

가토 두개골에서 β -TCP와 자가골 이식에 관한 실험적 연구

이성훈 · 송승일** · 한지영 · 황경균 · 백승삼* · 심광섭

한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과, 병리학교실*, 분당제생병원**

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2004;30:282-291)

THE EXPERIMENTAL STUDY OF THE BONE REGENERATION ON β -TCP IN RABBIT CRANIAL BONE

Sung-Hoon Lee, Seung-II Song**, Ji-Young Han, Kyung-Gyun Hwang, Sung-Sam Paik*, Kwang-Sup Shim

Division of Oral & Maxillofacial Surgery, Department Of Dentistry, Department of Pathology, College Of Medicine, Hanyang University, Pundang Jesaeng Hospital***

Pure-phase beta-tricalcium phosphate(β -TCP) proved to be a bone regeneration material, providing the patient with vital bone at the defect site in a reasonable time, making a second surgical procedure for bone harvesting unnecessary. This study compares bone healing and BMP 2/4 expression in cranial defects in rabbits grafted with autogenous bone and β -TCP.

Thirty New Zealand White rabbits was divided into 3 group of 10 animals each. Bilateral calvarial defects were made in the parietal bones of each animal. β -TCP placed in one defect and the other defects was filled with autogenous bone. The animal were sacrificed at 4, 8 and 12 weeks. Immunohistochemical analysis was used to investigate the expression of BMP 2/4.

1. The new bone formation around autogenous bone from 4 weeks and β -TCP from 8 weeks.
2. In autogenous bone graft, BMP 2/4 expression was decreased from 4 to 12 weeks.
3. In β -TCP graft, BMP 4 expression was increased from 8 to 12 weeks. But, BMP 2 was observed from 12 weeks.

This study showed that bone healing, regeneration and, BMP 2/4 expression are delayed in grafted β -TCP than autogenous bone.

Key words : Rabbit, Cranial bone, β -TCP, BMP 2/4, Immunohistochemical analysis

I. 서 론

치아의 결손을 회복하기 위해서 통상의 보철물 대신 인공치아를 식립하여 구강기능을 회복하고 있지만, 상악악골에 위치한 해부학적 구조물은 인공치아의 식립에 상당한 제한을 주게 된다. 치아의 소실에 의한 상악동의 확장, 저작기능 소실로 인한 치조골의 결손, 상악전치부 협착의 급속한 소실등의 변화된 구강환경은 인공치아 식립을 이용한 구강기능의 회복을 어렵게 한다. 변화된 치조골에 정상적인 인공치아를 식립하기 위해서는

골이식을 동반한 외과적 수술을 필요로 한다. 골이식은 골재생능과 생체적합성 및 면역반응에 유리한 자가골을 지금까지 많이 사용해 왔으나, 이식골 채취를 위한 부가적인 수술과 감염 및 이식골의 흡수가 발생할 수 있으므로, 최근에는 자가골 대신 동종골, 이종골 또는 생체 친화성이 우수한 골대체재료를 많이 사용한다^{1,2}. 인공치아를 식립하기 위한 골이식술에 사용되는 골대체재료로 탈회동결건조골, 이종골이 임상에서 사용되어 왔으나, 후천성 면역결핍증후군의 발생, 오염된 혈액과 조직을 통한 전염, 다른 종으로부터 질병의 전염의 위험 가능성이 제기되고 있다. 그래서 최근 생체친화성이 우수한 수산화인회석, 생체유리, 생체도재, polymer 등의 합성 골대체재료가 연구, 개발되고, 실제 임상에서 사용되어지고 있다³.

자가골을 대체할 수 있는 인공 골대체물질로 초기에는 Calcium-sulfate 등이 이용되었으나, 초기에 흡수됨으로 해서 충분한 골의 성장을 유도하지 못하였다. 이후 골과 유사한 구조를 가진 HA, 생체유리, 생체도재로 β -TCP등이 사용하게 되었다. 골 조직의 무기결정은 수산화인회석의 결정구조를 가지고 있으나, 생

황 경 균

133-792, 서울시 성동구 행당동 17

한양대학교 의과대학 구강악안면외과

Kyung-Gyun Hwang

Division of OMFS, Dept. of Dentistry College of Medicine, Hanyang Univ.

#17, Haengdang-Dong, Seongdong-Gu, Seoul, 133-792, Korea

Tel : 82-2-2290-8671, 8676 Fax : 82-2-2290-8678

E-mail : hkg@hanyang.ac.kr

* 이 논문은 2002년 한양대학교 교내연구비 지원으로 연구되었음.

체 내에 존재하는 수산화인회석이나 제삼칼슘인산염 등은 결정의 표면에 존재하는 이온의 구조로 인해서 순수한 수산화인회석과는 달리 반응성이 매우 높다고 보고 된다. 수산화인회석이나 β -tricalcium phosphate는 무균의 인공재료로 혈액이나 조직을 매개체로 하는 감염으로부터 위험성을 제거할 수 있는 인공의 생체친화성 골대체재료이다. β -TCP는 미세기공으로 연결된 생체활성 재료로 HA보다 높은 용해도를 보이며, 다른 calcium phosphate ceramics보다 빠른 흡수를 보이고, 골형성을 촉진하는 한편 용출, 흡수의 과정을 거쳐 자가골로 치환될 수 있고 보고되고 있다. 그래서, 인공치아와 관련된 골이식술을 위한 인공골대체 물질로 최근 사용되어지고 있다⁹.

