



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](#)

2015년 8월

2015년 8월
박사학위논문

박사학위논문

치조골 재생을 위한 약물 서방 방출형 다공성 수산화인회석

치조골 재생을 위한 약물 서방 방출형 다공성 수산화인회석

조선대학교 대학원

치의학과

서 기 원

서기원

치조골 재생을 위한 약물 서방 방출형
다공성 수산화인회석

2015년 8월 25일

조선대학교 대학원

치의학과

서 기 원

치조골 재생을 위한 약물 서방 방출형 다공성 수산화인회석

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2015년 4월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

서 기 원

서기원의 박사학위논문을 인준함

위원장 서울대학교 교수 양 형 철 (인)

위 원 조선대학교 교수 최 한 철 (인)

위 원 부산대학교 교수 설 효 정 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 (인)

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 (인)

2015년 6월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험재료	4
가. 수산화인회석 나노 분말 합성	4
나. 수산화인회석 현탁액 제조	4
다. 다공성 수산화인회석 제조	5
라. 반코마이신을 함유한 PLGA 나노스피어(nanosphere) 제조	7
마. HA-PLGA 복합체 제조	7
2. 실험방법	7
3. 통계 처리	8
III. 연구 결과	9
IV. 총괄 및 고찰	20
V. 결 론	23
참고문헌	24

LIST OF TABLES

Table 1. Compositions of HA slurries.	5
Table 2. Porosity according to the composition of HA slurries.	15
Table 3. Compressive strength according to the composition of HA slurries.	16

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Alginate beads.	6
Fig. 2. HA-coated alginate beads.	6
Fig. 3. XRD patterns of HA nanoparticles.	9
Fig. 4. TEM image of HA nanoparticles.	10
Fig. 5. SEM image of HA granule.	10
Fig. 6. Cross section of HA showing a solid internal structure.	11
Fig. 7. Cross section of HA showing a hollow internal space.	11
Fig. 8. SEM images showing various sizes of pores and pore channels of (a) H1, (b) H2, and (c) H3.(Magnification of surface images is x500, and that of cross-section images is x1,000).	13
Fig. 9. SEM images showing various sizes of pores and pore channels of (a) N1, (b) N2, and (c) N3.(Magnification of surface images is x1,000, and that of cross-section images is x10,000).	14
Fig. 10. SEM images of PLGA nanospheres showing (a) size distribution, (b) outer appearance, (c) solid, and (d) porous inner structures.	17
Fig. 11. SEM images of HA-PLGA composites.	18
Fig. 12. The releasing behavior of vancomycin from HA-PLGA composites.	19

ABSTRACT

Tailored Drug Release of Porous Hydroxyapatite for Bone Regeneration

Seo Ki Won

Advisor : Prof. Ko Yeong-Mu D.D.S., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Many studies in bone tissue engineering have been reported to promote the ability of bone regeneration. The limits of autografts, allografts, and xenografts have inspired the use of alloplastics.

In recent years, strategies using synthetic bonegraft materials with biological factors have been come into the spotlight and hydroxyapatite(HA) is generally considered of choice due to similarity in composition to human bone as well as teeth and excellent osteoconductivity. Biological factors, including growth factors for bone tissue engineering are very diverse, and considerable efforts have been made purify, isolate and identify the osteoinductive proteins presenting an osteoinductivity. Although many researches have been reported that optimize the combination of alloplastic bonegrafts and growth factors, it seemed that there is still no ideal solution.

Tailored drug release from the inside of the hollow HA through the pores in the shell was investigated in this study. Needle-shaped HA nanoparticles, 20 nm in width and 100 nm in length, were synthesized by coprecipitation using 0.3M aqueous solution of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and 0.5 M aqueous solution of CaCl_2 with vigorous stirring at 10,000 rpm. The pH was adjusted to pH 10 and the

temperature was maintained at 60°C. The coprecipitated HA was filtered, washed and freeze-dried.

HA slurry was prepared by dispersing the synthesized HA powders into the distilled water with various organic additives such as 3% polyvinyl alcohol, 1% polyethylene glycol, 1% methyl cellulose, and 5% dimethyl formamide in order to improve the dispersing effect and prevent the crack formation during drying. Then amount of HA powders were varied from 30 to 70%(H groups), and followed by addition of sodium chloride up to 15%(N groups).

Alginate beads were prepared by dropping 2% alginic acid solution into 1% calcium chloride solution. They were coated with HA slurry and subsequently dropped into liquid nitrogen. The HA-coated beads were freeze dried, and then organics were burned out during sintering.

Vancomycin as a selected drug in this study was encapsulated with poly(lactic-co-glycolic acid)[PLGA] which is one of the representative biodegradable polymers by a double emulsion method. Vancomycin HCl injection was mixed with PLGA solution with dichloromethane(DCM). Through the evaporation of DCM under vacuum, ultracentrifugation at 10,000 rpm and subsequent lyophilization, vancomycin-laden PLGA nanoparticles were obtained.

In order to insert vancomycin-laden PLGA nanoparticles into the porous and hollow HA granules, vacuum pressure was applied for a minute after dispersing them together in distilled water.

Drug release rates from HA/PLGA complex bone-graft granules were monitored *in vitro*. They were immersed in phosphate-buffered saline and stored at 37°C under 100 rpm under shaking. The amount of the released vancomycin was determined by the spectrophotometric plate reader.

The phase composition of the synthesized HA powders was analyzed with an X-ray diffractometer. The shape and size of HA powder and PLGA particles were observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. The size and distribution of the HA powder and PLGA particles were measured by dynamic light scattering. The total amount of drug on the

surface of the hollow HAp granules was calculated using simultaneous thermogravimetric analysis.

The fabricated HA granules had an overall spherical geometry with 1.5 mm in diameter. The size could be controlled by the injector size as well as dropping speed into liquid nitrogen. Internal empty space was formed by the burning out the alginate beads during sintering process. Pores in the shell offered an connection between internal empty space and external surface.

The thickness of the shell, the pore size and porosity were depends on the composition of HA slurry. In H groups, increasing the ratio of HA powder and distilled water, the thickness of the shell was increased from 20 to 100 μm in this study, while the pore size and porosity was decreased from (0.902 ± 0.035) to (0.454 ± 0.020) mL/g. This phenomena could be explained that pore was formed as water frozen and subsequent sublimation of ice inside the shell during lyophilization.

The addition of sodium chloride in HA slurry did not affect pore size and porosity in groups N. However, irregular-shaped pores were caused because the sodium chloride remained after lyophilization. Nearly all the residual sodium chloride could be burned out during sintering process up to 1300°C.

The structure of the pore channels is believed to have played a role in delay the initial burst out of the drug.

It could be concluded that how to tailor the structure of pore channels connecting internal empty space and external surface was the key to control the sustained drug release rate from the internal empty space.

Keywords : Bone-graft, Bone regeneration, Hydroxyapatite, PLGA, Vancomycin,
Sustained drug delivery

I. 서 론

과학기술 및 의료기술의 발전으로 인간의 수명이 연장되어 65세 이상 노인의 비율이 2005년에 9.1%가 되면서 고령화 사회로 접어든 이래, 2018년에는 14.3%가 되어 고령사회로, 2026년에는 20.8%로 초고령사회에 도달할 것으로 전망되면서 각종 산업 및 자연 재해로 인한 상해와 질병으로 인한 조직 결손이 증가하고, 국민 의식과 삶의 질이 높아짐에 따른 의료복지 서비스에 관한 욕구가 높아지면서 인체장기나 조직의 결손으로 인한 치료에 대한 수요와 관심이 높아지고 있다.

