

발간등록번호

11-1543000-001171-01

오리 및 말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 개발

(Development of biomaterials for bone substitutes
using duck and horse bones)

충북대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “오리 및 말뼉을 이용한 골대체재용 생체소재에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 12월 일

주관연구기관명 : 충북대학교

주관연구책임자 : 최 석 화

연 구 원 : 손 수 진

연 구 원 : 이 재 연

연 구 원 : 한 미 나

협동연구기관명 : 한국섬유개발연구원

협동연구책임자 : 손 준 식

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 정 종 훈

요 약 문

I. 제 목

: 오리 및 말뼉을 이용한 골대체재용 생체소재에 관한 연구

II. 연구성과 목표 대비 실적

- 가) 연구기간동안 골 이식재관련 세계 유일의 원천기술을 포함하여 국제 특허가 3건이 출원 되었으며, 국내 특허는 3건이 등록되었음.
- 나) 본 연구를 수행하는 동안 국제 전문 학술지(SCI)에 논문이 19건 게재되었으며, 국내 논문은 7건을 게재하였음.
- 다) ‘오리부리로부터 유래된 세라믹 소재, 소재의 제조기술 및 노하우’는 의료기기 전문 업체인 ㈜에프비바이오세라믹에 전용 실시권으로 기술 이전이 되었음 (2015년 9월 18일).
- 라) 말의 부산물을 이용한 골 이식재의 시제품 개발 : ‘치과용 골이식재’의 기준에 맞추어 시제품이 개발됨. 물리화학적 성능평가와 생물학적 안전성 평가가 시행 되었음.

연도	연구개발의 목표	연구개발 수행 내용	실적(%)
1차년도	오리 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 원료와 공정 개발	오리부리의 뼈 유래 생체소재의 제조공정 개발 및 생체적합성 동물시험	100
		오리 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 물리, 화학적특성 분석	100
		오리부리의 뼈 유래 생체소재의 제조공정별 멸균법의 개발	100
	말뼉을 이용한 골대체재용 생체소재의 원료와 공정개발, 제조공정의 기계화 및 설계	말뼉을 이용한 골대체재용 생체소재의 원료 제조와 공정개발	100
		말뼉을 이용한 골대체재용 생체소재의 제조 공정 기계화 및 설계, 가공처리	100
2차년도	오리 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 제조 및 동물안전성 시험	오리 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 생체적합성 및 안전성 동물시험	100
		대량 생산 기술 및 열처리 온도에 따른 오리 뼈의 물리화학적 특성 규명	100
		오리부리의 미생물 및 이화학적 검사	100
	말뼉을 이용한 골대체재의 생체의 실험 및 동물실험을 통한 생체적합성 평가	말뼉을 이용한 골대체재용 생체소재의 특성 및 안전성 평가	100
		말뼉을 이용한 골대체재용 생체소재의 생체의 실험 및 생체적합성 평가	100

연도	연구개발의 목표	연구개발 수행 내용	실적(%)
3차년도	오리 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 인체줄기 세포와의 친화성 검사와 조직재생 실험	오리 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 인체줄기 세포와의 친화성 검사	100
		오리 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 조직재생 검증	100
		오리 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 인체면역 세포에 대한 반응 검사	100
	말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 인체줄기 세포와의 친화성 검사와 조직재생 실험 및 시제품 개발	인체 이식형 골대체재의 인체줄기 세포와의 친화성 검사와 조직재생 실험	100
		말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재와의 인체줄기세포의 조직재생 검증	100
		고품질 생체소재 생산을 위한 비파괴 품질검사장치 설계	100

III. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 인구의 고령화에 따라 골질환의 증가 및 치과용 임플란트 관련 재료의 수요증가 등의 사회적 요인으로 인하여 골 재생용 세라믹의 새로운 생체소재 개발이 필요함.
- 현재 임상에 사용되는 골 대체재의 원료는 죽은 사람의 뼈와 소 및 돼지의 동물 사체 부산물 등이 있으나 재료의 안정적 공급도 어렵고 감염상의 리스크가 높음. 특히 소는 광우병에 노출되어 있음.
- 세계 골 대체재의 시장은 해마다 7-12% 성장률이 예상되므로 골 대체재의 원료개발에 따른 원천기술의 확보는 추후 거대시장의 외화를 국내로 유입되게 할 수 있는 가장 이상적인 방법임.
- 국내에서 골 이식재용 원료는 대부분 수입에 의존하고 있어 막대한 외화가 해외로 유출되고 있으며, 이로 인한 제품 가격의 상승은 국민의 부담을 크게 가중시켜 적지 않은 가계 부담을 낳고 있음.
- 오리와 말뼈는 원료 제한성이 없으므로 대량생산이 가능하고, 이종골과 동종골보다 쉬운 제조공정 및 인체거부 반응이 적어 제조비용 절감 효과 및 우수한 골 재생능력을 기대할 수 있어 타 제품에 비해 극대화된 시장 확장성을 가질 수 있음.
- 오리와 말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 제조기술과 응용기술을 개발함으로써 농업 생물자원을 이용한 바이오산업 분야에서 기술적 및 경제적 효과를 창출할 수 있음.
- 오리와 말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재를 확보하고, 이를 조직공학용 생체조직 및 생체기관의 제품 응용 및 실용화를 통해서 손상된 신체기관의 일부분을 대체할 수 있는 바이오산업 기술에도 기여하리라 사료됨.
- 따라서, 오리와 말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 기술 확보는 세계 최초의 시도이므로 원천특허에 대한 잠재성이 확실하며 오리 농가와 말축산 농가, 국가보건사업의 증

진을 위해 꼭 필요한 연구 사업임.

- 전량 폐기되는 오리 부리(1억마리 이상/년)를 이용하여 고부가가치의 골대체재용 생체소재를 개발하는 것은 친환경적 사업이며, 오리 농가의 소득을 증대시키고 창조경제에 크게 기여할 수 있어 반드시 필요한 연구 사업임.
- 말뼉가루는 Ca과 P의 성분이 다른 동물에 비해 많아 인체의 뼈에 매우 효능이 좋다고 알려져 다른 식품재료와 혼합되어 1 g당 약 30원 정도에 식용으로 판매되고 있으나 이를 생체소재로 개발시에는 1 g당 약 15만원 (Bio-Oss®, Geistlich Co., 스위스) 이상으로 판매가 가능하여 말 축산 농가에 약 30-50% 이상의 큰 소득 증대를 가져다 줄 수 있음.
- 국민복지 차원에서도 몸의 통증 및 불편함을 감수하기보다 골 대체재를 이용한 외과적 수술치치를 통한 생활의 질 향상 요구에 부응하는 생명공학기술로서 오리와 말뼉을 이용한 생체소재의 개발이 필요함.

IV. 연구개발 내용 및 범위(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

1. 오리부리 및 말뼉 유래 생체소재의 물리화학적 특성 조사
 - 가. 골대체재용 생체소재의 원료와 가공공정의 개발
 - 나. 제조된 오리부리 및 말뼉 입자의 물리화학적 특성 분석
2. 오리부리 및 말뼉을 이용한 골대체재용 생체소재의 생물학적 유효성 및 안전성 평가
 - 가. 골대체재용 생체소재의 생체 적합성 평가
 - 나. 생체소재의 멸균제조 공정법의 개발
 - 다. 골대체재용 생체소재의 열처리에 따른 특성 평가
 - 라. 골대체재용 생체소재의 감마선 멸균법의 개발
3. 오리부리 및 말뼉 유래 생체소재의 생물학적 유효성 및 안전성 평가를 위한 동물실험
 - 가. 골대체재용 생체소재의 생체 적합성 평가
 - 나. 골대체재용 생체소재의 생체 이식 실험
 - 다. 골대체재용 생체소재의 생체안전성 골재생능 평가
4. 오리부리 및 말뼉 유래 생체소재의 유효성 및 안전성 평가
 - 가. 골대체재용 생체소재의 인체면역세포에 대한 면역반응 검사
 - 나. 골대체재용 생체소재의 세포독성 평가
 - 다. 골대체재용 생체소재의 인간유래 지방줄기 세포와의 친화성 평가
 - 라. 골대체재용 생체소재의 인간유래 치아줄기 세포를 이용한 세포친화성 검사

5. 시제품의 물리학적 성질 및 생물학적 안전성 평가

- 가. 오리부리 및 말뚝 유래 골대체재의 무균시험
- 나. 오리부리 및 말뚝 유래 골대체재의 피부감작성 시험
- 다. 오리부리 및 말뚝 유래 골대체재의 세포독성 검사
- 라. 오리부리 및 말뚝 유래 골대체재의 생체내에서 발열성 평가
- 마. 오리부리 및 말뚝 유래 골대체재의 급성 독성 평가
- 바. 오리부리 및 말뚝 유래 골대체재의 피내반응 평가
- 사. 오리부리 및 말뚝 유래 골대체재의 세포친화성 검사

V. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

1. 오리부리 및 말뚝을 이용한 치과용 골 충전재의 개발

- 가. 치과용 임플란트 수요의 증가로 안전하고 재생효과가 뛰어난 잇몸 뼈 충전재의 개발로 임플란트의 시술효과를 높임.
- 나. 뼈 충전재뿐 아니라 뼈 시멘트 등의 바이오 생체재료에도 다양하게 사용할 수 있으며 뼈 재생에 시너지 효과를 유발.

2. 오리부리 및 말뚝 유래 바이오 세라믹 생체소재의 개발

- 가. 뼈 손상이 큰 부위에도 오리부리의 뼈는 뼈의 전도성과 유도성이 좋음.
- 나. 손쉬운 제조 공정의 개발과 가공으로 사람 맞춤형 성형외과용 뼈 대체재로 개발.
- 다. 기존 재료와 기술에서 완전히 차별되는 창의적이고 독창적인 생체소재의 개발로 창조경제에 기여할 신기술 확보.
- 라. 오리부리 및 말뚝 유래 생체삽입형 의료기기인 식품의약안전처에서 요구하는 청정 설비를 갖추고 이에 물성을 맞추어 제품을 개발하는 공정을 확립함.
- 마. 골 분말 입자의 크기를 조절하여 bioresorbable한 성질을 갖는 초미세 분말을 제조함. 이는 키토산과 섞었을 때 생체소재로 사용하기 적합한 강도를 가짐을 관찰함.
- 바. 초미세 골 분말과 키토산 용액을 혼합하여 기존에 사용하던 칼슘포스페이트 시멘트와 비슷한 물성을 가지는 혼합물을 개발함. 개발한 초미세 골 시멘트는 골 재생을 촉진시키는 효과가 탁월했음.
- 사. 의료기기 허가를 위한 제조 공정 및 품질관리 시스템의 개발

VI. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 가. 골대체재의 국산화 및 산업화: 오리 및 말 부산물로부터 얻어진 바이오세라믹 생체소재는 생물학적 안전성 검사 결과를 토대로 제품화 및 산업화할 예정임.
- 나. 축산 농가의 새로운 고부가 수익원 창출: 본 연구의 결과물은 축산농가의 고부가가치

를 창출할 것이며 농가수입의 한 획을 그을 수 있는 미래 농촌 성장동력 사업이 될 것임.

다. 자원의 재활용(녹색환경산업)과 농가소득 증대(현실적 농가접근산업), 고부가가치 생체소재 개발(첨단미래형 생명산업), 국민보건 향상(국민보건의료산업), 축산 농가/산업체/축산협회/대학 등이 연계된 Agricultural Livestock Byproducts, Biosystems Engineering, Biomaterials, Tissue Engineering, Nanotechnology가 결합된 단 융복합 산업군 구성의 기반으로 활용할 토대를 마련함.

라. 본 연구의 결과물인 초미세 콜리식재를 3D 바이오 프린터의 원료 물질로 사용하여, 뼈 조직재생용 지지체를 개발할 예정임.

SUMMARY

I. Title

Development of biomaterials for bone substitutes using duck and horse bones

II. Achievements

- A. Characterization analyses of duck beak and horse bones for bone substitutes.
- B. Fabrication of bone substitute materials and establishment of the manufacturing process of duck beak and horse bones.
- C. Evaluation of the biocompatibility of duck beak and horse bone-derived biomaterials for bone substitute.
- D. Development of prototype the duck beak and horse bone-derived biomaterials for bone substitute.
- E. The prototype was produced in conformity with the guideline from the Ministry of Food and Drug Safety.
- F. The appraisal about physicochemical properties and biological safety was conducted.
- G. Sixteen international research papers and seven domestic research papers were published during this research period.
- H. Three international patents and three domestic patents were obtained through conducting this research project.

III. Purpose and needs

Various bone diseases caused by aging and demand of dental implants is gradually increasing. There are requests for the development of new bio-ceramic biomaterials, which could regenerate the damaged bone tissue. Currently, the world market of bone substitute is expected to grow 7-12% annually.

Therefore, securing the novel manufacturing method about bone substitute is prerequisite. Among many animal byproducts, duck and horse bones powder has been utilized for the

edible products because of the high content of calcium and phosphorous ions compared to any other animals.

Consistently, duck and horse bone-derived biomaterials for bone substitutes (DHBBS) could be more effective than any other animal bone-based bone substitute. DHBBS easily mass-produced because it has no limitation of raw materials and it has simple manufacturing method.

If duck and horse bones are made for xenograft biomaterials than the food, its value could be multiplied over 5000 folds. Thus, in these research, the DHBBS were developed and evaluated. Moreover, commercialization and industrialization of the DHBBS were also investigated.

IV. Criterion of research

- A. Development of manufacturing process of DHBBS
- B. Studying on the characteristics of DHBBS according to part and production of the biomaterials to implants for human body
- C. Functionality of DHBBS by incorporation of submicron- and micro-sized bone powders
- D. Development of calcium phosphate composites using duck beak and horse bone powders and chitosan solution
- E. Development of quality control systems and manufacturing process for permission as medical appliances

V. Results

- A. Development of manufacturing process of DHBBS: The DHBBS which can be classified as a medical appliance were developed through this research. The clean equipment and manufacturing process was established according to the guideline from the Ministry of Food and Drug Safety to obtain their approval.
- B. Characteristics of DHBBS by parts: The properties of DHBBS by parts were investigated. The main component of sintered bone was identified as hydroxyapatite. There is no significant difference by parts.
- C. Development of DHBBS with submicro-sized particles: The ultra-fine sintered duck beak and horse bone powders which are bioresorbable were developed by controlling

particle size.

- D. Development of calcium phosphate composites with duck beak and horse bone powders and chitosan: The calcium phosphate composites with duck beak and horse bone powders and chitosan were made. The composites had similar properties with commercial calcium phosphate cements. In addition, the enhancement of osteogenesis was observed by the composites.
- E. Development of quality control systems and manufacturing process for permission as medical appliances. The test to confirm the physicochemical properties of the bone substitute was conducted following guidelines from the Ministry of Food and Drug Safety.

VI. Outcomes and future plans

- A. Commercialization and industrialization of bone substitute: The bone substitutes can be industrialized based on the biological safety results.
- B. Excavation of new value-added earnings on stockbreeding farmhouse: The results of this study can be classified as high-value products because there is severe difference between selling price and costs of raw materials. The products will be new growth engines in agricultural industry.
- C. This study is based on organization of fusion and convergence, including recycling (Green Environmental Industry), increasing the income of farmers (Practical methods to support farmhouse), development of biomaterials (Future biological industry), improving national health service (National health care industry), and relationship between farmhouses, industries, and university.
- D. Three-dimensional printing-based scaffolds which contain submicro-sized DHBBS will be developed.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	
Section 1. Necessities of Project	15
Section 2. Background of Project	16
Section 3. Objectives of Project	17
Chapter 2. Current status of technology	18
Chapter 3. Results of Project	
Section 1. Development of duck beak bone-derived biomaterials for bone substitutes	
A. Identification of basic physicochemical properties and development of duck beak bone-derived biomaterials for bone substitutes	22
B. Biological safety and effectiveness of duck beak bone-derived biomaterials for bone substitutes	42
C. <i>In vivo</i> study for the evaluation of safety and effectiveness of duck beak bone-derived biomaterials for bone substitutes	71
D. <i>In vitro</i> study for the evaluation of safety and effectiveness of duck beak bone-derived biomaterials for bone substitutes for commercialization	89
E. New fabrication of duck beak bone and establishment of the manufacturing process	111
F. Reports of the prototype for biological safety and physicochemical properties ..	135
Section 2. Development of horse bone-derived biomaterials for bone substitutes	
A. Identification of basic physicochemical properties and development of horse bone-derived biomaterials for bone substitutes	162
B. Biological safety and effectiveness of horse bone-derived biomaterials for bone substitutes	182
C. <i>In vivo</i> study for the evaluation of safety and effectiveness of horse bone-derived biomaterials for bone substitutes	223

D. <i>In vitro</i> study for the evaluation of safety and effectiveness of horse bone-derived biomaterials for bone substitutes for commercialization	242
E. New fabrication of horse bone and establishment of the manufacturing process..	258
F. Reports of the prototype for biological safety and physicochemical properties...	261
Chapter 4. Achievement and contributions on relative industries	299
Chapter 5. Outcomes and further plans	310
Chapter 6. International scientific and technological information gathered during the study ·	311
Chapter 7. Current status of achievements	313
Chapter 8. Safety management of laboratory	314
Chapter 9. References	318

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표	
1. 연구의 필요성	15
2. 연구의 배경	16
3. 연구의 성과목표	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	
1. 폴리식재의 학술 연구.....	18
2. 폴리식재의 제품.....	19
3. 국내외 폴리식재의 특허 현황.....	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
제1절 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 개발	
1. 오리부리의 뼈 유래 생체소재의 물리화학적 특성 조사	
가. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 원료와 가공공정의 개발...	22
나. 제조된 오리부리 뼈 입자의 물리화학적 특성 분석.....	26
2. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 생물학적 유효성 및 안전성 평가	
가. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 생체적합성 평가	42
나. 오리부리의 뼈 유래 생체소재의 멸균제조 공정법의 개발	50
다. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 열처리에 따른 특성 평가	59
라. 인공합성 하이드록시아파타이트/오리부리의 뼈 이중구조 지지체의 제조 및 세포 친화성 검사	61
3. 오리부리의 뼈 유래 생체소재의 생물학적 유효성 및 안전성 평가를 위한 동물실험	
가. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 생체 치조의 적합성 평가	71
나. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 토끼 경골의 이식 실험	76
다. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 생체안전성 골재생능 평가	84
4. 오리부리의 뼈 유래생체소재의 유효성 및 안전성 평가	
가. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 인체면역세포에 대한 면역반응 검사	89
나. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 세포독성 평가	92

다. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 인간유래 지방줄기 세포와의 친화성 평가	93
라. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 인간유래 치아줄기 세포를 이용한 세포친화성 검사	98
5. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 신공정 개발	
가. 오리부리의 뼈 유래 골대체재용 생체소재의 새로운 제조공정의 개발	111
나. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 신공정의 생체 적합성 검사	130
6. 시제품의 물리학적 성질 및 생물학적 안전성 평가	
가. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 무균시험	135
나. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 피부감작성 시험	140
다. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 세포독성 in vitro 시험	145
라. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 생체내에서 발열성 평가	148
마. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 급성 독성 평가	150
바. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 토끼의 피내반응 평가	154
사. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 세포친화성 검사	157
제2절 말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 개발	
1. 말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 개발 및 물리화학적 기본특성 조사	
가. 말뼈 부위별 생체소재의 물리화학적 특성 분석	162
나. 말뼈의 세부 공정별 재료 특성 분석	166
다. 골 분말의 입도 크기가 물리적 특성에 미치는 영향에 관한 연구	174
2. 말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 생물학적 유효성 및 안전성에 관한 연구	
가. 열처리 온도를 달리한 생체소재에서의 세포 친화성 실험	182
나. 생체소재와 키토산 혼합물의 세포 친화성 실험	186
다. 생체소재를 이용한 골 조직재생을 위한 줄기세포의 증식과 분화 촉진에 관한 연구	195
라. 그래핀이 함유된 골시멘트의 개발	206
마. 서로 다른 입도 크기를 갖는 골 분말과 키토산과의 혼합물에서의 줄기세포 반응에 관한 연구	216
3. 말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 유효성 및 안전성 평가를 위한 동물실험	
가. 말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재(골시멘트)의 생체적합성 평가 I	223

