수산화인회석을 근간으로 한 생체 활성 골시멘트의 연구

인제대학교 의생명공학대학 의용공학과, 전남대학교 의과대학 정형외과*,
아주대학교 분자과학기술학과†, 연세대학교 의과대학 정형외과‡

신정욱 · 김석봉 · 윤택림* · 김영곤 · 박기동† · 이진우‡ · 박수아 · 김영직

= Abstract =

A Study on the Potential of Hydroxyapatite Based Bioactive Bone Cement

Jung-Woog Shin, Seok Bong Kim, Taek Lim Yoon*, Young Kon Kim, Ki Dong Park†, Jin Woo Lee‡, Su-A Park, Young Jick Kim

Department of Biomedical Engineering, Inje University,
Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine, Chunnam National University,*
Department of Molecular Science and Technology, Ajou University†,
Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine, Yonsei University‡

Study on the Potential of Hydroxapatite Based Bioactive Bone Cement

Purpose: The purpose of this study is to propose a new bioactive bone cement (BBC) composed of bone powder (hydroxyapatite; HA), chitosan powder, and currently available polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement for use in orthopaedic surgeries such as vertebroplasty or bone filler.

Materials and Methods: Three types of proposed BBCs and a currently available commercial PMMA were tested. In vitro studies the surface morphology, chemical composition, changes in pH value along the time, exothermic temperatures, intrusion and cellular responses were investigated. SEM, radiological and histological examinations were performed in animal studies.

Results: The major components of BBCs were C, O, Ca, P, Cl, Si, S, Ba and Mg. The pH values in BBCs decreased after 1 day, however they eventually reached 7.2-7.4. The water absorbency, weight loss, and porosity in BBCs increased more than PMMA more than during degradation ($p<0.05$). However, the compressive Young's moduli and ultimate compressive strength (UCS) of BBCs were lower than those of PMMA (<0.05). The exothermic temperatures of the BBCs were considerably lower than that of PMMA ($p<0.05$). In view of setting time, it takes relatively longer for BBCⅡ and Ⅲ to be solidified than PMMA ($p<0.05$). The intrusion tests showed that the BBCs were more intrusive than PMMA ($p<0.05$). The cell proliferation test on BBCⅡ showed that the BBCⅡ was more preferable than the PMMA. No cytotoxic characteristics were

※ 통신저자: 신 정 욱
경상남도 김해시 어방동 607
인제대학교 의생명공학대학 의용공학과
TEL: 055)320-3317 FAX: 055)327-3292 E-mail: sjw@bme.inje.ac.kr

* 본 연구는 1999년도 인제대학교 해외연수지원사업 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

found in all BBCs. In the animal test, BBC II was more biocompatible as well as osteoconductible than the PMMA.

Conclusion: The results of in vitro and animal studies indicated that the proposed BBCs have a potential of clinical application as replacement of the current PMMA bone cements.

Key Words: Hydroxyapatite, Chitosan, PMMA bone cement, Bioactive, Biocompatibility

서　　론

척추 골절 수술용이나 골 충진물(bone filler)로 사용하기 위한 골시멘트는 1) 적절한 주입성(injectability), 2) 짧은 경화시간(setting time)과 적당한 강성도(stiffness), 3) 생체 활성(bioactivity), 4) 낮은 발열온도(exothermic temperature), 그리고 5) 방사선비투과성(radiopacity) 등[1)]의 특성들이 임상적으로 요구된다. 1961년 Charnely에 의해 최초로 소개된 PMMA(polymethylmethacrylate) 골시멘트[2-4)]는 현재 정형외과 수술용으로, 예를 들어 골관절염(osteoarthritis) 치료를 위한 고관절 전치환술(total hip arthroplasty, THA)[1-3)], 골다공증으로 인한 요통, 척추 종양, 복합 압박 골절(multiple compression fractures) 등을 치료하기 위한 척추성형술(vertebroplasty)[5-8)], 그리고 척추후만 성형술(kyphoplasty)[9)] 등에서 다양하게 사용되고 있다.

이러한 수술에서 PMMA 골시멘트는 구조적 안정성을 증가시키고, 통증은 경감시켜 임상적으로 좋은 예후를 나타내고 있다. 그러나 PMMA 골시멘트는 1) 조직의 괴사를 야기할 수 있는 높은 발열 온도[2,10,11)], 2) 영구적인 보철물(implant)로서 장시간 이용 시 생체친화성 저하[12)], 3) 고관절 전치환술(THA)에서 역학적 실패의 원인인 골과 골시멘트 사이의 헐거움(loosening)[1-3,13)], 그리고 4) 척추성형술에서 골시멘트로 처치된 척추로 인한 응력 차폐(stress shielding) 현상, 즉 생체역학적 불균형[14)] 등의 잠재적인 부작용을 내포하고 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 현재 골시멘트의 주류를 이루고 있는 PMMA를 대신할 새로운 생체 활성(bioactive) 재료의 개발 필요성이 대두되고 있다. 따라서 본 연구에서는 골 재생에 기여하는 것으로 알려진 HA(hydroxyapatite)[2,15-19)] 분말과 분해성의 키토산(chitosan)[15,17,20-22)]을 기존의 PMMA 분말에 첨가하여 현재 널리 사용되고 있는 PMMA의 부작용을 개선시킨 생체 활성 골시멘트(bioactive bone cement, BBC)를 제안하고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 재료의 준비

1) 분말의 준비

골 분말(HA)은 돼지 척추 해면골을 재료로 하여 일련의 약품 처리와 건조 및 열처리(Siliconit Muffle Furnace, Kwang Sung, Corp., Korea) 방법으로 제조된 TS-GBB®(Tae San-Green Bone Block®, TaeSan Inc., Korea)를 분쇄(Ball Mill, Dong Won Inc., Korea)한 후, 체 진탕기(Sieve Shaker, Dong Won Inc., Korea)를 사용하여 준비하였다. 키토산 분말(Jakwang Co. Ltd., Korea)은 분자량 300,000Da이고 탈아세틸화가 90% 이상의 것을 사용하였고, PMMA 분말은 Simplex P® 골시멘트(Howmedica Inc., Rutherford, NJ, USA)를 사용하였다.

2) 분말과 용매의 혼합

실험에 사용된 시편은 PMMA와 골 분말의 무게비(wt%)에 따라 PMMA와 BBCⅠ, Ⅱ, Ⅲ로 구분하였다(Table 1). BBC 군의 시편에 포함된 키토산의 무게비는 10wt%로 동일하게 하였다. 4종류의 분말은 MMA(methylmethacrylate) 용매에 1.52 g/ml의 비율로 혼합하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Compositions of the specimens

Bone cements	Powder (wt%)		
	PMMA	Bone (HA)	Chitosan
Simplex P	100	0	0
BBCⅠ	50	40	10
BBCⅡ	40	50	10
BBCⅢ	30	60	10

2. 생체 외 실험

1) 분말 특성 조사

골 분말의 크기는 입도분석기(Coulter®, USA)를 사용하여 측정하였고, 미세 구조는 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM, Hitachi S-2400, Japan)을 사용하여 관찰하였으며, 화학적 구성 성분은 에너지 분산 X-선 분광기(Energy Dispersive X-ray, EDX, Kevex Sigma MS3, 15KeV/100Pa, USA)를 사용하여 분석하였다[23].

2) pH 변화 측정

고형화된 시편의 pH 변화를 조사하기 위하여 50 ml 생리식염수(0.9% NaCl, pH=7.4)를 담은 vial을 사용하였다. 각 시편을 지름 6 mm, 두께 12 mm의 디스크 형태로 만든 후, 37℃ 배양기에서 1일, 3일, 7일 그리고 10일이 경과 한 후 pH 변화를 측정하였으며, 생리식염수는 매일 교환하였다[21].

