



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

2010년 2월

석사학위논문

# 이종골로부터 하이드록시아파타이트 제조 및 조골세포와의 생체 친화성

Preparation of hydroxyapatite derived from xenograft and its  
biocompatibility with human osteoblast cells

조선대학교 대학원

첨단부품소재공학과

고영화

# 이종골로부터 하이드록시아파타이트 제조 및 조골세포와의 생체 친화성

Preparation of hydroxyapatite derived from xenograft and its  
biocompatibility with human osteoblast cells

2010년 2월

조선대학교 대학원

첨단부품소재공학과

고 영 화

# 이종골로부터 하이드록시아파타이트 제조 및 조골세포와의 생체 친화성

지도교수 이 종 국

이 논문을 공학석사학위신청 논문으로 제출함.

2009년 10월

조선대학교 대학원

첨단부품소재공학과

고 영 화

# 고영화의 석사학위논문을 인준함

위원장    조선대학교    부교수    신동찬    인

위    원    조선대학교    조교수    강현철    인

위    원    조선대학교    교    수    이종국    인

2009년 12월

**조선대학교 대학원**

# 목 차

List of Tables .....	III
List of Figures .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	VI
<b>제 1 장. 서 론</b> .....	1
<b>제 2 장. 이론적 배경</b> .....	4
제 1 절. 생체재료 .....	4
제 2 절. 인산칼슘계 세라믹스 .....	8
1. 상 및 결정구조에 따른 생화학적 특성 .....	11
2. 인공합성법 .....	12
3. 골 대체용 인산칼슘계 세라믹스 .....	13
제 3 절. 조직공학 .....	16
1. 골 조직 .....	18
2. 조골세포 .....	18
제 4 절. 재료 표면에서의 조골세포 반응 .....	21
<b>제 3 장. 상용 분말 및 소 뼈로부터 하이드록시아파 타이트 제조 및 조골세포와의 생체친화성</b> .....	24
제 1 절. 서 론 .....	24
제 2 절. 실험방법 .....	26
제 3 절. 결과 및 고찰 .....	28
제 4 절. 결 론 .....	38

제 4 장. 소 뼈로부터 다공형 하이드록시아파타이트  
 제조 및 조골세포와의 생체친화성 ..... 39

  제 1 절. 서론 ..... 39

  제 2 절. 실험방법 ..... 41

  제 3 절. 결과 및 고찰 ..... 43

  제 4 절. 결 론 ..... 50

제 5 장. 종합 결론 ..... 51

참 고 문 헌 ..... 53

List of publications ..... 57

## List of Tables

**Table 1** Classification of bioceramics by biochemical activity

**Table 2** Kinds of calcium phosphate ceramics and their Ca/P ratios

**Table 3.** Synthetic methods of hydroxyapatite

**Table 4.** The color of bovine bone calcined up to 1200 °C for 1 h



## List of Figures

- Fig. 1.** Bioactive spectra for various bioceramic implants
- Fig. 2.** Solubility of calcium phosphate ceramics.
- Fig. 3.** Tissue engineering generally combines three key elements : scaffolds (matrices), signaling molecules(growth factors), and cells. By combining these elements, tissue regeneration can often be accomplished.
- Fig. 4.** Mechanism of bone remodeling.
- Fig. 5.** Temporal expression of genes characteristics of osteoblastic differentiation.
- Fig. 6.** (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of artificial HA after calcination at 800 °C for 1 h.
- Fig. 7.** (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of bovine bone derived-HA after calcination at 800 °C for 1 h.
- Fig. 8.** (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of artificial HA after sintering 1200 °C for 1 h.
- Fig. 9.** (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of bovine bone derived-HA after sintering 1200 °C for 1 h.
- Fig. 10.** FE-SEM micrographs of adherent cells on artificial HA with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days.
- Fig. 11.** FE-SEM micrographs of adherent cells on bovine bone derived-HA with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days.
- Fig. 12.** Cell proliferation measured as absorbance using MTS assay after cell culture for 1, 3 and 5 days on the artificial HA(AHA) and bovine bone derived-HA(BHA).
- Fig. 13.** (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of porous bovine bone derived-HA after sintering at 1100 °C for 1 h.
- Fig. 14.** (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of porous bovine bone derived-HA after sintering at 1200 °C for 1 h.
- Fig. 15.** Density of porous bovine bone derived-HA sintered at 1100 °C and

1200 °C.

**Fig. 16.** FE-SEM micrographs of adherent cells on porous bovine bone derived-HA sintered at 1100 °C with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days.

**Fig. 17.** FE-SEM micrographs of adherent cells on porous bovine bone derived-HA sintered at 1200 °C with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days.

**Fig. 18.** Cell proliferation measured as absorbance using MTS assay after cell culture for 1, 3 and 5 days on porous bovine bone derived-HA sintered at 1100°C and 1200 °C for 1 h.

# ABSTRACT

## **Preparation of hydroxyapatite derived from xenograft and its biocompatibility with human osteoblast cells**

Ko, Young Hwa

Advisor : Prof. Lee, Jong Kook, Ph.D.

Dept. of Advanced Materials Engineering,  
Graduate School of Chosun University.

Hydroxyapatite (HA) is well known as biocompatible and bioactive materials. HA has achieved the significant applications as bone graft materials in the range of medical and dental fields. When HA is implanted into osteogenic tissue, such as bone defects or medullary cavities, bone formation can occur on the surface and then the HA directly and strongly bonds to the bone.

An alternative for treatment of bone defects is the use of xenogenous bone, which is morphologically and structurally similar to human bone. Also, it is easy to obtain and available in unlimited supply with low production cost.

Bovine bone is composed of organic and inorganic components. The organic part contains mainly collagen and proteins, whereas the inorganic component is mainly hydroxyapatite with small amounts of other elements such as carbonate, magnesium and sodium being incorporated in the structure.

The present study evaluates the biocompatibility of HA ceramics for supporting osteoblast cells growth and cytotoxicity using the MG-63 cell line

model in vitro.

We used two types of HA. One was the commercially-obtained artificial HA, noted as AHA. Another was the bovine bone derived HA (BHA) which was obtained as follows. The fresh bovine bones were cut into small pieces and cleaned well to remove macroscopic adhering impurities. The bone pieces were boiled in distilled water for easy removal of the bone marrow and tendons. The boiled bones were dried at 80°C. The resulting product was crushed into small particles and they were ball-milled for 48 h. The BHA powder was calcined at 800°C for 1 h. The AHA and BHA disks were prepared by uniaxial pressing and cold isostatic pressing, followed by sintering at 1200 °C for 1 h under moisture protection.

MG-63 cells, a human osteoblast-like cell line were used to assess the cellular response to the AHA and BHA ceramics. The samples were placed in 24-well plates for MG-63 cells implantation at a set density of  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. The MG-63 cells were further incubated in DMEM(dulbecco's modified eagle's medium) solution supplemented with 10% FBS and 1% PS for 1, 3 and 5 days.

Following incubation of cells with two types of HA for indicated time in 24-well plate, cells were washed once with PBS(phosphate buffer saline). And then 35  $\mu$ ml of MTS solution and 350  $\mu$ ml DMEM solution of nothing excluded was added to each well. After incubating the plates at 37°C for 90 min, absorbance in control and the treated wells was measured in a plate reader at 490 nm. The samples were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). For the FE-SEM(field emission scanning electron microscope) observation, the samples were dehydrated in a graded series of ethanol and were treated with isoamyl acetate.

In chapter 3, We investigated the behavior of human bone cell on two types of hydroxyapatite (HA) ceramics. One was the AHA, the other was the BHA.

Porous hydroxyapatite from bovine bone was biocompatible in the tests performed and any cell morphological change was not observed by light microscopy. FE-SEM observation showed that most of MG-63 cells was stellar shape and formed intercellular matrix containing fibers on porous BHA. The

cells were well attached and grown up over the BHA surface meaning that there was no toxicity.

In chapter 4, The response of MG-63 cell to HA 1100 and HA 1200 from bovine bone was compared. The samples differentiated the thermal annealing temperature at 1100 and 1200°C in moisture protection for 1 h. The samples have the density of 65% and 82%. And then MG-63 cell line were used to assess the cellular response to sample.

We found that cells adhere to the surface of a sample after the cell culture for one day. Cytoplasm had been spread around the nucleus after the cell culture for 3 days. And then most of cells were extended to large area. Until 3 days, the cell viability was nearly same each other the growth of a cell after 5 days drastically increases in the porous BHA at FE-SEM and MTS assay.

# 제 1 장. 서 론

과학 기술 및 의료기술의 발전으로 인간 수명이 늘어나 고령화 사회로 변화하고, 각종 산업, 자연 재해와 문명의 발전에 동반한 질병, 그리고 국민 의식과 삶의 질 향상으로 인해 의료복지 서비스에 대한 국민들의 욕구가 날로 증가하고 있다. 이에 1970년대부터 생체재료를 이용한 인공장기 및 의료용구 개발 노력이 다각적으로 진행되어 현재 많은 상품으로 제조되고 있다.

생체재료란 인공 또는 천연의 재료로서, 인체 내에서 단기 또는 장기간 동안 인체의 조직, 기관 또는 기능을 치료, 보강, 또는 회복시키는데 사용되는 재료를 일컫는다. 물론 이는 모두 인체에 대한 친화성 또는 생체적합성이 우수한 재료를 말한다. 이러한 생체 재료 중에서 세라믹을 이용한 골 결손부위에 치료를 목적으로 하는 재료가 많이 연구되어 왔다. 골 결손부를 회복시키고 부족한 골 조직을 공급하기 위한 자가 이식(*autogenic graft*)이 조직·면역학적으로 거부 반응이 없어 많이 사용되었으나, 공급량의 한계로 인해 합성골 이식재가 자가골 이식의 대안으로 개발되어 왔다<sup>1, 2)</sup>.

현재까지 생체적합성이 가장 우수한 인공골용 임플란트 재료는 하이드록시아파타이트(*Hydroxyapatite*,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , 이하 HA로 표기함)로 알려져 있다.<sup>3)</sup> HA는 인산칼슘계 세라믹스 화합물 중 하나로 생체친화성이 우수하기 때문에 인공치아, 인공뼈 등의 생체용 세라믹 재료로 널리 활용되고 있으며, 최근에는 표면활성, 생체친화성 및 조직유연성을 이용하여 약물전달물질로 활용하는 연구가 활발하게 진행되고 있고, 그 활용성 및 사용범위가 급격히 증가하고 있다.

현재 HA의 합성법으로는  $\text{Ca}^{2+}$ 이온이 녹아 있는 용액에  $\text{PO}_4^{3-}$  이온이 함유되어 있는 용액을 서서히 적하시키는 방법인 습식 침전법이 가장 널리 이용되고 있다.<sup>57-61)</sup> 침전법으로 합성된 하이드록시아파타이트 분말은 약 20~50 nm 정도의 미세한 입자가 얻어지는 장점이 있으나<sup>41)</sup> 온도, pH, 출발원료의 조성 등 합성조건에 따라 Ca/P 몰비가 달라졌다. 이론 조성(Ca/P 몰비=1.67)에 맞지 않는 하이드록시아파타이트가 합성되었을 경우 열처리 도중  $\beta$ -TCP( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )와 같은 이차상으로 분

해되는 단점이 있다.<sup>42)</sup>

건식법은 조성의 제어는 용이하지만 분체특성 면에서 결점이 있으며<sup>43-50)</sup>, 수열법은 결정성이 뛰어난 분체가 얻어지지만 미세한 입자를 얻는 것은 어려운 것으로 알려져 있다<sup>51-56)</sup>. 또한 습식법과 건식법 등은 모두 열처리 하여 얻어진 치밀한 소결체가 사용되므로 열처리시 수산기의 분해나 수산화아파타이트의 전이로 인하여 광물학적 변화나 생체친화성의 손실이 없는 치밀한 수산화아파타이트 소결체를 얻는 것이 매우 중요하며, 실제로 이러한 소결체를 제조하는 과정에서는 많은 어려움이 따른다.<sup>5)</sup>

이러한 문제점 때문에 합성 인산칼슘계 세라믹 임플란트 소재는 시술 후 인산칼슘계 하이드록시아파타이트 코팅 층의 박리(delamination)나 입자이탈(particle loosening)이 일어나 기계적 성질이 크게 나빠지고 이로 인해 임플란트로서의 기능이 약화되거나 몸속에서 일부 파괴되어 염증유발 등 부작용을 나타내게 되어 이에 대한 해결방법이 대두되고 있다<sup>6)</sup>.

이에 비하여 동물 뼈로부터 얻은 생물학적 HA는 조성이 사람의 뼈와 거의 동일하기 때문에 생체적합성이 매우 뛰어나고, 제조하기가 비교적 쉬우며, 값싸게 대량으로 만들 수 있는 이점이 있다. 또한, 동물 뼈에서 추출한 HA의 경우 1000 °C 부근의 고온에서 하소한 후 다시 1200 °C 근처에서 소결을 하기 때문에 2차 감염에 대한 우려는 거의 해소되어 최근 의·공학 분야에서 동물 뼈로부터 추출한 HA 분말에 대한 관심이 커지고 있으며, 이에 대한 각종 특허도 급증하고 있다<sup>7)</sup>.

최근 조직공학의 발달과 더불어 인산칼슘계 생체재료를 이용한 3차원적 다공성 생체 재료에 관해 많은 연구가 되고 있다.<sup>8-9)</sup> 다공성 생체재료는 새로운 조직이 성장할 수 있는 공간을 제공하고 흡수되어 새로운 조직에 의해서 대체될 수 있어야 한다. 생체재료는 적용하고자 하는 부위에 대한 임계적인 물리적, 생물학적 특성이 요구된다. 골 재생용 생체 세라믹 재료는 골유도성이 아닌 골 전도성 재료이기 때문에 골 조직이 재료 내로 성장되어 들어올 수 있는 적당한 크기의 연결된 기공을 갖는 다공체로 사용되는 것이 바람직하며, 신생골의 성장속도와 유사한 생분해 속도가 요구된다.

일반적으로 생체 친화성은 기계적 친화성과 계면 생체 친화성이 구분되는데, 기계적 친화성으로는 강도, 마모, 탄성, 취성, 내구성, 장기간 생체 안정성 등이 있

으며, 계면 생체 친화성은 능동적 조직 결합형, 즉 생체 활성(bioactive)과 생체 불활성(bioinert) 등으로 분류된다. 생체 활성이란 주위조직에 부착하면서 그 표면을 제외한 모양과 유지하는 경우를 의미하며, 생체 안정성이란 인체에 대해 발열반응, 세포 유해성/비독성, 항원성, 발암성 등 유해 작용이 없으면서 생체 내에서 시간이 경과하여도 재료의 모양이나 구조가 유지되며 주위 조직에 부착되지 않는 것을 의미한다. 생체 생분해성(biodegradable)이란 주위 조직과 부착되면서 수주, 수개월 동안 모양과 구조가 유지되나 차차 모양과 구조를 상실하면서 조직으로 대체되는 것을 말한다<sup>10)</sup>.

따라서 본 연구에서는 동물 뼈에서 추출한 수산화 아파타이트를 사용하여 생체 내 환경과 유사한 조건으로 생체 외에서 조골세포와 재료와의 생체친화성을 알아 보았다. 동물 뼈로부터 뼈 성분인 하이드록시아파타이트를 얻는 방법은 공정이 단순하면서도 용이하기 때문에 비용이 적게 들 뿐만 아니라, 원료가 되는 소 뼈나 돼지 뼈 등이 매우 풍부한 편이다. 그리고 동물 뼈로부터 얻은 하이드록시아파타이트는 생체 내에서 안정하고 형상적으로나 구조적으로 인간 뼈와 가장 유사하다는 장점이 있다.

본 연구에서는 이중골인 소뼈를 이용하여 수산화아파타이트 미립 분말을 제조한 다음, 상압소결을 이용하여 다공질 및 치밀질 소결체를 제조한 다음, 제조된 소결체의 생체활성을 상용 HA와 비교하여 관찰하였으며, 또한 소결체의 치밀도 등 미세구조가 세포의 부착 및 성장에 미치는 영향을 고찰하여 평가하였다.



## 제 2 장. 이론적 배경

### 제 1 절. 생체재료

생체재료(biomaterials)란 일반적으로 “생체 내에서 손상된 장기나 조직의 일부를 대체하여 이들의 기능을 보완 또는 대신할 수 있는 물질”로 정의 하고 있지만 좀더 광범위하게는 “인체 이식재료 뿐만이 아니라, 인체의 질병을 진단, 치료하기 위한 수단으로 개발되어지는 재료로서 생체 조직, 혈액, 체액 등과 접촉 시 생체 거부반응이나 독성반응 등을 나타내지 않는 즉 “생체적합성(biocompatibility)” 을 갖는 물질”로 정의되고 있으며, 고분자, 금속, 세라믹 및 이들의 복합재료 중 일부가 이에 해당된다<sup>11)</sup>.