골형성단백질(BMP)은 골형성유도 물질로서 골속에 내재해 있으면서 태생기 이후 골성장에 따른 골개조에 관여하다가, 골의 외상이나 질병이 발생하면 다른 성장인자와 함께 골형성을 유도한다. BMP는 화학구조적으로 미분화 간엽세포를 골결손부위로 유인하고, 연골전구세포 및 골전구세포로의 분화를 유도하면서 이들 세포의 증식에 관여한다⁸. 최종적으로는 연골모세포 및 골모세포 및 골세포로 분화가 완료되면서 연골내 골화과정을 통해 신생골을 형성한다. 여러 가지 골형성단백질 중 BMP 2/4군은 다른 종류의 골형성단백질과 성장인자 등에 비하여 유전자 서열이 가장 유사하고 생체 및 시험관에서 낮은 농도에서의 골형성능력이 뛰어나 골형성단백질의 골형성 유도를 검증하는 동물실험에서 많이 이용되고 있다^{9,10}.

본 연구는 가토의 두개골 결손부에 자가골과 β -TCP를 이식하여, 골이 치유되는 과정에서 골형성단백질 2/4가 분포하는 세포 및 작용시기, 발현양상을 면역조직화학을 이용하여 관찰하고, β -TCP이 이식시에 골치유과정을 자가골과 비교 평가하여, 인공치아를 위한 골이식재료로 β -TCP의 임상적 가능성을 알아보고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 동일 조건하에서 사육된 체중 약 3.0kg(15주)내외의 NEW ZEALAND 가토 30마리를 사용하였다.

2. 수술방법

염산케타민(ketamine[®] HCl,유한양행) 1cc와 xylazine(Rumpun[®], 한국바이엘) 1cc를 근육 주사하여 마취를 유도하였다. 가토 두정부를 삭모하고 베타딘으로 소독하였다. 수술 중 지혈을 목적으로 1:10만 에피네프린이 함유된 2% 리도케인을 수술 부위에 주사한다. 두개 정중부에 절개선을 주어 두개골의 봉합부를 노출시켰다. 골막하박리는 양쪽 안와상연까지 골막에 손상을 주지않게 시행하였다. 노출된 두개골에 봉합선을 피하여 뇌경막에 손상을 주지 않도록 조심하면서, 직경 15mm의 원형결손부를 두 곳에 형성하였다. 골결손부의 한쪽은 자가골이식을 시행하였고,

반대측 골결손부는 β -TCP(Cerasorb[®], Curasan) 단독으로 이식을 시행하였다(Fig. 1, 2). 골막은 4-0catgut으로 피부는 3-0silk로 봉합한다. 수술 후 당일과 2일까지 감염 예방을 목적으로 겐타마이신(Gentamycin[®], 동화약품) 2cc를 근주하였다.

3. 조직학적 관찰

각 군을 실험 후 4, 8, 12주 간격으로 각각 10마리 희생하여, 고정은 4% paraformaldehyde로 시행하고, 탈회는 0.1M 인산완충용액으로 30분간 수세하여 0.1M 인산완충용액에 희석시킨 10% EDTA로 4°C에서 10일간 탈회하였다. Hematoxyline & Eosin으로 염색하고 광학 현미경으로 검경하였다.

4. 면역조직화학적 관찰

면역조직화학 염색과 슬라이드 제작을 위하여 streptavidin-biotin법을 이용하였다. 먼저 박절편을 xylene으로 탈과라핀하고 각 단계의 알콜을 거쳐 함수시켰다. 증류수로 3회 세척한 후 전처리로 0.01M sodium citrate buffer(pH 6.0)용액에 담근상태에서 microwave 로 5분씩 2회 처리하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 억제시키기 위하여 3% 과산화 수소수용액으로 10분간 처리한 후 증류수와 phosphate buffer solution(PBS)로 세척하였다. DAKO LSABkit(DAKO[®], California, U.S.A.)의 blocking 시약으로 20분간 부란(incubation)시켜 비특이적 IgG 결합을 방지하였다. 그리고 상온에서 각각 BMP 2/4의 일차 항체로 1시간이상 부란한 뒤 PBS로 3회 세척하였다. BMP 2/4에 대한 일차 항체로는 polyclonal goat anti-BMP 2/4 antibodies (SantaCruz[®], California, U.S.A.)를 각각 50:1로 희석하여 사용하였다. 이 후 biotin이 표지된 이차항체로 15분간 부란한 후 PBS로 3회 세척하였다. Peroxidase가 표지된 streptavidin으로 15분간 부란시키고 PBS로 충분히 세척하였다. 조직은 갈색의 DAB (3,3-diaminobenzidine)로 5분간 발색시킨 후 증류수로 충분히 세척하였고 Meyer's hematoxyline으로 대조염색한 후 permount로 봉입하였다.

III. 연구 결과

1. 조직학적 관찰

1) 자가골이식군

(1) 4주 : 이식골 주위로 신생골의 생성이 관찰되며, 신생골의 주위로 조골세포와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 이식골 주변으로 다수의 핵을 가진 식세포(phagocyte)들의 활성이 관찰되었다(Fig. 3).

