

Poly(L-lactide)와 돼지골기질에서 추출 부분정제한 골형성단백을 이용한 조형가능성 골형성유도체의 개발

이종호* · 정종평** · 이승진***

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실*, 치주과**, 이화여자대학교 약학대학***

Abstract

DEVELOPMENT OF MOLDABLE BONE REGENERATING THERAPEUTICS USING PARTIALLY PURIFIED PORCINE BONE MORPHOGENETIC PROTEIN AND BIORESORBABLE POLYMER

Jong-Ho Lee*, Chong-Pyung Chung**, Sung-Jin Lee***

*Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, **Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University,

***Dept. of Industrial Pharmacy, College of Pharmacy, Ehwa Woman's University

The purpose of this study was to develop an osteogenic, biodegradable material using polymer and BMP. It was designed to have structural function and be moldable, for the reconstruction of load bearing areas and deformities of various configurations. Bone apatite was added to Poly(L-lactide)(PLLA) and made porous for osteoconductability and ease of BMP loading. The materials, with or without BMP purified from porcine bone matrix, were evaluated in cranial bone defect models in rats for biocompatibility and bone regeneration capability. The following results were obtained:

The PLLA-BMP material with BMP added to the polymer showed 30% healing of cranial bone defects in rats during the 2 weeks to 3 months period of observation. The moldable PLLA agent without BMP also showed 25% bone healing capacity. Although new bone formation was incomplete in the critical size defect of rat cranium, it can be concluded that the unique moldability of those agents makes them useful for the reconstruction of various bone defects and maxillofacial deformities.

Key words : Bioresorbable polymer, BMP, Bone regenerating therapeutics.

I. 서 론

치과 임상분야, 특히 악안면재건외과 영역에서는 골결손을 적절히 회복시킬 수 있는 생체재료의 필요성을 빈번히 느끼게 된다. 아직까지 신선한 자가골이 대부분의 임상적 상황에서 가장 유용한 재료이지만, 자가 물질은 부가적인 수술이 필요하고 채취할 수 있는 이식체의 양이 한정되어 있다는 단점을 가지고 있다. 더구나 일부의 증례에서는 이식된 조직에 기능적 형태(functional shape)를 부여하고 유지하기가 어렵다는 점이 지적되고 있다. 자가 이식재 대체재로 동종골 이식이 있으나 면역학적으로 숙주와 양립하지 못하여(incompatible) 종종 면역 거부 반응을 일

으키기도 한다. 동종골 이식에 대한 면역학적 반응은 이식편으로의 재혈관화(revascularization)를 지연시킬 뿐만 아니라 골편 생착(segment incorporation)을 현저히 방해하여 결과적으로 이러한 이식골편은 감염되기 쉽고 골결이 잘되며, 비유합(nonunion)되기도 한다^{1,3)}.

오늘날 개발 연구되고 있는 골재생 전략은 다음으로 요약될 수 있다. 첫째 polymer나 ceramics 등의 골전도성이거나 친화성이 있는 이형성재료로서 흡수성 또는 비흡수성 재료들, 둘째, 골형성을 촉진시킬 수 있는 세포 (transplantation of osteopromotive cells), 셋째 골형성을 유도하는 생활성분자(bioactive molecule)를 이용하여 골재생을 시키는 것, 마지막으로 이러한 신기술의 조합을 통한 방법들이다^{4,7)}. 이중 생체분해성 고분자는 다양한 형태로 디자인 하기가 쉽고 생체 내에서 분해되는 아주 매력적인 성질을 갖고 있다. 이러한 특징으로 인해 생체흡수성 재료는 이전부터 봉합사나 조직 결손부 치환체로 사용해 오고 있는데, Poly(alpha-hydroxyl esters)(PHA), Polydioxanone, Poly(ethylene glycol)(PEG), Poly(estere)s, Polyanhydrides, Polyurethane 등이 사용되어 왔다. 이중에서 특히 Poly(DL-lactide)(PLA), Poly(glycolide),

이 종 호

서울시 종로구 연건동 28번지
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jong-Ho Lee

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National Univ.
28, Yungeon-Dong, Chongro-Gu, Seoul, 110-744, Korea

Tel. 02-740-8705, 760-3813 Fax: 02-766-4948

E-mail: leejongh@yahoo.com

*본 연구는 1997년 과학재단 목적기초(특정과제연구: 세부과제명, 조형가능성고분자제제와 골형성단백질을 이용한 악골결손 재건) 연구비의 지원으로 시행되었으며, 본 내용의 일부는 1998년 11월 대한악안면성형재건외과학회 학술대회에서 발표되었음.

Poly(lactide/glycolide)(PLGA) copolymer 등의 Poly(alpha-hydroxy esters)가 가장 많이 연구되어졌는데⁸⁾, 이들은 1) 골모세포가 자라 골을 형성시킬 수 있는 적절한 3차원적 구조를 가지고 있는 골격 형태(scaffold)로 작용하며, 2) 골이 침착됨에 따라 생분해되어 원하는 공간을 골조직으로 치환시킬 수 있는 역할을 할 수 있다. 이러한 목적으로 많은 연구가 진행되었지만 고분자 단독으로 임상에 적용되기에는 골형성 면이나 이물 반응 면에서 완전히 긍정적인 평가를 받지는 못하였다. 폴리머의 이러한 단점을 보완하기 위해 골세포(osteocyte)나 골모세포(osteoblast) 등 골형성촉진 세포(osteopromotive cell)를 Polyglycolic acid(PGA) 등의 기질에 배양하여 신생골 조직을 만드는 방법이나 골재생능이 있는 성장인자의 전달체로 폴리머의 적용이 시도되었다^{9,10)}.