나. 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 생체적합성 평가 II	226
4. 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 유효성 및 안전성 평가 및 제품화 방안	
가. 말뚝 유래 골 분말과 인간줄기세포를 이용한 하악골 재생을 위한 동물실험	242
나. 말뚝 유래 골분말 시멘트와 그래핀의 혼합물의 동물실험	254
5. 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 생산 설비 개발	
가. 생산 설비의 기계화 계획	258
나. 생체소재 제조공정의 기계화	259
6. 시제품의 물리학적 성질 및 생물학적 안전에 대한 보고서	
가. 생물학적 안전성에 관한 보고서	261
나. 물리 화학적 안전성에 관한 보고서	281
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	299
제 5 장 연구개발의 성과 및 성과활용 계획	310
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	311
제 7 장 연구시설 장비 현황	313
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적	314
제 9 장 참고문헌	318

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

1. 연구의 필요성

- 현재 임상에 적용하는 골 대체재는 경금속과 레진, 고분자 물질 등이 사용하고 있으나 재료로 다양성과 경제성, 안전성 등에서 다양한 의료 수요를 충족치 못하고 있음.
- 자가골의 이식이 가장 좋으나 이식재 확보 측면에서 한계에 도달해 이종골 대체재의 개발이 절실히 요구됨.
- 전 세계 생체소재 산업은 약 120억 달러(14조 4000억원)이고, 경조직의 보충과 보조, 대체 분야 등의 매출액이 연간 23억 달러(2조 7000억원)이다. 생체재료의 임상적용은 고령화 사회의 진입 등 사회환경 요인과 더불어 외상 환자와 변형성 관절염, 류마티스, 골다공증 등의 환자 증가로 향후 계속적으로 증가되어 해마다 7-12%의 성장률이 예상됨.
- 축산 부산물을 활용한 기초 연구에서 오리 및 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 개발 가능성을 발견함.
- 국내외 논문과 특허 등의 선행기술을 검색한 바 오리 부리의 재활용에 대한 특허는 전혀 없으며, 말뚝을 이용한 골대체재의 생산 기술도 거의 없음.
- 국내외적으로 가장 많이 사용되고 있는 인체 이식용 골 대체제인 Bio-Oss[®]제품(소뼈, Geistlich Co., Switzerland)의 인산칼슘계 바이오세라믹 생체소재는 2 g당 삼십만원으로 판매되고 있음.
- 따라서, 오리 및 말뚝을 재활용한 생체소재는 고부가가치일 뿐 아니라, 대부분 수입에 의존하는 국내 현실에 맞춰서 기술적·경제적 효과를 크게 창출할 수 있음.
- 현재, 국내 생체소재 분야는 기술력 부족으로 전량을 수입에 의존하고 있는 실정인 반면 수요는 계속 증가되고 있음.
- 이에 오리와 말뚝을 이용한 생체소재의 대량 생산 및 품질검사 시스템 그리고 생산기술도 시급히 요구됨. 이는 바로 축산자원의 재활용에 관련된 기술개발과 생체소재의 고부가가치 창출로 인한 국가 경쟁력 제고에 기여할 수 있음.
- 오리와 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재 개발에 관한 선점적 지적재산권의 확보 노력이 시급함.
- 오리와 말뚝 축산농가의 소득 증대와 신규 소득원의 개발로 농촌발전에 기여할 오리와 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 개발이 절실함.
- 전량 폐기되고 있는 오리 부리(1억마리 이상/년)의 활용과 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재 개발은 친환경적 산업의 선두적인 역할과 적용분야의 폭 넓은 저변확대를 이룰 수 있는 미래형 융복합 산업이 될 것임.

2. 연구의 배경

- 인구의 고령화에 따른 각종 골 질환의 증가와 치과용 임플란트 수요 증가 등에 따른 신규 골 재생용 바이오세라믹 생체소재의 개발이 요구됨.
- 국내 골 이식재 제품의 원료는 대부분 수입에 의존하고 있어 막대한 외화가 해외로 유출되고 있으며, 이로 인한 제품 가격의 상승은 국민의 부담을 크게 가중시켜 적지 않은 가격 부담을 낳고 있음.
- 현재 사용되고 있는 골 대체재의 원료는 죽은 사람의 뼈, 소 등의 동물의 사체 등으로부터 주로 추출하여 사용되고 있어 각종 질병의 전파 가능성과 채취량의 한계 등의 부작용에 노출되어 있음. 이에 생체기능성 및 생체적합성이 더 좋은 생체소재의 개발이 요구됨.
- 현재 전 세계적 골 대체재의 시장은 해마다 7-12% 성장률이 예상되므로 골 대체재의 원료개발에 따른 원천기술의 확보는 추후 거대시장의 외화를 국내로 유입되게 할 수 있는 가장 이상적인 방법임.
- 오리 축산업은 오리고기에 국한되어 팔리고 있으며 시장성이 낮아 오리농가의 낙후성을 부추기는 악재로 작용하고 있음. 이에 오리 부리를 활용한 생체소재로의 가능성이 매우 높으므로 이에 대한 연구개발이 요구됨.
- 오리 뼈는 오리고기 이외의 부산물을 사용하는 것으로 생체소재로 개발하면 고기보다 높은 가격경쟁력을 가질 수 있으므로 오리 축산농가에 약 30% 이상의 소득증대를 가져다 줄 수 있음.
- 돼지 뼈도 최근 국내에서 골대체재 생체소재로 개발되어 수입 골 대체재(소뼈) 판매가인 g당 15만원 수준에 판매하고 있어서 돼지 뼈보다 생체기능성과 생체 적합성이 더 나은 말뼈를 생체소재로 개발한다면 고부가가치의 생체소재를 생산할 수 있음. 현재 돼지 뼈는 일반적으로 식용으로 사용되지 않고 폐기되고 있음.
- 오리와 말뼈는 원료 제한성이 없으므로 대량생산이 가능하고, 이종골과 동종골보다 쉬운 제조공정 및 인체거부 반응이 적어 제조비용 절감 효과 및 우수한 골 재생능력을 기대할 수 있어 타 제품에 비해 극대화된 시장 확장성을 가질 수 있음.
- 국내외적으로 인체에 시술되고 있는 수입용 골 대체재의 원료는 대부분 소뼈로 생산하고 있으나 광우병의 감염으로 인해 안전성 측면에서 인체 감염의 우려가 있음. 따라서 이러한 질병이 없는 오리와 말뼈를 공급받아 고부가가치의 생체소재를 생산하는 친환경적 사업을 추진함으로써 축산 농가의 소득 제고에 기여함.
- 오리와 말뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 제조기술과 응용기술을 개발함으로써 농

업 생물자원을 이용한 바이오산업 분야에서 기술적 및 경제적 효과를 창출할 수 있음.

- 오리와 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재를 확보하고, 이를 조직공학용 생체조직 및 생체기관의 제품 응용 및 실용화를 통해서 손상된 신체기관의 일부분을 대체할 수 있는 바이오산업 기술에도 기여하리라 사료됨.
- 따라서, 오리와 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 기술 확보는 세계 최초의 시도이므로 원천특허에 대한 잠재성이 확실하며 오리 농가와 말뚝산 농가, 국가보건사업의 증진을 위해 꼭 필요한 연구 사업임.

3. 연구의 성과 목표

오리 및 말뚝을 이용한 골 대체재용 생체소재를 개발하기 위해 아래와 같은 세부 목표를 달성해야 함.

- 생체적합성을 가지는 오리 및 말뚝 유래 바이오 세라믹 생체소재의 제조공정 설계
- 생체적합성을 가지는 오리 및 말뚝 유래 바이오 세라믹 생체소재의 제조공정 개발
- 생체적합성이 있는 오리 및 말뚝 유래 바이오 세라믹 생체소재의 생체외 생체적합성 평가
- 오리 및 말뚝 유래 바이오세라믹 생체소재를 이용한 인체 이식용 골 대체재(이식재) 및 골 시멘트의 개발
- 말뚝 유래 바이오세라믹 생체소재의 인체 줄기세포와의 친화성 평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 골이식재의 학술연구

- 국내외를 막론하고 가축에서 얻어진 무기 소재인 뼈를 이용한 골 이식재 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 특히 전 세계적으로 사육두수가 많은 소의 뼈를 이용한 골 이식재에 대한 연구가 가장 활발하게 이루어진 상태임.

키워드	Bovine bone graft	Porcine bone graft	Avian bone graft	Equine bone graft
Scopus 검색 ¹⁾	1,327	525	89	133

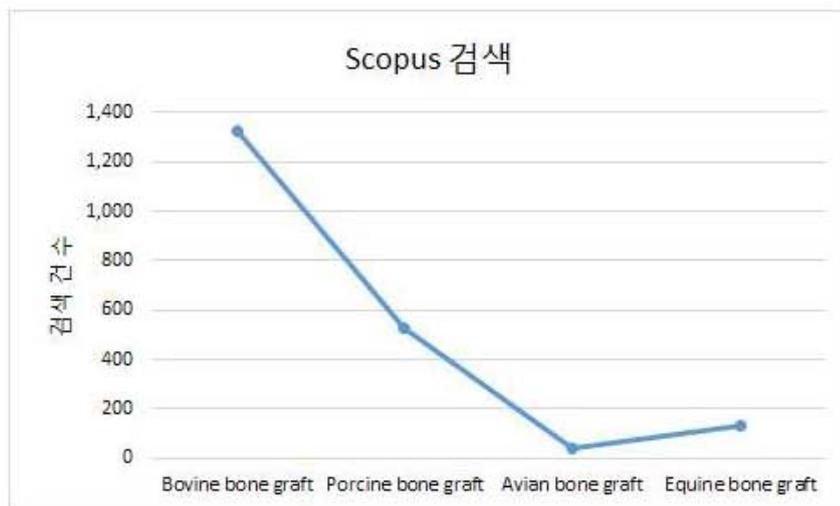


그림 1. 국내외 골이식재 학술연구 현황

- Scopus 서지 검색을 통해 각각의 가축에 대한 연구 논문 게재 건수를 조사한 결과 소뼈를 이용한 골 이식재의 연구 결과가 말뼈보다 월등히 많은 양을 보이고 있음 (그림 1).
- 또한 말의 뼈를 이용한 골 이식재에 관한 물리적 화학적 기본 특성 및 치료 특성이 타 가축군에 비해 부족한 상황임.

1) 15.12.16 www.scopus.com 검색 결과

2. 골이식재의 제품

표 1. 국내에서 시판되고 있는 골이식재의 제품

회사	제품명	국가	유래동물	특징
NIBEC	OCS-H	한국	말	말뼈에서 추출한 골무기질로 인체의 골 구조와 유사함.
NIBEC	OCS-B	한국	소	제조과정 상에서 소뼈를 조기에 분쇄하여 입자 표면적을 증대함.
Geistlich	Bio-Oss	스위스	소	30년 이상의 장기간 임상결과를 가지고 있으며 전 세계적으로 많이 이용되고 있다.
푸르고 바이오로지스	THE Graft	한국	돼지	세포테스트에서 기존의 소 골 이식재와 동등한 효과를 보임.
Inoteb	Biocoral	프랑스	산호	3차원적 구조가 인간 뼈와 유사함.
Botiss	Cerabone	독일	소	2년 이상의 성숙한 소를 이용하여 해면골의 비중이 높음.
Sigmagraft	InterOss	미국	소	저온살균 공정을 거치며 내부 표면적이 높음.
Oscotec	Biocera-F	한국	소	100% 해면골만 사용함.
Oscotec	InduCera	한국	소	특허 등록된 Ca-P 크리스탈 코팅기술을 적용해 골 재생 능력을 높인 제품.
셀루메드	Intergraft	한국	소	면역거부인자 및 감염성 바이러스 등을 제거하기 위해 국내 최초로 화학적 처리 방식을 사용.
Biomet3i	Endobon® Xenograft Granules	미국	소	비 흡수성 물질로 흡수가 돼서는 안되는 부위의 골 재생에 탁월한 효과가 있음.

- 현재 한국에서 유통되고 있는 대표적 이종골 이식재를 조사하여 (표 1)에 나타내었음.
- NIBEC에서 만든 OCS-H를 제외하면 대부분의 이종골 이식재가 소의 뼈를 이용하여 만들어졌음을 알 수 있음.
- 골이식재 관련 국내 특허 추세를 그래프로 나타낸 결과 2011년 이후 특허 등록건수가 늘어났음 (그림 2).



그림 2. 국내의 골이식재 관련 특허 현황

3. 국내·외 골이식재의 특허 현황

(1) 국내의 골이식재 대표 특허명²⁾

표 2. 국내 골이식재 관련 특허

	제목	등록년도	비고
1	동물 뼈를 이용한 골이식 대체재 및 그 제조 방법	02.03.25	소
2	동물 뼈를 이용한 골 대체물 제조방법	03.07.22	이중골
3	말뼈를 이용한 골이식재의 제조방법	08.06.23	말
4	참치 뼈 유래 수산화인회의 제조방법	12.10.16	참치
5	골 이식재 및 이의 제조방법	13.06.03	돼지
6	조류 부리로부터 유래된 세라믹을 이용한 생체의료용 및 산업용 재료의 제조 방법	13.08.06	조류 부리
7	이중골 유래 골이식재 및 그 제조방법	13.12.26	이중골
8	형질전환 돼지 뼈를 이용한 골 이식용 세라믹 입자, 그 제조방법 및 상기 입자를 포함하는 생체의료용 세라믹재료	14.03.25	형질전환 돼지
9	말뼈를 이용한 나노 세라믹 골시멘트 및 이의 제조 방법	14.12.10	말
10	갑오징어뼈를 이용한 골이식재 및 이의 제조방법	15.11.16	갑오징어

2) 2015년 12월 15일 기준, 특허정보넷 키프리스 (www.kipris.or.kr) “이중골”, “골이식재” 검색결과

- 국내 골이식재 제조에 관한 대표적 특허를 조사하여 (표 2)에 나타냄. 2010년대 이래로 소, 돼지를 제외한 다른 동물에서 얻어진 골 이식재의 제조에 대한 특허들이 등록됨.

(2) 해외 특허 검색수³⁾

표 3. 해외 골이식재 특허 현황

	Bovine bone graft	Porcine bone graft	Avian bone graft	Equine bone graft
미국	31,584	9,375	6,791	6,399
유럽	5,889	1,457	1,047	1,021
일본	75	43	11	13

- 해외 특허 검색결과 소뼈를 이용한 골 이식재가 가장 많은 등록 및 출원이 이루어 졌음을 알 수 있었음. 이는 연구 논문의 검색 결과와도 유사한 결과이며 가축의 사육두수가 높은 소를 중심으로 골 이식재 시장이 편성되어 있는 것을 알 수 있음.
- 미국의 경우 이종골 이식재 관련 특허를 유럽에 비해 3.5배 일본에 비해 약 400배 정도로 보유하고 있음.

3) 2015년 12월 15일 기준, 특허정보넷 키프리스 (www.kipris.or.kr) 해당 검색어 검색결과

3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 개발

1. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 물리화학적 특성 평가

가. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 원료와 가공공정 개발

- 국내산 육용 오리 (cherry valley, 생후 6-8주령)의 오리부리를 osteotome으로 절취하여, 3D micro-CT으로 오리의 두개골과 부리를 분석한 해부학적 구조는 (그림 1-1)과 같다.

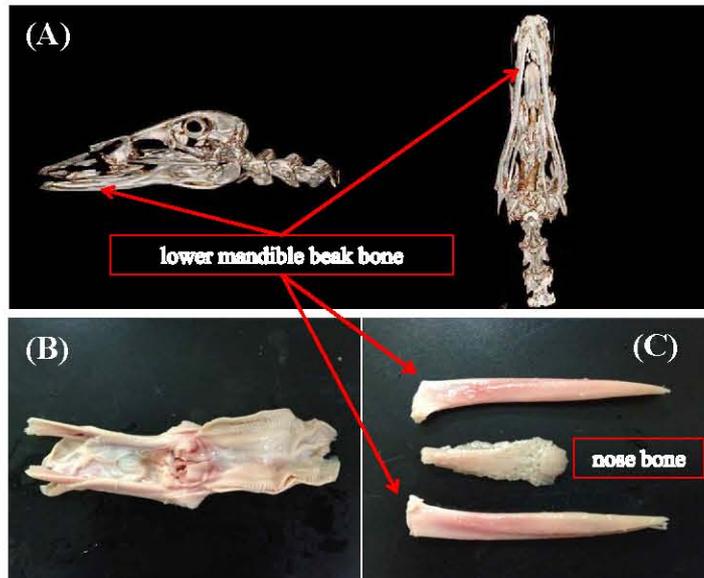


그림 1-1. 오리의 두개골과 부리의 3D



그림 1-2. 오리의 머리에서 절취한 부리와 회수된 아래턱 뼈 및 코 뼈(왼쪽, 중앙), 에탄올에 침지된 오리부리 뼈(오른쪽).

- 오리부리의 뼈에 함유된 유기물의 제거 공정을 개발하기 위해 1차적으로 건조된 부리 뼈를 10% 과산화수소 수용액에 24시간 침지한 다음 건조하여 탈색과정만을 거치고, 유기물의 제거없이 600℃와 900℃, 1,200℃에서 각각 3시간씩 바로 열처리 (소결) 하였음 (그림 1-3).
- 600℃에서 열처리한 오리부리의 뼈는 유기물이 탄화되어 완전히 제거되지 않아 검은색을 나타내고 있지만 900℃ 및 1,200℃에서 열처리한 오리부리의 뼈는 유기물이 제거되어 흰색을 나타내고 있음).



그림 1-3. 열처리 온도(왼쪽 600℃, 중앙 900℃, 오른쪽 1,200℃)에 따른 오리부리의 뼈.

- 오리부리의 뼈에도 지방과 단백질 등의 많은 유기물이 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, 고온 열처리 시 이들이 모두 제거됨을 확인하였다.
- 그러나, 고온 열처리 시 오리부리의 뼈를 구성하고 있는 수산화인회석의 고결정성으로 인하여 생분해도 및 물성에 영향을 줄 수 있으므로 유기물을 완전히 제거하고 열처리 온도에 따른 이들의 특성을 제어하는 것이 바람직할 것으로 생각됨.

- 아래의 (그림 1-4)은 회수된 오리부리 뼈의 연조직 제거 공정과 탈지, 탈단백, 수세, 건조 공정을 모식도로 나타낸 것임.

