



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

토끼 두개골 모델에서의 rhBMP-2
농도에 따른 이형상 칼슘 인산염
골이식재의 골형성능 연구



연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 중 현

토끼 두개골 모델에서의 rhBMP-2
농도에 따른 이형상 칼슘 인산염
골이식재의 골형성능 연구

지도 박 영 범 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2015년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 중 현

김중현의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 박 영 법



심사위원 이 재 훈



심사위원 김 지 훈



연세대학교 대학원

2015년 6월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기 까지 부족한 저를 항상 격려해주시고 석사 학위 과정 내내 이끌어 주신 박영범 지도 교수님께 먼저 깊은 감사를 드립니다. 제게 주신 귀한 기회에 감사드리며, 그 기대에 부응하도록 더욱더 열심히 정진하겠습니다. 또한 귀중한 시간을 내주시어 논문에 큰 도움을 주시고 조언과 격려를 해주신 이재훈 교수님, 김지환 교수님께 감사 드립니다.

제가 이 자리까지 올 수 있도록 진심 어린 조언과 관심으로 보살펴주신 정문규 교수님, 한동후 교수님, 이근우 교수님, 문홍석 교수님, 심준성 교수님께도 감사 드립니다. 보철과 생활을 같이 하며 연구하는 내내 많은 도움을 주었던 모든 의국원들에게도 감사와 애정을 전합니다. 그리고 본 연구 및 실험에 많은 도움을 주신 보철과 연구원 최현민 선생님, 장성호 선생님, 이아름 선생님께도 감사드립니다.

항상 저를 응원해주고 지지해주시는 아버지와 어머니, 그리고 여동생에게 감사의 마음을 전합니다.

2015년 6월

김중현 드림

차 례

그림 및 표 차례	iii
국문 요약	v
I. 서론	1
II. 실험재료 및 방법	8
1. 실험동물 및 재료	8
가. 실험동물	8
나. rhBMP-2, Biphasic calcium phosphate (BCP)	8
2. 실험 방법	9
가. 실험군의 설정	9
나. 수술 과정	9
다. 희생 과정	11
3. 평가 방법	11
가. Micro CT 촬영	11
나. 시편제작 및 조직형태학, 계측학적 검사	12
다. 통계학적 분석	12
III. 결과	13
1. Micro CT를 이용한 골생성 부피 측정	13
가. Mature bone volume (%)	13
나. Immature bone volume (%)	15
2. 조직형태학적 분석	16
가. 2주 군에서의 각 BMP 농도에 따른 조직 시편 분석	17
나. 4주 군에서의 각 BMP 농도에 따른 조직 시편 분석	19
다. 12주 군에서의 각 BMP 농도에 따른 조직 시편 분석	21
3. 조직계측학적 분석	23

가. 신생조직의 전체면적 조직계측학적 분석	23
나. 신생골의 조직계측학적 분석	25
다. 잔여 골이식재의 조직계측학적 분석	27
라. 지방조직의 조직계측학적 분석	28
마. 조직학적 구성 비율	30
IV. 총괄 및 고찰	33
V. 결론	52
참고 문헌	53
영문 요약	59



그림 차례

Fig.1 Schematic diagram of surgery and group distribution	9
Fig.2 Photograph of surgery site	10
Fig.3 A : X-ray of specimen B : Micro CT view of specimen	11
Fig.4 Percentage volume of Mature bone in Micro CT data.....	14
Fig.5 Percentage volume of Immature bone in Micro CT data	15
Fig.6 Histologic specimens undergone 2 weeks of healing time	17
Fig.7 Histologic specimens undergone 4 weeks of healing time	19
Fig.8 Histologic specimens undergone 12 weeks of healing time	21
Fig.9 Volume of Total tissue in Histomorphometric data	23
Fig.10 Percentage volume of New bone in Histomorphometric data	25
Fig.11 Percentage volume of Remained graft in Histomorphometric data.....	27
Fig.12 Percentage volume of Adipose tissue in Histomorphometric data	28
Fig.13 Cumulative graph of histologic components at 0.0mg/ml BMP group	30
Fig.14 Cumulative graph of histologic components at 0.1mg/ml BMP group	31
Fig.15 Cumulative graph of histologic components at 0.5mg/ml BMP group	31
Fig.16 Cumulative graph of histologic components at 1.0mg/ml BMP group	32
Fig.17 Series of cumulative graphs of 4 BMP groups	32
Fig.18 Histologic analysis range on tissue slide	39
A : Entire tissue analysis	
B : Region of Interest (ROI) analysis	
Fig.19 Comparison of New bone volume between different histomorphometric analysis range.....	39
A : Entire tissue analysis	
B : Region of Interest (ROI) analysis	
Fig.20 Comparison of remained graft volume between different histomorphometric analysis range.....	40
A : Entire tissue analysis	
B : Region of Interest (ROI) analysis	

Fig.21 Comparison of Adipose tissue volume between different histomorphometric analysis range.....	41
A : Entire tissue analysis	
B : Region of Interest (ROI) analysis	

표 차례

Table 1. Percentage volume of Mature bone in Micro CT data.....	13
Table 2. Percentage volume of Immature bone in Micro CT data	15
Table 3. Volume of Total tissue in Histomorphometric data	23
Table 4. Percentage volume of New bone in Histomorphometric data	25
Table 5. Percentage volume of Remained graft in Histomorphometric data.....	27
Table 6. Percentage volume of Adipose tissue in Histomorphometric data	28

국문요약

토끼 두개골 모델에서의 rhBMP-2 농도에 따른 이형상 칼슘 인산염 골이식재의 골형성능 연구

실험목적 :

최근 합성골 및 골생성 인자를 통한 골재생이 활발히 연구되고 있다. 본 연구에서는 Scaffold로서 Biphasic Calcium Phosphate (BCP), 그리고 골형성 인자로서 Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)의 골형성능 효과를 평가하였다. 또한, 기존에 사용되던 고농도가 아닌, 비교적 Side effect를 줄일 수 있으면서도 골형성능이 유지되는 적절한 농도의 BMP-2를 고찰하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법 :

토끼 18 마리를 대상으로, 두개골 부위에 4 개의 골결손부를 형성하였다. BCP 이식재에 농도를 달리한 BMP-2 희석액을 혼합하여 이식하였다. BMP-2의 농도는 0.0mg/ml, 0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml로 하였다. 시간에 따른 골형성 양상을 확인하기 위하여 희생기간을 2, 4, 12 주로 설정하였다. 그 후 조직학적으로 총 신생조직, 신생골, 잔여 이식재, 지방조직 형성의 정도를 계측하였고, 방사선학적으로 성숙골과 미성숙골의 수치를 확인하였다.

결과 및 고찰 :

Micro CT 계측상으로, 성숙골의 양은 증가하였고, 미성숙골의 양은 감소하였다. 0.5mg/ml BMP 농도 2 주군에서 다른 BMP 농도군에 비하여 유의차 있는 성숙골의 생성 및 미성숙골의 감소가 확인되었다. 조직계측상으로, 치유 기간이 늘어날수록 통계적 유의차 있게 신생골의 형성 및 지방조직의 증가가 관찰되었고, 잔여 이식재의 양은 감소하였다. 전체 신생조직 면적은 치유기간에 따른 유의차를 나타내지 않았으며, 이는 잔여이식재의 흡수 및 골생성이 동반하여 일어나서 전체 조직의 양이 지속적으로 잘 유지되기 때문인 것으로 판단된다.

Keyword : rhBMP-2, BCP, 골형성

토끼 두개골 모델에서의 rhBMP-2 농도에 따른 이형상 칼슘 인산염 골이식재의 골형성능 연구

(지도교수 박영범)

연세대학교 대학원 치의학과

김 중 현



치과 구강 악안면 영역에선 많은 경우 골이식이 필요로 하게된다. 구순구개열 등의 선천성 결손 및 후천적인 병소, 또는 외상에 의한 악안면 결손부 재건 시에도 골이식은 필요하다. 또한 결손치의 수복에 쓰이는 임플란트 수술에 있어서 잔존 골량의 유무가 중요한데, 특히 치주염으로 발치 후 심한 골흡수가 일어난 환자에 있어 골이식이 필수적인 경우가 많다. 이러한 골이식에는 자가골이식, 이종골이식, 합성골이식 등이 있다.

이렇게 이식을 통해 신생골을 형성하는 것은 조직공학의 영역이다. 조직공학의 3대 축은 세포(source of cell) , 기질(matrix or scaffold), 신호물질(singal molecule) 으로 이루어 진다. 이를 골재생적인 측면에서

보자면 골형성세포, 골유도 효과를 갖는 호르몬 또는 성장인자, 골전도 효과를 갖는 기질로 볼수 있다¹⁾.

자가골 이식은 골이식에 있어 gold standard 로 여겨지지만, 다시 흡수되는 경향이 있으며, 공여부의 부가적인 수술이 필요하다는 단점이 있다²⁾. 다른 종의 조직을 이용하는 이종골 이식은 면역반응 및 전염의 걱정이 있다. 이러한 점에서 최근 연구가 많이 행해지고 각광받는 분야는 합성골 이식이다. 합성골이식은, 공여부의 추가적인 수술을 하지 않아도 되며, 원하는 양만큼 이식이 가능하다.

이러한 골전도 효과를 갖는 합성골 이식에 관련하여, 골유도 효과를 보이는 골재생 성장인자들 또한 많이 연구되고 있다. Bone morphogenetic proteins (BMP-2, BMP-7), transforming growth factor beta (TGF- β), insulin-like growth factors I, II (IGF I, II), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factors (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) 등이다³⁻⁵⁾. 그 중, 현재 연구가 활발히 진행되며, 임상에 적용 되고 있는 것이 BMP 이다.

BMP 는 osteogenesis 및 chondrogenesis 에 관여한다. 또한 배아발생 및 골절 치유에 관여한다.

입술과 구개의 발생에, TGF β (transforming growth factor-beta) superfamily 는 중요한 역할을 하는데, 이는 activin, TGF β , BMP cytokines 로 이루어져 있다⁶⁾. 이때 BMP 는 세포 분화, 세포사멸, 형태발생 등의 역할을 맡는다.

BMP family 로는 현재 20가지가 넘게 확인되고 있다. BMP ligand 는 amino acid sequence 유사성에 따라 5가지 subfamily 로 분류할수 있다⁷⁾. 특히 BMP-2 및 BMP-7 는 효과적으로 골유도를 하는 것으로 알려져 있다^{8, 9)}. 구강악안면 영역에선 BMP 중 recombinant human BMP2 (rh-BMP2) 를

사용한다¹⁰⁾. BMP2 및 BMP7은 골모세포의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있다.

골유도 적인 역할을 하는 BMP¹¹⁾의 세포 수준에서의 메커니즘은 다음과 같다. BMP 는 세포 표면의 수용체와 결합하여 작용한다. BMP 가 수용체에 결합하면 세포내에 serine/threonine kinase 를 통한 cascade 가 발현된다. 이를 통하여 미분화 간엽세포를 골모세포로 분화 시킨다. Runx-2 family 는 전사인자 로서, 골모세포 로의 분화에 중요한 역할을 하는데¹²⁾, 이중 Runx-2는 특히 BMP 와 관련된 중요한 세포 전사인자로서 작용한다. 이러한 pathway 는 다수의 antagonist, co-receptor, 그리고 세포 내 조절단백질에 의해 세심하게 조절된다.

BMP 는 또한 골모세포로 부터 VEGF- α (vascular endothelial growth factor α)를 생산케 하여, 골형성에 필수적인 혈관생성을 돕는다¹³⁾. 골모세포는, 산소를 비교적 적게 필요로 하는 Mesenchymal stem cell (MSC) 에 비해 산소 소모량이 많다. 이렇게 혈관 생성을 통해 골모세포에 산소를 공급하게 되는 것이다.

이렇듯 골형성 인자로 알려진 BMP 는^{10, 14)}, 정형외과 영역에서 골형성을 위해 사용되기 시작하였다. 1997년도 lumbar spinal fusion 에 Randomized Controlled Trial(RCT) 연구가 행해졌으며¹⁵⁾, 그 이후 행해진 여러 임상 데이터를 기반으로, Food and Drug Administration (FDA) 에서는 rh-BMP2를 척추유합술에 사용 가능한 골이식재로 승인하였다¹⁶⁾. 또한 구강악안면 영역에서도 자가골 대체 이식재로 FDA 승인을 받았다¹⁷⁾. 이에 Interbody spinal fusion, Open tibial fractures, Sinus augmentation 및 Alveolar ridge augmentation 등에 쓰이게 되었다¹⁾.

정형외과 영역에선 이미 골 결손부에 대해 자가골을 대신하여 BMP 가 사용되고 있다. 치과영역, 특히 구강악안면 영역에서도 sinus graft 시에 또는 alveolar ridge 쪽에서 골형성을 위해 연구되고 있으며 사용되고 있다. 특히

구강악안면 재건 적인 측면에서, 구개구순열 치료 영역에서도 BMP 가 시도되고 있는데, 본디 alveolar cleft 영역에서는, PMCB (autogenous iliac crest particulate marrow and cancellous bone graft)를 통한 자가골이식이 gold standard 로¹⁸⁾ 여겨진다. 그외 공여부로 하악 symphysis, 늑골, 정강뼈, 두개골 등이 있다¹⁹⁾. 하지만 이는, 환자에게 부가적인 수술위치에 대한 술후 통증, 감각손상, 감염, 흉터 등의 단점이 존재한다. 또한, 원하는 양 만큼 골이식을 하기 위해선 그만큼을 공여부로부터 채취해야 하는데, 그것이 쉽지 않은 경우가 많다는 것이 문제이다.

Van Hout¹⁾ 등은 alveolar cleft 에 대하여 BMP 를 사용한 것에 대하여, 종래의 자가골 이식에 비하여 혼합치열기때는 두 군이 유의차 없는 골생성량을 보이며, 골형성이 성숙했을때는 BMP 치료군이 골생성량이 더 컸음을 보고하였다. 골질에 대한 추가연구가 필요하지만, 자가골 대신 BMP 를 사용함으로써, 비용 절감, 공여부 수술에 의한 부작용 부재, 입원기간 단축, 수술시간 단축이라는 장점이 있었다.

이러한 점에서, 치과영역에서도 자가골 이식을 대신할수 있는, BMP 를 이용한 골이식을 시도하는데에는 충분한 이점과 동기가 있다 하겠다.

그런데 이러한 BMP 는, 고유의 생리적 농도에 비하여, 치료에 사용될 경우 고농도가 쓰인다. 구순구개열 치료에 사용되는 BMP 치료 용량은 1.5mg/ml 로 사용되고 있다. 하지만 이런 높은 농도의 BMP 는 혈중, 심한 부종, 연하곤란, 과도한 골생성 등의 부작용을 초래할 수 있다.²⁰⁾ 이 때문에 인체에 적용하기 위한, 효과는 있으나 부작용은 덜 일으킬 적정 농도의 BMP 를 찾는 연구들이 계속되고 있다.

이러한 rh-BMP2 를 수용할 수 있는 Carrier 에 대한 연구는 계속되어 왔고, 많은 기질들이 사용되었다. 그러한 기질에는 Absorbable collagen sponge, decalcified bone matrix²¹⁾, hyaluronan²²⁾, deproteinized bovine

bone matrix²³⁾, hydroxyapatite (HA)²⁴⁾, Calcium phosphate²⁵⁾, polylactic acids²⁶⁾, polymethylethyl-methacrylate²⁷⁾ 등이 있다.

골형성을 위해 필요한 골이식체인 scaffold 는, 골형성 기간동안 부피 유지를 위한 기계적인 지지를 해야하며, 골의 extracellular matrix 와 유사해야 해야한다. 의도한 모양과 위치에서 골형성을 guide 할수 있도록 형태형성이 용이해야 한다. 또한 면역반응이 없어야 하며, 재생산이 가능해야 한다. 혈관의 침투를 가능케 하여 세포의 ingrowth 를 도와야 하며, 생체친화적이며 생분해성이어야 한다¹⁾. 또한 골형성 인자의 carrier 가 되어야 하는데, 성장인자의 적절한 분비 기전이 있어야 하고²⁵⁾, 국소적으로 골형성 인자가 분비되는 속도를 유지 시켜야 한다.

BMP 는 기존엔 type 1 bovine collagen 으로 만든 Acellular collagen sponge (ACS)를 기질로 사용하였다. Infuse[®] (Medtronic Biologics, USA) 는, 동결건조된 rhBMP-2와, 희석액, 그리고 ACS 기질로 구성되어 있다. 이것을 희석액과 rhBMP-2를 1.5mg/ml 농도로 ACS 에 적용하여 15분 정도후 사용한다. ACS 의 collagen 에 BMP 가 어느 정도로 결합되어 있는데, 세포들이 ACS 로 침투하게 되어 골조직으로 대체되는 것이다²⁸⁾. 하지만 ACS 는 낮은 수준의 cross-link 로 인해, 부피의 90%정도가 비어있으며, 이에 따라 space maintenance 가 어렵다. 또한 면역반응의 위험성이 있다²¹⁾. 그래서 부피가 큰 결손부의 경우, 골재생에 있어 그리 유리하지 못하다.³⁰⁾³¹⁾

골생성에 있어, 최근 합성골 이식이 각광 받고 있다. 합성골은 자가골과 달리 제공할수 있는 양에 있어서 풍부한 공급을 할수 있으며, 감염 및 질환 전파의 우려가 없다는 장점이 있다. 또한, 공여부가 필요없으므로 부가적인 수술이 필요 없다. 이에 Hydroxyapatite, Tricalcium phosphate, Biphasic Calcium phosphate, Bioactive glass ceramics, Calcium sulfate, Calcium carbonate, Calcium phosphate cements 등이 있다.

