

골대체재의 생체친화성

연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실

부교수 김 광 만

서 언

대부분의 골대체재(bone substitute materials) 또는 골이식재(bone graft materials)는 생체 조직 내에 이식되어 장기간 또는 영구적으로 유지되어야 하므로 생체친화성은 재료가 갖는 그 어느 성질보다도 중요하게 고려되어야 한다. Doland's Medical Dictionary에 의하면, 생체친화성이란 '생명체와 조화를 이루면서 생물학적 기능을 저해하거나 독작용이 없는 것'으로 정의하고 있으며, 재료나 기기의 생체조직이나 체액과의 적합성 또는 생물학적 기능에 어떠한 독작용이나 해로움 없이 생명체와 조화를 잘 이루는 정도라고 정의할 수 있다.

일반적으로 재료의 생체친화성을 평가하기 위해서 표준화된 시험방법을 적용할 수 있는데, 이러한 생체재료의 생체친화성 평가에 참조가 될 만한 규격으로 ISO 7405:1997, ISO 10993 Part 1~16, ADA Specification no. 41, 한국식품의약품안전청 고시규격으로 의료용구의 생물학적평가를 위한 규격 등이 있다^{1,2,3,4}.

그러나 구강악안면 분야에서 사용하는 골대체재의 생체친화성을 평가하기 위하여 표준화된 방법

이외의 동물실험을 통한 접근법이 다양하게 소개되고 있으며, 이들에 관한 내용은 치의학 관련 학술잡지에서 접근할 수 있다.

구강악안면 영역에 사용되는 골대체재의 생체친화성을 평가하기 위한 다양한 방법들을 세포를 이용한 실험실적 시험(in vitro test), 동물을 이용한 안전성 시험(in vivo test), 동물을 이용한 유효성 시험(usage test)으로 구분하여 소개하고자 한다.

본 문

ISO 10993-1, Biological evaluation of medical devices-Part 1 : Evaluation and testing에 따르면 골조직에 장기간 이식하는 의료기기의 안전성을 평가하기 위해서 적어도 세포독성시험(cytotoxicity test), 감작성시험(sensitization test), 자극성시험(irritation test), 급성 및 아급성 전신독성시험(acute and subacute systemic toxicity test), 유전독성(genotoxicity test), 이식시험(implantation test)을 시행할 것을 제안하고 있다.

1. in vitro test

골대체제의 생물학적 안전성 평가하는 첫 번째 단계는 세포를 이용하는 in vitro test이다. 세포를 이용한 세포독성시험(cytotoxicity test)은 시험에 소요되는 기간이 짧고, 경제성이 좋으며, 재현성이 우수하면서도 정량적인 평가가 가능하므로 모든 생체친화성 평가 가운데 우선적으로 고려하는 시험방법이다. 이때 사용하는 대상 세포로는 일반적으로 확립세포주(cell line)를 이용하게 되는데, 쥐의 섬유세포인 L929를 사용할 수도 있으나, 골대체제는 골 조직과 접촉하게 되므로 유사골모세포인 MC3T3 세포를 사용하는 것이 보편적이다.

특히 MC3T3은 골모세포로서 적절한 배양환경에서 석회화 현상도 유도할 수 있기 때문에 대상 물질의 단순한 세포독성뿐만 아니라 골세포의 활성화 및 대사에 미치는 영향까지도 예측할 수 있다.

단순한 독성 평가를 위해서는 한천확산시험(agar diffuse test)나 MTT 시험 등을 시행하게 되는데, 한천확산시험은 대상 골대체재료 자체 또는 재료로부터 발현된 물질이 한천을 투과하여 세포와 접촉하게 되는데, 이로 인한 세포의 형태와 수를 바탕으로 독성 여부를 판정하게 된다. MTT 시험은 골대체재료 또는 재료의 용출물을 함유한 배지 내에서 세포를 일정 기간 동안 배양한 후 세포로부터 발현된 환원성 효소의 양을 비색법으로 정량할 수 있는 MTT 시약을 처리하는 방법으로 독성과 세포의 활성화도에 미치는 영향을 판정하게 된다.