비교적 재생이 용이한 연조직과는 달리 경조직은 자발적으로 재생이 되지 못하는 경우에는 골이식을 통해 재생을 촉진시켜 왔다. 자가골 이식이 가장 이상적이지만, 채취 부위의 2차 수술로 인한 비용과 환자의 고통이 수반되고, 채취량에 제한이 있으며, 2차 수술이 필요하다는 한계가 있다(Quintero와 Mellonig, 1982). 동종골은 사체 혹은 조직은행에 보관된 골조직을 이용하여 만드는 것으로, 부가적인 수술이 없는 것이 장점이지만, 면역학적 거부반응 및 일부 바이러스 질환에 이환된 경우 전염가능성을 완전히 배제할 수 없다는 것이 문제점으로 지적된다 (Mellonig, 1991). 이종 골이식은 골 성장 인자를 포함하고 있어서 골유도가 가능한 장점이 있어서 널리 사용되고 있으나, 주로 소뼈에서 채취한 후 화학처리하여 병원균 위험이 적지만, 광우병과 같은 동물의 질환에 전염될 위험성을 배제할 수 없다(Mellonig, 1991).

따라서, 경제적이고, 질병의 전염 가능성이 없을 뿐 아니라, 재료의 물성을 조절할 수 있는 인공적으로 합성한 골이식 재료에 관한 관심이 높아지고 있다. 생체친화성과 물리적 성질을 모두 만족하는 것으로 1926년 X선 회절 분석에 의해 인체의 뼈와 치아가 아파타이트 구조를 가지고 있다는 것이 밝혀짐으로써 칼슘 포스페이트 화합물이 주로 사용되어 왔다(de Bruijn 등 1995; Dennis 등 1992; Hench와 Wilson 1984; Jarcho 1981; Roy 1974). 그 중에서도 가장 대표적인 수산화인회석 [$\text{HA}; \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]에 관한 여러 논문에서 동물시험 결과, 면역 거부 반응이 없고, 장기간에도 우수한 생체적합성을 나타내며, 골전도성이 있어서 골조직과 결합한다고 보고되었다(Cerroni 등 2002; Ducheyne 등 1999; Klein 등 1983). 하지만 합성 골이식체는 골전도성은 있으나 골유도성이 없어서, 주변 조직과 상호 작용할 수 있도록 하기 위한 연구가 많이 진행되어 왔다(Healy 1999; Hubbell 1999;

Sakiyama와 Hubbell 2001). 생체재료의 표면에 세포외기질(ECM) 단백질을 흡착시켜, 세포가 흡수된 ECM 단백질을 통해 생체재료 표면에 간접적으로 상호 작용할 수 있도록 하는 생체모사(biomimetic) 특성에 관한 연구들로, 크게 두 가지 방법이 보고되었다. 첫 번째는 재료에 성장인자나 플라스미드 DNA와 같은 용해성 생체활성 분자를 적용하여 생체 분자를 방출시켜 새로운 조직을 형성하는 방법이고 (Babensee 등 2000; Richardson 등 2001; Whitaker 등 2001), 두 번째는 재료를 세포-결합 인자(peptide)로 개질하여 재료가 특이적 단백질성 효소에 의해 분해하여 세포간 반응을 유도하는 것이다(Suzuki 등 2000; West 등 1999).

최근의 연구 방향은 성장인자를 골이식체에 부착시키는 것이다. 성장인자는 수용체에 의해 합성되는 단백질을 up-regulation하거나 down-regulation하여 세포의 부착, 증식, 이동이나 분화를 촉진하거나 억제하는 물질로, 인접세포와 결손부에 침윤된 세포의 분열을 자극하고, 특별한 경로를 통해 세포의 분화와 혈관생성과정을 촉진시키는 역할을 하는 신호전달 물질이다.

대표적인 것으로 TGF- β superfamily에 속하는 BMP(bone morphogenic protein) 및 FGF(fibroblast growth factor) 등이 있다(Nohe 등 2004; Pittenger 등 1999). BMP는 1988년 Wozney 등에 의해 클로닝하여 30여 가지의 물질이 확인된 이래, 지난 10여 년간 BMP를 재조합하여 상용화하는 많은 연구가 진행되어 왔다.

그럼에도 불구하고, BMP의 효능은 실제 임상에서 아직까지 명확하지 않으며, 골 재생에 영향을 미치는 적정량의 BMP 농도에 관해 많은 연구 결과가 보고되었고, 최근에는 BMP-2를 고정화하여 서방형으로 방출하는 골이식체에 관하여 많은 연구가 다수 발표되고 있다(Boden 1999; Schmitt 등 1999; Winn 등 1999).

따라서, 본 논문에서는 BMP와 같은 성장인자를 골이식체의 내부에 담지하고 원하는 속도로 방출시킬 수 있는 방법에 관한 기초 연구로, 성장인자를 대신하여 항생제로 반코마이신을 사용하였다. 골이식체로는 인체의 뼈와 화학적으로 가장 유사한 조성을 갖는 수산화인회석을 선택하여, 속이 비어 있고, 외부 표면과 내부는 겹질의 기공 채널을 통해 연결되어 있는 형태로 제조하고자 하였다.

속이 비어 있는 형태로 제조하기 위해서는 알지네이트를 비드 상태로 제조하여 템플레이트(template)로 사용하였다.

수산화인회석 나노 분말을 제조하여 증류수에 현탁액(slurry)을 만들어 알지네이트 비드를 코팅하여, 소결(sintering)하는 과정에서 알지네이트 비드를 태워서 제거하였다(burn out).

성장인자를 담지하기 위한 기초 연구로 항생제를 수산화인회석 내부에 담지시키기 위한 방법을 연구하였으며, 항생제를 PLGA에 넣어 나노스피어로 만들어, 이를 수산화인회석의 기공 채널을 통해 내부로 들어간 상태의 복합 골이식재로 제조한 후, 방출 거동을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 수산화인회석 나노 분말 합성

공침법을 이용하여 수산화인회석 나노 분말을 합성하였다. Ca의 전구체로는 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였고, P의 전구체로는 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다. 0.5M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 수용액을 제조하여 10,000 rpm의 속도로 교반하면서 0.3M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 수용액을 적하시키면서 반응시켰다. 이때 온도는 60°C 로 유지하면서, pH는 NH_4OH 용액을 이용해서 10으로 맞추었다. 24시간 후에 수산화인회석 침전물을 여과, 세척하여 반응 부산물인 염화암모늄(NH_4Cl_2)을 제거한 후에 동결건조(freeze drying)하였다.