이러한 합성골 이식재 중에서, Biphasic Calcium Phosphate (BCP) 골이식재가 도입되고 있다. BCP는, Hydroxyapatite (HA)와 β Tricalcium phosphate (β -TCP)의 혼합물이다.

BCP는 sinus graft나³²⁾ 각종 임플란트와 관련된 골이식에 활용되고 또한 연구되고 있다. HA는 인체 뼈와 화학적으로 유사하여 생체적합성이 유리하고, 새로운 골생성이 될때까지 부피를 유지하는 성질은 좋지만, 흡수가 느리다. β -TCP는 흡수속도가 빠르며, de novo 골형성을 유도한다. Jensen 등에 따르면, β -TCP는 contained 형태의 결손부에서 자가골 이식과 거의 차이 없는 골생성 능력을 보인다³³⁾. 하지만 β -TCP는 흡수 속도 때문에, 부피유지에는 불리하여 onlay graft 등에는 부적절하다³³⁾. 이에 착안하여 HA에 β -TCP를 코팅하여 BCP를 합성하였다. 이러한 BCP는, 두 가지 상호보완적인 성격을 지닌 HA와 β -TCP 두가지 성분의 비율을 변화시키는 여러 연구들이 행해졌다. 기존의 60/40³²⁾뿐 아니라, 70/30 및 30/70³⁴⁾ 등 다양³⁵⁾하게 연구가 되어왔다. 본 실험에 쓰이는 BCP는 HA와 β -TCP의 비율이 30:70이다. 이는, 기존 연구에서 30:70 비율의 BCP 또한 부피의 안정성이 유지되는 것으로 나타났으며³⁶⁾, 신생 골형성을 유도하는 β -TCP 비율을 늘림으로써 골생성에 유리한 비율의 BCP로 볼수있다.

골형성 기전은 두가지로 나뉘어 있는데, 기존 연골에서 골화가 이뤄지는 연골내 골화가 있다. 이때 기존 연골은 신생골이 형성되는데 있어 지지체 역할을 하며 서서히 흡수되어 골로 치환된다. 또한 연골 없이도, 직접 간엽조직에서 골모세포가 분화되어 골이 형성되는 막내골화가 있다.^{37, 38)}

Calvaria는 막성골 형성을 통해 발생되며, 이는 두개악안면 부위의 막성골 형성되는 부위와 유사성을 가진다. 또한, calvaria는 외측 및 내측의 cortical bone으로 형성되었으나, 중간에 해면골로 이루어져, 해부학적으로 Mandible과 유사하다. 생리학적으로, calvaria의 cortical bone은 atrophic mandible과 닮았다³⁹⁻⁴¹⁾.

이러한 두개악안면 부위의 형성과정에서의 유사성과, 하악과의 해부학적 생리학적 유사성으로 calvaria 는 치의학 연구분야에서 골재생과 관련한 연구모델로서 적합하다.

본 실험에선 골형성을 위해 BCP 골이식재에 BMP 를 적용하여 scaffold 로서 BCP, 그리고 골형성 인자로서 BMP 의 골형성능 효과를 기대한다. 또한, 임상에서 쓰이는 치료용량보다 비교적 낮은 농도의 BMP 골형성 정도를 평가하여, 부작용을 줄일 수 있는 적정 BMP 농도를 평가하는데 목적이 있다.

본 실험은 토끼를 대상으로, 두개골 부위에 골결손부를 형성하였으며, BCP와 BMP를 혼합하여 골이식을 하였다. BMP의 농도를 군별로 달리하였으며, 시간에 따른 골형성 양상을 확인하기 위하여 희생기간을 2,4,12주로 설정하였다. 그 후 조직학적, 방사선학적으로 골형성의 정도를 비교하였다. 귀무가설은 다음과 같다. 첫째, 신생골 형성량 및 시간에 따른 골생성 속도는 BCP에 혼합한 BMP의 유무 또는 BMP농도에 따라 영향을 받지 않는다. 둘째, 골형성 정도와 기존 이식재의 흡수율은 서로 상관관계가 없다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 재료

가. 실험동물

16-20 주령의 3~3.5kg 무게의 Newzealand white rabbit 18 마리를 준비 하였다. 실험동물의 반입 후 일주일 동안의 검역 및 순화 기간을 거쳤으며, 표준화된 식이를 시행하였다. 실험동물의 사육 및 관리, 외과적 수술 과정은 연세대학교 의과대학 임상의학연구센터의 실험동물 관리위원회의 동물 실험 표준 지침을 따랐다.

나. rhBMP-2, Biphasic calcium phosphate (BCP)

Biphasic calcium phosphate (BCP)는 Osteon II (GENOSS, Korea) 를 사용하였다. HA 와 β -TCP 의 비율은 30:70 로서, 다공성 구조를 갖추고 있다. Pore size 는 250 μm 이며, porosity 는 70% 이상 이다. 각 입자크기는 0.5 ~ 1.0mm 이다. 각 군별로 동일하게 70mg 씩 사용하였다. 이는 형성한 골결손부 크기에 맞는 용량이다.

BMP 는 rhBMP-2 (E.coli-derived, GENOSS, Korea) 를 사용하였다. Saline 과 희석하여 0.1mg/ml , 0.5mg/ml, 1.0mg/ml 농도의 BMP 용액을 준비하였다. 각 군별로 BMP 희석액 양은 동일하게 40 μl 씩 적용하였으며, 함유된 rh-BMP2 는 각각 4 μg , 20 μg , 40 μg 를 사용하였다. BMP 를 혼합하지 않는 군에서는 생리식염수만 40 μl 사용하였다.

BCP 및 BMP 희석액, 생리식염수를 미리 준비해두고, 골결손부에 이식하기 30 분 전에 BCP 와 BMP 희석 용액(생리식염수)을 균일하게 혼합한다. 혼합 후 30 분이 지나고 나서, 골 결손부에 적용한다.

2. 실험 방법

가. 실험군의 설정

rhBMP-2 의 4 가지 농도군을 설정하였다. 0.0mg/ml BMP 군 (Saline), 1.0mg/ml BMP 군, 0.5mg/ml BMP 군, 0.1mg/ml BMP 군을 설정하였다. 총 18마리의 개체에서 두개골에 실험군에 따른 각 4 개의 골결손부를 형성하였다.

치유기간은 2 주, 4 주, 12 주 군으로 설정하였다. 각 기간별로 개체수는 6 마리로서, n 수는 6 이다.

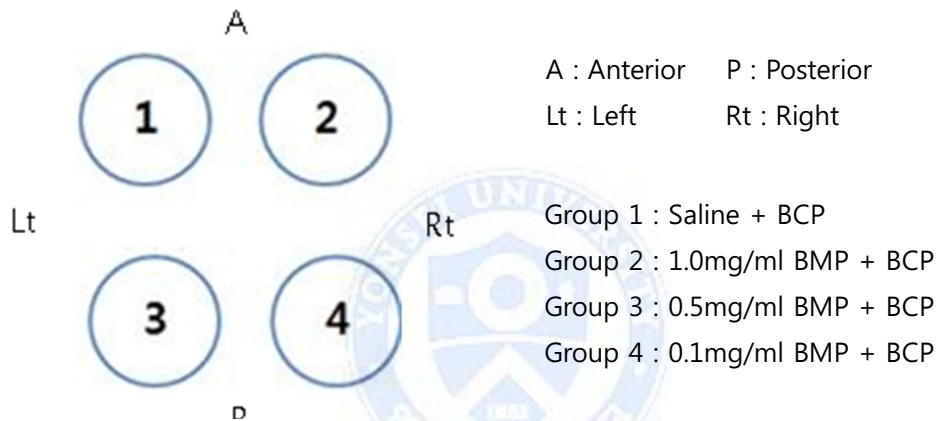


Fig. 1 Schematic diagram of surgery and group distribution

나. 수술과정

New Zealand white rabbit 을 Zolazepam(Zoletil[®], virback Korea Co., Korea) 1.5mg/kg 피하 주입 및, Xylazine HCl(Rompun[®], Bayer Korea) 5mg/Kg 을 근육내 주입하여 전신마취 한다. 전신마취 약제 주입 10 분 후에 Povidon-Iodine 으로 두개골 부위 피부를 소독하고 1:80,000 epinephrine 이 함유된 2% Lidocaine(lidocaine HCl, Huons) 으로 국소마취를 시행한다. 전두골 전방부 부터 두정골을 거쳐 후두골 앞부분 까지 약 2.0 - 2.5cm 정도의 길이로 중앙부를 따라 피부와 골막을 절개하고, 전층판막으로 골막을 거상한다.

노출된 두개골 표면에서, 모식도와 같이 좌우로, 그리고 앞뒤로 2 개씩 총 4 개의 골결손부를 형성한다. 직경 8mm 의 Trepine bur(Mr. Curette Tech, Korea)

로 뇌경막이 훼손되지 않게, 하방 피질골 까지 깊이 2-3mm 의 원형 골결손부를 형성한다. 형성된 결손부의 골편을 큐렛을 이용하여 부드럽게 거상시킨다. 뇌경막이 훼손되지 않고, 그에 따른 출혈이 없음을 확인한다. 각 결손부간의 거리는 최소 3mm 이상을 확보한다.

이식하기 30분전에 미리 혼합해둔 BCP 와 BMP 희석액 혼합물을 골결손부에 적용시킨다. 상기 모식도와 같은 위치에 BMP 농도 군별로 이식을 시행한다. 흡수성 봉합사로 (4-0 Vicryl, reverse cutting 19mm 3/8C, Ethicon, Somerville, NJ, USA)로 두개골 부위 골막조직을 먼저 봉합후, 표피를 마저 봉합한다. 2 주후 봉합사의 제거를 시행하였다. 골 치유 기간동안 감염의 징후는 없는 것을 확인하였다.



Fig. 2 Photograph of surgery site

다. 희생과정

2, 4, 12 주군에 따라서 치유기간을 갖고, 희생을 시행한다. 심마취 유도 후 표피를 절개하고 골막을 분리한다. 치유가 진행된 골결손부 주변으로 충분한 거리를 두고, 핸드피스를 사용하여 변두리 부위 골을 삭제 하여 시편을 채취하였다. 시편의 앞쪽에 방향을 구분하기 위한 표시를 새긴다. 채득한 시편을 10%의 중성 포르말린 용액으로 고정시켰다.

3. 평가 방법

가. Micro CT 촬영

7 일동안 포르말린 용액에 고정한 시편에 대하여, x-ray 촬영 및 Micro CT scanner (Skyscan 1076, Bruker, Belgium)를 이용하여 미세전단촬영을 시행한다. 미세전단촬영의 데이터를 Nrecon(SKYSCAN, Bruker, Belgium) 프로그램으로 재구성한다. 이것을 CT-AN™(SKYSCAN, Bruker, Belgium) 프로그램과 CT-Vol™(SKYSCAN, Bruker, Belgium) 프로그램으로 3 차원적으로 분석 후, 전체 부피 및 미성숙골, 성숙골의 부피를 측정하였다. 총 부피에 대한 성숙골, 미성숙골의 부피 비율을 백분율로 환산하여 계산하였다.

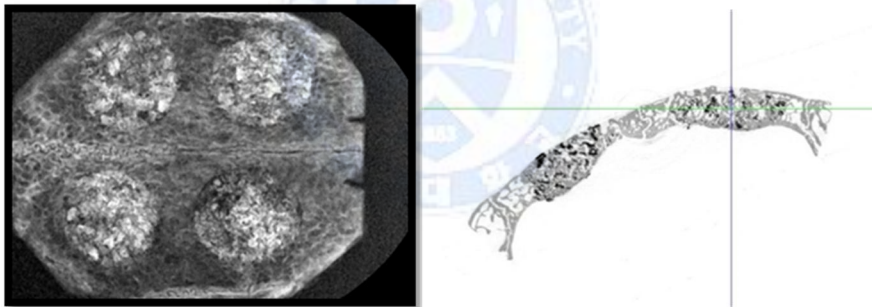


Fig. 3 A : X-ray of specimen

B : Micro CT view of specimen

나. 시편제작 및 조직형태학, 계측학적 검사

미세전단 촬영을 마치고, 10%의 포르말린에 고정된 시편을 수세 후, 2.5% NaOCl 과 17%의 EDTA 용액에 18 일간 탈회과정을 거친다. 에탄올과 자일렌을 이용하여 탈수 및 파라핀 침투 과정을 시행한다. 포매 후 3~4 μm 두께로 박절한다. 이때 시편의 앞뒤 방향으로, 골결손부 중심을 지나는 시상면에 따라 박절한다. Hematoxylin-Eosin(HE) 염색 및 Masson's trichrome 염색을 시행하고 조직 슬라이드를 제작하였다.

시편을 광학현미경(Leica DM 2500, Leica Microsystems, Germany)을 이용해 12.5 배와 50 배 배율로 촬영하였다. 12.5 배 HE 염색 조직슬라이드로 조직계측을 시행하였다. 조직 계측에는 I-solution (iMTechnology, Korea) 프로그램을 이용하여 총 신생조직 면적, 신생골 면적, 잔여 골이식재 면적, 지방조직의 면적을 측정하였다. 추후 전체 신생조직 면적에 대한 신생골 면적 및 잔여 골이식재의 면적, 지방조직의 면적을 백분율로 환산하여 산출하였다.

다. 통계학적 분석

방사선학적, 조직계측학적으로 얻어진 데이터를 이용하여 통계학적 분석과 검증을 거쳤다. 본 실험에서 상정한 n 수는 6 이었으며, 염증 및 실험개체의 사망으로 인하여 실제 n 수 중에 최저 4 도 있었으므로 비모수 검정을 시행하였다

각 2 주령, 4 주령, 12 주령에서의 BMP 농도 군간 비교 및 각 BMP 농도군 서의 치유기간에 따른 통계적으로 유의한 차이가 있는지에 대한 비교는 Kruskal Wallis 검정을 시행하였다. 유의수준은 .05 로 설정하였다. 각 군마다의 비교는 Mann-Whitney U test 를 시행하였다. Mann-Whitney U test 에서의 유의수준은 Bonferroni correction 을 적용하였다. 통계계산은 IBM SPSS Statistics 21 (IBM, United States) 를 통하여 시행하였다.

Ⅲ. 결과

본 실험 결과, 총 18 마리 개체 중 1 개체는 수술 직후 사망하였으며, 나머지 68 개의 시편 중 4 개의 시편에서 뇌경막의 손상으로 인한 염증반응이 발생하였다. 총 64 개의 시편으로 micro CT 분석 및 조직형태, 조직계측학적인 분석을 시행하였다.

1. Micro CT 를 이용한 골생성 부피 측정



가. Mature bone volume (%)

Table 1. Percentage volume of Mature bone in Micro CT data

Mature Bone Volume (%)	2wk (mean±SD [%] n)	4wk (mean±SD [%] n)	12wk (mean±SD [%] n)
0.0 BMP	27.46 ± 2.03 (6)	46.57 ± 1.70 (5)	53.01 ± 3.96 (6)
0.1 BMP	29.48 ± 3.40 (5)	45.33 ± 2.42 (5)	50.24 ± 4.78 (6)
0.5 BMP	33.49 ± 3.26 (5)	44.91 ± 0.98 (5)	49.34 ± 4.02 (6)
1.0 BMP	32.76 ± 2.37 (6)	42.75 ± 2.90 (4)	52.38 ± 3.44 (5)

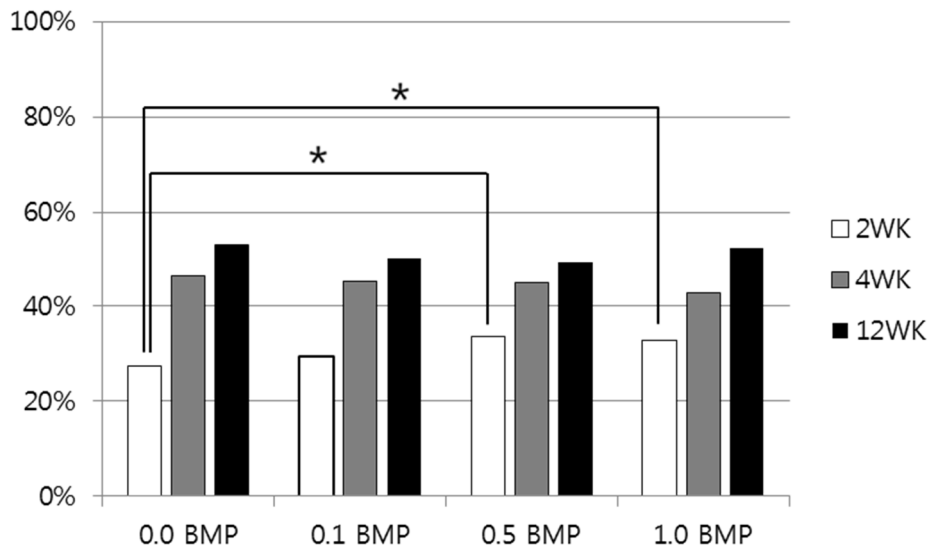


Fig. 4 Percentage volume of Mature bone in Micro CT data (statistically significantly different * $P < 0.05$)

치유기간에 따라 성숙골은 유의차 있게 증가하였다. 하지만 0.1mg/ml BMP 군과 0.5mg/ml BMP 군에서 4 주에서 12 주로 될 때 성숙골이 증가하는 하였지만, 통계적 유의차를 보이지는 않았다.

