

칼슘 포스페이트 글라스 분말을
이식한 백서 두개골 결손부의
골조직 재생

연세대학교 대학원

치 의 학 과

문 현 주

칼슘 포스페이트 글라스 분말을
이식한 백서 두개골 결손부의
골조직 재생

지도교수 이 용 근

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

치의학과

문 현 주

문현주의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

부족하지만 한편의 논문을 완성하게 되었습니다. 본 논문이 완성되기까지 언제나 부족한 저를 끝까지 인내하시며 너무 많이 도와주시고 지도해 주신 이용근 교수님께 진심으로 감사드리며, 너무 큰 배려와 관심으로 지도해주신 김경남 교수님과, 아울러 따뜻한 조언과 격려를 아끼지 않으신 김종관 교수님, 최성호 교수님께 깊이 감사드립니다.

치과생체재료공학교실 여러분과 바쁜 중에도 실험에 대해 많은 도움을 주신 이상배 선생님, 정의원 선생님, 김성태 선생님, 권석훈 선생님과 석헌주 선생님께 감사드리며 또, 늘 곁에서 힘이 되어주는 친구들-영임, 소정, 민정, 예진, 복희, 민희에게 고마운 마음을 전합니다.

분에 넘치는 사랑을 베풀어주시는 아버님께 대학원 공부를 시작하게 해주셔서 감사드리며, 넘치는 사랑과 염려를 베풀어주시는 어머님과, 힘든 기간 내내 너무 큰 사랑으로 많이 보살펴 주신 엄마와 아빠께 깊이 감사 드립니다. 또 힘들 때 많이 의지가 되는 사랑하는 우리 큰언니, 작은언니, 큰형부, 작은형부, 석준이와 도련님께도 감사 드립니다.

사랑하는 남편과, 가장 큰 사랑과 행복을 가르쳐 주는 우리 아기 천사 동렬이에게 이 논문을 드립니다.

모든 분들께 감사드립니다.

2002년 12월

저자썸

목 차

도표 및 사진 목차	i
국문 요약	iii
I. 서 론	1
II. 연구 재료 및 방법	5
1. 연구 재료	5
가. 실험 동물	5
나. 실험 재료	5
2. 연구 방법	7
가. 실험군 설정	7
나. 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치	7
다. 조직학적 관찰	8
라. 조직 계층학적 관찰	8
마. 방사선 계층학적 관찰	8
바. 통계학적 분석	9
III. 결과	10
1. 조직학적 관찰	10
가. 2주 소견	10
(1) 대조군	10
(2) CPG 40	10
(3) CPG 400	10
나. 4주 소견	11
(1) 대조군	11
(2) CPG 400	11
다. 8주 소견	11
(1) 대조군	11

(2) CPG 40	11
(3) CPG 400	12
2. 조직 계측학적 관찰	12
가. 두개골 결손부 내 신생골 형성 길이	12
나. 두개골 결손부 내 신생골 형성 면적	14
3. 방사선 계측학적 관찰	15
가. 두개골 결손부 내 신생골 밀도	15
IV. 고찰	17
V. 결론	22
참고 문헌	24
사진 부도 설명	28
사진 부도	30
영문 요약	35

도표 및 사진 목차

Table 1. Number of Sprague-Dawley rats determined in this study	7
Table 2. Histomorphometric analysis for the length of the new bone formed.	13
Table 3. Histomorphometric analysis for the area of the new bone formed.	14
Table 4. Radiodensitometric analysis for the density of the new bone formed.	16
Fig. 1. Particle size distribution of the prepared calcium phosphate glasses having mean particle size of (a) 40 μm and (b) 400 μm , respectively.	6
Fig. 2. Sprague-Dawley rats used in this study.	30
Fig. 3. Defect formation.	30
Fig. 4. Sample transplantation.	30
Fig. 5. Suture after sample transplantation.	30
Fig. 6. Sacrification after 2, 4 and 8 weeks postoperatively.	30
Fig. 7. Harvested transplant after sacrifice.	30
Fig. 8. A schematic diagram depicting radiodensitometric analysis.	9
Fig. 9. Histologic microphotographs of the control groups after 2 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	31
Fig. 10. Histologic microphotographs of CPG 40 after 2 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	31
Fig. 11. Histologic microphotographs of CPG 400 after 2 weeks of	

transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	31
Fig. 12. Histologic microphotographs of the control groups after 4 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	32
Fig. 13. Histologic microphotographs of CPG 400 after 4 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	32
Fig. 14. Histologic microphotographs of the control groups after 8 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	33
Fig. 15. Histologic microphotographs of CPG 40 after 8 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	33
Fig. 16. Histologic microphotographs of CPG 400 after 8 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	33
Fig. 17. Histomorphometric analysis of newly formed bone length.	13
Fig. 18. Histomorphometric analysis of newly formed bone area.	15
Fig. 19. Digital images taken by Digora.	34
Fig. 20. Radiodensitometric analysis of newly formed bone density.	16

국문 요약

칼슘 포스페이트 글라스 분말을 이식한 백서 두개골 결손부의 골조직 재생

외상, 종양, 수술, 감염 등에 의해 야기된 골 결손부를 치료하는 것은 치료 치료에 있어 아주 중요한 문제로 질환의 진행을 정지시키는 것 뿐 만 아니라 지지 조직들의 흡수를 예방하고, 이미 파괴된 지지 조직들을 기능적, 심미적으로 재생시키는 데 그 목적이 있다. 골 이식재는 골재생을 위한 공간을 제공하기 위해 사용되어 외상이나 수술로 야기된 결손부를 골증대시키고, 발치 부위와 인접 부위의 치조골 흡수를 예방하고, 치주 질환으로 야기된 골 결손부는 골재생을 유도하며, 임플란트 수술 시에는 부족한 치조골 부위를 증대시키는 역할을 한다.

골 이식재의 종류에는 자가골 이식재, 동종골 이식재, 이종골 이식재, 합성골 이식재 등이 있으며, 이중 합성골 이식재료는 주로 아파타이트 등의 칼슘 포스페이트 화합물이 사용되어 왔다. Lee 등은 기존의 칼슘 포스페이트 화합물에 비해 Ca/P 비가 0.6으로 매우 낮고, 비결정성인 칼슘 포스페이트 글라스를 개발하여 *in vitro* 시험 결과 생분해 속도가 매우 빠르고, 재료 표면에 아파타이트 결정이 석출되며, 유사 전구 골모세포인 MC3T3-E1 세포의 알카리성 인산 효소 활성도가 유의하게 증가되고, 골결절 형성 시기가 빨라져서 세포의 초기 분화에 효과적이라고 보고하였다.

이에 본 연구에서는 백서 두개골에 8 mm 지름의 원형 결손부를 형성하여 평균 입도 40 μm 인 CaO-CaF₂-P₂O₅-MgO계 칼슘 포스페이트 글라스(CPG 40)와 평균 입도 400 μm 인 CaO-CaF₂-P₂O₅-MgO-Al₂O₃계 칼슘 포스페이트 글라스(CPG 400)를 이식하고 아무런 처치도 하지 않은 군을 대조군으로 하여 술후 2주, 4주 및 8주의 치유 결과를 조직학 및 방사선학적으로 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CPG 40은 조작성과 응집력이 우수하여 결손부 내에 충전이 용이하고 혈류에 저항성이 있었으나 염증이 심하여 술후 백서의 두피가 벗겨졌으며, CPG 400은

조작이 난이하고 혈류에 산재되는 단점이 있었으나 치유 양상은 깨끗하였다.

2. 조직학적 관찰 결과 대조군과 CPG 40에서는 골 성장 양상이 주로 결손부 변연과 경뇌막에 국한되는 삼각형을 나타내었으나, CPG 40에서는 결손부 변연과 경뇌막 뿐 아니라 상부로도 광범위하게 활발히 진행되는 양상을 나타내었다.
3. 백서 두개골 결손부 내 신생골의 형성 길이는 대조군과 CPG 40은 술후 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나, CPG 40은 술후 2주에는 대조군보다 큰 값을 나타내었지만, 술후 8주에는 대조군보다 오히려 낮은 값을 나타내어 시간에 따라 오히려 감소하였다. CPG 40은 전기간에서 대조군 및 CPG 40에 비해 통계적으로 유의하게 큰 값을 나타내었다. 단, 술후 2주의 CPG 40과 CPG 40간에는 통계적인 유의차가 없었다($p < 0.05$).
4. 백서 두개골 결손부 내 신생골의 형성 면적은 대조군과 CPG 40은 술후 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나, CPG 40은 술후 2주에는 대조군보다 큰 값을 나타내었지만, 술후 8주에는 대조군보다 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내어 시간에 따라 오히려 감소하였다. CPG 40은 전기간에서 대조군과 CPG 40에 비해 통계적으로 유의하게 큰 값을 나타내었다($p < 0.05$).
5. 백서 두개골 결손부 내 신생골의 형성 밀도는 대조군과 CPG 40은 술후 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나, CPG 40은 술후 2주에는 대조군보다 큰 값을 나타내었지만, 4주와 8주에는 오히려 대조군보다 낮은 값을 나타내었다. CPG 40은 전기간에서 대조군보다 높은 값을 나타내었고, 술후 8주에서는 통계적으로 유의차가 있었으며, CPG 40에 비해서도 전기간에서 높은 값을 나타내었으나, 술후 2주에는 통계적 유의차가 없었다($p < 0.05$).

이상의 결과를 통해 백서 두개골 결손부에 칼슘 포스페이트 글라스를 이식한 경우에 신생골 길이, 면적 및 밀도가 유의하게 개선되어 골조직 재생 유도 능력이 우

수한 재료로 사료되며, 그 효과는 알루미나의 첨가와 입도에 의존하였다. 향후 차폐막이나 성장 인자와 함께 사용하면 좋은 결과를 얻을 것으로 기대된다.