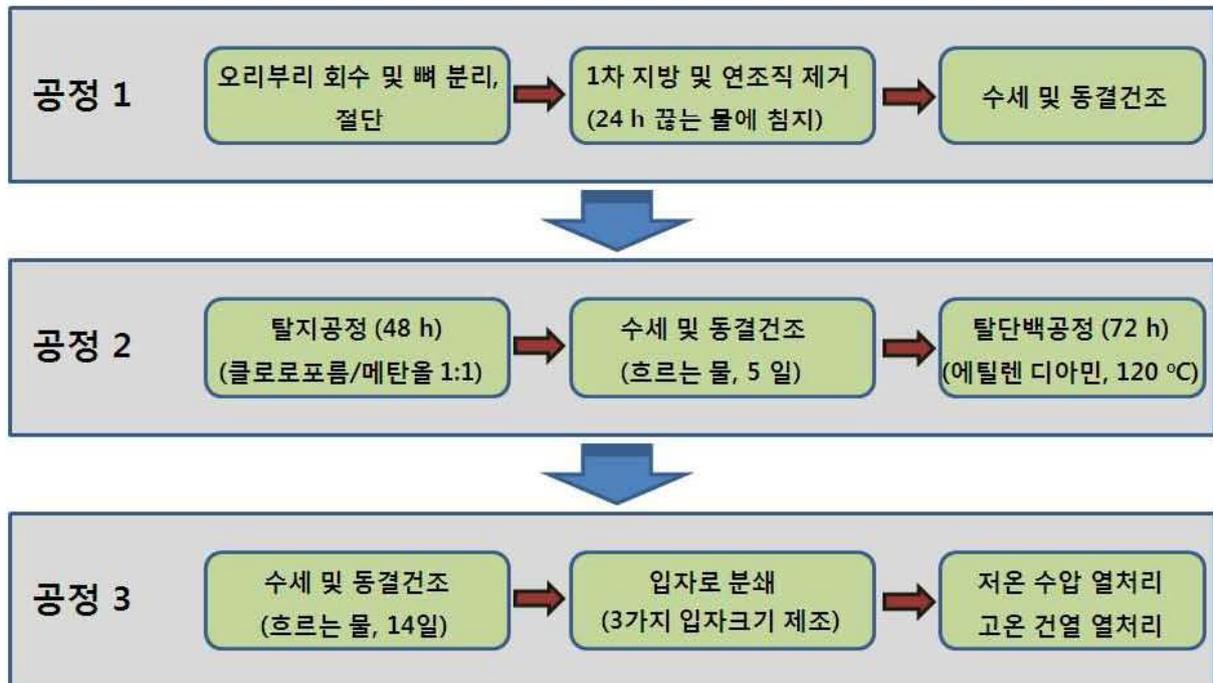


그림 1-4. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재 생체소재의 제조 공정의 모식도.

○ 공정 1

- 먼저 오리부리의 뼈로부터 연조직 및 1차 지방제거는 회수된 오리부리의 뼈를 끓는 물에 24시간 동안 침지한 후 여러 번의 수세과정을 거쳐 분리된 연조직을 제거하고 순수한 오리부리의 뼈만을 회수하여 동결 건조하였음.

○ 공정 2

- 오리부리 뼈의 탈지공정은 클로로포름과 메탄올 1 : 1 (v/v) 혼합 용액에 침지하여 속슬렛 추출 장치를 이용하여 48시간 동안 수행하였음.
- 이때 워터배스의 온도는 95℃로 유지하였고, 흐르는 물에 5일 동안 침지하여 잔류약품을 제거하고 동결 건조하였음.
- 탈단백 공정은 끓는 에틸렌디아민 용액에 부리 뼈를 침지한 다음 72시간 동안 수행하였음.
- 이때 맨틀의 온도는 200℃로 설정하였고 환류냉각기에 지속적으로 물을 흘려주어 기화되는 에틸렌 디아민의 유실을 최소화하였음.

○ 공정 3

- 탈단백이 완료된 오리부리의 뼈는 흐르는 물에 14일 동안 침지하여 오리부리의 뼈에 존재하는 화학약품을 완전히 제거하고 동결건조 하였음.
- 탈단백 공정 시간별 단백질의 제거 유무는 24시간과 36시간, 48시간, 72시간 동안 처리한 각각의 오리부리 뼈를 400℃에서 5시간 처리한 후 오리부리 뼈의 색깔변화로 관찰하였음.
- 탈단백공정에 의해 단백질이 완전히 제거되지 않은 오리부리의 뼈는 단백질의 탄화에 의해 오리부리의 뼈가 옅은 노란색에 가까운 색을 나타내며 단백질이 완전히 제거되었을 경우는 흰색을 나타냄.
- (그림 1-5)는 각 탈단백공정 시간별 400℃에서 열처리한 오리부리의 뼈를 디지털 사진으로 나타낸 것으로 탈단백 공정을 48시간 전으로 수행하였을 경우 오리부리의 뼈가 옅은 노란색을 나타낸 반면 72시간 처리한 오리부리의 뼈는 흰색을 나타내고 있음.
- 즉, 오리부리 뼈의 전처리 공정은 상기와 같은 방법으로 이루어졌을 때 가장 효과적이라는 결론을 얻었으며, 향후 최적화 공정 시스템을 적용하여 scale-up 공정에 활용할 계획임.
- 탈지 및 탈단백 공정이 완료된 오리부리의 뼈는 막자사발을 이용하여 입자화하였음. 이때 입자의 크기는 아래와 같이 분류하여 제조하여 물리화학적 특성을 평가하였음 (그림 1-6).

※ 입자 크기의 분류.

- In vivo: 0.7-1.0 mm
- SEM 및 EDS: 0.7-1.0 mm
- XPS: 0.5-0.7 mm
- XRD 및 FTIR; 0.05 mm 이하

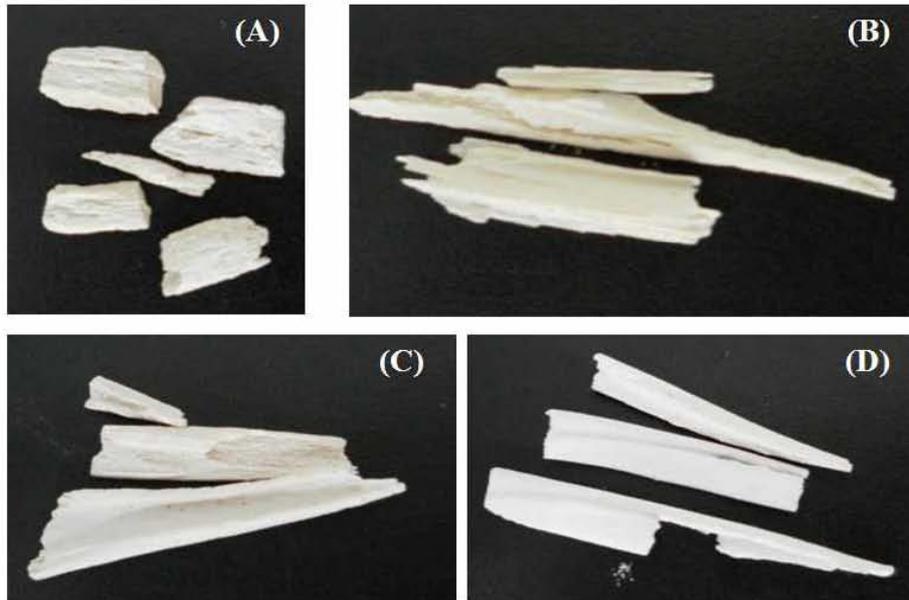


그림 1-5. 탈단백 공정의 시간별로 분류한 오리부리 뼈.
 (A) 24시간 처리, (B) 36시간 처리, (C) 48시간 처리, (D) 72시간 처리

- 입자로 제조된 오리부리의 뼈는 아래와 같이 열처리를 진행하여 분석 시료를 제조하였고, 양성 대조군으로 현재 세계에서 가장 많이 시판되고 있는 소뼈의 입자 (Bio-Oss[®], Geistlich, switzerland)와 동종골로서 자가치아 이식재 (Auto Tooth Bone, TBM Co., Korea)를 시편과 동일한 입자크기로 제조하여 사용하였음.
- 실험군의 분류는 제1군(양성 대조군)으로 소뼈 입자(Bio-Oss[®], Geistlich, switzerland)를 사용한 군과 제2군은 자가치아 이식재 (Auto Tooth Bone, TBM Co., Korea)를 사용한 군, 제3군은 고압멸균 소독을 이용한 120℃에서 30분간 저온 수압 열처리한 군, 제4군은 전기로를 이용한 400℃에서 5시간 건열 열처리한 군, 제5군은 전기로를 이용한 1,200℃에서 3시간 건열 열처리한 군으로 하였음 (그림 1-6).



그림 1-6. 본 연구에서 제조된 오리부리의 뼈 입자 및 소 뼈, 자가치아 입자.
 (G1, 제1군; G2, 제2군; G3, 제3군; G4, 제4군; G5, 제5군).

나. 제조된 오리부리 뼈 입자의 물리·화학적 특성 분석

(1) 형태학적 특성 분석

- 제조된 시료의 형태학적 및 표면 특성은 scanning electron microscope (SEM, JSM-6700F, JEOL, Japan)을 이용하여 측정하였음. 이때 완전히 건조된 시료를 카본테이프 위에 고정시키고 금박 코팅하여 이들의 각 배율별 SEM 사진을 촬영하였음 (그림 1-7 ~ 11).

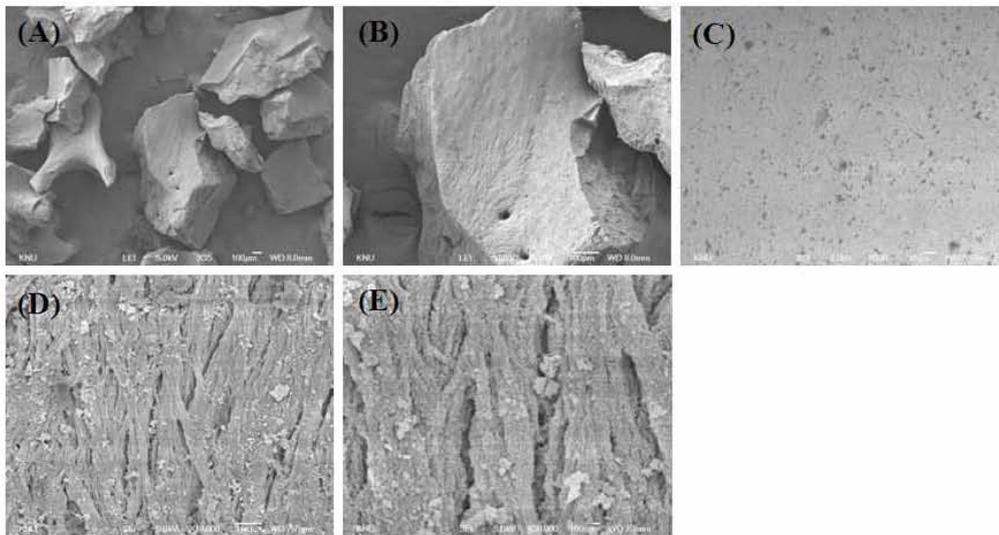


그림 1-7. 소뼈의 입자 형태 (제1 실험군, 양성 대조군).
(A $\times 35$, B $\times 100$, C $\times 500$, D $\times 10,000$, E $\times 30,000$).

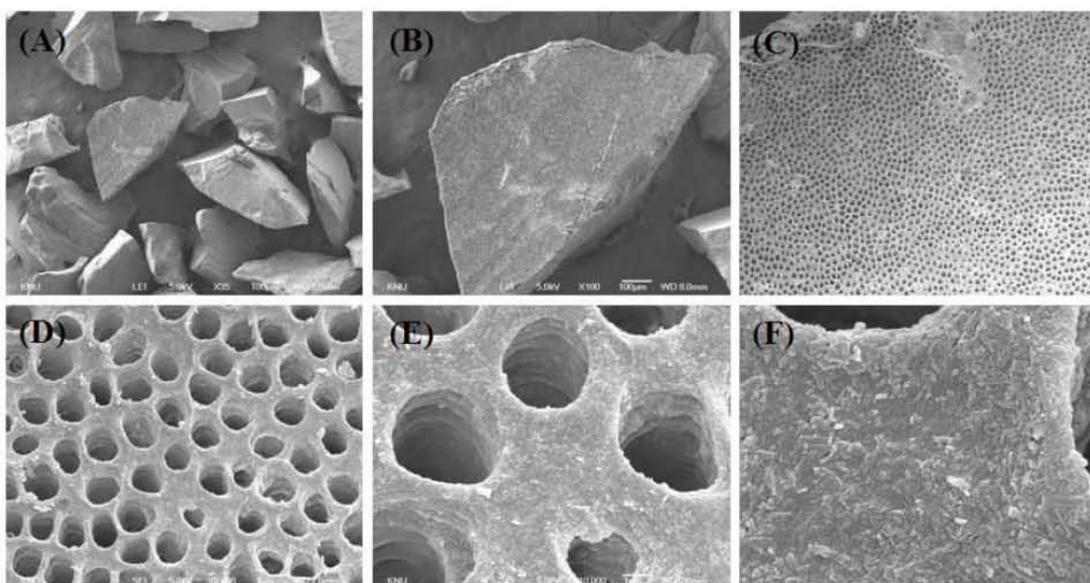


그림 1-8. 자가 치아의 입자 SEM 사진 (제2 실험군).
(A, $\times 35$; B, $\times 100$; C, $\times 500$; D, $\times 3,000$; E, $\times 10,000$; F, $\times 30,000$).

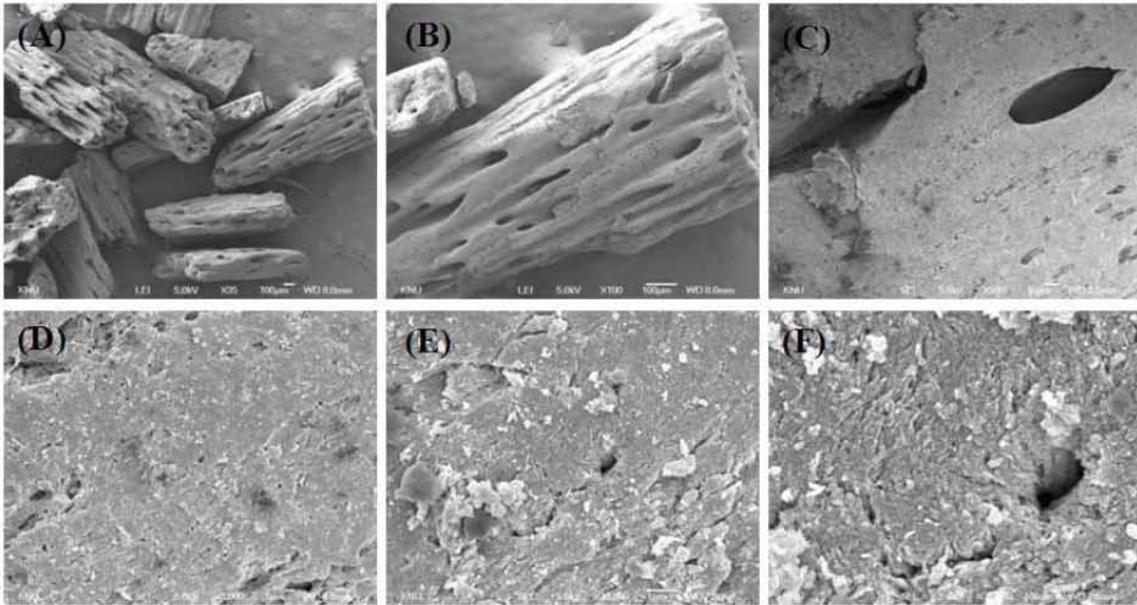


그림 1-9. 오리부리를 120℃로 열처리한 때의 SEM 사진 (제3 실험군).
 (A, ×35; B, ×100; C, ×500; D, ×3,000; E, ×10,000; F, ×30,000).

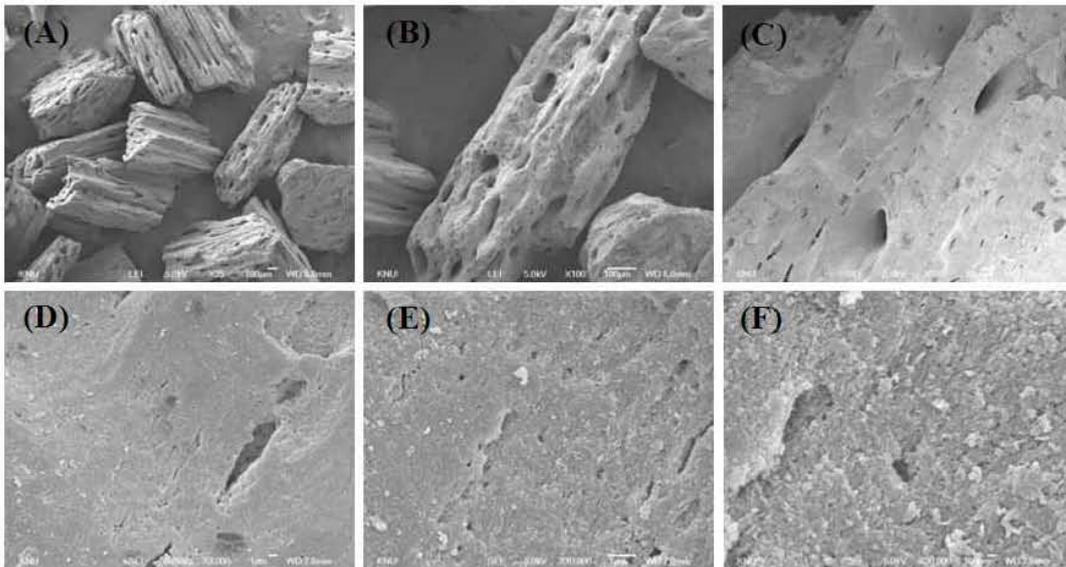


그림 1-10. 오리부리를 400℃로 열처리한 때 SEM 사진 (제4 실험군).
 (A, ×35; B, ×100; C, ×500; D, ×3,000; E, ×10,000; F, ×30,000).

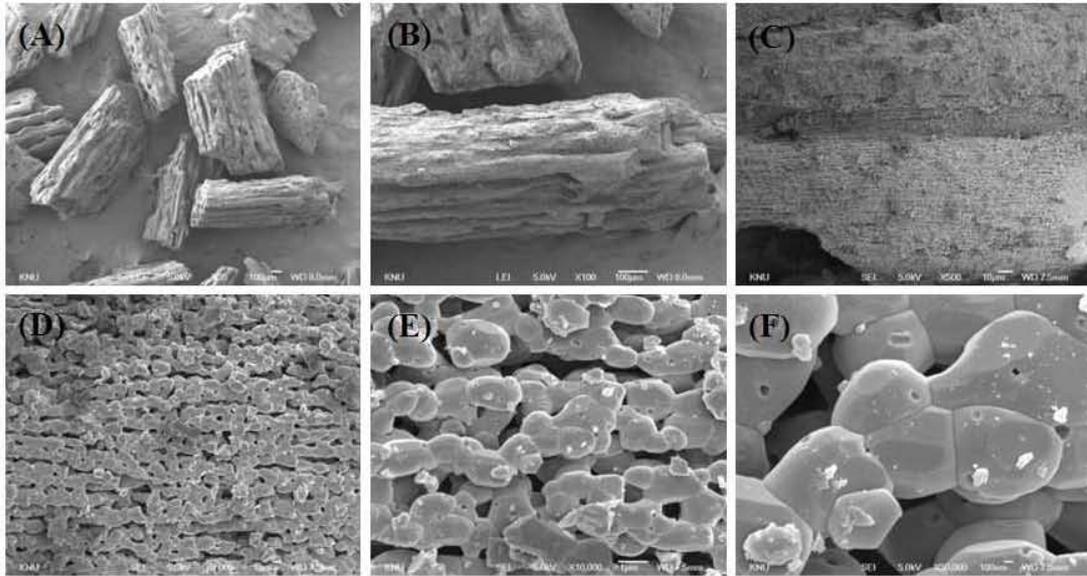


그림 1-11. 오리부리를 1,200℃로 열처리한 뼈의 SEM 사진 (제5 실험군).
(A, ×35; B, ×100; C, ×500; D, ×3,000; E, ×10,000; F, ×30,000).