나. 수산화인회석 현탁액 제조

제조한 수산화인회석 나노 분말을 이용하여 Table 1에 나타낸 조성과 같이 수산화인회석 현탁액을 제조하였다. 증류수를 사용하여, 알지네이트 비드(bead)에 잘 결합되도록 polyvinyl alcohol(PVA, Du Pont, USA)을 3 wt% 첨가하고, 수산화인회석이 증류수에 잘 분산되도록 polyethylene glycol(PEG, Duksan Pure Chemical Co., Korea)과 methyl cellulose(MC, Duksan Pure Chemical Co., Korea)를 각각 1 wt% 첨가하였으며, 건조할 때 균열이 생기는 것을 방지하기 위해 dimethyl formamide(DMF, Aldrich, USA)를 5 wt% 첨가하여 비클(vehicle)을 만든 후에, 최종적으로 수산화인회석 나노 분말을 첨가하였다.

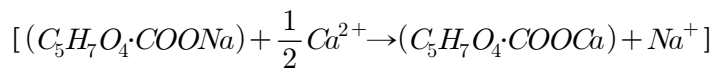
수산화인회석 분말은 증류수 100 mL당 30, 50, 70 g 첨가하여, 이를 H1, H2, H3 군이라 칭하였고, H2에 NaCl을 5, 10, 15 g 첨가한 것을 N1, N2, N3군이라 칭하였다.

Table 1. Compositions of HA slurries.

Group	HA (g)	NaCl (g)	Vehicle				
			DI water (mL)	PVA (wt.%)	MC (wt.%)	PEG (wt.%)	DMF (wt.%)
H1	70	0	100	3	1	1	5
H2	50	0					
H3	30	0					
N1	50	5					
N2	50	10					
N3	50	15					

다. 다공성 수산화인회석 제조

속이 빈 형태를 제조하기 위해서 알지네이트 비드를 제조하여 템플레이트(template)로 사용하였다. Sodium alginate acid(Sigma-Aldrich, USA) 용액을 microtip(D200, Gilson, USA)으로 calcium chloride(CaCl₂)(Sigma-Aldrich, USA) 용액에 적하하여 아래와 같은 반응에 따라 Fig. 1과 같은 직경 1~2 mm의 비드를 제조하였다.



제조한 알지네이트 비드를 수산화인회석 현탁액에 넣고 교반하여 알지네이트 비드 표면에 수산화인회석을 코팅한 후에 액체 질소에 적하하여 Fig. 2와 같이 구형(sphere)으로 제조한 후, 동결건조(freeze drying)하여 증류수를 제거하고, 1300℃에서 소결하면서 알지네이트를 연소시켜 속이 빈 형태로 제조하였다.

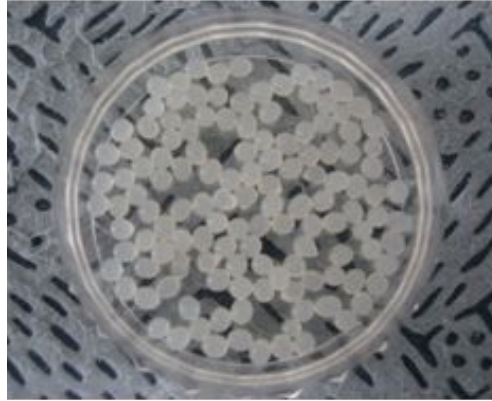


Fig. 1. Alginate beads.



Fig. 2. HA-coated alginate beads.

라. 반코마이신을 함유한 PLGA 나노스피어(nanosphere) 제조

Dichloromethane(DCM; Sigma-Aldrich, USA) 10 mL에 반코마이신(Vancomycin HCl Injection, CJ, Korea) 100 mg을 넣어 10분간 혼합한 후, PLGA(RG504H, Boehringer Ingelheim, Germany) 500 mg을 혼합하여 반코마이신을 함유한 PLGA 용액을 제조하였다.

0.5 wt% PVA 수용액과 10,000 rpm의 속도로 강력 교반하여 PLGA/VCM/DCM 용액이 PVA 용액에 구형으로 분산되어 있는 에멀전(emulsion)을 제조하였다.

Rotary evaporator(NN Series, Eyela, Japan)를 이용하여 진공 하에서 DCM을 증발시키고, ultracentrifuge(Beckman Coulter, USA)를 이용하여 10,000 rpm의 속도로 원심분리하여 PVA를 제거한 후, 동결건조하여 반코마이신이 함유된 PLGA 나노스피어를 제조하였다.

마. HA-PLGA 복합체 제조

속이 빈 수산화인회석과 PLGA 나노스피어를 증류수에 분산시킨 후, 진공 챔버(chamber)에 넣고 진공을 가하여 수산화인회석의 기공을 통해 PLGA 나노스피어가 수산화인회석 내부로 들어간 복합체를 제조하였다.

2. 실험방법

제조한 수산화인회석의 결정상은 X-ray diffractometer(XRD; Ultima IV, Rigaku, Japan) 을 이용하여 4°/min의 속도로 20~80°의 범위에서 측정 한 후, JCPDS software(PCPDFWIN1.30, JCPDS-ICDD)로 분석하였다.

수산화인회석과 PLGA의 형태는 투과전자현미경(TEM; JEM 4010, Jeol, Japan) 과 주사전자현미경(SEM; JSM-6701F, Jeol, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

수산화인회석의 기공율은 질소 가스의 흡착량을 측정하여 BET(Brunauer-Emmett-Teller) 원리에 따라 계산하였다.

수산화인회석의 압축강도는 만능시험기(3366, Instron, USA)을 이용하여 0.1 mm/min의 crosshead 속도로 측정하였다.

반코마이신의 용출량은 UV/vis spectrometer(UVD-3200, Labomed, USA)을 이용하여 측정하였다.

3. 통계 처리

SPSS(SPSS Inc Co., PASW Statistics 18.0, Chicago, USA)를 사용하여 통계적 유의성을 one-way ANOVA로 통계처리하였으며, Tukey test로 유의수준 95% 범위에서 사후 검증하였다.

Ⅲ. 연구 결과

공침법으로 제조한 수산화인회석의 XRD 결정 피크를 Fig. 3에 나타내었다. 다른 결정상이 검출되지 않아 화학반응이 완전히 이루어져 수산화인회석이 생성되었음을 확인할 수 있었다.

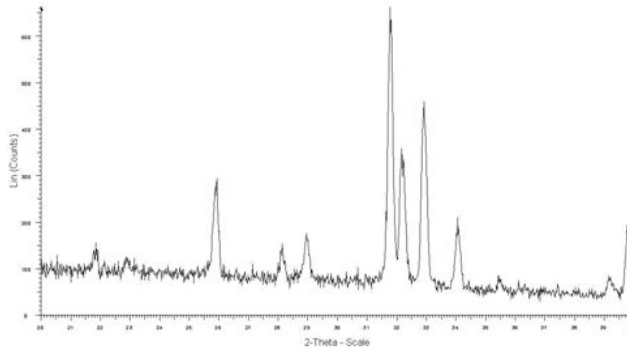


Fig. 3. XRD patterns of HA nanoparticles.

공침법으로 제조한 수산화인회석 나노 분말의 결정형태를 투과전자현미경을 관찰하여 Fig. 4에 나타내었다. 전형적인 바늘 형태(needle shape)의 수산화인회석임을 볼 수 있으며, 길이는 약 100 nm이고, 폭은 약 20 nm인 나노 분말이었다.