3) 분해 거동 조사

고형화된 시편(지름 6 mm, 두께 12 mm)을 12 ml 생리식염수(0.9% NaCl, pH=7.4)가 담긴 vial에 넣은 후 37℃, 110 rpm의 진탕 배양기에서 8주 동안 형태학적 변화, pH 변화, 분해성과 압축 강도 변화를 조사하였으며, 생리식염수는 교환하지 않았다[24]. 형태학적 변화는 SEM을 사용하여 0주, 4주, 8주 동안 시편의 미세구조 변화를 관찰하였으며, pH 변화는 1일, 3일, 7일, 4주 그리고 8주 경과 후 측정하였다. 시간의 경과(0주, 4주, 8주)에 따른 분해성(degradability)을 평가하기 위해 아래의 식들을 이용하여 수분흡수도, 무게감소 그리고 다공성을 분석하였다.

수분흡수도(water absorbency)[25]

$$\frac{W_w - W_d}{W_d} \quad \text{-----------------} \ ①$$

무게감소(weight loss)

$$\frac{W_i - W_d}{W_d} \quad \text{-----------------} \ ②$$

다공성(porosity)[26,27]

$$\frac{\rho_{max} - \rho_{min}}{\rho_{min}} \quad \text{-----------------} \ ③$$

여기서 W_W는 수분을 흡수한 시편의 무게, W_d는 건조한 시편의 무게, W_i는 분해전의 시편의 무게, ρ_{min}는 분해 전의 시편의 밀도, 그리고 ρ_{max}는 분해 후의 시편의 밀도를 나타낸다.

또한 시간에 따른 기계적인 강도의 변화를 측정하기 위하여 만능시험기(MTS System Corp., USA)를 사용하여 ASTM(American Society for Testing and Materials)기준에 따라 압축실험을 실시하였다[28-30]. 25 kN load cell을 사용하여 0.33 mm/s의 속도로 압축하였고, 하중과 변형 데이터는 20 Hz로 얻었다. 탄성계수(Young's modulus)는 응력과 변형률 곡선의 선형 구간에서 계산하였고, 아울러 최대압축강도(ultimate compressive strength, UCS)도 계산하였다.

4) 발열온도(exothermic temperature)

K-type의 열전대(thermocouple)를 이용하여 시편의 고형화까지 나타나는 온도 변화를 측정하였다. 이를 위하여 돼지 척추 해면골을 사용하여 bone mold(지름 9 mm, 두께 12 mm)를 제작하였다. 시편을 bone mold에 주입하고, 37℃, 5% CO_2 배양기에 넣은 후 30분간 5초 간격으로 온도를 기록하였다. 경화시간(setting time)은 ASTM 기준에 따라 아래의 식 4에 의해 계산하였다[28,30].

$$T_{set} = \frac{T_{amb} + T_{max}}{2} \qquad \text{-------------} \; ④$$

여기서 T_{amb}는 CO_2 배양기 내부의 온도, T_{max}는 최대발열온도를 나타낸다.

5) 관입(intrusion) 조사

시편의 관입 조사는 ASTM 기준에 따라 관입 주형(지름 1 mm, 두께 10 mm인 4개의 구멍)을 제작하였고, vernier calipers(Mitutoyo Corp., Japan)를 이용하여 시편의 고형화까지 관입된 거리를 측정하였다[28,30].

6) 세포 반응(cell responses)

· 세포 독성(cytotocity) 시험

시편의 용출액이 세포 독성을 일으키는 정도를 측정하기 위하여 ISO 10993-5에 따라 한국화학시험연구원(Korea Testing & Research Institute for Chemical Industry, KOTRIC)에 의뢰 시험하였다. 시편을 멸균하여 건조시킨 후, 시편 4 g당 20 ml의 비율로 추출한 용출액과 음성대조액을 사용하여 세포 배양하였다. 세포 배양은 L929 세포를 MEM 배양액에서 단층 배양한 후, 트립신 처리하여 1×10^5 cells/ml의 농도로 용출액과 음성 대조액에서 각각 48시간 배양한 후 시편의 독성을 비교·분석하였다.

· 세포 증식 비교 시험

시편에 대한 세포 증식을 알아보기 위하여 시편간의 세포 증식을 비교하였다[31,32]. 시편은 지름 6 mm, 두께 3 mm의 디스크 형태로 준비한 후 멸균 처리하여 24-well 세포배양용기에 각 시편을 담아두었다. 세포 배양은 단층 배양했던 MG63 세포를 트립신 처리하여 떼어낸 후 6×10^5 cells/ml의 농도로 각 시편에 접종하여 37℃에서

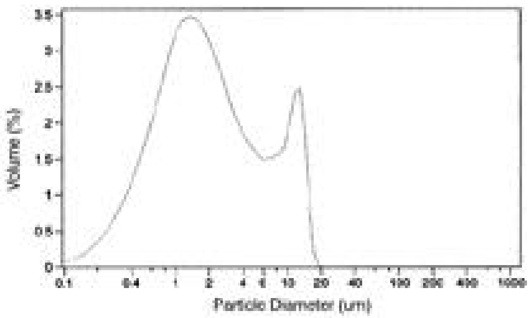
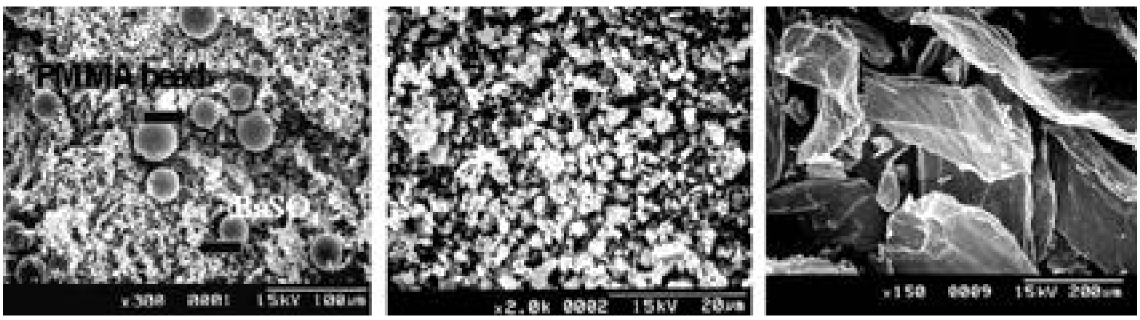


Fig. 1. The average size of the particles and their distribution provided by a sieve analyzer.



(a) PMMA powder(×300) (b) HA powder(×300) (c) Chitosan powder(×300)