본 연구는 악골 등 외력이 가해지는 부위와 외관적으로 해부학적 재건 뿐만 아니라 다양한 형태의 결손을 원하는 형태로 재건할 수 있도록 폴리머와 골형성단백을 이용하여 구조적 기능(structural function)을 가지고 있으면서 조형 가능한 골형성능을 갖는 생분해성 재제를 개발코자 하였다. 핀¹¹⁾, 스크류¹²⁾, 골고정판¹³⁾ 등으로 이미 많이 연구되고 현재 임상에 적용되고 있으면서 기계적 강도가 Poly(alpha-esters) 중 비교적 강한 Poly(L-lactide)(PLLA)에서 골형성단백을 함유시키기 용이하고 골전도성을 높일 수 있도록 인회석 성분의 bone apatite를 넣고 다공성을 부여하여 수술 시 골형성단백을 적절히 적용 가능토록 한 재제를 만드는 방법을 모색하였으며, 백서 두개골 결손 모델을 이용하여 골형성단백을 부과한 PLLA와 부과하지 않은 PLLA 각각에서 이물반응 등의 생체적합성과 골재생 능력을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 돼지 골기질을 이용한 골형성단백 추출 부분 정제법

돼지 골기질을 이용하여 채 등¹⁴⁾의 방법대로 골형성단백을 추출 부분 정제하였으며, 그 방법을 간략히 설명하면 다음과 같다. 먼저 신선 돼지 사지골을 이용하여 피질골 분말을 형성하고, 탈지 및 탈회한 후 동결건조하여 골기질젤라틴을 만들었다. 이 골기질을 0.1M Tris-HCl + 0.01M EDTA + 5mM NEM(N-ethylmaleimide) + 5mM Iodoacetic acid 용액으로 처리하여 endogenous protease를 억제시킨 후 guanidine 용액(4M Gu-HCl, 0.1M Tris-HCl, 0.01M EDTA, 5mM NEM, 5mM IAA, 2mM PMSF)으로 단백질을 추출, 투석하였으며, heparine-sepharose CL-6B와 Sephacryl S-200HR로 더욱 fractionation 하여 BMP를 부분정제하였다.

2. PLLA 임프란트 제작

다공성의 골격을 Francis¹⁷⁾의 방법에 기초하여 inversion process를 이용해 만들었다. 약 15~30mg의 저분자량 PLLA를 methylene chloride에 녹이고, 여기에 low-temperature plasma ashing 방법¹⁸⁾으로 만든 bone apatite 35mg을 넣은 다음 4도씨에서 10분간 초음파 처리하여 bone crystal을 폴리머 용액에 골고루 잘 분산시켰다. 여

기에 porogen으로서 urea 115mg을 넣고 차가운 isoprophyl 10ml을 넣어 원하는 형태의 몰드(두께 1.5mm, 직경 8mm)에 넣고 응고 시켜 백서 두개골 결손부에 맞게 원판 형태의 이식체를 만들었다. 그리고 methanol에 넣고 dessicator에 위치시킨 후 urea를 녹여 내 porosity를 부여하였다. Urea를 충분히 제거한 후 무수 에탄올과 85% 에탄올에 세척하여 잔유 methanol을 제거하였으며, PLLA 원판에 BMP 2mg이 함유된 PBS 2 cc를 흡수시키고 동결건조시켰다. 이렇게 만들어진 PLLA-BMP와 PLLA를 자외선으로 소독한 후 동물 실험에 사용하였다.

3. 동물 수술

실험 동물로 350g 내외의 웅성 백서(Sprague Dawley) 36마리(실험군, PLLA-BMP 이식군 12마리; 대조군, PLLA 이식군 12마리)를 사용하였으며, 물과 인공 사료로 사육하였다. 각 동물군을 xylazine (Rompun[®], 한국바이엘)과 케타민 (Ketalar[®], 유한양행) 혼합액으로 마취하였다(Rompun[®] 0.2ml + Ketalar[®] 0.8ml, 용량 0.1ml/100g, 복강내 주사). 두정부 피부절개를 시행하고 두개골을 노출시킨 다음, 수술용 엔진과 드릴을 사용하여 직경 8mm 크기의 원형으로 두개골 결손을 만들었다. 각기 12개씩의 두개골 결손부에 미리 준비 보관하고 있던 PLLA-BMP 그리고 PLLA를 이식하였다. 수술이 끝난 다음 창상을 층별로 봉합하였으며, 술후 항생제는 사용하지 않았다.