제조한 수산화인회석 입자의 주사전자현미경 사진을 Fig. 5에 나타내었다. 구형 체임을 볼 수 있으며, 직경은 템플레이트로 사용한 알지네이트 비드의 크기에 따라 조절 가능하며, 본 연구에서는 평균 1.5 μm 의 크기이었다. 알지네이트 비드를 사용하지 않았을 때는 Fig. 6과 같이 속이 꽉 차 있는 구형체로도 만들 수 있었고, 알지네이트를 사용하면 Fig. 7과 같이 속이 비어 있는 구형체로 제조할 수 있었다. 속이 비어 있는 경우의 수산화인회석의 두께는 알지네이트 비드에 코팅된 수산화인회석 현탁액의 두께에 의존하게 되며, 수산화인회석의 함량이 증가하면 점도가 증가하면서 최종적인 두께가 증가하는 경향을 나타내었다. 본 연구에서는 20~100 μm 의 두께를 나타내었다.



Fig. 4. TEM image of HA nanoparticles.

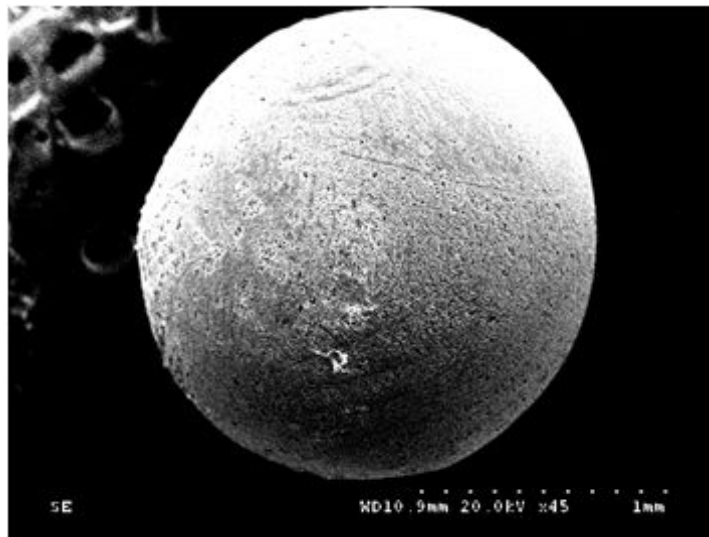


Fig. 5. SEM image of HA granule.



Fig. 6. Cross section of HA showing a solid internal structure.

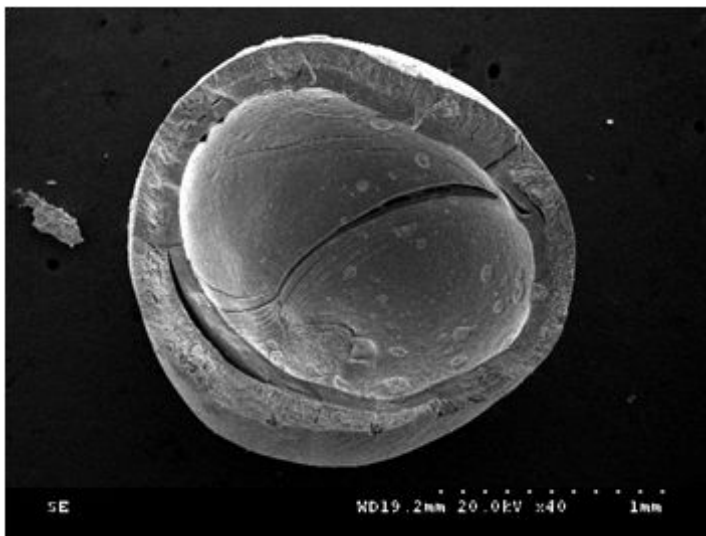


Fig. 7. Cross section of HA showing a hollow internal space.

제조 조건에 따른 수산화인회석의 겉표면과 두께의 단면을 전자현미경으로 관찰하여 Fig. 8과 Fig. 9에 나타내었다. Fig. 8에서 보면 두께 방향으로 비어 있는 내부로부터 바깥 표면쪽으로 가면서 기공 크기가 커지는 양상을 볼 수 있었다. 조성에 따라서는 수산화인회석 현탁액의 수산화인회석 함량이 감소함에 따라, 즉 증류수의 양이 증가함에 따라 기공 크기가 증가하는 경향을 나타내었다. Fig. 9에 나타난 NaCl를 첨가했던 경우에는 NaCl의 첨가량이 증가함에 따라 기공 채널이 치밀해지는 경향을 나타내었다.