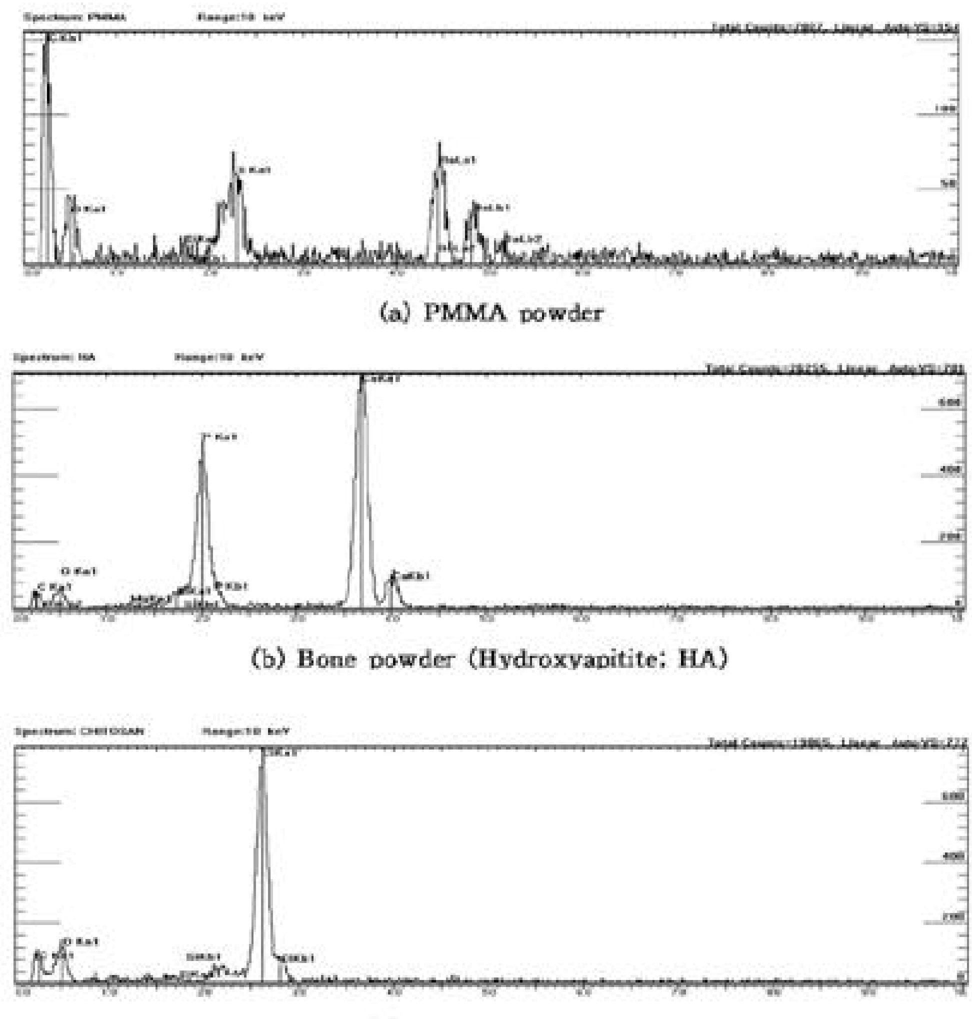
Fig. 2. SEM morphologies of powders consisting of BBCs.

5% CO_2 배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 세포 배양액은 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액을 사용하였고 세포의 증식 정도를 관찰하기 위하여 MTT assay를 사용하였다. 각 시편을 MTT 용액에 37℃에서 4시간 동안 반응시킨 후, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

모든 통계 분석은 SPSS(Ver. 11.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 일원배치 분산분석(one way ANOVA)을 실시하였으며, 다중분산비교(multiple comparisons)는 Tukey HSD 방식을 시행하였다.

3. 동물 실험

생후 5개월(약 3 kg)인 토끼의 복강에 염산카타민(5 mg/ml)을 주사하여 마취시킨 후, 우측 대퇴골과 경골에는 PMMA, 좌측에는 BBCII를 각각 주입하고 초기 방사선 및 SEM 관찰을 하였다. 또한 2주, 4주 경과 후, 대퇴골과 골시멘트 계면의 형태를 관찰하였고 H&E(Hematoxylin and Eosin) 염색법을 사용하여 조직학적 검사를 시행하였다.



(a) PMMA powder

(b) Bone powder (Hydroxyapitite: HA)

(c) Chitosan powder

Fig. 3. The chemical composition of powders analyzed by EDX.

결　　과

1. 생체 외 실험

1) 분말의 특성 분석

입도분석기에 의해 분석된 골 분말의 평균 크기는 2.0±3.0 ㎛이었다(Fig. 1). SEM을 이용한 PMMA, HA 그리고 키토산 분말의 형태학적 구조 관찰에서 PMMA는 PMMA bead와 황산바륨(barium sulfate)으로 분포되어 있고, 골 분말은 엉켜 있는 경우에 20 ㎛이하, 키토산은 100 ㎛ 이상의 입자들로 분포하였다(Fig. 2). 시편의 화학적 성분 분석에서 PMMA 분말은 황(S)과 바륨(Ba), HA 분말은 칼슘(Ca), 인(P)과 마그네슘(Mg), 그리고 키토산 분말은 염소(Cl) 등으로 구성되어 있고 탄소(C), 산소(O) 그리고 규소(Si)는 공통적으로 나타났다(Fig. 3).

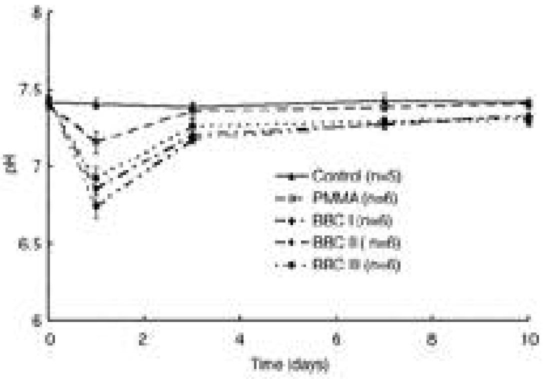


Fig. 4. The change in pH values of the specimens: The solution was replaced everyday.

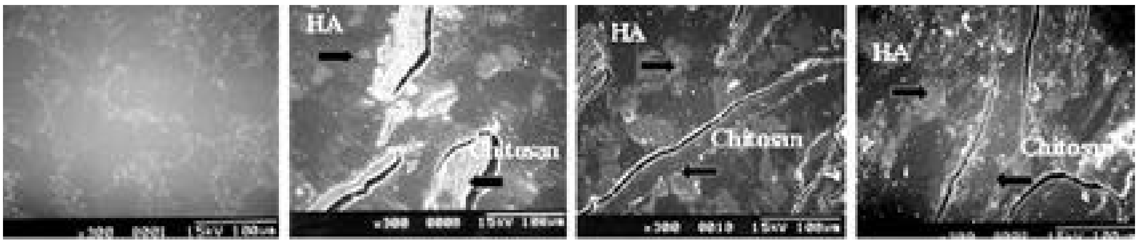
2) pH 변화 분석

시간의 경과에 따른 각 시편의 pH 변화를 Fig. 4에 나타내었다. BBC들의 pH는 초기 1일 동안 감소하였으나 1일 후, 시간이 지남에 따라 차츰 생리식염수의 값에 준하는 pH 7.2~7.4에 수렴하였다.

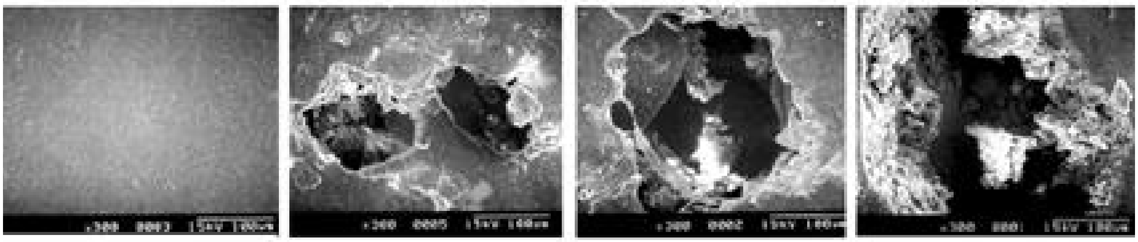
3) 분해 거동의 분석

· 형태학적 변화

고형화된 각 시편의 절단면의 표면 구조를 Fig. 5-A에 나타내었다. 그 결과 PMMA에 비해 BBC들은 PMMA 기질 내에 키토산과 골 분말이 고르게 존재함을 알 수 있었다. 시간의 경과(0주, 4주, 8주)에 따른 각 시편의 미세구조의 변화 관



(A)　a. PMMA(×300)　　b. BBC Ⅰ(×300)　　c. BBC Ⅱ(×300)　　d. BBCⅢ(×300)



(B)　a. PMMA(×300)　　b. BBC Ⅰ(×300)　　c. BBC Ⅱ(×300)　　d. BBCⅢ(×300)

Fig. 5. The micro-structure of each specimen(SEM): A. Before degradation, B. After degradation (8 weeks).