(2) 8주 : 이식골 주위로 신생골의 생성이 많이 관찰되며, 신생골의 주위로 조골세포와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 이식골은 대부분 신생골로 둘러싸여 있으며, 식세포(phagocyte)들의 활성은 관찰되지 않았다(Fig. 4).

(3) 12주 : 이식골 주위로 많은 신생골의 생성이 관찰되어, 이식골은 완전히 신생골로 둘러싸여 있는 것이 관찰되었다. 하지만, 신생골 주위의 조골세포들의 활성을 보이지 않고, 전체적으로는 신생골의 생성보다는 골개조현상이 일어난 것으로 관찰되었다(Fig. 5).

2) β -TCP 이식군

- (1) 4주 : 이식된 β -TCP주변으로 많은 다수의 핵을 가진 식세포(phagocyte)들의 활성이 관찰되고, 이들 주변으로 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 골변연부의 β -TCP외에는 신생골의 생성은 관찰되지 않았다(Fig. 6).
- (2) 8주 : 이식된 β -TCP주변으로 신생골의 생성이 일어나며, 신생골의 주위로 조골세포와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 다수의 핵을 가진 식세포(phagocyte)들의 활성은 β -TCP주변으로 관찰되었다(Fig. 7).
- (3) 12주 : 이식된 β -TCP주변으로 왕성한 신생골의 형성이 관찰되어, 이식된 β -TCP를 완전히 둘러싸는 신생골이 서로 연결된 것이 관찰되었다. β -TCP주변으로 간간이 다수의 핵을 가진 phagocyte가 관찰되었다. 일부 β -TCP는 흡수되어 작은 크기로 관찰되고, 신생골의 주변으로는 활성화된 조골세포와 혈관이 많은 결체조직들이 관찰되었다(Fig. 8).

2. 면역조직화학적 관찰

총 30개의 표본에서 BMP 2/4의 활성을 관찰하여 다음과 같은 발현양상을 관찰하였다. BMP 2/4의 발현은 주로 신생골 주변의 조골세포에서 발현되었고, 섬유아세포에는 일부에서 발현되는 양상을 보였다(Table 1, 2).

1) 자가골 이식군

- (1) 4주 : 이식골 주변의 조골세포에서 높은 BMP 4의 활성이 관찰되었으며, 일부의 섬유아세포의 핵에서도 BMP 4의 활성이 관찰되었다(Fig. 9). BMP 2의 발현은 주로 조골세포에서 관찰되었다(Fig. 10).
- (2) 8주 : 이식골 주변의 조골세포에서 높은 BMP 4의 활성이 관찰되었으나, 4주에서 보다는 활성이 전체적으로 떨어지는 것이 관찰되었다. 섬유아세포에서의 활성도는 4주와 별다른 차이가 없었다(Fig. 11). BMP 2의 발현도 주로 조골세포에서 관찰되었고, 4주보다 발현도 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 12).
- (3) 12주 : 이식골 주변의 조골세포의 수와 BMP 2/4의 활성이 현저하게 줄어든 양상이 관찰되었다(Fig. 13, 14).

Table 1. Immunohistochemical study on BMP-2 expression

		Autogenous bone graft			β -TCP graft		
		4 weeks	8weeks	12weeks	4 weeks	8weeks	12 weeks
Sample 1	Osteoblast	++	++	-	-	-	-
	Fibroblast	-	-	-	-	-	-
Sample 2	Osteoblast	++	++	+	-	+++	-
	Fibroblast	-	-	-	-	-	-
Sample 3	Osteoblast	++	+	+	-	-	-
	Fibroblast	-	-	-	-	-	-
Sample 4	Osteoblast	++	-	-	-	-	-
	Fibroblast	-	-	-	-	-	-
Sample 5	Osteoblast	++	++	+	-	-	+
	Fibroblast	-	-	-	-	-	-
Sample 6	Osteoblast	++	-	+	-	-	+
	Fibroblast	-	-	-	-	-	-
Sample 7	Osteoblast	+	++	+	-	-	+
	Fibroblast	-	-	-	-	-	-
Sample 8	Osteoblast	+	+	-	-	-	+
	Fibroblast	-	-	-	-	-	-
Sample 9	Osteoblast	-	++	-	-	+	+
	Fibroblast	-	-	-	-	-	-
Sample 10	Osteoblast	+++	-	+	-	-	++
	Fibroblast	-	-	-	-	-	-

Positive was graded on a scale, with - representing no staining, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 2. Immunohistochemical study on BMP-4 expression

		Autogenous bone graft			β -TCP graft		
		4 weeks	8weeks	12weeks	4 weeks	8weeks	12 weeks
Sample 1	Osteoblast	+++	+++	+	+	++	+++
	Fibroblast	+	++	-	+	-	-
Sample 2	Osteoblast	++	+++	+++	-	+++	+++
	Fibroblast	+	+	+	+	-	+
Sample 3	Osteoblast	+++	++	++	-	+	+
	Fibroblast	+	+	-	+	-	-
Sample 4	Osteoblast	+++	+	+	-	++	++
	Fibroblast	++	+	+	-	+	+
Sample 5	Osteoblast	+	+++	+	-	+	+
	Fibroblast	+	+	+	-	+	-
Sample 6	Osteoblast	+++	+	+	+	+	+++
	Fibroblast	-	-	-	+	++	+
Sample 7	Osteoblast	++	+++	+	-	++	+++
	Fibroblast	+	+	-	-	+	+
Sample 8	Osteoblast	+	++	+	-	-	++
	Fibroblast	+	-	-	-	-	-
Sample 9	Osteoblast	+++	++	+	-	+	+++
	Fibroblast	++	+	-	+	-	++
Sample 10	Osteoblast	+++	+	+	-	+	++
	Fibroblast	-	+	-	-	-	-