핵심되는 말 : 폴리식재, 칼슘 포스페이트, 두개골 결손부, 백서

칼슘 포스페이트 글라스 분말을 이식한 백서 두개골 결손부의 골조직 재생

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 이 용 근 교수)

문 현 주

I. 서 론

외상, 종양, 수술, 감염 등에 의해 야기된 골 결손부를 치료하는 것은 치과치료에 있어 아주 중요한 문제로 질환의 진행을 정지시키는 것 뿐 만 아니라 지지 조직들의 흡수를 예방하고, 이미 파괴된 지지 조직들을 기능적, 심미적으로 재생시키는데 그 목적이 있다.

골 이식재는 골재생을 위한 공간을 제공하기 위해 사용되어 파절된 부위의 유합을 촉진시키고, 외상이나 수술로 야기된 결손부를 골 증대시키고, 발치 부위와 인접 부위의 치조골 흡수를 예방하고, 치주 질환으로 야기된 골 결손부는 골재생을 유도하며, 임플란트 수술 시에는 부족한 치조골 부위를 증대시키는 역할을 한다 (Jeffery, 1997).

이에 다양한 종류의 골 이식재가 연구되어 왔다. 골 이식재의 종류에는 자가골 이식재, 동종골 이식재, 이종골 이식재, 합성골 이식재 등이 있다. 이중 자가골 이식재는 수 년 간 치조골 결손 부위에서 임상적으로 가장 좋은 결과를 보였지만, 부가적인 수술이 필요하고 충분한 양을 얻을 수 없으며, 술후 흡수로 인한 전체 부피의 감소와 공여 부위의 위험성 증가, 환자의 불편감, 골유착 유발, 치근 흡수 등의 단점이 있다(Dragoo, 1973). 이런 문제점들을 해결하기 위해 지난 수년간 자가골의 대체 재료 개발에 많은 연구가 있어 왔다. 동종골 이식재나 이종골 이식재의 경우

다양한 생산과정을 통해 여러 공급원으로부터 얻어져 마침내 임상적 효과를 거두었고 자가골 이식재에 비해 부가적인 수술이 필요 없고 흡수가 많이 일어나지 않는다는 장점이 있으나 질환 전염 가능성과 이식 항원에 대한 거부 반응이 나타날 수 있다는 위험성을 내포하고 있다(Cecilia 등, 1999).

이에 이상적인 합성골 이식재를 개발하기 위한 연구가 현재까지 많이 진행되어 오고 있는데 칼슘 포스페이트 화합물(hydroxyapatite, tricalcium phosphate, octacalcium phosphate), HTR(hard tissue replacement) 고분자, 생체활성 유리 및 결정화 유리 등이 있다.

지난 몇 십 년 동안 합성골 이식재로서 가장 각광을 받아온 것은 칼슘 포스페이트 화합물로서 치주낭을 제거하기 위해서, 치주 질환 등에 의한 치조골 상실을 치료하기 위해, 신생 백악질 재생을 유도하고 치조능 재건술과 발치와 보존 등의 치료에 사용되어 왔다. 이는 생체 적합성이 있고 크기와 형태를 쉽게 변화시켜 제조할 수 있고 신생골 형성을 위한 화학적 환경과 골전도 가능한 공간을 제공한다(Jeffery, 1997). In vitro 실험 뿐 만 아니라 동물 실험과 사람에게 이식했을 때 그 안전성과 생체적합성, 임상적으로 우수한 결과에 대한 많은 보고가 있어 왔다(Daculsi, 1989). 이의 가장 많이 사용되는 2가지 형태는 hydroxyapatite(HA)와 tricalcium phosphate(TCP)인데 이들의 작용 기전은 골전도(osteoconduction)로 신생골 형성을 위한 공간을 형성하여 신생골 형성이 그들의 표면을 따라 일어나게 하는 것이다(Misch, 1993). HA는 자연골의 구성요소로 석회화된 골의 60~70%와 치아 법랑질의 98%를 구성하고 Ca/P의 비는 1.67이다(Meffert 등, 1985). HA는 생체 적합성이 있고 인접 경조직이나 연조직에 쉽게 부착된다. HA의 물리적 화학적 성질은 흡수 속도에 영향을 미칠 뿐 아니라 임상적 적용을 결정하는데, 물리적 성질은 표면적, 공급 형태(블록형, 입자형), 기공성(치밀형, 거대기공형, 미세기공형), 결정화도(결정질, 비정질) 등에 영향을 받고 화학적 성질은 Ca/P 비, 순도, HA의 이온 치환, 주위 조직의 pH에 영향을 받는다(Klinge 등, 1992). TCP는 화학적으로 HA와 유사하나 자연골의 구성요소는 아니다. Ca/P 비는 1.5이고, 생체 내에서 TCP는 표면에 HA가 형성된다(Duane, 1972). TCP의 흡수 속도는 다양하여 연조직과 경조직에서 다르게 나타나고 재료의 화학적 구성과 기공율, 입자 크기에 따라

다르다. 열과 열균은 흡수율 뿐 만 아니라 화학적 구조와 성질을 바꿀 수 있다 (Robert 등, 1987).

칼슘 포스페이트를 생체 내에 이식했을 때 신생골은 형성되지 않고 입자 주위로 단지 섬유성 결체 조직만이 둘러싸여져 있다는 보고도 있었으나(Stahl, 1985), 그와 반대로 신생골을 형성한다는 많은 연구 결과가 보고되었다. HA가 신생골을 형성한다는 것은 1975년 Chiroff 등에 의해 대퇴골과 장골의 해면골에 이식했을 때 신생골이 형성된다고 최초로 보고되었다. Gauthier 등(1999)은 발치와에 biphasic calcium phosphate(BCP)를 주입했을 때 골충전을 촉진시킨다고 보고하였다. Bowers 등(1986)은 사람에게 TCP를 이식하고 1년 후 관찰하였을 때 TCP 입자가 결체 조직에 둘러싸여 있으면서 신생골에 결합되어 있고 신생골을 형성한다고 보고하였다. Hashimoto 등(1995)은 깊은 치주 결손부에 칼슘 포스페이트 화합물을 이식했을 때 활발한 골치유의 결과를 보였다고 보고하였다. Saffar 등(1990)은 4명 환자의 골내낭 병소에 TCP를 이식하여 10~16개월 후 생검하여 조직학적으로 관찰하였는데 TCP는 신생 골형성을 촉진하는 능력이 있고, 골형성이 시작됨과 동시에 활발하게 흡수되기 시작하여 골형성이 완료되는 시기에는 완전히 흡수된다고 보고하였다. Kamakura 등(1999)은 octacalcium phosphate(OCP)를 백서 두개골 결손부에 이식했을 때 신생골 형성을 유도한다고 보고하였고, Sasano 등(1995)은 rat tibia에 OCP를 이식했을 때 이식 1주후 chondrogenesis와 osteogenesis가 시작되었고 2주 후에는 거의 모든 연골이 골조직으로 대체되었다고 보고하였다.

Lee 등(2002)은 HA 및 TCP 등 기존의 칼슘 포스페이트 화합물에 비해 Ca/P 비가 0.6으로 매우 낮고, 비결정성인 칼슘 포스페이트 글라스에 관하여 보고하였다. pH 4~7.2의 완충 용액에서 시험한 결과 낮은 Ca/P 비와 비결정성으로 인해 기존의 칼슘 포스페이트 화합물에 비해 생분해 속도가 향상되었으며, 의사체액 및 우태아 혈청 내에서 일주일만에 칼슘 포스페이트 글라스 표면에 아파타이트 결정이 침착되어 생체 활성이 있다고 보고하였다. 송(2001)은 섬유모세포인 L929 세포를 대상으로 세포 증식 시험과 한천중층시험을 통해 칼슘 포스페이트 글라스가 생체 독성이 없으며, 유사 전구 골모세포인 MC3T3-E1 세포를 대상으로 시험한 결과 알칼리성 인산 효소 활성도가 유의하게 증가되고, 골결절이 빨리 형성되어 세포의 초기

분화에 효과적이라고 보고하였다. 김(2002)의 보고에 의하면 성견의 1면 골내낭 치조골 결손부에 칼슘 포스페이트 글라스를 이식했을 때 신생 백악질 형성에 효과가 있다는 결과를 얻었다.

이에 저자는 최근 개발된 생분해성 칼슘 포스페이트 글라스를 외과적으로 형성된 백서 두개골 결손부에 이식하여 골조직 재생 유도 능력을 조직학적, 조직 계측학적 및 방사선 계측학적으로 관찰, 평가하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

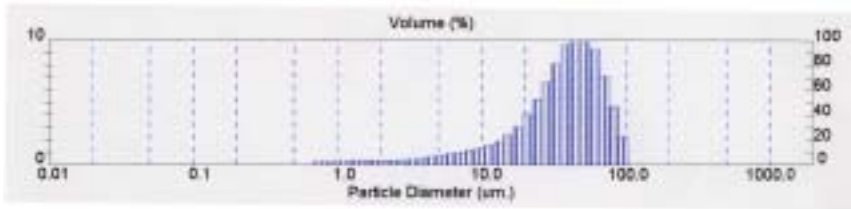
가. 실험 동물

본 연구에서는 체중 200~250g의 수컷 백서(Sprague-Dawley rat) 72마리를 사용하였다. 실험 부위는 두개골을 이용하였으며, 실험 동물은 연세 임상의학연구센터의 관리 규정에 따라 관리하였다.