생체재료는 인체에 독성이나, 암유발성, 항원성이 아주 적거나 없어야 하며, 여기에다 주위 생체조직과 반응하여 원하는 목적을 달성할 수 있는 생체 활성이 요구된다. 생화학적으로 주위조직과 강도나 탄성계수가 비슷하여 상당기간 원래 조직의 기능을 대체할 수 있어야 하며, 주위 조직의 치유를 방해하거나 지연시키지 않아야 한다. 경제적으로는 재료의 가공이 쉬어야 하고 가격이 저렴해야 한다.

일반적으로 생체 친화성에는 기계적 친화성과 계면 생체 친화성으로 구분되며, 기계적 친화성으로는 강도, 마모, 탄성, 취성, 내구성, 생체 내에서의 장기간 안정성 등이 있으며, 계면 생체 친화성은 또 다시 능동적 조직 결합형, 즉 생체 활성(bioactive)과 수동적 비이물형, 즉 생체불활성(bioinert)등으로 구분된다. 생체 활성이란 주위조직에 부착하면서 그 표면을 제외한 모양과 유지하는 경우를 의미하며, 생체 안정성이란 인체에 대해 발열반응, 세포 유해성/비독성, 항원성, 발암성 등 유해 작용이 없으면서 생체 내에서 시간이 경과하여도 재료의 모양이나 구조가 유지되며 주위 조직에 부착되지 않는 것을 의미한다. 생체 분해성(biodegradable)이란 주위 조직과 부착되면서 수주, 수개월 동안 모양과 구조가 유지되나 차차 모양과 구조를 상실하면서 조직으로 대체되는 것을 말한다.<sup>10)</sup>

생체 친화성이 있는 세라믹스는 용도에 따라 여러 형태로 제조되고 있으며, 그

들의 응용에 대하여 Table 1에 나타내었다.<sup>12)</sup>

세라믹과 생체와의 이식기간에 따른 관계가 제안되었는데, 이에 따르면 크게 3 종류의 생체용 세라믹 재료로 구분할 수 있다. 첫 번째로, 생체 내에서 흡수(resorption)되고 최종적으로는 골 조직과 치환되는 역할을 하는 물질이 그것인데 대표적으로 제3인산칼슘(tricalcium phosphate, TCP)이 있다. 이것은 생체 내 대사에 의해 시간이 경과함에 따라 흡수되며, 이는 결국 새로운 골로의 전환을 의미한다. (Fig. 1의 A) 두 번째로, 생체 내에서 거의 불활성(bioinert)한 성질을 가지는 물질로 알루미나(alumina,  $Al_2O_3$ )나 탄소 재질의 재료들이 있다.(Fig. 1 D) 이러한 불활성 물질들은 체액 내에 장기간 인식했을 때 특별한 화학적 변화를 일으키지 않으며 골 조직과의 결합은 기계적으로만 유지된다. 마지막으로, 위의 두 가지의 중간성질을 나타내는 생체활성 유리(bioactive glass) 등이 있는데 이것은 부분적 혹은 선택적으로 화학반응이 일어나는 재료이다.(Fig. 1의 B와 C)<sup>13)</sup>

생체조직의 대체를 위한 이식재료로서의 알루미나의 조건은 순도 99.5% 이상의  $Al_2O_3$  성분을 갖춰야 하며 약  $3.9 \text{ g/cm}^3$  정도의 밀도를 가진다. 알루미나는 강도와 경도가 세고 마찰이 적으며, 강한 내마모성, 내부식성 등 높은 생체적합성을 나타내는 재료이므로, 고관절, 무릎관절, 골절용 나사, 치아 대체용 등의 재료 및 성형 재료로 꾸준히 사용되어 왔다. 지르코니아(zirconia,  $ZrO_2$ )도 알루미나와 비슷한 성질을 가지고 있으며, 고강도 및 비교적 저탄성률을 지녀 인공 고관절에 많이 응용되고 있다. 하이드록시아파타이트, 글라스-세라믹 등이 대표적이다.

이 중 하이드록시아파타이트는 좀 더 비중 있게 다루기 위해서 뒤에서 설명하도록 한다. 글라스-세라믹은 1960년도 개발된 다결정 구조의 세라믹인데, bioglass, ceravital 등의 제품들이 이식용으로 사용되어지고 있다<sup>66-67)</sup>. 이러한 제품들은 골과 같은 경조직에 직접 결합이 되는 생체 활성 물질이기 때문에 약한 강도 때문에 직접적으로 힘을 받는 부위에는 사용할 수 없지만 골 시멘트와 같은 다른 재료들과 함께 사용되고 있다.

복합재료는 위에서 언급한 물질들을 두 가지 이상 조합하여 만들어진 재료들을 말한다. 여기에는 다양한 응용방법이 있는데, 대표적으로는 금속재료를 사용해 기계적인 강도를 얻고 동시에 표면 처리를 통해 무기 세라믹 박막 등을 합성하여 생체적합성을 향상시키는 연구들이 보고되어 있다<sup>14)</sup>.

**Table 1.** Classification of bioceramics by biochemical activity<sup>12)</sup>

Type	Tissue attachment	Examples
Bioinert	Mechanical interlock (morphological fixation)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , ZrO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub>
Bioactive dense	Interfacial bonding with tissue	Bioactive glasses Bioactive glasses-ceramics Dense HA
porous	Tissue ingrowth into pores	Porous HA HA coating on porous metals
Bioresorbable	Replacement with tissues	Tricalcium phosphate(TCP) Calcium metaphosphate(CMP) Bioactive glasses

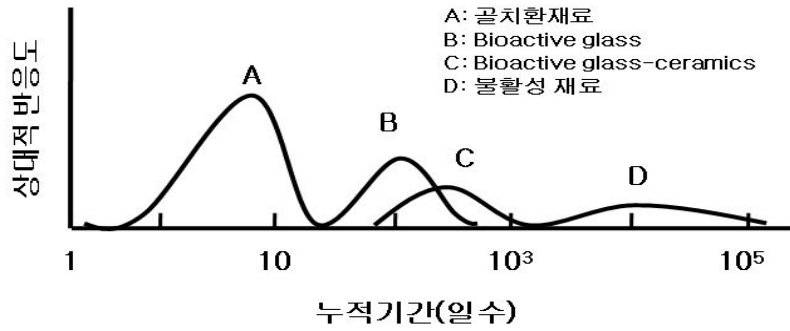


Fig. 1 Bioactive spectra for various bioceramic implants.<sup>13)</sup>

## 제 2 절. 인산칼슘계 세라믹스

인산칼슘계 화합물은 골의 무기물 성분과 유사한 화학적 조성을 가지고 있어 경조직 대체 재료로 많이 사용되고 있는데, HA와 TCP (tricalcium phosphate)의 화학적 조성변화를 통한 생체 활성도 향상과 기계적 특성 개선을 위한 고밀도화 공정개발이 연구의 주류를 이루고 있다<sup>15)</sup>. 현재까지 인산칼슘계 화합물은 낮은 강도 및 취성 때문에 하중지지대로는 사용하지 못하고 주로 골 결손부위를 복원시켜 주는 골수복재에 사용하고 있는데, 다공질 및 치밀질 형태로 제어하여 여러 형상을 갖는 임플란트가 개발되고 있다.

인산칼슘계 세라믹스의 특성은 Ca/P 몰 비, 탄산이온 농도 또는 결정성 등 제조하는 방법 및 합성조건에 따라 모두 달라지는데, 임플란트로서 체내에 매식하였을 경우 체액과의 반응이 인산칼슘계 세라믹스의 종류에 따라 달라지기 때문에 골수복능력에 차이를 보이게 된다. Fig. 2과 Table 2에 바이오세라믹스로서 사용되고 있는 각종 인산칼슘계 화합물의 종류 및 용해도 특성을 나타내었다.

인산칼슘계 세라믹스는 합성 시 Ca/P 비 및 함유된 이온의 종류에 따라 여러 종류가 생성된다. 인산칼슘계 세라믹스는 상 및 조성에 따라 용해도가 크게 변화하며, 이중 용해도가 큰 조성은 Ca/P 비가 0.5~1.0인 일인산칼슘과 이인산칼슘계이고 용해도가 작은 조성은 Ca/P 비가 1.33~2.0인 인산칼슘계 세라믹스이다<sup>16)</sup>. 즉, 용해도가 조성이나 입자크기, 결정상에 따라 크게 변화하며, OCP, HA는 용해도가 매우 낮고 TCP, TTCP는 물에서 부분적으로 용해가 일어난다.

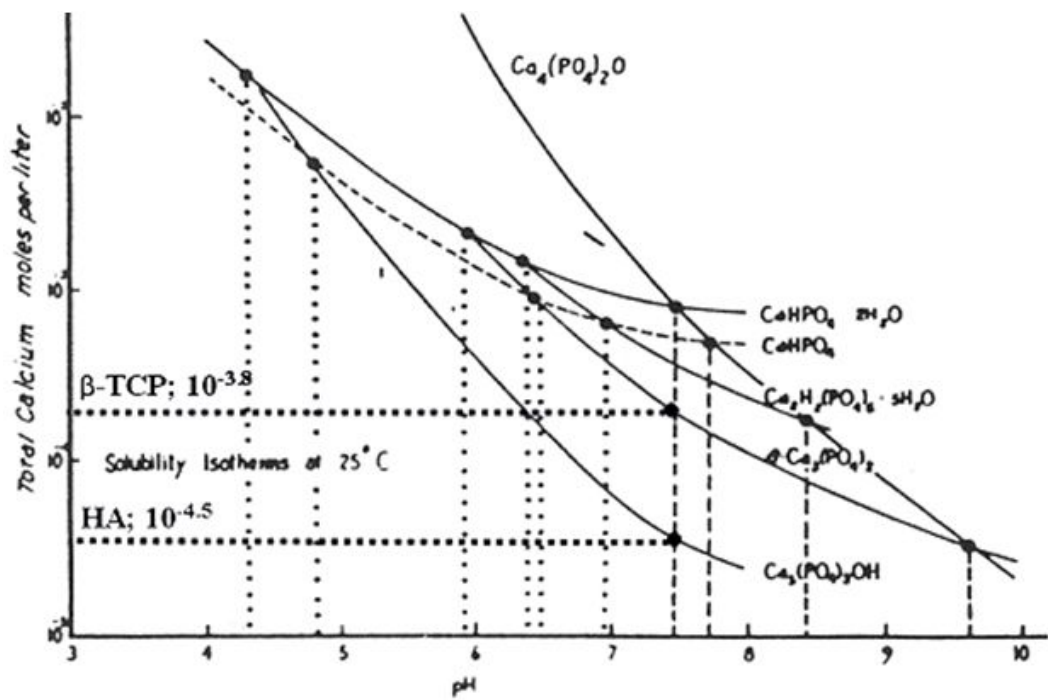


Fig. 2. Solubility of calcium phosphate ceramics<sup>17)</sup>.

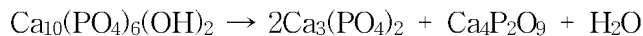
**Table 2.** Calcium phosphate ceramics and their Ca/P ratios<sup>18)</sup>

	Composition	Ca/P ratio	Solubility
Dicalcium Phosphate Dihydrate(DCPD)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	$2.34 \times 10^{-6}$
Dicalcium Phosphate Anhydrate(DCPA)	$\text{CaHPO}_4$	1.0	$9.50 \times 10^{-7}$
Octacalcium Phosphate(OCP)	$\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$	1.33	$5.02 \times 10^{-50}$
Hydroxyapatite(HA)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 \cdot \text{OH}$	1.67	$2.13 \times 10^{-59}$
$\beta$ -Tricalcium Phosphate( $\beta$ -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50	$2.09 \times 10^{-30}$
$\alpha$ -Tricalcium Phosphate( $\alpha$ -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50	$3.16 \times 10^{-26}$
Tetracalcium Phosphate(Te-CP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_2)$	2.0	$8.32 \times 10^{-31}$

## 1. 상 및 결정구조에 따른 생화학적 특성

현재까지 거의 완벽하게 생체 친화성 및 생체 활성을 나타내는 재료로는 HA, TCP 등의 인산칼슘계 화합물이 잘 알려져 있다<sup>12)</sup>. 그 중에서도 HA는 기본 조성이  $A_{10}(MO_4)_6X_2$ 로 육방정계 P6<sub>3</sub>/m에 속하는 결정 화합물 군이며, 비교적 고온에서도 OH기를 가지고 있는 물질이다<sup>19)</sup>. 특히 A=Ca, M=P, X=OH, F, Cl, CO<sub>3</sub>는 뼈의 구성 성분으로서 매우 중요하다. 일반적으로 뼈는 약 65%의 무기물질과 35%의 유기물질로 이루어져 있으며, 인체 내 경조직 (hard tissue)이라고 불린다<sup>21)</sup>. 물에는 약간 용해하여 약알칼리성을 띠고, 산에는 용이하게 용해되지만 알칼리에는 난용성이다. 우수한 이온교환을 가지며, Ca<sup>2+</sup>는 Hg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> 등의 이온에 의해 용이하게 치환된다. 또한, F<sup>-</sup>이온도 잘 치환되며, 치환속도는 빠르다.

HA는 약 800 °C 부근에서 결정수의 이탈 현상이 발생하며, 열분석 시 이 온도에서 매우 넓은 흡열반응을 관찰할 수 있다<sup>22)</sup>. HA는 1000-1500 °C의 온도에서 소결하는데 소결 후 안정상은 온도, 수증기압, 초기 분말 내 Ca/P 몰 비 등에 의해 결정된다. 만일 소결 시 수증기압이 충분히 높은 경우, 약 1350 °C의 온도까지 HA는 안정하지만, 수증기가 존재하지 않는 경우에는 다음 반응을 통하여 TTCP (tetracalcium phosphate, Ca<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>9</sub>)와 TCP (tricalcium phosphate, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)로 분해되는 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>.



HA는 생체친화성이 우수하여 인공치, 인공뼈 등의 바이오세라믹스 재료로 응용되는데, 생체조직과 잘 결합할 뿐만 아니라, 생체에 독성이 없고 반응에 의한 이물질이 생성되지 않으며, 주위 조직과도 잘 결합한다. 또한 기계적 강도가 강하고 조직이 치밀하여 골과 유사한 강도를 가지고 있으나, 생체 내에서 기계적 성질이 열화되어 장시간 사용하기에는 곤란한 단점이 있다.

HA의 가장 대표적인 임상학적인 응용 예로는 금속 임플란트 표면 위에 HA를



코팅하여 금속에 생체 적합성을 부여한 것인데, HA 코팅층은 뼈와의 접합성을 높이고 체액과의 반응에 의한 금속 이온의 용출을 방지할 뿐 만 아니라 금속 표면을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>24)</sup>.

그러나 금속 임플란트에 HA 코팅층을 사용한 경우 대부분 순수한 HA 결정 이외에 각종 염이나 비정질 인산칼슘(ACP, amorphous calcium phosphate), CaO, TCP, TTCP 등 다른 물질을 다량 함유하게 된다<sup>25,26)</sup>. 이와 같은 조성이 코팅층에 생성되는 원인은 크게 두 가지인데, 대부분 코팅 공정 시 원료로 사용되는 각종 염으로부터 유입되거나 높은 공정온도에 의한 HA의 열분해에 의해 형성되는 것으로 알려져 있다<sup>27,28)</sup>. 이러한 불순물들은 생체 내에서 혈액과 반응하여 쉽게 용해되기 때문에 코팅층의 화학적 안정성을 감소시키며, 장기적으로는 금속 표면 위 HA 코팅층을 기계적으로 열화 시켜 금속 임플란트로부터 코팅층을 이탈시키는 것으로 알려져 있다<sup>29,30)</sup>. 이와 같이 임플란트로부터 이탈된 HA 입자덩어리는 때때로 체내에서 염증을 일으키거나 정상적인 관절사이에 끼여 마모(third body friction)를 일으키는 부작용을 유발하게 된다.

## 2. 합성법

HA의 합성법에는 분말의 원료를 고온에서 고상반응에 의해 합성하는 건식합성법, 용액 중에서 이온 반응을 이용한 습식합성법, 고온, 고압 하에서 합성하는 수열합성법과 flux법<sup>61-65)</sup> 그리고 동물의 뼈로부터 생물학적 HA를 추출하는 방법 등이 있다.