(2) 제1실험군 (소뼈의 입자, 양성 대조군)

- 소뼈에서 해면골만을 추출하여 제조한 제품으로 현재까지 세계에서 가장 널리 사용되고 있는 대표적인 골대체재용 생체재료임.
- 저배율 SEM에서 해면골(스펀지 구조) 특유의 구조가 나타나는 것을 확인하였고, 표면은 세라믹 입자가 밀집되어 형성된 치밀한 표면이 형성되어 있음을 확인하였음.
- 소뼈 입자의 제품은 탈지 및 탈단백 공정을 거쳐 400℃ 이하의 온도에서 장시간 (5시간이상) 열처리하며 세라믹 입자의 크기는 100 nm 이하로 관찰됨 (그림 1-7).

(3) 제2실험군 (자가 치아의 입자)

- 입자의 형태가 불규칙한 구조로 형성되어 있고 표면에 상아질 특유의 기공구조를 관찰할 수 있었음.
- 고배율 SEM 사진에서는 직사각형 형태의 세라믹 입자들이 치밀하게 쌓여서 밀집된 다소 매끄러운 표면이 관찰됨 (그림 1-8).
- 일반적으로 치아는 법랑질과 상아질로 구성되어 있으며 상아질의 경우 법랑질보다 물리적 특성이 강하고 치밀한 구조가 나타나는 반면 상아질의 경우 다공성 기공구조를 형성하고 낮은 결정화도에 의해 생분해도가 빨리 진행되는 것으로 알려져 있음.
- 본 연구에 사용된 자가치아의 경우 인산 수용액에서 탈회과정을 거쳐 열처리과정 없이 제조된 자가치아 입자임.

(4) 제3실험군 (120℃로 열처리한 오리부리의 뼈)

- 소뼈 및 자가치아 입자와는 다른 형태를 나타내고 있으며 지금까지 보고된 세라믹 골대체재(동

물 뼈, 폐각, 산호 등) 입자에서 볼 수 없었던 특이한 형태를 나타내고 있음.

- 입자 전체의 모양은 오리부리 뼈의 형태처럼 길쭉한 모양을 취하고 있으며 마이크로미터 크기의 큰 기공들이 입자 형태를 따라 길쭉하게 형성되어 있는 것이 관찰됨 (그림 1-9).
- 또한 입자의 내부 기질에서도 수많은 마이크로미터 크기의 기공들이 관찰되었고 이는 혈관 또는 기타 유기물들이 제거되어 형성된 것으로 예측되며 이러한 기공구조는 조직재생에 크게 유리한 방향으로 작용할 것으로 판단됨.
- 고배율 SEM사진에서 100 nm 이하의 세라믹 결정들이 서로 응집되어 치밀한 표면구조가 형성되어 있는 것을 관찰하였고, 자가치아와는 달리 나노기공들이 표면에 상당량 존재하는 것을 관찰함.

(5) 제4실험군 (400℃로 열처리한 오리부리의 뼈)

- 제3실험군과 크게 차이가 없는 형태 및 표면특성을 관찰하였음 (그림 1-10).

(6) 제5실험군 (1,200℃로 열처리한 오리부리의 뼈)

- 저배율 SEM 사진에서 제3실험군과 제4실험군의 입자 형태 및 기공특성 등은 크게 차이가 나지 않았지만 입자 표면 고배율 SEM 사진은 확연히 다른 차이를 발견할 수 있었음.
- 즉, 고온열처리에 의한 세라믹 입자의 결정화에 의해 결정들이 입자형태 방향의 사선형태로 성장되어 있는 것을 확인함 (그림 1-11).
- 또한 이들 세라믹의 결정화로 인해 과립 크기가 커지면서 마이크로미터 크기의 기공들이 형성된 것을 관찰함 (과립 크기 1 μm 이상).
- 요약하면, 제조된 오리부리의 뼈 입자는 부리 형태와 같은 길쭉한 방향으로 입자화되었고 많은 마이크로미터 크기의 기공들이 입자방향으로 형성되어 있었고, 입자의 기질내부에도 마이크로미터 크기의 기공들이 존재하는 것을 확인함.
- 저온 열처리(120 및 400℃)의 경우 나노미터 크기의 세라믹 입자들이 불규칙하게 밀집된 치밀한 표면과 나노기공들이 형성되어 있는 것을 관찰하였고 고온 열처리의 경우 세라믹 입자의 결정화에 의한 과립 크기가 커지면서 나노 기공보다는 마이크로 기공들이 더 많이 형성된 것을 확인하였음.
- 이러한 내부 및 표면구조는 지금까지 보고된 바 없는 독특한 구조로서 골대체재용 세라믹 소재로서 활용하기에 충분한 장점이 있는 것으로 파악됨.

(7) Ca/P 함량 분석

- 제조된 부리 뼈의 Ca과 P의 비율은 SEM에 장착된 energy dispersive spectrometer (EDS, Inca x-sight, Oxford instruments, UK)로 분석함.

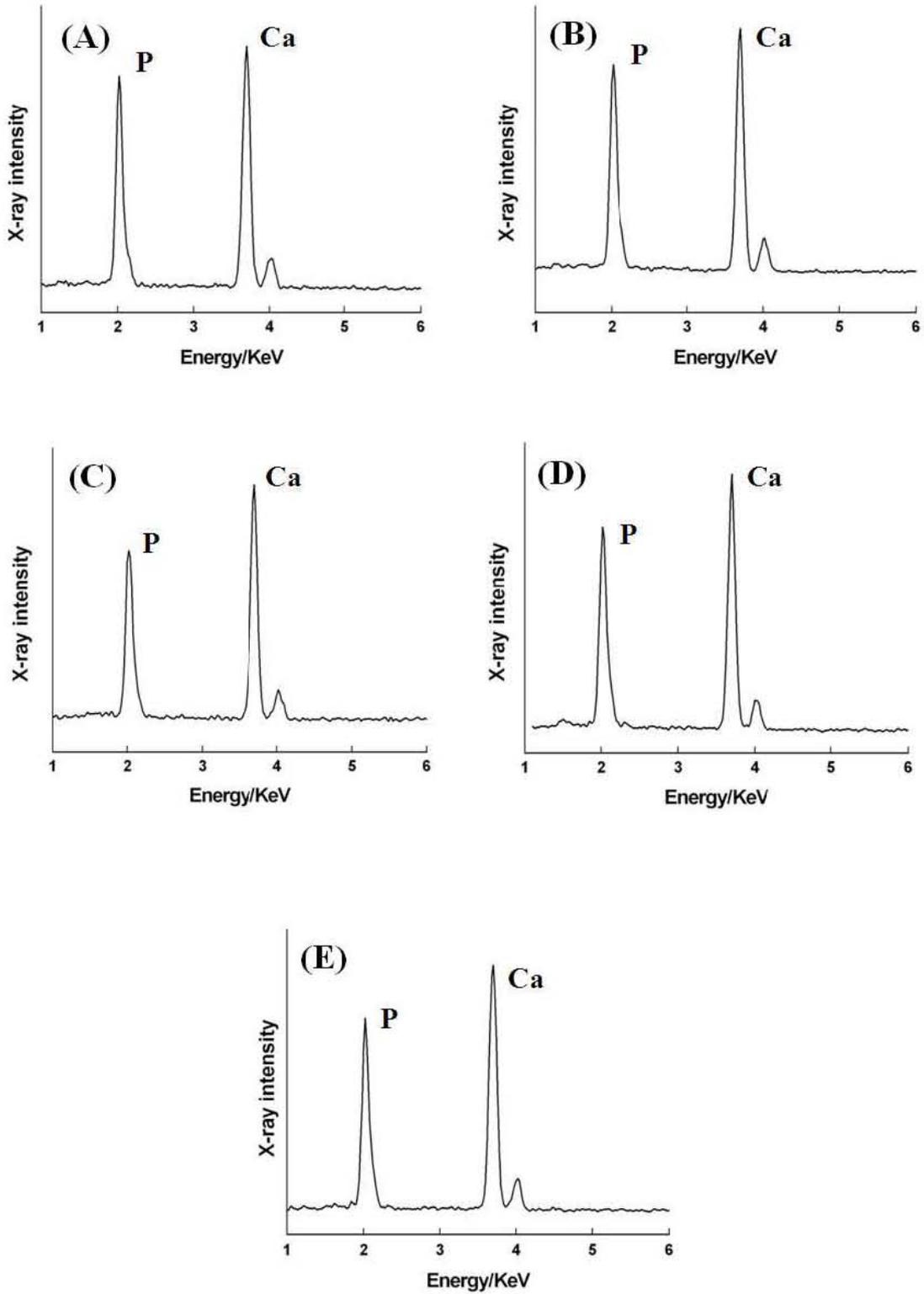
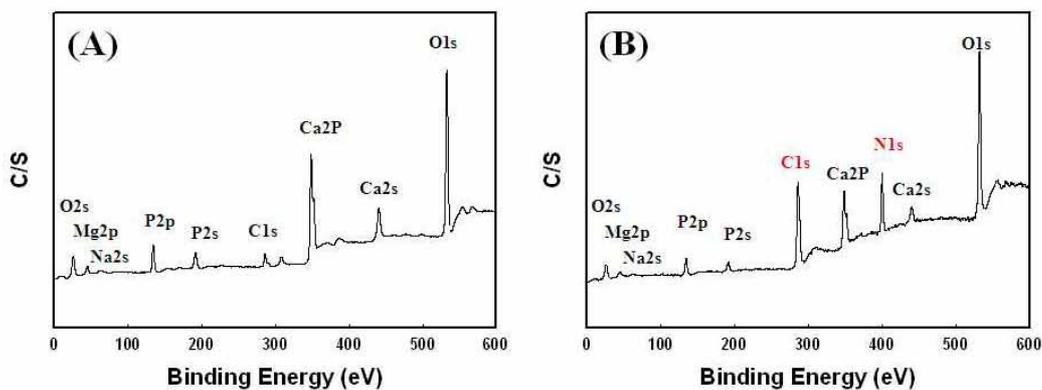


그림 1-12. 각 시료별 EDS의 스펙트럼
 (A) 제1군, (B) 제2군, (C) 제3군, (D) 제4군, (E) 제5군.

- 각 시료별 Ca/P 비율을 계산한 결과 제1군(소뼈의 입자)는 1.41-1.48, 제2군(자가치아의 입자)는 1.40-1.52, 제3군은 1.61-1.68, 제4군은 1.54-1.68, 제5군은 1.60-1.73으로 나타남 (그림 1-12).
- 즉, 해면골로 제조된 소뼈의 입자와 자가치아에서 상아질로 구성된 입자의 Ca/P 비율은 1.4-1.5사이를 나타내었고, 열처리 온도에 따른 오리부리의 뼈 입자는 1.6-1.7 사이를 나타내었음 (그림 1-13).
- 인체의 뼈의 Ca/P 비율은 1.67이므로 본 연구에서 제조된 오리부리의 뼈가 좀 더 인체 뼈와 Ca/P 비율이 유사한 것을 확인하였음. 비록 모든 시료 입자의 표면 상태에 따라서 Ca/P 비율이 일정하지 않지만 반복 측정을 통한 평균값을 산정한 결과 상기와 같은 결론을 얻을 수 있었음.
- 따라서, 저온 및 고온 열처리 오리부리의 뼈 입자의 경우 Ca/P 비율이 천연 뼈와 유사한 값을 나타냄으로서 골대체제로 활용하기에 바람직한 결과로 판단됨.

(8) 입자 표면 원소분석

- 제조된 입자 시료의 표면 원소 분석은 x-ray photoelectron spectroscopy (XPS, Quantera SXM, ULVAC-PHI, 일본)을 이용하여 측정하였음.
- 이때 조건은 Al K α ($h\nu = 1486.6$ eV, 25 W, 15 kV)선을 이용하여 pass energy 13.00 eV, beam size 100 μm 으로 측정하였고 photoelectrons의 emission angle은 45°로 유지하여 시료의 데이터를 얻었음.



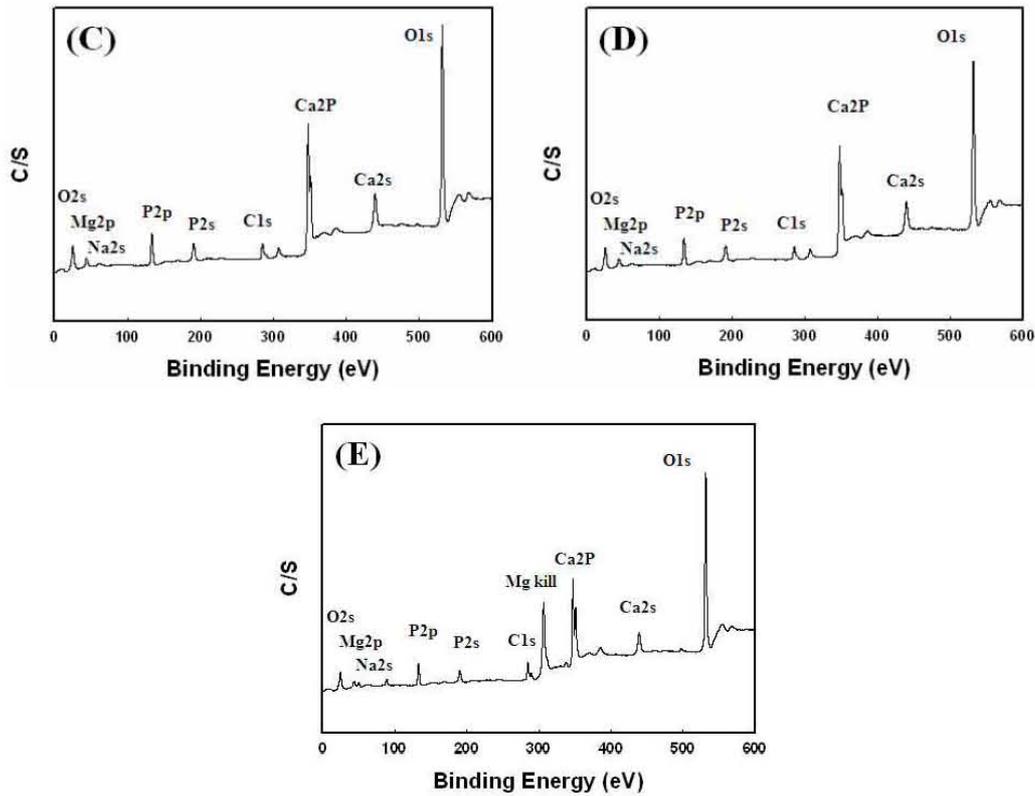


그림 1-13. 각 시료별 XPS의 스펙트럼.
(A, 제1군; B, 제2군; C, 제3군; D, 제4군; E, 제5군)

표 1-1. 제조된 오리부리의 뼈와 소 뼈, 자가치아 뼈 입자의 표면 원소 함량

Group	C (%)	N (%)	O (%)	Ca(%)	P(%)	Na(%)	Mg(%)
1	12.5	-	57.3	17.1	11.3	0.4	1.4
2	46.8	13.4	30.5	5.1	4.2	-	-
3	12.9	-	57.0	16.9	11.1	0.7	1.4
4	12.3	-	57.2	17.1	11.1	0.5	1.8
5	16.2	-	52.4	13.2	7.7	0.5	10.0

- 소뼈의 입자는 탄소(C), 산소(O), 칼슘(Ca), 인(P)이 확인되었고, 소량의 마그네슘(Mg)와 나트륨(Na)이 검출되었지만 기타 중금속은 검출되지 않았음 (표 1-1).
- 자가치아의 뼈 입자는 탄소, 산소, 칼슘, 인이 확인되었고 다량의 질소가 검출되었으며 나트륨과 마그네슘은 확인되지 않았음. 자가치아의 경우 탈회과정만을 거치고 유기물은 제거되지 않았기 때문에 유기물에 의한 탄소와 질소의 함량이 높게 나타났으며, 표면 유기물에 의해 나트륨과 마그네

습의 검출이 다소 어려웠을 것으로 사료됨.

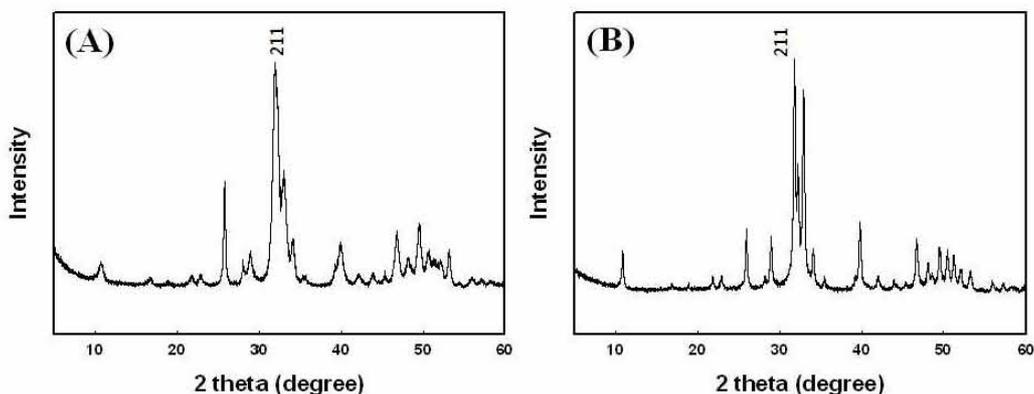
- 오리부리의 뼈 입자는 소뼈의 입자와 같이 탄소, 산소, 칼슘, 인, 마그네슘, 나트륨이 확인되었고 질소 피크가 검출되지 않아 유기물이 완전히 제거되었음을 확인할 수 있었음. 이들의 함량 비 또한 소뼈와 유사한 특성을 보였으며 신생골 형성에 필수적인 마그네슘과 나트륨이 확인됨으로써 인체 이식 시 골형성에 유리한 영향을 미칠 것으로 판단됨.
- XPS의 결과를 요약하면 제조된 오리부리의 뼈 입자에는 유기물에 대한 피크가 존재하지 않았고 기타 중금속과 같은 이물질은 검출되지 않았음. 또한 골형성에 필수적인 마그네슘과 나트륨이 확인됨으로써 신규 천연자원으로부터 제조된 생체세라믹으로 조직재생에 충분히 활용할 수 있는 안전한 재료임을 확인하였음 (그림 1-14).

(9) 입자의 결정화도 분석

- 제조된 오리부리 뼈의 입자 결정특성의 분석은 XRD (x-ray diffractometer, Rigaku, Max-2500, 일본)을 사용하여 분석하였음 (표 1-2).
- 이때 측정조건은 Cu K α x-ray를 이용하여 40 kV, 200mA에서 2 $^\circ$ /min으로 하여 2 θ 5도에서 60도 범위를 측정하였음. 그리고 이들 시료의 결정크기는 아래의 Scherrer 방정식을 이용하여 분석하였음.

$$D = \frac{0.94 \lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta}$$

- 여기서 D는 결정의 크기(domain size)이고, λ 는 입사 x-ray 파장, $\beta_{1/2}$ 는 특정 회절 피크(211)의 반가폭, θ 는 최대 피크에서의 회절각임.