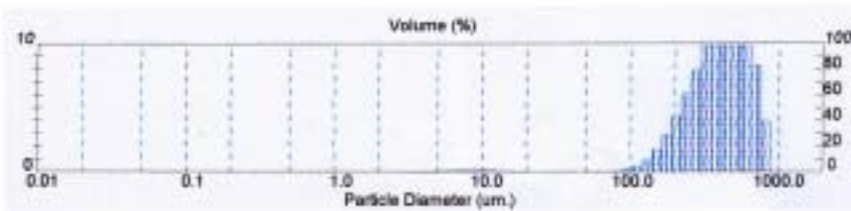
나. 실험 재료

CaCO_3 , CaF_2 , H_3PO_4 , MgO 를 출발 물질로 하여 $\text{CaO-CaF}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ 계 칼슘 포스페이트 글라스를 제조하였다. Ca/P 의 원자비가 0.6이 되도록 출발 물질을 혼합하였으며, CaO/CaF_2 의 몰비는 9로 하였고, MgO 는 무게비로 1%를 첨가하였다. 혼합한 배치를 80°C 에서 12시간 건조한 후, 백금 도가니를 이용하여 super kanthal furnace(BF51314C, Lindberg/BlueM, Asheville, NC, U.S.A.)에 넣고 450°C 에서 1시간 하소(calcination)한 다음 850°C 에서 용융하였다. 용융한 후 상온의 흑연판(graphite plate)에 부어 급냉(quenching)한 후, 알루미나 유발과 ball mill로 분쇄하고 체가름(sieving)하여 Fig. 1(a)에 나타낸 바와 같이 평균 입도 $40\ \mu\text{m}$ 칼슘 포스페이트 글라스의 미세 분말을 제조하였다.

칼슘 포스페이트 글라스의 생분해 속도를 조절하기 위하여 Al_2O_3 를 무게비로 5% 첨가하여 1350°C 에서 재용융하여 급냉한 후 체가름하여 Fig. 1(b)에 나타낸 것 같이 평균 입도 $400\ \mu\text{m}$ 의 조대 분말을 제조하였다.



(a)



(b)

Fig. 1. Particle size distribution of the prepared calcium phosphate glasses having mean particle size of (a) 40 μm and (b) 400 μm, respectively.

2. 연구 방법

가. 실험군 설정

두개골 결손부에 아무 것도 이식하지 않은 군을 대조군으로, 칼슘 포스페이트 글라스의 미세 분말과 조대 분말을 이식한 군을 각각 CPG 40과 CPG 400으로 설정하였다. 각 군은 수술 후 각각 2주, 4주, 8주의 치유 기간을 두고 희생하여 관찰하였다. 각 주별로 8마리씩으로 72마리를 실험하였으나 실험 도중과 실험 후 치유 기간 동안에 사망하여 희생 후 관찰한 동물은 Table 1에 나타낸 바와 같이 총 64마리였다.

Table 1. Number of Sprague-Dawley rats determined in this study.

Duration	Control	CPG 40	CPG 400
2 Weeks	7	8	5
4 Weeks	6	8	8
8 Weeks	7	7	8

나. 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치

각 군의 백서를 염산 케타민(50 mg/ml)으로 근육 주사(70 mg/ml)하여 마취하였다. 두부의 털을 깎고 povidone iodine으로 소독한 후 고정하였다(Fig. 2). 수술 부위인 두개골 부위에 소량의 2% lidocaine(1:100,000 epinephrine 함유)으로 침윤 마취한 후 전두골 전방부에서 후두골 후방부까지 정중부를 따라 두피를 절개하여 두개골의 상면을 노출시켰다. 지름 8 mm의 trephine bur를 이용하여 경뇌막(dura mater)에 손상을 주지 않도록 하면서 지름 8 mm의 원형 결손부를 형성하였다(Fig. 3). 대조군에는 아무 것도 이식하지 않고, CPG 40과 CPG 400에는 각각 칼슘 포스페이트 글라스 미세 분말과 조대 분말을 식염수에 적셔 두개골 결손부에 이식한 후(Fig. 4), 두피를 덮어 4/0 Vicryl[®] 흡수성 봉합사로 봉합하였다(Fig.5). 실험 후 2

주, 4주 및 8주에 실험 동물을 희생하고(Fig. 6) 두개골을 절제하였다(Fig.7).

다. 조직학적 관찰

절제해낸 조직을 10% 포르말린에 고정하고 5% 질산에 넣어 탈회시킨 후 파라핀 포매하였다. 이 블록을 3 μ m 두께로 결손부의 중앙부에서 관상면으로 절단하여 슬라이드를 제작하였다. 이를 Hematoxylin-Eosin(H-E) 염색법으로 염색하고 광학 현미경으로 관찰하였다.

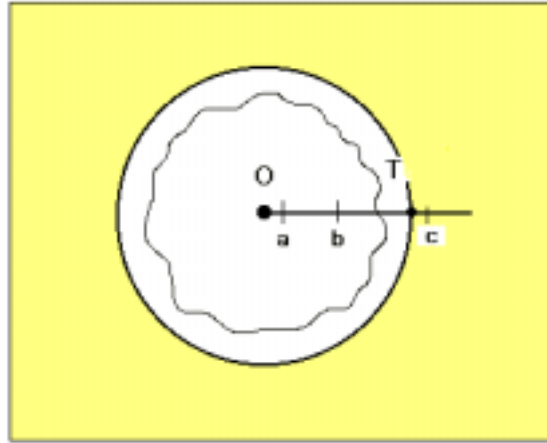
라. 조직 계측학적 관찰

20배 배율로 확대된 조직 표본 상을 컴퓨터 모니터 상에 재현하고 Image-Pro Plus(Media Cybernetics, Silver Spring, MD, U.S.A.)를 이용하여 두개관 결손부의 변연부에서부터 신생골 조직의 말단까지의 거리(mm), 신생골의 면적(mm²)을 계측하였다.

마. 방사선 계측학적 관찰

Digora(Soredex, Orion Co., Helsinki, Finland)로 관전압 70 kVp, 노출시간 0.1 초, 조사관부터 거리 10 cm의 조건하에서 촬영한 후 Image-Pro Plus를 이용하여 골밀도를 측정하였다. Fig. 8에 나타난 바와 같이 결손부의 중앙 부위(Oa)와 기존 골 부위(Tc)의 방사선 불투과도를 계측하여 각각 0과 100으로 보정하고, 신생골 부위(bT)의 방사선 불투과도를 계측하여 아래 식에 의해 골밀도를 계산하였다. 10 방향으로 선을 그어 10 군데의 각기 다른 방사선 불투과도를 측정하여 평균값을 계산하였다.

$$\text{골밀도}(\%) = \frac{bT\text{의 방사선불투과도} - Oa\text{의 방사선불투과도}}{Tc\text{의 방사선불투과도} - Oa\text{의 방사선불투과도}} \times 100$$



O : Center of defect

T : Boundary of critical-sized defect

$$Oa = \frac{OT}{10} ; \text{Low densitometric reference area}$$

$$Tc = \frac{OT}{10} ; \text{High densitometric reference area}$$

$$bT = \frac{OT}{2} ; \text{Region of interest}$$

Fig. 8. A schematic diagram depicting radiodensitometric analysis.

바. 통계학적 분석

신생골의 길이, 신생골의 면적 및 신생골의 상대 밀도를 같은 시점에서 실험군 및 대조군 내에서 실험 기간에 따른 유의차를 Kruskal-Wallis test로 통계 처리하였으며, 실험군과 대조군 간의 유의차는 t test로 통계 처리하여 비교 분석하였다.

III. 결 과

1. 조직학적 관찰

가. 2주 소견

(1) 대조군

신생골은 주로 결손부 변연과 하방 경뇌막 주위에 국한되어 삼각형 형태로 형성되어 있었다. 결손부 중앙 부위는 성긴 섬유성 결합 조직에 의해 채워져 있었고, 신생골 말단 부위는 골성 조직(osteoid)이 많이 관찰되었으며, 그 전방으로 조골 세포가 줄지어 있었다(Fig. 9).

(2) CPG 40

중앙부는 대조군과 비슷하게 성긴 결합 조직을 보였고 염증 세포들이 많이 관찰되었다. 이 염증세포들은 결합 조직에서 뿐만 아니라 신생골 부위에서도 많이 관찰되었다. 신생골 말단 부위는 골성 조직이 관찰되었고 그 전방으로 조골 세포가 줄지어 있었다(Fig. 10).

(3) CPG 400

대조군 2주에 비해 결손부 중앙 부위의 결합 조직은 더 치밀하고 균일한 양상을 보였고 칼슘 포스페이트 글라스 입자가 많이 관찰되었다. 신생골 말단 부위는 골성 조직으로 채워져 있었으며 그 주위로 조골 세포가 줄지어 있었다. 같은 시기의 대조군에 비해 더 넓은 범위에서 신생골 형성이 진행되는 것이 관찰되었다(Fig. 11).

나. 4주 소견

(1) 대조군

결손부 중앙 부위는 대조군 2주와 비교해서 더 균일한 섬유성 결합 조직에 의해 채워져 있었고 혈관이 더 많이 증식해 있었다. 신생골 말단에는 골성 조직이 관찰되었고, 그 전방으로 조골 세포가 줄지어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 12).

(2) CPG 400

더 균일하고 치밀한 세포성 결합 조직이 두드러졌다. 혈관의 증식도 두드러졌다. 결손부 중앙 부위의 결합 조직에서는 칼슘 포스페이트 글라스 입자의 빈 공간이 많이 관찰되었다. 같은 시기의 대조군에 비해 더 넓은 범위에서 신생골 형성이 진행되는 것이 관찰되었다. 신생골 말단에서는 골성 조직 전방으로 조골 세포가 두드러진 양상이 보였다. 섬유들이 평행하고 균일하게 줄지어 있었다(Fig. 13).

다. 8주 소견

(1) 대조군

4주에 비해 더 잘 정돈되고 균일한 결합 조직이 보였고 잘 정돈된 섬유 다발 사이로 방추형의 섬유 아세포가 많이 관찰되었다. 혈관의 증식도 더 많이 관찰되었다. 신생골 말단은 조골 세포가 역시 줄지어 있었지만 골성 조직이 관찰되지 않았다 (Fig. 14).