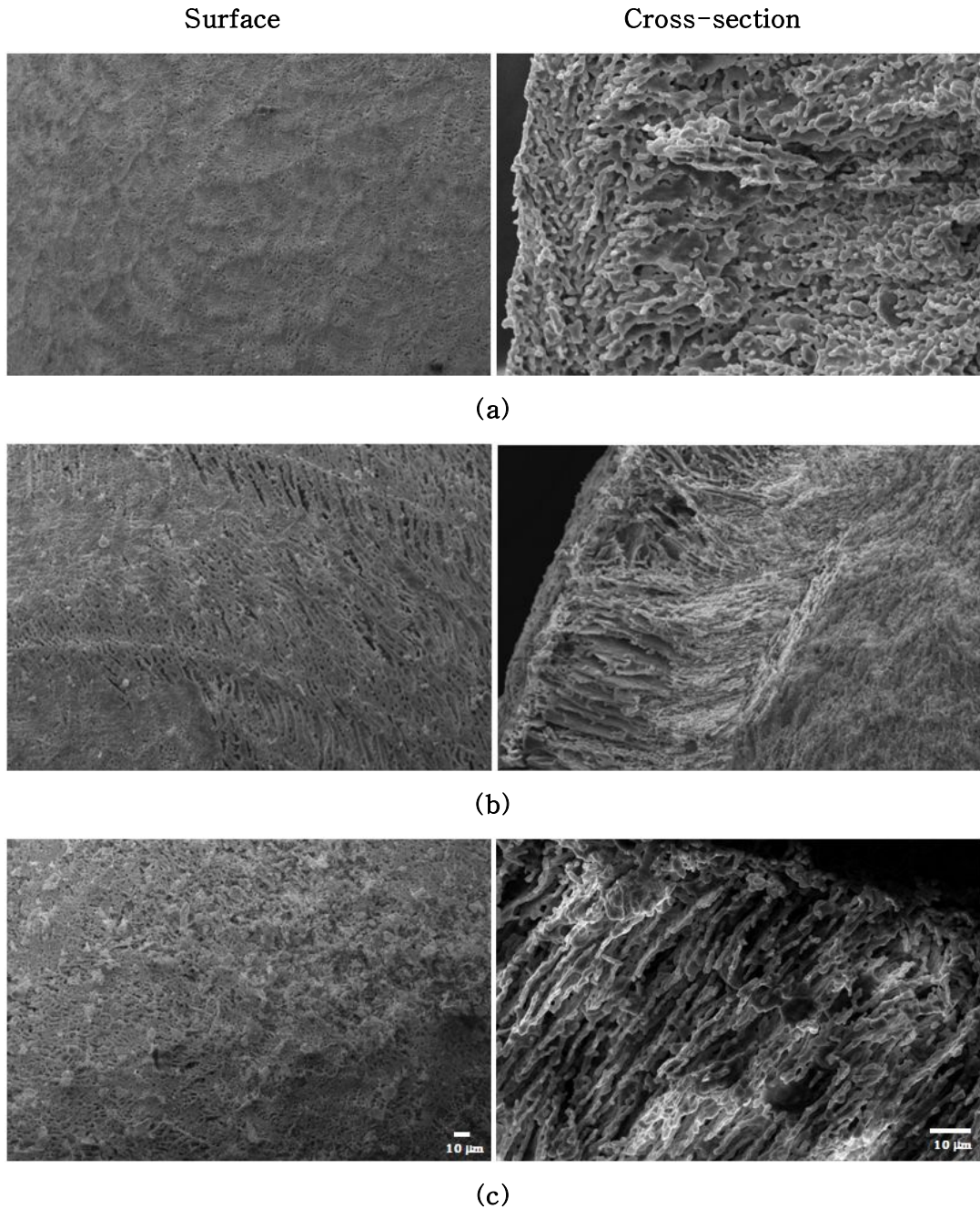


Fig. 8. SEM images showing various sizes of pores and pore channels of (a) H1, (b) H2, and (c) H3.(Magnification of surface images is x500, and that of cross-section images is x1,000).

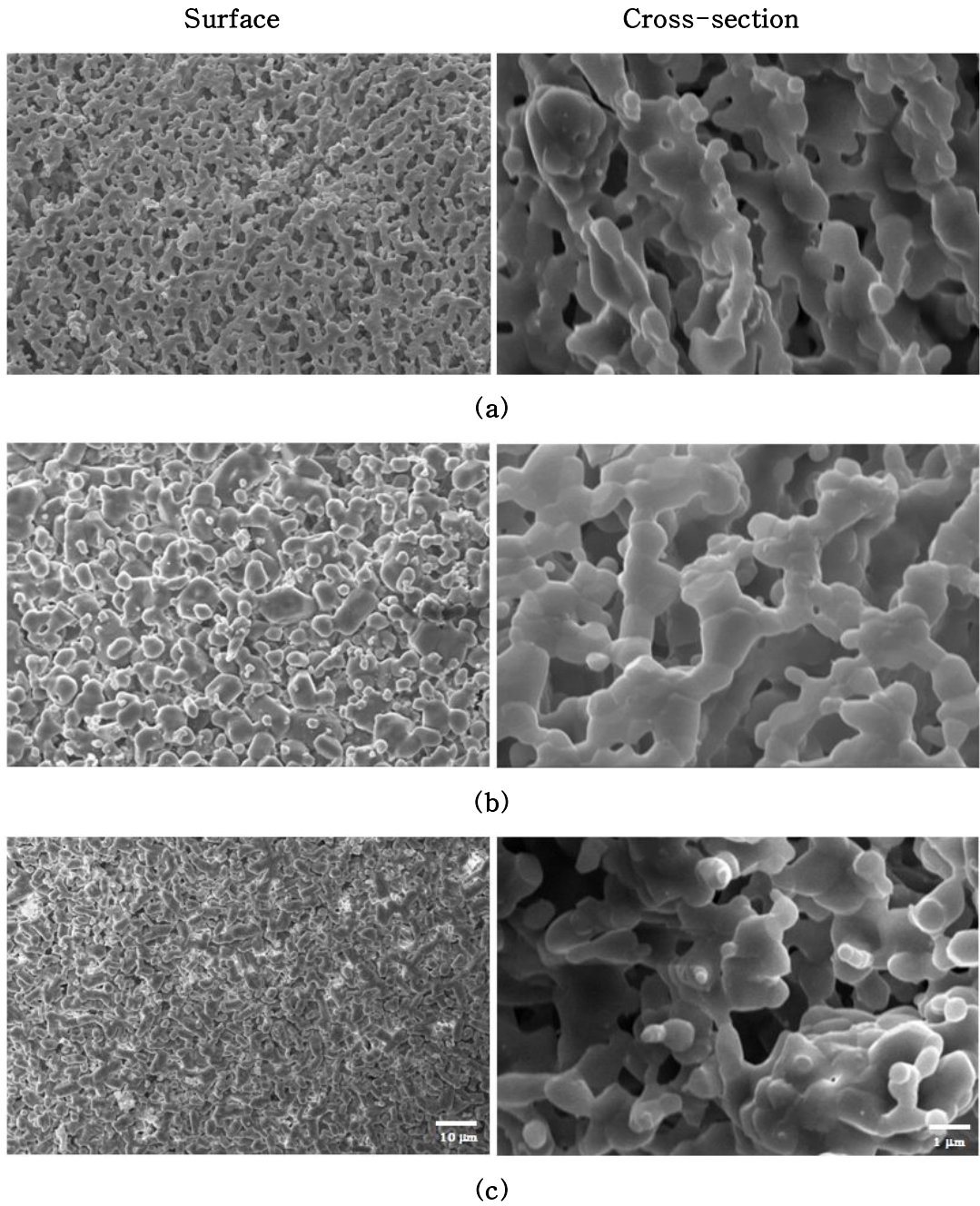


Fig. 9. SEM images showing various sizes of pores and pore channels of (a) N1, (b) N2, and (c) N3. (Magnification of surface images is x1,000, and that of cross-section images is x10,000).

수산화인회석의 기공율을 Table 2에 나타내었다. 수산화인회석 현탁액의 증류수 양이 증가함에 따라 기공율이 증가하는 경향을 나타내었고, NaCl의 첨가량이 증가함에 따라 기공율이 감소하여 (0.454±0.020)~(0.902±0.035) mL/g의 값을 나타내었다.

Table 2. Porosity according to the composition of HA slurries.

Group	Pore volume (mL/g)
H1	0.454±0.020
H2	0.616±0.014
H3	0.902±0.035
N1	0.833±0.087
N2	0.678±0.021
N3	0.479±0.012

수산화인회석의 압축 강도를 Table 3에 나타내었다. 기공율이 감소함에 따라 압축 강도가 증가하여 (3.379±0.791)~(9.650±1.826) MPa의 값을 나타내었다.

Table 3. Compressive strength according to the composition of HA slurries.

Group	Compressive strength (MPa)
H1	9.650±1.826
H2	8.669±1.112
H3	3.379±0.791
N1	5.794±0.597
N2	7.612±0.946
N3	8.714±1.074

PLGA 나노스피어의 전자현미경 사진을 Fig. 10에 나타내었다. 직경이 200~300 nm인 구형 입자임을 볼 수 있으며, 제조 조건에 따라 안이 꼭 찬 것부터 다공성인 것까지 다양하게 제조할 수 있었고, 모든 경우에 반코마이신을 함유하고 있었다.