찰 결과는 Fig. 5-B에 나타난 바와 같이 PMMA는 시간의 경과에 따른 미세구조의 변화를 관찰할 수 없었고, BBC들은 골 분말의 비율이 증가함에 따라 다공성의 증가를 보여주었으며, 8주 후 BBCIII 경우 공극의 크기가 200 ㎛ 이상을 보였다(Fig. 5-B-d).

• 분해에 따른 pH 변화

각 시편의 시간의 경과에 따른 pH 변화를 Fig. 6에 나타내었다. BBC들의 경우 키토산의 분해에 따라 PMMA보다 낮은 pH를 나타내었다. 하지만 일정기간 후 더 이상의 pH 저하는 관찰되지 않았다.

• 분해성의 분석

각 시편의 시간의 경과에 따른 분해성을 평가하기 위하여 수분흡수도, 무게감소, 다공성 그리고 압축 강도를 조사하였다. 8주 경과 후 BBCI, II, III와 PMMA의 수분흡수도는 각각 9.1±1.6, 10.4±1.1, 12.4±1.1, 그리고 3.1±1.2%이었으며(Fig. 7), 무게감소는 각각 1.1±0.7, 1.6±0.7, 2.4±0.4, 그리고 0.3±0.2%이었고(Fig. 8), 다공성은 각각 1.1±0.9, 2.7±1.5, 3.9±0.8, 그리고 0.6±0.6%이었다(Fig. 9). 수분흡수도, 무게감소의 경우 PMMA와 BBC들 간 유의한 차이를 보였으며 다공성은 PMMA와 BBCII, III간 유의한 차이를 보였고 BBC들간에서도 유의한 차이를 보였다($p<0.05$). 분해가 시작되기 전 BBCI, II, III와 PMMA의 압축탄성

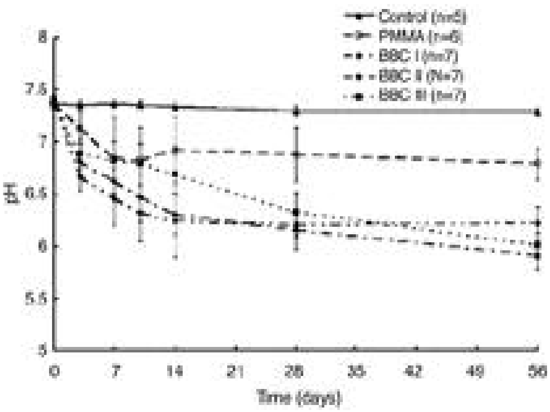


Fig. 6. The change in pH values during the degradation: The solution was not replaced.

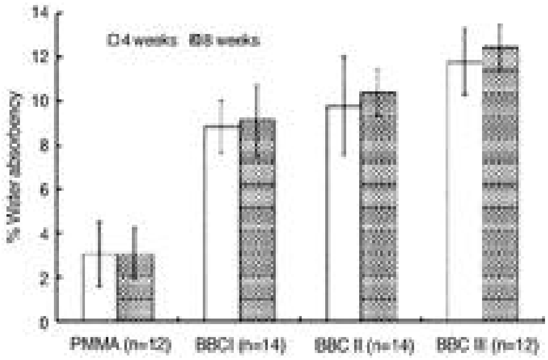


Fig. 7. The change in water absorbency during the degradation for each specimen.

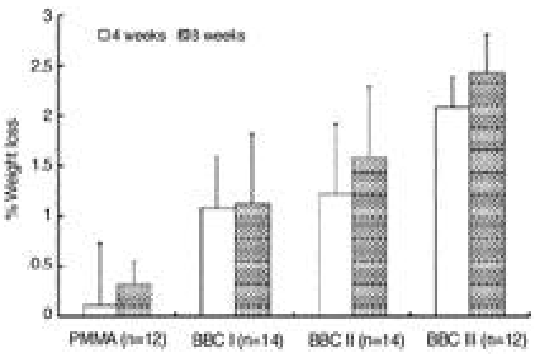


Fig. 8. The percentage in weight loss during the degradation for each specimen.

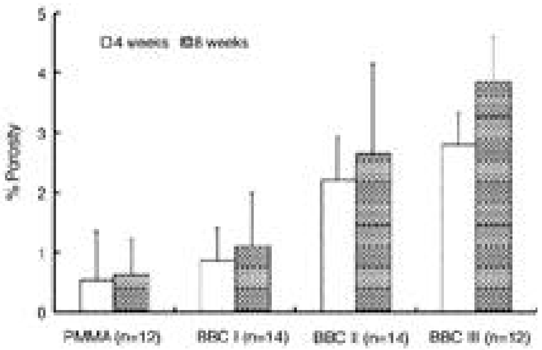


Fig. 9. The change in porosity during the degradation for each specimen.

계수(compressive Young's moduli)는 각각 2.4±0.3, 2.3±0.5, 1.5±0.4, 그리고 2.0±0.3 GPa이었고(Fig. 10-a), 최대압축강도(UCS)는 각각 81.8±4.5, 72.5±4.6, 63.7±4.5, 그리고 93.3±11.3 MPa이었다(Fig. 10-b). 압축 탄성계수는 PMMA와 BBCⅠ, Ⅲ간 유의한 차이를 보였으며, 최대압축강도는 PMMA와 모든 종류의 BBC들 간에 유의한 차이를 보였다($p<0.05$). 또한 8 주 분해 후 BBCⅠ, Ⅱ, Ⅲ와 PMMA의 탄성계수는 각각 2.1±0.1, 1.5±0.2, 1.2±0.1, 그리고 2.0±0.1 GPa이었고(Fig. 10-A), 최대압축강도는 각각 72.7±3.9, 59.0±5.1, 48.9±3.4, 그리고 90.9±4.5MPa이었다(Fig. 10-B). 시간의 경과에 따라 PMMA의 압축탄성계수와 최대압축강도는 유의한 차이를 보이지 않았으나 BBCⅠ, Ⅱ 그리고 Ⅲ는 유의한 차이를 보였고, BBC들간에서도 유의한 차이를 보였다($p<0.05$).

4) 발열온도의 분석

각 시편의 고형화시 발열온도의 변화를 Fig. 11에 나타내었다. 측정된 PMMA의 평균 최대발열온도는 76.3±2.7℃인 반면 BBCⅠ은 60.4±4.8℃ 그리고 Ⅱ와 Ⅲ는 각각 53.5±2.0℃, 49.9±1.5℃를 나타내었고 모든 군간 유의한 차이를 보였다($p<0.05$). 또한 평균 경화시간의 경우 PMMA는 9.0±0.3분인 반면, BBCⅠ, Ⅱ 그리고 Ⅲ는 각각 14.0±0.4분, 18.3±0.5분과 20.3

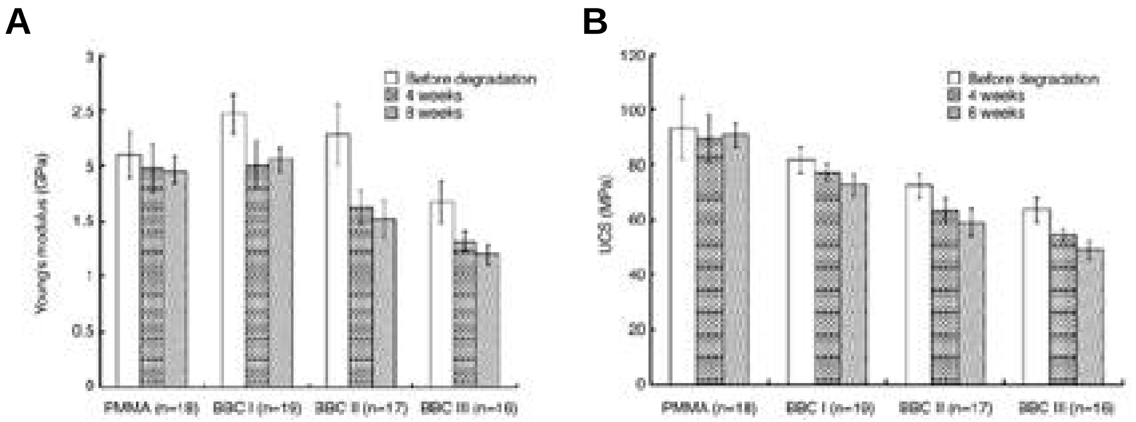


Fig. 10. The typical mechanical properties of each specimen during the degradation: (**A**) Compressive Young's moduli, (**B**) Ultimate Compressive Strength(UCS).