Positive was graded on a scale, with - representing no staining, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

2) β -TCP 이식군

- (1) 4주 : β -TCP 주변과 섬유아세포에서의 BMP 2/4의 활성은 관찰되지 않았다(Fig. 15, 16).
- (2) 8주 : β -TCP주변의 조골세포에서의 BMP 4의 활성이 증가하는 것이 관찰되었고, 섬유아세포에서의 활성은 4주와 별다른 증가를 보여주지 못하였다(Fig. 17). BMP 2는 조골세포와 섬유아세포에서 발현이 미약하였다(Fig. 18).
- (3) 12주 : β -TCP주변의 조골세포에서의 BMP 4의 활성이 매우 증가하는 것이 관찰 되었고, 섬유아세포에서의 활성은 4주에 비해 별다른 증가를 보여주지 못 하였다(Fig. 19). BMP 2는 조골세포에서 발현이 약간 증가하는 양상을 보였다(Fig. 20).

IV. 총괄 및 고찰

인공치아를 식립하기 위한 골이식재료로 가장 널리 사용되고 있는 것이 자가골이다. 자가골 이식이 다른 종류의 골이식에 비해 이식편에 살아있는 조골세포 및 전구조골간엽세포가 많아 골형성기전에 의해 치유가 되고, 면역학적 거부반응이나 질환의 전파의 우려가 없다. 하지만, 자가골이식은 공여골 채취를 위한 부가적인 수술과 감염 및 공여할 수 있는 골의 양도 한계가 있다. 그러므로, 최근에는 자가골 대신 동종골, 이종골이나 생체 친화

성이 우수한 골대체물질을 많이 사용한다. 동종골과 이종골은 현재 임상에서 많이 사용되고 있지만, 간염, HIV 등의 전염성 질환을 완전히 배제하지 못한다는 단점을 갖고 있어, 많은 나라에서는 사용을 엄격히 규제하고 있는 실정이다. 이로 말미암아 생체친화성이 우수한 수산화인회석, 생체유리, 생체도재, polymer 등의 합성 골대체재들이 개발되고, 실제 임상에서 사용되어지고 있다. 이 중 β -TCP는 무균의 인공재료로 혈액이나 조직을 매개로 하는 감염으로부터 위험성을 제거할 수 있는 생체친화성 골대체 재료이다. β -TCP는 미세기공으로 연결된 생체활성 재료로 HA보다 높은 용해도를 보이며, 다른 calcium phosphate ceramics보다 빠른 흡수를 보이고, 골형성을 촉진하는 한편 용출, 흡수의 과정을 거쳐 자가골로 치환될 수 있고 보고와 함께 임상에서도 소개되어, 인공치아와 관련된 골이식술을 위한 인공골대체물질로 최근 사용되어지고 있다.

골조직의 60~70%는 무기결정으로 구성된다. 골의 무기결정은 골의 기계적 강도를 높게 할 뿐만 아니라 생리적으로 조직액 내의 Ca, PO₄와 같은 무기이온의 저장고로서 역할을 한다. 골조직의 무기결정은 일반적으로 수산화인회석(HA)의 결정구조를 가지고 있다. 하지만 골 결정의 표면에 존재하는 이온의 구조는 순수한 수산화인회석과는 달리 반응성이 매우 높다고 알려져 있다¹⁴⁾. 생체 내에 존재하는 수산화인회석과 비슷한 구조를 가지는 인공 골재료를 개발하기 위한 시도로 100년 전에 Calcium-sulfate(gypsum)을 사용하였지만, 조기에 빠른 흡수로 인해서 충분한 골의

성장을 유도하지 못하였다. 수산화인회석, 생체유리, 생체도재, polymer 등에 대한 물리적 화학적 성질을 연구하였으나, 아직까지는 골의 무기결정과 비슷한 물리적 화학적 성질이 비슷한 인공합성물은 소개되지 않고 있다. 골과 유사한 구조를 가진 구조로 HA나 β -TCP 등이 소개되고 있지만, 이식 후 이식재료의 흡수라는 측면에서는 만족할 만한 결과를 보여주지 못하고 있다¹²⁻¹⁴.