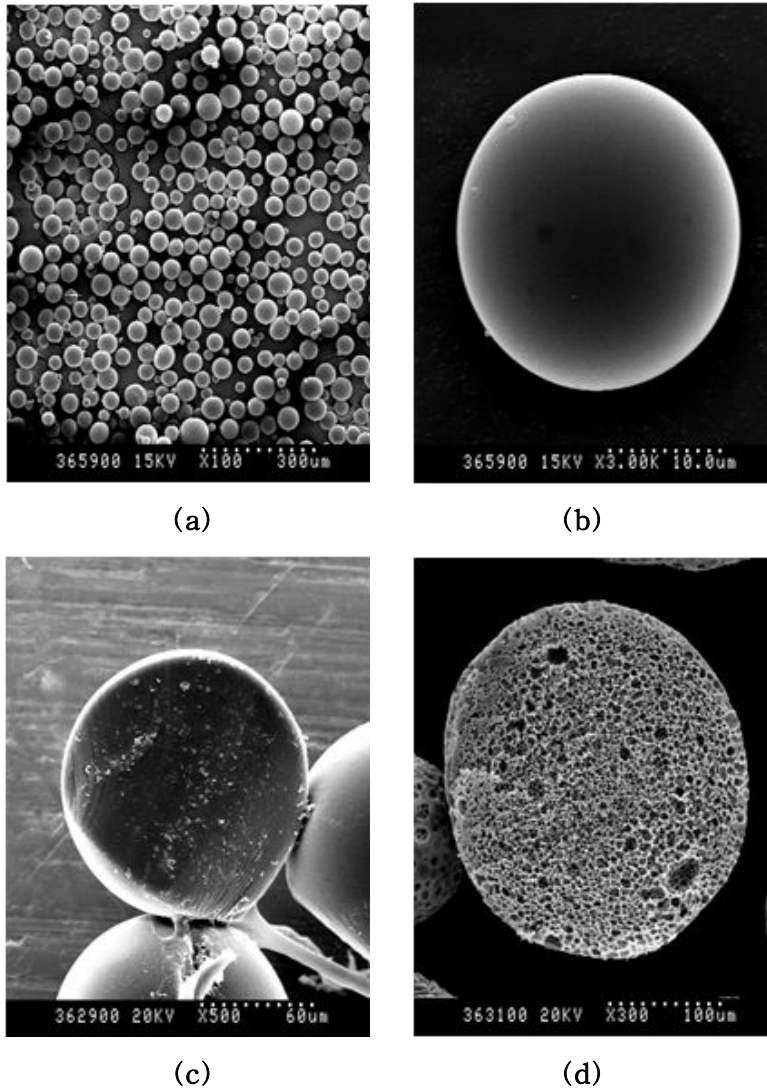


Fig. 10. SEM images of PLGA nanospheres showing (a) size distribution, (b) outer appearance, (c) solid, and (d) porous internal structures.

HA-PLGA 복합 골이식체의 전자현미경 사진을 Fig. 11에 나타내었다. PLGA 나노스피어가 수산화인회석의 내부와 기공 사이에 존재하고 있는 것을 볼 수 있다.

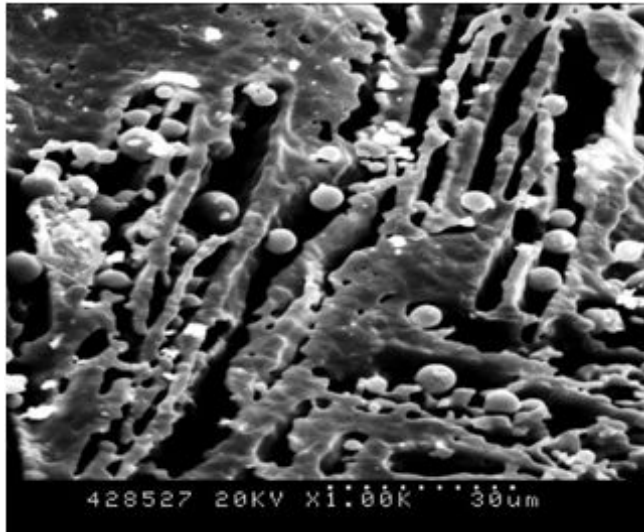


Fig. 11. SEM images of HA-PLGA composites.

HA-PLGA 복합 폴리식재료로부터 반코마이신이 방출되는 경향을 Fig. 12에 나타내었다. NaCl를 첨가하지 않은 H2는 초기에 급격하게 방출되어 2일에 거의 90%가 방출되는 경향을 나타낸 반면, NaCl를 첨가했던 N2는 초기의 급격한 방출없이 시간에 따라 서서히 방출되는 경향을 나타내었다.

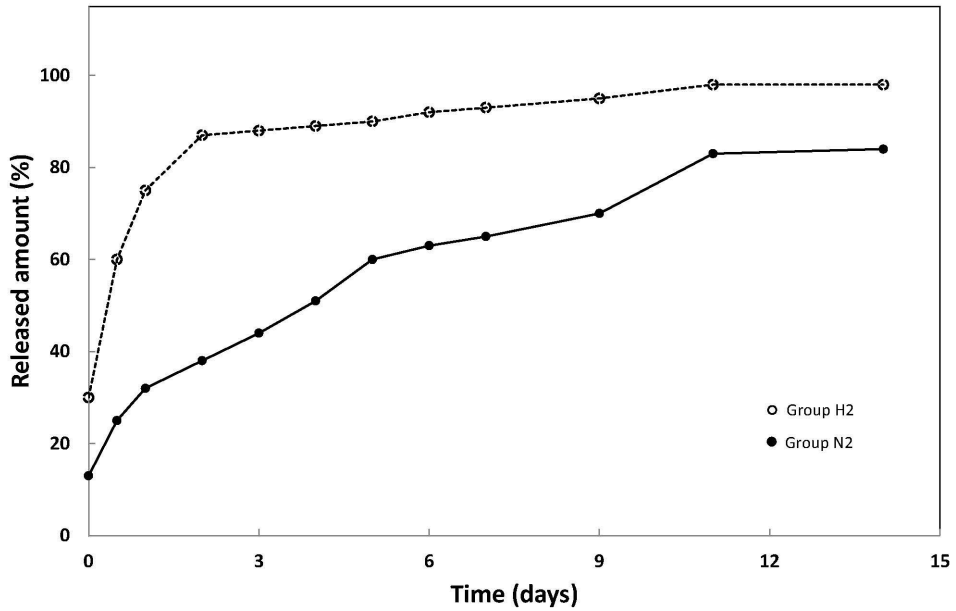


Fig. 12. The releasing behavior of vancomycin from HA-PLGA composites.

IV. 총괄 및 고찰

골 재생력을 향상시키기 위한 골조직공학에서 성장인자에 관한 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 골유도성 단백질인 생물학적 인자인 성장인자의 분리정제에 관해 많은 연구가 보고되었다. 이종골로부터 추출한 BMP와 platelet-rich plasma(PRP)가 골유도성을 나타내었고(Dinopoulos 등, 2012), 혈당대체제로 알려진 덱스트란(dextran)이 골유도성을 갖는다는 사실도 보고되었다(Cheng 등, 1994; Rickard 등, 1994).

이제까지 성장인자와 생체재료에 관한 많은 연구가 진행되었으나, 성장인자와 생체재료의 종류가 매우 다양할 뿐 아니라, 성장인자를 생체재료에 부착하는 방법도 다양해서 방출 속도를 제어할 수 있는 방법에 관해서는 명확한 해답이 제시되지 못하고 있다.