2 주군에선 BMP 농도가 증가할수록 성숙골이 늘어나는 경향을 보이며, control 군보다 0.5mg/ml 및 1.0mg/ml BMP 군에서 통계적으로 유의성 있게 증가하였다. 그에 반해 4 주군에선 BMP 의 농도가 증가할수록 성숙골이 감소하는 경향을 보이나, 통계적 유의성은 없었다. 12 주군은 대조군에서 0.1, 0.5mg/ml BMP 군으로 갈수록 성숙골이 감소하는 양상을 보이다가 1.0mg/ml BMP 군에서 다시 증가하는 추세를 보인다. 하지만 농도군간 유의성은 없었다.

나. Immature bone volume (%)

Table 2. Percentage volume of Immature bone in Micro CT data

Immature Bone Volume (%)	2wk (mean±SD [%] n)	4wk (mean±SD [%] n)	12wk (mean±SD [%] n)
0.0 BMP	56.74 ± 2.77 (6)	35.18 ± 2.84 (5)	27.38 ± 1.59 (6)
0.1 BMP	52.58 ± 3.96 (5)	37.29 ± 1.76 (5)	29.55 ± 2.67 (6)
0.5 BMP	45.83 ± 4.15 (5)	38.18 ± 0.95 (5)	30.62 ± 3.09 (6)
1.0 BMP	46.75 ± 1.87 (6)	39.68 ± 3.09 (4)	29.65 ± 4.41 (5)

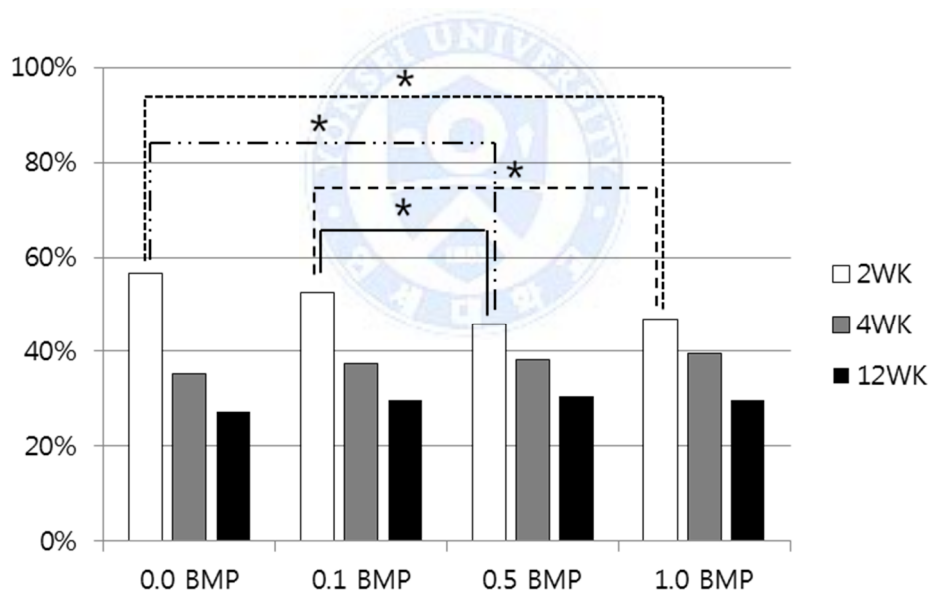


Fig. 5 Percentage volume of Immature bone in Micro CT data (statistically significantly different * P < 0.05)

치유기간이 길어질수록 미성숙골의 부피가 줄어드는 명확한 경향성이 보였다. 또한 모든 BMP 농도군에서 치유기간에 따른 미성숙골 부피는 통계적으로 유의성 있게 감소하였다.

2 주 군에서는 전반적으로 BMP 의 농도가 증가할수록 미성숙골의 양은 감소하였다. 특히 0.1mg/ml BMP 군에 비해 0.5mg/ml BMP 군이 유의성 있게 미성숙골의 양이 작았다.



2. 조직형태학적 분석

2 주, 4 주, 12 주령의 순서에 따라 분석하였다. 신생골 및 잔여 골이식재, 그리고 지방조직에 초점을 맞추어 관한 조직형태학적 관찰을 시행하였다.

가. 2 주 군에서의 각 BMP 농도에 따른 조직 시편 분석

BMP농도 (mg/ml)	Masson's trichrome stain (x12.5) HE stain (x12.5)	HE stain (x50.0)
------------------	---	-------------------

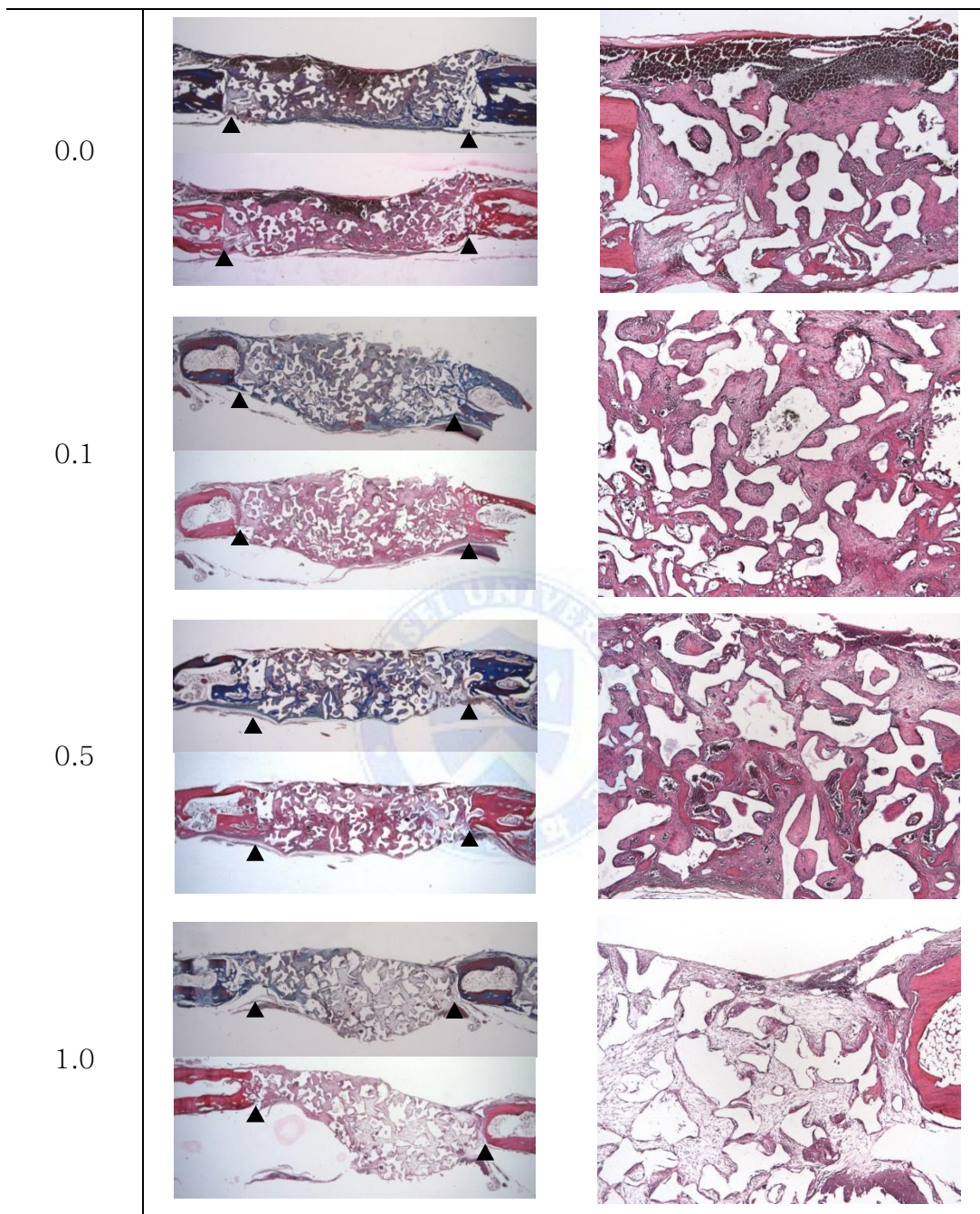


Fig. 6 Histologic specimens undergone 2 weeks of healing time

상기 조직은 2주 군에서의 4가지 농도에 따른 조직학 슬라이드이다. 좌측은 12.5 배율로서, Masson's trichrome 및 HE 염색이다. 우측은 50배 고배율

HE 사진이다. 위에서부터 순서대로 0.0mg/ml BMP, 0.1mg/ml BMP, 0.5mg/ml BMP, 1.0mg/ml BMP 농도군의 표본 사진이다.

2주 군에선 신생골이 생성되기 시작한다. 양 옆의 기존 골에서부터 골형성이 시작되는 것이 확인되나, 아직 신생골의 양이 많지 않다. 골결손부의 양측 경계부는 신생조직과 명확히 구분된다. 하방 뇌경막 및 상방 골막에서부터 골형성이 되기 시작하는 양상 또한 확인된다. 초기 결합조직이 많이 관찰된다. 지방조직은 4개군 모두 거의 관찰되지 않았다. 망상골의 형성이 보이며, 망상골 속에서 성숙골이 형성되는 것이 확인된다. 잔존 골 이식재는 불규칙적으로 표면에서의 흡수가 시작되고 있으며, 그에 따라 골형성 또한 잔존 골 이식재 주변으로 접촉하여 생성되고 있다. 1.0mg/ml BMP 농도군에선 신생골의 형성이 분명하지 못하다.



나. 4 주 군에서의 각 BMP 농도에 따른 조직 시편 분석

BMP농도 (mg/ml)	Masson's trichrome stain (x12.5) HE stain (x12.5)	HE stain (x50.0)
------------------	---	-------------------

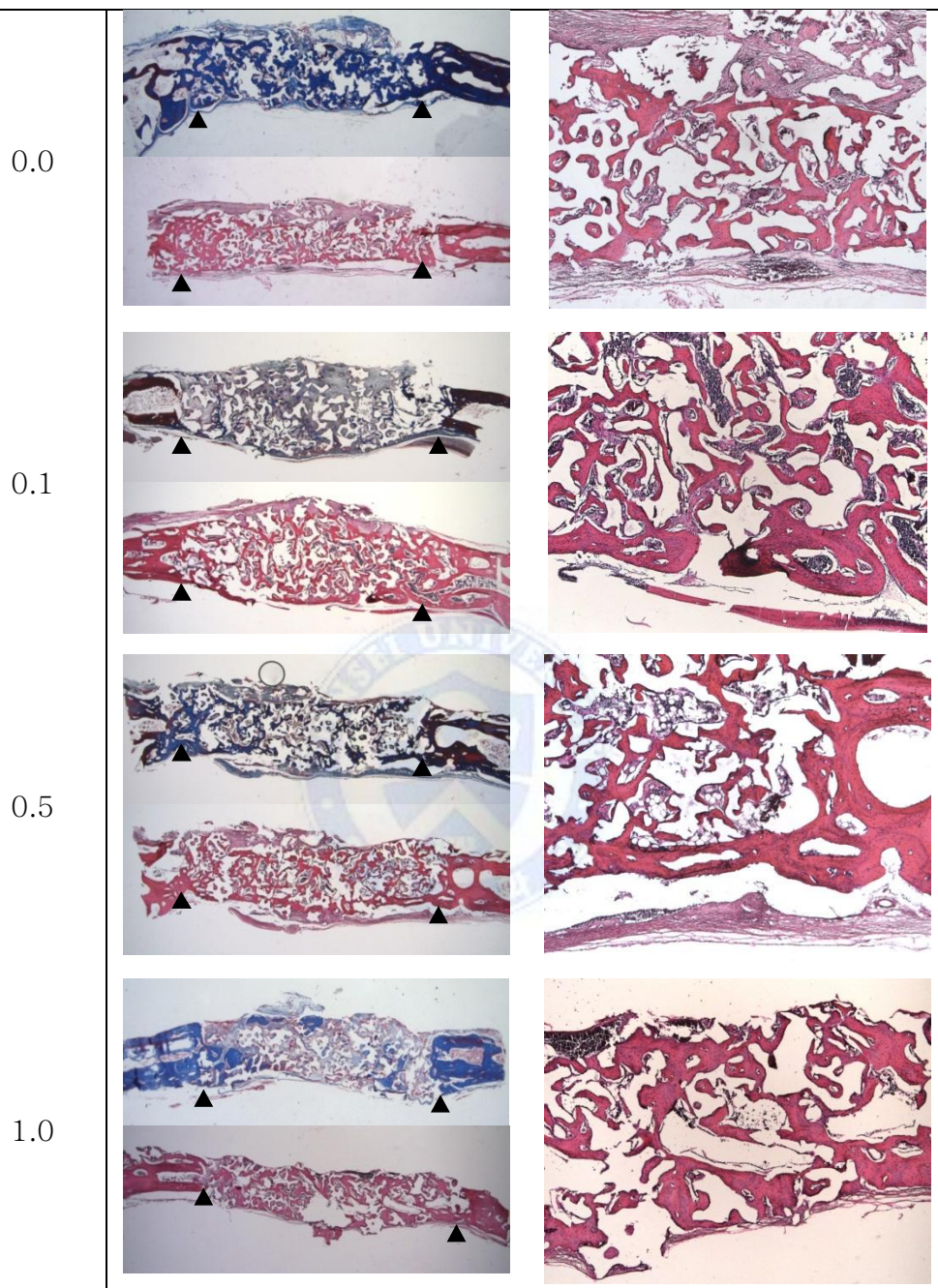


Fig. 7 Histologic specimens undergone 4 weeks of healing time

상기 조직은 4주 군에서의 4가지 농도에 따른 조직학 사진이다. 좌측은 12.5 배율로서, Masson's trichrome 및 HE 염색이다. 우측은 50배 고배율

HE 사진이다. 위에서부터 순서대로 0.0mg/ml BMP, 0.1mg/ml BMP, 0.5mg/ml BMP, 1.0mg/ml BMP 농도군의 표본 사진이다.

4주 군에선 중등도의 광화된 신생골의 형성이 관찰된다. 측면에서부터 생성된 신생골과, 골결손부 경계면의 기존골이 서로 경계를 구분짓기 힘들어진다. 잔여 골이식재는 2주군에 비하여 더욱 흡수가 일어났으며, 흡수가 일어난 잔여 골이식재를 따라 골형성이 되어있는 모습이 관찰된다. 망상골은 성숙골로 상당수가 대체되었지만, 아직 신생 성숙골과 잔여 골이식재가 서로 불규칙적으로 혼합되어있는 양상이 관찰된다. 뇌경막 아래 방향으로 불룩한 양상으로 신생조직이 형성된다. 지방조직 형성의 시작이 관찰되며, 신생골 속의 골수조직이 관찰되고 있다.