Ducheyne 등은 ceramic들이 골로 대체되는 과정을 용해, 침전, 이온 변화, 침착, 화학주성, 세포 부착과 증식, 세포 분화, 세포외기질 형성이라는 기전에 주변 환경 또는 골과 반응한다고 보고하고 있다¹⁰. Lu 등은 TCP의 생체분해성이 물리적, 화학적인 용해 또는 분해과정을 거치는 단계와 파골세포와 식세포의 분해과정에 의해서 일어나고, 이식초기에는 주로 물리 화학적인 분해과정이 주를 이루고, 후반기로 갈수록 세포와 관련된 형태의 흡수를 보이면서, 골개조 현상이 일어난다고 보고하였다^{14,15}. Wilfgang 등은 β -TCP를 이식한 후 최소한 5-6개월 이후에 인공치아 이식해야 한다고 보고하고 있다. Wilfgang은 α 와 β -TCP의 흡수양상을 살펴본 연구에서 TCP의 흡수양상은 4주에서는 비슷하고, 16주에서는 70%, 40% 존재, 68-86주에서는 둘 다 10%이하로 남게 된다고 보고하고, 인공치아는 5-6개월 이후에나 식립 하여야 한다고 주장하고 있다⁶. 본 연구에서도 4주에서는 이식된 β -TCP의 흡수나 주변의 골형성은 관찰되지 않았고, 다수의 핵을 가진 phagocyte들의 출현이 관찰되었다. 8주나 12주로 갈수록 조골세포들의 활성화와 골형성단백질의 활성이 증가하는 것으로 보아서 이식된 β -TCP의 골형성과정은 초기의 물리, 화학적 흡수부터 시작해서 8-12주경에서부터 세포와 관련된 골형성과정이 일어나는 것으로 관찰되었다. β -TCP가 완전히 흡수되는 시기는 Szabo 등은 12-18개월에 완전히 흡수되고 해부학적으로나 기능적으로 골로 대체된다고 한다⁷. BCP(HA+ β -TCP)의 경우는 BCP(25/75)가 pure한 β -TCP 보다 흡수가 빠르다고 한다. 이는 단순한 화학적 분해 이외도 파골세포의 활성이 골개조시기에 더욱더 중요한 역할을 한다고 보고 되고 있다. Merten 등은 Goettingen miniature pigs에 이식된 β -TCP의 골형성과정에서 초기에는 hydrolytic-cellular degradation이 주로 일어나고, 후반기 20주 이상에서는 bifunctional remodeling이 일어난다고 하였다^{15,16}.

골대체물질의 흡수는 초기에는 이식재의 물리, 화학적 성질에 따라 많은 차이가 보이게 된다. Ca-P 생체물질의 분해는 물리학적으로는 입자의 크기, 기공의 크기, 표면적, 결정의 크기나 구조에 따라 영향을 받고, 화학적으로는 pH나 Ca/P ratio, sintering시의 압력과 온도, 이온의 구조에 따라 많은 영향을 받는다고 한다¹⁷. 골 결정의 크기는 결정의 용해도와 관계가 있다. 특히 극미세결정의 용해도는 전적으로 결정의 크기에 좌우되는 것으로 아주 작은 양의 크기 변화도 용해도에 민감하게 된다. 골결정은 생성된 후 성숙과정에 의해 약간의 화학적 및 구조적 변화를 겪는다. 일반적으로 결정의 표면에 존재하는 것으로 믿어지는 PO₄, CO₃와 같은 비결정이온들의 양은 감소한다. 따라서 성숙된 골결정은 미성숙된 골결정에 비해 반응성이 낮아진다고 한다¹⁸⁻²¹. Bioactive ceramic의 반응성은 Ca/P의 비율 또는 Carbonate와 PO₄의 성분비에 의해서 차이가 난다. Lu 등의 실험에 의하면 rabbit에

서 24주 후에 55%정도의 degradation이 일어나고 HA는 5%만 흡수된다고 하였고¹⁹, TCP는 HA보다 산성에서 12.3배 염기에서 22.3배 빨리 흡수된다고 보고 되고 있다. 이러한 흡수에 영향을 미치는 용해도는 Ca/P ratio이며, TCP의 Ca/P ratio는 1.67이고, HA의 Ca/P ratio는 1.7이라고 하였다^{14,15}.

Bolander 등은 손상받은 골조직의 치유과정을 염증반응과 육아조직을 형성하는 단계, 막내골화 단계, 연골화단계, 연골내 골화단계의 4단계로 나누고 단계에서 골형성에 관련된 성장인자의 발현이 각 단계에서 달리 나타난다고 보고하고 있다²⁰. 골형성과 골개조 과정에 관련된 골형성단백질 또는 골형성에 관련된 단백질의 발현 양상도 이식골의 치유과정에서 여러 단계에 따라서 다르게 나타날 것이다^{23,24}. 파골세포에 의한 이식골의 흡수는 조골세포의 활성을 증가시켜서 골형성단백질의 발현을 활성화시킬 수 있다는 보고가 있다²⁵. 여러 가지 골형성 단백질 중 BMP 2/4는 낮은 농도에서의 골형성 능력이 뛰어나 골형성 단백질의 골형성 유도를 검증하는 동물실험에서 많이 이용되고 있다. 골형성단백질의 발현이 파골세포와 조골세포의 활성을 완전히 대표할 수 있지는 않지만, 골조직이 손상의 치유나 골형성에 관련 된다고 본다면 이식골주변에서의 골형성단백질의 발현은 골형성이 활발하게 일어나는 시기와 파골세포의 의해서 이식골의 흡수 또는 분해과정이 일어나는 시기를 결정하는 데, 중요한 단서가 된다^{6,12}. Urist 등은 rabbit의 귀에 결손부 치유과정에서 BMP 2에 대한 면역조직화학적 실험에서 2-4주경에 골형성단백의 발현이 많다고 보고하고 있다²⁶. 본 실험의 결과를 보면, 자가골이식에 있어서는 4주를 기점으로 해서 BMP 2/4의 발현이 감소하는 양상을 보인다. 이는 자가골이식에서 BMP와 관련된 골재생은 4주 이전에 일어난다고 할 수 있다. 반면, β -TCP이식 후 BMP 2/4의 발현은 4-12주로 갈수록 증가함을 보이는 것으로 보아서, 자가골이식 때보다는 지연된 골재생시기를 보여준다. 골전도능이 있는 자가골에 비해 골전도능이 없는 골대체물질에서의 골재생의 시기는 3배정도 지연된다고 하겠다. 초기에 골형성을 유도하기 위한 성장인자와 동시에 β -TCP들의 골대체물질의 이식에 관한 연구가 계속 필요하다.