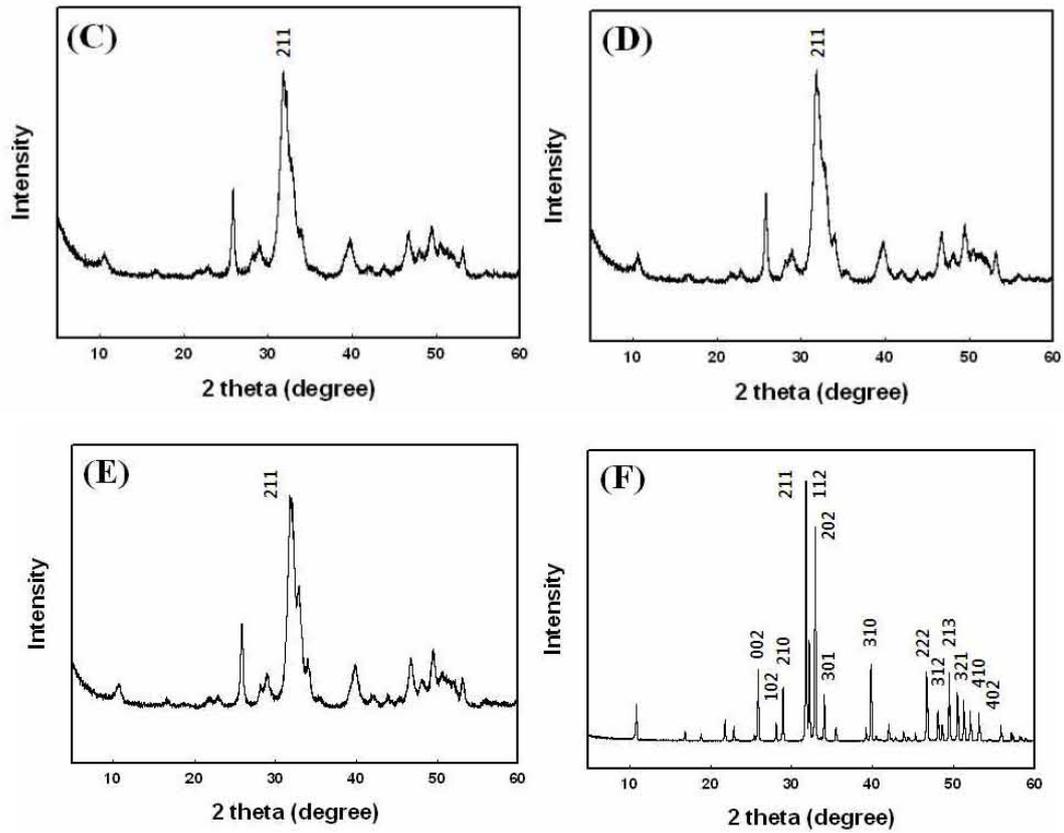


그림 1-14 시료별 XPS 스펙트럼
 (A) 제1군, (B) 제2군, (C) 열처리를 하지 않은 오리부리의 뼈 입자,
 (D) 제3군, (E) 제4군, (F) 제5군.

표 1-2. Scherrer 방정식을 이용한 오리부리의 뼈와 소뼈, 자가치아 뼈 입자의 결정크기

Group	반가폭(FWHM)	Crystal Size (211) (Å)
1	0.713	120
2	0.348	265
3	0.927	91
4	0.816	104
5	0.146	993

- 제조된 시료의 XRD 스펙트럼에서 소뼈는 2 theta가 10, 21, 22, 25, 28, 31, 32, 34, 39, 42, 43, 46, 49도에서 특성피크가 나타나고 있는 것을 확인하였으며, 이는 JCPDS File No. 9-432와 일치하는 것으로 순수 하이드록시아파타이트(HA)와 동일한 회절피크임을 확인하였음.

• 또한, 회절피크가 대체적으로 broad한 특성을 나타냄으로서 저결정의 HA임을 확인하였음.

※ HA에 대한 JCPDS NO. 9-432 회절각: 21, 22, 25, 26, 28, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49 (2 theta) (그림 1-15).

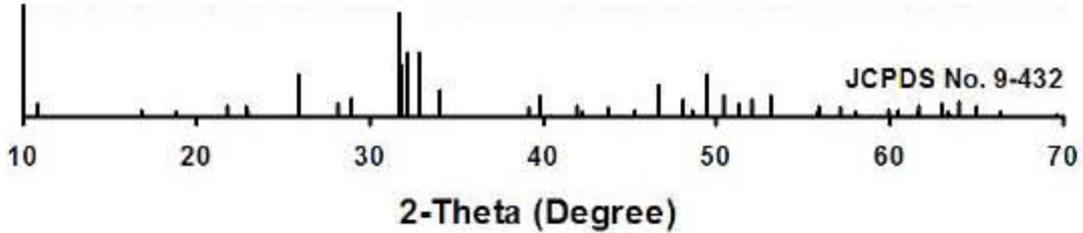


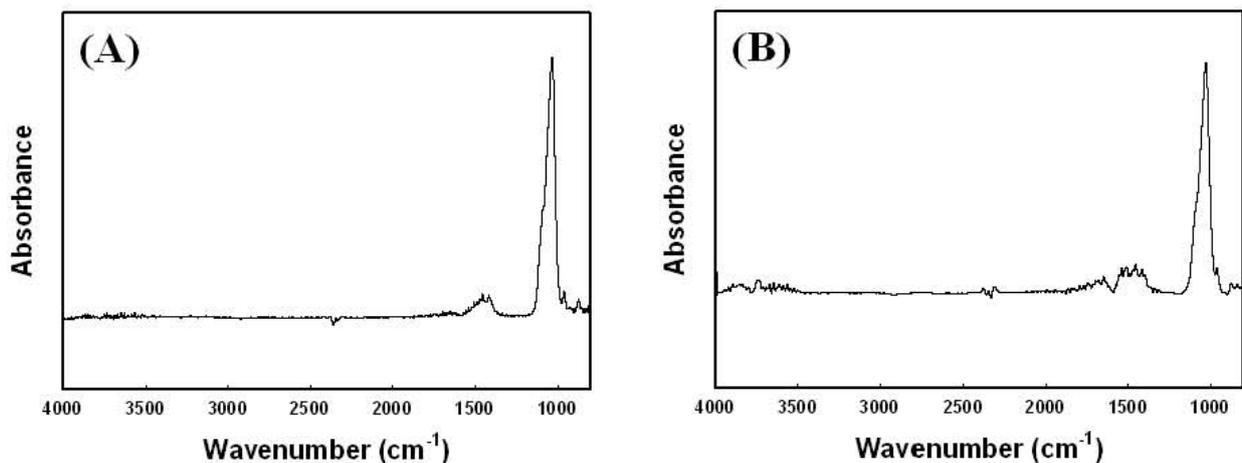
그림 1-15. HA에 대한 JCPDS No. 9-432 XRD 회절피크
[출처: Herliansyah et al., APEMS 2012 1137-1146].

- 자가치아의 뼈 입자는 전형적인 HA 특성의 피크에 대한 회절곡선을 나타내었으며 소뼈 보다 다소 날카로운 회절곡선이 나타남으로써 소뼈 보다 결정화가 높은 HA임을 확인하였음.
- 미열처리(그림 1-14) 및 120℃와 400℃에 열처리된 오리부리의 뼈 입자의 경우 소뼈 및 자가치아와 마찬가지로 전형적인 HA에 대한 회절피크를 나타내고 있는 반면 좀더 broad한 회절양상을 보임으로써 저결정의 HA임을 알 수 있었음.
- 그러나, 1200℃에서 열처리한 오리 부리 뼈의 경우 다른 시료들과는 달리 날카로운 회절피크가 관찰됨으로서 열처리에 의한 결정화도의 증가를 예측할 수 있었음.
- 이들 시료의 회절피크에서 2 theta 31.8도의 211면에 대한 결정크기를 scherrer 방정식으로 구하여 (표 1-2)에 나타내었음. 제1실험군의 결정크기는 120, 제2실험군은 265, 제3실험군은 91, 제4실험군은 104, 제5실험군은 993 Å으로 열처리 온도가 증가함에 따라 오리 부리 뼈의 입자의 결정크기가 상당히 증가하는 것을 관찰할 수 있었음.
- 고결정성을 갖는 HA의 경우 기계적 물성은 상승하는 반면 인체 이식시 인체 뼈와 비교해서 흡수되기가 상당히 어려움. 즉 생분해도가 많이 저하되는 특징을 나타냄.
- 그러므로 결정화도의 정도를 조절하여 인체 뼈와 유사한 흡수속도를 갖는 골대체제가 이상적인 세라믹이라 할 수 있음.

- 오리부리의 뼈는 상기의 XRD 결과와 같이 열처리 온도에 따라 다양한 결정화도를 갖는 HA의 제조가 가능함.
- 따라서, 적절한 열처리 온도와 시간을 설정한다면 생분해도가 제어된 적용하고자 하는 부위에 인체맞춤형 HA의 제조가 가능하고, 이는 오리부리의 뼈 입자의 용도 전개측면에서 (치과 및 외과 용) 상당히 유리한 장점이 될 것으로 전망됨.
- 요약하면, 120℃와 400℃로 열처리한 오리부리의 뼈 입자는 소뼈 입자와 동일한 HA 회절특성을 나타내었고, 결정크기 또한 유사한 크기를 보였음.
- 오리부리의 뼈 입자는 열처리 온도에 따라 결정화도가 제어된 HA의 제조가 가능함을 알 수 있었고, 기타 이물질에 의한 피크는 관찰되지 않았음. 즉 인체에 보다 안정한 골대체재로서의 역할이 충분할 것으로 사료됨.

(10) ATR-FTIR 분석

- 오리부리의 뼈 입자의 표면 화학적 작용기 분석은 attenuated total reflectance fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy (IRPrestige-21, Shimadzu, Japan)로 분석하였음.
- 이때 조건은 분해능을 4.0 cm^{-1} 로 하고 scan수를 30으로 하여 측정하였음. 각 시료 입자들은 막자 사발을 이용하여 최대한 분쇄하여 스펙트럼을 얻었음 (그림 1-16).



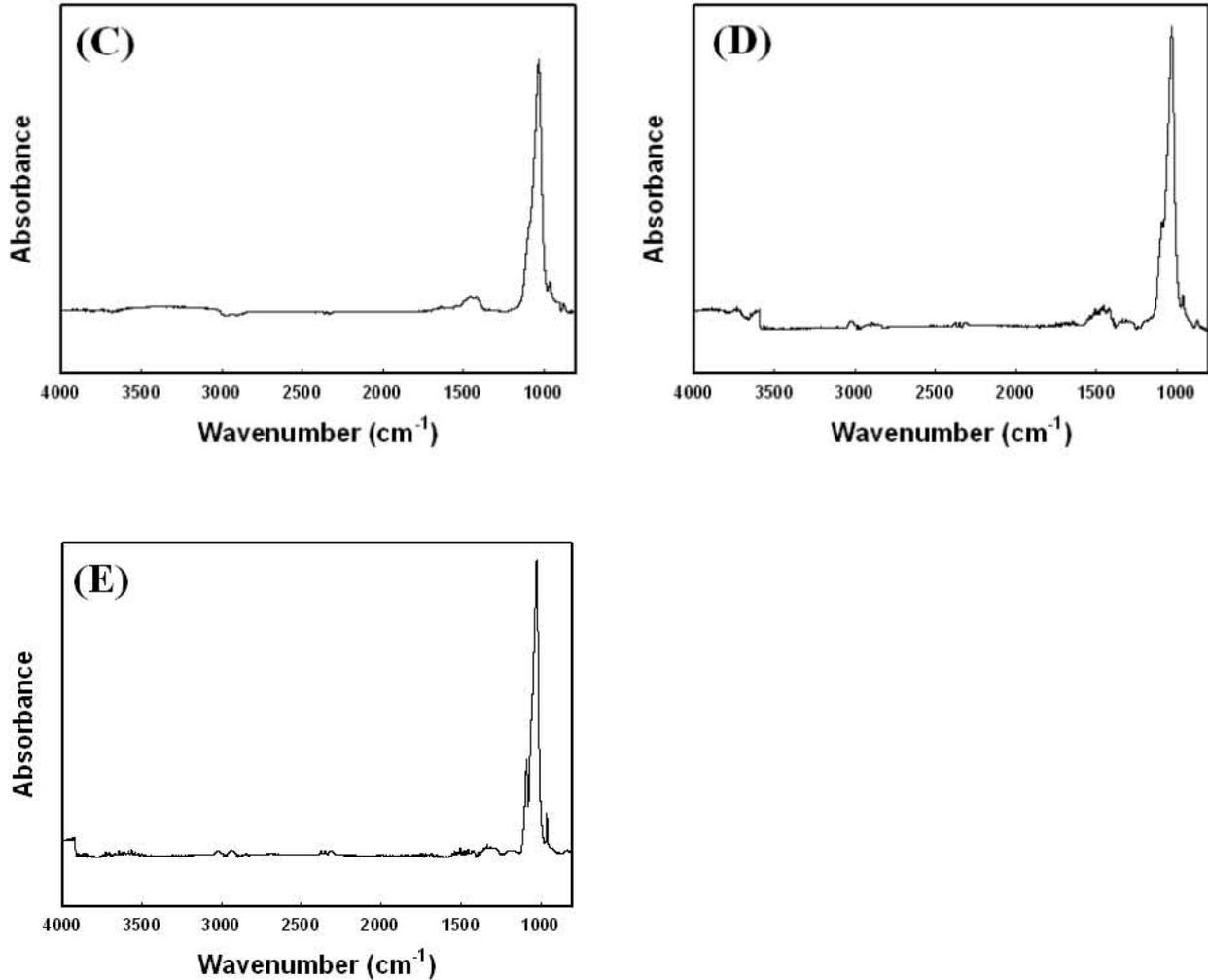


그림 1-16. 각 시료별 ATR-FTIR 스펙트럼
(A, 제1군; B, 제2군; C, 제3군; D, 제4군, E, 제5군).

- 각 시료에 대한 작용기를 확인하기 위하여 측정한 FTIR 스펙트럼에서 각 시료에 대한 특성피크를 살펴보면 1028-1100 cm^{-1} 에서 P-O stretching (ν_3), 960 cm^{-1} 에서 P-O stretching (ν_4 , symmetric), 3573 cm^{-1} 에서 HA의 OH stretching, 1400-1550 cm^{-1} 그리고 874 cm^{-1} 에서 카보네이트 그룹(CO_3^{2-})에 의한 피크를 확인함으로써 아파타이트에 대한 특성피크임을 알 수 있었음.
- 소뼈의 입자와 자가치아의 입자, 120 $^{\circ}\text{C}$ 에서 열처리한 제3군, 400 $^{\circ}\text{C}$ 에서 열처리한 제4군에서 모두 카보네이트와 포스페이트 그룹 및 OH기에 의한 피크들을 확인하였고 intensity 또한 증가하는 것을 확인하였음. 즉, 오리부리의 뼈는 소뼈 및 자가치아 뼈와 같은 아파타이트로 이루어진 것을 확인함.
- 1,200 $^{\circ}\text{C}$ 로 열처리한 오리부리의 뼈는 1030-1100 cm^{-1} 에서 특성피크의 split이 일어나는 것을 관찰하였고 이는 높은 결정화도에 의한 카보네이트와 포스페이트 그룹의 강한 흡수진동에 의한 것임.

로 판단됨.

- 요약하면, 열처리 온도별 제조된 오리부리의 뼈는 소뼈 및 자가치아 뼈와 동일한 아파타이트로 이루어져 있으며 열처리 온도의 증가에 의한 이들 작용기의 intensity가 상당히 증가하는 경향을 알 수 있었음.

(11) 기공도 분석

- 제조된 오리부리의 뼈 입자의 다공도는 수은 다공도 측정기 (AutoPore IV 9520, Micromeritics, USA)을 이용하여 측정하였음.
- 이때 조건으로 각 시료의 무게는 0.1-0.2 g의 입자를 취하여 mercury filling 압력을 0.52 psia로 해서 0.1-60,000 psia 범위를 측정하였음.
- 소뼈의 입자의 기공크기는 54.4 nm, 기공도는 67.77%을 나타내었고, 자가치아 뼈의 입자는 기공 크기가 126.1 nm, 기공도는 18.99%로 측정되었음.
- 오리부리의 뼈로 제조된 입자의 경우 120℃로 열처리한 것과 400℃로 열처리한 것의 기공크기가 46.2 및 55.4 nm, 기공도는 74.31 및 77.07%로 측정되었음. 즉, 소뼈와 비슷한 기공크기 및 기공도를 보인 반면 열처리 온도가 증가할수록 기공크기와 기공도가 다소 상승하는 결과를 얻음 (표 1-3).

표 1-3. 제조된 오리부리의 뼈와 소뼈, 자가치아 뼈 입자의 기공특성

Group	Average Pore diameter (4V/A, nm)	Bulk Density at 0.52 psia (g/mL)	Apparent density (g/mL)	Porosity (%)
1	54.4	0.62	2.24	72.20
2	126.1	1.81	2.23	18.89
3	46.2	0.62	2.43	74.31
4	55.4	0.60	2.65	77.07
5	2,878.3	0.84	2.63	67.77

※ 참고: Average pore diameter = 총 기공 크기의 평균값
Bulk density = 시료의 기공을 포함한 실제 density

Apparent density = 시료의 기공을 제외한 물질의 이론 density

Porosity = 시료의 표면 기공을 $[1 - (\text{Bulk density} / \text{Apparent density})] \times 100$

- 그러나, 1,200°C로 열처리한 것은 기공도는 67.77%로 미약하게 감소하였지만 기공크기는 2,878 nm로 크게 증가하였음. 이는 고온 열처리에 의해 HA 결정이 성장하여 나노미터 크기의 기공보다는 마이크로미터 크기의 기공들이 크게 증가하여 나타나는 현상으로 판단됨. 이러한 결과는 SEM 및 XRD 결과와 일치하는 소견임.
- 결론적으로 오리부리의 뼈는 소뼈와 같은 해면골로 제조된 것은 아니지만 해면골과 같은 높은 기공도를 나타내었고, 열처리 온도에 따라 기공크기가 크게 변화하는 현상을 알 수 있었음.
- 큰 기공크기는 인체 이식시 산소 및 영양분의 교환 통로이며 세포 시그널링을 위해 꼭 필요한 것으로 고온 열처리에 의해 기공크기가 증가하는 것은 바람직한 현상임. 그러나 열처리에 의해 결정화도 또한 상승하므로 인체 골재생에 가장 이상적인 기공크기 및 기공도 그리고 결정화도를 제어하는 것이 필요함.

(12) 칼슘(Ca) 및 인(P) 용출

- 제조된 오리부리의 뼈 입자의 칼슘과 인 용출특성 분석은 inductively coupled plasma mass (ICP) spectrometer (Optima 7300DV, PerkinElmer, USA)를 이용하여 측정하였음. 먼저 각각의 시료 입자 0.5 mg을 10 mL의 증류수에 침지한 다음 37°C의 항온조에서 정적인 상태로 방치하였음.
- 이어서 주어진 시간에 침지액을 꺼내어 1,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 뼈 입자들을 침전시키고 추출용액 10 mL을 회수하였음.
- 다시 새로운 증류수 10 mL를 추가하고 vertex를 이용하여 침전된 뼈 입자들을 충분히 분산시킨 다음 항온조에 다시 투입하였음. 회수된 추출용액은 0.42µm의 기공크기를 갖는 필터로 필터링하여 -20°C에서 보관하였음.
- ICP 측정에서 인은 파장 213.617nm에서 칼슘은 317.927 nm에서 측정하였음.