4. 조직학적 관찰

술 후 2주, 한달, 석달째 각 실험군의 동물을 4마리씩 희생시키고 채취된 골편을 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 탈회후 파라핀 블록을 형성하여 5 μ m의 두께로 박절하였으며, 헤마톡시린/에오신, toluidine blue 또는 Safranin-O로 염색하여 신생골 형성, 골 결손부 치유 정도 및 이물반응 등을 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 결 과

저자들이 돼지골기질에서 추출한 골형성단백은 SDS-PAGE에서 18KDa 정도에서 강한 분획을 가지고 있었다. 백서 사지골로부터 만들어진 불활성화 골기질(Inactivated Bone Matrix: IBM)을 운반체로 하여 BMP(20mg IBM + 2mg BMP)를 백서의 사두근낭(quadriceps muscle pouch)에 이식하여 골형성능을 확인한 결과 매식후 20일째 채취된 조직 표본에서 연골과 초기 골형성이 관찰되어 우골에서 추출한 BMP가 골형성능을 가지고 있음을 확인하였다.^{19,20)}

백서 두개골에 매식한 PLLA-BMP는 2주째에는 단지 표면에만 침식되어 disintegration 되었을 뿐 임프란트 원래의 형태를 잘 유지하고 있었다. 경막을 따라 부분적으로 신생골 형성이 관찰되었고, 두피 쪽은 신생골이 아닌 증식성 섬유조직으로 덮여 있었다. 매식체 main bulk가 host tissue로부터 침투되지 않은 관계로

이물반응은 그리 심하지 않았다. 한달째의 군들에서 골형성이 다소 진행되어 있었으며, 연골세포들도 관찰되었다(Fig. 1). 임프란트는 부분적으로 흡수되어 있었으며, 이물반응도 관찰되었다. 석달째에는 한달째 군에 비해 골형성 정도가 다소 진행되어 골

이 개조되어 있었으나 골 치유정도는 미미하였다. Bone apatite 및 임프란트가 일부 흡수되어 있었고, 이물반응도 한달째에 비해서는 다소 경미한 것 처럼 보였다(Fig. 2).

PLLA만을 매식한 경우는 섬유성 조직이 임프란트 내에 흩어져

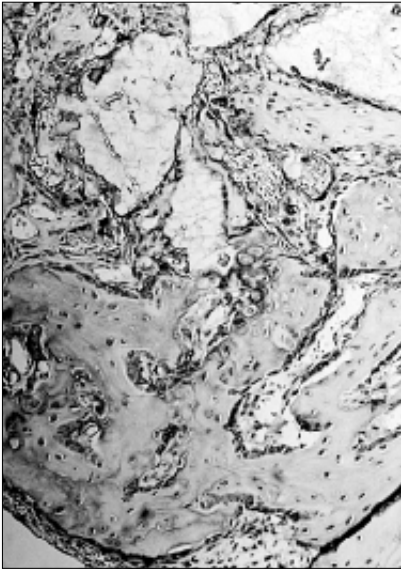


Fig. 1. Photomicrograph of PLLA-BMP, 1 month post-implantation to the rat calvarial critical size defect. Definite bone regeneration can be observed, but new bone formation is confined to the dural side, not the whole area of implant. Note the cluster of chondrocyte-like cells along the newly formed bone (Safranin O stain, Original Magnification $\times 100$)

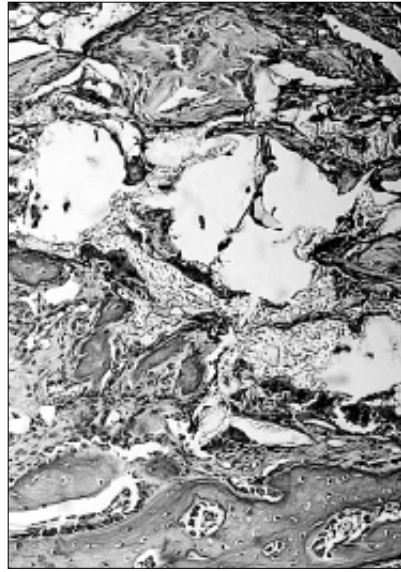


Fig. 2. Photomicrograph showing bone regeneration along part of the implant(PLLA-BMP) and dura(3 months after implantation). The remnants of polymer with bone apatite are still visible and surrounded with multiple giant cells (Safranin O stain, Original Magnification $\times 100$).



Fig. 3. Photomicrograph of PLLA, 1 month post-implantation to the rat calvarial critical size defect. There's some area of new bone formation. The implant was partially resorbed and is surrounded and infiltrated with fibrotic tissue and multinuclear giant cells. (Hematoxyline & Eosin stain, Original Magnification $\times 100$).