건식합성법은 Ca/P 몰비를 화학양론 조성비인 1.67로 제어하는 것이 용이하지만, 고온의 수증기 분위기에서 합성해야 하고 또한 고상반응을 거치기 때문에 생성물이 무정형의 응집체로 얻어지는 경우가 많다<sup>43-50)</sup>. HA 합성법으로 가장 폭넓게 이용되고 있는 방법은 습식 합성법으로서 침전법과 가수분해법 등이 있다. 침전법은  $Ca^{2+}$  이온과  $PO_4^{3-}$  이온이 용해되어 있는 용액을 반응시키는 방법으로, 1963년 Hayek에 의해 처음으로 침전법에 의해 HA 분말이 합성되었다<sup>31,57-61)</sup>. 침전법은 미

제한 입자를 얻을 수 있는 장점이 있으나, Ca/P 몰비가 1.67보다 낮은 비화학양론 조성으로 되기 쉽고 1차 입자들이 응집되기 쉬운 단점이 있다. 가수분해법은 인산 칼슘계 화합물을 적절한 온도 및 pH의 수용액 내에서 가수분해 시켜 비화학양론 HA 또는 인산팔칼슘 (octacalcium phosphate,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )을 얻는 방법인데, 가수분해법을 이용할 경우, 입자의 크기 및 형태를 조절할 수 있으며 대량생산이 가능한 이점이 있으나, 적절한 출발 물질과 반응조건의 선택이 매우 중요하다.

1956년 Peroff 등이 0.3 mm 두께의 HA를 성장시킨 이후 수열 합성법이 연구되기 시작하였는데, 이 방법은 HA 고유 특성을 분석하기 위한 단결정을 얻는데 주로 이용되며, 장시간의 처리과정을 거쳐야 하고 다량처리가 어렵다는 단점이 있다<sup>32)</sup>.

가장 일반적인 HA 분말 합성법인 침전법은 Ca/P 몰비, pH, 온도, 농도, 숙성시간 등의 합성 조건에 따라 다른 결과를 보이며, 결정성 HA 분말을 합성하기 위해서는 비정질 인산칼슘 상태를 거치는 문제가 있다. 이에 비하여 동물 뼈로부터 얻는 생물학적 HA는 조성이 사람의 뼈와 거의 동일하기 때문에 생체적합성이 뛰어나고 제조하기가 비교적 쉬우며 값싸게 대량으로 만들 수 있는 장점이 있다. 이러한 HA 분말은 현실적으로 이식이 필요한 환자들이 2차 감염에 대한 선입견에 의해 기피하는 경향이 있어 사용에 제한이 따르고 있으나 실질적으로 1000 °C 부근의 고온에서 하소한 후 다시 1200 °C 근처에서 소결을 하기 때문에 2차 감염에 대한 우려는 거의 해소되었다.

### 3. 골 대체용 인산칼슘계 세라믹스

뼈를 구성하는 성분은 무기질이 약 70%를 차지하는데 주로 하이드록시아파타이트의 형태를 가지며 나머지 약 30%는 유기질로 대부분이 섬유성 단백질 콜라겐이다. 뼈 결손의 치료에는 여러 가지 방법이 있으며, 일반적으로 자가 뼈 이식 (autograft), 동종 뼈 이식(allograft), 인공 뼈 이식(artificial bone graft)으로 나눌 수 있다. 자가 뼈 이식의 경우 회복이 빠르고 합병증이 적은 장점이 있는 반면,

쓸 수 있는 양이 제한되어 있고 추가적인 수술을 필요로 하는 등 여러 단점들이 있다. 동종 뼈 이식은 세균 전염의 우려가 있어 최근에는 인공뼈 이식이 많이 행해지고 있으며, 주로 인산칼슘계 세라믹스 등 무기물이 인공 뼈 재료로 많이 쓰인다.

인산칼슘계 세라믹스 중 우수한 생체적합성으로 인하여 생체재료로 많이 쓰이는 하이드록시아파타이트의 합성방법에는 분말의 원료를 고온에서 고상반응에 의해 합성하는 건식합성법, 용액반응을 이용하는 습식합성법, 고온 및 고압 하에서 합성하는 수열합성법 등이 있으며, 하이드록시아파타이트의 합성법과 반응식을 Table 3에 나타내었다. 이러한 제조법은 결정도가 낮거나 입자 간의 응집이 심하여 화학양론적인 하이드록시아파타이트를 제조하는 데 어려움이 있다<sup>33)</sup>.

장기간 생체 내에서 용해가 일어나지 않는 동물 뼈의 경우 하이드록시아파타이트 합성 시 원료 면에서 매우 풍부하기 때문에 동물 뼈의 재활용에 대한 연구가 다방면으로 진행되고 있다. 일반적으로 동물 뼈는 뼈 표면을 싸고 있는 흰색의 섬유성막인 골막과 뼈의 표층을 차지하는 견고하고 치밀한 부분인 치밀질, 양골단부에 얇은 판상의 골질이 복잡하게 짜여져 많은 갯숨모양으로 이루어진 해면질, 그리고 수강이나 수소실에 들어있는 연한 조혈 조직인 골소 등으로 구성되어 있다.

동물 뼈는 유기질인 골기질에 무기염이 침착된 것이며, 약 1/3의 유기질과 2/3의 무기질로 구성되어 있다. 동물 뼈의 조성은 인산칼슘이 전체 성분의 1/2 이상을 차지하고 있으며, 유기질, 탄산칼슘, 인산마그네슘의 순서로 나타난다. 동물 뼈에서 하이드록시아파타이트를 추출하는 방법은 뼈를 직접 처리하여 얻기 때문에 Ca/P 물비를 맞추는 필요가 없고, 유기물을 완전히 제거하는 온도범위에서 열처리를 하므로 이차적인 감염이나 인간 면역 결핍 바이러스, 광우병 같은 위험성을 막을 수 있다.

**Table 3.** Synthetic methods of hydroxyapatite.

Method		Chemical reaction
Wet	Precipitation <sup>17)</sup>	$10\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + 6(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
	Hydrothermal <sup>7)</sup> crystallization	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
	Hydrolysis <sup>22)</sup>	$10\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
	Sol-gel <sup>12)</sup>	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Dry	Solid state <sup>22)</sup> reaction	$3\text{Ca}(\text{PO}_4)_2 + \text{CaCO}_3 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Hydrothermal <sup>17)</sup>		$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CaO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

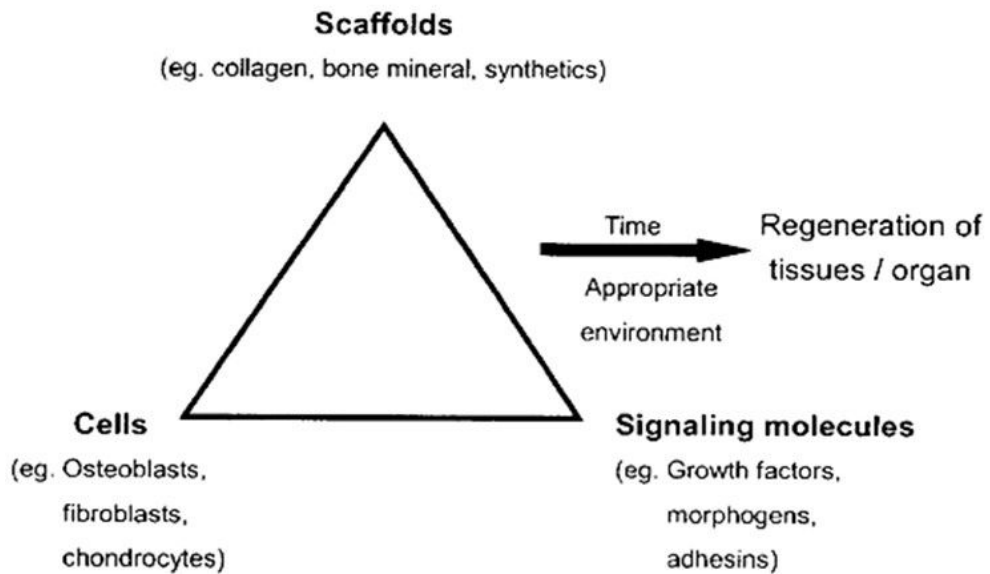
### 제 3 절. 조직공학

조직공학이란, “손상된 조직과 기관의 기능을 회복시키거나 유지, 향상시키기 위한 것으로 생물학적 대체물의 발전과 더불어 공학과 생명과학의 원리를 기초로 하여 형성된 응용학문”이라고 정의하고 있다. 조직공학은 불과 몇 년 전만 해도 과학자들에게 생소한 학문이었으나 이제는 너무나 잘 알려진 학문으로 발전하였다.

조직공학의 이론적 배경은 두 가지로 요약할 수 있는데 이는 선택적 세포 이식과 인공기질의 개념이라 할 수 있다. 선택적 세포이식이란 장기 전체를 이식하지 않고 장기 중에서 필요한 조직 또는 세포만을 선택적으로 분리하여 이식한다는 개념이고, 인공기질의 개념은 세포가 조직을 형성하는 데는 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)이 지지체와 같은 역할을 하며 인공적으로 만든 기질에서도 같은 효과가 나타난다는 것이다. 이러한 이론적 배경을 바탕으로 살아있는 세포와 장기의 모양으로 만들어진 고분자 담체로 인체에서 손상된 부분을 대체하거나 재생되도록 도와주고 매개체의 역할을 감당하도록 할 수 있다.

Fig. 3 에서 보는 것처럼 조직공학적 인공장기는 세 가지 중요한 요소가 서로 상호관계로 이어져 있다. 앞에서 언급했듯이 장기의 형태를 갖는 담체와 골세포나 조직세포, 연골세포와 같은 다양한 세포, 이에 수반되는 성장인자들이나 morphogen, adhesion 와 같은 signaling molecule 이다. 앞의 세 가지 요소들이 어우러져서 이식 후 일정 시간이 지나 새로운 조직이나 기관으로 재생되는 것을 조직공학적 인공장기라 한다<sup>34)</sup>. 세포가 인공적으로 만들어진 생분해성 고분자 담체에 점착되고 성장하면서<sup>35-37)</sup> ECM을 분비하면서 새로운 장기가 형성되어가고 담체인 생분해성 고분자는 점차적으로 분해하여 물과 이산화탄소로 인체에서 배출 된다<sup>38)</sup>. 조직공학을 통해 만들어진 인공 장기는 자신의 세포를 소량 분리한 후 실험실에서 대량 배양하고, 고분자 담체에 배양되기 때문에 인간복제나 유전자 조작과 같은 사회윤리 문제를 배제시킬 수 있고 자기 세포를 사용하기 때문에 인체에서 거부반응을 일으키지 않는다는 장점을 가지고 있다.

## Tissue Engineering Triad



**Fig. 3** Tissue engineering generally combines three key elements : scaffolds (matrices), signaling molecules(growth factors), and cells. By combining these elements, tissue regeneration can often be accomplished.<sup>34)</sup>

## 1. 골 조직

골 조직은 다른 조직들과는 달리 단단한 ECM로 구성되어 있어 다른 조직에 비해 기계적인 하중을 잘 견디게 된다. 상피조직과 같은 세포의 기질은 상대적으로 수화된 젤 형태를 가지며, 세포들을 지지하거나 세포들을 연결하여 주는 역할을 수행한다. 세포의 기질을 포함하는 결합조직을 형성하는 세포는 조직에 따라 서로 다르게 명명되는데, 대표적으로 피부나 인대에서는 섬유모세포(fibroblast), 골 조직에서는 조골세포(osteoblast)라고 한다. 일반적으로 골형성과정은 성장-조절 인자들의 순차적인 발현을 통해 이루어진다. 골 생리학적 관점에서 세포, 분자, 그리고 골 격계를 구성하고 있는 성분들이 상호 간에 영향을 미치는 복잡한 내부 관계를 가지고 있다. 골을 구성하고 있는 계에서는 역학적인 요소들과 분자들에 의한 영향들 함께 받으며 균형이 잘 조절된 조건하에서 광물의 재흡수와 침착 반응을 유지하며 재구성되는 과정을 반복한다<sup>39)</sup>. 이러한 과정을 골 재건(bone remodeling)이라고 한다(Fig. 4).

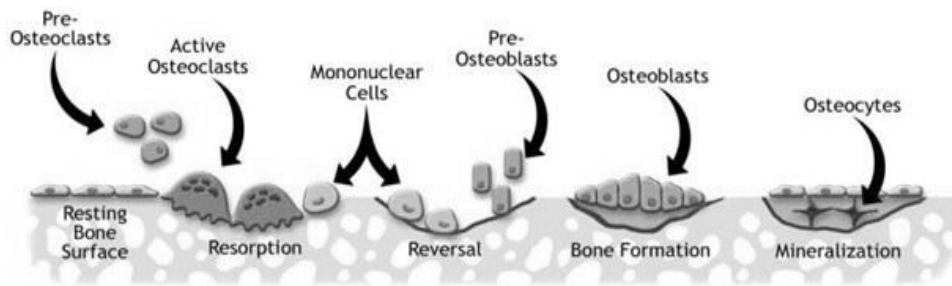
## 2. 조골세포

골조직은 크게 세 가지 형태의 세포로 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast), 골세포(osteocyte)로 분류할 수 있다. 일반적으로 골형성 세포(bone-forming cell)의 정의는 실제 골을 만드는 세포이다. 조골세포는 골 형성 세포라는 말과 거의 동일하게 생각할 수 있다. 그것은 골이 형성되는 어느 곳이든 조골세포가 있다는 사실로부터 유추된 것이며, 이에 대한 근거는 네 가지로 구분하여 설명할 수 있다. 첫 번째는 특이적 성질을 나타내는 marker들을 포함한 조골세포의 초미세구조와 기능적인 특성이며, 두 번째는 조골세포의 계통, 세 번째는 골 형성에서의 핵심과정, 네 번째는 세포들과 연관된 특별한 조절기전 등이다. 조골세포의 특징 중 하나는 조직화학적 방법인 alkaline phosphatase 효소의 존재와 그 양을 통해 설명할 수 있다. 골에 특이적인 alkaline phosphatase는 조골세포의 기질막 쪽에 국지화되어 있는데, 이에 대한 기능과 역할은 아직 정확하게 밝혀져 있지

않았지만 alkaline phosphatase가 다량으로 존재할 경우엔 골 형성과 많은 관계가 있다는 것은 확실하다. 즉 혈액 속에 골 특이적 alkaline phosphatase 양이 급격하게 상승하는 것은 조골세포의 과도한 활성화 혹은 골의 형성을 의미한다고 볼 수 있다.

조골세포는 조골세포 전구체(pre-osteoblast)로부터 유래되며, 골 합성에 필요한 모든 분화와 관련된 기능들을 발현한다. 조골세포는 점진적인 분화단계를 거치기 때문에 세포가 성숙된 형태로 골 표면을 형성할 때에 이르러서야 완전히 발현되었다고 할 수 있다. 조골세포가 골 표면을 형성하게 되면, 이것의 기능이 교원질(collagen), 비교원질 기질(noncollagenous matrix) 단백질들과 조절 인자(regulatory factor)들을 구조화된 배열 내로 합성 및 분비하게 되며, 궁극적으로는 이것들을 광물화시킨다. 보통 활성화 된 조골세포들은 그들 자체가 스스로 합성한 기질 내에 존재한다.





**Fig. 4** Mechanism of bone remodeling<sup>39)</sup>.

## 제 4 절. 재료 표면에서의 조골세포 반응

생체 재료의 생물학적인 반응 및 생체적합성을 확인하기 위한 *in vitro* 실험을 진행하기 위해서는 실제 적용 대상인 인간의 세포를 이용하여 표면의 물리화학적 성질과 세포의 반응과의 관계를 규명할 필요가 있다. 이러한 관점에서 새롭게 만들어진 생체재료와 대상되는 세포와의 반응을 확인하기 위한 여러 가지 요소들에 대한 연구가 진행되고 있다.

세포의 부착에 영향을 줄 수 있는 요소들은 매우 다양하며, 우선 그것들을 분류해 보고 각각의 특성을 확인하는 과정은 재료의 생체적합성을 확인하는 측면에서 중요하다. 여기서 재료 표면의 성질을 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫째는 표면의 거칠기, wettability, 결정성, 표면 에너지 및 화학적 작용과 같은 물리화학적 성질이다. 둘째로 물리화학적 성질에 따른 표면과 단백질, 단백질과 단백질, 단백질과 세포에 대한 반응이 각각 다르게 된다. 이러한 반응은 결국 부착된 세포 내부의 단백질 합성 및 신호전달에 관계되어 세포의 형태, 퍼짐현상, 증식 그리고 분화 등에도 영향을 미치게 되고, 반대로 이러한 현상을 통해 내부 신호 전달에 대한 현상 규명이 가능하다.