다. 12주 군에서의 각 BMP 농도에 따른 조직 시편 분석

BMP농도	Masson's trichrome stain (x12.5) HE stain (x12.5)	HE stain (x50.0)
-------	---	-------------------

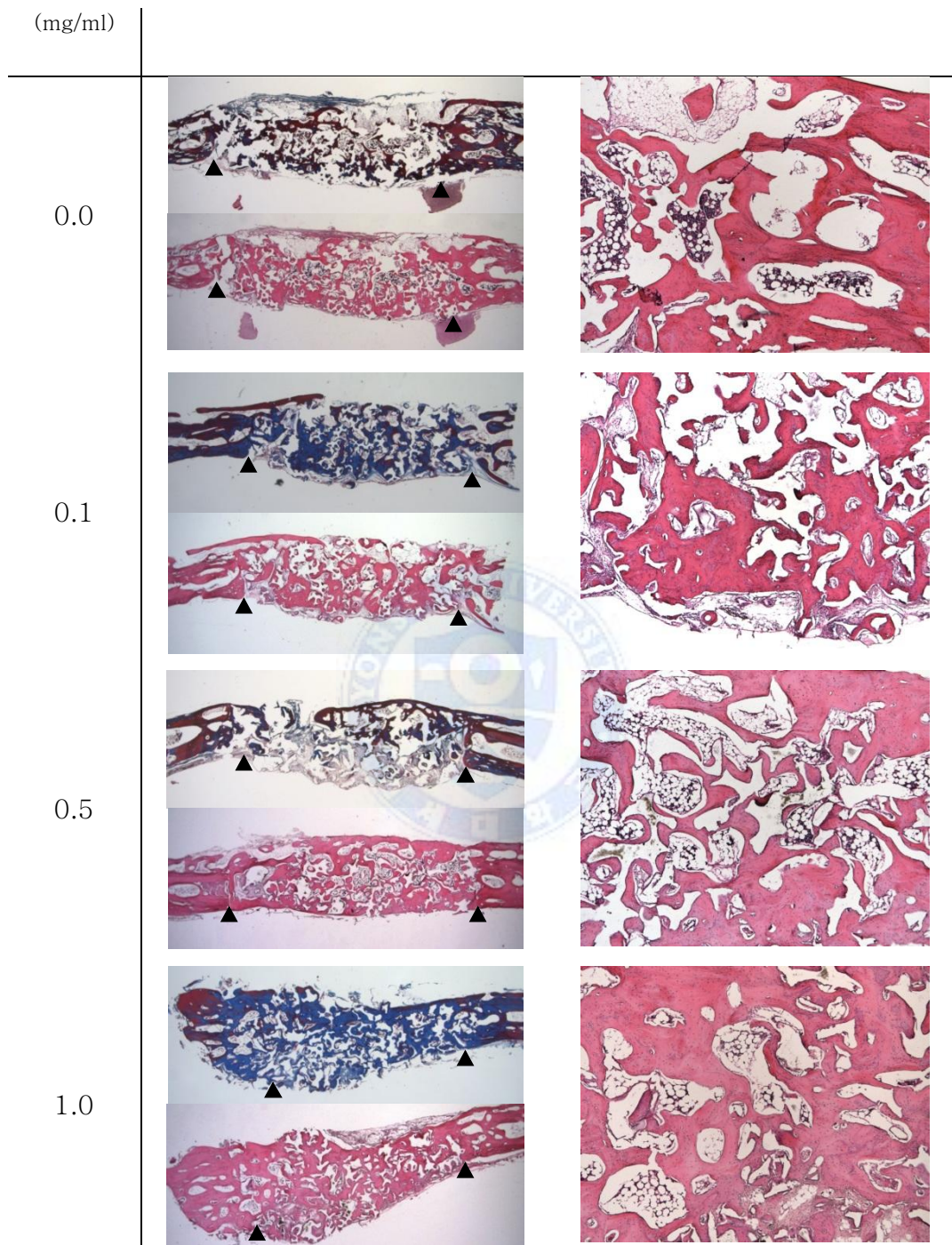


Fig. 8 Histologic specimens undergone 12 weeks of healing time

상기 조직은 12주 군에서의 4가지 농도에 따른 조직학 사진이다. 좌측은

12.5 배율로서, Masson's trichrome 및 HE 염색이다. 우측은 50배 고배율 HE 사진이다. 위에서부터 순서대로 0.0mg/ml BMP, 0.1mg/ml BMP, 0.5mg/ml BMP, 1.0mg/ml BMP 농도군의 표본 사진이다.

12주 군에선 높은 수준의 골형성이 관찰된다. 양측의 기존 골과 신생골의 경계를 구분짓기 힘들다. 산발적으로 형성되었던 신생골 간의 간격이 매워져 성기지 않고, 밀도있는 신생골의 양상이 관찰된다. 신생골 내부에서 골수 조직 또한 잘 형성 된 것이 관찰된다. 잔여 이식재는 많은 흡수가 일어났고, 차지하는 공간이 줄어들었다. 모든 시편에서 지방조직이 관찰된 것은 아니지만, 4주 군에 비하여 지방조직의 면적은 더욱 증가되었으며, 이때 형성된 지방조직은 특징적으로 주로 상방 측, 골막에 접한 부위에 형성되었다.



3. 조직계측학적 분석

신생조직의 전체 면적, 신생골의 면적, 잔여 골이식재의 면적, 지방조직의 면적에 대하여 조직계측학적인 분석을 시행하였다.

가. 신생조직의 전체면적 조직계측학적 분석

Table 3. Volume of Total tissue in Histomorphometric data

Total tissue Volume (mm ²)	2wk (mean±SD [mm ²] n)	4wk (mean±SD [mm ²] n)	12wk (mean±SD [mm ²] n)
0.0 BMP	15.95 ± 1.27 (6)	14.19 ± 2.41 (5)	15.68 ± 2.24 (6)
0.1 BMP	17.10 ± 2.64 (5)	16.49 ± 1.18 (5)	15.68 ± 2.59 (6)
0.5 BMP	13.89 ± 0.67 (5)	15.66 ± 2.30 (5)	13.66 ± 2.77 (6)
1.0 BMP	15.00 ± 1.45 (6)	13.98 ± 2.62 (4)	15.24 ± 2.68 (5)

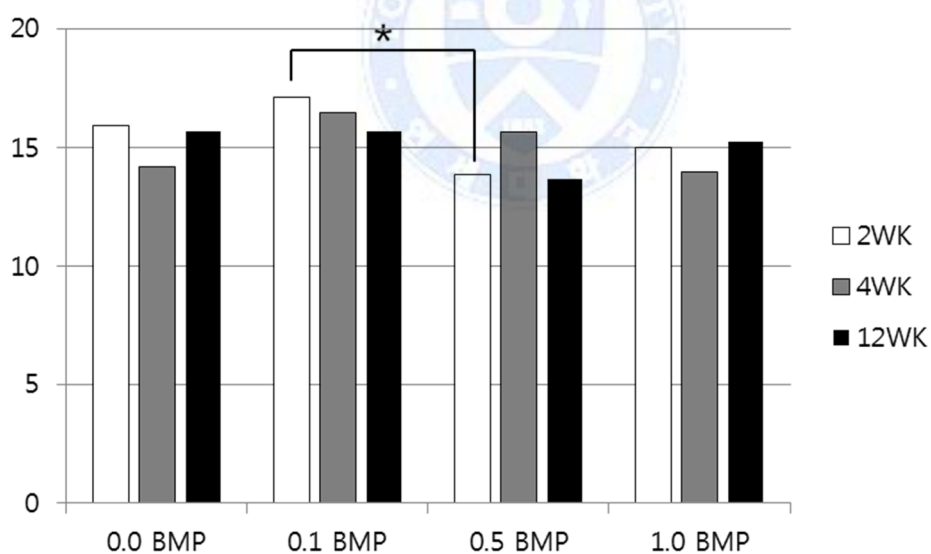


Fig. 9 Volume of Total tissue in Histomorphometric data
(statistically significantly different * P < 0.05)

조직 슬라이드에서 계측한 전체 신생 조직의 면적은, 치유 기간에 따른 증감의 추세가 뚜렷하게 보이지 않았다. 통계학적으로, 2,4,12 주 치유기간에 따른 전체 신생조직 면적의 유의차는 없었다.

대부분의 서로 다른 BMP 농도군 간에도 전체 조직양의 유의차는 없었지만, 2 주군 에서 0.1mg/ml BMP 군의 전체 신생조직의 양이 0.5mg/ml BMP 군의 신생조직 양보다 유의차 있게 높게 나왔다.



나. 신생골의 조직계측학적 분석

Table 4. Percentage volume of New bone in Histomorphometric data

New Bone Volume (%)	2wk (mean±SD [%] n)	4wk (mean±SD [%] n)	12wk (mean±SD [%] n)
0.0 BMP	15.20 ± 6.10 (6)	24.19 ± 5.81 (5)	34.38 ± 6.08 (6)
0.1 BMP	16.01 ± 7.01 (5)	30.51 ± 12.34 (5)	36.57 ± 7.64 (6)
0.5 BMP	18.45 ± 9.76 (5)	29.26 ± 13.96 (5)	37.75 ± 7.33 (6)
1.0 BMP	11.53 ± 4.66 (6)	24.43 ± 11.13 (4)	38.51 ± 2.84 (5)

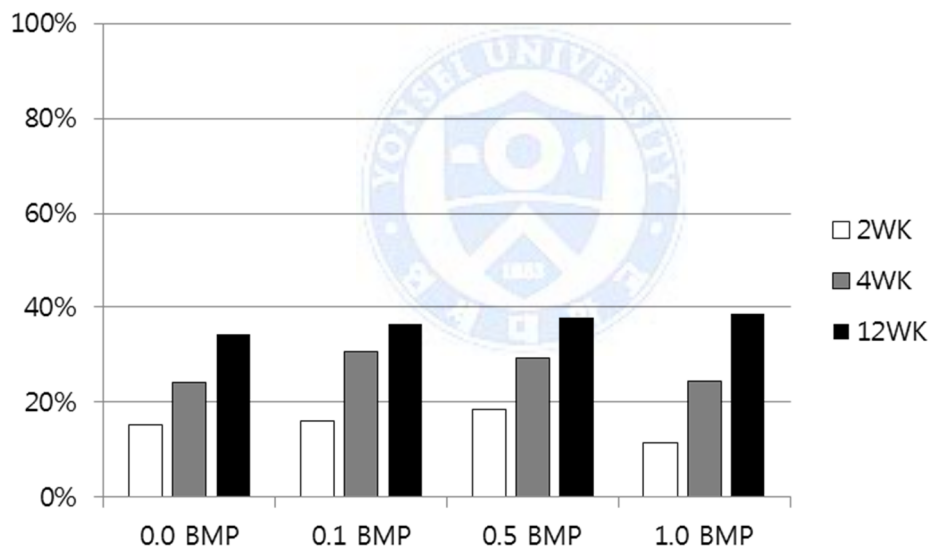


Fig. 10 Percentage volume of New bone in Histomorphometric data

동일한 BMP 농도 군에 있어서는, 2 주, 4 주, 12 주로 치유기간이 길어질수록 골생성량이 증가하였다. 그 중에서도 0.0mg/ml BMP 군 에서는 4 주군과 12 주군 사이의 통계학적 유의차가 있었고, 0.1mg/ml BMP 및 0.5mg/ml BMP 군에서는

2 주군과 12 주군 사이에서 통계적 유의차가 있었다. 1.0mg/ml BMP 군에서는 2 주, 4 주, 12 주 군 각각이 서로 통계적 유의성 있게 차이가 있었다.

동일한 치유기간에서 BMP 농도 군간 비교를 해보면, 생성량의 차이는 있었지만, 전반적으로 통계적 유의차는 보이지 않았다. 2 주군에선 0.5mg/ml 농도군이 최대 골생성량을 보이며, 1.0mg/ml BMP 군에선 오히려 0.0mg/ml BMP 군보다 낮은 골형성을 보인다. 4 주군에선 0.1 mg/ml 농도군에서 최대 골생성량을 보였다. 12 주군에선 BMP 농도가 높아질수록 골생성량이 증대됨을 보였다.



다. 잔여 골이식재의 조직계측학적 분석

Table 5. Percentage volume of Remained graft in Histomorphometric data

Remained graft material Volume (%)	2wk (mean±SD [%] n)	4wk (mean±SD [%] n)	12wk (mean±SD [%] n)
0.0 BMP	22.72 ± 1.03 (6)	20.52 ± 5.74 (5)	18.64 ± 7.79 (6)
0.1 BMP	23.35 ± 2.97 (5)	20.16 ± 5.58 (5)	17.27 ± 2.02 (6)
0.5 BMP	25.75 ± 3.90 (5)	22.79 ± 6.74 (5)	18.74 ± 8.80 (6)
1.0 BMP	26.82 ± 2.88 (6)	24.22 ± 9.04 (4)	16.76 ± 3.79 (5)

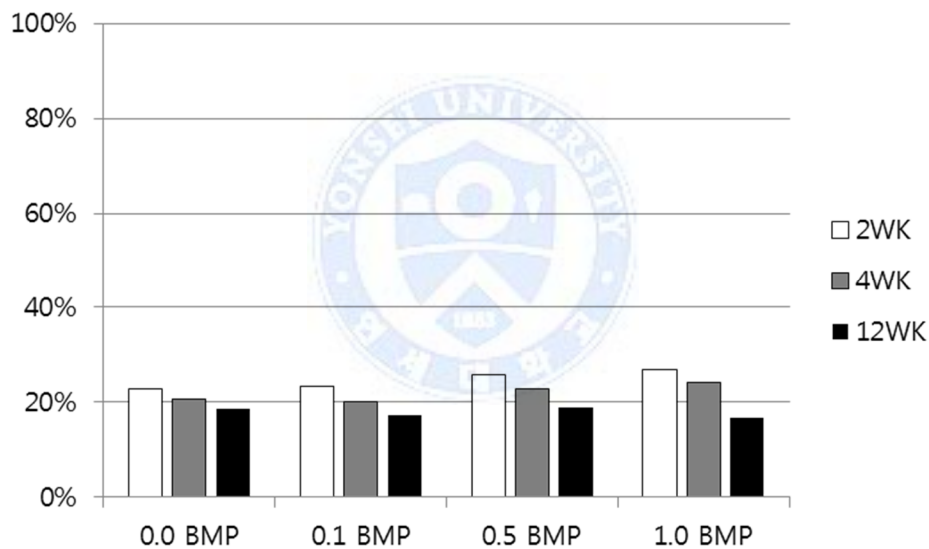


Fig. 11 Percentage volume of Remained graft in Histomorphometric data

골형성 기간이 2,4,12 주로 늘어날수록, 잔여 골이식재가 차지하는 부피는 감소하는 경향을 보였다. 하지만 대부분 군간의 통계적 유의차가 확인되지 않았으며, 단지 1.0mg/ml BMP 농도군에서 2 주와 12 주군 간의 통계적 유의차가 관찰되었다. 4 주령과 12 주령에서 BMP 의 농도가 증가할수록 잔여 골이식재 량이 늘어났으나, 통계학적 유의성을 띠진 않았다.

라. 지방조직의 조직계측학적 분석

Table 6. Percentage volume of Adipose tissue in Histomorphometric data

Adipose Tissue (%)	2wk (mean±SD [%] n)	4wk (mean±SD [%] n)	12wk (mean±SD [%] n)
0.0 BMP	0.12 ± 0.10 (6)	3.16 ± 4.25 (5)	6.08 ± 4.24 (6)
0.1 BMP	0.29 ± 0.30 (5)	3.70 ± 4.26 (5)	6.44 ± 3.30 (6)
0.5 BMP	0.11 ± 0.02 (5)	2.40 ± 1.77 (5)	7.00 ± 3.70 (6)
1.0 BMP	0.11 ± 0.06 (6)	1.20 ± 0.36 (4)	6.13 ± 0.89 (5)

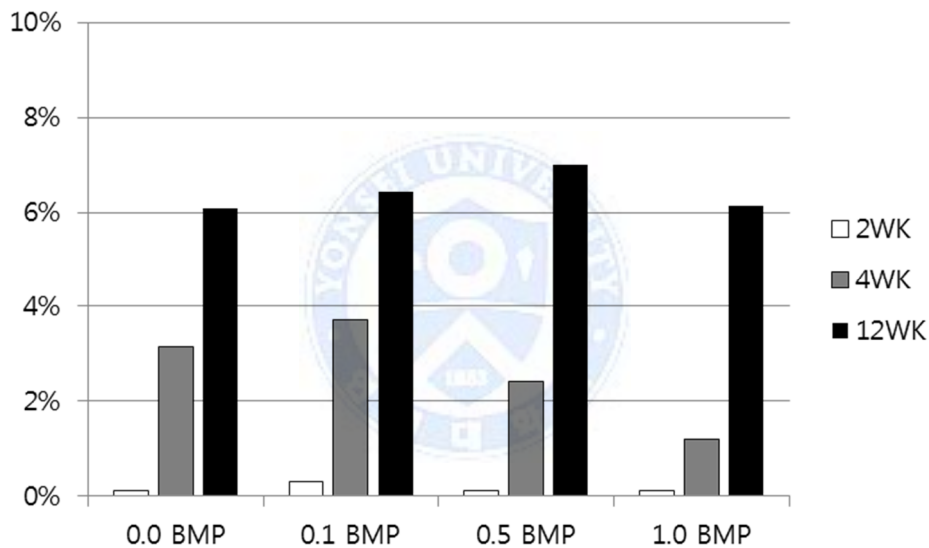


Fig. 12 Percentage volume of Adipose tissue in Histomorphometric data

골형성 기간이 늘어날수록, 지방조직은 증가하는 경향을 보였다. 이는, 신생골의 시간에 따른 증가 추세와 비슷한 양상을 보였다. 4 주군에선 0.1mg/ml BMP 군이 최대치를 띠고 점차 높은 농도로 갈수록 줄어드는 양상도 신생골과 유사한 양상이다.

동일한 치유기간에서 BMP 농도 차이에 따른 유의차는 없었다. 동일한 BMP 농도군에서 치유기간에 따른 유의차는 존재하였다. 모든 4 개 농도군에서 2 주와 12 주간 에는 지방조직이 통계적 유의성 있게 증가하였다. 0.5mg/ml BMP

농도에선 추가적으로, 4 주와 12 주 간에도 통계적 유의성 있는 증가를 확인할수 있었다. 1.0mg/ml BMP 농도에선 2주와 4주, 또한 4주와 12주간 모두에서 통계적 유의성 있는 증가가 확인되었다.