(2) CPG 40

결손부 중앙 부위는 성긴 섬유성 결합 조직에 의해 채워져 있었고 염증 세포의

침윤이 두드러졌다. 신생골 말단 부위는 골성 조직이 관찰되었고 그 전방으로 조골 세포가 줄지어 있었다. 염증 세포의 침윤이 두드러져 보이는 것이 특징적이었다 (Fig. 15).

(3) CPG 400

4주보다 더 치밀하고 균일한 섬유성 결합 조직이 관찰되었고 고밀도의 세포성, 고밀도의 섬유성, 고밀도의 혈관성 결합 조직이 두드러졌다. 결손부 중앙부위의 결합조직에서는 칼슘 포스페이트 글라스 입자의 빈 공간이 많이 관찰되었다. 역시 신생골 말단에는 골성 조직이 보였으며 그 전방으로 조골 세포가 줄지어 있는 것이 관찰되었다. 염증 세포가 관찰되었으며 giant cell도 보였다. 신생골은 성숙된 양상을 보였다. 혈관의 증식이 많은 치밀한 신생골 증식이 두드러졌다. 결손부 변연에는 골성숙과 골개조(remodeling)가 이루어지면서 기존골과 혼화되는 양상을 보였다(Fig. 16).

2. 조직 계층학적 관찰

가. 두개골 결손부 내 신생골 형성 길이

백서 두개골 결손부 내 신생골이 형성된 길이를 Table 2와 Fig. 17에 나타내었다. 술후 2주에 대조군, CPG 40, CPG 400은 각각 (0.93 ± 0.07) mm, (1.47 ± 0.37) mm, (1.75 ± 0.10) mm를 나타내었고, 술후 4주에는 대조군과 CPG 400이 각각 (1.18 ± 0.19) mm, (2.21 ± 0.13) mm를 나타내었으며, 술후 8주에는 대조군, CPG 40, CPG 400이 각각 (1.66 ± 0.14) mm, (1.42 ± 0.18) mm, (2.38 ± 0.13) mm를 나타내었다.

CPG 40은 술후 2주에 대조군보다 큰 값을 나타내었으나, 술후 8주에는 대조군보다 오히려 낮은 값을 나타내었으며, 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p < 0.05$). CPG 400은 전기간에서 대조군에 비해 유의하게 큰 값을 나타내었고, CPG 40에 비해서도 높은 값을 나타내었으며, 술 후 8주에서는 통계적인 유의차가 있었다

($p < 0.05$). 대조군에서는 술후 기간이 지남에 따라 신생골의 형성 길이가 통계적으로 유의하게 증가하였고, CPG 40에서도 기간에 따라 신생골의 길이가 증가하였으며 2주와 8주간에는 통계적으로 유의차가 있었다($p < 0.05$).

Table 2. Histomorphometric analysis for the length of the new bone formed.

(unit : mm)

Group	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control	0.93±0.07	1.18±0.19 ^a	1.66±0.14 ^{bc}
CPG 40	1.47±0.37	-	1.42±0.18
CPG 400	1.75±0.10 [*]	2.21±0.13 ^{a*}	2.38±0.13 ^{c*#}

* : significant difference from the control group ($p < 0.05$)

: significant difference from the CPG 40 group ($p < 0.05$)

a : significant difference between 2 and 4 weeks in each group ($p < 0.05$)

b : significant difference between 4 and 8 weeks in each group ($p < 0.05$)

c : significant difference between 2 and 8 weeks in each group ($p < 0.05$)

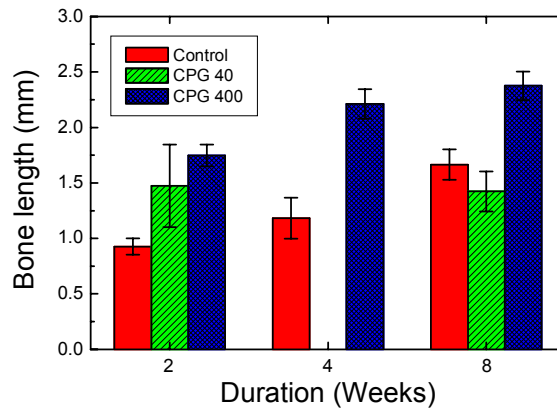


Fig. 17. Histomorphometric analysis of newly formed bone length.

나. 두개골 결손부 내 신생골 형성 면적

백서 두개골 결손부내 신생골이 형성된 면적을 Table 3과 Fig. 18에 나타내었다. 술후 2주에 대조군, CPG 40, CPG 400은 각각 $(0.28 \pm 0.04) \text{mm}^2$, $(0.43 \pm 0.20) \text{mm}^2$, $(0.96 \pm 0.11) \text{mm}^2$ 를 나타내었고, 술후 4주에는 대조군과 CPG 400이 각각 $(0.46 \pm 0.04) \text{mm}^2$, $(1.41 \pm 0.19) \text{mm}^2$ 를 나타내었으며, 술후 8주에는 대조군, CPG 40, CPG 400이 각각 $(0.86 \pm 0.09) \text{mm}^2$, $(0.41 \pm 0.08) \text{mm}^2$, $(1.53 \pm 0.18) \text{mm}^2$ 를 나타내었다.

CPG 40은 술후 2주에 대조군보다 큰 값을 나타내었으나, 술후 8주에는 대조군보다 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내었다($p < 0.05$). CPG 400은 전기간에서 대조군에 비해 유의하게 큰 값을 나타내었고, CPG 40에 비해서도 술후 2주와 8주에서 유의차를 나타내었다($p < 0.05$). 대조군에서는 술후 기간이 지남에 따라 신생골의 형성 면적이 통계적으로 유의하게 증가하였고, CPG 400에서도 기간에 따라 신생골의 길이가 증가하였으나 2주와 4주간에는 통계적으로 유의차가 없었다($p < 0.05$).

Table 3. Histomorphometric analysis for the area of the new bone formed.

(unit : mm^2)

Group	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control	0.28 ± 0.04	0.46 ± 0.04^a	0.86 ± 0.09^{bc}
CPG 40	0.43 ± 0.20	-	$0.41 \pm 0.08^*$
CPG 400	$0.96 \pm 0.11^{*#}$	$1.41 \pm 0.19^{a*}$	$1.53 \pm 0.18^{c*#}$

* : significant difference from the control group ($p < 0.05$)

: significant difference from the CPG 40 group ($p < 0.05$)

a : significant difference between 2 and 4 weeks in each group ($p < 0.05$)

b : significant difference between 4 and 8 weeks in each group ($p < 0.05$)

c : significant difference between 2 and 8 weeks in each group ($p < 0.05$)

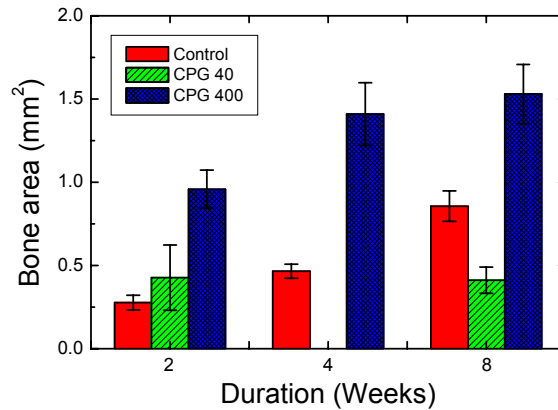


Fig. 18. Histomorphometric analysis of newly formed bone area.

3. 방사선 계측학적 관찰

가. 두개골 결손부 내 신생골 밀도

Diagora로 측정된 백서 두개골 결손부의 방사선 사진을 Fig. 19에 나타내었으며, 이로부터 계산한 신생골의 밀도를 Table 4와 Fig. 20에 나타내었다. 대조군, CPG 40, CPG 400은 각각 술후 2주에 (15.88±2.38)%, (24.26±12.06)%, (30.23±0.88)%를 나타내었고, 술후 4주에는 (21.77±6.68)%, (11.40±8.81)%, (33.66±8.22)%를 나타내었으며, 술후 8주에는 (26.49±6.48)%, (12.43±6.13)%, (37.31±10.58)%를 나타내었다.

CPG 40은 술후 2주에 대조군보다 큰 값을 나타내었으나, 4주와 8주에는 대조군보다 낮은 값을 나타내었으며, 8주에는 통계적으로 유의차를 나타내었다($p < 0.05$). CPG 400은 전기간에서 대조군보다 높은 값을 나타내었으며, 술후 8주에서는 통계적으로 유의한 차를 나타내었다($p < 0.05$). CPG 400은 CPG 40에 비해서도 전기간에서 높은 값을 나타내었으나, 술후 2주에는 통계적 유의차가 없었다($p < 0.05$). 모든 군에서 술 후 기간이 지남에 따라 신생골의 밀도가 증가하였으나, 대조군의 2주와

8주간을 제외하고는 통계적인 유의차는 없었다($p < 0.05$).

Table 4. Radiodensitometric analysis for the density of the new bone formed.

(unit : %)

Group	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control	15.88±2.38	21.77±6.68	26.49±6.48 ^c
CPG 40	24.26±12.06	11.40±8.81	12.43±6.13 [*]
CPG 400	30.23±0.88	33.66±8.22 [#]	37.31±10.58 ^{*#}

* : significant difference from the control group ($p < 0.05$)

: significant difference from the CPG 40 group ($p < 0.05$)

a : significant difference between 2 and 4 weeks in each group ($p < 0.05$)

b : significant difference between 4 and 8 weeks in each group ($p < 0.05$)

c : significant difference between 2 and 8 weeks in each group ($p < 0.05$)

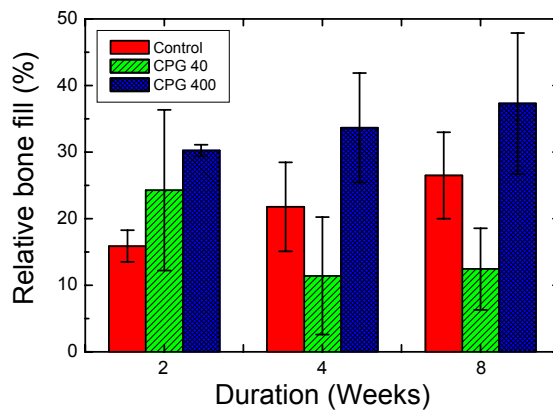


Fig. 20. Radiodensitometric analysis of newly formed bone density.