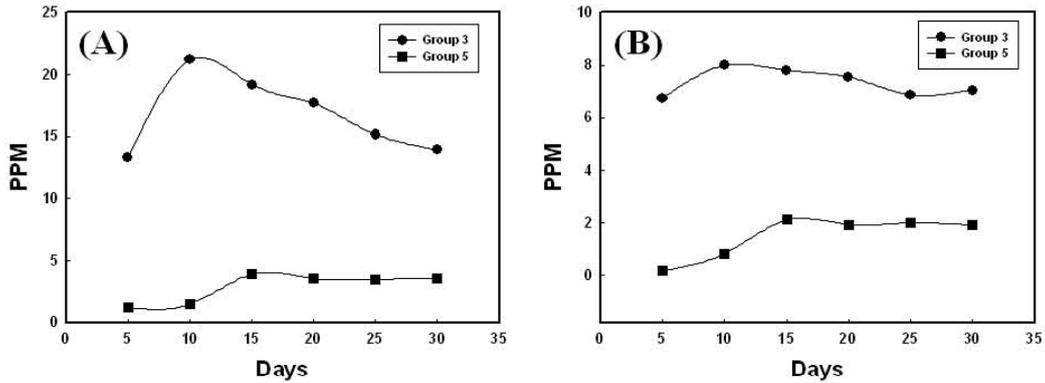


그림 1-17. 제조된 오리부리 뼈의 칼슘(A)과 인(B)의 용출 거동

- 칼슘과 인의 용출실험은 120℃에서 열처리한 군과 1,200℃에서 열처리한 군만을 선택하여 시행하였음. 이는 1차적인 결과를 확인한 다음 침지시료의 양과 침지시간을 선택하여 최적의 실험계획을 수립하기 위한 것이었음. 제2년차에는 본 연구에서 제시한 모든 시료 대한 용출실험을 좀 더 진행할 예정이다.
- (그림 1-17)은 제조된 오리부리의 뼈 입자의 1차적인 칼슘과 인의 용출 결과로서 제3군과 제5군의 칼슘 용출경향은 저온 열처리한 제3군에서 침지 10일까지 많은 양의 칼슘이 용출되는 경향을 보였으며, 침지 시간이 지날수록 칼슘 용출이 감소하는 경향을 나타냄.
- 이러한 결과는 침지초기 오리부리의 뼈 입자에 존재하는 나노기공, 마이크로기공, 매크로기공으로 물이 침투함으로써 보다 넓은 표면적이 물에 노출되기 때문으로 생각되며 그 이후 세라믹기질 내부로 물이 서서히 침투하면서 낮아지는 칼슘 용출을 보이는 것으로 사료됨.
- 제5실험군의 칼슘 용출 거동은 저온 열처리 시료에 비해 적은 양의 칼슘이 방출되는 경향을 나타내고 있고 침지시간이 증가할수록 용출량이 증가하는 경향을 나타냄. 이는 고온 열처리(1,200℃)에 의해 HA 결정화에 의한 치밀한 구조 및 결정 크기가 증가하므로 나타나는 경향으로 판단됨.
- (그림 1-17B)는 제조된 오리부리의 뼈 입자의 인 용출 거동을 나타낸 것으로서 칼슘 용출 경향과 유사한 용출특성을 보여주고 있음.

(13) 결론

- 이상의 결과에서 오리부리의 뼈 입자의 제조 공정의 개발이 성공적이었으며, 이를 통하여 제조된 오리부리의 뼈 입자는 신규 천연자원부터 얻을 수 있는 안전하고 안정적인 골대체재용 생체소재가 될 수 있을 것으로 판단됨.

2. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 생물학적 유효성 및 안전성 평가

가. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 생체적합성 평가

○ 실험 동물

- 체중이 250-280그램이고 생후 7주령의 수컷 Sprague-Dawley rat (Samtaco Co., Korea) 35마리를 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $60\pm 10\%$ 로 유지하고 12시간 명암주기가 유지되는 충북대학교 실험동물연구지원센터에서 사료와 식수를 자유롭게 공급하면서 사육하였다.

○ 두개골의 임계 골결손부 유발 및 골 이식재의 이식

- 마취제(Zoletil, Virbac Co.)로 랫드를 전신 마취를 한 후 랫드의 두개골 부위를 전모한 후 포비돈 용액으로 소독하였다.
- 랫드의 두개골 정중부위의 피부를 절개하고 골막을 U자형으로 절개한 후 골막하를 박리하여 두개골을 노출시켰다.
- 생리식염수를 두개골 부위에 관주하면서 원거기 (trephine bur, 8 mm)를 이용하여 뇌경막이 손상되지 않도록 두개골의 정중부에 원형으로 임계 골결손부 (calvarial defect model)를 유발하였다 (그림 1-18).
- 원형 임계 골결손부에 아무것도 이식을 하지 않은 음성 대조군과 오리 부리뼈를 이식한 이식군으로 분류하였다.
- 골막은 4-0 흡수성 봉합사(Surgisorb, Samyang Co., Korea)로 연속 봉합을 하였고, 골이식재를 이식한 후 두개골 부위의 피부는 3-0 비흡수성 봉합사 (black silk, Ailee Co, Korea)로 단순 결절봉합을 하였다.
- 두개골 결손부 유발과 동물실험은 충북대학교 실험동물연구지원센터의 규정에 따라 수행하였다.
- 오리부리의 뼈를 이식한 4주 후에는 염증반응 없이 골막이 잘 형성되어 임계 결손부에 신생골이 형성되고 있었다 (그림 1-19와 20).



그림 1-18.
랫드의 두개골 정중부에 유발한
임계 골결손 부위.

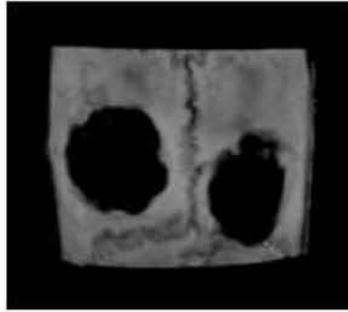
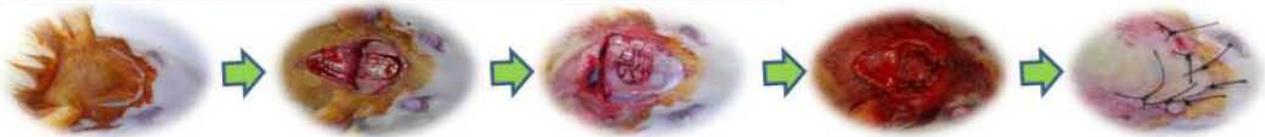


그림 1-19.
랫드의 두개골에 유발한 임
계 골결손부의 방사선 사진
상.



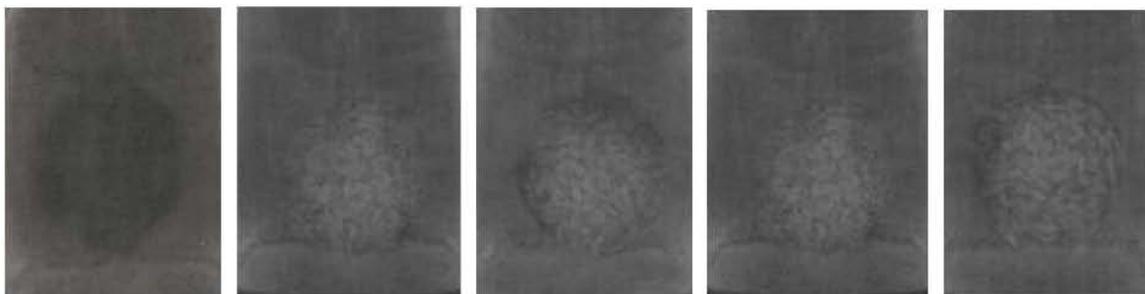
그림 1-20.
임계 골결손부에 오리부리 뼈를
이식 4주후의 두개골 모습.

◆ 랫드의 임계 골결손부에 생체소재를 이식하는 과정



○ 골이식 부위의 방사선학적 평가

- 임계 골결손 부위에 생체소재를 이식한 4주 후에 랫드를 안락사시킨 후에 diamond disc로 두개골의 이식재를 포함하여 랫드의 두개골을 절취하였다.
- 치과용 방사선 촬영기기(Elytis, Trophy, France)를 이용하여 70 kVp, 7 mA, 0.031 second, 15 cm FFD의 조건으로 방사선 사진을 촬영하였다 (그림 1-20).
- 이식한 4주 후에 오리부리 뼈의 입자는 신생골 형성이 80%이상을 보였다 (그림 1-21).



A. 음성 대조군 B. 양성 대조군 C. 오리 부리를 D. 오리 부리를 E. 오리 부리를
(임계 골결손 부 (소뼈, BioOss® 120℃로 처리한 400℃로 처리한 1,200℃로 처리
위) 이식) 군 군 한 군

그림 1-21. 임계 골결손부에 골이식재를 이식한 4주 후의 방사선 사진.

○ Micro-CT 촬영

- 안락사시킨 후 랫드에서 절취된 두개골의 micro-CT 사진의 촬영은 skyscan 1172 desktop X-ray (skyscan, Artselaar, Belgium)를 이용하여 50 kVp의 관전압과 201 uA의 노출조건으로 CT 촬영을 하였다 (그림 1-22).
- Micro-CT로 촬영한 골결손 부위의 단면상에서 골부피(bone volume)를 분석한 결과 오리부리의 뼈를 이식한 부위가 소뼈를 이식한 부위보다 더 많았다 (그림 1-23C, $p < 0.05$).
- 임계 골결손(critical defect)만을 유발한 음성 대조군에서는 골이식재를 이식한 4주째에 골결손부 가장자리로부터 골이 형성되어 들어오는 것을 확인할 수 있었음.
- 양성 대조군(소뼈, Bio-Oss® 이식군)에서는 골이식재를 이식한 4주째에 이식부의 가장자리로부터 원래 존재하던 골과 융합되면서 신생골을 형성하는 양상을 보였음.
- 오리부리의 뼈로 제조된 모든 군 (120℃에서 열처리한 군과 400℃에서 열처리한 군, 1200℃에서 열처리한 군)에서 이식부위의 가장자리로부터의 이식재와 원래 존재하던 골 사이의 융합이 확인되었으며, 대조군과 유사한 골융합 및 신생골 형성이 확인할 수 있었음 (그림 1-22B).

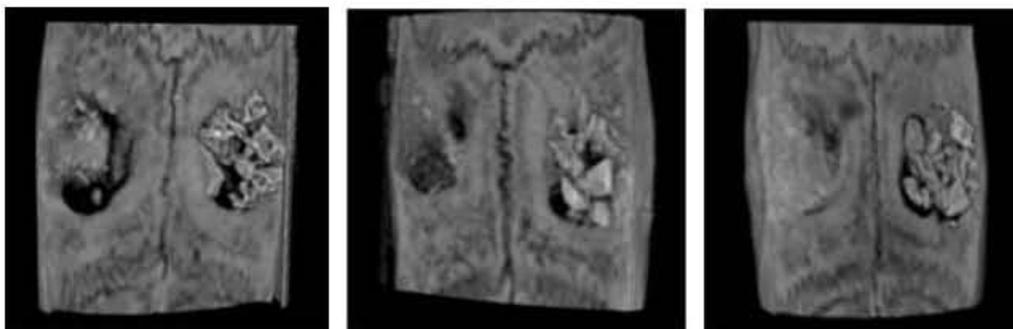


그림 1-22. 골이식재를 이식한 4주 후의 micro-CT 사진상.
(각 사진상에서 왼쪽은 오리부리의 뼈 이식, 오른쪽은 Bio-oss®를 이식)

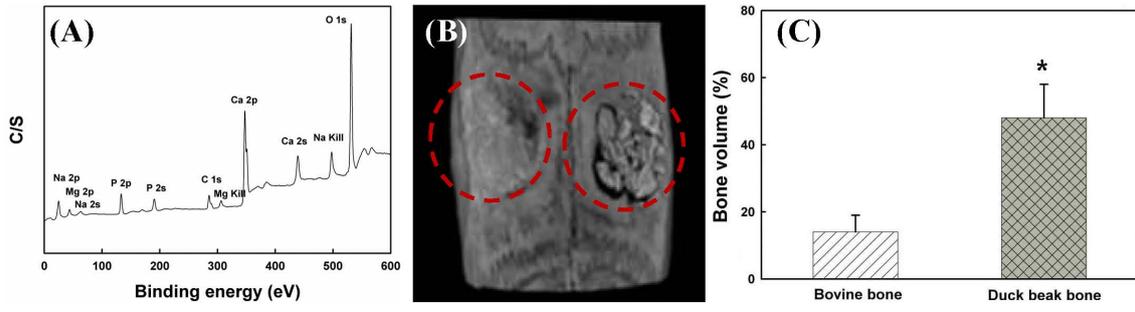


그림 1-23. 음식찌꺼기

나. 오리부리의 뼈 유래

- 오리 부리의 1차 오염물질의
: 전기오븐에 넣어 180°C에
고온소독을 통한 오염물질
- 전처리(boiling)와 탈지, 탈단

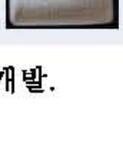
공정	준비재료	처리방법	비고
1차 오염물질 제거	오리 부리	전기오븐에 넣어 180°C에서 10분 동안 1차 가열하고, 90°C에서 30분 동안 2차 가열하여 고온소독	
전처리(Boiling)	DW, Heating plate, flask	DW boiling 15시간	
탈지	Toluene, Heating mantle, Soxhlet's extractor	Soxhlet 장치를 이용하여 Toluene으로 72시간 처리	
탈단백	Ethylene diamine, DW, Heating plate, flask	ED용액에 50시간 boiling	
세척	DW	탈단백 처리 후 각각 17일 세척	
열처리	Furnace	350°C 20시간 처리	

그림 1-24. 오리부리 유래 골대체재용 생체소재의 멸균 제조공정의 개발.

○ 효과적인 멸균방법 모색

- 오리부리의 채취 농장 이력관리 시스템 개발

- 배경: 국내 오리 사육농가에서 주로 문제가 되고 있는 질병들은 오리패혈증, 오리 바이러 스성 간염, 대장균증, 살모넬라 감염증 등과 같은 전염성 질병들이 대부분임.

- 본 질병들은 치료가 되지 않아서 절대적으로 예방이 필요함. 예방은 원인체 유입을 사전 에 차단하는 엄격한 격리개념을 도입한 차단방역 시스템 도입.

- 따라서, 엄격한 출입통제와 철저히 소독한 후 출입허가, 예방백신을 투여한 농장에서 오 리의 부리를 채취하여야 함.

- 제조된 오리부리 유래 골대체제의 감마선 멸균

- 배경: 의료기기 및 의료소재 멸균 시 일반적으로 널리 사용되고 있는 EO가스 멸균은 각 종 의료기기 및 의료소재에 잔류해 인체에 흡수될 수 있다는 문제점이 WHO(세계보건기

구)·UNEP(유엔환경계획) 등 국제기구로부터 꾸준히 제기돼왔음. 이와 같은 상황에서 ‘감마선 멸균’(Gamma Sterilization)은 친환경·무공해·청정기술이라는 점에서 선진국을 중심으로 기존 EO가스 멸균방법을 빠르게 대체해나가고 있음.

- 감마선 조사량에 따른 제조된 오리부리 유래 골대체재의 특성 분석

▪ 0, 15, 20, 25 및 40 kGy의 감마선을 조사하였음.

○ FE-SEM 분석

▪ 서로 다른 선량의 감마선을 조사한 오리부리의 골대체재 입자의 표면 형상을 관찰한 결과 뼈 입자의 크기는 다양하였으며, 각 그룹간 표면 형상은 유사한 것으로 나타났음.

▪ 이러한 결과는 감마선의 조사가 D350C의 표면 형상에 영향을 미치지 않음을 의미함 (그림 1-25).

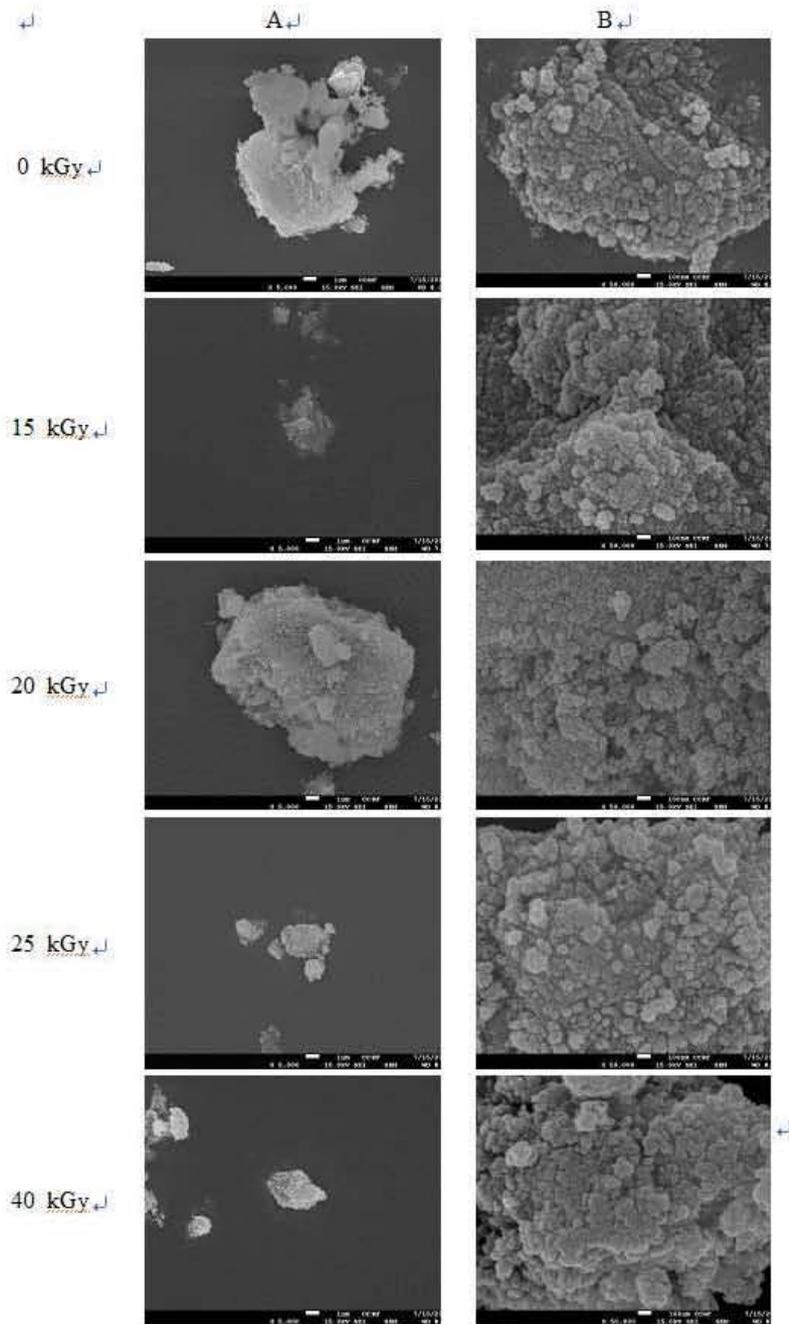


그림 1-25. 오리부리 유래 골대체제 입자의 전계방사형 주사전자현미경(FE-SEM) 영상.
(A) x5,000, (B) x50,000.

○ ATR-FTIR 분광분석

- ATR-FTIR 분석 결과 특정 파동수(cm^{-1})에서 모든 그룹의 최고 분광도가 매우 유사하게 나타났음 (그림 1-26).
- 이러한 결과는 오리부리 골대체제가 PO43-와 CO32- 작용기의 특징적 조성을 가지고 있음을 의미하며, 감마선의 조사가 오리부리 골대체제의 특성에 영향을 미치지 않았음을 나타냄.