골대체재료가 유사골모세포의 골대사에 미치는 영향까지 보기 위해서는 ALP(Alkaline Phosphatase) 활성도를 평가할 수 있는데, 골세포는 정상적인 배양 조건에서는 석회화 물질을 생성하게 되고 이 과정에서 alkaline phosphatase라는 효소를 발현하게 된다. 따라서 배양 과정 중에 alkaline phosphatase를 인지할 수 있는 표지물질을

이용하여 ALP 활성도를 평가할 수 있다. 만약 해당 골대체재료가 단순한 골전도(osteochonduction) 기능 외에 골유도(osteoinduction) 기능까지 갖고 있다면 ALP 활성도가 크게 나타날 것이다.

유전독성을 평가하는 시험의 일환인 Ames test도 in vitro test의 하나이다. 여기에는 여러 가지 시험 프로토콜이 있는데 OECD guideline 474, 475, 478, 483, 484, 485, 486이 있다. 이것의 원리는 특수 배지에 골대체재나 이로부터 용출된 용출액을 추가하고, 돌연변이를 일으킨 세포 또는 세균을 일정 기간 배양한 후 역돌연변이를 일으켜 생존한 세포 또는 세균의 수를 측정하여 돌연변이성을 평가하는 것이다.

2. in vivo test

골대체제의 생물학적 안전성을 평가하기 위해 시행하는 동물을 이용한 in vivo test로는 감작성시험(sensitization test), 자극성시험(irritation test), 급성 및 아급성 전신독성시험(acute and subacute systemic toxicity test), 이식시험(implantation test) 등이 요구된다. 이 과정 중 골내 이식시험은 단순한 독성 관찰만 하는 것이 아니라 주변 골과의 반응성, 골형성 등과 같은 유효성도 판단할 수 있는 근거를 동시에 제시하므로 usage test로 분류할 수 있다.

감작성시험은 골대체제가 생체 내에서 알러지 현상 등과 같은 감작반응을 일으키는지 여부를 확인하고자 하는 평가방법으로 기니피그를 이용한 극대화법(maximization)을 이용한다. 일차로 시험물질을 동물에게 피내로 주입하고 7일 후 피부에 접촉시켜 국소유도를 시행한다. 국소유도한 지 14일 후 재감작시키고 이후 48시간동안 관찰하여 감작반응 발현 여부를 판단한다.

전신독성시험은 마우스의 정맥으로 골대체제의

용출물을 주입하고 일정기간동안 이상 여부를 관찰하고, 희생한 후 부검하여 주요 장기를 관찰함으로써 전신적인 독작용 발현 여부를 판단한다.

이외에도 만성독성시험(chronic toxicity test)이나 발암성시험(carcinogenicity test) 등도 추가적으로 고려해 볼 수 있다. 이러한 시험은 소요기간도 길 뿐만 아니라 많은 수의 동물의 희생이 따르므로 필수적으로 요구되지는 않는다. 그리고 발암성시험의 결과와 유전독성의 결과는 상호 연관성을 갖는다는 보고가 많이 있다. 따라서 Ames test가 발암성시험의 screening test로서의 역할을 감당할 수도 있다.

3. usage test

이식시험은 실제로 동물의 골에 결합부를 만들고 이 부위에 이식하여 재료의 안전성뿐만 아니라 주변 골에 대한 반응성, 재료의 흡수정도, 신생골의 형성 양상 등 임상적 상황에 가장 근접한 시험항목이다.

골조직에 이식하기 위해서 사용할 수 있는 동물과 이식기간은 Table 1과 같으며, 시험재료의 성격과 시험기간에 따라 동물의 종과 기간을 선정한다.

이식할 시료의 수는 충분한 수로 하며, 각 재료당 그리고 각 관찰기간 당 적어도 10개의 시료를

시행하는 것이 바람직하다. 골이식재의 시료의 크기는 이식재의 형태(고체, 분말, 연고 등), 시험동물의 종과 부위, 그리고 해당 골이식재의 용도에 따라 결정된다.

토끼의 경우에는 직경 2 mm, 길이 6 mm의 크기로, 개, 양, 염소, 돼지와 같은 중대형 동물의 경우에는 직경 4 mm, 길이 12 mm의 크기로 한다. 보통 각 기간별로 토끼는 적어도 4마리, 다른 동물이라면 2마리 정도를 준비해야 한다.

동물 한 마리 당 이식하는 부위는 토끼의 경우 최대 6곳, 개, 양, 염소, 돼지 등에서는 12곳 정도에 이식할 수 있다.