V. 결 론

본 연구는 가토의 두개골 결손부에 자가골과 β -TCP를 동시에 이식하여, 이식골이 치유되는 과정에서 BMP 2/4가 분포하는 세포 및 작용시기, 발현양상을 면역조직화화법을 이용하여 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 신생골의 형성은 자가골 이식체에서는 4주에, β -TCP 이식체에서 8주에 관찰되었다.
2. 자가골 이식시, 조골세포에서 BMP 2/4는 4주에서 가장 많이 발현되었고, 12주로 갈수록 점차 감소되었다.
3. β -TCP 이식시, 조골세포는 BMP 4는 4주에서 12주로 갈수록 증가하였다. BMP 2는 12주에서 약간 발현이 되었다.

이상의 결과로 볼때, 골전도능이 있는 자가골에 비해 β -TCP 인공골대체재료의 이식과 관련된 골치유에서 신생골 형성과 BMP 발현은 지연되어 관찰되었다. 그러므로 β -TCP를 이용한 골이식술에서 골치유기간은 자가골보다 충분한 시간이 필요하다고 결론지어졌다.

참고문헌

- Goldberg VM, Stevenson S: Nature history of autograft and allograft. Clin Orthop 1987;225:7-16.
- Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV et al: Quantitative comparison of healing in cranial fresh autografts, and allografts in canine skull defects. Clin orthop 1986;205:269-291.
- Lemperle SM, Calhoun CJ, Curran RW et al: Bony healing of large cranial and mandibular defects protected from soft tissue interposition : a comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. Plast Reconstr Surg 1998;101:660-672.
- Merkx MAW, Maltha JC, Stoeltinga PJW: Assessment of the value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation: a review of clinical reports. Int J Oral Maxillofac Surg 2003;32:1-6.
- Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, et al: Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? Clin Oral Implants Res 2003;14:213-218.
- Trisi P, Rao W, Rebaudi A, et al: Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. Int J Periodontics Restorative Dent 2003;23:69-77.
- Szabo G, Suba Z, Hrabak K, et al: Autogenous bone versus β -tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations(2-and 3-dimensional compute tomographic, histologic,and histomorphometric evaluations) : preliminary results. Int J Oral Maxillofac Implant 2001;16:681-692.
- Chai Y, Slavkin HC: Biology of bone induction and its clinical applications. Oral and Maxillofac Surg Clin North Am 1994;6:739-753.
- King GN, King N, Hughes FJ: The effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. J periodontal 1995;66:131-138.
- Hughes FJ, Clooyer J, Stanfield S, Goodman S: The effects of bone morphogenic protein-2,4 and 6 on differentiation of rat osteoblastic cell in vitro. Endo 1995;136:2671-2677.
- Ducheyne P, Qiu Q: Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. Biomaterials 1999;20:2287-303.
- Gisep A, Wieling R, Bohner M, et al: Resorption patterns of calcium-phosphate cements in bone. J Biomed Mater Res 2003;66A:532-540.
- Ogose A, Hotta T, Hatano H, et al: Histological examination of beta-tricalcium phosphate graft in human femur. J Biomed Mater Res 2002;63:601-604.
- Lu JX, Gallur A, Flautre B, et al: Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. J Biomed Mater Res 1998;42:357-367.
- Lu J, Descamps M, Dejou J, et al: The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. J Biomed Mater Res 2002;63:408-412.
- Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, et al: Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. J Biomed Mater Res 2002;63:115-121.
- Merten HA, Wiltfang J, Grohmann U, et al: Intraindividual comparative animal study of α -and β -tricalcium phosphate degradation in conjunction with simultaneous insertion of dental implants. J Craniofac Surg 2001;12:59-68.
- Blokhuis TJ, Termaat MF, den Boer FC, et al: Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior. J Trauma 2000;48:179-186.
- Yamada S, Heymann D, Bouler JM, et al: Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. Biomaterials 1997;18:1037-1041.
- Yamada S, Heymann D, Bouler JM, et al: Osteoclastic resorption of biphasic calcium phosphate ceramic in vitro. J Biomed Mater Res 1997;37:346-352.
- Gbureck U, Grolms O, Barralet JE, et al: Mechanical activation and cement formation of β -tricalcium phosphate. Biomaterial 2003; 24:4123-4131.
- Bolander MR: Regeneration of fracture repair by growth factors. Proc Soc Exp Bio Med. 1992;2000:165-170.
- Taylor JC, Cuff SE, Leger JP, et al: In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation : A pilot study. Int J Oral Maxillofac Implant 2002;17:321-330.
- Flautre B, Maynou C, Lemaitre J et al: Bone colonization of β -TCP granules incorporated in brushite cements. J Biomed Mater Res 2002;63:413-417.
- Kloen P, Di Paola M, Borens O et al: BMP signaling components are expressed in human fracture callus. Bone 2003;33:362-371.
- Urist MR, Raskin K, Goltz D et al: Endogenous bone morphogenic protein : immunohistochemical localization in repair of a punch hole in the rabbit's ear. Plast Reconstr Surg 1997;99:1382-1389.