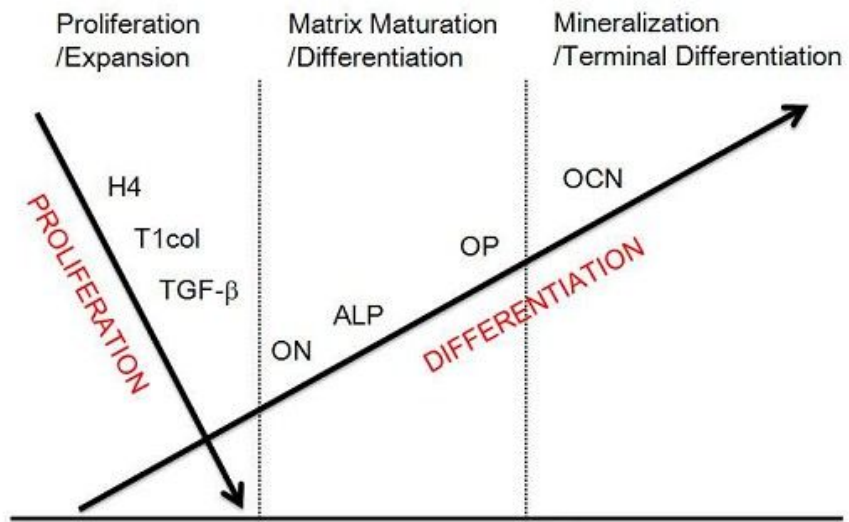
실제로 물리화학적인 성질 중 표면의 거칠기가 세포에 대해 미치는 영향은 여러 연구 사례에서 보고된 바 있다. 조골세포에 대한 실험에서, 대체로 매끈한 표면보다 거친 표면에서 세포의 부착 및 증식이 더 증가하는 것으로 나타났다. wettability의 경우에는 재료 표면의 contact angle을 측정하여 나타내는데 보다 높은 wettability를 가진 친수성 표면이 소수성 표면에 비해 높은 생물학적인 반응을 나타낸다.

표면의 결정성과 조골세포의 반응에 대한 연구에 있어서는 대체적으로 결정성이 낮은 표면 혹은 무정형의 표면에서 세포의 부착 및 증식이 높은 것으로 나타났다. 또한 표면에너지 및 화학적 작용에 의한 초기 단백질 흡착의 차이는 세포 부착에도 상당한 영향을 일으키게 된다. 앞에서 언급한 바와 같이 재료 표면의 물리·화학적 성질은 세포 내부의 복잡한 기전에 영향을 미치게 되는 데 이러한 영향

들에 대한 연구 역시 비교적 상세히 수행되었다.

세포의 성장과 분화는 초기 세포 부착에 많은 부분 영향을 받는다. 세포의 부착 혹은 퍼지는 동안 물리·화학적 성질에 의한 형태적 변화는 세포의 모양과 형태를 조절하는 역할을 하는 골격 구조의 재조직화와 연관이 있다. 최종적으로는 조골세포 내부의 신호전달 체계에 관여하게 되고, 조골세포의 성숙 단계에도 영향을 미치게 된다. 조골세포의 분화를 증식, 기질 성숙, 그리고 광물화의 3단계로 나누는데 각각 확장, 분화 말기분화로 부르기도 한다. 이러한 용어 자체의 구분에 큰 의미가 있는 것은 아니며, 보다 쉬운 이해를 위해 두 가지 용어를 병기하였다. 이제, 조골세포의 증식과 분화에 대한 시기 및 형태에 따른 유전자들이 발현 정도를 종합하여 설명하고자 한다.

Fig. 5에 따르면 type I collagen(T1col)과 히스톤(histone H4), 그리고 transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )의 유전자는 조골세포가 증식/팽창기(proliferation/expansion phase)에 있을 때 가장 큰 발현을 보이며, 이후에는 감소한다. 광물화/말기분화(mineralization/terminal differentiation)기에 들어서면 osteopontin(OP) 및 osteocalcin(OCN) 유전자가 가장 높은 발현을 나타내기 시작한다. 이러한 결과를 토대로 하면, 조골세포에 있어 증식 및 분화의 표현형에 대한 정보(phenotypical information)을 얻을 수 있다. 이것은 다시 말하면, 위의 언급된 특이적인 유전자들의 발현을 확인함으로써 약물, 혹은 생체 재료의 생물학적인 특성을 추론할 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 정보는 재료를 설계하고 그 성질을 확인함에 있어, 골 조직 공학에 대한 이해 정도를 높이고 그 기전을 조절하기 위해 필수적이다.



**Fig. 5** Temporal expression of genes characteristics of osteoblastic differentiation.

# 제 3 장. 상용 분말 및 소 뼈부터 하이드록시아파타이트 제조 및 조골세포와의 생체친화성

## 제 1 절. 서 론

골절환자의 증가와 교통사고 등 산업재해의 증가에 의해 뼈 이식 환자수가 증가 추세를 보이고 있으며, 이에 따라 생체재료의 연구가 활발히 진행되고 있다. 생체재료는 손상된 인체의 일부 장기 또는 신체 일부분을 대체할 수 있는 재료인데, 이를 의학 또는 치과 분야에 적용하기 위해서는 생체에 적합해야만 한다.<sup>1,2)</sup>

생체적합성이란 재료나 장치가 기능을 하는 동안 생리학적으로 독성이 없도록 유지시키는 기능인데, 현재까지 개발된 재료 중 생체적합성이 가장 좋은 인공 뼈 대체용 재료는 인체 내 뼈 구성성분 중 약 70%를 차지하는 하이드록시아파타이트 재료로 알려져 있다<sup>20)</sup>.

인조합성 HA계 소재의 경우 이미 오래 전부터 인간의 뼈나 치아 등 경조직 대체용 생체소재로 널리 연구되어 왔으나 임플란트용 소재로 사용시 파괴인성 등이 낮아 장기간 인체에 삽입할 경우 생체용액에 의한 기계적 성질이 열화되고 이로 인한 마모 및 입자의 loosening 문제가 발생하는 단점이 있다.

이에 비하여 동물 뼈에서 추출한 하이드록시아파타이트는 형상적으로나 구조적으로 인간 뼈와 가장 유사하다. 그리고 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있고 대량으로 생산이 가능하다. 동물 뼈는 무기물과 유기물로 나누어지는데, 유기물은 주로 콜라겐과 단백질로 이루어져있다. 반면 무기물은 주로 하이드록시아파타이트와 소량의 마그네슘, 나트륨등으로 이루어져 있다. 최근 연구에 의하면 가축 도살로 대량으로 얻어지는 동물 뼈로 부터 아파타이트를 추출하였고, 또한 대구 뼈에 포함된 단백질, 세균, 대장균등의 유기물을 고온에서 열처리함으로써 잔존하는 주요 무기성분인 수산화아파타이트를 이용하여 생체재료로 임상가능성을 보고된바 있다.

최근 각국에서 화학형태가 다른 여러 가지 칼슘염을 주체로 한 칼슘보충제 및 체내 칼슘 이용성 촉진 물질 등을 개발하여 시판하고 있으며, 일본에서는 칼슘영양

신소재 또는 칼슘보충제로서 소 뼈 분말을 식품, 음료 또는 가공식품에 첨가하여 시판하고 있다<sup>49)</sup>.

현대 산업사회가 발전함에 따라 우리들의 생활이 질적으로 향상됨에 따라 무고해 연료와 쾌적한 환경에 대한 인식이 점차 높아지고 있으며, 또한 환경오염 문제가 심각하게 대두되고 있는 실정이다. 따라서 발생하는 생활 쓰레기, 음식물 쓰레기등을 단순 처리하는 방법이 아니라, 에너지와 자원의 소비를 줄이면서 오염물질의 발생을 원칙적으로 없애거나 극소화 하는 방법으로 환경문제를 해결해야 한다고 생각한다. 특히 폐 소 뼈가 폐기물로 배출되고 있어 이것을 처리하는데, 많은 곤란을 겪고 있는 실정이다.

소 뼈는 유기물과 무기물로 이루어져 있는데, 유기물은 주로 콜라겐과 단백질로서 대부분 열처리 후에는 제거되는 것으로 알려져 있다. 반면 무기물은 대부분의 하이드록시아파타이트와 적은 양의 다른 이온 즉 마그네슘, 나트륨등이 있다.

## 제 2 절. 실험방법

원료인 소 뼈는 음식점에서 발생하는 폐기물을 수집하여 사용하였다. 수거된 소 뼈는 방해 요소인 유기물과 염분 등을 제거하기 위하여 일차적으로 물로 세척하고 칫솔로 시료 표면의 유기물들을 제거하였다. 이차적으로 800 °C로 가열된 0.1%의 NaOH 수용액에 투입 후 4시간 교반하여 소 뼈에 포함되어 있는 유기물 등을 제거하였다. 유기물이 제거된 소 뼈는 흐르는 물에 48시간 동안 수세하여 소 뼈에 부착 가능한 Na 이온 등을 제거하였다. 수세된 소 뼈는 건조기내에서 80 °C로 건조하여 수분을 제거하였다. 소 뼈에 잔류하는 유기물을 완전히 제거하기 위해 800 °C의 온도에서 1시간 동안 하소하였다. 하소된 분말의 특성을 알고자 X선 회절분석을 하였다. 하소된 분말을 48시간 동안 attritor볼밀을 한 후 80 °C의 온도에서 건조하였다.

제조된 분말의 생체친화성을 고찰하기 위해 시중에서 구입한 상용 HA 분말과 비교 분석하였다. 각각의 분말은 일축가압성형 하여 성형체를 제조하고, 220 MPa의 압력으로 정수압성형을 행한 후 수증기 분위기에서 1200 °C의 온도로 1시간 동안 소결하여 제조하였다. 인간의 골 조직과 물성이 흡사한 이종골에서 얻은 하이드록시아파타이트와 시중에서 사용 판매되고 있는 하이드록시아파타이트를 조골세포의 세포배양실험을 실시하였다. 이 실험에서는 human osteoblast-like cell line 인 MG-63 세포를 이용하였다. MG-63 세포는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 내에서 배양되었으며, 37 °C, CO<sub>2</sub>가 5 % 로 공급되는 배양 환경을 유지하였다. DMEM 배양액에는 10% fetal bovine serum (16000-044, Gibco)와 항생제로서 1 %(v/v) antibiotic antimycotic solution(15240-0620, Gibco)을 첨가하였다. 또한 completed media는 2일에 한 번씩 정기적으로 교체되었다. 생체실험을 위해서 소결체의 표면을 다이아몬드정반에 1 μm까지 연마한 다음, Autoclave에 121 °C에서 멸균하였다. 멸균한 시편은 건조 후 24well plate에 연마된 부분이 위를 향하게 넣고, MG-63 세포를 well 당  $1 \times 10^4$ 개 씩 분주한 후 인큐베이터 안에서 배양한다.

MG-63 세포는 단위면적 1 cm<sup>2</sup>당 약  $6 \times 10^4$ 개 정도일 때 거의 포화된다고 보고된바 있다. 위와 같은 단위 면적당 세포 개체 수 및 세포의 doubling time을 고려한 설계에 의해 각각 1, 3, 5일 되는 시점에 증식 실험을 수행하였다. 시간에 따

라 시편 표면에 세포의 증식과 부착을 관찰하기 위해 배양 일정 시간이 지나면 배양액을 제거하고 1X 인산완충용액(dulbecco's phosphate buffer saline, 21600-010, Gibco)을 첨가 후 다시 제거하는 과정으로 세척하였다. 시편위에서 세포의 성장 및 증식을 알아보기위해 세척한 시편을 24well에 옮긴 후 4% Paraformaldehyde를 2 시간동안 반응 후 제거하고, 그런 다음 50, 60, 70, 80, 90, 100% 알콜에 10분씩 시편을 침적시켜 4% paraformaldehyde를 세척하였다. 마지막으로 isoamyl acetate에 3시간 이상 담근 후 실온에서 건조시켜 주사전자현미경 (SEM, H-4800, HITACHI)으로 관찰하였다. 조골세포의 성장정도환원정도를 측정하는 MTS assay 로 측정하였다. 세척된 시편위에 MTS시약을 분주 후, 96 well plate로 옮긴 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 각 조건에 따른 상대적인 부착능을 확인하였다.



### 제 3 절. 결과 및 고찰

구입한 소 뼈는 노란색을 나타내었으며, 열처리 온도가 증가함에 따라 색상이 변화하였다. 500-1200 °C의 온도 구간에서 1시간 동안 각각 하소하여 하소온도에 따른 소 뼈의 색상을 살펴본 결과(Table 4), 500 °C에서는 갈색, 600 °C에서는 회색, 700 °C에서는 밝은 회색, 그리고 800 °C 이상에서는 모두 흰색을 나타내었다. 이것으로 미루어 소 뼈는 열처리 시 500 °C 부터 유기물의 분해가 시작되고 800 °C에서 분해가 끝나는 것으로 판단되었다. 따라서 본 실험에서는 하소 온도를 800 °C로 정하였으며, 하소시간은 1시간으로 고정하여 하이드록시아파타이트 분말을 최종적으로 제조하였다.

하소 후 FE-SEM 및 X-선 회절 분석으로 Fig. 6에 나타내었다. FE-SEM을 통해 HA는 20-50 nm로 아주 미세하고 X선 회절을 통해 순수한 하이드록시아파타이트의 피그만 존재했다. 이에 반해 하소 한 소 뼈분말(Fig. 7)은 X-선 회절에서는  $2\theta=42.5$  부위의 소량의 MgO 피크를 제외하고 모두 HA 특성 피크를 나타내었다. 또한 전체적으로 폭이 넓고 강도가 낮음을 확인할 수 있었다. 이는 소 뼈에 포함된 HA 입자가 작고, 소 뼈 내에 포함된 일부 유기물 때문인 것으로 보인다.

Fig. 8과 Fig. 9에는 1200 °C 온도에서 1시간동안 소결 후 시편에 세포배양을 하기위해 소결체의 표면을 다이아몬드 정반에 1  $\mu\text{m}$ 까지 연마하여 관찰한 사진을 나타내었다. 상용 HA의 경우 미세한 입자로 구성되어 있었으며, 소결밀도가 높아 표면에는 기공이 적게 존재하였다(Fig. 8(a)).

소 뼈로부터 추출된 분말을 사용하여 제조된 BHA 소결체는 약 85%의 소결밀도를 나타냈으며, 이에 따라 연마면에는 많은 기공이 존재하였다. Fig. 8(b)와 Fig.9(b)는 상용 HA와 소 뼈 추출 HA의 연마면을 XRD 및 FE-SEM으로 관찰하여 나타낸 상분석 및 미세구조 분석결과이다. X-선 회절 분석 결과, 두 경우 모두 분말의 XRD와 유사한 특성을 나타내었는데, 이것으로 미루어 소결 시 상분해나 상전이는 일어나지 않는 것을 알 수 있었다. 특히 높은 소결 온도에서도 HA의 상분해로 생성되는 TCP 상이 관찰되지 않았는데, 이는 소결 시 상분해를 억제하는

수증기 분위기 효과가 크기 때문인 것으로 고찰되었다.

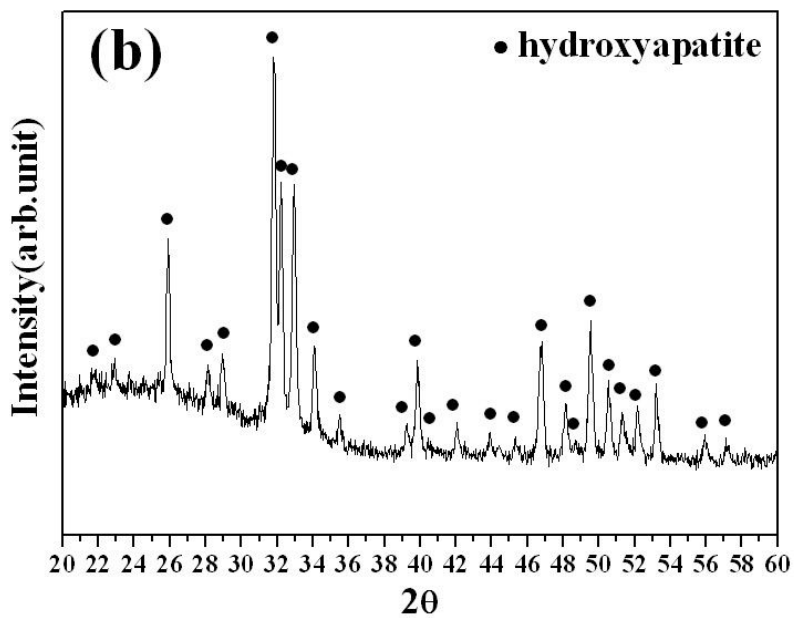
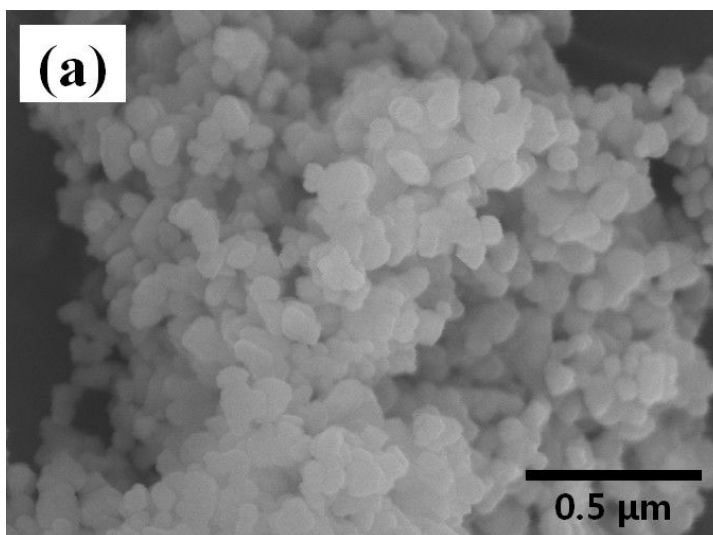
연마된 HA 표면에 MG-63 cell을 well 당  $1 \times 10^4$  개를 분주시키고, 37로 유지시킨 인큐베이터 내에서 5%의 이산화탄소를 포함한 공기 중에서 1, 3, 5일 되는 시점에 증식 실험을 수행한 결과를 Fig. 10과 Fig.11에 나타내었다. 그림에서 보듯이 세포는 각 시편 위에서 잘 부착되어 성장하였다. 둥근 형태의 핵으로 강조되는 세포들은 별 모양으로 잘 뻗어 자라는 모습이며, 시간이 지남에 따라 둥근형태의 핵이 잘 드러날 뿐 아니라 세포질이 끼리 연결되어 있음을 알 수 있었다.