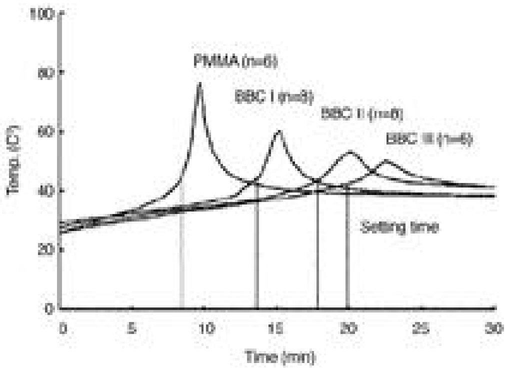


Fig. 11. The change in exothermic temperature during polymerization with setting time.

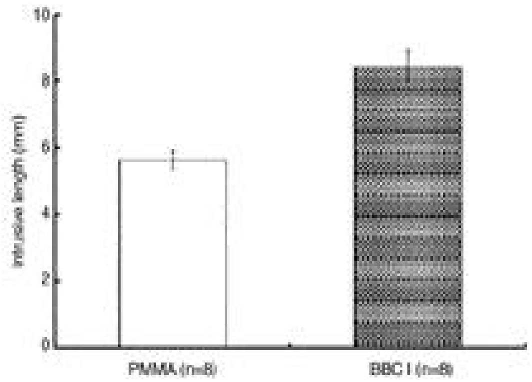


Fig. 12. Comparision of intrusive lengths of PMMA and BBCⅠ. This was more intrusive than that.

±0.6분을 나타내어 역시 유의한 차이를 보였다 ($p<0.05$).

5) 관입 조사 분석

PMMA와 BBCI의 관입된 거리는 각각 5.6±0.3 mm와 8.4±0.5 mm를 나타내었고(Fig. 12), 유의한 차이를 보였다($p<0.05$).

6) 세포 반응의 분석

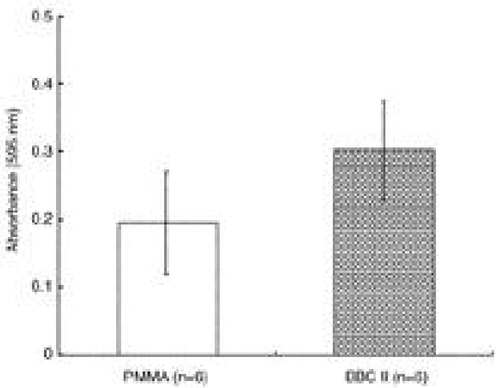


Fig. 13. Comparision of cell proliferations of PMMA and BBC II. The MTT assay showed that the cells were more proliferative on BBC II.

한국화학시험연구원에 의한 세포 독성 시험 결과, 모든 BBC는 세포독성에 대한 반응이 나타나지 않아 유해하지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 MTT assay를 통하여 PMMA와 BBCII의 세포 증식을 비교하였을 때, BBCII가 PMMA 보다 50% 이상의 유의한 증가를 보였다($p<0.05$)(Fig. 13).

2. 동물 실험

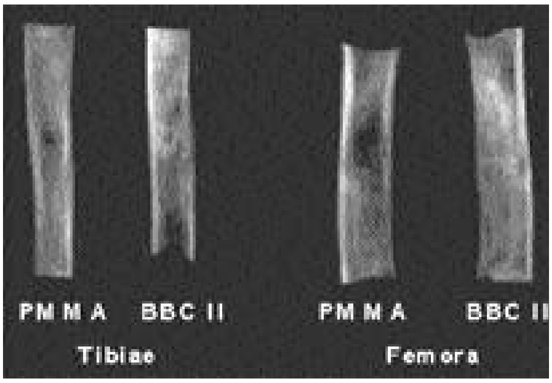


Fig. 14. Radiological examinations of tibia and femur with injected PMMA and BBCⅡ. They revealed the radiopacity of the BBCⅡ.

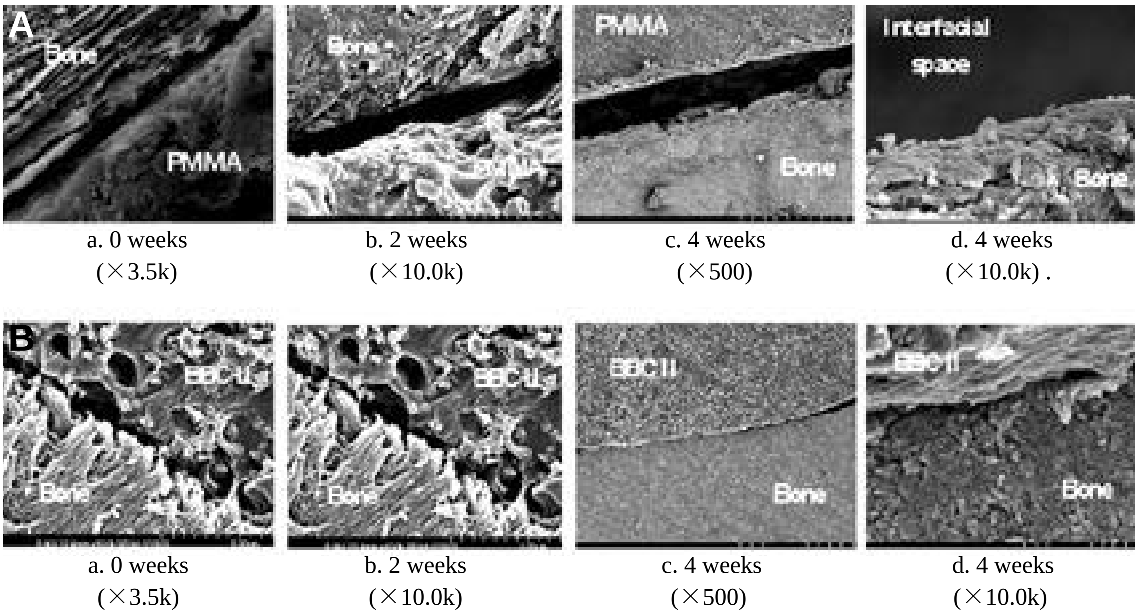
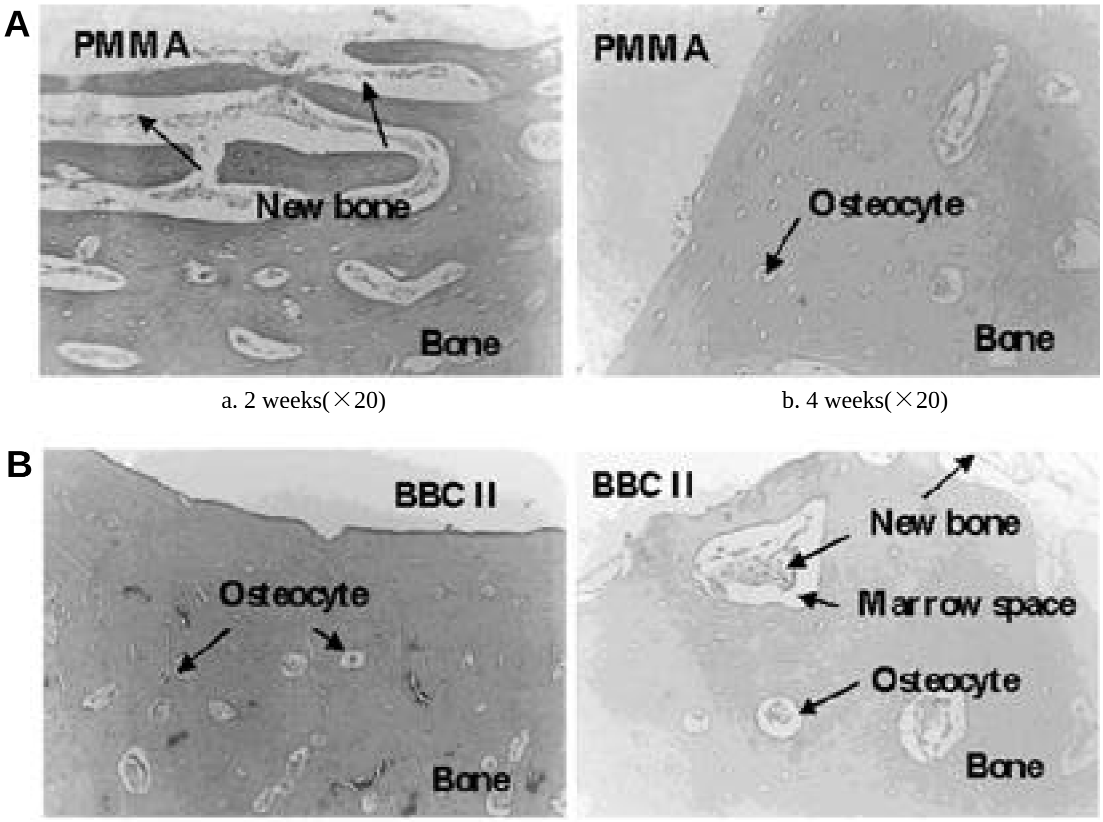