사진부도 설명

- Fig. 1. Two calvarial defect was filled with autogenous(right) bone and β -TCP(left).
- Fig. 2. β -TCP(tricalcium phosphate).
- Fig. 3. Microscopic exam. show the autogenous bone graft. 4week ($\times 200$, H&E).
- Fig. 4. Microscopic exam. show the autogenous bone graft. 8week ($\times 200$, H&E).
- Fig. 5. Microscopic exam. show the autogenous bone graft. 12week ($\times 200$, H&E).
- Fig. 6. Microscopic exam. show the β -TCP graft. 4week ($\times 200$, H&E).
- Fig. 7. Microscopic exam. show the β -TCP graft. 8week ($\times 200$, H&E).
- Fig. 8. Microscopic exam. show the β -TCP graft. 12week ($\times 200$, H&E).
- Fig. 9. Immunohistochemical exam. of BMP-4 show the autogenous bone graft. 4 weeks ($\times 200$).
- Fig. 10. Immunohistochemical exam. of BMP-2 show the autogenous bone graft. 4 weeks ($\times 200$).
- Fig. 11. Immunohistochemical exam. of BMP-4 show the autogenous bone graft. 8 weeks ($\times 200$).
- Fig. 12. Immunohistochemical exam. of BMP-2 show the autogenous bone graft. 8 weeks ($\times 200$).
- Fig. 13. Immunohistochemical exam. of BMP-4 show the autogenous bone graft. 12weeks ($\times 200$).
- Fig. 14. Immunohistochemical exam. of BMP-2 show the autogenous bone graft. 12weeks ($\times 200$).
- Fig. 15. Immunohistochemical exam. of BMP-4 show the β -TCP graft. 4weeks ($\times 200$).
- Fig. 16. Immunohistochemical exam. of BMP-2 show the β -TCP graft. 4weeks ($\times 200$).
- Fig. 17. Immunohistochemical exam. of BMP-4 show the β -TCP graft. 8weeks ($\times 200$).
- Fig. 18. Immunohistochemical exam. of BMP-2 show the β -TCP graft. 8weeks ($\times 200$).
- Fig. 19. Immunohistochemical exam. of BMP-4 show the β -TCP graft. 12weeks ($\times 200$).
- Fig. 20. Immunohistochemical exam. of BMP-2 show the β -TCP graft. 12weeks ($\times 200$).