본 연구의 결과, 상용 AHA와 소 뼈로부터 제조된 BHA의 경우 인산칼슘으로 이루어져 있기 때문에 세포의 생존이 잘 이루어졌으며, 재료 내에는 세포에 독성이 있는 성분은 없는 것으로 확인되었다. 또한 두 종류의 시편 모두 세포의 부착력이 높게 나타났으며, 부착형태 및 퍼짐 형상은 약간 다르게 나타났다. 대체적으로 AHA와 BHA 표면에서는 모두 시간이 지남에 따라 세포가 수가 증가하였으며, 퍼짐 형상이 뚜렷하게 나타났다. 특히 5일이 지난 후에는, 세포의 성장으로 인해 표면의 세포가 밀집해 있는 것이 관찰되었는데, 이것으로 미루어 AHA 및 BHA의 경우 세포와의 생체 친화성이 큰 것으로 고찰되었다.

Fig. 12에는 세포 증식과 생존능력을 MTS assay로 측정한 결과를 나타내었다. 세포배양 1일, 3일이 지난 후, 상용 HA의 경우 소 뼈 HA보다 세포의 증식량이 많았으며, 5일 후에는 상용 HA와 소 뼈 HA의 증식이 같은 흡광도 대략 4.25값으로 세포 증식량이 유사했다. 이는 상용 HA보다 소 뼈 HA의 기공률이 크기에 기공으로 세포가 성장하여, 소 뼈 HA에서 상용 HA 보다 더욱 증가했을 것으로 사료된다.

**Table 4.** The color of bovine bone calcined up to 1200 °C for 1 h.

Temperature (°C)	Color
Before calcination	Yellow
500	Brown
600	Grey
700	Bright grey
800	White
900	White



**Fig. 6.** (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of artificial HA after calcination at 800 °C for 1 h.

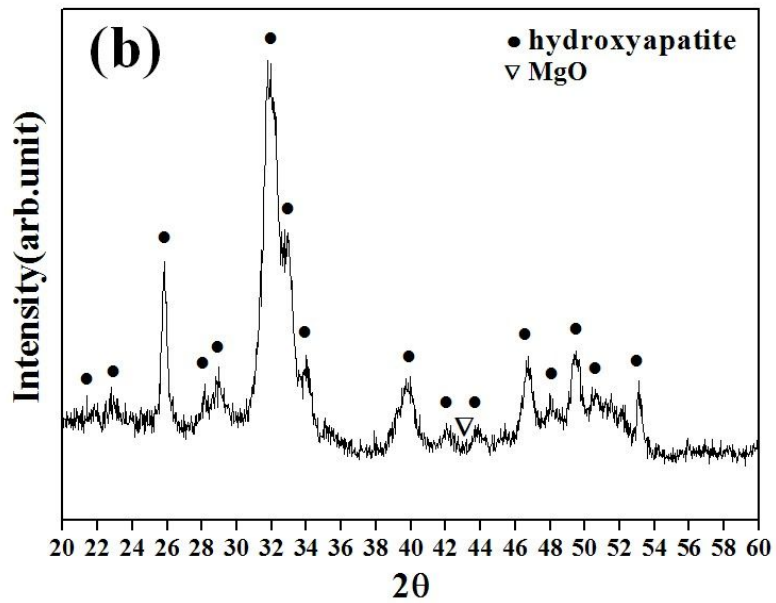
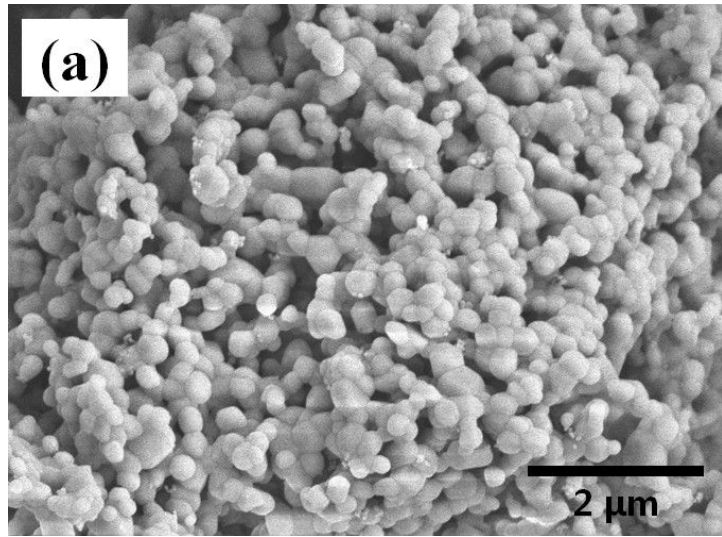
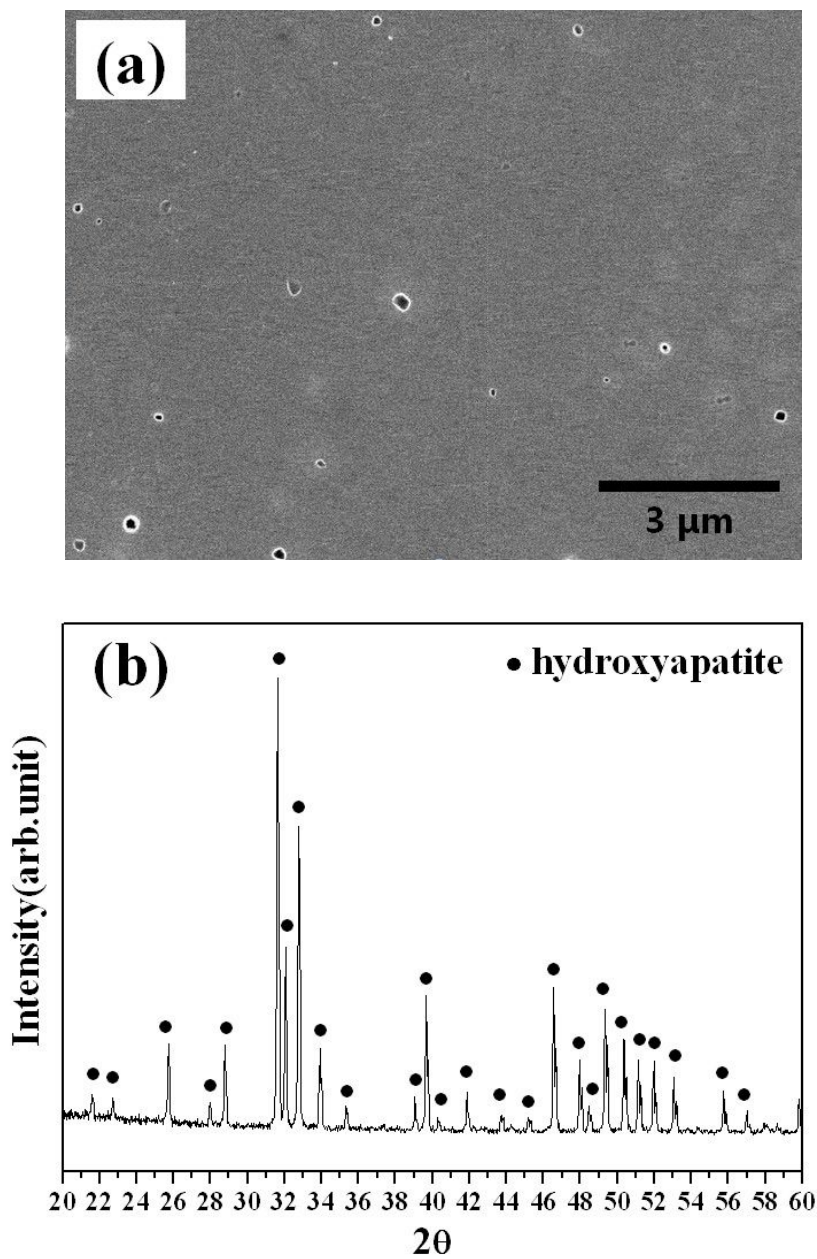


Fig. 7. (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of bovine bone derived-HA after calcination at 800 °C for 1 h.



**Fig. 8.** (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of artificial HA after sintering 1200 °C for 1 h .

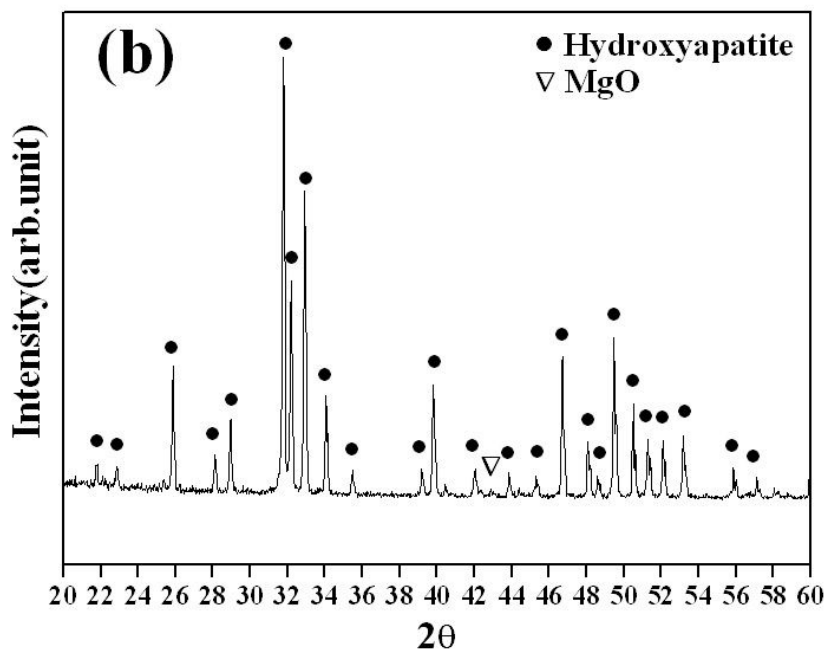
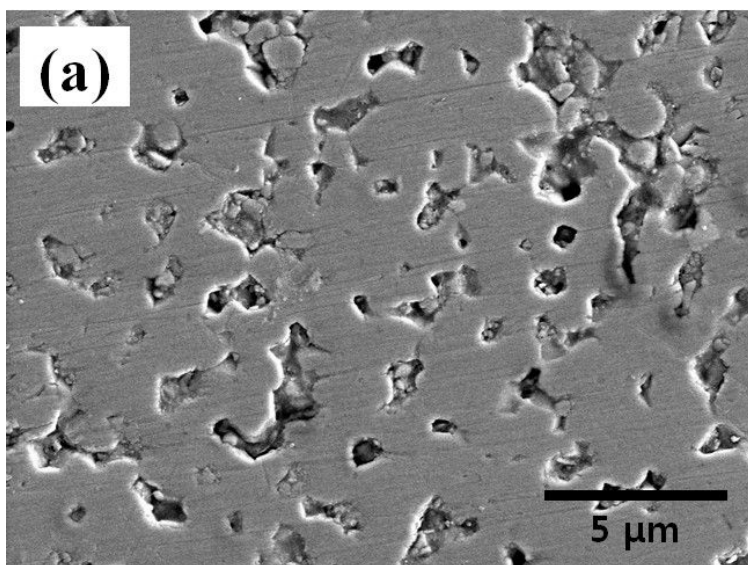
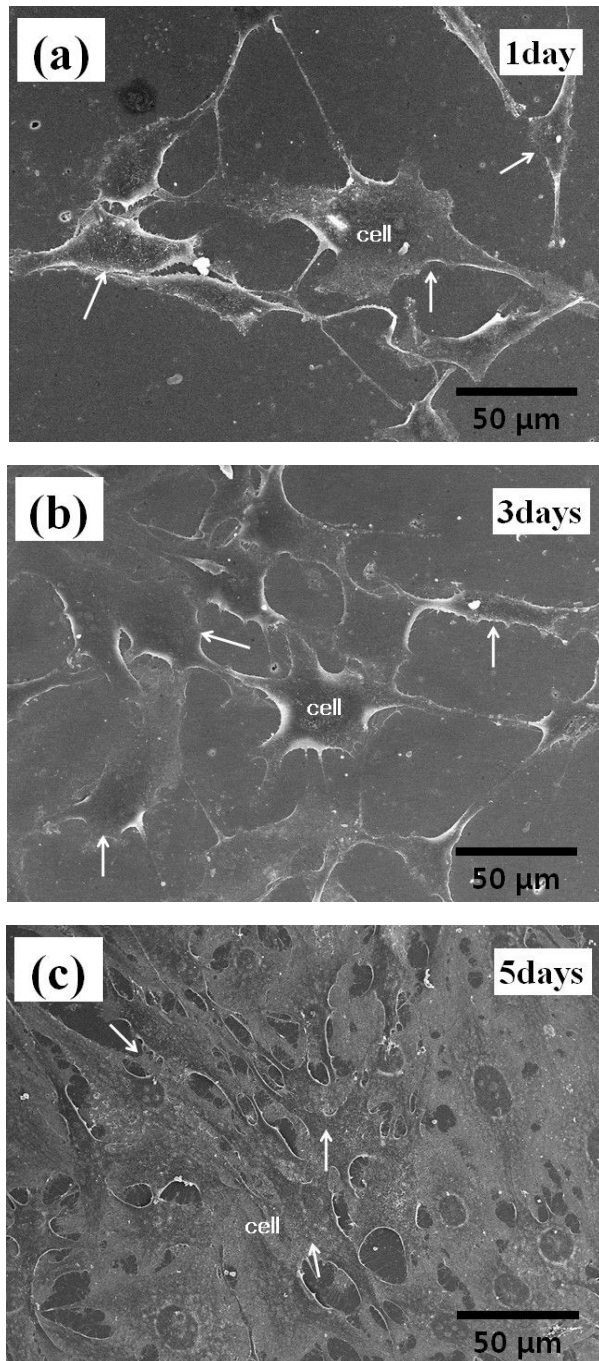
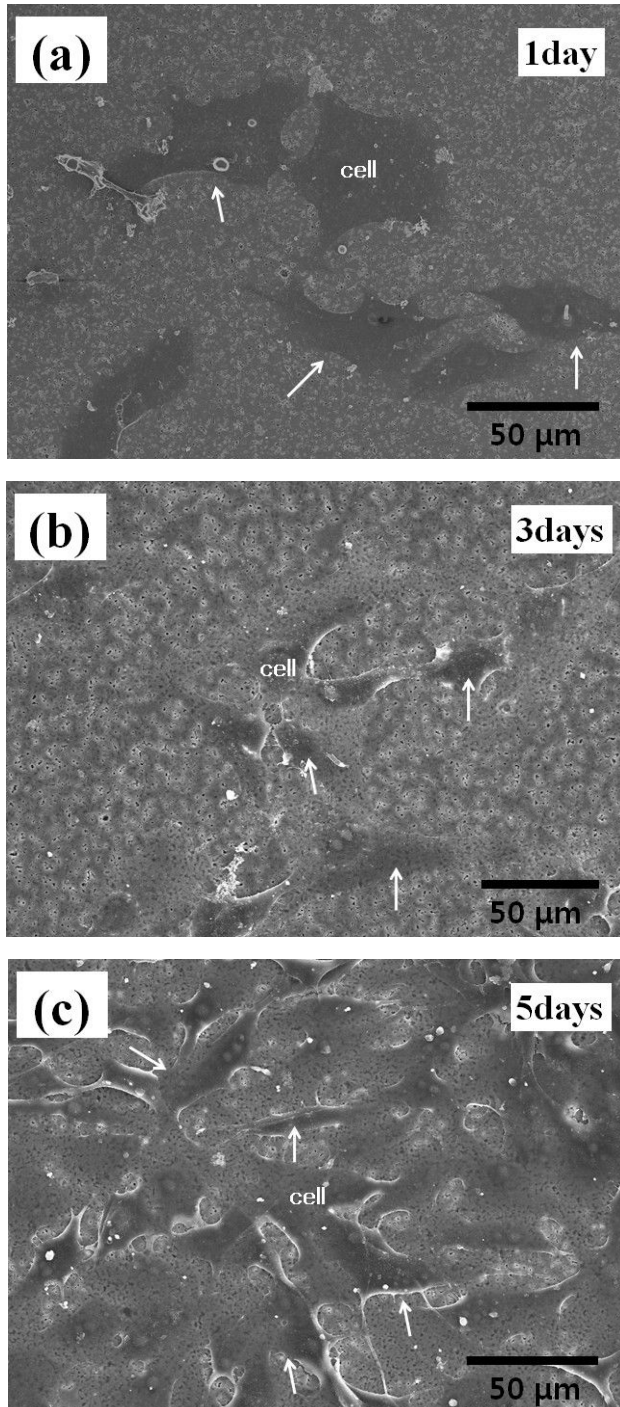


Fig. 9. (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of bovine bone derived-HA after sintering at 1200 °C for 1 h .