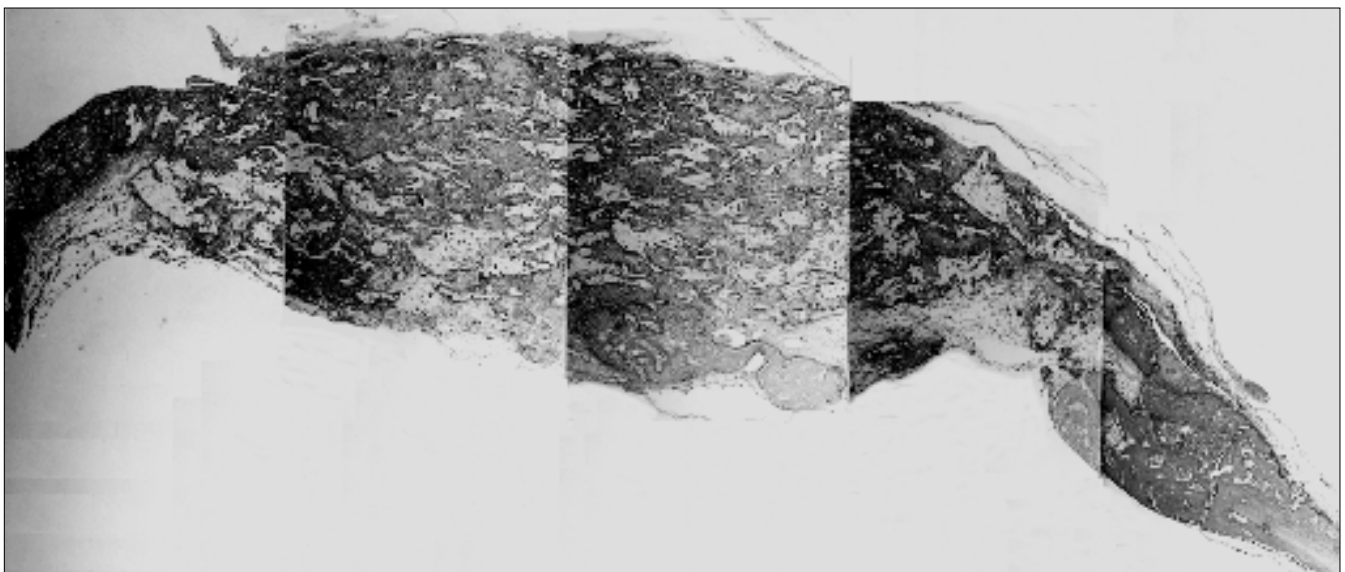


Fig. 4. Rearranged photomicrographs of PLLA, 3 months post-implantation to the rat calvarial critical size defect. Newly formed bone can be observed, but is confined to the small part of implant. The implant still retains its original shape with infiltration of fibrotic tissue and multinuclear giant cells. (Hematoxyline & Eosin stain, Original Magnification $\times 40$).

있었으며, 실험 전 기간에서 부분적인 골형성이 관찰되었다(Fig. 3). 이물반응은 PLLA-BMP 군과 유사하거나 다소 증가된 양상이었으며, 석달째가 되어도 임프란트의 main bulk는 남아 있었으며

일부만이 흡수되었다(Fig. 4). 상기의 관찰 사항을 골형성정도, 염증반응과 이물반응 그리고 매식체의 흡수 정도를 지수화하여 표시하였을 때 Table 1로 요약되었다.

Table 1. Comparison of PLLA-BMP and PLLA using various histologic parameters

	PLLA-BMP			PLLA		
	2 weeks	1 month	3 months	2 weeks	1 month	3 months
Bone Formation Index	0.75	1.75	1.5	0.5	1	1.25
Functional Bone Marrow	0	0.5	0.75	0	0.5	0.5
Cartilage Formation	0.5	0.75	0.25	0	0	0
Inflammatory Reaction	0.25	0	0	0.25	0	0
Foreign Body Reaction	1	2.5	2	2	2	2.25
Implant Resorption	1	2	2	1	2	2
Area of Fibrous Tissue	1.5	1.5	1.75	1.5	1.5	2

PLLA-BMP: Poly(lactic acid) disk with bone apatite and bone morphogenetic protein

PLLA : Poly(lactic acid) disk only with bone apatite

Regenerated bone quality and quantity

1. Bone formation index

- “0” Bone formation not observed
- “1” Small bone nodule or isolated bone particle
- “2” Notable bone formation at either outer or inner side, extending up to 1/3 of the original defect length
- “3” Notable bone formation at either outer or inner side, extending 1/3 to 2/3 of the original defect length
- “4” Notable bone formation at either outer or inner side, extending 2/3 to total length of the original defect
- “5” Complete healing

2. Functional bone marrow

- “0” absent
- “1” observable
- “2” well developed

3. Cartilage formed

- “0” absent
- “1” focally present

Degree of Inflammation or Foreign Body Reaction

1. Inflammatory Reaction

- “0” absent
- “1” mild
- “2” moderate
- “3” severe

2. Foreign Body Reaction

- “0” absent , foreign body giant cell(FGC) not detectable
- “1” mild
- “2” moderate
- “3” severe

Implant resorption and Fibrous tissue area score

1. Implant resorption

- “0” maintain original form
- “1” partially resorbed, but some area of it is intact
- “2” partially resorbed with penetration of fibrotic tissue through the implant
- “3” advanced resorption

2. Fibrous tissue area score

- “0” very few
- “1” slight
- “2” moderate
- “3” abundant

IV. 총괄

본 연구를 시작 할 때 폴리머 운반체로 처음에는 분자량 300,000의 Poly(L-lactide) (Polyscience Inc. USA)를 염화메틸렌과 에틸아세테이트의 혼합 용매에 녹인 용액에 water phase BMP suspension을 가하고 w/o emulsifying하고 원하는 형태대로 주조(casting)하는 방법을 시도하였다. 그러나 본 연구에 사용된 BMP가 순도가 높지 않은 조잡(crude)한 형태이고 또한 비교원성단백(non-collagenous protein)이 많이 함유되어 물에 녹지 않는 관계로 수용성인 유전자재조합 형태의 골형성단백과는 달리 운반체 내에 골고루 단백을 함유(load)시키는 데 문제가 있다고 판단되었다. 또한 PLLA의 분자량이 높아 생흡수 정도가 골형성단백을 적절히 유리시키기에는 그 속도가 느렸으며, 이 정도의 유리에 골형성능을 보이기에서는 부분정제 골형성단백의 bone yielding efficacy가 낮았다. 따라서, 저자들은 생분해가 좀 더 빨리 일어나고 운반체 자체의 골전도성도 높이는 방법을 모색하게 되었다.