Fig. 15. The observations of the interfaces between the bone and bone cements: (**A**) bone-PMMA, (**B**) bone-BBC II.

PMMA와 BBCII를 이식한 직후 희생시킨 토끼의 방사선 관찰 결과를 Fig. 14에 나타내었다. BBCII의 경우 방사선으로 관찰한 결과, 우상위 대퇴골에서 방사선비투과성(radiopacity)을 보였다. 또한 이식 후 초기, 2주 그리고 4주 경과 후, 골과 골시멘트 계면의 미세구조의 변화를 Fig. 15에 나타내었다. 이식 후 초기에 BBCII는 PMMA에 비해 계면 내에 골성장에 필요한 작은 구멍들이 많이 존재하였고, 이식 초기에 비해 BBCII와 골 사이의 공간은 4주 경과 후 PMMA보다 골과 골시멘트 계면 사이의 공간이 훨씬 줄어들었다. 또한 Fig. 16에 나타난 조직학적 검사 결과와 같이, 2주 경과 후에는 PMMA가 BBCII보다 계면에 많은 신생골이 형성되기 시작하였으나, 4주 경과 후에는 BBCII가 PMMA보다 더 많은 신생골과 골세포(osteocyte)들이 관찰되었고, 염증반응도 없었다.

고　　찰

본 연구의 목적은 재료 특성, 세포 반응 및 동물 실험을 통하여 기존의 PMMA 골시멘트를 대치하는 생체 활성 골시멘트(BBC)를 제안하는 데 있다. 제안된 BBC들은 생체친화성이 뛰어난 골분말(HA)와 키토산을 포함하기 때문에 화학적 성분 면에서 기존의 PMMA 골시멘트보다 우위에 있을 것으로 사료된다. 분해성에서 BBC들의 임상적용 가능성을 확인 할 수 있었다. SEM 관



a. 2 weeks(×20)　　b. 4 weeks(×20)

a. 2 weeks(×20)　　b. 4 weeks(×20)

Fig. 16. The histological examinations of the interfaces between the bone and bone cements after 2 and 4 weeks implantation. After 4 weeks of implantation, new bone formations were observed more in this than that (H&E stain).

찰에서 BBC들은 키토산이 분해 된 후 골유도를 위한 공간을 제공할 것으로 사료된다. 다공성의 측정은 밀도를 이용하여 측정 되는데 본 연구에서 측정한 부피는 실험 전 측정한 초기 부피를 기준으로 하였으며 이에 따른 시편의 질량변화를 통해 밀도를 측정하여 다공성을 계산 하였다(Fig. 9). 다공성 계산에 의한 생체활성 골시멘트의 다공성은 4%에 지나지 않았지만, chitosan은 밀도 차이에 의해 표면에 많이 존재하게 된다는 사실과 SEM관찰(Fig. 4)에서 나타난 표면의 모습을 통해 실제 생체골과 유착하게 될 시편 표면에서는 다공성이 상당히 증가됨을 알 수 있었다. 또한 골 분말은 기존의 PMMA보다 골유도 등에 효과적일 것으로 사료된다. HA 분말의 존재와 다공성의 상승 효과는 1) 세포 증식, 2) 골세포 활성, 3) 골유도와 골전도 과정 그리고 4) 골 재생 등을 향상시킨다[19]고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 제안된 BBC들은 분명히 기존의 골시멘트보다 더욱 생체친화성을 보여줄 것으로 판단된다. 분해성 조사에서 BBC들의 pH 변화는 점차적으로 감소하여 pH 6.0 정도에서 수렴하는 경향을 보였으나, Chitosan의 분해로 인한 pH 변화에 대한 문헌조사결과 Chitosan은 현재 생체재료로서 많이 이용되고 있는 물질이며 Maruyama등은 세포를 24~48시간 동안 pH 6에 노출시 세포의 회복에 부정적인 효과를 나타내지 않는다고 보고하였다[17]. 또한 실제 생체 내에서는 체액의 순환이 pH 변화를 긍정적으로 감소 시켜 줄 것으로 판단되며, 생체 내의 체액 순환을 가정한 배지의 교환에 따른 pH 변화 측정 실험결과도 pH 변화가 미미한 것으로 나타났다. 따라서 BBC들의 pH 변화는 세포의 기능에 영향을 주지 않을 것으로 사료된다. 본 연구에서 제안한 BBC들은 PMMA보다 수분흡수도, 무게 감소와 다공성의 증가를 보였다. 이러한 결과들은 PMMA 기질 내의 키토산 분해 그리고 골 분말이 함유한 미량의 TCP (tri-calcium phosphate)로 인한 골 분말의 분해에 의한 것으로 사료된다. 이러한 TCP의 존재는 HA 분말의 생분해성을 증가시킨다고 하였으며[18], Lu 등은 생체 내에서 TCP는 보다 빨리 분해되고, HA 분말은 매우 느린 것으로 보고하였다[33]. 또한 분해에 의한 BBC들의 다공성 증가는 골세포의 부착에 영향을 줄 수 있기 때문에[34,35] 골 성장의 유도에 효과적일 것으로 사료된다. 이전의 연구자들은 이미 성공적인 골유도를 위한 다공의 크기는 최소 150 ㎛가 필요하다고 보고하였다[20]. 따라서 분해 8주 후의 BBCII와 III의 SEM 사진에서 보여진 골시멘트 내의 200 ㎛ 크기의 다공성의 유효함을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 분해가 시작되기 전에는 BBC 복합물중 BBCIII만 PMMA보다 낮은 압축탄성계수를 나타내었고, HA 분말을 가장 적게 포함하는 BBCI는 PMMA보다 높은 압축탄성계수를 나타내었다. 이러한 결과는 Ishihara 등이 PMMA 분말에 40(wt%) HA 분말 첨가시 압축탄성계수의 증가하였다36)고 보고한 결과와 부합되는 것으로 사료된다. 또한 PMMA는 8주 분해 후에도 압축탄성계수와 최대압축강도의 유의한 차이를 보이지 않았다($p<0.05$). 그러나 BBCII와 III는 유의한 감소를 보였고($p<0.05$), PMMA에 비해 BBCII의 압축탄성계수는 22.6%, 최대압축강도는 35.1% 감소하였으며, BBCIII의 경우 각각 38.9%와 46.3% 감소하였다. Barralet 등은 CPC(calcium phosphate cement)의 다공성 증가로 인한 압축탄성계수와 강도의 감소를 보고하였으며[14], 이러한 결과는 단지 기존의 골시멘트만을 사용했을 경우에 발생할 수 있는 응력 차폐 현상을 줄일 수 있을 것으로 사료된다. 경화시간에서 PMMA와 BBCII, III간에 유의한 차이를 보였으나($p<0.05$), BBCI과 II의 평균경화시간이 기존의 PMMA보다 긴 점은 기존의 PMMA의 빠른 경화시간으로 인한 골시멘트의 적절한 운반을 저해할 수도 있다는 임상적 소견에 비추어 바람직한 현상으로 사료된다. 또한 발열온도에서도 PMMA와 BBC들 사이에 유의한 차이를 보였다($p<0.05$). PMMA의 높은 발열 온도는 심각한 주위 조직(골) 괴사를 야기할 수 있다[20]는 점에 비추어 BBC들은 PMMA보다 발열온도가 낮아 주위 조직의 괴사를 막을 수 있을 것으로 사료된다. 또한 Castaldini 등이 PMMA내에 HA 분말의 존재는 중합 반응으로 인한 발열을 줄인다[37]고 보고한 바 있다. BBC 복합물들의 점도를 측정하기 위한 관입 길이 측정은 예비 실험에서 BBC II와 III가 ASTM 규격 mold를 통한 측정