**Fig. 10.** FE-SEM micrographs of adherent cells on artificial HA with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days.





**Fig. 11.** FE-SEM micrographs of adherent cells on bovine bone derived-HA with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days.

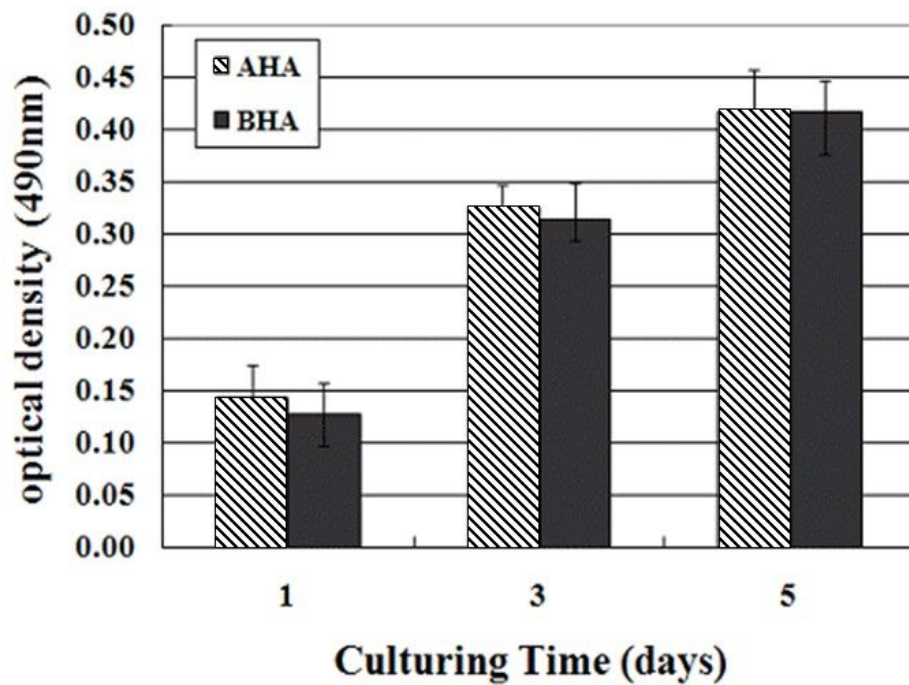


Fig. 12. Cell proliferation measured as absorbance using MTS assay after cell culture for 1, 3 and 5 days on the artificial HA(AHA) and bovine bone derived-HA (BHA).

## 제 4 절. 결 론

본 연구에서는 소 뼈에서 추출한 하이드록시아파타이트를 제조하고, 이렇게 얻어진 분말들을 소결체로 만들어 일정 기간 동안 조골세포인 MG-63과 반응해 재료의 생체 친화성을 측정하였다. 조골세포의 증식 및 분화의 경우에도 생체활성의 특성을 지닌 HA와 직접 제조한 소 뼈 HA를 비교 분석하였다.

소 뼈에서 추출한 하이드록시아파타이트를 800 °C에서 하소 후 잔류 탄소를 제거하여 하이드록시아파타이트 분말을 제조하였다. 하소 후 분말은 대부분 하이드록시아파타이트 결정상으로 이루어져 있었고, MgO가 미량으로 존재했다. 열처리 후 분쇄된 하이드록시아파타이트 분말은 약 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 등면체 분말로 전체적으로 입자간 응집이 적고 균질하였다.

상용 HA와 소 뼈 HA 소결체를 제조하여 세포의 성장 및 증식 정도를 확인하기 위한 실험에서는 상용 HA와 마찬가지로 소 뼈 HA도 높은 수준으로 관찰되었다. 특히 5일째 증식이 MTS assay 결과를 보면 소 뼈 HA와 상용 HA 시편 위에서 세포의 증식이 유사한 것을 확인할 수 있었다. 소 뼈 HA도 상용과 세포활성이 유사하였으며, 생체재료로서의 생체친화 특성이 우수한 것으로 고찰되었다.

# 제 4 장. 소 뼈로부터 다공형 하이드록시아파타이트의 제조 및 조골세포와의 생체친화성

## 제 1 절. 서 론

현대 사회로 갈수록 노인 인구가 증가하고 각종 사고 및 노화에 의하여 뼈에 손상 가는 경우가 많다. 현재까지 여러 가지 치료법이 시행되고 있지만 회복이 불가능할 정도로 손상이 심하면 인공뼈 이식이 필수적으로 요구된다.

인공뼈 이식을 하기 위해서는 재료나 장치가 기능을 하는 동안 생리학적으로 독성이 없도록 유지해야 한다. 생체 재료 중에서 세라믹을 이용하여 골 결손부위에 치료를 목적으로 하는 재료가 많이 연구되어 왔다. 골 결손부를 회복시키고 부족한 골 조직을 공급하기 위한 자가이식 조직 면역학적으로 거부 반응이 없어 많이 사용되었으나, 공급량의 한계로 인해 합성골 이식재가 자가골 이식의 대안으로 개발되어 왔다.

1982년 결핵에 의해 생성된 골 결손부위에 석고(calcium sulfate)를 충전하여 새로운 골이 형성되었음을 보고된 이래로 많은 세라믹 재료가 골 결손부를 대체할 물질로 연구가 되어 왔다. 지난 20년간, 세라믹 재료 중에서도 하이드록시아파타이트와  $\beta$ -tricalcium phosphate( $\beta$ -TCP)는 자연골과 유사한 화학적 조성을 갖고 있고, 생체 조직과의 생체적합성이 우수하여 합성골 이식재료로서 주목받아 많은 연구가 진행되어 왔다. 이러한 생체세라믹 재료를 체내에 매식하면 재료와 골조직과 결합이 이루어지게 된다.

많은 동물결과, 고체상태의 HA의 생체적합성이 장기간에도 우수하며 연조직과 골 조직과의 상호작용이 원활하다고 보고되고 있으며, 골전도성을 가지고 면역 거부 반응을 발생시키지 않으면서 골조직과 결합한다고 알려져 있다. 결과적으로 HA는 생체 활성 재료로서 또한 골 재생을 위한 재료로서 사용이 가능하다고 널리 인정되고 있다. 이들 골 재생용 생체 세라믹 재료는 골유도성이 아닌 골전도성 재료이기 때문에 골 조직이 재료 내로 성장되어 들어올 수 있는 적당한 크기의 연결된

기공을 갖는 다공체로 되는 것이 바람직하며, 신생골의 성장 속도와 유사한 생분해 속도가 요구되는 성질이다.

다공성 재료는 새로운 조직이 성장 할 수 있는 공간을 제공하고 흡수되어 새로운 조직에 의해서 대체될 수 있어야 한다. 또한 적용하고자 하는 부위에 대한 임계적인 물리적, 생물학적 특성이 요구된다. 이상적인 다공성재료는 세포의 부착이 용이하며, 증식과 분화가 가능해야하고, 체액의 공급이 원활히 이루어져야 한다. 또한, 면역 반응이나 이식 거부 반응이 최소화 되어야 하며, 생체 적합성이 우수해야 하고, 세포 조직의 성장 속도와 생분해속도가 유사해야 할 뿐만 아니라 기계적 강도와 생체활성이 있어야 하고, 원하는 형상으로 쉽게 제조가 가능해야한다. 다공성 생체재료는 대표적으로 HA에 글라스를 첨가하여 HA의 생체 친화성이나 골전도성에 영향을 미치지 않으며 강도를 향상시킨 연구가 다수 발표되었다.

본 연구에서는 소 뼈로부터 제조한 하이드록시아파타이트의 분말을 이용하여 다공질 소결체를 제조 후 생물학적인 활성 및 기능에 대해 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 제조된 소결체의 생체활성을 평가하기 위해 *in vitro*에서 일정기간 세포 반응을 비교 관찰하였다. 또한 소 뼈 하이드록시아파타이트는 열처리 조건을 제어하여 소결체를 제조하고 소결거동을 고찰하기 위해 미세구조적으로 관찰하였다.

또한 열처리조건에 따른 생물학적 특성은 MG-63세포를 이용하여 세포의 세포 부착실험을 행하여 알아보았으며, 이를 통하여 열처리 조건 및 기공 특성이 생체적 합성에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다.

## 제 2 절. 실험방법

출발 물질은 앞 3장과 마찬가지로 소 뼈를 일차적으로 물로 세척하고 칫솔로 시료 표면의 유기물들을 제거하였고, 이차적으로 800 °C로 가열된 0.1%의 NaOH 수용액에 투입 후 4시간 교반하여 소 뼈에 포함되어 있는 유기물 등을 제거하였다. 유기물이 제거된 소 뼈는 흐르는 물에 48시간 동안 수세하여 소 뼈에 부착 가능한 Na 이온 등을 제거하였다. 수세된 소 뼈는 건조기내에서 80 °C로 건조하여 수분을 제거하였다. 소 뼈에 잔류하는 유기물을 완전히 제거하기 위해 800 °C의 온도에서 1시간 동안 하소하였다. 하소된 분말을 48시간 동안 attritor 볼밀을 한 후 80 °C의 온도에서 건조하였다. 이렇게 얻어진 분말을 사용하여 상압소결과 가압소결을 행하였다. 제조된 분말을 일축가압성형 하여 성형체를 제조하고, 열처리 온도를 수증기 분위기에서 1100, 1200 °C의 온도로 1시간 동안 소결하여 제조하였다.

생체 적합성 실험은 human osteoblast-like cell line 인 MG-63 세포를 이용하였다. MG-63 세포는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 내에서 배양되었으며, 37 °C 온도에서 CO<sub>2</sub>가 5 % 로 공급되는 배양 환경을 유지하였다. DMEM 배양액에는 10% fetal bovine serum (16000-044, Gibco)와 항생제로서 1 %(v/v) antibiotic antimycotic solution(15240-0620, Gibco)을 첨가하였다. 또한 completed media는 2일에 한 번씩 정기적으로 교체되었다. 생체실험을 위해서 소결체의 표면을 다이아몬드정반에 1 μm까지 연마한 다음, Autoclave에 121 °C에서 멸균하였다. 세포배양을 위해 모든 시편을 24-well plate에 각각 배치시키고, 37 °C로 유지시킨 인큐베이터 내에서 5%의 이산화탄소를 포함한 공기 중에서 증식시켰다. 살아있는 세포를 분리하기 위하여 tryptin-EDTA액을 사용하고, hemocytometer를 이용하여 세포 개수를 측정하였다.

MG-63 세포는 단위면적 1 cm<sup>2</sup>당 약 6 x 10<sup>4</sup>개 정도일 때 거의 포화된다고 보고된바 있다. 위와 같은 단위 면적당 세포 개체 수 및 세포의 doubling time을 고려한 설계에 의해 각각 1, 3, 5일 되는 시점에 증식 실험을 수행하였다. MG-63 세포는 well당 1 × 10<sup>4</sup>개씩 분주 시키고 인큐베이터 내에서 증식시켰다. 시간에 따라 시편 표면에 세포의 증식과 부착을 관찰하기 위해 배양 일정 시간이 지나면 배양

액을 제거하고 1X 인산완충용액(Dulbecco's phosphate buffer saline, 21600-010, Gibco)을 첨가 후 다시 제거하는 과정으로 세척하였다. 세척한 시편을 24well에 옮긴 후 4% paraformaldehyde를 2시간동안 반응 후 제거하고, 그런 다음 50, 60, 70, 80, 90, 100% 알콜에 10분씩 시편을 침적시켜 4% paraformaldehyde를 세척하였다. 마지막으로 Isoamyl Acetate에 3시간 이상 담근 후 실온에서 건조시켜 주사전자현미경 (SEM, H-4800, HITACHI)으로 미세구조를 관찰하였다. 조골세포의 증식 측정하는 MTS assay로 측정하였다.

### 제 3 절. 결과 및 고찰

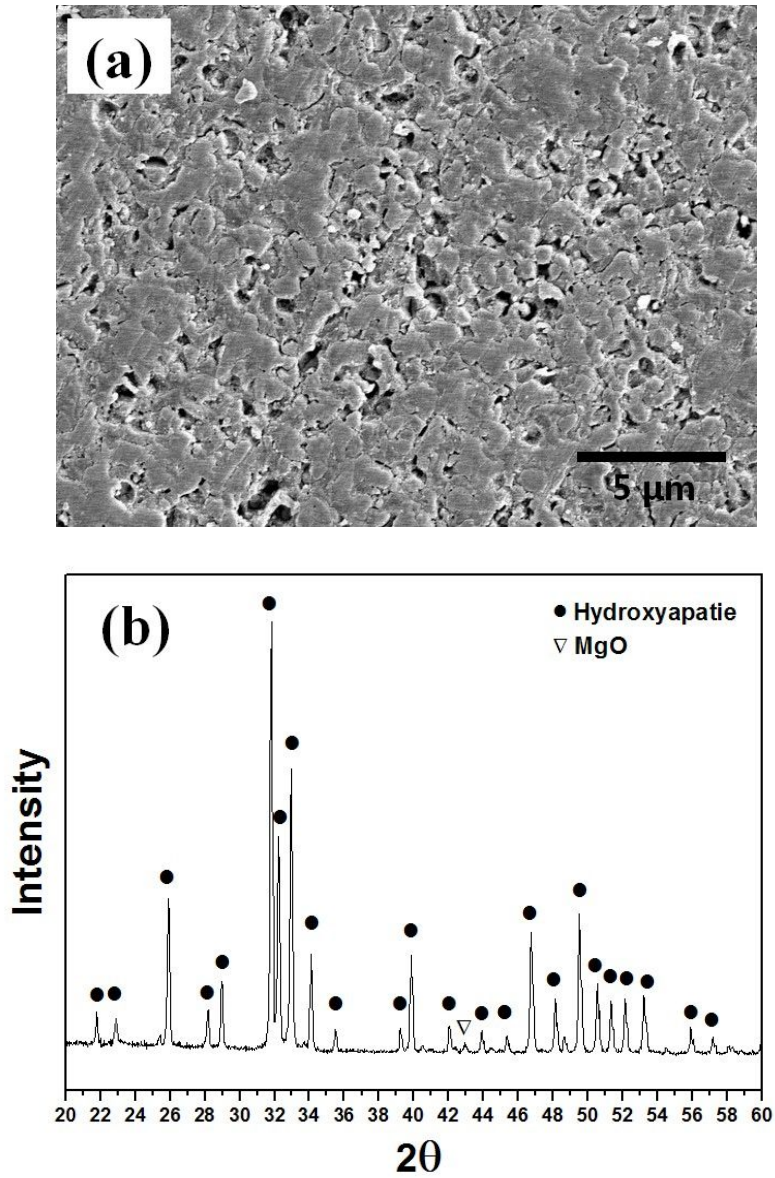
Fig. 13(a)은 소 뼈로부터 제조한 하이드록시아파타이트 분말을 이용하여 1100 °C 온도에서 1시간 동안 소결한 시편 (HA 1100)을 FE-SEM과 X-선 회절로 관찰한 것이다. 1100 °C에서 소결한 시편은 약 65%의 소결 밀도를 갖는 다공질의 하이드록시아파타이트이다. 등면체 입자로 구성되어 있으며, 입자 사이사이에 입자 크기와 유사한 0.4-0.5  $\mu\text{m}$  내외의 기공들이 존재하였다.