IV. 고 찰

칼슘 포스페이트 화합물은 기공 크기에 따라 치밀형, 거대 기공형(100~350 μm), 미세 기공형(1~5 μm)으로 분류되고, 공급 형태에 따라 블록형, 입자형으로 분류할 수 있으며, 결정화도에 따라 결정성 화합물과 비정질로 분류된다. 일반적으로 치밀형 칼슘 포스페이트 화합물은 압축 강도는 높으나 인장 강도가 낮으며, 이는 자연 골 조직과 비슷하다. 흡수성은 입자 크기에 의존하여 입자 크기가 크면 흡수 속도가 느리고, 작은 입자는 빠르게 흡수된다. 또한 결정화도에 따라서도 흡수 속도가 달라져서 비정질의 입자는 빠른 속도로 흡수된다(Jeffery, 1997; Gauthier 등, 1998).

본 연구에서는 칼슘 포스페이트 글라스의 골조직 재생 유도 효과를 평가하기 위해 백서 두개골 결손부 실험 모델을 선택하였다(Schmitz, 1986). 아무 처치를 하지 않았을 때 동물의 생존 기간 동안에 완전히 치유가 불가능한 최소 크기의 결손부를 임계 크기 결손(critical size defect, CSD)이라 한다. 골 결손부의 치유 정도는 결손부의 크기에 달려있는데 임계 크기 결손에서는 신생골이 완전히 형성되지 않고 섬유성 결체 조직이 형성된다(Schmitz, 1990). 백서의 두개골에서의 임계 크기 결손에 대한 연구는 Freeman과 Turnbull(1973)에 의해 최초로 보고되었고, Tagaki와 Urist(1982)에 의해 임계 크기가 8 mm라고 보고되었다. 백서의 두개골에 8 mm의 결손을 형성하고 아무런 처치를 하지 않았을 때는 4주 후에 5 mm가 치유되고 12주부터는 더 이상 치유되지 않았으나, BMP(bone morphogenic protein)을 이식했을 때는 3주만에 완전히 신생골로 치유되었다고 보고되었다(Tagaki, 1982). 이번 연구에 사용한 백서의 두개골 모델에서는 임계 크기 결손이 지름 8 mm의 원형 결손을 선택하였다. 두개골에는 골수(bone marrow)가 상대적으로 부족하고 주된 혈관이 없기 때문에 혈관 공급이 부족하고, 다만 경뇌막의 혈관으로부터 보조적으로 혈관 공급을 받는 상태이기 때문에 두개골 결손부의 골재생에 있어서는 경뇌막의 역할이 중요하며 따라서, 결손부 형성 시 손상시키지 않도록 주의하여야 한다(Schmitz, 1990).

입자 크기에 따른 골형성 유도 효과를 비교한 연구를 보면, Mankani 등(2001)은

BCP에 human bone marow stromal cell을 배양하여 마우스에 이식하여 신생골의 형성 능력을 평가하였다. 이때 BCP의 입자 크기를 44~2000 μm 로 변화시키며 입자 크기에 따른 신생골의 형성 능력을 조직학적 관찰과 조직계측학적 분석을 통해 비교하였다. 입자 크기가 44 μm 미만일 때는 신생골이 형성되지 않고, 62 μm 이상이 되면 신생골이 형성되기 시작하여 입자 크기가 커질수록 신생골의 형성량이 증가하여 100~250 μm 일 때 최대치를 나타내고, 그 이후는 입자 크기가 커질수록 신생골의 형성량이 감소하여 1000~2000 μm 이 되면 최소치를 나타내어 BCP의 입자 크기가 신생골의 형성량과 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. Bruijn 등(2002)은 HA의 입자 크기를 210~300 μm 와 500~706 μm 의 두 가지로 하여 마우스의 치은 연하치주낭에 이식하여 4~10주 후에 비교하였는데, 입자 크기가 210~300 μm 이었을 때는 신생골이 형성되었으나, 입자 크기가 500~706 μm 이었을 때는 신생골이 형성되지 않아 입자 크기가 신생골의 형성에 중요한 역할을 한다고 보고하였다.

본 연구에서는 미세 분말(CPG 40)과 조대 분말(CPG 400)의 칼슘 포스페이트 글라스를 사용하였는데 미세 분말은 조성이 $\text{CaO-CaF}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ 인 칼슘 포스페이트 글라스로 Ca/P의 원자비는 0.6이고 입자의 평균 크기는 40 μm 이며, 조대 분말은 조성이 $\text{CaO-CaF}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO-Al}_2\text{O}_3$ 인 칼슘 포스페이트 글라스로 Ca/P의 원자비는 0.6로 동일하였으나 입자의 평균 크기는 400 μm 이었다.

이번 연구의 분석을 위하여 조직학적 소견 관찰, 조직 계측학적 분석과 방사선 계측학적 분석을 시행하였다. 조직학적 소견 관찰에서는 대조군과 CPG 40에서는 골 성장 양상이 주로 결손부 변연과 경뇌막에 국한되어 나타나 중앙 부위로 갈수록 굉장히 좁아지는 삼각형 형태를 보였으나, CPG 400에서는 결손부 변연과 경뇌막 뿐 아니라 상부로도 활발히 진행되어 광범위하게 활발히 진행되는 양상을 나타내어 CPG 40의 신생골 형성 정도가 CPG 400에 비해 다소 떨어지는 것을 알 수 있었다. 대조군 2, 4주와 CPG 40에서는 성긴 결합 조직을 보였으나, 대조군 8주와 CPG 400에서는 2, 4, 8주로 갈수록 치밀하고 균일한 섬유성 결합 조직으로 성숙되는 양상을 보였다. 이러한 결합 조직의 양상으로 성숙도를 짐작할 수 있으며, 고밀도의 세포성, 고밀도의 섬유성, 고밀도의 혈관성의 양상은 신생골 형성이 활발히 진행됨을 시사한다(Stahl,1986; Wada 등, 1989). 신생골 말단 부위의 골성 조직의

존재는 향후 지속적인 신생골 형성의 가능성을 시사하여 길이 성장과 면적 성장을 예고하여 신생골 형성이 활발히 진행되고 있음을 나타내는데 대조군 2, 4주에는 신생골 말단이 골성 조직으로 완전히 둘러 싸여 있었으나, 대조군 8주에는 골성 조직이 관찰되지 않아 골성장이 거의 완료되었음을 알 수 있었다. 이에 반해 CPG 400에서는 전기간에서 신생골 말단에서 골성 조직과 줄지어 있는 조골 세포를 관찰할 수 있어서 골성장이 계속 활발히 진행 중임을 알 수 있었다. CPG 40에서는 술후 8주에는 골성 조직이 관찰되는 곳도 있었지만 활발하지 않아 신생골의 형성이 거의 종료되었음을 알 수 있었다. 또한 대조군과 CPG 400에 비해 염증 세포의 침윤이 두드러졌다. 중앙부의 결합 조직 내에 염증 세포가 산재해 있을 뿐만 아니라 골 조직 내의 골내강에서 염증 세포가 밀집해 있어서 신생골의 형성보다 염증 반응이 활발히 진행되는 것을 관찰할 수 있었다.

Bower 등(1986)은 41세 여자 환자의 4개의 골내낭 병소에 TCP를 이식하여 1년 후 생검하여 조직 관찰하였는데 TCP 입자 주위로 골성 조직과 신생골이 관찰되었고 염증 소견은 거의 보이지 않았다고 보고하였다. Kamakura 등(1999)은 OCP를 백서 두개골 결손부에 이식하여 4주 후의 조직학적 소견에서는 신생골이 두개골의 결손부 변연과 변연으로부터 멀리 떨어진 OCP 주위, 즉 두 방향에서 형성되었고 OCP 입자 주위로 다형핵 거인 세포(multinucleated giant cell)가 관찰되었으며, OCP 입자 주위의 신생골에서는 조골모 세포가 관찰되었다고 보고하였다. 또 12주 후의 소견에서는 OCP 입자 주위로 신생골 형성이 더욱 두드러졌고, 24주 후의 소견에서는 골결손부가 완전히 새로 형성된 신생골로 채워 있었다고 보고하였다. Saffar 등(1990)은 칼슘 포스페이트 화합물을 이식한 후 흡수되기까지의 과정에 대해 보고하였는데, 먼저 대식 세포나 거인 세포 등에 의해 흡수되고, 파골 세포는 이식재의 표면을 흡수하며, 이러한 국소적인 표면 흡수와 함께 이식재 주위로 골이 형성된다고 하였다. 즉, 이는 초기에는 이식재 입자 주위로 골이 침착되어 생성되다가 골성숙, 골개조가 진행되면서 이식재가 완전히 흡수된다는 것을 시사한다. 본 연구에서는 조직학적 관찰을 위해 탈회법인 H-A 염색법을 이용했기 때문에 조직 내에 잔류된 칼슘 포스페이트 글라스 입자를 관찰하는 데에는 적합하지 않다고 생각되나, CPG 400에서는 결합 조직이나 신생골 형성 부위, 신생골 내부의 큰 혈관

부위에서 염색되지 않은 빈 공간(lacinae)이 다수 관찰되어, 이것이 잔류되어 있는 칼슘 포스페이트 글라스 입자라고 추측된다. 반면 CPG 40에서는 이런 공간이 확인되지 않았는데 이것은 입자 크기가 작고, 생분해 속도가 빨라 이미 모두 흡수되었기 때문이라고 생각된다. 그러나 명확한 규명을 위하여는 비탈회 염색법인 Villanueva bone stain 등을 사용하여 확인할 필요가 있다고 사료된다.