마. 조직학적 구성 비율

전체 조직의 양이 치유기간 및 BMP 군간에도 크게 차이 나지 않고, 유의차가 거의 없다는 점을 고려하여, 100% 기준 누적 그래프로 표현해 보았다. 이는, 앞서 열거한 조직계측한 결과에 대해 총 망라한 그래프이다.

1) 0.0mg/ml BMP 군에서의 누적 그래프

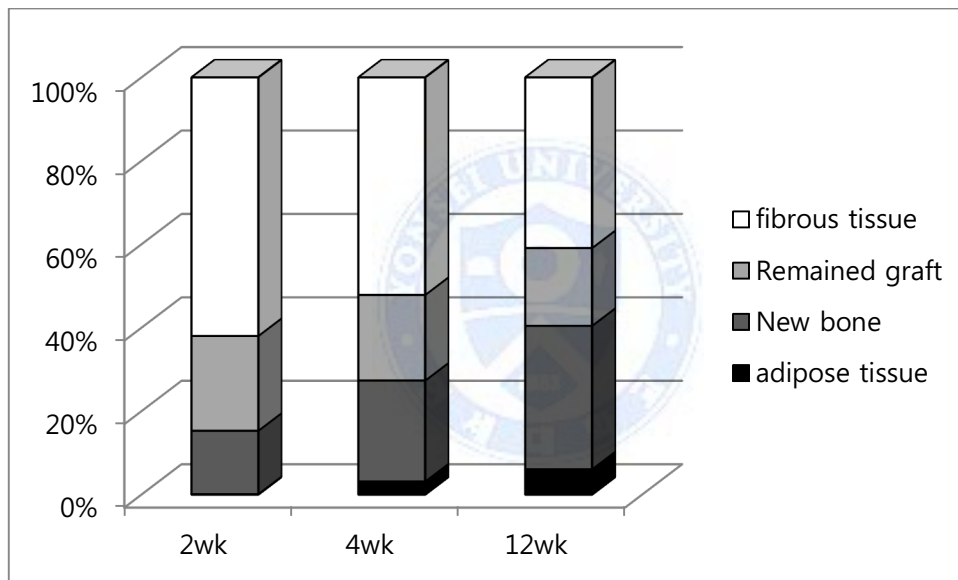


Fig. 13 Cumulative graph of histologic components at 0.0mg/ml BMP group

2) 0.1mg/ml BMP 군에서의 누적 그래프

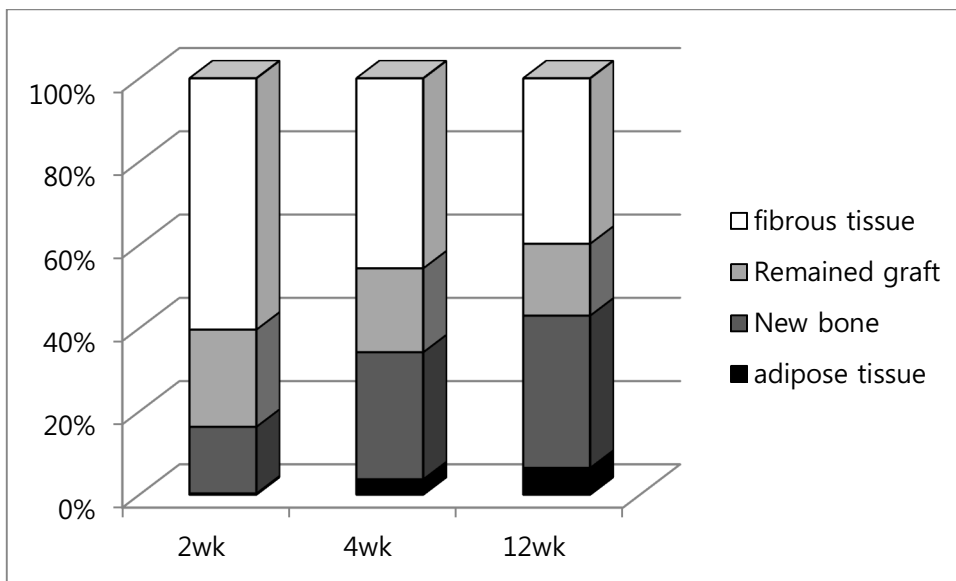


Fig. 14 Cumulative graph of histologic components at 0.1mg/ml BMP group

3) 0.5mg/ml BMP 군에서의 누적 그래프

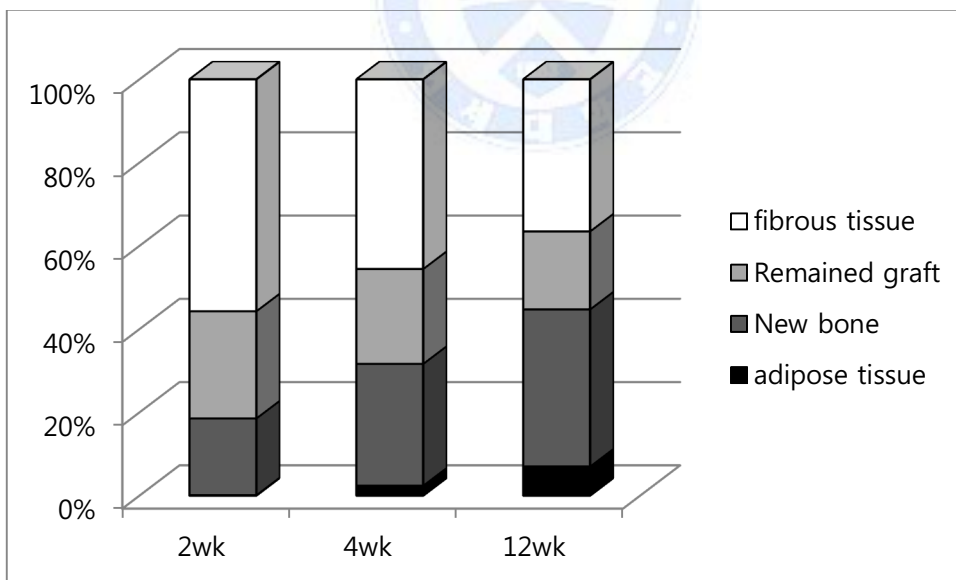


Fig. 15 Cumulative graph of histologic components at 0.5mg/ml BMP group

4) 1.0mg/ml BMP 군에서의 누적 그래프

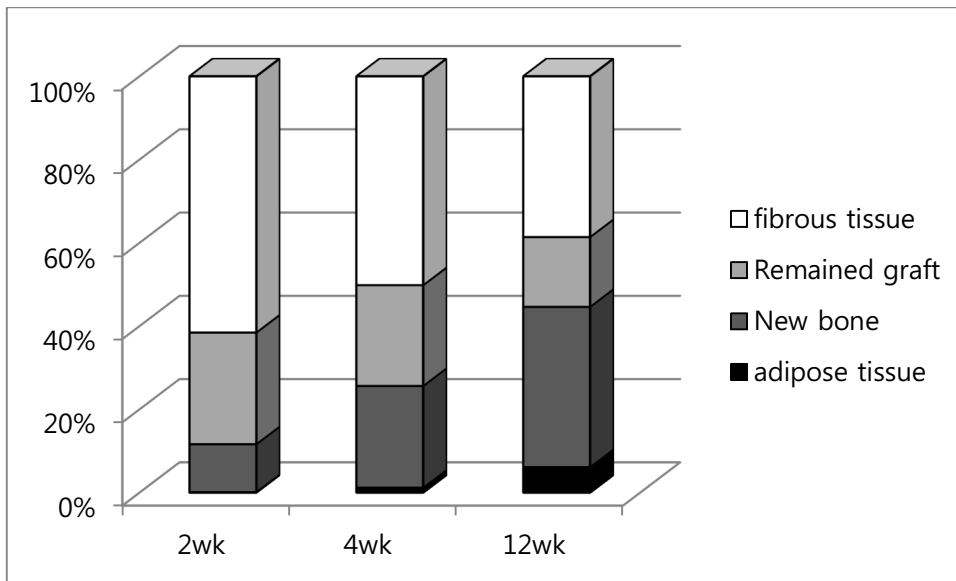


Fig. 16 Cumulative graph of histologic components at 1.0mg/ml BMP group

5) BMP 농도 4 개군의 누적그래프 모음

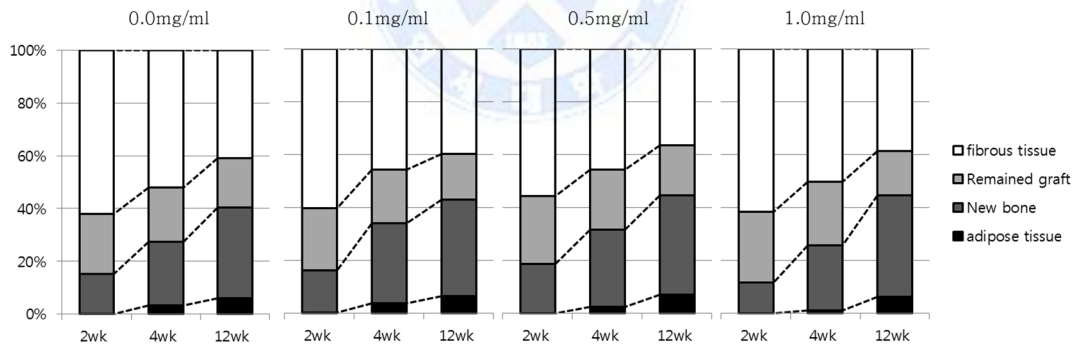


Fig. 17 Series of cumulative graphs of 4 BMP groups

IV. 총괄 및 고찰

MicroCT 상에서 성숙골은 치유기간이 증가함에 따라 증가 하였지만, 0.1mg/ml BMP 군과 0.5mg/ml BMP 군에서 4 주에서 12 주로 증가할 때는 유의차가 보이진 않았다. 이는 BMP 분비에 의한 골생성의 효과가 0.1mg/ml 및 0.5mg/ml BMP 에서, 4 주가 지나면 떨어지는 것으로 해석할 수 있다.

2 주 군에서 BMP 농도가 상승함에 따라 성숙골의 형성 정도가 높아지는 것이 관찰되며, 특히 대조군과 0.5mg/ml BMP 군, 그리고 대조군과 1.0mg/ml BMP 군 끼린 통계적 유의차를 보인다. 2 주 군에선 BMP 의 농도에 따라, 신생골 형성 효과가 차이가 난다고 할 수 있다. 0.5mg/ml BMP 군과 1.0mg/ml BMP 군 간은 형성된 골의 수치 차이가 거의 없으며, 통계학적 유의차도 없다. 이는 2 주 군에선, 0.5mg/ml 농도의 BMP 만 사용하여도 1.0mg/ml 농도의 BMP 를 사용한 것과 같은 수준의 성숙골 형성 효과를 볼 수 있다고 해석할 수 있다.

4 주군 및 12 주 군은 BMP 농도가 증가함에 따라 성숙골이 상승하는 경향을 보이지 않으며, BMP 농도 군끼리는 성숙골 생성의 유의차도 없다.

Micro CT 상에서 성숙골의 결과를 정리하면, BMP 의 성숙골형성 효과는, 4 주 및 12 주 군에서는 BMP 농도에 따른 골형성 정도의 통계적 유의성을 보이지 않으며, 2 주군에서는 통계적 유의차가 나타난다. 즉, BMP 농도 차이에 따른 성숙골 형성 효과를 보는 것은 주로 2 주군 이며, 4 주가 넘어가면 BMP 농도 차이에 따른 성숙골 형성정도의 차이가 유의차 있게 나지 않는다. 2 주군에서는 BMP 농도가 증가할수록 높은 성숙골 형성을 보이며, 0.5mg/ml BMP 와 1.0mg/ml BMP 간의 차이가 없는 것으로 보아, 0.5mg/ml BMP 농도가 성숙골 형성에 적절한 농도로 생각할 수 있다. 또한, 치유기간이 늘어날수록 성숙골 형성은 점차 증가하지만, 0.1mg/ml BMP 농도군 및 0.5mg/ml BMP 농도군 에서는 4 주가 지나게

되면, 치유기간의 증가에 따른 유의차 있는 성숙골의 형성이 이루어 지지 않는다. 즉, 상기 농도에서는 4 주까지 성숙골 형성의 효과가 유효하다는 것이다.

Micro CT 상에서의 미성숙골은 전반적으로, 치유기간이 지날수록 점차 감소하였다. 이는 성숙골과 반대되는 양상이다. 또한 모든 BMP 농도군에서, 치유기간에 따른 미성숙골의 감소는 통계적 유의차를 띠었다. 이는 미성숙골이 먼저 형성이 되고, 그것이 점차 광화됨에 따라 성숙골로 치환되어 간다는 조직학적 단계에 부합되는 결과이다.

또한, 성숙골과 미성숙골의 그래프 양상을 BMP 농도 증가에 따라 비교해보면, BMP 농도에 따른 증감 추세가 서로 반대로 나왔다. 예를 들어, 성숙골에서 2 주군에서의 BMP 농도에 따른 증감 추세는 미성숙골에서 2 주군에서의 BMP 농도에 따른 증감 추세와 반비례적으로 나온다는 것이다. 이렇게, BMP 농도에 따라 서로 반대되는 증감 추세는 2 주, 4 주, 12 주군 모두에서 확인된다. 이러한 그래프의 서로 상반되는 대비적인 양상은, 미성숙골이 광화를 통해 성숙골로 치환된다는 조직학적 과정을 더욱 충실하게 나타낸다고 할 수 있다.

2 주군에서는 0.1mg/ml BMP 군에 비하여 0.5mg/ml BMP 군에서의 미성숙골 수치가 유의차 있게 적었다. 이는 초기 2 주동안은, 0.1mg/ml BMP 에 비하여 0.5mg/ml BMP 에서 미성숙골이 성숙골로 치환되는 정도가 좀더 큰 것으로 풀이할 수 있다. 이는 앞서 보았던 성숙골의 데이터와 유사하다. 2 주군에서 0.5mg/ml BMP 가 성숙골 형성에 좋은 효과를 보인 것을 참고하면, 0.5mg/ml BMP 는 2 주 군에서, 미성숙골의 광화를 통한 성숙골의 형성 정도가 다른 BMP 농도군에 비해 뛰어나다고 볼 수 있다.

조직 슬라이드에서 보여지는 신생조직의 총 면적은, 신생골, 신생 결합조직, 혈관, 잔존 이식재, 지방조직 등으로 구성된다. 조직학적 결과에서 총 신생조직의 면적은, 치유기간에 따른 통계적 유의차가 거의 나타나지 않았다. 단지, 2 주 군에서 0.1mg/ml BMP 군의 총 신생조직 면적이 0.5mg/ml BMP 군의

총 신생조직 면적에 비하여 유의차 있게 높았다. 2 주 군의 0.1mg/ml BMP 군과 0.5mg/ml BMP 군에서 개별 구성조직들을 비교해보면, 신생골의 비율은 0.5mg/ml BMP 군에서 더 높았으며, 잔여 이식재의 비율도 0.5mg/ml BMP 군이 더 높았다. 지방조직의 비율은 0.1mg/ml BMP 군이 약간 더 높긴 하였으나, 지방조직이 차지하는 비율은 적어서 그 효과는 미미하다. 그러므로, 0.1mg/ml BMP 군에서 총 신생조직 면적이 더 큰것은, 0.5mg/ml BMP 군과 비교하여, 혈관, 결체조직 등의 생성이 더 많았다고 풀이된다. 0.5mg/ml BMP 군은 0.1mg/ml BMP 군과 비교하여, 전체 면적은 더 작지만, 전체에서 신생골 및 잔여 골 이식재가 차지하는 비율이 더 높다고 할 수 있다.

조직 슬라이드상에서 신생골을 측정하게 되면, 동일한 BMP 농도군에 있어서, 2 주, 4 주, 12 주로 치유기간이 늘어날수록 신생골은 대체로 유의차 있게 증가하였다. 앞서 micro CT 에서 성숙골의 증가는, 0.1mg/ml BMP 및 0.5mg/ml BMP 군에서 2 주군 및 4 주군 간에 유의차 있는 증가를 보였다. 조직학적 신생골 분석에서는 역시 0.1mg/ml , 0.5mg/ml BMP 농도일때, 2 주군 및 12 주군 사이에서 유의차 있는 증가를 보였다. 이때, 형성 초기 4 주간 측정된 신생골은, 그 이후 8 주간 형성된 신생골의 양보다 더 많았다. 또한, 4 주 군에서 0.1mg/ml BMP 군과 0.5mg/ml BMP 군이 다른 BMP 농도군에 비해, 신생골 형성이 더 뛰어났다. 즉, 0.1mg/ml BMP 군과 0.5mg/ml BMP 군에서는, 초기 4 주간 높은 수준의 골 형성이 이루어진다.

1.0mg/ml BMP 고농도 군은 2 주군에선 오히려 대조군 보다 낮은 수준의 골형성을 보이며, 4 주 군에선 대조군과 거의 비슷한 수준의 신생골 형성을 보인다. 12 주 군에서는 다른 BMP 농도군에 비하여 가장 높은 수준의 신생골 형성을 보이지만, BMP 농도군간 유의차는 없었다.