Fig. 14(a) 소 뼈에서부터 제조한 하이드록시아파타이트를 1200 °C에서 소결한 시편(HA 1200)의 현미경 사진이다. HA 1200는 HA 1100와 입자의 크기는 유사하나, 기공의 크기가 작고, 소결 밀도가 82%로 높게 나타났다(Fig. 15). 파단면의 미세구조를 관찰한 결과 대부분 입자들이 등면체의 각형을 나타냈으며, 입계파괴 형태로 균열이 진행되었다. Fig. 13(b)와 Fig. 14(b)에서 소결체의 X-선 회절 분석 결과 소량의 MgO 피크만 보일뿐 소결온도에 따른 큰 변화는 나타나지 않았다.

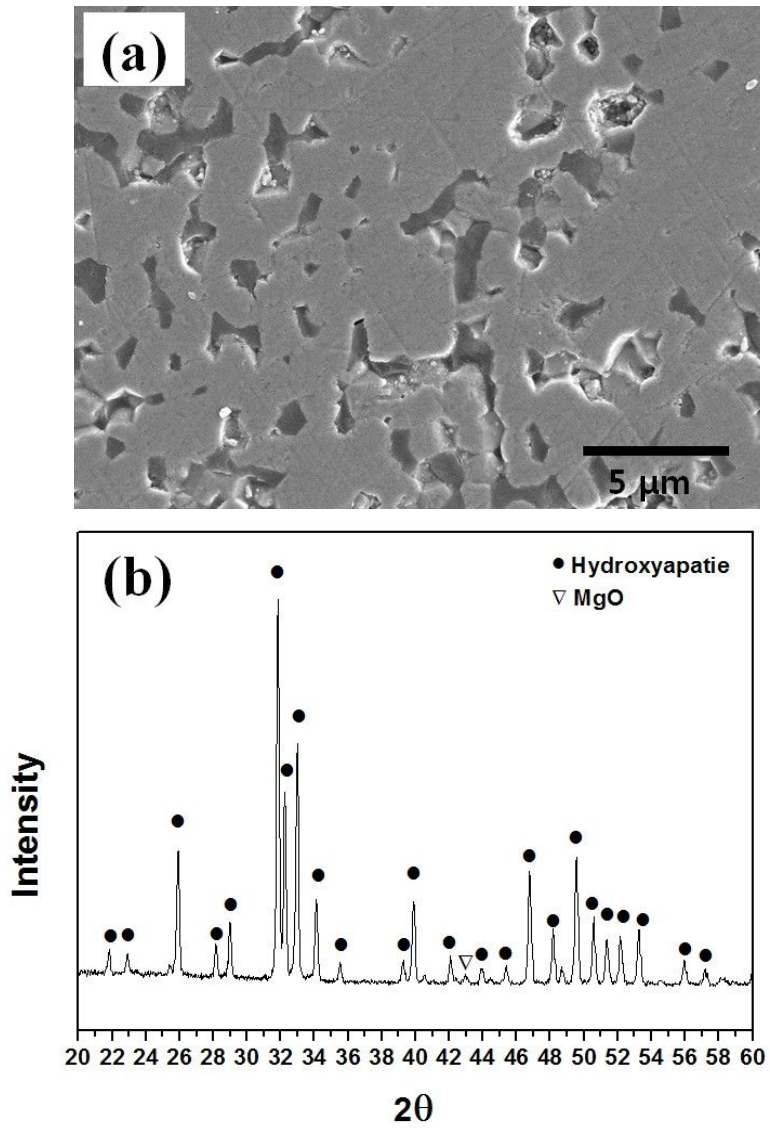
Fig. 16과 Fig.17은 연마된 소 뼈 HA 표면에 MG-63 cell을 well 당  $1 \times 10^4$  개를 분주시키고, 1, 3, 5일 되는 시점에 증식 실험을 수행한 결과이다. 소결 온도에 따라 기공률을 달리한 시편위에 MG-63 세포의 고정되고 부착되고, 성장하는 형태학적 변화를 관찰하였다. 세포의 부착과 성장하는 것으로 제조된 HA에서 독성이 없는 것을 알 수 있다. 세포배양 1일이 지난 후, Fig. 16(a)와 Fig. 17(b)에서 세포의 부착은 기공이 크고 작은 것에 관여하지 않고 HA 표면에서 잘 부착되었다. SEM을 통해 다공질 시편 모두 세포가 부착하여 성장하고 있음을 알 수 있다. 시간이 지남에 따라 보다 많은 세포가 부착하여 성장하였음을 보여주고 있으며, 특히 1100 °C에서 소결한 기공이 많은 시편에서 많은 세포를 관찰하였다(Fig. 16(c)).

Fig. 18은 배양 시간에 따라 시편위에 부착 성장한 세포수를 확인하기 위해 MTS 테스트를 한 결과이다. 1, 3일은 세포가 두 시편 모두에서 증식과 성장이 유사하였다. 그러나 5일째 지난 후에는 세포가 급격히 증가하였고, 기공이 많은 BHA 1100 시편에서 BHA 1200에서 보다 더욱 증가하였다.





**Fig. 13.** (a) FE-SEM micrograph and (b) XRD pattern of bovine bone derived-HA after sintering at 1100 °C for 1 h.



**Fig. 14.** (a) FE-SEM micrograph, (b) XRD pattern of bovine bone derived-HA after sintering at 1200 °C for 1 h.

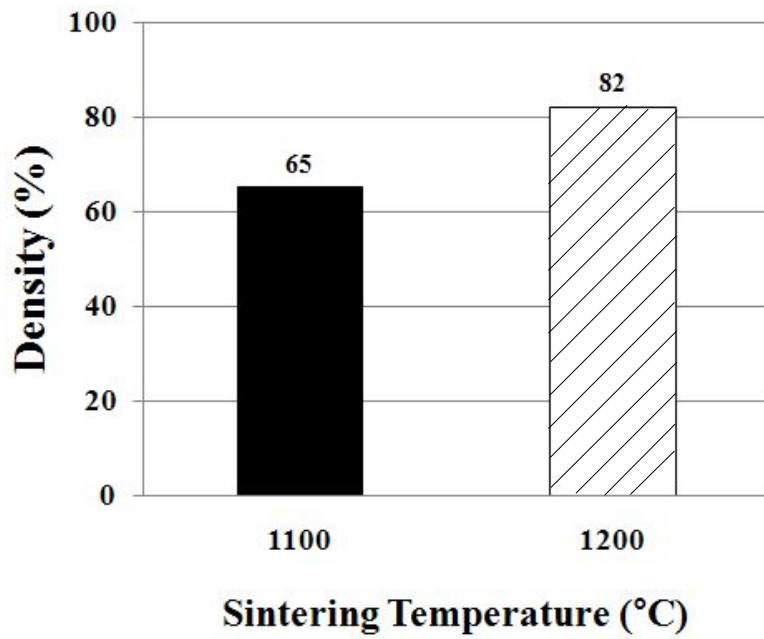
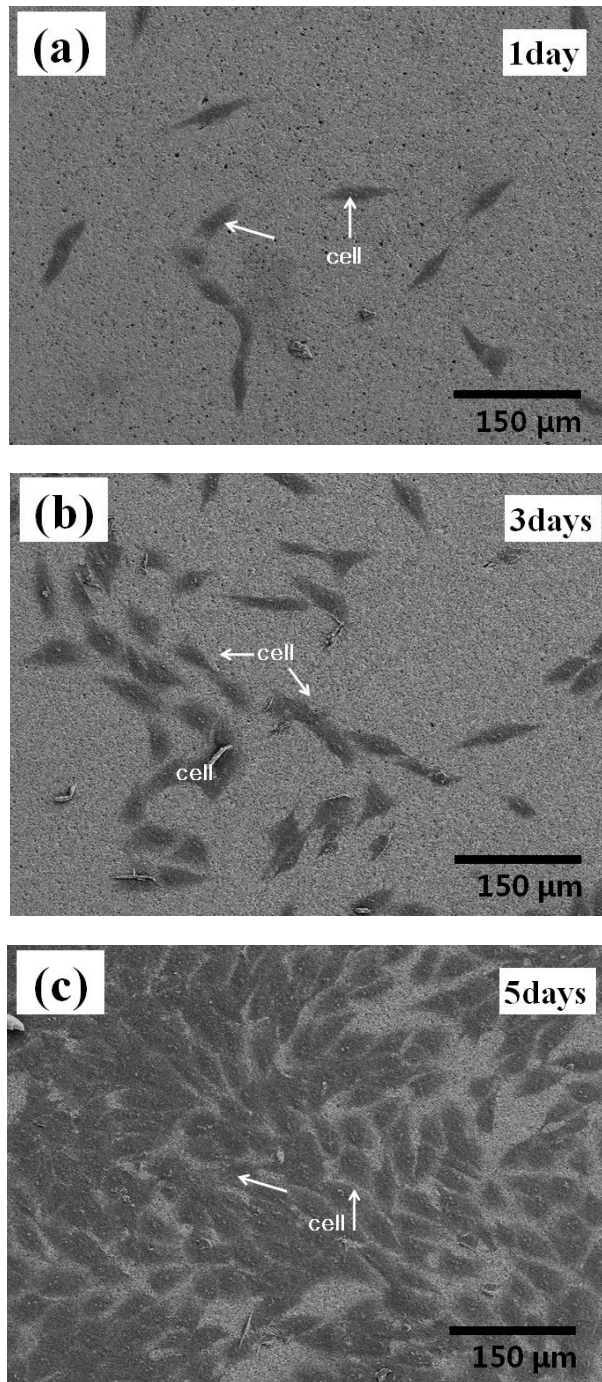
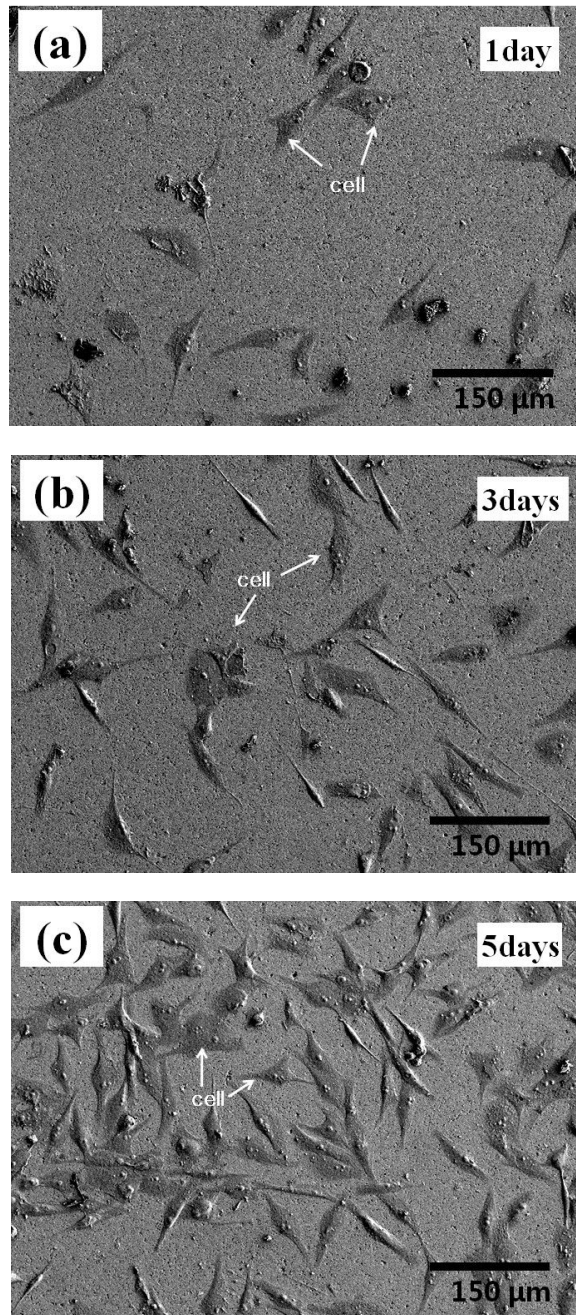


Fig. 15. Density of bovine bone derived-HA sintered at 1100 °C and 1200 °C for 1 h.



**Fig. 16.** FE-SEM micrographs of adherent cells on bovine bone derived-HA sintered at 1100 °C with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days.



**Fig. 17.** FE-SEM micrographs of adherent cells on bovine bone derived-HA sintered at 1200 °C with cell culture for (a) 1, (b) 3 and (c) 5 days.

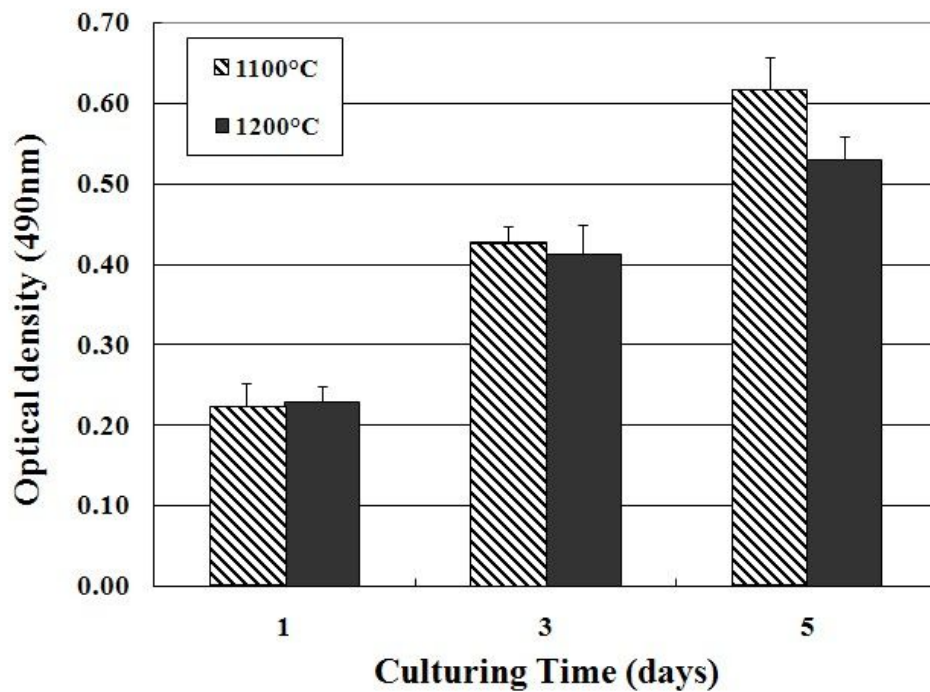


Fig. 18. Cell proliferation measured as absorbance using MTS assay after cell culture for 1, 3 and 5 days on bovine bone derived-HA sintered at 1100 °C and 1200 °C for 1 h.

## 제 4 절. 결 론

본 연구에서는 소 뼈에서 추출한 하이드록시아파타이트를 제조하고, 이렇게 얻어진 분말을 열처리 온도를 조절하여 다공성 및 치밀질 소결체로 만들었다. 각각의 소결체를 일정 기간 동안 조골세포인 MG-63 세포의 증식 및 분화를 통해 재료의 생체활성의 특성을 비교 분석하였다.

소 뼈에서 추출한 하이드록시아파타이트를 800 °C 1시간 하소 후 잔류 탄소를 제거하여 하이드록시아파타이트 분말을 제조하였다. 하소 후 분말은 대부분 수산화아파타이트 결정상으로 이루어져 있었고, MgO가 미량으로 존재했다. 열처리 후 분쇄된 하이드록시아파타이트 분말은 약 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 등면체 분말로 전체적으로 입자간 응집이 적고 균질하였다.

MG-63 세포의 초기 부착능력에 대한 실험에서 약물의 농도에 상관없이 모든 인산칼슘 박막 위에서는 세포의 부착력이 높게 나타나고, 부착형태 및 퍼짐 형상도 다른 결과를 얻는다고 했다. 이 사료와 같이 상용 HA와 소 뼈 HA는 인산칼슘으로 이루어져 있기 때문에 세포의 생존이 재료에 독성이 있지 않는 것을 확인할 수 있었다.