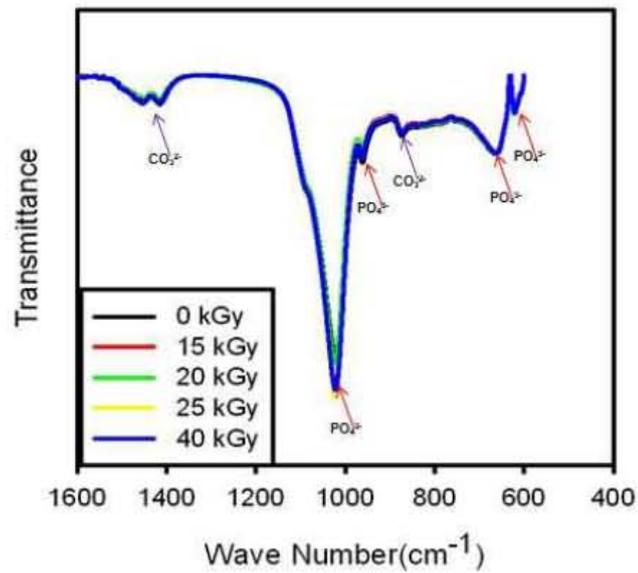


그림 1-26. 오리부리의 뼈를 이용한 생체소재 입자의 감쇠 전반사 푸리에 변환 적외선 분광법(ATR-FTIR) 스펙트럼.

○ 열중량 분석(TGA)

- TGA의 결과에서 미미한 중량의 감소가 관찰되었으며 감마선 선량에 따른 곡선에서 유의성있는 차이는 없었음 (그림 1-27).
- 이는 감마선의 조사가 오리부리 유래 골대체제 입자의 물리적, 화학적 특성에 영향을 미치지 않았음을 의미함.

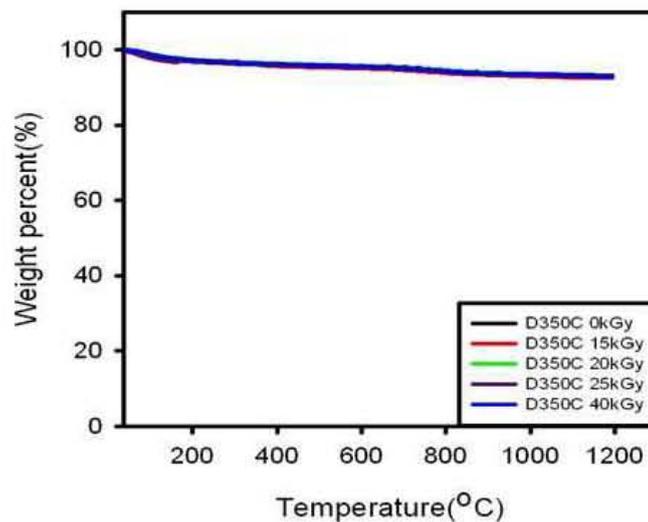


그림 1-27. 오리부리 골대체제 입자의 열중량 분석(TGA analysis) 곡선.

○ 세포 독성 평가(MTT)

- MTT의 분석 결과에서 사람 중간엽 줄기세포(Human Mesenchyma Stem Cells; hMSCs)의 생존률은 90-100 %로 감마선을 조사한 오리부리 유래 골대체제 입자는 세포 독성을 나타내지 않은 것으로 나타났음.

나. 오리부리의 뼈 유래 골대체제의 멸균 제조 공정법의 개발

○ 연구의 내용 및 방법

- 골대체제용 생체소재의 HACCP 관리
 - 국내의 오리 사육 농가에서 주로 문제가 되고 있는 질병들은 오리 폐혈증과 오리 바이러스성 간염, 대장균증, 살모넬라 감염증 등과 같은 전염성 질병들이 대부분임.
 - 따라서 의약품에 사용되는 오리의 사육은 농림축산검역본부에 권장하는 축산물위해 요소중점관리 (HACCP) 시스템으로 관리가 필요함.
 - 본 연구에서는 오리농장의 HACCP에 대한 사육시스템에 대한 기본적인 자료를 제공함.
- 오리부리 원료 (골이식재, D350C)의 멸균처리 공정 개발
 - 멸균제품이란 생명력있는 미생물이 없는 제품임, 의약품에 대한 유럽 표준으로 멸균 제품을 공급하고자 할 때 모든 원천에 의한 의약품의 우발적인 미생물의 오염이 최소화되어야 함.
 - 의료기기 및 의약품 멸균에 일반적으로 사용되는 EO 가스 멸균은 각종 의료기기에 잔류해 인체에 흡수될 수 있다는 문제점이 제기되고 있음.
 - 본 연구에서는 감마선 멸균법으로 오리부리 유래 골이식재 멸균 제조 공정을 확립하여 친환경, 무공해, 생체친화적인 이식재를 개발하고자 함.

○ 실험군의 분류

- 오리부리의 뼈 유래 골이식재(D350C)를 감마선 멸균하기 위해 2개의 그룹으로 나누어 25 및 40 kGy의 감마선을 조사하였고, 감마선을 조사한 D350C는 주사 전자 현미경(scanning electron microscopy)을 이용하여 표면 형상을 관찰하였음.

○ 감마선 조사량(25, 40 kGy)에 따른 생체친화성 평가

- 감마선 조사된 D350C의 세포 독성 및 생존율을 측정하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)와 cell counting kit-8 (CCK-8) assay를 실시하였고, 공초점 레이저 현미경(laser scanning confocal microscope)을 통해 세포

친화력을 측정하였음.

○ 멸균공정으로 생산된 오리부리 골이식재의 바이오 버든 검사

- 표면 또는 내부에 있는 생존 가능한 미생물 확인
- 각 포장된 완제품(골이식재)에 PBS 3 ml를 넣고, 용출된 용액을 혈액 한천 배지에 떨어뜨린 후 37℃에서 24시간 배양하고 세균증식 여부를 관찰함.

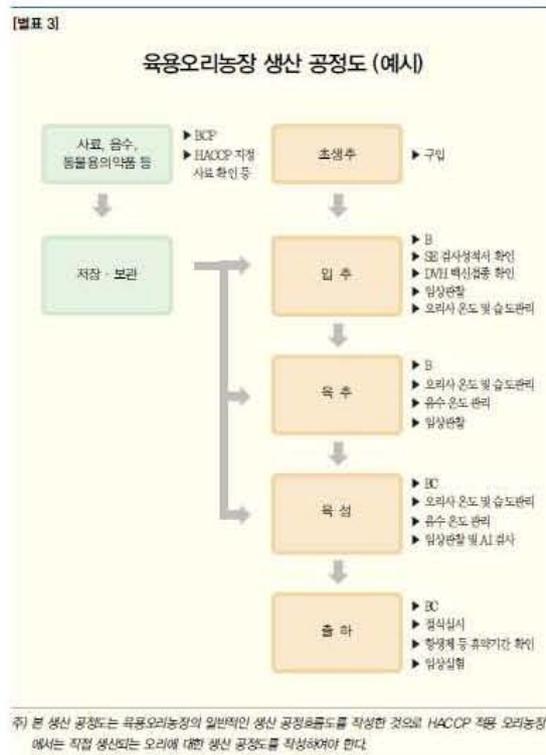
○ 멸균공정으로 생산된 D305C의 상품 가능성 평가

- 전 세계적으로 가장 많이 사용하는 이종골 이식재인 Bio-Oss®와 D350C를 비교·평가하기 위해 세포 독성 및 생존율을 측정하기 위한 MTT와 CCK-8 assay를 실시하였고, 공초침 레이저 현미경을 통해 세포 친화력을 측정하였음.

○ 연구의 결과

▪ 골대체제용 생체소재 HACCP 관리

- 자료인용: 농림축산검역본부 홈페이지(<http://www.qia.go.krs>)의 알기 쉬운 축산물 HACCP 가이드 시리즈 4 가축사육단계(오리농장) HACCP 적용 매뉴얼(그림 1-28)에서 생산된 오리부리의 사용을 권장함.



본인에서 따지는 오리농장 HACCP 적용 매뉴얼 129

그림 1-28. 오리유래 생체소재의 생산 공정도.

○ 오리부리 원재료 사용 의료기기(폴이식재, D350C) 멸균처리공정 개발



그림 1-29. 오리부리의 뼈 유래 폴이식재의 멸균 제조 공정

- 감마선 멸균법은 의료기기 시장의 85%를 차지하고 있음. 이 멸균공정이 적절하게 시행되도록 하기 위해 여러 국제규격이 정해져 있음. 감마선 멸균공정은 코발트-60 방사성동위원소에서 방출되는 이온화 감마선을 제품에 조사(irradiation)시키는 공정을 포함하는 물리적인 공정임. 감마 멸균의 경우, 멸균의 균일도와 우수한 멸균효과를 유지해야 하므로 적절한 멸균법으로 평가되는 감마선 멸균방법이 ISO 11137 등과 같은 국제기준을 통해 권고되고 있음.
- 본 연구에서 개발된 멸균 공정은 공정관리변수가 적기 때문에 재현성이 좋고, 균일한 무균보증을 얻기 쉬우며, 잔류독성이 없다는 특징을 가지고 있음. 또한 완제품 생산 후 최종 포장 후에 감마선 멸균을 하기 때문에 제품이 유효기간 동안 외부 미생물로 인해 재오염되거나 해충 등 일반 유기체들의 침입으로 사용할 수 없게 되는 것을 방지하고 제품을 사용하기 전까지 안전하게 보호할 수 있음.

- 오리부리 유래 멸균 제조공정으로 제조된 골이식재의 특성 분석 (그림 1-30)
 - FE-SEM 사진에서 멸균 제조공정으로 제조된 오리부리 유래 골이식재는 다양한 미세기공이 존재하였고, 기공들은 서로 연결이 되어서 장축 방향으로 관을 형성하였음.
 - EDS 분석에서 Ca/P의 비율은 1.47로 사람과 유사한 형태를 보였음(Ca/P ratio: 1.50-1.70). XRD 분석에서 전형적인 nano 크기의 poorly crystalline apatite 형태의 peak의 너비가 넓은 저결정성(low crystallinity) 골이식재로 제조되었음.

본 연구팀의 특허등록 사항

특허번호: 제 10-1438745, 특허등록일 : 2014. 9. 1.

특허명: 동물뼈로부터 유래된 저결정성 세라믹재의 제조 방법

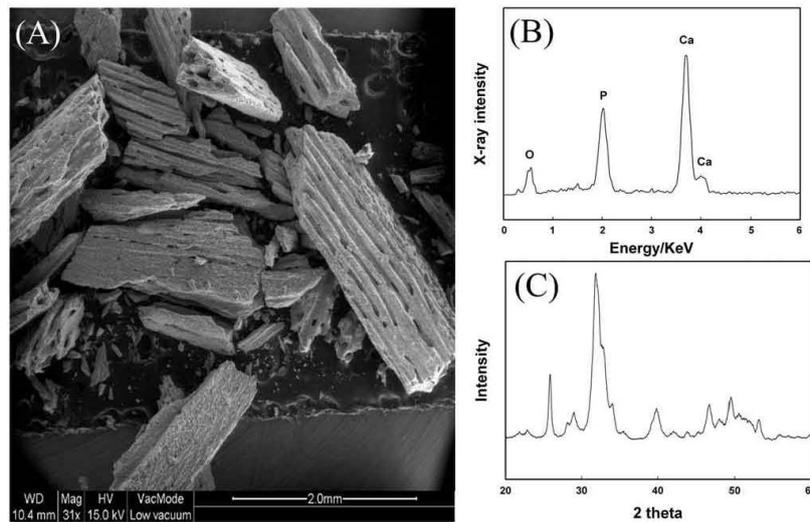


그림 1-30. 감마선 멸균법으로 제조된 골이식재(D350C)의 FE-SEM 사진 (A), EDS spectrum (B) 및 XRD pattern (C).

- 감마선 조사량(25, 40 kGy)에 따른 생체친화성 평가
 - 공초점 레이저 현미경 (laser scanning confocal microscopy)으로 서로 다른 선량의 감마선(25, 40 kGy)을 조사한 D350C의 세포 친화(침투)성을 관찰한 결과 각 그룹간 세포 친화력은 우수하였으며, 선량에 따른 차이는 관찰되지 않았음 (그림 1-31). 이는 감마선의 조사가 D350C의 친화성에 영향을 미치지 않음을 의미함.

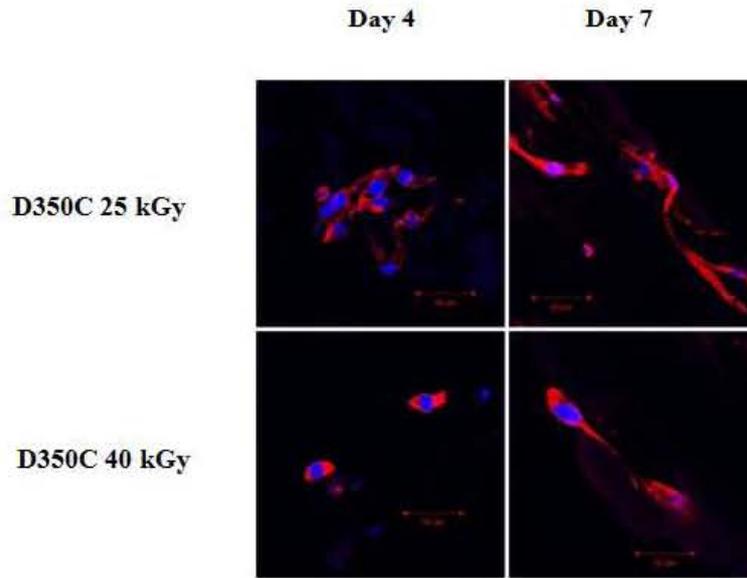


그림 1-31. 오리부리의 뼈 유래 폴리식재(D350C)의 laser scanning confocal microscopy. X400.

- 멸균공정으로 생산된 오리부리 폴리식재의 바이오 버든 검사
 - 포장된 시제품의 감마선 멸균 (25 kGy) 후에 오리부리 폴리식재의 바이오 버든 검사에서 세균이 증식하지 않아 제조공정의 멸균공정이 적절한 방법인 것을 확인하였음 (그림 1-32).



그림 1-32. 멸균 제조공정으로 제조된 골이식제(D350C)의 혈액 한천배지에서
세균배양 실험 과정 및 결과(1일 후).

- 멸균공정으로 생산된 D350C의 상품 가능성 평가
 - 전자현미경 사진에서 Bio-Oss® 및 D350C의 입자는 형태가 다르지만, 두 이식제의 안쪽으로 거친 표면의 저결정성 골이식제의 특징을 가지고 있음.
 - 공초침 레이저 현미경 사진에서 4일과 7일째 각각 이식제의 세포친화도를 측정하였을 때, Bio-Oss® 보다 D350C에서 더 많은 세포가 관찰되었고, 4일째보다 7일째에서 세포 부착에 관여하는 F-actin이 더 뚜렷하고 세포들간의 상호작용이 충분한 것으로 확인됨. 즉, D350C 입자의 세포의 표면에 대한 원활한 부착 및 세포의 증식과 생존률이 더 높게 나타났음을 알 수 있음.
 - CCK-8 kit assay 분석에서 Bio-Oss® 및 D350C의 사람 조골세포(Human Osteocarcinoma: human osteoblast-like MG-63 cell line)에 대한 세포 증식률은 점점 증가하는 양상을 보였고, D350C가 Bio-Oss®보다 더 세포 증식률이 높은 것으로 나타났으나 유의적인 차이는 없었음.
 - MTT 분석에서 D350C가 MG-63의 세포 생존율은 130-160%로 Bio-Oss® 보다 더 높았으나 유의적인 차이는 없었음.

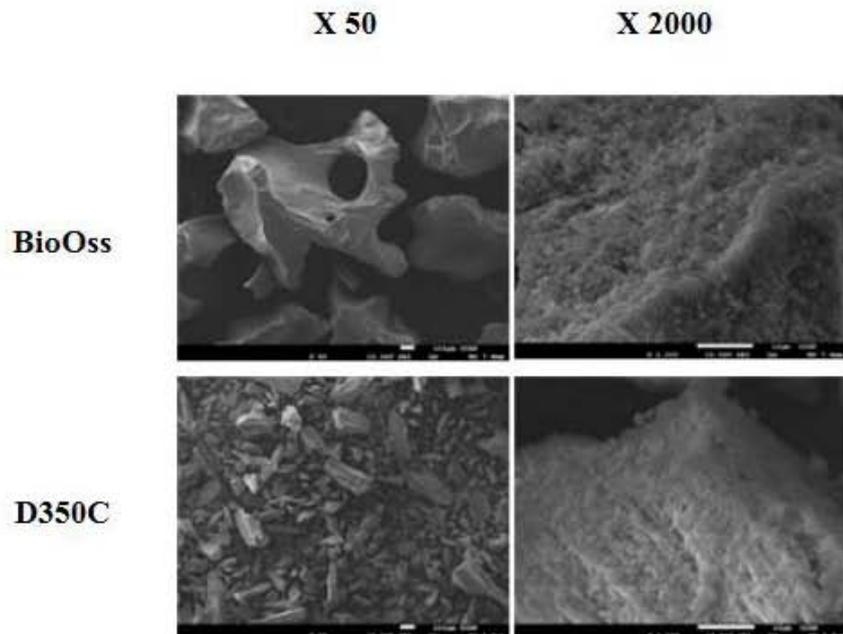


그림 1-33. Bio-Oss[®] 및 오리부리의 뼈 유래 골이식재(D350C)의 주사 전자 현미경 사진 (배율 x50, x2000).

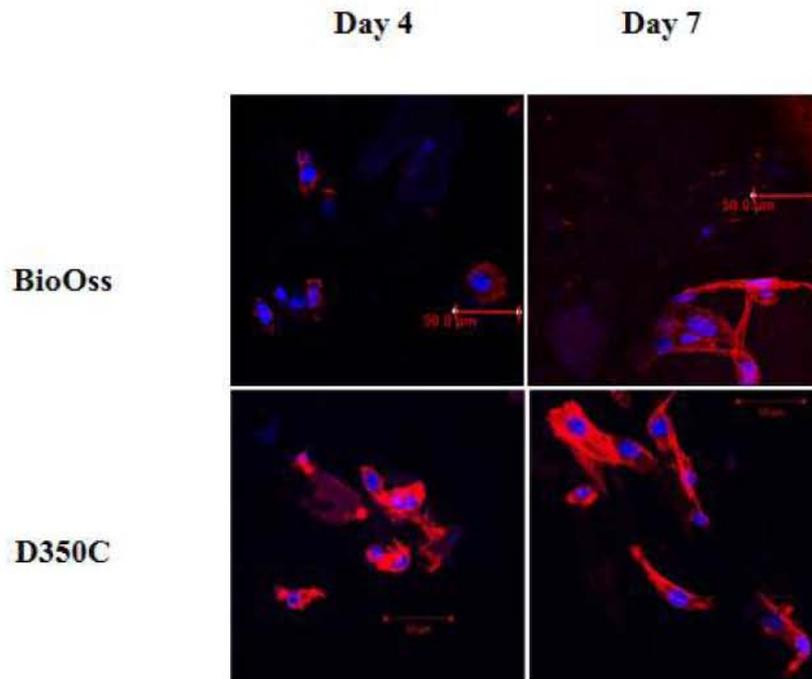


그림 1-34. Bio-Oss[®] 및 오리부리 유래 골이식재(D350C)의 공초침 레이저 현미경 사진, 배율 x400.