조직 계측학적 분석에서는 신생골 길이와 면적에 대해 각각 비교하였다. 계측은 Image-Pro Plus[®] 프로그램을 이용하여 조직 슬라이드를 보면서 길이와 면적을 측정하였다. 길이는 20 배율로 확대된 상에서 두개관 결손부의 신생골 조직의 변연부로부터 말단까지의 거리를 구하였다. 이는 조골 세포의 이동 정도를 비교하기 위한 것으로 길이 성장이 많이 이루어질수록 향후 두께 성장을 감안할 때 더 많은 양의 신생골을 형성할 수 있으리라 예상되므로 골 이식재의 골유도 재생 능력을 평가하기에 좋은 지표라 사료된다. CPG 400은 신생골의 형성 길이와 면적이 모두 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 값을 나타내어 백서 두개골 결손부의 치유에 효과적임을 알 수 있었다. 다만 조직학적 소견에서 신생골 말단 부위에 조골 세포가 많이 있는 것이 관찰된 것에 비해 술후 4주에서 8주로 시간이 지날수록 신생골의 형성 길이가 많이 증가하지 않은 것은 연조직이 침투하여 골형성을 방해하였기 때문이라 생각된다. 그러므로 연조직의 침투를 막는 방법을 병행하면 신생골의 형성 길이와 면적이 더욱 향상될 것으로 생각된다.

방사선 계측학적 비교는 신생골의 성숙도를 평가하기 위한 것으로 신생골 광화 정도를 비교한 것이다. 마찬가지로 분석을 위해 Image-Pro Plus[®] 프로그램을 이용하였고 신생골이 결손부의 변연부로부터 형성되기 시작하여 결손부의 중앙 부위에서는 골재생이 가장 저조하다는 가정하에 결손부 변연부(Tc)의 방사선 불투과도를 100, 결손부 중앙부(Oa)의 방사선 불투과도를 0으로 보정하여 계측하였다. 각 개체마다 보정하였는데, 이는 개체마다 기존 골의 골밀도가 다를 수 있고, 또 방사선 상을 표준화하기 위해 같은 조사량과 노출하에 Digora[®]을 이용하여 현상조건을 표준화하였으나 약간의 오차가 발생할 수 있으며, 방사선 필름을 스캔할 때에도 차이가 발생할 수 있기 때문이다. CPG 400은 전기간에서 대조군 및 CPG 40에 비해 높은 골밀도를 나타내었으며, 이것은 CPG 400이 CPG 40에 비해 분말의 크기가

커서 입자간에 형성된 free space의 크기가 크고 많이 형성되어 주위의 골이 침투되어 들어오기 용이하였기 때문이라고 생각된다.

칼슘 포스페이트 글라스 미세 분말(CPG 40)은 실험 중 조작이 용이하고 입자간에 응집이 잘 되어 결손부 내에 용이하게 충전할 수 있었고 혈류에 저항성이 있었으나, 칼슘 포스페이트 조대 분말(CPG 400)은 조작이 어렵고 혈류와 같이 이동되어 흩어져서 결손부 내에 충전이 난이한 단점이 있었다. 그러나 대조군과 CPG 400은 전기간에서 치유 양상이 깨끗한데 비해, CPG 40은 술후 독성을 나타내어 술후 기간이 지날수록 백서의 두피가 벗겨진 양상이 심각해져 8주에서는 외과적으로 형성한 8 mm의 결손부 원형이 다 드러날 정도로 두피가 벗겨지는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 CPG 400이 CPG 40에 비해 5 wt%의 Al_2O_3 를 첨가되어 생분해 속도가 감소되었기 때문으로 생각되며, 따라서 너무 빠른 생분해는 국부적인 과농도를 유발하여 오히려 독성을 유발하는 것으로 추측된다. 하지만 입자 크기에 따라서도 생분해 속도는 다소 차이가 나기 때문에 본 연구에서 칼슘 포스페이트 글라스의 조성과 입자 크기에 따른 영향을 명백히 구분하기는 곤란하였으며, 이에 관해서는 추가적인 연구 진행이 요구된다.

본 연구에서 사용한 칼슘 포스페이트 글라스 분말의 신생골 형성능의 정도를 알아보기 위하여 다른 골 이식재를 이용하여 동물 시험한 연구 논문들과 비교 고찰해 보았다. 김(1999)은 성견 1면 치조골 결손부에 석고를 이식한 후 8주 후에 관찰하여 아무 것도 이식하지 않은 대조군에 비해 신생골 형성량이 142.7%라고 보고하였다. 정 등(2001)은 백서 두개골 결손부에 키토산을 이식한 후 8주 후에 관찰하여 신생골 형성이 대조군에 비해 193.6%라고 보고하였고, 김(2001)은 백서 두개골 결손부에 홍화씨 추출물을 이식한 후 8주 후에 관찰하여 신생골 형성이 대조군에 비해 149.9%라고 보고하였다. 이에 비교해 본 실험에서는 8주후 신생골의 형성 면적이 대조군에 비해 178.6%를 나타내어 석고 및 홍화씨 추출물에 비해 우월한 골형성 능력을 나타내었고, 거의 키토산에 필적하는 우수한 골이식재로 판단된다.

향후 칼슘 포스페이트 글라스의 이식 후 고정을 위해선 차폐막(membrane)과 석고(HAPSET[®])의 사용이 추천되어지고, 성장 인자, cytokines, BMP 등과 함께 사용하여 골재생의 유도 효과를 연구할 필요가 있다고 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 백서 두개골 결손부에 칼슘 포스페이트 글라스를 이식했을 때 결손부의 재생과 치유에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시하였다. 체중 200~250g의 Sprague-Dawley rat의 두개골에 임계 크기인 지름 8 mm의 원형 결손부를 실험적으로 형성한 후 평균 입도 40 μm 인 CaO-CaF₂-P₂O₅-MgO계 칼슘 포스페이트 글라스와 평균 입도 400 μm 인 CaO-CaF₂-P₂O₅-MgO-Al₂O₃계 칼슘 포스페이트 글라스를 이식하여 각각 CPG 40과 CPG 400으로 설정하고, 아무 것도 이식하지 않은 것을 대조군으로 하여 술후 2주, 4주, 8주의 치유 결과를 조직학적, 조직계측학적 및 방사선 계측학적으로 비교 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CPG 40은 조작성과 응집력이 우수하여 결손부 내에 충진이 용이하고 혈류에 저항성이 있었으나 염증이 심하여 술후 백서의 두피가 벗겨졌으며, CPG 400은 조작이 난이하고 혈류에 산재되는 단점이 있었으나 치유 양상은 깨끗하였다.
2. 조직학적 관찰 결과 대조군과 CPG 40에서는 골 성장 양상이 주로 결손부 변연과 경뇌막에 국한되는 삼각형을 나타내었으나, CPG 400에서는 결손부 변연과 경뇌막 뿐 아니라 상부로도 광범위하게 활발히 진행되는 양상을 나타내었다.
3. 백서 두개골 결손부내 신생골의 형성 길이는 대조군과 CPG 400은 술후 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나, CPG 40은 술후 2주에는 대조군보다 큰 값을 나타내었지만, 술후 8주에는 대조군보다 오히려 낮은 값을 나타내어 시간에 따라 오히려 감소하였다. CPG 400은 전기간에서 대조군 및 CPG 40에 비해 통계적으로 유의하게 큰 값을 나타내었다. 단, 술후 2주의 CPG 400과 CPG 40간에는 통계적인 유의차가 없었다($p < 0.05$).
4. 백서 두개골 결손부내 신생골의 형성 면적은 대조군과 CPG 400은 술후 시간이

경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나, CPG 40은 술후 2주에는 대조군보다 큰 값을 나타내었지만, 술후 8주에는 대조군보다 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내어 시간에 따라 오히려 감소하였다. CPG 400은 전기간에서 대조군과 CPG 40에 비해 통계적으로 유의하게 큰 값을 나타내었다($p < 0.05$).

5. 백서 두개골 결손부내 신생골의 형성 밀도는 대조군과 CPG 400은 술후 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나, CPG 40은 술후 2주에는 대조군보다 큰 값을 나타내었지만, 4주와 8주에는 오히려 대조군보다 낮은 값을 나타내었다. CPG 400은 전기간에서 대조군보다 높은 값을 나타내었고, 술후 8주에서는 통계적으로 유의차가 있었으며, CPG 40에 비해서도 전기간에서 높은 값을 나타내었으나, 술후 2주에는 통계적 유의차가 없었다($p < 0.05$).

이상의 결과를 통해 백서 두개골 결손부에 칼슘 포스페이트 글라스을 이식한 경우에 신생골 길이, 면적 및 밀도가 유의하게 개선되어 골조직 재생 유도 능력이 우수한 재료로 사료되며, 그 효과는 알루미늄의 첨가와 입도에 의존하였다. 향후 차폐막이나 성장 인자와 함께 사용하면 좋은 결과를 얻을 것으로 기대된다.

참고 문헌

- 김성태: 백서 두개골 결손부에서 홍화씨 추출물의 골조직 재생 유도 효과. *대한치주과학회지* 30(4):835-850, 2000.
- 김종관: 성견 1면 치조골 결손부에서 특수 제조된 calcium sulfate paste가 치주조직 치유에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 29(1):153-171, 1999.
- 김현수: 비정질 calcium phosphate glass가 성견의 1면 골내낭에서 치주조직 치유에 미치는 영향. 석사학위 논문, 연세대학교 대학원, 서울, 2002.
- 송진: 칼슘 포스페이트 글라스에 대한 L929 및 MC3T3-E1 세포의 증식과 분화. 박사학위 논문, 연세대학교 대학원, 서울, 2001.
- 정의원: 백서 두개골 결손부에서 키토산의 골조직 재생 유도 효과. *대한치주과학회지* 30(4):851-868, 2000.
- Bowers GM, Vargo JW, Levy B: Histologic observations following the placement of tricalcium phosphate implants in human intrabony defects. *J Periodontol* 57:286-287, 1986.
- Bruijn JD, Fischer E, Bergen P: In vivo bone formation by marrow stromal cells cultured on dense hydroxyapatite granules: effect of granules size and preparation method. Abstract of the 28th annual meeting of the Biomaterials Society, 427, 2002.
- Cecilia Y, Peter S, Annika S: A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillof Implant* 14:72-76, 1999.
- Chiroff R, White E, Weber J: Tissue ingrowth of replamineform implants. *J Biomed Mater Res* 6:29-33, 1975.
- Daculsi G, Legeros RZ: Transformation of biphasic calcium phosphates ceramics in vivo: Ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mat Res* 23:883-894, 1989.