또한 소 뼈 HA에서 FE-SEM의 미세구조를 통해서 부착력이 높고 부착형태 및 퍼짐 형상이 나타났다. SEM을 통해서 세포가 시편위에서 증식하는 것을 볼 수 있듯이, 세포의 독성과 세포의 생존능력은 각각의 시편에서 세포가 부착 성장하는 것을 볼 수 있으므로 독성이 없다는 것을 관찰할 수 있었다. 세포배양 1일 후, 세포의 시편 표면에 부착한 것을 알 수 있다. 3일이 지난 후 세포핵을 중심으로 세포질이 퍼져 나가면서 성장하였다. 3일까지는 각각의 시편의 세포 생존은 거의 비슷하였으나 5일이 지난 이후는 FE-SEM과 MTS assay에서의 기공이 많은 1100 °C 시편에서 세포의 성장이 급격히 증가하는 것을 볼 수 있었다.

## 제 5 장. 종합 결론

생체 안정형 하이드록시아파타이트를 제조하기 위하여 동물 뼈에서 추출한 하이드록시아파타이트를 제조하였다. 열처리 온도를 조절하여 다공성 및 치밀질 소결체로 만들었다. 각각의 소결체를 일정 기간 동안 조골세포인 MG-63 세포의 증식 및 분화를 통해 재료의 생체활성의 특성을 비교 분석 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 소 뼈를 800 °C의 온도에서 하소 후 산화마그네슘이 미량 포함된 하이드록시아파타이트와 분말을 제조하였고, 상용 HA분말과 유사한 크기로 제어하기 위해 attritor 볼밀로 48시간 분쇄하였다. 최종적으로 제조된 하이드록시아파타이트 분말은 0.4-0.5  $\mu\text{m}$ 의 크기를 갖고 입자간 약한 응집이 있는 각형의 형상을 나타내었다.
2. 소 뼈에서 추출한 HA와 상용 HA를 일축가압성형 하여 성형체를 제조하고, 제조된 소결체의 생체활성을 평가하기 위해 상용 HA와 in vitro에서 1, 3, 5 일간 세포 반응을 비교 관찰하였다. FE-SEM을 통해서 각각의 시편에 부착력이 높고 부착형태 및 퍼짐 형상이 나타났다. 세포의 독성과 세포의 생존능력은 각각의 시편에서 세포가 부착 성장하는 것을 볼 수 있으므로 독성이 없다는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 5일째 증식이 MTS assay 결과를 보면 소 뼈 HA와 상용 HA 시편 위에서 세포의 증식이 유사한 것을 확인할 수 있었다. 소 뼈 HA도 상용과 세포활성이 유사하므로 생체재료로 사용하기에 적합한 것으로 판단되었다.
3. 열처리 온도를 달리하여 수증기 분위기에서 각각 1100, 1200 °C의 온도로 1 시간 동안 소결하여 각각 65%, 82%의 밀도를 갖는 소결체 제조하였다. 세포의 독성과 세포의 생존능력은 각각의 시편에서 세포가 부착 성장하는 것을



볼 수 있으므로 독성이 없다는 것을 관찰할 수 있었다. 세포배양 1일 후, 세포의 시편 표면에 부착한 것을 알 수 있다. 3일이 지난 후 세포핵을 중심으로 세포질이 퍼져 나가면서 성장하였다. 3일까지는 각각의 시편의 세포 생존은 거의 비슷하였으나 5일이 지난 이후는 FE-SEM과 MTS assay에서의 기공이 많은 시편에서 세포의 성장이 급격히 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이 결과로 기공이 크고 많을수록 생체활성이 높은 재료로 판단되었다.

## 참 고 문 헌

1. A. S. Posner: The mineral of bone. Clin. Orthop. 200:87-99, 1985.
2. D. F. Williams, Definitions in Biomaterials, 4:3-5, 1986.
3. L. L. Hench, Bioceramics: from concept to clinic. J. Am Ceram Soc, 74:1487-1510, 1991.
4. Y. Zhang, G. Yin, S. Zhu, D. Zhou, Y. Wang, Y. Li and L. Luo, Current Applied Physics, 5:531, 2005.
5. Y. Fang, D. K. Agrawal and D. W. Roy, Ed. P. W. Brown. CRC Press. London & Tokyo, 1994.
6. L. Yubao, Z Xindong and K. De. Groot, Biomaterials, 18:737, 1997.
7. C. Y. Ooi, M. Hamdi, S. Ramesh, Ceramics International 33:117, 2007.
8. Engin NO, Tas AC. Manufacture of macroporous calcium hydroxyapatite Bioceramics. J European Ceram Soc 19:2569-2572 1999.
9. Barralet JE, Grover L, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR. Biomaterials. 23:3063-3072, 2002.
10. L.L. Hench and J. Wilson, World Scientific, 1993.
11. J. Wang, R. Yang, L. C. Gerstenfeld, and M. J. Glimcher, Calcif. Tissue Int. 67:314, 2000.
12. E. Milella, F. Cosentino, A. Licciulli and C. Massaro, Biomaterials, 22:1425, 2001.
13. N. Nakabayashi, biomaterials Sci., 44(1):221-228, 1999.
14. M. J. Mo, S.U. Kim, H. Y. Shin, D. S. Im, I. H. Jung, J. S. Ko, and W. K. Lee. Ind. Eng. Chem, 11:507-514, 2005.
15. P. Ducheyne and Q. Qiu, Biomaterials, 20:2287, 1999.
16. L. Yubao et. al., Biomaterials, 18:737, 1997.
17. S. F. Hulbert, J. C. Bokros, L. L. Hench, J. Wilson, G. Heimke and M. Jarcho, Elsevier, Amsterdam, 1987.
18. L. L. Hench, J. Am. Ceram. Soc., 81:1705, 1998.
19. H. Dadarathy et. al., J. Biomed. Mater. Res., 31:81, 1996.

20. L. Hong, H. C. Xu and K. D. Groot, *J. Biomed. Mater. Res.*, 26:7, 1992.
21. M. I. Kay, R. A. Young and A. S. Posner, *Nature*, 204:1050, 1964
22. H. Monma, S. Ueno and T. Kanazawa, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 31:15, 1981.
23. G. L. Darimont, R. Cloots, E. Heinen, L. Seidel and R. Legrand, *Biomaterials*, 23(12):2569, 2002
24. D. E. MacDonald, F. Betts, M. Stranick, S. Doty and A. L. Boskey, *J. Biomed. Mater. Res.*, 54(4):480, 2001.
25. C. M. Cotell, *Appl. Surface Sci.*, 69:140, 1993.
26. R. K. Singh, F. Qian, V. Nagabushnam, R. Damodran and B. M. Moudgil, *Biomaterials*, 15:522, 1994.
27. K. A. Gross and C. C. Berndt, *J. Biomed. mater. Res.*, 39(4):580, 1998.
28. M. Ogiso, Y. Yamashita and T. Matsumoto, *J. Biomed. Mater. Res.*, 41(2):296, 1998.
29. L. Cleries, J. M. Fernandez-Pradas and J. L. Morenza, *Biomaterials*, 21:1861, 2000.
30. C. Y. Yang, R. M. Lin, B. C. Wang, T. M. Lee, E. Chang, Y. S. Hang and P. Q. Chen, *J. Biomed. Mater. Res.*, 37(3):335, 1997.
31. E. Hayek and W. Stadlmann, *Angew. Chem.*, 67:327, 1955.
32. J. B. Park and R. Lakes, *Biomaterials*, An introduction, 2nd Ed., 1-6, 1992.
33. W. Suchanek and M. Yoshimura, *J. Mater. Res.*, 13(1):94, 1998.
34. O. Bostman, *J Bone Joint Surg.* 73:148 1991
35. K. A. Athanasiou, A. R. Singhal, C. M. Agrawal, and B. D. Boyan, *Clin Orthop.* 315:272, 1995
36. L. G. Cima, J. P. Vacanti, C. Vacanti, D. Ingber, D. Mooney, and R. Langer, *J. Biomech. Eng.* 113:143, 1991
37. A. G. Mikos, G. Sarakinos, S. M. Leite, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Biomaterials*, 14:323, 1993
38. J. O. Hollinger, and J. P. Schmitz, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 45:594, 1987
39. Nancy E Lane, *Therapy Insight: osteoporosis and osteonecrosis in systemic lupus erythemato년*, *Nat. Clin. Pract. Rheumaltol.*, 2:562-569, 2006.

40. J. Y. Hong, Y. J. Kim, H. W. Lee, W. K. Lee, J. S. Ko, and H. M. Kim, *Biomaterials*, 24:2977-2984, 2003.
41. T. Futagami, T. Okamoto, Y. K. Shi, 95(8):775, 1987.
42. M. Jarcho, C. H. Bollen, M. B. Thomas, J. Bobick, J. F. Kay and R. H. Doremus, J. Maler, *Sci.*, 11:2027, 1976
43. C. M. Fayard, H. M. Villele, G. Paul, J. C. Siberchicot, *Eur. Pat.*, 4:18, 1985.
44. R. Kurokawa, *Nagoya Kogyo Gijutsu Shikensho Hokoku*, 34(7):210-216, 1985.
45. G. W. Latimer, I. Wayen, H. Hinojosa, M. Roth, *Journal-Association of official Analytical chemists*,71(4):854, 1988.
46. P. Luo, T. G. Nieh, *Materials Science & Engineering, C. Biomimetic Materials, Sensors and Systems*, C3(2):75-78, 1995.
47. J. A. Clemens, J. G. Wolke, C. P. Klein, K. Groot, *Journal of Biomedical Materials Research*, 48(5):741-748, 1999.
49. D. J. Ballman, S. W. Creedon, J. W. Geoffrion, T. D. Hede, M. F. Langenfeld, J. E. Trautz, *PCT Int. Appl.*:32, 2001
50. Higham, Paul. *U.S. Pat. Appl.*:4, 2002.
51. Yokogawa, Yoshiyuki. *Phosphorus Research Bulletin*, 20:33-40, 2006.
52. M. Eguchi, T. Yoshiichuka, *Jpn. Kokai Tokko Koho*, 7, 2007
53. R. R. Nie, Z. Feng, L. R. Shen, Z. Q. Chen, X. Y. Li, X. Dong, H. Gang, Y. Zhao, Z. H. Liang, *Key Engineering Materials*, 1596-1598, 2007
54. J. P. Wiff, V. M. Fuenzalida, J. L. Arias, M. S. Fernandez, *Materials Letters*, 61(13):2739-2743, 2007.
55. M. Inagaki, T. Kameyama, *Biomaterilas*, 28(19); 2923-2931, 2007.
56. I. S. Park, T. S. Bae, K. W. Seol, *Metals and Materials International*, 12(5):399-406, 2006
57. M. H. Li, S. X. Qu, R. Shen, N. Yao, P. D. R, J. Weng, *Key Engineering Materials* 330-332, 2007
58. H. H. Zhou, D. Zhang, L. H. Guo, H. Li, *American Journal of Applied Sciences*, 1-4, 2006.
59. M. Nelson, B. Ganesan, J. Thomas, *Int. J. Nanomed.*, 1(3):339-349, 2006
60. J. W. Reid, L. H. Tuck, S. Michael, K. Fargo, J. A. Hendry, *Biomaterials*,

- 27(15):2916-2925, 2006.
61. B. Ganesan, M. Sato, J. Tomas, *Biomaterials*, 27(14):2798-2805, 2006.
  62. V. F. Janas, K. S. Tenhuisen, *U.S. Pat. Apr.*:8, 2001
  63. H. Schiffl, *European J. Med. Res.*, 12(1):26-33, 2006.
  64. S. Y. Kitamura, *Thohka Daigaku Tagen Buaahitsu Kagaku Kenkyusho Sozai Kogaku Iho*, 61(1,2):21-24, 2006
  65. L. E. Jackson, B. M. Kariuki, M. E. Smith, J. E. Barralte, A. J. Wright, *Chem. Mater.*, 17(18):4642-4646, 2005.
  66. J. M. Oliveira, R. N. Correia, M. H. Fernandes, *Biomaterials*, 23(2):371-379, 2002
  67. C. Y. Kim, S. S. Jee, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 23(11):1803-1811, 2003.
  68. A. Pizoferrato, A. Vespucci, G. Ciapetti, S. Stea, *Biomaterials*, 6(5):346-351, 1985.

## List of publications

1. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Proliferation of human osteoblast-like cell line and activation of alkaline phosphatase in hydroxyapatite" The Spring Meeting of the Korean Ceramic Society 2008, P.140, Seoul National University, Seoul, Korea, Apr. 24-26, 2008.
2. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Comparison of cell activity and proliferation in synthetic hydroxyapatite and bovine bone derived Hydroxyapatite" The 5th International Conference on Advanced Materials and Processing, Harbin, China, Sep. 3-6, 2008.
3. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "In vitro biocompatibility of hydroxyapatite derived from xenograft with osteoblast-like cells" The Fall Meeting of the Korean Ceramic Society 2008, P.110, Kyonggi University, Suwon, Korea, Oct. 24-25, 2008.
4. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Cytotoxicity and Proliferation of Human bone marrow cells on Synthetic Hydroxyapatite and Bovine Bone Derived Hydroxyapatite", 3rd International Conference on Surface, Coatings and Nanostructured Materials(NanoSMat), NSM304, Hotel Meli Barcelona, Spain, Oct. 21-24, 2008.
5. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "In vitro behavior of MG-63 cells on hydroxyapatite and bovine bone derived hydroxyapatite" 2008 International Conference on Nanoscience and Nanotechnology, P.156, Jeonnam University, Gwangju, Korea, Nov. 6-7, 2008.
6. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Microstructural response of hydroxyapatite to stem cells in rabbit tibia defect" 2008 International Conference on Nanoscience and Nanotechnology, P.157, Jeonnam University, Gwangju, Korea, Nov. 6-7, 2008.

7. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Human osteoblast-like cells proliferate onto Bioceramics In vitro" 2008 Meeting of The Korea Society for Biomaterials, P.64, Seoul Nation University of Technology, Korea, Nov. 28-29, 2008.
8. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Biocompatibility of Hydroxyapatite Ceramics Derived from Animal Bones" The 10th International Symposium on Eco-materials Processing and Design, P.188, Xian Jiaotong University, Xian, China, Jan. 13-15, 2008.
9. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Proliferation and attach of the osteoblast according to the bioceramics." 2008 Meeting of The Korea Society for Biomaterials, P.64, Technopark, Seoul, Korea, Nov. 28-29, 2008.
10. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "In vitro Biocompatibility of Hydroxyapatite Derived from Xenograft" The Spring Meeting of the Korean Ceramic Society 2009, P.101, Pohang University, Gyungbuk, Korea, Apr. 23-24, 2009.
11. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "In vitro Biocompatibility of Hydroxyapatite Derived from Animal Bone with MG-63 Cell" Tissue Engineering and Regenerative Medicine, P177, Lotte Hotel World, Seoul, Korea, Aug. 31- Sept. 3, 2009.
12. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "MG-63 Cell Morphorogy and Proliferation in the Surface of Hydroxyapatite" 22nd European Conference on Biomaterials, P.740, Lausanne, Switzerland, Korea, Sept. 7-11, 2009.
13. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Biocompatibility of Porous Hydroxyapatite Derived from bovine bone with MG-63 Cells" The Fall Meeting of the Korean Ceramic Society 2009, P.101, Conventioncenter, Daejeon, Korea, Oct. 19-20, 2009
14. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Biological behavior of MG63 cells on the hydroxyapatite surface" The 22nd International Symposium on ceramics in Medicine, Pohang University, Gyungbuk, Korea, Oct. 26-29, 2009.

15. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Bovine bone derived-HA surface on the behavior of the cells culture" 2009 Meeting of The Korea Society for Biomaterials, KIST, Seoul, Korea, Nov. 27-28, 2009.
16. Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Preparation of Porous Hydroxyapatite Derived from Bovine Bone and Feasibility Study with Human Osteoblast Cell", The 11th International Symposium on Eco-materials Processing and Design, Sakai, Osaka, Japan, Jan. 9-12, 2010.
17. J. K. Lee, Y. H. Ko, D. S. Seo, H. Kim and K. H. Hwang, "Biological performance of stem cell containing hydroxyapatite powder" 22nd European Conference on Biomaterials, P.528, Lausanne, Switzerland, Korea, Sept. 7-11, 2009.
18. S. W. Kim, Y. H. Ko, D. S. Seo and J. K. Lee, "Coating of Bovine Bone Derived Hydroxyapatite by Room Temperature Spray" The 22nd International Symposium on Ceramics in Medicine, Pohang University, Gyungbuk, Korea, Oct. 26-29, 2009.
19. H. G. Han, Y. H. Ko, D. S. Seo, G. J. Kim and J. K. Lee, "Preparation of CaCO<sub>3</sub>-containing Geopolymers for Green Concrete" International Conference on Manufacturing Science and Engineering(ICMSE2009), Zhuhai, China, Dec. 26-28, 2009.
20. D. S. Seo, Y. H. Ko, K. H. Hwang and J. K. Lee, "Microstructural analysis on biological disintegration of hydroxyapatite" The Second International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials(ISSIB-II), Hong Kong, Jan. 4-6, 2010.