저자들이 사용한 PLLA와 동일한 광학적 구조는 아니지만 Poly(D, L-lactide)(PLA)를 crude BMP 운반체로 사용한 실험이 Heckman 등²⁰에 의해 보고된 바 있는데, 그들은 개의 골기질에서 구아니딘으로 추출한 crude BMP 1.5 또는 15mg을 PLA에 클로로포름으로 같이 녹인 후 BMP를 분산(disperse)시켜 co-polymerization 시킨 다음, 개의 radial diaphyseal non-union model에 적용하여 양호한 골형성을 경험하여 적절히 추출된 골형성단백은 운반체로 IBM이 아닌 폴리머에서도 골형성이 일어남을 보고하였다. 이 논문에서 그들이 사용한 PLA의 분자량은 알 수 없었으나, 12주의 관찰 기간에서 골형성단백 15mg을 사용한 군에서 골형성이 월등히 높았음을 보고하였다. Miyamoto 등²¹은 murine osteosarcoma에서 구아니딘으로 추출하고 gel column으로 부분정제한 골형성단백(4mg)의 운반체로 다양한 분자량의 PLA homopolymer를 조사하였는데, 단지 분자량 650 만이 골을 형성하였으며, 고체 펠렛(solid pellet) 형태의 105,000, 21,000, 3,300 분자량의 PLA는 골형성을 유도하지 못하였는데, 그 이유는 PLA의 물리적 성질(physical property)과 염증반응 때문일 것으로 결론지었다. 그리고 골형성이 유도된 50의 분자량에서는 이보다 큰 분자량에서 보다 염증 반응이 미약함이 관찰되었으나, 흡수가 너무 빠르고 저분자량의 특성상 산성 성질로 인해 왕성한 골형성이 되지 않았다고 추측하였다. Lovell 등²²도 crude BMP를 함유시킨 락톤 형태의 PLA로 개의 spinal fusion augmentation에 적용하여 대조군 보다 양호한 골형성을 보아 PLA의 BMP 운반체로서의 가능성을 제시하였으나, PLA 폴리머가 fusion 부위에서 흡수되지 않고 부분적으로 남아 있어 신속하게 분해되는 운반체계(rapidly degradable delivery system)를 사용할 것을 추천하였다. 이와 같이 적절히 변형이 되지 않은 PHA는 골형성단백의 운반체로 적절하지 않을 가능성이 많으며, 결국은 콜라겐과 유사한 구조의 matrix를 갖게끔 폴리머를 변형시켜야 이상적인 폴리머 운반체가 될 것으로 Hollinger와 Leong²⁴이 주장한 바 있다.

본 연구에서는 임프란트의 성질로 두가지 측면이 요구되었는데, 하나는 골형성단백 운반체로 흡수가 빨라야 하며 또 하나는

악골 결손 등 외력이 가해질 수 있는 곳에 적용 가능하게 적절한 외력을 갖는 것 두가지 다소 상반된 성질이 필요하였다. 전자를 위해서는 가능하면 저분자량의 결정도가 높지 않은 PLLA가 좋으나, 후자를 위해서는 결정이 치밀하고 분자량이 높은 PLLA가 필요하였다. 따라서 분자량은 가능하면 큰 것을 사용하면서도 생분해 속도를 높이는 방법을 모색하게 되었다. PHA 분해(degradation)의 첫 phase로서 운반체의 water interaction이 non-specific hydrolysis에 중요하다. 따라서 조직액(tissue fluid)의 접촉과 상호 반응을 최고화 하기 위해서는 표면적(surface area)을 많게 할 필요가 있는데, 이를 위해 운반체의 빈 공간(void volume)을 높여 다공성을 부여하는 구조적 변화(dimensional change)가 중요하게 된다.