전반적으로, 조직학적 신생골 측정에 있어서, 동일한 치유기간 에서는, BMP 농도의 차이에 따른 골생성량은 서로 유의차가 없었다. 이는 각 군의

평균값들이 갖는 표준편차가 높기 때문이다. 동일한 군에 있어서 각 시편에서의 신생골 차이가 났다. 이는 개체간의 차이에 기인한 높은 표준편차로 생각된다.

조직학적으로 신생골을 측정할 때는, 조직학 슬라이드 상에서 층판 구조가 관찰되며, 골세포 및 하버스관 등의 골의 조직학적 소견을 기준으로 판단하여 측정하였다. 이는 micro CT 를 통해 측정한 성숙골, 미성숙골과는 개념상 차이가 있다. Micro CT 에서 측정한 성숙골, 미성숙골은 오직 방사선 불투과성 정도의 차이로 구분을 하였으며, 이는 골의 조직학적 구조와 관련이 있다기 보다는, 미네랄 침착으로 인한 광화 정도와 관련이 있다 할수 있다. 골이 형성되고 나서 점차 광화되어 가는 과정에 있어, 치유 초기에 미성숙골이 많았다가, 점차 시간에 따라 성숙골이 많아 지는 경향을 micro CT 에서 확인하였다고 할수 있다.

잔존 골이식재를 조직슬라이드에서 측정하였을때, 치유기간에 따른 잔존 골이식재의 감소가 일어났다. 치유기간에 따라 증가하는 신생골의 양상을 고려한다면 이는, 잔여 이식재의 흡수와 신생골의 형성이 연관되어 있다는 조직학적 과정을 반영하는 데이터이다. 전체적으로, 통계적 유의차가 있는 구간이 신생골에 비하여 적었다. 치유시기에 따라 잔존 골이식재가 통계적 유의성 있게 감소되는 구간은 1.0mg/ml BMP 농도 하에서 2 주 및 12 주 구간 뿐이었다. 그런데, 이 구간 즉, 1.0mg/ml BMP 농도군에서 2 주 및 12 주간 구간은 신생골에서도 제일 큰 차이를 보였다.

4 주 군에서, 신생골과 그래프를 비교하였을 때, BMP 농도에 따른 잔여 이식재의 그래프 경향과 신생골의 그래프 경향은 반대성향을 띠고 있었다. 이와 같이, 신생골과 잔여이식재 데이터는, 잔여 이식재가 흡수되고 신생골이 그에 따라 생성되는 경향을 반영한다.

1.0mg/ml BMP 에서 2 주군은 신생골 형성량에 있어 가장 최저치를, 잔존 골이식재 량에 있어 가장 최대치를 보인다. 12 주군에선, 신생골 형성량에 있어 가장 최대치를, 잔존 골이식재 량에 있어 가장 최저치를 보인다. 이는 1.0mg/ml BMP 농도가, 치유기간에 따라, 신생골 형성 및 잔존 골이식재의 흡수가 가장

급격하게 나타나는 것으로 볼수 있다. 하지만, 초기 2 주에서는 신생골 생성 및, 잔여이식재 흡수가 다른 농도군에 비교하여 앞선 결과를 보이지 않았다.

생체이식재, 보철물, 의료기구를 식립하고 난 뒤의 실험개체의 반응은 조직이나 장기에 손상이 가해진 후의 반응과 유사하다^{42, 43)}. 이런 식립에 대한 반응 에서, 급성 염증은 보통 초기 1 주 동안 일어난다. 이후 만성 염증이 시작된다. Foreign body reaction 은 만성염증이 남아있는 특징이 있으며, 생체적합재료의 경우는, 급성 및 만성 염증이 짧은 시간 내에 사라진다⁴²⁾. 본 실험에서 잔존 골이식재가 감소하는 양상을 확인할 수 있었는데, 조직학적 관찰상으로 발견된 염증 반응을 고려한다면, 잔존 골이식재의 흡수 반응이 일어났음을 알수 있다.

지방세포의 생성 메커니즘은 파골세포, 간엽줄기세포, 골모세포와 연관되어 있다. 손상된 골결손부의 골재생은 파골세포로부터 시작한다. 파골세포가 분화되면, 파골세포가 골흡수를 일으키며, 또한 미분화간엽줄기세포를 골모세포로 분화시킨다. 이때 어떠한 인자가 작용하여, 파골세포의 분화 및 활동, 그리고 골모세포의 분화 유도를 방해하게 되면, 미분화간엽줄기세포는 골모세포가 아닌, 지방세포로 분화된다.⁴⁴⁾ 이를 미루어 보면, 지방조직은, 미분화 간엽조직이 골모세포로 분화하지 못하고, 지방세포로 분화한 결과라 볼수 있다. 이를, 미분화 간엽조직에서 골모세포 및, 지방세포로 경쟁적으로 분화되는 관계로 본다면, 지방세포와 골생성의 양은 반비례 양상을 띠어야 한다.

본 연구에서, 치유기간에 따라 지방조직이 증가하였다. 4 주군에선, 0.1mg/ml BMP 농도에서 가장 높은 지방조직 생성이 확인되었고, 그 이후 농도에선 감소하였다. 12 주군에선 농도의 증가에 따라 0.5mg/ml BMP 농도군 까진 지방조직이 증가하다가 1.0mg/ml BMP 에선 다시 감소한다. BMP 농도에 따른 이와 같은 추세는, 신생골의 BMP 농도에 따른 추세와 유사한 양상을 띤다. 통계적 유의차가 나타나는 양상 또한 신생골과 지방조직이 유사하게 나타난다.

신생골 수치와 지방수치가 서로 반비례 양상을 띠지 않고, 오히려 유사한 추세를 띤다. 이는, 지방조직의 의미를, 미분화간엽세포가 골모세포로 되지 못해서 생성된 부산물이라기 보다는, 미분화간엽세포가 골모세포 또는 지방세포로 자연스럽게 시간에 따라 분화해간 결과라고 해석해야 한다. 치유기간이 길어질수록 증가하는 지방조직은, 신생골과 비례적으로 함께 증가한 것이다. 그리고, 신생골에서도 지방조직에서도 BMP 농도군 끼리의 유의차가 발견되지 못했다. 즉 본 실험에서, BMP의 농도 차이는, 미분화 간엽줄기세포가 지방세포로 분화하는가, 골모세포로 분화하는가에 대하여 영향을 주지 못하였다고 해석할 수 있다.



조직 계측학적 측정에 있어서, 생성된 전체 조직을 대상으로 측정한 것과, ROI를 설정하여 측정한 두가지 측정치를 비교해보았다. 앞서 조직계측학적 결과값들은 생성된 전체조직을 대상으로 측정한 결과였다.

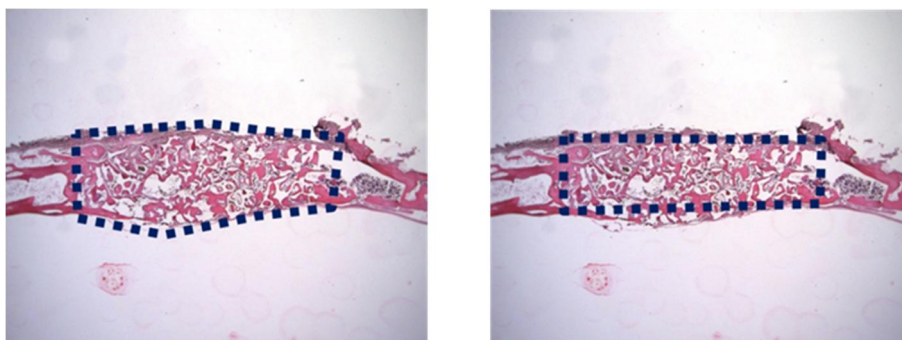


Fig. 18 Histologic analysis range on tissue slide
 A : Entire tissue analysis B : Region of Interest (ROI) analysis

좌측은 생성된 전체 조직에 대한 측정 범위이며, 우측은 ROI 설정을 통한 측정범위이다. 신생골, 잔여이식재, 지방조직에 대한 수치를 비교하였다.

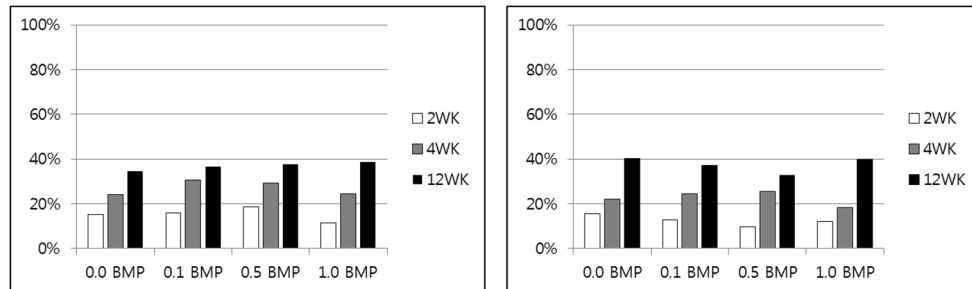


Fig. 19 Comparison of New bone volume between different histomorphometric analysis range A : Entire tissue analysis B : Region of Interest (ROI) analysis

신생골의 결과를 보면, 좌측은 기존 측정치, 우측은 ROI 에서 측정치이다. ROI 에서도 치유기간이 길어질수록 골생성 양이 많아졌다. 하지만 BMP 농도에 따른 경향성이 기존 측정치의 경향과 다소 차이가 있었다. 전반적으로 생성된 골의 수치가 ROI 에서 다소 낮게 측정되었다. ROI 범위에서, 생성된 조직의 외곽 부위가 배제되는 경우가 빈번하다. 이때, 배제된 외곽쪽에서 생성된 골이 ROI 측정에선 제외되게 된다. 즉, 골생성이 외곽에서부터 시작되어, 외곽에서 차지하는 골의 비율이 높다는 것을 의미한다. 2 주, 12 주에서 0.5mg/ml BMP 군이 최저 수치를 나타낸다. 2 주 및 12 주에서 BMP 의 농도가 0, 0.1, 0.5mg/ml 로 높아질수록 신생골의 생성이 줄어드는 것이다. 즉, ROI 로 측정하게 되면 주위 골막이나 기존골에서부터, 외곽에서부터 자라오는 골을 일부 포함하지 못하게 되고, 전체적으로 신생골이 낮게 측정된다.

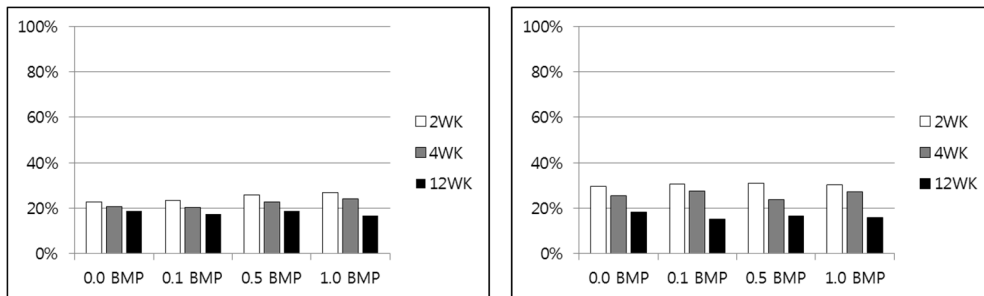


Fig. 20 Comparison of remained graft volume between different histomorphometric analysis range
 A : Entire tissue analysis B : Region of Interest (ROI) analysis

잔여 이식재의 경우에 대하여 살펴보겠다. 우측과 같이 ROI 측정에서도, 치유시기에 따라 잔여 이식재는 감소경향을 보인다. ROI 에서 측정치가 전반적으로 기존 측정값 보다 높다. 이는 앞서 ROI 에서 측정한 신생골 수치가 낮게 나온 결과와 연관지을 수 있다. 또한 2,4,12 주 치유기간 간에 차이가 많이 났다. 특히, 4주에서 12주 군으로 진행됨에 따라 잔여골 이식재의 감소폭이 컸다. 그런데, 12주 군에선 기존 측정치와 ROI에서의 잔여골 이식재 값이 매우 유사한 수치를 보인다.

이를 분석하면, 12 주군으로 치유가 길어질수록, 전체측정과 ROI 가 유사성을 띠게 되며, 조직이 한군데로 치우친 현상이 점점 해소되는 것이다. 즉, 치유기간이 길어질수록 조직이 점차 균질하게 된다. 앞서 신생골에서도, 12주군에선 기존 측정치와 ROI 측정치가 유사하다.

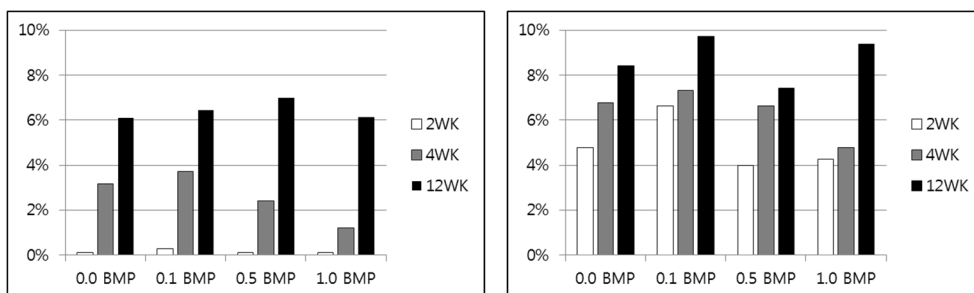
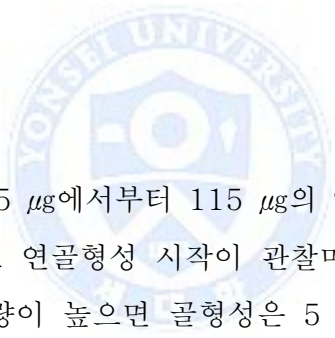


Fig. 21 Comparison of Adipose tissue volume between different histomorphometric analysis range
 A : Entire tissue analysis B : Region of Interest (ROI) analysis

지방조직에 대하여 알아보겠다. 지방조직은 ROI 에서 측정하였을 때 기존 측정에 비하여 전반적으로 비율이 더 증가하였으며, 치유시기별 차이는 좀더 줄어들게 되었다. 다른 BMP 농도군에 비하여, 0.1mg/ml BMP 군이 높은 지방 조직 비율을 나타내었다. 기존 측정에서도 0.1mg/ml BMP 군에서 높은 수치가 나왔으나, ROI 에선 그 경향이 더욱 뚜렷하였다. 본디 지방조직은 한쪽에 치우쳐져 있는 경우가 많은데, 원래 차지하는 비율 자체도 적은 점을 고려한다면, 기존 측정치와 ROI 의 측정값이 차이 나는 이유로 생각할수 있다.



Wang 에 ⁴⁵⁾ 따르면, 0.5 μg 에서부터 115 μg 의 양의 Rh-BMP2 를 rat 에 이식하였을때 7 일 이내로 연골형성 시작이 관찰며, 14 일 이내로 골형성이 시작된다. BMP-2 의 용량이 높으면 골형성은 5 일 이내에서도 시작하기도 한다. BMP-2 가 골형성이 가능한 양은 600ng 부터라고 알려져있다. 하지만 이는, 같이 포함된 인자나 scaffold 등에 따라 이는 영향을 받는다 ⁴⁵⁾.

본 실험에서 설계한 골결손부는 contained defect 형태이다. Contained defect 의 골형성능은 안정적이다. Lundgren ⁴⁶⁾등은 토끼 두개골에서 occlusive barrier 를 사용하여 골형성 정도를 확인하였다. 결과적으로, 다른 조직이 개재 되지도 않고, 본래 골의 boundary 보다 두배 이상 높이로 골이 자라올랐다. 이렇듯, 두개골에서의 contained defect 는 골형성이 좋으며, 이에 따라 본 실험에선 골결손부의 크기 선정에 있어, critical defect size 를 고려해야 했다.

Critical size defect (CSD) 는 동물에서 평생 완전히 healing 되지 않을 결손부의 크기다. frame 등 ⁴⁷⁾에 따르면 토끼의 CSD 는 직경 16mm 의 원형 골 결손부이다. Kramer 등 ⁴⁸⁾은, 토끼의 두개골에 8mm 크기의 골결손부를 형성하였을 때, Bone 의 bridge 형성에는 보통 8-16 주가 걸렸고, 16 주에도 bridge 가 형성되지 못하고 치유되는 과정에 있는 경우가 있음을 확인하였다. 그리고 24 주가 지나도 calvarium 의 원래 두께를 회복하진 못하였다.

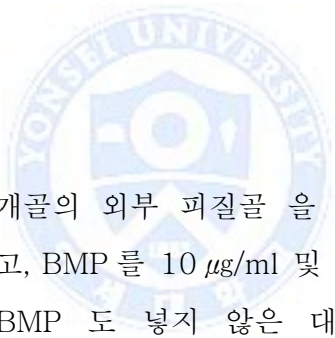
Schenk 등 ⁴⁹⁾ 은 골재생의 과정을 세가지 단계로 나누었다. 일차 해면골이 형성되고, 일차해면골이 해면골과 치밀골로 변환되고, 형성된 골이 개조되는 세가지의 단계이다. 이때 첫번째 단계는 8 주경에 이루어 지며, 두번째 단계는 16 주에도 완성되지 않는다고 하였다 ³⁹⁾.