사진부도 ①

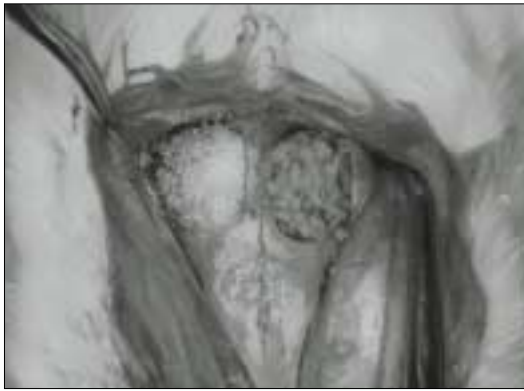


Fig. 1



Fig. 2

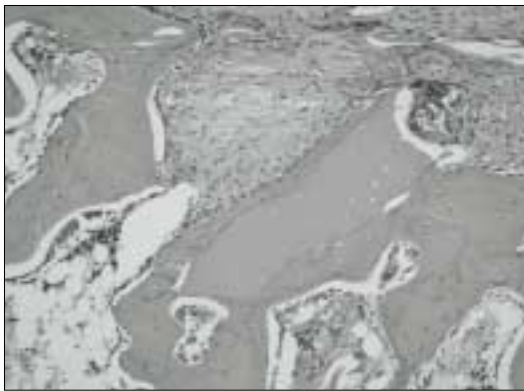


Fig. 3

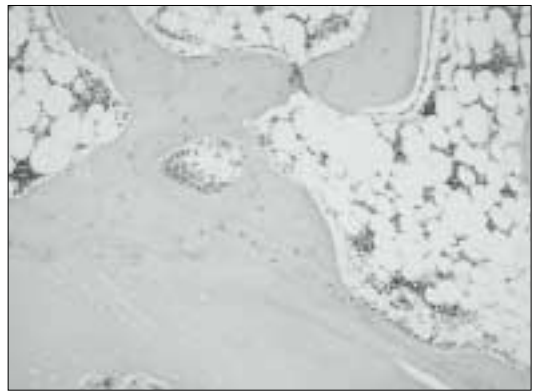


Fig. 4

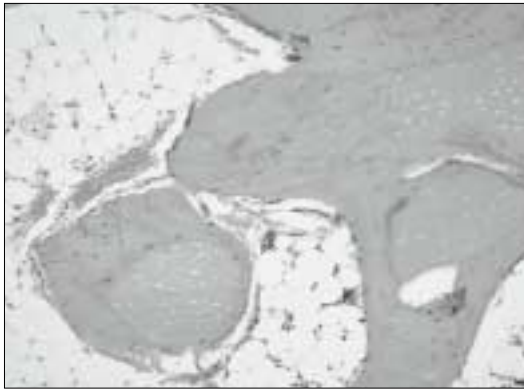


Fig. 5

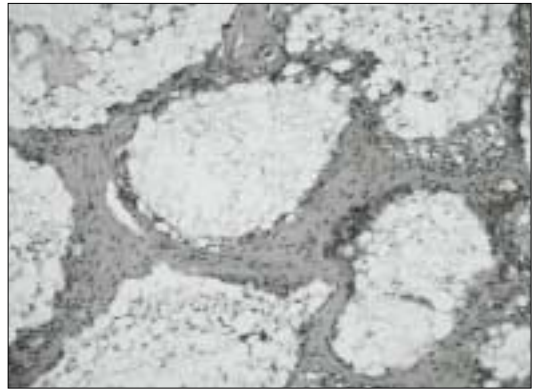


Fig. 6

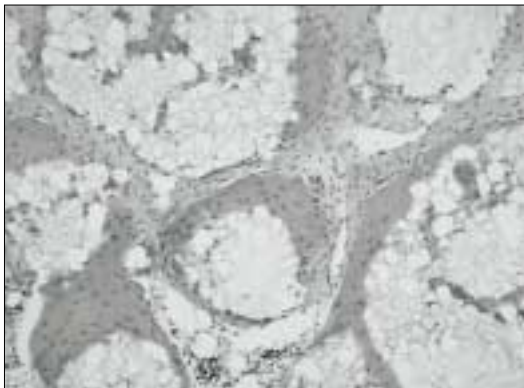


Fig. 7

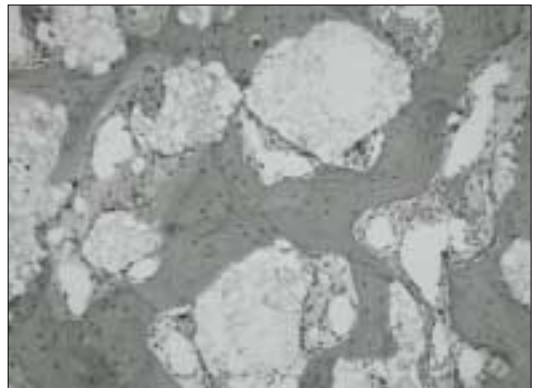


Fig. 8

사진부도 ②



Fig. 9



Fig. 10



Fig. 11

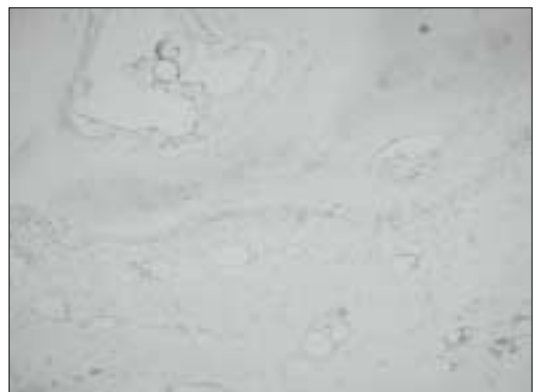


Fig. 12



Fig. 13

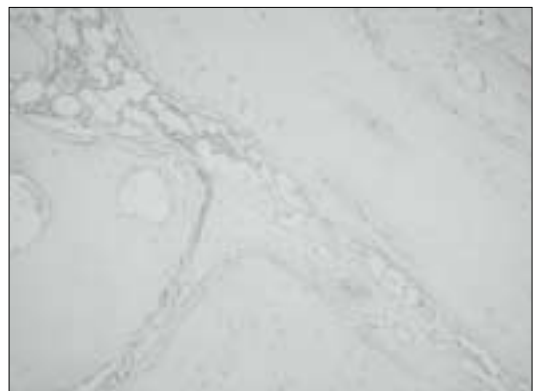


Fig. 14



Fig. 15

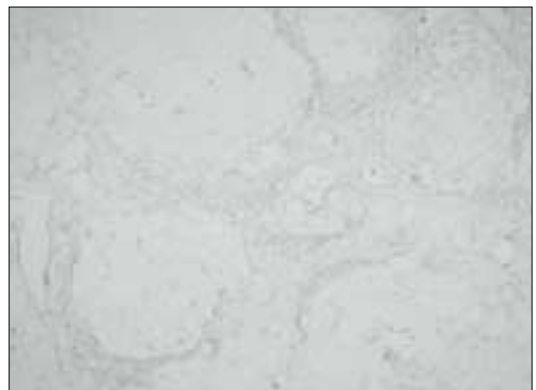


Fig. 16

사진부도 ③



Fig. 17



Fig. 18

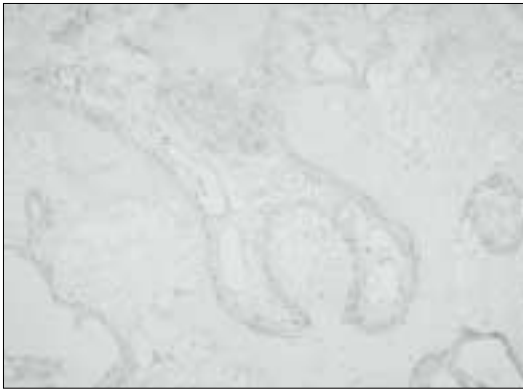


Fig. 19



Fig. 20