폴리머에 다공성을 부여하는 방법으로는 Agrawal 등²³이 사용한 방법과 같이 폴리머를 acetone과 같은 용매에 녹여 겔 형태로 만들고 이것을 다시 용매 교환법(solvent exchange)으로 5~20 μ m의 기포를 형성하는 방법이 있다. 이 방법은 40도 이하의 저온을 사용하는 이점이 있으며, 또한 골형성단백을 파우더 형태로 아세톤에 녹인 폴리머 용액에 넣어 실온에서 저어줌으로 골고루 임프란트 내에 분산시킬 수 있는 이점이 있다. 그러나 이 방법은 두가지 면에서 단점이 있다고 할 수 있다. 하나는 기포의 크기가 osteon(223micrometer)에 비해 상당히 작다는 점이다. 그리고 미리 섞어 co-polymerization 시킨 골형성단백이 polymer crystallization 시 핵(seed)으로 작용하여 결정부위(crystalline site)를 증가시켜 분해 속도(degradation rate)를 늦출 수 있다^{26,27}. Robinson 등²⁸은 bulk D, L-PLA를 갈아서 작은 분말(microparticle)로 만들어 폴리머의 glass-transition temperature 이상으로 sintering하면서 압력을 가해 원하는 형태의 그리고 다양한 크기의 기포를 (≤ 100 , ≤ 200 , $\leq 350\mu$ m) 부여하였다. 이 방법은 폴리머의 입자 크기 조절을 통해 기포 크기를 조절할 수 있는 이점이 있으나, 폴리머 입자를 녹여 붙이기 위해서는 glass-transition temperature 이상으로 가열하여야 하므로 골형성단백 등 열에 약한 인자들에서는 사용하기 어렵다. 물론 골형성단백을 임프란트를 완전히 제작한 후에 흡수시켜 사용할 수 있는 방법은 있지만, co-polymerization에는 문제점이 있다. 그리고 수상과 유상의 두 분리된 phase emulsion 기법으로 폴리머를 만들어 굳히고 동결건조하여 물이 차지하고 있던 공간에 기포가 생기게끔 하거나, 저자들이 처음에 사용하였던 염화메틸렌과 에틸아세테이트의 혼합 용매에 녹인 용액에 water phase BMP suspension을 가하고 w/o emulsifying하고 용매와 수분을 증발(evaporate)시켜 기포도 만들고 골형성단백도 함입시키는 방법이 있다. 이 방법도 기포의 크기가 그리 크지 않아 osteon 만큼 충분히 되게끔 하기가 쉽지 않다는 단점이 있다¹⁹.

저자들은 이상의 방법들의 단점으로 인해 원하는 크기의 기포의 우레아를 폴리머 용액에 넣고 다시 우레아를 녹여서 제거하는 방법을 사용하였다. 이 방법은 골형성단백 등 열에 민감한 물질을 같이 co-polymerization 시킬 수 있는 저온을 사용한다는 점과 기포의 크기를 임의로 조절할 수 있다는 점 등의 큰 이점이 있었다. 저자들은 약 200 μ m 크기의 우레아로 그에 상응하는 기포를 얻었는데, 더 큰 기포를 원할 경우는 더 큰 크기의 입자를 사

용하면 된다. 그리고 이 방법은 골형성단백 외에도 원하는 성분 즉 저자들은 인회석을 추가하였는데, 이러한 것들을 얼마든지 쉽게 병합할 수 있다는 점이다. 그러나 이 방법 역시 잠재적인 문제점이 따르는데, 기포 형성을 위해 넣은 우레아가 완전히 제거 되지 않았을 경우에는 조직에 악영향을 미칠 수 있을 것으로 생각되었다. 물론 메탄올을 사용하여 수차에 걸쳐 충분히 우레아를 제거하였다고 생각되었으나, 혹시 잔존하더라도 조직에 유해하지 않으면서 골형성에 도움이 되는 물질로 바꾸는 방법도 고려해 볼만 하다고 사료되었다. 본 연구에서 만들어진 다공성의 폴리머에서 기포의 크기는 원하는 대로 얻을 수 있었으나, 다양한 크기의 다공성으로 폴리머의 생체 내에서 그 흡수 정도를 미리 파악하지 않은 점 그리고 골형성단백의 유리 형태(release profile)를 미리 확인해 보지 않은 점 등이 아쉬웠다.

다공성 구조는 폴리머 흡수와 골형성단백을 함유 또는 유리 (loading 및 release) 시키는데 절대적으로 필요한 삼차원적인 구조이지만, 이러한 matrix 구조는 당연히 골전도를 향상시키게 된다. 다공성 정도의 차이로 인해 치밀골보다 망상골 이식에서 조직 침투가 신속히 일어나서 신생골이 빨리 형성됨이 알려져 있는데, 골전도성의 물질 주위의 높은 $CaPO_4$ 농도 역시 골전도에 도움이 된다. 저자들은 이러한 목적으로 인회석 분말을 폴리머 내에 같이 co-polymerization 시켰는데, 이 결정 입자는 이식체 내에서 파골세포성 흡수를 촉진시키며, 이러한 흡수는 조골세포성 신생골 형성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다²⁹. 저자들은 다공성을 높이고, 인회석을 첨가하여 골 친화력을 높인 PLLA에서 약 20%의 골 치유를 관찰하였는데, 그 정도가 임상에 적용하기에는 미미하더라도 다소의 골전도성을 관찰할 수 있어 이러한 면에서 상당히 개선된 형태라 생각되었다.