성장인자를 함유하는 생체재료, 즉 캐리어(carrier)로는 주로 고분자 재료가 널리 이용되어 왔으며, 고분자의 종류와 크기, 형태 등에 따라 방출 속도가 달라지게 된다. 성장인자가 고분자 재료의 표면에 부착되면 고분자 재료의 표면 물성이 변화하여 생체친화성, 생체활성 등이 저하된다는 우려가 있다(Son 등, 2011)

따라서, 본 연구에서는 인체의 뼈 및 치아와 화학적 조성이 유사하여 고분자 재료에 비해 생체친화성과 생체활성이 우수할 뿐 아니라, 독성과 발암성이 없다고 보고된 수산화인회석(Alexander 등, 1983; Boonsongrit 등, 2008; Jose 등, 2009; Kim 등, 2012; Sharma 등, 1993; Son 등, 2011)을 기본 조성으로 선택하여 나노 분말을 합성한 후에 구형체로 제조하였다.

나노 분말은 마이크로 분말에 비해 비표면적이 커서 세포의 이동, 단백질 흡착 및 골모세포의 부착에 유리하다고 보고되었다(Christenson 등, 2007; Li 등, 2006; Webster 등, 2000; Webster 등, 2001).

구형체는 다른 형태에 비하여 신생골의 골전도에 유리하고(Parsons 등, 1988; Salthouse 등, 1980; Weinlander 등, 1992), 치조골과 같이 하중을 받는 부위의 사용에도 적합하다고 알려져 있다(Misiak 등, 1984).

성장인자를 내부에 넣기 위해 속이 비어 있는 구형체로 제조하였으며, 이를 위하여 알지네이트를 비드 형태로 만들어서 템플레이트로 사용하였다. 구체적으로는 알지네이트 비드에 수산화인회석 현탁액을 코팅하였는데 알지네이트의 카복실

기와 수산화인회석의 카복실기가 화학 결합하여 코팅력을 갖게 된다.

수산화인회석의 비어 있는 내부 공간은 성장인자 또는 항생제를 담지할 수 있을 뿐 아니라, 혈관 신생과 신생골의 성장, 세포 이동 및 영양분 공급에도 유리하게 작용할 수 있다. 세포가 이동하기 위해서는 약 100 μm , 혈관 신생과 영양분 공급을 위해서는 300~500 μm 크기의 기공이 필요하다고 보고되었다(Davies, 2000; Gittings 등, 2005; Karageorgiou와 Kaplan, 2005; Rezwan 등, 2006).

비어 있는 내부는 수산화인회석 껍질의 기공을 통하여 바깥 표면으로 연결된 구조로 설계하였다. 이 기공을 통하여 내부로부터 성장인자가 방출하게 되며, 다공성 구조로 인한 높은 비표면적으로 인해 세포와 재료 간에 반응성도 향상될 수 있다.

그러나, 수산화인회석은 기공 구조와 기계적 물성을 위하여 소결 단계를 반드시 거쳐야하므로(Chaim 등, 2008; German, 1996) 열에 약한 성장인자를 소결 전에 담지하는 것은 곤란하여 소결 후에 기공을 통하여 넣었다.

본 연구에서는 성장인자를 대신한 기초 연구로 항생제인 반코마이신을 사용하였으며, 미국식약처(FDA)의 허가를 받은 대표적 고분자 생체재료인 PLGA로 인캡슐레이션(encapsulation)하였다. 에멀전-용매 증발법으로 PLGA 나노스피어를 제조하였으며, PLGA의 함량, 교반 시간, 계면활성제 함량, 용매의 증발 속도, 물과 유기상의 비율 등에 따라 Fig. 14에 나타난 바와 같이 다양한 구조로 제조할 수 있었다(Mainardes와 Evangelista, 2005).

Fig. 8에 나타난 H군의 전자현미경 사진에서 수산화인회석 구형체의 비어 있는 내부로부터 바깥 표면 쪽으로 기공이 연결된 것을 볼 수 있으며, 증류수 양이 증가할수록 기공 크기가 커지는 것을 볼 수 있다. 이는 기공이 증류수에 의해 형성되는 것으로 설명할 수 있다. 수산화인회석 현탁액을 알지네이트 비드에 코팅한 후 동결건조하는 과정에서 증류수는 -50°C 의 온도에서 동결하고, 압력을 낮추면 얼음이 승화되면서 기공이 발생하게 되는 것이다. 따라서, 기공 크기는 수산화인회석 현탁액의 증류수 함량에 의존하게 된다. 즉, 증류수의 양이 많을수록 기공이 커지게 된다. 증류수의 양이 많아지면, 상대적으로 현탁액 내의 수산화인회석 함량은 감소하게 되어, 현탁액의 점도가 낮아지기 때문에 알지네이트 비드에 코팅되는 두께가 감소하여 결과적으로 수산화인회석 구형체의 껍질이 얇아지게 된다. 또한, 기공이 커질수록 Table 2에 나타난 바와 같이 기공율이 증가하여 Table 3에 나타난 압축 강도는 감소하게 된다. 본 연구에서 H3군은

강도가 너무 낮아 조작하기 어려웠고, H1군은 H2군에 비해 기공율이 낮아서 H2군을 최적 조성으로 보고, 이를 대상으로 NaCl을 첨가하였다.

Fig. 9는 NaCl을 첨가했던 N군의 전자현미경 사진이다. N1군은 H군과 유사한 기공을 나타내고 있지만, N2군과 N3군은 불규칙한 기공 형태를 나타내고 있다. NaCl은 구형이 아닌 육면체의 형태를 갖고 있어서 증류수가 동결했다가 승화되는 과정에서 중간 중간에 남아 있다가 소결 과정에서 기화되면서 기공의 구조를 불규칙하게 만들게 된다.

항생제인 반코마이신의 방출 거동을 2주간 관찰하여 Fig. 12에 나타내었다. 수산화인회석 현탁액을 제조할 때, NaCl를 넣지 않았던 H2군은 초기에 급격하게 방출되어 2일만에 거의 90%가 방출되는 경향을 나타낸 반면, NaCl를 넣었던 N2군은 초기의 급격한 방출없이 시간에 따라 서서히 방출되는 경향을 나타내었다. 이것은 위에서 설명한 바와 같이, NaCl로 인해 기공이 불규칙한 형태를 갖게 되어 발생한 결과라고 생각되며, NaCl의 첨가가 항생제가 초기에 급격하게 방출되는 것을 억제하는데 효과적임을 알 수 있었다.

V. 결 론

본 논문에서는 치조골 재생을 위한 약물 서방 방출형 다공성 수산화인회석에 관하여 연구하고자, 수산화인회석 나노 분말을 제조한 후, 증류수로 현탁액을 만들어 알지네이트 비드에 코팅하고, 소결 과정에서 알지네이트 비드를 제거하여 속이 비어 있는 구형체로 제조하였다. 항생제인 반코마이신을 PLGA로 인캡슐레이션하여 수산화인회석 구형체의 비어 있는 내부로 넣어 복합화하였다.

1. 평균 직경 1.5 mm의 속이 비어 있는 수산화인회석 구형체를 제조할 수 있었으며, 껍질 두께는 20~100 μm 이었다.
2. 수산화인회석 현탁액의 증류수로 인해 형성된 0.5~10 μm 의 기공으로 비어 있는 내부와 표면이 연결되어 있는 다공성 구조로 증류수 양이 증가할수록 기공율과 기공 크기가 증가하였다.
3. NaCl을 첨가하여 반코마이신이 초기에 급격하게 방출되는 것을 억제하여 시간에 따라 서서히 방출되게 할 수 있었으며, 이는 기공 구조가 불규칙해졌기 때문으로 생각된다.