이식 이후에는 적절한 기간 간격을 두고 관찰하며 국소적, 전신적으로 이상 징후를 보이는 지 관찰한다. 또는 필요에 따라 주기적으로 방사선 촬영을 하고 치유상태를 관찰할 수도 있다. 일정 이식기간 이후에는 실험동물을 윤리적인 방법으로 희생해야 한다.

희생한 후 이식체를 비롯한 주위 조직을 육안적으로 그리고 조직학적으로 관찰한다. 육안 관찰 시에는 저배율의 확대경을 이용하고 조직의 상태나 이상 유무를 기록해야 한다. 조직학적 관찰을 위해서 슬라이드를 제작해야 하는데, 이때에는 골이식재 뿐만 아니라 그 주위 조직까지 포함하도록 절제해내야 한다. 이식재와 골조직 간의 경계면을 잘 관찰하기 위해서는 hard plastic에 포매하는 것이 좋다. 일반 조직 슬라이드와 같이 paraffin에 포매하면 슬라이드 절편을 제작하는 과정에서 경계부위 조직의 손상이 야기될 수도 있기 때문이다. 또한 경우에 따라서는 비탈회 시편을 제작할 수도 있는데 이 경우 슬라이드 절편을 얇게 연마하여 제작하므로 많은 시간과 비용이 소요된다.

조직 슬라이드 관찰을 통해서 Table 2와 같은 생체반응 여부를 판별해야 한다.

치과용 골이식재의 동물실험에서는 일차적으로

Table 1. animal species for implantation test of bone graft materials and period

species	12	26	implantation period weeks		
			52	78	104
rats	x	x	x		
guineapigs	x	x	x		
rabbits	x	x	x	x	
dogs	x	x	x	x	x
sheep	x	x	x	x	x
goats	x	x	x	x	x
pigs	x	x	x	x	x

Table 2. biological response parameters which shall be assessed

1	fibrosis/fibrous capsule, inflammation
2	degeneration
3	inflammatory cell infiltration
4	necrosis
5	other parameters; material debris, fatty infiltration, granuloma
6	bone tissue ingrowth
7	bone resorption/bone formation, calcification

소형동물인 흰쥐의 두개골을 이용하는 방법이 학술지에서 많이 소개되었다. 연구자에 따라서 방법상 약간의 차이는 있지만 보편적인 방법을 소개하면, 먼저 흰쥐를 마취한 후 두부의 털을 깎고 고정한다. 수술부위를 치과용 국소취액으로 침윤마취한 후 전두골 전방부에서 후두골 후방부까지 정중부를 따라 두피를 절개하여 두개골의 상면을 노출시킨다. 8 mm trephine bur를 이용하여 뇌막의 손상을 주지 않도록 하면서 지름 8 mm의 원형 결손부를 형성한다. 대조군에는 결손부를 형성한 후 아무것도 이식하지 않거나 대조군 이식재를 이식하고, 실험군에는 평가하고자 하는 골이식재를 이식한다(Fig. 1). 2주, 8주후 실험동물을 희생시키고 두개관을 절제한다. 조직학적 관찰을 하기 위하여 절제해낸 조직을

10% formalin에 고정한 후, 5% nitric acid에 넣어 탈회과정을 거치고 paraffin 포매를 하여 4 μm 두께로 관상면으로 절단한다. 절단된 조직편들 중에서 결손부의 가운데 부위를 포함하는 조직편과 양쪽 2 mm 떨어진 부위를 선택하여, Hematoxylin-Eosin(H-E) 염색법과 Masson-trichrome 염색법으로 염색하고, 광학현미경으로 관찰한다. 조직 계측학적 관찰을 위해서 조직 표본 상을 확대 관찰하고 컴퓨터 계측법을 이용하여 두개관 결손부에서 신생골 조직의 면적을 계측하기도 한다. 또한 이식 후 관찰기간 도중에 주기적으로 방사선 사진을 촬영하여 골밀도(bone density)를 예측할 수도 있다⁹⁾.