본 연구에 사용한 다공성의 PLLA 임프란트는 초기에는 염증성 반응이 관찰 되었으나 한달 이후에는 관찰 되지 않았다. 일반적으로 저분자량의 PLA(6500 mol.wt)는 초기에 분해되어 심한 삼출성 염증 반응을 일으키는데 반해, 고분자량(28000 mol wt.)은 섬유아세포와 foreign body giant cell에 둘러 싸여 비교적 낮은 (mild) 조직 반응을 일으킨다³⁰. 일반적으로 폴리머 등을 매식하게 되면 자연치유 현상의 결과로 염증 반응이 일어나게 마련인데, 이것은 곧 앓은 섬유성 막으로 둘러싸이게 된다³¹. 이러한 반응은 골형성단백이 미분화간엽세포(undifferentiated mesenchymal cell)와의 접촉을 막으므로 그의 활성화를 차단하는 결과를 가져 오게 된다. 시간이 경과 함에 따라 거대세포 등 이물반응세포의 침윤이 많아졌는데, 이것은 일반적인 생흡수성 물질의 2-phase degradation 현상의 결과이다. PLLA는 매식후 hydrolysis에 의해 긴 폴리머 체인이 짧게 끊어지게 되어 전반적으로 분자량이 감소하게 되고 임프란트가 integrate를 잃어 분절(fragmentation)되게 된다. 이렇게 되면 대식세포들이 침윤되어 떨어져 나온 폴리머 입자(fragment)를 탐식하여 물과 이산화탄소로 분해하게 된다. 엄밀한 의미에서 PLLA가 생체 친화적이라고 하기 위해서는 이물 반응 없이 수화 분해되어야 하지만 아직까지 이러한 수준의 재료는 개발되지 않았다.

PLLA의 흡수는 PGA나 PLGA 또는 Polydioxanone 보다 훨씬 오

래 걸리는데, 5년 이상 걸리는 경우도 있다. 더구나 폴리머가 분해됨에 따라 발생한 고결정 잔해(highly crystalline debris)는 피하 부종(subcutaneous swelling)을 야기하거나 임프란트 주위의 pH를 감소시켜 뼈를 용해시키거나(osteolysis) 조직 독성을 야기시킬 수 있는 것으로 알려져 있다³². 우리가 제작한 임프란트는 약 3개월의 기간에서 1/3 ~ 1/2 정도의 흡수를 나타내 흡수 시간을 상당히 단축시켰으며 또한 염증 반응은 단지 매식에 따른 염증성 반응이었을 뿐, 이물 반응 이외에 조직 괴사나 다른 독성반응(toxic response)은 관찰되지 않았다.

Saitoh 등³³은 PLA(10,600 mol. wt.)와 탈회골분말(demineralized bone: DB)을 같이 섞었을 때 골형성에 부정적인 효과(negative effect) 없이 골분말 격자 틈 사이로 매식 후 2주째에 신생골 형성이 되는 것을 관찰하여 골형성단백의 운반체로 PLA가 사용될 수 있음을 보고하였다. 이후 유전자재조합 골형성단백이나 분리 정제한 골형성단백과 폴리머를 이용한 골치유 연구가 많이 시행되었으며 다양한 결과들이 보고되었다. 유전자재조합 등 조직 기술의 발달로 rhBMP-1에서 -15까지 이미 나와 있으나, Besso 등³⁹은 분리 정제 골형성단백이 재조합형태에 비해 연골과 골 유도 능이 5~10배 많은 heterodimer형태이고 또한 rhBMP는 수용성이 아닌 운반체가 적절하지 않을 경우에는 뼈를 형성하는 양이 적다는 단점이 있음을 지적하였다. 저자들의 PLLA 임프란트에 돼지 골기질에서 부분 정제한 골형성단백을 첨가하였을 경우 첨가하지 않은 경우에 비해서 골형성이 우수한 양상이었으나, 그 차이가 명확치 않고 또 사용한 동물의 마리수가 적어 통계적 검증을 하지 못하였다. 비록 PLLA-BMP 및 PLLA의 골재생력이 불활성골 기질을 운반체로 한 골형성단백 보다는 우수하지 못하였으나, 조형 가능하고 또 임프란트 매식체의 형태에 따라 골이 재생되도록 한 결과로 보아 악골을 위시한 다양한 형태의 골결손 재건 성형재로 그 역할을 할 것으로 사료되었으며, 분자량 및 기포의 크기 등 삼차원적인 matrix 구조를 변화시키거나 인회석 대신 골전도성이 더 탁월한 것으로 알려진 천연 또는 인공 수산화인회석을 첨가한 다양한 형태의 임프란트를 조사해 보는 것도 도움이 되리라 생각되었다.

V. 결 론

본 연구는 악골 등 외력이 가해지는 부위와 외관적으로 해부학적 재건 뿐만 아니라 다양한 형태의 결손을 원하는 형태로 재건할 수 있도록 폴리머와 골형성단백을 이용하여 구조적 기능(structural function)을 가지고 있으면서 조형 가능한 골형성능을 갖는 생분해성 재제를 개발코자 하였다. PLLA에 $CaPO_4$ 성분의 bone apatite를 넣고 다공성을 부여하여 결손부의 형태에 맞게 적절히 적용 가능토록 한 재제를 만들었으며, 돼지골기질에서 부분 정제한 골형성단백을 함유시킨 경우와 아닌 경우에서 백서두개골 결손 모델을 이용해 이물반응 등의 생체적합성과 골 재생능력을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

폴리머에 골형성단백을 함유시킨 PLLA-BMP 제제는 백서 두개골 결손부에 매식한 결과, 2주에서 석달간의 관찰 기간에서 백서

두개골 결손부의 약 30%를 치유시켰으며, 골형성단백을 함유시키지 않은 조형가능성 PLLA 제재도 25% 정도의 골치유능을 나타냈다. 비록 백서 critical size defect model에서 신생골 형성이 완전한 정도는 아니었으나, 상기 제재들의 독특한 조형가능성 특성(moldability)을 이용하여 악골 결손 및 골 기형에 적용될 경우 양호한 골 결손 재건 및 성형재가 될 수 있을 것으로 생각되었다.