범위를 넘어 측정 할 수 없어, 본 연구에서는 PMMA와 비교가 가능한 BBC I만을 측정 하였다. BBC I의 관입 조사에서 BBCⅠ은 PMMA보다 점도가 낮아 임상적으로 더욱 효과적일 것으로 사료되며, Vallo 등은 PMMA에 HA 분말의 첨가는 점성의 감소를 보인다고 보고하였다[3]. 세포 증식에서 BBCⅡ는 PMMA보다 더욱 바람직한 것으로 사료된다(Fig. 13). 이러한 결과들은 PMMA 기질 내에 골 분말과 키토산의 첨가는 순수한 PMMA보다 골아세포(osteoblast) 반응 등을 향상시키는 것으로 사료되며, 이러한 결과들은 이전의 연구[2,31,34,35]와 일치한다. 본 연구에서 BBC II만을 세포 증식 실험 한 이유는 세포독성 실험을 공인 인증 기관인 한국화학시험연구원에서 ISO 기준에 따라 검증 하였으므로 추가적인 실험으로 세포 증식 실험 수행 하였는데, BBC I의 경우 골시멘트로서 강도가 PMMA보다 크게 나타났고 발열온도에서 60℃가 넘어 실효성이 없다고 판단 하였고, BBC III는 경화 시간이 너무 길어 실제 임상에서 이용이 불가능 하다고 판단되어 BBC II만을 세포 증식 실험 하였다. 동물 실험에서 SEM 관찰 결과 이식 후 초기에 BBCⅡ는 골과 골시멘트의 계면 내에 골유도를 위한 많은 다공들이 존재하였고, 4주 이식 후에는 PMMA에 비해 계면의 공간이 훨씬 줄어들었다. 이것은 BBCⅡ의 4주 후 조직학적 검사의 결과, 관찰된 많은 골세포와 계면 내에 신생골의 형성에 의한 것으로 사료된다. Dai 등은 개 모델에서 5개월 후에 HA 분말을 첨가한 골시멘트는 HA 입자들이 분해되는 자리로 골의 성장에 의한 골유합과 계면강도의 증가를 보고하였다[38]. 또한 Kwon 등이 토끼 모델에서 6주 경과 후에 30 wt%의 골분말(HA)을 포함한 PMMA는 계면전단강도가 증가하였다[16]고 보고한 점도 HA 분말의 첨가가 유용함을 설명하고 있다. 한편 2주 이식 후 조직학적 검사 결과, PMMA가 BBCⅡ보다 계면에 신생골의 형성이 많은 것은 PMMA의 높은 발열에 의한 주위 골조직의 손상을 회복하려는 골조직의 피드백(feed back) 작용에 의한 것으로 사료된다. 따라서 장기적인 관점에서 BBCⅡ가 PMMA보다 생체친화성에서 우위를 보일 것으로 사료되며, 기존의 PMMA 골시멘트 대치물로서 임상적용 가능성이 높을 것으로 사료된다. 본 연구는 생체내에서 새로운 골시멘트가 가지는 생체친화성(안전성)에 초점을 맞추고 있다 그러므로 본 연구에서 제안된 생체활성 골 시멘트는 앞으로 유효성 부분에서 보완하여할 점들을 많이 남겨두고 있다. 특히 골 시멘트와 생체골 사이 계면에 대한 기계적 강도 실험(접착력 실험)은 아직 ASTM이나 ISO에 명시된 표준 실험법이 없고 또한 통계적 혹은 생체역학적으로 유의한 결과를 얻기 위해서는 최소한 8주 이상의 다수의 동물 실험이 필요하기 때문에 현재 준비중인 임상 실험의 유효성 검증 과정에서 보완할 예정이다.

결　론

생체 외 및 동물 실험에 근거하여 다음의 결론을 얻었을 수 있었다.

1. BBC들의 화학적 성분은 C, O, Ca, P, Cl, Si, S, Ba 그리고 Mg 등으로 구성되어 있다.

2. BBC들의 표면 관찰에서 골 분말(HA)과 키토산 입자의 고른 분포를 보였다.

3. BBC들의 pH 변화는 1일 후에 점차로 감소하였으나 시간이 지남에 따라 생리식염수의 값에 준하는 pH 7.2~7.4에 도달함을 확인하였다.

4. 분해성, 발열온도와 관입 실험을 통하여 제안된 BBC들은 PMMA에 비해 다음과 같은 특성들을 가지고 있었다.

1) pH 변화: 감소(BBCⅠ; 8.4%, Ⅱ; 12.8%, Ⅲ; 11.5%)

2) 수분흡수도: 감소(BBCⅠ; 193.4%, Ⅱ; 234.7%, Ⅲ; 300.0%)

3) 무게감소: 감소(BBCⅠ; 236.4%, Ⅱ; 374.2%, Ⅲ; 626.1%)

4) 다공성: 증가(BBCⅠ; 80.4%, Ⅱ; 330.6%, Ⅲ; 525.4%)

5) 압축탄성계수: 분해 전(초기); 증가(BBCⅠ; 17.7%, Ⅱ; 8.5%), 감소(BBCⅢ; 20.4%), 8 주 분해 후; 증가(BBCⅠ; 4.9%), 감소(BBCⅡ; 22.6%, Ⅲ; 38.9%)

6) 최대압축강도(UCS): 감소(BBCⅠ; 20.1%, Ⅱ; 35.1%, Ⅲ; 46.3%)

7) 발열온도: 감소(BBCⅠ; 21.5%, Ⅱ; 29.7%, Ⅲ; 34.5%), 경화시간: 증가(BBCⅠ; 56.2%, Ⅱ; 76.9%, Ⅲ; 124.7%)
8) 관입된 길이: 증가(BBCI ; 59.8%)

5. BBCⅡ에 대한 세포 독성 및 세포 증식 비교 실험 결과, 기존의 PMMA보다 세포친화성이 우수하였다.

6. BBCⅡ의 동물 실험 결과, 골유도성 및 생체친화성을 확인할 수 있었으며 임상적용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서 제안된 BBC들은 기존의 골시멘트 대치물로서 임상 적용 가능성이 높을 있을 것으로 사료된다. 그러나 이를 위해서 장기간의 동물 실험 및 나아가 임상 시험이 요구될 것으로 사료된다.

