용출액이 첨가된 배양배지에서 성장한 세포는 대조군에 비해 약간 낮은 세포성장을 나타내었다. 따라서 다공질 β -TCP 용출액의 농도가

증가함에 따라 뼈모세포의 성장거동이 억제되는 것을 관찰 할 수 있었다. 그러나 일반적인 생체재료에 대한 세포 독성 평가에서 세포의 생존율이 대조군에 비해 70% 이상일 경우에 생체적합성이 우수하다고 평가되어지고 있

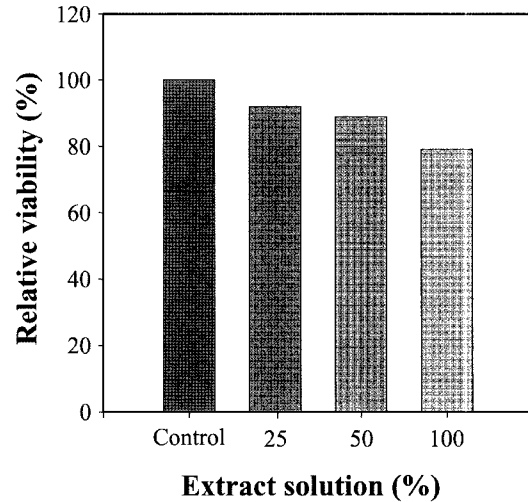


Fig. 6. Cytotoxicity of osteoblast-like MG-63 cells cultured with the diluted extract solutions of β -TCP bone graft substitute (60 vol.% PMMA).

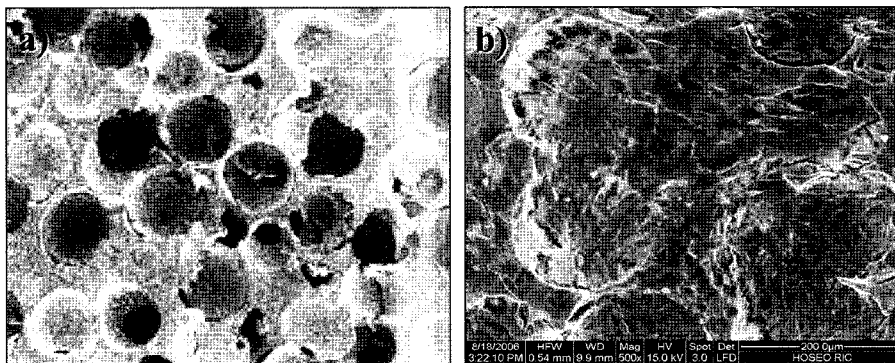


Fig. 7. SEM images of control (a) and osteoblast-like MG-63 cells cultured porous β -TCP bodies (b) sintered at 1500°C.

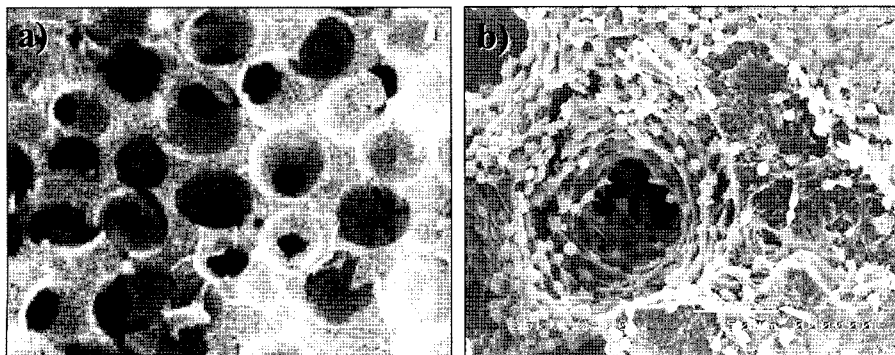


Fig. 8. SEM images of control (a) and osteoclast-like Raw 264.7 cells cultured porous β -TCP bodies (b) sintered at 1500°C.

80%의 세포 생존률을 보여 본 연구에 이용된 β -TCP 소결체가 세포독성이 없는 생체소재로 확인되었다.

Fig. 7은 다공질 β -TCP 소결체 위에 10일 동안 배양된 MG-63 뼈모세포의 SEM 이미지이다. 대조군 (a)의 경우는 개기공과 폐기공이 존재하지만 MG-63 뼈모세포를 10일 동안 배양한 Fig. 7(b)에서는 다공질 β -TCP 소결체의 표면뿐만 아니라 기공형성제인 PMMA로 인해 생긴 개기공과 폐기공에도 MG-63 뼈모세포가 전체적으로 우수한 성장거동과 함께 치밀한 단층 구조의 증식 양상을 확인 할 수 있다.