치주 영역에서는 치주낭에 대한 골이식재의 골개생 효과를 보기 위해서 개를 이용하는 경우가 많은데, 실험동물의 치조골에 인위적으로 골내낭을 형성하고 골이식재를 이용하여 치유되는 정도를 관찰한다. 일반적인 실험방법을 간단히 소개하면, 실험동물의 정맥 및 enflurane inhalation을 통한 전신마취를 시행하고, 치과용 국소마취액으로 시술 부위를 추가로 국소마취한다. 개의 경우 보통 하악 치아의 인접면에 주위 골에 4 mm x 4 mm x 4 mm의 골결손부 형성하는데, 이를 위해서는 적어도 2개월 전에 해당 부위의 인접치아를 발치하여 무치악 부

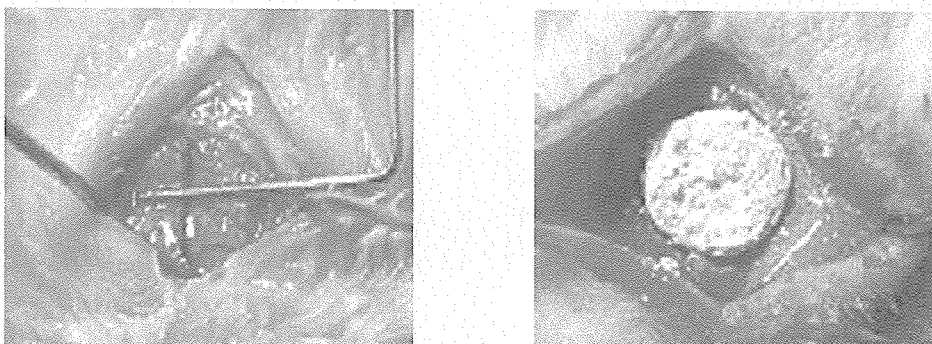


Fig. 1. The rat calvarial defect and graft materials.

분을 만들어야 한다. 결손부 기저부 위치의 치근에 1/4 round bur로 notch를 형성하여 후에 조직학적 관찰 시 골결손부의 참고 기준선으로 삼게 된다. 관찰기간 동안 주기적으로 방사선 사진을 촬영하여 골밀도나 골형성 과정을 간접적으로 평가한다. 일정 기간 경과 후 실험동물을 인륜적으로 희생하고 실험 부위의 치아와 주변조직을 포함하여 적출한 다음 전술한 바와 같이 고정, 탈수, 포매, 절편제작, 염색 등의 과정을 거쳐 조직학적 분석을 위한 슬라이드 제작하고 광학현미경으로 관찰한다⁹⁾.

결 언

전통적으로 골이식재는 사고나 질환 또는 암이나 낭종을 치료하기 위한 수술로 인하여 형성된 골 결

손부위를 기능적, 생리적으로 회복하기 위해서 주로 사용되어 왔다. 그러나 최근에는 치과용 임플란트 기술의 확대 보급으로 인하여 임플란트 기술을 하기에 생리학적인 골조직이 부족한 곳을 임플란트 기술이 가능한 조건으로 준비하기 위해서, 즉 상악동 거상술 등의 용도에 많이 요구되고 있는 실정이다. 자가골의 경우에는 해당이 되지 않겠지만, 동종골이나 이종골, 더 나아가서는 합성골 이식재에 있어서는 생체친화성이 매우 중요한 고려사항이다. 대부분의 상품화된 골이식재는 다양한 생체친화성 평가를 거쳐 그 안전성과 유효성이 입증된 것이 대부분이다. 그러나 일반적인 골이식재의 생체친화성 평가방법을 이해하고, 사용하고자 하는 골이식재의 특성을, 특히 생체친화성에 대한 평가자료를 보다 면밀히 검토하여 재료를 선정하면, 보다 우수한 임상효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. International standard organization. ISO specification 7405:1997 Dentistry-Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry-Test methods for dental materials, ISO, 1997, Geneve, Swiss
2. International standard organization. ISO specification 10993 : Biological evaluation of medical devices Part 1~16, ISO, Geneve, Swiss
3. American Dental Association. ANSI/ADA specification No. 41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials, American Dental Association, Chicago, IL, USA
4. 한국식품의약품안전청. 의료용구의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격, 식품의약품안전청, 2000, 서울, 대한민국
5. Lee SB et al., A histological evaluation of novel cyanoacrylate-based β -TCP composite in rat calvarial defects, Key Eng Mater 309-311:1133~1136, 2006
6. Choi SH et al., Effect of α BMP-2/ACS on healing in 3-wall intrabony defects in dogs, J Periodontol 73(1):63~72, 2002