이러한 선행연구들을 근거한다면, 토끼에서 CDS 는 직경 16mm 원형 골결손부 라고 할수 있으나, 직경 8mm 결손부에 있어서도 16 주 까지도 bone bridge 가 완벽하지 못함을 알수있다.

위와 같은 사항들을 고려하여, 본 실험은 2,4,12 주 동안 치유기간을 갖는, 8mm defect 를 형성하는 것으로 설계하였었다.

하지만, Infantile rabbit 에선 직경 8mm defect 에서도 자발적으로 골이 차는 것으로 알려져 있으며 ⁵⁰⁾, 본 실험에서의 골결손부는 치유능력이 좋은 contained defect 이다. 이것은, 본 연구 결과 에서 BMP free 한 BCP 식립군에 있어서, 다른 농도군에 비해 그리 적지않은 신생골이 생성되었으며, 심지어 2 주 치유기간에 있어서는, 1.0mg/ml BMP 농도 군보다 더 많이 신생골이 형성된 이유라고 분석할 수 있다. 골결손부의 골형성능 때문에 BMP 의 독자적인 골형성 능이 제대로 구분되지 못한 것이다. 또는 BCP 골이식재 자체의 효과 때문이기도 하다.

토끼의 생리학적 골치유는 인간의 치유 양상과 유사하다. 하지만 치유 속도는 인간보다 3 배 정도 빠르다. 생리학적으로, 토끼에서 8 주의 치유는 인간에서의 6-8 개월의 치유와 비견될수 있다^{51) 52)}.



Jung 등⁵³⁾은 토끼 두개골의 외부 피질골 을 제거하고 티타늄 실린더에 PEG + BCP 를 기질로 하고, BMP 를 10 $\mu\text{g/ml}$ 및 30 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 실험을 하였다. 이때, 기질이나 BMP 도 넣지 않은 대조군과, 기질은 이식하되, BMP 를 함유치 않은 군에 비하여 BMP 군이 유의차 있게 신생골 형성을 보임을 확인하였다. 여기서 10 $\mu\text{g/ml}$ 및 30 $\mu\text{g/ml}$ 간의 신생골 양의 유의차는 존재하지 않았다. 이는 보통 실험연구에 사용되는 것 보다 10 배 적은 농도이며, 골형성을 위해 임상적으로 사용되는 양보다 50-100 배 적은 수치라 한다.

Boyne 등⁵⁴⁾은 상악 구치부의 골높이가 부족한 12 명의 환자에게 2- stage sinus augmentation 에 rhBMP-2 + ACS 를 적용하였다. 이때 사람마다 사용된 rh-BMP2 의 용량은 사람마다 1.77 - 3.40 mg 이었다. 면역반응이나 부작용 등은 크게 없었으며, blood count, blood chemistry, urinalysis result 에도 유의할만한 변화가 없었다. 발생한 부작용들은 안면부종, 구강

홍반, 통증, 비염 등이었다. 평균 높이 8.5mm 의 골이 생성되었으며, 이는 유의성을 갖는 생성이었다.

Cochran 등 ⁵⁵⁾은 성견의 하악에 임플란트 식립시 ACP 를 기질로서 함께 첨가하였고, 실험군엔 0.2mg/ml 의 rh-BMP2 를 첨가하였다. BMP 를 함유치 못한 대조군에 비하여 BMP 를 함유한 실험군은 유의차 있게 많은 신생골을 형성하였고, bone-to-implant contact percentage 또한 높았다.

Higuchi 등 ⁵⁶⁾은 rat 하악에서 through-through defect 를 형성하고, 총 60 μ l 부피의 PGS(gelatin sponage coated with polylactic acid-polyglycolic acid copolymer)+ rh BMP2 (농도 0.1 mg/ml , 용량 6 μ g BMP) 혼합물을 이식하였다. 대조군은 PGS 만 이식하였다. 이때, 실험군은 대조군에 비해 유의차 있게 신생골 형성이 확인되었다.

Miranda 등 ⁵⁷⁾에 의하면 개코원숭이 모델에서 치조골에 골결손부를 형성하였으며, 이식하는 기질로서는 BCP + ACS 그리고 α -BSM(calcium phosphate cement)를 사용하였다. 각각의 기질에 0.4mg/ml BMP 를 첨가 하거나 하지 않는 방식으로 총 4 개 군을 생성하였다. 이때 BCP + ACS 에 첨가하는 BMP 는 260 μ g, α -BSM 에 첨가하는 BMP 는 320 μ g 를 사용하였다. BMP 를 첨가하지 않은 군과 첨가한 군의 치조골 두께는 거의 2 배 정도 차이를 보였다. 또한 trabecular bone 및 골 밀도 또한 통계적 유의차가 존재하였다. 단, BMP 군에서도 기질에 따른 유의차는 없었다.

Wikesjo 등 ⁵⁸⁾은 성견 을 대상으로, CSD 골결손부를 형성하고, rh-BMP2 를 함유한 ACS 를 이식하였다. 이때 rh-BMP2 의 농도는 각각 0.05, 0.10, 0.20 mg/ml 였으며, BMP 의 용량은 200 μ g, 400 μ g, 800 μ g이었다. 8 주후 결손부는 각각 86%, 96%, 88% 회복 되었다. 하지만 이 수치간의 유의할만한 차이는 보이지 않았다.

Herford ¹⁸⁾ 등은 총 12 명의 편측 cleft 환자 중 10 명에게 rh BMP-2 를 이식하였고, 2 명은 PMCB 를 시행하였다. 4ml 의 멸균증류수와 섞은 4.2

mg 용량의 rhBMP-2 를 ACS 와 혼합하여 이식한다. CT 를 이용하여 골생성양을 평가한 결과, BMP 에 의한 골생성은 자가골 이식과 유사한 수준으로 확인되었다.

Toriumi 등⁵⁹⁾은 성견 26 개체의 하악에 길이 3CM 의 완전 단절된 결손부를 형성하였다. Stainless steel 로 plate 를 형성하고, 이식재와 관련하여 3 가지 군을 설정하였다. 대조군은 아무것도 이식하지 않았으며, 첫번째 실험군은 골이식재(비활성 dog bone powder 0.5g) 만 식립하였다. 두번째 실험군은 골이식재에 추가로 250 μ g 의 BMP-2 를 4ml 의 자가혈과 섞어서 혈전을 만들어 적용하였다. BMP 를 함유한 군은 10 주후 저착을 할수 있을 정도의 광화된 골이 생겨서 plate 를 제거하였다. 또한 6 개월 후 이식재의 68%가 광화된 골로 대체되었다. 반면, BMP 를 함유치 않았거나 아예 아무것도 이식치 않은 군에서는 광화된 골이 오직 4% 이하로 형성되었다. 굽힘강도 에서도 결손부를 형성치 않은 정상골에 비하여 BMP 군은 27%의 굽힘강도를 보였고, BMP 를 첨가치 않았거나 아무것도 이식치 않은 군에선 0%의 굽힘강도를 나타내었다.

Boyne⁶⁰⁾ 등은 5 명의 cleft palate 환아에게 0.5mg/ml 농도의 rh-BMP2 가 첨가된 ACS 를, 역시 rh-BMP2 를 스며들게 한 이중 콜라겐막 과 함께 적용하였다. 1 년의 관찰결과, 기존의 gold standard 인 PMCB (autogenous iliac crest particulate marrow and cancellous bone graft) 이식과 필적하는 좋은 골생성이 관찰되었다.

위의 기존연구들을 종합해보면, 대부분의 연구에서 rh-BMP 를 이식하게 되면, 기질만 이식한 대조군에 비하여 유의차 있는 골생성을 보였다. 사람 대상으로는 BMP 의 사용 용량이 수 mg 에 해당하였다. 동물실험 상에선 수백 μ g 용량의 BMP 를 사용하였으며, 농도는 0.01mg/ml 에서부터 1.0mg/ml 까지 다양하였다.

본 연구에서 사용한 rhBMP-2 농도는 0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml 농도 였으며, 사용한 용량은 각 4 μ g, 20 μ g, 40 μ g 이었다. 사용된 농도는 기존의 동물실험 연구에 비하여 그리 적게 적용한 편은 아니다. 하지만 사용된 용량은 비교적 적게 적용하였다고 할 수 있다.

본 실험 결과에서, BMP 농도에 따른 차이는 micro CT 상에서 발견되었다. 2 주 치유기간 상에서, 0.5mg/ml BMP 군 및 1.0mg/ml BMP 군은 대조군에 비하여 유의차 있는 성숙골의 형성이 확인되었다. 또한 0.5mg/ml BMP 군은 0.1mg/ml BMP 군에 비하여 유의차 있는 미성숙골의 감소가 관찰되었다. 조직학적 계측에선 농도군간 유의성 있는 차이는 발견되지 않았다.

기존 연구에 비하여, 1.0mg/ml BMP 군이 비교적 골형성 효과가 높지 않았던 것으로 사료된다. 또한 초기 2 주 치유기간에서 0.5mg/ml BMP 군이 골형성 효과가 있었다고 볼 수 있다.

생리적으로 BMP 가 생체내에서 osteogenic differentiation 을 야기하는것으로 알려진 농도는 300ng/ml 이다 ⁶¹⁾. 또한 BMP 의 골조직 함유량은 생리적으로 1 μ g/g ⁵⁾ 이다.

고용량의 BMP 를 사용하였을 때는 혈종, 심한 부종, 또 그에 따른 연하곤란 ²⁰⁾, 과도한 골생성, 면역반응이 일어날수 있다 ⁶²⁾. Lisa 등은,²⁰⁾ absorbable collagen sponge (ACS) 를 carrier 로, rh BMP-2 를 적용하는 Anterior cervical fusion 수술을 받은 151 명의 환자 중 23%에서 혈종, 심한부종, 그에 따른 연하곤란, 또는 호흡곤란, 늘어난 입원기간 같은 부작용이 있었음을 보고하였다.

그러한 점에서, 골형성 효과는 유지하면서, 생리적 농도보다 고농도임에서 기인하는 부작용을 피할수 있는 저농도에서의 BMP 적용을 고민해봐야 하겠다.

본 연구에서 1.0mg/ml BMP 고농도 군에서, 다른 농도군과 비교하였을 때, 골형성이 더 잘 일어나진 않았다. 심지어 2 주 치유기간 때는 BMP 가 없는 대조군 보다도 적은 값을 나타냈다.

BMP 가 고농도 임에도 골형성이 방해되는 경우가 있다. 고농도의 BMP 가 burst release 를 일으키게 되면 높은 초기 BMP 농도가 osteoclast 의 활동성을 일으키게 되고, 골흡수를 촉진시킨다. 또한 이러한 고농도의 BMP 는 BMP 의 Antagonist 인 Noggin 의 활동성을 증가시켜, BMP 의 골형성 활동을 억제하는 것으로 알려져있다⁶³⁾.

Ruhe 등⁶³⁾은 Calcium Phosphate 에 BMP 를 함유하여 임플란트 주위 골이식을 하였다. 이때 사용한 임플란트는 표면처리를 하지 않은 대조군과, 표면에 BMP 를 흡착시킨 실험군이 있었다. 이런 두가지 군간의 임플란트 주위 골생성을 관찰하였을 때, BMP 함유한 골이식재만 홀로 사용한 것이 BMP 흡착한 임플란트 및 BMP 함유 골이식재 두가지를 동시에 적용하는 것보다도, 두배 이상의 골생성 수준을 보였다.

두가지 BMP 방출 양상을 살펴 보았을 때, 임플란트 표면에 흡착한 BMP 는 초기 몇시간에 걸쳐 다량 방출되며, 2 주면 전부 방출되는데 비해, Calcium phosphate 에 포함된 BMP 는 몇일, 몇주에 걸쳐 좀더 점진적으로 방출되며, 골형성에 훨씬 효과적으로 작용하는 것으로 나타났다.

이렇듯, BMP 는 금방 releasing 되는 성질 때문에 단독으로 사용되지 못하며, scaffold 의 개발이 계속되고 있는 실정이며, BMP 의 점진적인 delivery 는 골형성 효과에 있어 중요한 것이다.

지금까지 살펴본 바와 같이, 이들은 본 실험에서 골생성의 추세가 대조군에 비해 BMP 군에서 명확히 높진 않게 나온 이유가 될수 있다. 또한, 본 실험의 대조군이 BCP 를 포함한 점도, 대조군에서 골생성이 비교적 높게 나온 이유이다. 즉, BMP 가 빨리 확산된다고 해서 고농도의 BMP 를 부작용을 무릅쓰면서 사용하는 것 보다는, 부작용을 줄일 수 있게 저농도의 BMP 를 천천히 배출시키는 적절한 delivery system 이 확립되는 것이 더 중요한 것이다.

생체내 약물을 적용하는데 있어, 효과는 나타내되, 부작용을 줄이기 위해 저용량을 오랫동안 방출하게 하는 데에 대한 연구들이 있어 왔다⁶⁴⁾. Yamamoto⁶⁵⁾ 등은, 다른 수분함량을 지닌 hydrogel 에 BMP 를 수용시켜, mice 에 이식하였다. BMP 의 in vivo 유지기간은 hydrogel 의 수분함량의 감소에 따라 지속되었고, hydrogel 주변에서의 alkaline phosphatase 활동성 및 osteocalcin 함량이, 오직 BMP 용액만을 주입한 군 주위나, BMP 를 함유한 collagen sponge 주위 보다도 높은 것을 확인하였다.

천천히 그리고 국소적으로 BMP 가 배출되는 것은, 골형성을 위해 투입하는 BMP 농도 및 용량을 줄일 수 있으면서도, 임상적으로 사용 가능한 성능을 나타내게 하는데 필요하다⁵³⁾.

Bone-remodeling process 에서는 골모세포에 의한 골형성은 파골세포의 골흡수가 같이 어우러져야 한다⁶⁶⁾. 파골세포가 integrin 을 통해 골표면에 부착하게 되면, 세포 내부구조가 변화하고, 파골세포의 활성이 나타나게 된다.

골이식재의 표면에는 파골세포의 활동성이 관찰 되는데⁶⁷⁾, 이를 통해 골이식재에 형성되어있는 apatite 와 기존골의 apatite 가 분해/침전 반응을 통해 화학적 결합을 하여 생화학적 결합을 이루는 것이다⁶⁸⁾. 이러한 골이식재의 흡수는, 골이식재 자체의 용해도 및 파골세포의 활성화 정도에 영향을 받는다. 또한 그 두가지 요인은 서로가 서로에 영향을 주기도 한다. 이식재의 용해도가 너무 크면 방출된 칼슘의 농도가 높아 파골세포의 활성화에 제한이 가해지는 것이다⁶⁹⁾.

용해도는 골이식재의 preparation 및 sintering process 등에 영향을 받는다. 그런데 용해도가 무조건 클수록 파골세포에 의한 흡수가 좋은 것도 아니다. Yamada⁶⁹⁾ 등에 의하면 용해도는 β -TCP 가 더 높음에도 불구하고, β -TCP : HA 가 25:75 비율을 이루는 BCP 에서 파골세포에 의한 이식재의 흡수가 더욱 활발했다. 또한 그러한 비율에서의 BCP 흡수 양상과 파골세포의

조직학적 형태가 자연적인 골과 상아질에서의 흡수 양상과 유사하였다 한다. 하지만 임상적으로는, mechanical strength 측면에서 25:75 의 BCP 는 약하기 때문에, 흡수율 및 용해도를 고려하더라도, 40:60 비율의 BCP 가 더 유용하다고도 한다⁷⁰⁾.

본 실험에서 사용된 BCP 는 HA 와 β -TCP 의 비율이 30:70 로서, 이보다 HA 비율이 높은 BCP 에 비하여 부피 안정성이 훼손되지 않다는 것은 기존의 연구결과에서도 검증 되었다. 본 실험에서도, 전체 부피는 비교적 일정하게 유지되고 있었고, 이는 부피의 안정성이 지켜졌다는 scaffolding 효과를 의미한다.

조직계측에서 기존 잔여 골이식재의 양을 살펴보면, 시간에 따라 점차 감소하는 추세를 보이며, 이것은 신생골의 증가 추세와는 반대로 나타난다. BMP 농도에 따른 잔여 골이식재의 흡수는 통계적 유의차가 존재하지 못했다. 2 주 군 및 4 주군 에선 농도가 증가함에 따라 오히려 잔여 골이식재의 양이 증가하였으며, 12 주 군에서는 고농도에서 최저치를 나타내었다. 이를 미루어 본다면, BMP 의 농도차는 BCP 의 흡수율에 미치는 영향이 크지는 못하다고 볼 수 있다.