참고문헌

- Alexander H, Parsons JR, Ricci JL, Bajpai BK, Weiss AB. In DF Williams (ed.) CRC critical reviews. Boca Raton, CRC Press. 1987, p. 43.
- Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG. Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm Res* 2000;11:47-58.
- Boden SD. Bioactive factors for bone tissue engineering. *Clin Orthop* 1999;367:S84-S94.
- Boonsongrit Y *et al.* Controlled release of bovine serum albumin from hydroxyapatite microspheres for protein delivery system. *Mater Sci Eng B*. 2008;148:162-165.
- Cerroni L *et al.* Growth of osteoblast like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an *in vitro* study. *Biomol Eng* 2002;19:119-124.
- Chaim R *et al.* Sintering and densification of nanocrystalline ceramic oxide powders: a review. *Adv Appl Ceram* 2008;107:159-169.
- Cheng SL *et al.* Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994;134:277-286.
- Christenson EM *et al.* Nanobiomaterial applications in orthopedics. *J Orthop Res* 2007;25:11-22.
- Davies JE. Bone Engineering. 2000, EM Squared, Toronto.
- de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Davies JE. Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface *in vivo*. *J Biomed Mater Res* 1995;29:89-99.
- Dennis JE *et al.* Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1992;1:23-32.
- Dinopoulos H, Dimitriou R, Giannoudis PV. Bone graft substitutes: What are the options? *Surgeon* 2012;10:230-239.
- Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone

- formation and bone cell function. *Biomaterials* 1999;20:2287-2303.
- German RM: *Sintering theory and practice*. 1996, Wiley, New York.
- Gittings JP, Turner IG, Miles AW: Calcium phosphate open porous scaffold bioceramics. *Bioceramics* 17 2005:284-286:349-352.
- Healy KE. Molecular engineering of materials for bioreactivity. *Curr Opin Solid State Mat Sci* 1999;4:381-387.
- Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science* 1984;226:630-636.
- Hubbell JA. Bioactive biomaterials. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:123-129.
- Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Rel Res* 1981;157:259-278.
- Jose MV *et al.* Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2009;5:305-315.
- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26:5474-5491.
- Kim SM *et al.* Gelatin-layered and multi-sized porous β -tricalcium phosphate for tissue engineering scaffold. *Nanoscale Res Lett* 2012;7:1-5.
- Klein C *et al.* Biodegradation behavior of various calcium-phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res* 1983;17(5):769-784.
- Li WJ, Jiang YJ, Tuan RS: Chondrocyte phenotype in engineered fibrous matrix is regulated by fiber size. *Tissue Eng* 2006;12:1775-1785.
- Mainardes RM, Evangelista RC. PLGA nanoparticles containing praziquantel. effect of formulation variables on size distribution. *Int J Pharm* 2005;290:137-144.
- Mellonig J. Freeze-dried bone allografts in periodontal reconstructive surgery. *Dent Clin North Am* 1991;35:504-511.
- Misiek DJ, Kent JN, Carr RF. Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shapes. *J Oral Maxillofac Surg*. 1984;42:150-160.
- Nohe A *et al.* Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 2004;16:291-299.
- Parsons JR, Ricci JL, Alexander H, Bajpai PK. In P. Ducheyne, JE Lemons (eds.) *Bioceramics: material characteristics versus in vivo behavior*. (New

- York: The New York Academy of Sciences;1988, p. 191.
- Pittenger MF *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
- Quintero G, Mellonig JT. A six months clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allograft in periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1982;53:726-734.
- Rezwan K *et al.* Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413-3431.
- Richardson TP, Murphy WL, Mooney DJ. Polymeric delivery of proteins and plasmid DNA for tissue engineering and gene therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2001;11:47-58.
- Rickard DJ *et al.* Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 1994;161:218-228.
- Roy DM, Linnenhan SK. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature* 1974;248:220-222.
- Salthouse TN, Matlaga BF. Effects of implant surface on cellular activity and evaluation of histocompatibility. In: Winter GD, Leray JL, de Groot K, editors. *Evaluation of biomaterials*. John Wiley and Sons: New York, 1980. p. 295-305.
- Sakiyama Elbert SE, Hubbell JA. Functional biomaterials: design of noble biomaterials. *Ann Rev Mater Res* 2001;31:183-201.
- Sharma CP *et al.* Synthesis of biocompatible hydroxyapatite powders and granules. *Trends Biomater Artif Organs*. 1993;7:8-11.
- Schmitt JM *et al.* Bone morphogenetic proteins: An update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 1999;17:269-278.
- Son JS *et al.* Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres. *J Control Release* 2011;153:133-140.
- Suzuki Y *et al.* Alginate hydrogel linked with synthetic oligopeptide derived from BMP-2 allows ectopic osteoinduction *in vivo*. *J Biomed Mater Res*

2000:50:405-409.

Webster TJ *et al.* Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2000:21:1803-1810.

Webster TJ *et al.* Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin. *Tissue Eng* 2001:7:291-301.

Weinlander M, Plenk H Jr, Adar F, Holmes R. In A. Ravaglioli, A. Krajewski (eds) *Bioceramics and the human body*. New York: Elsevier Science Publishers; 1992, p. 317.

West JL, Hubbell JA. Polymeric biomaterials with degradation sites for proteases involved in cell migration. *Macromolecules* 1999:32:241-244.

Whitaker MJ *et al.* Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol* 2001:53:1427-1437.

Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop* 1999:367:S95-106.

감사의 글

이 글을 쓰면서 정말로 감회가 새롭고 감개무량합니다. 뒤늦게 시작한 학문의 길에서 이제 작은 결실을 맺게 되었습니다.

박사 논문은 치조골 재생 그리고 석사논문으로 임플란트 표면처리, 뼈와 임플란트에 관해 연구하는 동안 아낌없는 격려와 지도를 하시며 오늘 의 저를 있게 해 준 평생의 스승인 지도교수 고영무 교수님의 은혜에 깊이 감사드립니다. 또 바쁘신 가운데 논문을 심사해주신 위원장 서울대학교 양형철 교수님, 조선대학교 최한철 교수님, 부산대학교 설효정 교수님, 조선대학교 김병훈 교수님께 깊은 감사를 드리고 어렵던 시기를 동고동락한 동료 원장님, 곁에서 응원해준 후배들, 노인구강질환케어연구센터(MRC) 임직원과 연구원 여러분께 감사를 전하며, 또한 어린 시절부터 늘 사랑과 관심으로 나의 든든한 후원자로서 치과의사의 길로 인도해주신 형님과 형수님, 그리고 형제 누나들에게 정말 고맙고 감사합니다.

마지막으로 항상 곁에서 남편이 하고자 하는 어떤 일이던지 믿고 따라주며, 힘이 되어주는 아내와 아들 딸, 그리고 살아생전에 석사, 박사가 되어 남의 눈에 꽃이 되고 잎이 되라고 기도하시던 어머님께 고마운 마음을 전하며 이 논문을 바칩니다.

2015년 8월
서 기 원 드림