참고문헌

- Hardin CK: Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am* 27:911, 1994.
- Misch CE, Dietsh F: Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 2:158, 1993.
- Mellonig JT, Prewett AB, Moyer MP: HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol* 63:979, 1992.
- Damien CJ, Parsons JR, Benedict JJ, Weisman DS: Investigation of a hydroxyapatite and calcium sulfate composite supplemented with an osteoinductive factor. *J Biomed Mat Res* 24:639, 1990.
- Urist MR, Lietze A, Dawson E: Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clinic Ortho and Related Res* 187:277, 1984.
- Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, et al: Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 274, 1992.
- Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K: Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 234:250, 1988.
- Thomson RC, Yaszemski MJ, Powers JM, Mikos AG: Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 7:23, 1995.
- Kim WS, Vacanti JP, Cima L, et al: Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers. *Plast & Reconstr Surgery* 94:233, 1994.
- Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, et al: Polylactic acid-polyethylene glycol block copolymer. A new biodegradable synthetic carrier for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 294:333, 1993.
- Kenley R, Marden L, Turek T, Jin L, Ron E, Hollinger JO: Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Biomed Mater Res* 28:1139, 1994.
- Hollinger JO, Schmitz JP: Restoration of bone discontinuities in dogs using a biodegradable implant. *J Oral Maxillofac Surg* 45:594, 1987.
- van der Elst M, Klein CPAT, de Blicke-Hogervorst JM, Patka P, Haarman HJTM: Bone tissue response to biodegradable polymers used for intra medullary fracture fixation: A long-term in vivo study in sheep femora. *Biomaterials* 20:121, 1999.
- Bouwman JPB, Tuinzing DB: Biodegradable osteosynthesis in mandibular advancement: a pilot study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37:6, 1999.
- Haers PE, Sailer HF: Biodegradable self-reinforced poly-L/DL-lactide plates and screws in bimaxillary orthognathic surgery: short term skeletal stability and material related failures. *J Cranio-Maxillofac Surg* 26:363, 1998.
- 채윤필, 이종호, 김수경, 여환호: 우골에서 추출한 골형성단백을 이용한 백서 두개골 결손부 치유에 관한 연구. *대한구강악안면외과학회지* 23: 290, 1997.
- Francis LF (personal commucication).
- Kim H-M, Rey C, Glimcher MJ: Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous method at low temperature. *J Bone Mineral Res* 10:1589, 1995.
- 이종호: 과학재단 중간보고서(미발표).
- 박영욱, 이종호, 김수경: 돼지의 골기질유도골형성단백질의 골유도능에 관한 실험적 연구. *대한악안면성형재건외과학회지* 19:265, 1997.
- Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbott JT: The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J Bone Joint Surg[Am]* 73:750, 1991.
- Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, Yoshikawa H, Hashimoto J, Suzuki S, Ono K: Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 278:274, 1992.
- Lovell TP, Dawson EG, Nilsson OS, Urist MR: Augmentation of spinal fusion with bone morphogenetic protein in dogs. *Clin Orthop* 243:266, 1989.
- Hollinger JO, Leong K: Poly(alpha-hydroxy acids): carriers for bone morphogenetic proteins. *Biomaterials* 17:187, 1996.
- Agrawal CM, Best J, Heckman JD, Boyan BD: Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture non-unions. *Biomaterials* 16:1255, 1995.
- Coombes AGA, Heckman JD: Gel casting of resorbable polymers. 1. processing and applications. *Biomaterials* 13:217, 1992.
- Coombes AGA, Heckman JD: Gel casting of resorbable polymers. 2. in vitro degradation of bone graft substitutes. *Biomaterials* 13:297, 1992.
- Robinson BP, Hollinger JO, Szachowicz EH, Brekke J: Calvarial bone repair with porous D,L-poly lactide. *Otolaryngol Head Neck Surg* 112:707, 1995.
- Cornell CN, Lane JM: Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop* 355S:S267, 1998.
- Saitoh H, Takata T, Nikai H, Shintani H, Hyon SH, Ikada Y: Effect of polylactic acid on osteoinduction of demineralized bone: preliminary study of the usefulness of polylactic acid as a carrier of bone morphogenetic protein. *J Oral Rehabil* 21:431, 1994.
- Pietrzak WS, Sarver DR, Verstynen ML: Bioabsorbable polymer science for the practicing surgeon. *J Craniofac Surg* 8:87, 1997.
- Mainil-Varlet P, Rahn B, Gogolewski S: Long-term in vivo degradation and bone reaction to various polylactides. *Biomaterials* 18:257, 1997.
- Bessho K, Kusumoto K, Fujimura K, Konishi Y, Ogawa Y, Tani Y, Iizuka T: Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37:2, 1999.