REFERENCES

1) **Li YW, Leong JCY, Lu WW, et al**: A novel injectable bioactive bone cement for spinal surgery: a developmental and preclinical study, *J Biomed Mater Res,* 52(1), 164-170, 2000.
2) **Dalby MJ, Silvio LD, Harper EJ and Bonfield W**: Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response, *Biomaterials,* 23(2), 569-576, 2002.
3) **Vallo CI, Montemartini PE and Fanovich MA**: Polymethylmethacrylate-based bone cement modified with hydroxyapatite, *J Biomed Mater Res* (Appl Biomater), 48(2), 150-158, 1999.
4) **Hass SS, Brauer GM and Dickson G**: A characterization of polymethyl-methacrylate bone cement, *J Bone and Joint Surg,* 55A(3), 380-391, 1975.
5) **Deramond H, Wright NT and Belkoff SM**: Temperature elevation caused by bone cement polymerization during vertebroplasty, *Bone,* 25(2), 17S-21S, 1999.
6) **Belkoff SM, Mathis JM, Jasper LE and Deramond H**: An ex vivo biomechanical evaluation of a hydroxyapatite cements for use with vertebroplasty, *Spine,* 26(14), 1542-1546, 2001.
7) **Ikeuchi M, Yamamoto H, Shibata T and Otani M**: Mechanical augmentation of the vertebral body by calcium phosphate cement injection, *J Ortho Sci,* 6(1), 39-45, 2001.
8) **Belkoff SM, Mathis JM, Jasper LE and Deramond H**: The biomechanics of vertebroplasty, *Spine,* 26(14), 1537-1541, 2001.
9) **Garfin SR, Yuan HA and Reiley MA**: New technologies in spine, *Spine,* 26(14), 1511-1515, 2001.
10) **Lu JX, Huang ZW, Tropiano P, et al**: Human biological reactions at the interface between bone tissue and polymethylmethacrylate cement, J Mater Sci: *Mater Med,* 13(8), 803-809, 2002.
11) **Heini PF, Walchli B and Berlemann U**: Percutaneous transpedicular vertebroplasty with PMMA: operative technique and early results, *Eur Spine J,* 9(5), 445-450, 2000.
12) **Cunin G, Boissonnet H, Petite H, Blanchat C and Guillemin G**: Experimental vertebroplasty using osteoconductive granular material, *Spine,* 25(9), 1070-1076, 2000.
13) **Kim YS, Kang YH, Kim JK, et al**: The effect of bone mineral particles on the porosity of bone cement, Biomed. *Mater Eng,* 4(1), 37-46, 1994.
14) **Barralet JE, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR and Knowles JC**: Effect of porosity by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement, J Biomed Mater Res (Appl Biomater), 63(1), 1-9, 2002.
15) **Yamaguchi I, Tokuchi K, Fukuzaki H, et al**: Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites, *J Biomed Mater Res,* 55(1), 20-27, 2001.
16) **Kwon SY, Kim YS, Woo YK, Kim SS and Park JB**: Hydroxyapatite impregnated bone cement: in vitro and in vivo studies, *Biomed Mater Eng,* 7(2), 129-140, 1997.

17) **Maruyama M and Ito M**: In vitro properties of a chitosan-bonded self-harding paste with hydroxyapatite granules, *J Biomed Mater Res*, 32(4), 527-532, 1996.
18) **Suchanek W and Yoshimura M**: Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, *J Mater Res*, 13(1), 94-117, 1998.
19) **Moursi AM, Winnard AV, Winnard PL, Lannutti JJ and Seghi RR**: Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate-hydroxyapatite composite, *Biomaterials*, 23(1), 133 ~ 144, 2002.
20) **Benesch J and Tengvall P**: Blood protein adsorption onto chitosan, *Biomaterials*, 23(12), 2561-2568, 2002.
21) **Yokoyama A, Yamamoto S, Kawasaki T, Kohgo T and Nakasu M**: Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials, Biomaterials, 23(4), 1091-1101, 2002.
22) **Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB and Bernard GW**: Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro, *J Periodontol*, 67(11), 1170-1175, 1996.
23) **Wang M and Bonfield W**: Chemically coupled hydroxyapatite-polyethylene composites: structure and properties, *Biomaterials*, 22(11), 1311-1320, 2001.
24) **Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R and Mikos AG**: In vitro degradation of a poly(propylene fumarate)-based composite material, Biomaterials, 17(22), 2127-2130, 1996.
25) **Pascual B, Goni I and Gurruchaga M**: Characterization of new acrylic bone cement based on methyl methacrylate/1-hydroxypropyl methacrylate monomer, *J Biomed Mater Res* (Appl. Biomater), 48(4), 447-457, 1999.
26) **Pascual B, Gurruchaga M, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA and Goni I**: Influence of the modification of P/L ratio on a new formulation of acrylic bone cement, Biomaterials, 20(5), 465-474, 1999.
27) **Dunne NJ and Orr JF**: Influence of mixing techniques on the physical properties of acrylic bone cement, Biomaterials, 22(13), 1819-1826, 2001.
28) **Demian HW and McDermott K**: Regulatory perspective on characterization and testing of orthopedic bone cement, Biomaterials, 19(17), 1607-1618, 1998.
29) **Higgs WAJ, Lucksanasombool P, Higgs RJED and Swain MV**: A simple method of determining the modulus of orthopedic bone cement, J Biomed Mater Res (Appl Biomater), 58(2), 188-195, 2001.
30) Standard specification for acrylic bone cement, American Society for Testing and Materials(ASTM), 13(01), F451-99a, 1999.
31) **Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, et al**: A bone substitute composed of polymethylmethacrylate and α-tricalciumphosphate: results in terms of osteoblast function and bone tissue formation, Biomaterials, 23(23), 4523-4531, 2002.
32) **Granchi D, Cenni E, Savarino L, et al**: Bone cement extracts modulate the osteoprotegerin/osteoprotegerin-ligand expression in MG63 osteoblast-like cells, Biomaterials, 23(11), 2359-2365, 2002.
33) **Lu J, Descamps M, Dejou J, et al**: The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone, J Biomed Mater Res (Appl Biomater), 63(4), 408-412, 2002.
34) **Mayr-Wohlfart U, Fiedler J, Gunther KP, Pahl W and Kessler S**: Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line(Saos-2) in contact with different bone substitute materials, *J Biomed Mater Res*, 57(1), 132-139, 2001.
35) **Midy V, Dard M and Hollande E**: Evaluation of the effect of three calcium phosphate powders on osteoblast cells, J Mater Sci: Mater Med, 12(3), 259-265, 2001.
36) **Ishihara K, Arai H and Nakabayashi N**: Adhe-

sive bone cement containing hydroxyapatite particle as bone compatible filler, *J Biomed Mater Res,* 26(8), 937-945, 1992.

37) **Castaldini A and Cavallini A**: Setting properties of bone cement with added synthetic hydroxyapatite, Biomaterials, 6(1), 55-60, 1985.

38) **Dai KR, Liu YK, Park JB, Clark CR, Nishiyama K and Zheng ZK**: Bone particle impregnated bone cement Ⅱ in vivo weight bearing study, *J Biomed Mater Res,* 25(2), 141-156, 1991.