Fig. 8은 다공질 β -TCP 소결체 위에 배양된 Raw 264.7 파골세포의 SEM 이미지이다. Fig. 7의 실험방법과 동일한 방법으로 Raw 264.7 파골세포를 10일 동안 배양한 결과로 타원형의 돌기를 가진 파골세포들이 기공 내부로 활발히 증식되어 들어가는 것을 관찰할 수 있었고 이들 세포들은 MG-63 뼈모세포와는 다르게 서로 돌기로 연결되어 다층의 세포 구조를 형성하면서 기공을 채워 들어가고 있었다. 이상의 결과를 볼 때 PMMA를 사용하여 제작된 다공질 β -TCP 소결체가 뼈와 관련된 세포의 부착 및 성장에 적합한 생체친화성의 골충진제임을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 초기 원료 분말로 HAp 분말과 기공형성제인 PMMA를 사용하여 탈지 후 소결온도변수에 따라 다공질 소결체를 제조하였다. 불밀에 의해서 기지체 HAp 분말에 PMMA 입자가 잘 분산된 성형체를 제조할 수 있었으며 탈지와 소결 처리 후 PMMA가 완전하게 제거됨을 알 수 있었다. 제조된 다공질체의 평균 기공 크기는 생체활성 특성에 유용한 크기인 200-250 μ m 임이 관찰되었다. 탈지 처리 후 다공질 HAp 성형체는 1500°C의 소결 처리에 의해 β -TCP 소결체로 완전히 상전이 되었다. 또한 PMMA의 첨가량이 증가함에 따라 기공형성제의 necking 현상이 증가하여 폐기공과 개기공이 현저하게 증가되었다. 60 vol.% PMMA를 사용한 소결체의 밀도, 탄성계수, 굽힘 강도 및 경도는 각각 44.5%, 22.2 GPa, 5.1 MPa, 182 Hv를 나타내었다.

또한 MTT법에 의한 세포 독성 평가 결과 저·고농도의 다공질 β -TCP 소결체 용출액과 배양된 MG-63 뼈모세포는 정상 대조군과 유사한 증식 양상을 보였다. 또한 다공질 β -TCP 소결체에 직접 배양된 MG-63 뼈모세포와 Raw 264.7 파골세포는 우수한 세포 부착 및 성장 거동을 보였고 세포 돌기를 이용하여 다공질 소결체 내부로 활발히 증식해 들어가는 것으로 보아 PMMA를 이용하여

제작된 다공성 β -TCP 소결체가 인체의 골 결손에 사용되는 골충제로의 응용 가능성을 보여주고 있다.

감사의 글

본 연구는 순천향대학교의 ‘학술연구비’ 및 ‘지역혁신센터(RIC) 연구비’ 로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. K.D. Groot, *biomaterials*, **1**, 47 (1980).
2. I.C. Kang, S.H. Cho, H.Y. Song and B.T. Lee, *J. Kor. Ceram. Soc.*, **41**, 560 (2004).
3. D.C. Moore, M.W. Chapman and D. Manske, *J. Orthop. Res.*, **5**, 356 (1987).
4. W. Suchanek and M. Yoshimera, *J. Mater. Res*, **13**, 94 (1998).
5. G. Daculsi, J. M. Bouler and R. Z. LeGeros, *Int. Rev. Cytol.*, **172**, 129 (1997).
6. Y.C. Tsui, C. Doyle and T.W. Clyne, *Biomaterials*, **19**, 2015 (1998).
7. Y.C. Tsui, C. Doyle and T.W. Clyne, *Biomaterials*, **19**, 2031 (1998).
8. S. W. K. Kweh, K. A. Khor and P. Cheang, *Biomaterials*, **21**, 1223 (2002).
9. T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, Y. Hamada, M. Taira and J. Takahashi, *Biomaterials*, **23**, 2241 (2002).
10. M. Manso, M. Langlet, C. Jimenez and J.M. Martinez-Duart, *Biomolecular Eng.*, **19**, 63 (2002).
11. Y.C. Yang and E. Chang, *Biomaterials*, **22**, 1827 (2001).
12. C. Chenglin, Z. Jingchuan, Y. Zhongda and W. Shidong, *Mater. Sci. Eng. A*, **271**, 95 (1999).
13. S.J. Ding, Y.M. Su, C.P. Ju and J.H. Chern Lin, *Biomaterials*, **22**, 833 (2001).
14. M.H. Youn, R.K. Paul, H.Y. Song and B.T. Lee, *Mater. Sci. Forum*, **534**, 49 (2007).
15. G.K. Asit, H.Y. Song and B.T. Lee, *Scrip. Mater.*, **54**, 2081 (2006).
16. C. Fleurya, A. Petita, F. Mwalea, J. Antonioua, D.J. Zukora, M. Tabrizianb and O.L. Huka, *Biomaterials*, **27**, 3351 (2006).
17. H.K. Xu, L.E. Carey, G. Simon, S. Takagi and L.C. Chow, *Dent. Mater.*, In press (2006).
18. P.D. Callis, K. Donaldson and J.F. McCord, *Clinic. Mater.*, **3**, 183 (1988).
19. O. Gauthier, J.M. Bouler, E. Aguado, P. Pilet and G. Daculsi, *Biomaterials*, **19**, 133 (1998).
20. C.H. Lee, M.H. Youn, H.Y. Song and B.T. Lee, *J. Kor. Inst. Meter. Res.*, **15**, 3 (2005).
21. H.Y. Song, Y.H. Kim, K.K. Ko, Y.H. Kim, I.H. Oh and B.T. Lee, *J. Kor. Inst. Met. Mater.*, **44**, 6 (2006).