- Dragoo MR, Sullivan HC: A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans II, External root resorption. *J Periodontol* 44:614-615, 1973.
- Duane EC, Surindar NB: Reaction of bone to tricalcium phosphate ceramic pellets. *Oral Surg* 33:850-856, 1972.
- Freeman E, Turnbull RS: The role of osseous coagulum as a graft material. *J Perio Res* 8: 229-235, 1973.
- Gauthier O, Boix D, Grimandi G, Aguado E, Bouler JM, Weiss P, Daculsi G: A new injectable calcium phosphate biomaterial for immediate bone filling of extraction sockets: a preliminary study in dogs. *J Periodontol* 70(4):375-383, 1999.
- Gauthier O, Bouler JM, Aguado E: Macroporous biphasic calcium phosphates ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterial* 19:133-139, 1998.
- Hashimoto-Uoshima M, Ishikawa I, Kinoshita A, Weng HT, Oda S: Clinical and histologic observation of replacement of biphasic calcium phosphate by bone tissue in monkeys. *Int J Perio Resto Dent* 15(2): 205-213, 1995.
- Jeffrey SG: Bone Grafting Materials for dental applications: a practical guide. *Comp Cont Educ Dent* 18:1013-1036, 1997.
- Kamakura S, Sasano Y, Homma H, Suzuki O, Kagayama M, Motegi K: Implantation of octacalcium phosphate(OCP) in rat skull defects enhances bone repair. *J Dent Res* 78(11):1682-1687, 1999.
- Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J: Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 50:241-249, 1992.
- Lee YK, Choi SH, Kim KN, LeGeros RZ: Preparation and properties of calcium phosphate glasses obtained from the system CaO-CaF₂-P₂O₅-MgO-ZnO. *J Mater Sci*, submitted.

- Lee YK, Lee SB, Oh YI, Kim KN: Relation between dissolution rate and cytotoxicity in calcium phosphate glasses. *Asia Pacific Dental Congress* 24:167, 2002.
- Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B: In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotech Bioeng* 72:96-107, 2001.
- Meffert RM, Thomas JR, Hamilton KM: Hydroxylapatite as an alloplastic graft in the treatment of human periodontal osseous defects. *J Periodontol* 56(2):63-73, 1985.
- Misch CE, Dietsch F: Bone grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 2:158-167, 1993.
- Robert WB, Ann C, Ralph EH: Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Ortho Clin Nor Amer* 18:323-334, 1987.
- Saffar JL, Colombier ML, Detienville R: Bone formation in tricalcium phosphate filled periodontal intrabony lesions: histological observations in humans. *J Periodontol* 61:209-216, 1990.
- Sasano Y, Kamakura S: Subperiosteal implantation of octacalcium phosphate (OCP) stimulate both chondrogenesis and osteogenesis in the tibia, but only osteogenesis in the parietal bone of a rat. *Anatom Rec* 242:40-46, 1995.
- Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop* 205:299-308, 1986.
- Schmitz JP, Zvi Schwarz, Hollinger JP, Boyan BD : Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat* 138:185-192, 1990.
- Stahl SS, Froum SJ: Histologic and clinical responses to porous hydroxyapatite as an alloplastic graft in the treatment of human periodontal osseous defects. *J Periodontol* 56(2):63-73, 1985.
- Stahl SS, Froum SJ: Histologic evaluation of human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. I: three

to eight months. *J Periodontol* 57:211-214, 1986.

Tagaki K, Urist MR: The reaction of dura to bone morphogenic protein(BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 196:100-102, 1982.

Wada T, Hara K, Ozawa H: Ultrastructural and histochemical study of β -tricalcium phosphate resorbing cells in periodontium of dogs. *J Periodont Res* 24:391-401, 1989.

사진부도 설명

Fig. 2. Sprague-Dawley rats used in this study.	30
Fig. 3. Defect formation.	30
Fig. 4. Sample transplantation.	30
Fig. 5. Suture after sample transplantation.	30
Fig. 6. Sacrification after 2, 4 and 8 weeks postoperatively.	30
Fig. 7. Harvested transplant after sacrifice.	30
Fig. 9. Histologic microphotographs of the control groups after 2 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	31
Fig. 10. Histologic microphotographs of CPG 40 after 2 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	31
Fig. 11. Histologic microphotographs of CPG 400 after 2 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	31
Fig. 12. Histologic microphotographs of the control groups after 4 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	32
Fig. 13. Histologic microphotographs of CPG 400 after 4 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	32
Fig. 14. Histologic microphotographs of the control groups after 8 weeks of transplatation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$, respectively.	33
Fig. 15. Histologic microphotographs of CPG 40 after 8 weeks of	

transplantation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$,
respectively. 33

Fig. 16. Histologic microphotographs of CPG 400 after 8 weeks of
transplantation with magnification of (a) $\times 20$ and (b) $\times 200$,
respectively. 33

Fig. 19. Digital images taken by Digora. 34



Fig 2. Sprague-Dawley rats.



Fig. 3. Defect formation.



Fig 4. Sample transplantation.



Fig. 5. Suture.



Fig 6. Sacrificiation.



Fig. 7. Harvested sample.

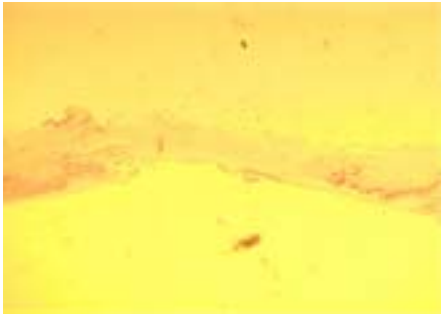


Fig. 9(a) Control, 2 wks($\times 20$)

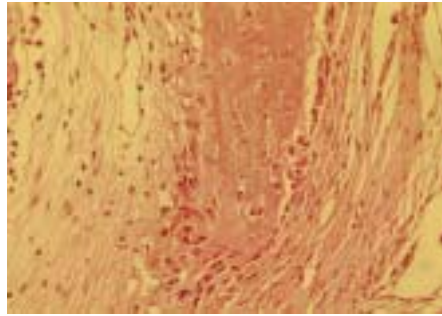


Fig. 9(b) Control, 2 wks($\times 200$)

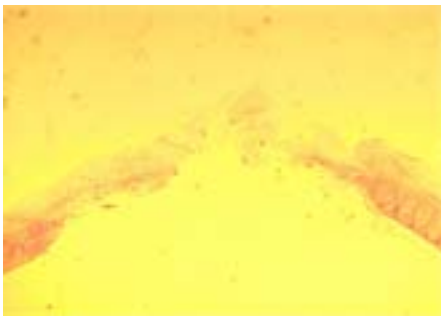


Fig. 10(a) CPG 40, 2 wks($\times 20$)

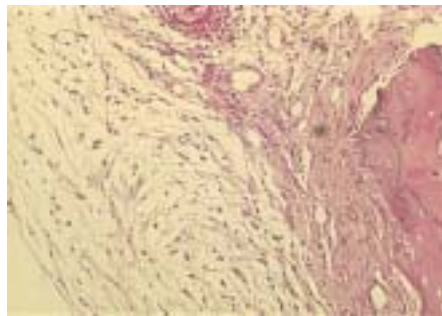


Fig. 10(b) CPG 40, 2 wks($\times 200$)

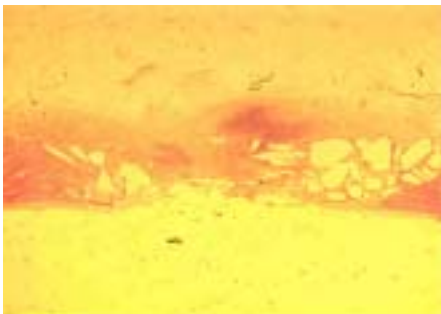


Fig. 11(a) CPG 400, 2 wks($\times 20$)

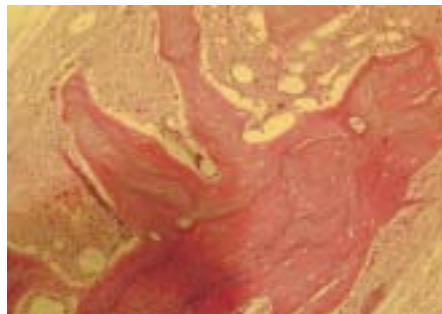


Fig. 11(b) CPG 400, 2 wks($\times 200$)

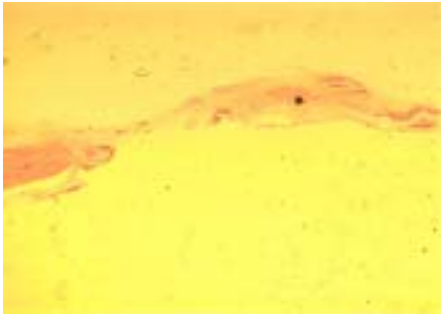


Fig. 12(a) Control, 4 wks($\times 20$)