이렇듯, 골이식을 하게되면, 골유도 과정을 거치고, 이식재는 추후 완전히 흡수 되어간다. 그리고 그 공간에 새로이 골이 형성되어 들어온다. 골이식을 동반한 임플란트의 경우, 추후 vital bone 과 골유착이 되는 것이다.⁷¹⁾

조직공학적인 측면과 결부해서 보자면, 기질이 흡수가 되는 속도가, 성장인자로 인한 골형성 속도와 동일하게 되면 골재생 과정에 있어 최대의 효과를 이끌어 낼수 있다⁷²⁾. Craig⁷²⁾ 등은 생리적 농도를 상회하여, 골재생 효과가 이미 알려진 기존의 실험 BMP 농도보다도 낮은 농도의 BMP 를, degradable hydrogel 과 함께 사용하였을때, 충분한 골형성을 보임을 확인하였다. 하지만 hydrogel 이 제대로 흡수되지 못한 경우에는 이러한 저농도의 BMP 에서 골형성이 뚜렷하지 못했다. 지켜보면, 치유시간에 따라

잔여 이식재가 감소하는 속도는 신생골 형성 속도와 함께 고려해야할 중요한 문제이다.

실제로 본 실험결과 신생조직의 전체 부피는 치유 기간에 따라서도, BMP 농도 군간 차이에 있어서도 한구간을 제외하고는 통계적 유의차가 없었다. 2 주 군에서 0.1mg/ml BMP 군과 0.5mg/ml BMP 군 끼리 서로 유의차가 존재하는 것 뿐이었다. 잔여 이식재의 흡수에 따라, 골이식의 형성이 동시에 이루어졌다고 볼수 있다. 하지만 치유 기간에 따라 신생골의 생성율은 잔여 이식재의 감소폭 보다 컸다. 이는 치유기간이 길어질수록, 치유 초기에 존재했던 결체 조직 및 망상골 등이 점점 신생골로 변화되다가, 점차 결체 조직과 망상골 등의 비율이 줄어드는 일련의 과정 때문인 것으로 생각된다.

골이식재의 기간에 따른 감소는 통계적 유의차가 나진 않았다. 잔여 이식재의 기간에 따른 흡수가 유의차 있게 난다면 골형성 또한 더욱 많이 일어났을 것이라는 추측을 할 수 있다.

본 실험에서 형성해 놓은 골결손부 간의 거리가 3mm 정도로서, 각 군에 이식한 BMP 가 혈류를 타고 서로 농도가 희석되었을 가능성이 있다. 하지만 그러한 효과는 네가지군 모두 서로 간에 미치는 영향이다. 그렇기 때문에 여전히 그들간의 BMP 서열은 그대로 라고 볼수 있다. 다만, 이로 인하여 BMP 를 사용하지 않은 대조군 에서 BMP 의 효과가 나타났을수 있다.

본 실험에서 골결손부를 농도군에 따라 고정시켰다. 이는 해부학적 위치에 따른 골형성의 차이 요인을 조절하지 못한 것으로, 결과가 왜곡되어 나올수 있다. 농도군 배정을 해부학적 위치에 따라 무작위적으로 시행하였으면, 이의 영향을 좀더 배제할 수 있었을 것이다.

BCP 에 관하여, BCP 에 BMP 를 혼합하였을때, 얼마나 BMP 의 분비가 천천히 지속되는 지에 관한 추가 연구가 필요할 것이다. 본 실험에선 기존에 쓰이던 ACS 가 아닌, 기질로서 BCP 를 사용하였지만, 추가적으로 BMP 의

느린 배출을 하게 해주는 scaffold 시스템의 확립이 더욱더 연구가 되어야 할 것이다. 또한, BCP 의 흡수가 제대로 일어났는지, 치유 기간별로 BCP 의 흡수는 어떻게 일어나는지에 대한 연구가 필요하며, 부피를 유지는 하되, 신생골의 생성과 함께 같은 비율로 잘 흡수가 되는 carrier 의 연구가 추가로 필요하다.

고농도 군에서 예상 외로 골형성능이 저조한 것이 실제로 BCP 에 통합시킨 BMP 가 너무 burst 하게 분비되어서 초래된 것이 맞는지 확인을 해봐야 한다. BCP 와 함께 적용한 BMP 의 분비 속도 및 잔여량을 기간에 따라 측정하는 연구가 필요하다.



V. 결론

- 치유 기간이 늘어날 수록, 조직계측상으로, 신생골의 형성 및 지방조직의 양은 증가하였고, 잔여 이식재의 양은 감소하였다. Micro CT 계측상으로, 성숙골의 양은 증가하였고, 미성숙골의 양은 감소하였다. 전체 신생조직 면적은 치유기간에 따른 유의차를 나타내지 않았다.
- BMP 농도차에 의한 골생성 효과는, 0.5mg/ml BMP 농도 (20 μ g BMP용량) 에서 초기 치유기간인 2주 경에 다른 농도 군에 비하여 좋은 효과가 나타나는 경향성을 보였으며, 이는 4주까지 지속되었다. 하지만 통계적 유의차는 나타나지 않았다.
- 1.0mg/ml BMP 농도군은 좋은 골형성 효과를 보이지 못했다. 이는 burst release 로 인한 이유로 추정된다.
- 4주 및 12주 경에는 BMP 농도차에 의한 골생성 효과의 차이가 나타나지 않았다.
- BCP의 흡수에 따라 신생골의 치환이 일어났다. 하지만, BMP의 농도에 따라 BCP 의 흡수율에 미치는 영향은 크지 못하다.
- BMP의 농도 차는 미분화 간엽줄기세포가 지방세포로 분화하는가, 골모세포로 분화하는가에 대하여 영향을 주지 못한다.

참고 문헌

1. van Hout WM, Mink van der Molen AB, Breugem CC, Koole R, Van Cann EM. Reconstruction of the alveolar cleft: can growth factor-aided tissue engineering replace autologous bone grafting? A literature review and systematic review of results obtained with bone morphogenetic protein-2. *Clinical oral investigations* 2011;15:297-303.
2. Sculean A, Donos N, Windisch P, Brex M, Gera I, Reich E, et al. Healing of human intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins or guided tissue regeneration. *Journal of Periodontal Research* 1999;34:310-22.
3. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience* 2004;4:743-65.
4. Jadowiec JA, Celil AB, Hollinger JO. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert opinion on biological therapy* 2003;3:409-23.
5. Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2002;31:469-84.
6. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Molecular Reproduction and Development* 1992;32:160-7.
7. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *European Journal of Oral Sciences* 1998;106:160-6.
8. Bessa PC, Casal M, Reis R. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2008;2:1-13.
9. Bessa PC, Casal M, Reis R. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2008;2:81-96.
10. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth factors* 2004;22:233-41.
11. Parada C, Chai Y. Roles of BMP signaling pathway in lip and palate development. *Frontiers of oral biology* 2012;16:60-70.
12. Lu C-JWH-K. Smad Signal Pathway in BMP-2-induced Osteogenesis-A Mini Review. *Journal of Dental Sciences* 2008;3卷:13-21.
13. He C, Chen X. Transcription regulation of the vegf gene by the BMP/Smad pathway in the angioblast of zebrafish embryos. *Biochemical and biophysical research communications* 2005;329:324-30.

14. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
15. Boden SD, Kang J, Sandhu H, Heller JG. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, Randomized clinical pilot trial 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 2002;27:2662-73.
16. Sandhu HS. Bone morphogenetic proteins and spinal surgery. *Spine* 2003;28:S64-S73.
17. Shahrokh Bagheri RBB, Husain Khan. *Current Therapy In Oral and Maxillofacial Surgery*. Missouri: Elsevier 2012.
18. Herford AS, Boyne PJ, Rawson R, Williams RP. Bone Morphogenetic Protein-Induced Repair of the Premaxillary Cleft. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2007;65:2136-41.
19. Ma'amon AR, Telfah H. Secondary alveolar bone grafting: the dilemma of donor site selection and morbidity. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2008;46:665-70.
20. Shields LB, Raque GH, Glassman SD, Campbell M, Vitaz T, Harpring J, et al. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine* 2006;31:542-7.
21. Sigurdsson TJ, Nygaard L, Tatakis DN, Fu E, Turek TJ, Jin L, et al. Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 1996;16:524-37.
22. Hunt DR, Jovanovic SA, Wikesjö UM, Wozney JM, Bernard GW. Hyaluronan supports recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone reconstruction of advanced alveolar ridge defects in dogs. A pilot study. *Journal of periodontology* 2001;72:651-8.
23. Jung RE, Glauser R, Schärer P, Hämmerle CH, Sailer HF, Weber FE. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clinical oral implants research* 2003;14:556-68.
24. Koempel JA, Patt BS, O'Grady K, Wozney J, Toriumi DM. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the integration of porous hydroxyapatite implants with bone. *Journal of biomedical materials research* 1998;41:359-63.
25. Wikesjö UM, Xiropaidis AV, Thomson RC, Cook AD, Selvig KA, Hardwick WR. Periodontal repair in dogs: space-providing ePTFE devices increase rhBMP-2/ACS-induced bone formation. *Journal of clinical periodontology* 2003;30:715-25.

26. Weber F, Eyrich G, Grätz K, Maly F, Sailer H. Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly (lactide-co-glycolide) foamspheres. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2002;31:60-5.
27. Boyne PJ, Shabahang S. An evaluation of bone induction delivery materials in conjunction with root-form implant placement. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2001;21:333-43.
28. Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Müller R, et al. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nature biotechnology* 2003;21:513-8.
29. Barboza EP, Duarte MEL, Geolás L, Sorensen RG, Riedel GE, Wikesjö UM. Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. *Journal of periodontology* 2000;71:488-96.
30. Spagnoli DB, Marx RE. Dental implants and the use of rhBMP-2. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America* 2011;23:347-61, vii.
31. Arosarena OA, Collins WL. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2005;132:592-7.
32. Friedmann A, Dard M, Kleber BM, Bernimoulin JP, Bosshardt DD. Ridge augmentation and maxillary sinus grafting with a biphasic calcium phosphate: histologic and histomorphometric observations. *Clinical oral implants research* 2009;20:708-14.
33. Jensen SS, Brogini N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clinical oral implants research* 2006;17:237-43.
34. Mangano C, Sinjari B, Shibli JA, Mangano F, Hamisch S, Piattelli A, et al. A Human Clinical, Histological, Histomorphometrical, and Radiographical Study on Biphasic HA-Beta-TCP 30/70 in Maxillary Sinus Augmentation. *Clinical implant dentistry and related research* 2013.
35. Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/ β TCP in periodontal osseous defects. *Journal of periodontology* 1992;63:729-35.
36. Lim H-C, Zhang M-L, Lee J-S, Jung U-W, Choi S-H. Effect of Different Hydroxyapatite: β -Tricalcium Phosphate Ratios on the Osteoconductivity of Biphasic Calcium Phosphate in the Rabbit Sinus Model. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2014.

37. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. *European Cells and Materials* 2007;14:6.
38. 전성현, 채지화, 이은정, 허재원, 강계원. 뼈이식재의 최근 연구동향. *조직공학과 재생의학* 2008;5:791-7.
39. 이영석, 박준봉, 권영혁, 허익, 정종혁, 주성숙. 무기인산염이 골재생에 미치는 효과에 대한 조직계측학적인 연구. *대한치주과학회지* 2007;37:65-75.
40. 이근혁, 권영혁, 박준봉, 허익. 골유도재생술시 그물형 티타늄막의 천공수가골형성에 미치는 영향. *대한치주과학회지: Vol* 2004;34.
41. SCHMITZ JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research* 1986;205:299-308.
42. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology: Elsevier* 2008;86-100.
43. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Research* 2001;31:81-110.
44. Kellinsalmi M, Parikka V, Risteli J, Hentunen T, Leskelä H-V, Lehtonen S, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates osteoclast and osteoblast differentiation and favours adipocyte formation in vitro. *European Journal of Pharmacology* 2007;572:102-10.
45. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990;87:2220-4.
46. Lundgren D, Lundgren A, Sennerby L, Nyman S. Augmentation of intramembraneous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. An experimental study in the rabbit. *Clinical oral implants research* 1995;6:67-72.
47. Frame J. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *Journal of oral surgery (American Dental Association: 1965)* 1980;38:176-80.
48. Kramer I, Killey H, Wright H. A histological and radiological comparison of the healing of defects in the rabbit calvarium with and without implanted heterogeneous anorganic bone. *Archives of oral biology* 1968;13:1095-IN17.
49. Hardwick R, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. 1994.
50. Mabbutt LW, Kokich VG, Moffett BC, Loeser JD. Subtotal neonatal calvariectomy. A radiographic and histological evaluation of calvarial and sutural redevelopment in rabbits. *Journal of neurosurgery* 1979;51:691-6.

51. Choi Y, Yun JH, Kim CS, Choi SH, Chai JK, Jung UW. Sinus augmentation using absorbable collagen sponge loaded with Escherichia coli-expressed recombinant human bone morphogenetic protein 2 in a standardized rabbit sinus model: a radiographic and histologic analysis. *Clinical oral implants research* 2012;23:682-9.
52. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2009;38:356-62.
53. Jung RE, Weber FE, Thoma DS, Ehrbar M, Cochran DL, Hämmerle CH. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate. *Clinical oral implants research* 2008;19:188-95.
54. Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly LC, et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 1997;17:11-25.
55. Cochran DL, Schenk R, Buser D, Wozney JM, Jones AA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *Journal of periodontology* 1999;70:139-50.
56. Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *Journal of periodontology* 1999;70:1026-31.
57. Miranda DA, Blumenthal NM, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjö UM. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the repair of alveolar ridge defects in baboons. *Journal of periodontology* 2005;76:210-20.
58. Wikesjö UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, et al. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *Journal of Clinical Periodontology* 1999;26:392-400.
59. Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor: functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 1991;117:1101-12.
60. Boyne PJ, Herford AS, Moretta CM. The use of rhBMP-2 in the osseous restoration of cleft palate defects without the use of bone grafting. *Oral Surgery,*

- Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2006;101:46.
61. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, et al. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochemical and biophysical research communications* 1996;220:366-71.
 62. Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue engineering* 2005;11:101-9.
 63. Ruhe P, Boerman O, Russel F, Spauwen P, Mikos A, Jansen J. Controlled release of rhBMP-2 loaded poly (dl-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites in vivo. *Journal of controlled release* 2005;106:162-71.
 64. Cui W, Li X, Zhu X, Yu G, Zhou S, Weng J. Investigation of drug release and matrix degradation of electrospun poly (DL-lactide) fibers with paracetamol inoculation. *Biomacromolecules* 2006;7:1623-9.
 65. Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* 2003;24:4375-83.
 66. Hayden J, Mohan S, Baylink D. The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* 1995;17:S93-S8.
 67. Baslé MF, Chappard D, Grizon F, Filmon R, Delecrin J, Daculsi G, et al. Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcified tissue international* 1993;53:348-56.
 68. Daculsi G, LeGeros R, Heughebaert M, Barbieux I. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcified tissue international* 1990;46:20-7.
 69. Yamada S, Heymann D, Bouler J-M, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* 1997;18:1037-41.
 70. Daculsi G, Passuti N, Martin S, Deudon C, Legeros R, Raher S. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. *Clinical and histological study. Journal of biomedical materials research* 1990;24:379-96.
 71. Quilligan G. 20 years of guided bone regeneration in implant dentistry, 2nd edition. *Br Dent J* 2010;209:192-.
 72. Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 2004;35:562-9.

ABSTRACT

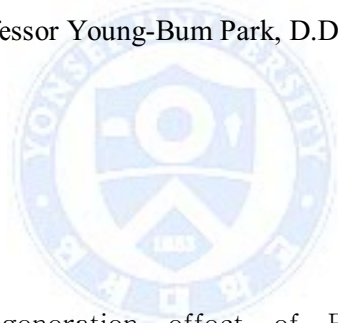
Bone regeneration effect of BCP with various concentrations of rhBMP-2 in rabbit calvarial model

Kim, Joong hyun. D.D.S

Department of Dentistry

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Young-Bum Park, D.D.S., M.S.D, Ph.D.)



Purpose :

We evaluated bone regeneration effect of Recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) as signaling molecule, and Biphasic Calcium Phosphate (BCP) as scaffold. Low concentration of rhBMP-2 must be discussed which can maintain bone regeneration effect and can reduce side effects induced by high concentration of rhBMP-2.

Material and Method :

18 Newzealand white rabbits were used. After surgical procedure, each of them had 4 defects on calvaria. BCPs mixed with different concentrations of rhBMP-2 were grafted into each defects. Concentrations of rhBMP-2 were 0.0mg/ml, 0.1mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml repectively. After 2, 4, 12weeks, rabbits were

sacrificed. Histomorphometrically, Total tissue volume, New Bone volume, Remained graft material volume, Adipose tissue volume were measured. Radiographically, Mature bone volume, Immature bone volume were measured by Micro CT.

Results and Discussion :

In Micro CT data, Mature bone volume increased and Immature bone volume decreased along with healing time significantly. 0.5mg/ml BMP group showed significant mature bone formation and immature bone decrease compared to other BMP groups at 2 weeks of healing time. In histomorphometric data, New bone volume and adipose tissue volume increased, Remained graft material decreased along with healing time. Compared to other BMP groups, high concentration 1.0mg/ml BMP group was not the best on bone formation. Burst release of BMP may contribute to this result. Along healing time, total tissue volume showed no statistically significance, which means that bone formation and graft material degradation occurred simultaneously.

Keyword : rhBMP-2, BCP, Bone regeneration