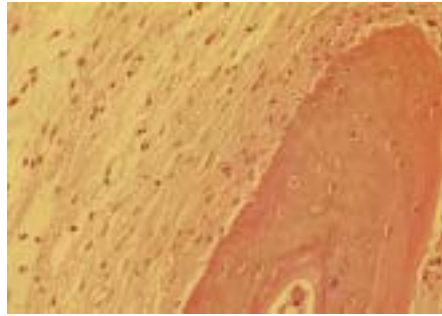


Fig. 12(b) Control, 4 wks($\times 200$)

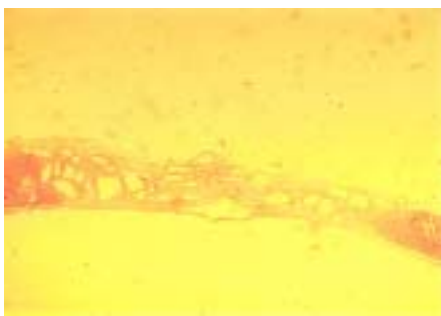


Fig. 13(a) CPG 400, 4 wks($\times 20$)

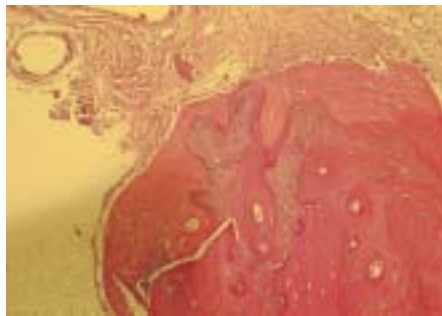


Fig. 13(b) CPG 400, 4 wks($\times 200$)

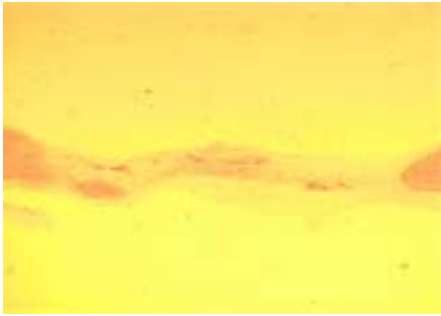


Fig. 14(a) Control, 8 wks($\times 20$)

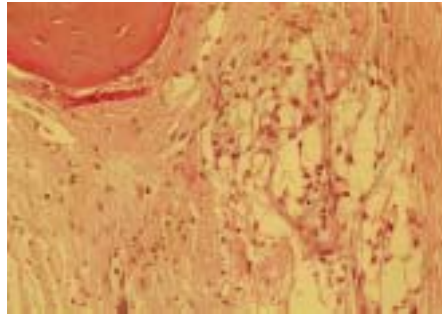


Fig. 14(b) Control, 8 wks($\times 200$)

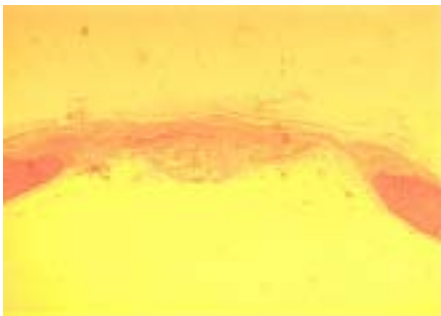


Fig. 15(a) CPG 40, 8 wks($\times 20$)

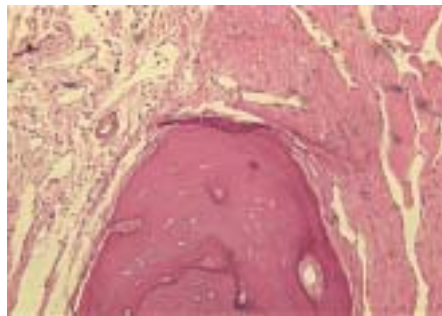


Fig. 15(b) CPG 40, 8 wks($\times 200$)

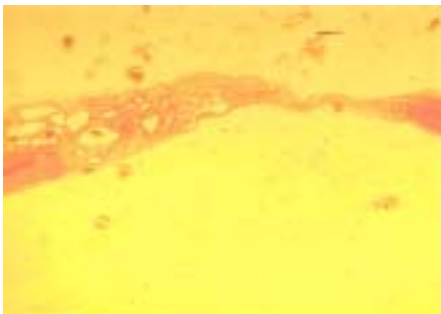


Fig. 16(a) CPG 400, 8 wks($\times 20$)

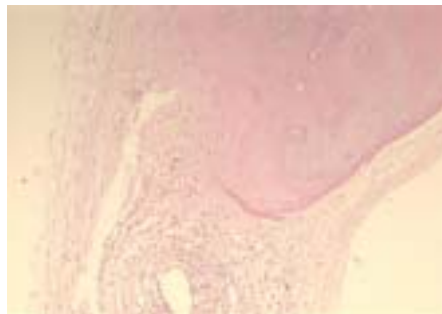
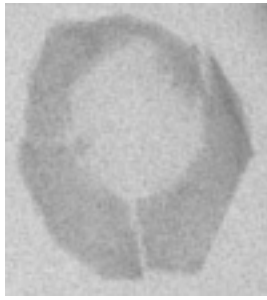
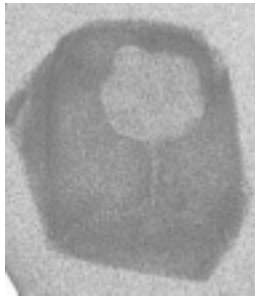


Fig. 16(b) CPG 400, 8 wks($\times 200$)



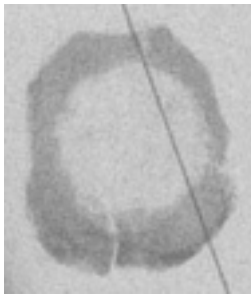
(a) control, 2 wks



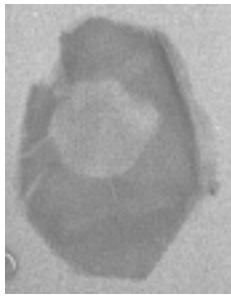
(b) CPG 40, 2 wks



(c) CPG 400, 2 wks



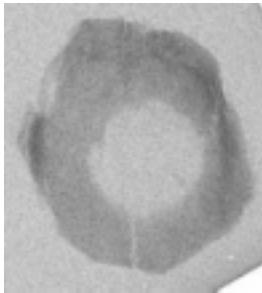
(d) control, 4 wks



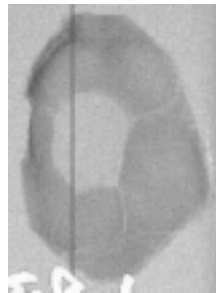
(e) CPG 40, 4 wks



(f) CPG 400, 4 wks



(g) control, 8 wks



(h) CPG 40, 8 wks



(i) CPG 400, 8 wks

Fig. 19. Digital images taken by Digora.

Abstract

Bone formation by transplantation of calcium phosphate glass powders onto the calvarial bone in Sprague-Dawley rats

Hyun Ju Moon, D.D.S.

Department of Dental Science, Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Yong-Keun Lee, M.S., Ph.D.)

The treatment of the bone defects resulting from trauma, neoplasm, surgery, or infection is one of the major concern in dentistry. The major goal is the functional, esthetical regeneration of supporting structures already destructed by disease. Transplantation technique have been used to provide a scaffold for bone regeneration, to augment bony defects resulting from trauma or surgery, to restore bone loss caused by dental disease, to prevent the collapse the alveolar ridge in recent extraction sites, to replace bone loss by periodontal disease, to augment the alveolar ridge in implant surgery.

There are autogeneous, allogenic, xenogenic and alloplastic bone-grafts in transplantation. Among the alloplastic bone-graft materials, calcium phosphates have been received the most attention.

In this study, the critical size defects were surgically produced in the calvarial bone of Sprague-Dawley rats using the 8 mm trephine bur. Calcium phosphate glass powders with smaller average size 40 μm in $\text{CaO-CaF}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ and with greater mean diameter 400 μm in $\text{CaO-CaF}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO-Al}_2\text{O}_3$ transplanted onto the produced defects and

named CPG 40 and CPG 400, respectively, while sutured without grafting anything in the control group. Histomorphometric as well as radiodensitometric analyses were performed after sacrifice at 2, 4 and 8 weeks following operation and produced results as follows.

1. The fine powder of the calcium phosphate glass with mean diameter 40 μm was easy to manipulate and condense onto the calvarial bone defects and stable against the blood supply, while the coarse powder with 400 μm was difficult to handle and unstable against the blood supply. However, skin around the grafted area had been stripped due to the aversion in CPG 40, while the healing condition was clear both in the control and CPG 400 groups.
2. New bone was formed in the upper side of the defects as well as the defect margin and dura mater in CPG 400, while was restricted within the defect margin and dura mater both in control and CPG 40 groups.
3. The length of the newly formed bone increased with increasing the healing time in the control and CPG 400 groups, while decreased in CPG 40. CPG 400 exhibited the significant higher values than the control or CPG 40 groups in every experimental duration time except between CPG 400 and CPG 40 after 2 weeks($p < 0.05$).
4. The area of the newly formed bone increased with increasing the healing time in the control and CPG 400 groups, while decreased in CPG 40. CPG 400 exhibited the significant higher values than the control or CPG 40 groups in every experimental duration time($p < 0.05$).

5. The density of the newly formed bone increased with increasing the healing time in the control and CPG 400 groups, while decreased in CPG 40. CPG 400 exhibited the higher values than the control or CPG 40 groups in every experimental duration time. There was significant differences between CPG 400 and control groups after 2 weeks and between CPG 400 and CPG 40 groups after 4 and 9 weeks($p < 0.05$).

According to the above results, the prepared calcium phosphate glass powder with average size 400 μm in $\text{CaO-CaF}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO-Al}_2\text{O}_3$ promoted new bone formation in the calvarial defects in the Sprague-Dawley rats. It is not clear, however, these results originated from whether different particle size or alumina addition. Further study is needed combined effects with the membrane or growth factors.

Key words : bone regeneration, calcium phosphate, calvarial defect, rat