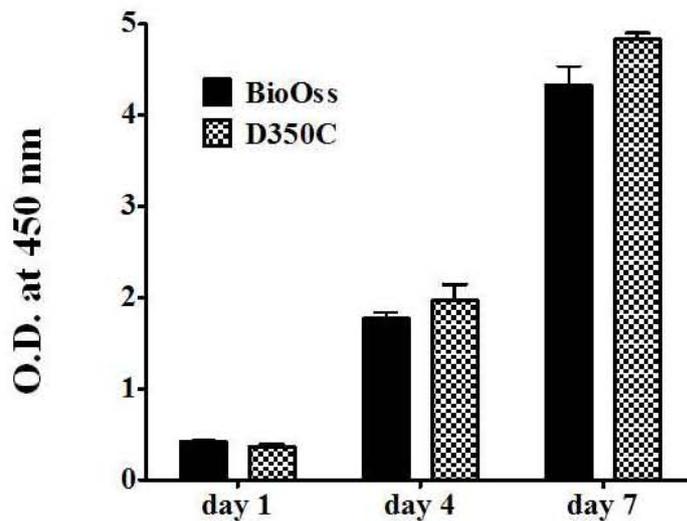


그림 1-35. Bio-Oss[®] 및 오리부리 유래 골이식재(D350C)의 Cell counting kit-8 (CCK-8) assay에 의한 세포 증식률 비교.

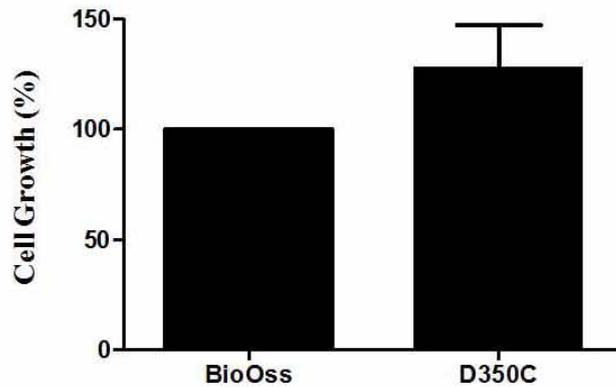


그림 1-36. Bio-Oss® 및 오리부리 유래 폴리식재(D350C)의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 분석법에 의한 24시간 후의 세포 생존율.

- 멸균공정으로 생산된 D350C를 이용한 정형외과용 골지지체 개발
 - (그림 1-37)에서 볼 수 있듯이 주사전자현미경으로 고배율에서 3차원 인공지지체의 표면을 관찰한 결과 PCL/PLGA 인공지지체에 비해 멸균공정으로 생산된 D350C를 53 μm 이하의 오리부리 뼈 입자(duck bone powder, DBP)로 만들어 혼합한 PCL/PLGA/DBP 인공지지체의 경우 표면이 거친 것을 볼 수 있음. 이를 통해 오리부리 뼈 입자가 PCL과 PLGA 물질과 잘 혼합된 것을 알 수 있음.

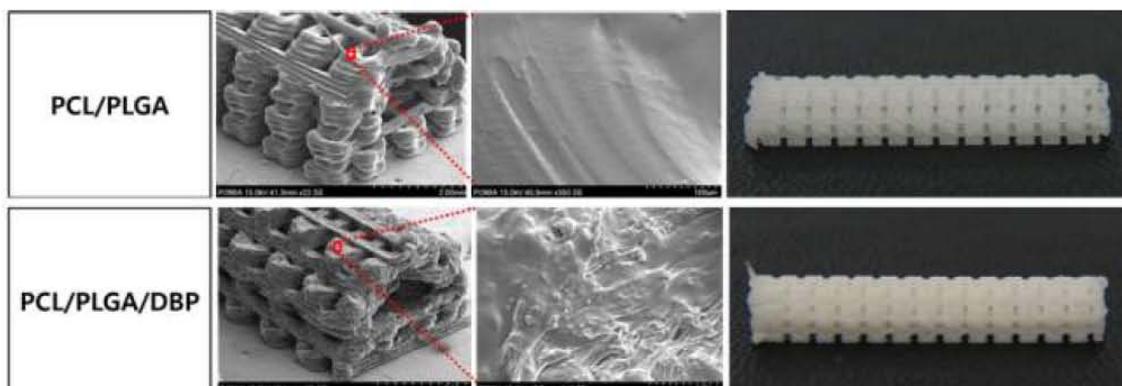


그림 1-37. 3차원 인공지지체의 외형 및 주사전자현미경 사진.

- 3차원 인공지지체에 인간 하비갑개유래 중배엽 줄기세포를 배양한 후 2주차에

주사전자현미경 사진을 촬영한 결과, PCL/PLGA 인공지지체에 비해 오리부리 뼈 입자를 혼합한 PCL/PLGA/DBP의 경우 거친 표면을 가진 지지체의 격자무늬 사이로 세포가 잘 부착하여 증식한 것을 볼 수 있었음. 이를 통해 오리 부리 뼈를 이용하여 만든 PCL/PLGA/DBP 인공지지체의 거친 표면이 세포 증식이 더욱 잘 될 수 있는 환경을 제공하여 세포가 자라기에 더 용이하다는 것을 알 수 있었음.

- 2주차에 alizarin red 염색을 실시하였을 때, PCL/PLGA는 붉은 염색성이 거의 보이지 않는 것과 대조적으로 PCL/PLGA/DBP의 경우에는 지지체 내에 형성된 칼슘염들이 빨갛게 염색되는 것을 확인할 수 있었음 (그림 1-38). 이러한 결과들로 보아 PCL/PLGA/DBP 지지체 내부에 부착해 증식한 세포들이 골원성 분화과정을 거치며 석회화된 기질을 형성했다고 할 수 있음.
- 4주차에 alizarin red 염색을 실시했을 때도 2주차의 결과와 동일하게 PCL/PLGA 인공지지체에 비해 PCL/PLGA/DBP 인공지지체에서 붉은 염색성이 더 뚜렷하게 잘 나타남을 볼 수 있었음 (그림 1-38). 이러한 결과들을 통해 PCL/PLGA 단독으로 만든 인공지지체보다 오리부리 뼈 입자를 혼합한 인공지지체들의 세포친화성이 더 뛰어나며 세포의 골원성 분화가 더 잘 일어난다고 할 수 있음. 따라서 PCL/PLGA 인공지지체보다 오리부리 뼈 입자를 혼합한 인공지지체가 생체적합성 및 골을 형성하는 능력이 더 뛰어나다고 할 수 있음.

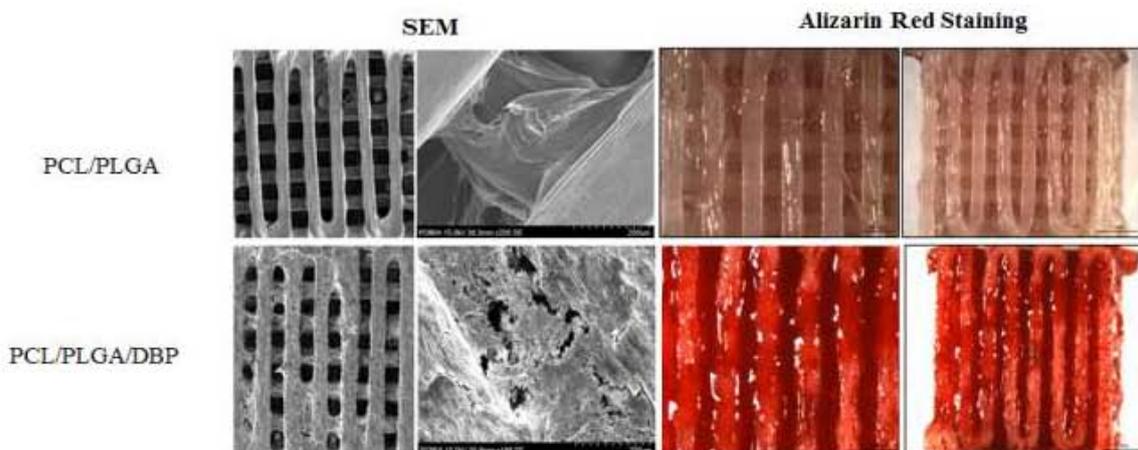


그림 1-38. 인간 하비갑개유래 중간엽 줄기세포와 3차원 인공지지체를 배양한 2주차의 주사전자현미경 사진 및 Alizarin Red S 염색 사진.

다. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 열처리에 따른 특성 평가

○ 실험군

- 오리부리의 뼈 유래 입자의 특성분석에 사용된 대조군은 제1군으로서 현재 가장 널리 사용되고 있는 소 뼈 입자임.
- 오리부리 뼈로 제조된 시료들은 제1차년도에 다양한 물리·화학적 특성 분석을 통해 골대체재로서의 가능성을 확인하였음. 이후 추가적인 분석 및 결과는 다음과 같다 (표 1-4).

표 1-4. 열처리 방법에 따른 시료의 특성 분석

실험군	가공방법
제1군 (control)	소 뼈 입자(Bio-Oss®, Geistlich, Switzerland)
제2군 (duck bone)	탈지 및 탈단백 → 수압 열처리(120℃, 30분)
제3군 (duck bone)	탈지 및 탈단백 → 건열 열처리(400℃, 15시간)
제4군 (duck bone)	탈지 및 탈단백 → 건열 열처리(1,200℃, 3시간)

○ 오리부리의 뼈 입자의 비표면적 분석

- 시료의 비표면적은 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 방법을 이용하여 측정하였고, pore diameter와 pore volume은 Barrett-Joyner-Halenda (BJH) 방법으로 계산하였음.
- BET 방법은 시료표면에 질소(N₂)가스를 흡착시켜 흡착된 질소가스의 양을 측정하여 표면적을 구하는 방법이며, 이때 측정기기는 Quantachrome (Quadrasorb S1, USA)를 이용하였음.
- 일반적으로 micro pore는 2 nm 이하, meso pore는 2-50 nm, macro pore는 50 nm 이상을 의미하며 BET 측정으로 micro pore에서 meso pore를 측정할 수 있으며 수은 침투법으로는 meso pore에서 macro pore를 측정하였음 (그림 1-39).

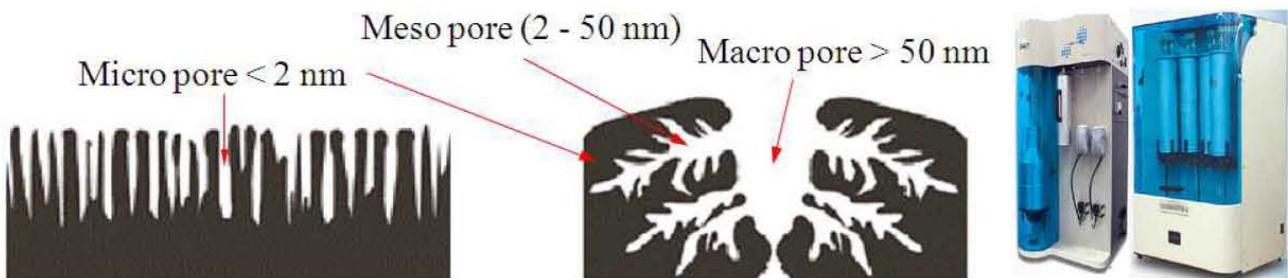


그림 1-39. 재료 표면의 기공크기에 따른 분류 및 BET 측정 장치

- 열처리 방법에 따른 각 시료의 표면적(surface area)과 기공체적(pore volume), 기공크기(pore size) 결과는 (표 1-5)와 같이 나타났다.

표 1-5. 열처리 방법에 따른 각 시료의 표면적과 기공체적, 기공크기

실험군	BET surface area (m ² /g)	Pore volume (cm ³ /g)	Pore size (nm)
제1군 (control)	76.85	0.44	601.09
제2군 (duck bone)	98.87	0.39	480.51
제3군 (duck bone)	78.67	0.41	612.87
제4군 (duck bone)	1.06	0.003	182.60

- 대조군인 소 뼈 입자의 경우 표면적은 76.85 m²/g, 기공체적은 0.44 cm³/g, 기공크기는 601 nm를 나타내었음. 오리 부리의 뼈로 제조된 제2군(120℃ 열처리)은 표면적은 98.87 m²/g으로 소 뼈의 입자 대비 증가한 경향을 나타내었으나 기공체적과 기공크기는 0.39 cm³/g 및 180.51 nm로 다소 낮은 값을 나타내었음.
- 그러나, 소 뼈의 입자와 유사한 열처리 온도(400℃)를 갖는 제3군은 표면적과 기공체적 및 기공크기가 소 뼈 입자보다 높거나 유사한 값을 나타내었음. 그리고 1,200℃로 열처리 한 제4군의 경우 표면적은 1.06 m²/g, 기공체적은 0.003 cm³/g, 기공크기는 182 nm로 다른 시료 대비 현저히 낮은 값을 나타내었음.
- 상기 BET 결과는 제1군과 제2군 및 제3군은 제조된 입자에 micro pore와 meso pore가 많이 분포되어 있으며 제4군은 meso pore와 macro pore가 많이 분포하는 것으로 생각됨.
- 즉 열처리 온도의 증가에 의해 부리 뼈 입자를 구성하는 아파타이드 grain들의 결정화로 그 치밀도가 증가하고, 이로 인해 유기물 제거 후 형성된 부리 뼈 입자내 상호연결된 micropore들이 사라지기 때문에 표면적, 기공체적 및 기공크기가 감소하는 것으로 생각됨.
- 그리고, 제1차년도에 수은측정법으로 측정한 제4군의 평균 기공크기가 2,878 nm임을 감안하면, 주로 macro pore로 구성된 제4군의 기공도를 측정하기에 BET 분석은 한계가 있는 것으로 판단됨.
- 결과적으로, 제1군과 제3군은 유사한 표면적 및 기공특성을 나타냄으로서 오리 부리 뼈 입자와 소 뼈 입자는 micro pore와 meso pore가 주로 분포되어 있고, 열처리 온도 제어에 의해 부리 뼈 입자의 기공특성을 변화시킬 수 있으므로 인체적용부위에 요구되는 특성으로 제어하기가 좀 더 유익할 수 있을 것으로 판단됨.

라. 인공합성 하이드록시아파타이트/오리부리의 뼈 이중구조 지지체의 제조 및 세포친화성 평가

(1) 오리부리 뼈 마이크로 입자 제조

- 오리부리의 뼈 마이크로 입자(평균 10 um 이하)의 제조과정을 아래에 나타내었음(그림 1-40).

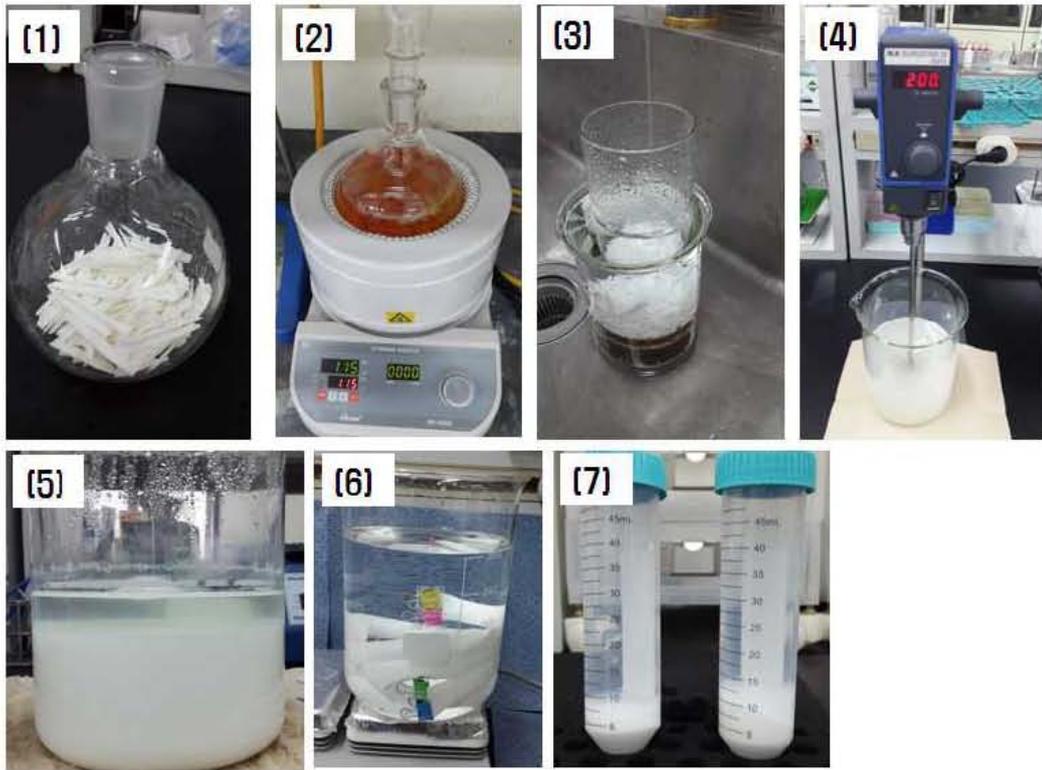


그림 1-40. 오리부리 뼈 마이크로입자 제조 과정 모식도.

- ① 먼저 오리부리 뼈를 끓는 물에 12시간 침지하여 유기물을 제거 하고 과산화수소 10% 수용액에 침지하여 100℃ 24시간 동안 끓여 1차 지방 및 단백질을 제거, 건조.
- ② 에틸렌 디아민용액에 침지하여 120℃에서 72시간 처리하여 2차 단백질 제거.
- ③ 흐르는 물에 7일간 수세하여 화학약품을 1차로 제거.
- ④ 이어서 증류수에 부리 뼈를 침지한 다음 분쇄용 프로펠러가 장착된 교반기로 24시간동안 교반하여 분말화 시킴.
- ⑤ 분말화된 부리 뼈를 투석용 멤브레인으로 옮긴 다음 7일 동안 교반하면서 잔류 화학 약품을 완전히 제거.
- ⑥ 원심분리기를 이용하여 3000 rpm에서 오리부리 뼈 분말을 회수하여 80℃ 오븐에서 24시간 동안 건조.

(2) 인공 합성 하이드록시아파타이트(HAp)/오리부리 뼈 이중구조 지지체 제조

- HAp를 기질로 하고 오리부리 뼈가 표면에 코팅된 다공성 이중구조 지지체는 스펀지 템플레이트 방법으로 제조하였음. 이때 HAp는 200-400 nm의 입도분포를 갖는 제품을 사용하였음.
- 먼저 바인더로서 일정 농도의 poly (vinyl alcohol) (PVA)과 carboxymethylcellulose (CMC)가 녹아 있는 수용액에 HAp 분말을 서서히 추가하면서 교반함. 이어서 온도를 80℃로 상승시켜 지속적으로 교반하면서 물을 증발시킴. 일정 농도의 슬러리가 제조되면 온도를 상온으로 낮추어서 교반시킴. 오리부리 분말 또한 상기와 같은 방법으로 슬러리를 제조함 (그림 1-41).



그림 1-41. HAp 슬러리 및 오리부리 뼈 분말로 제조된 슬러리

- 폴리우레탄계 스펀지(60 ppi)를 원통형의 펀치를 이용하여 직경 10 cm, 높이 5 cm의 디스크 타입으로 제작한 다음 상기의 HAp 슬러리로 코팅함. 이어서 1200℃에서 3시간 동안 소결하여 스펀지를 제거하는 동시에 스펀지 구조와 동일한 상호연결된 기공구조를 갖는 다공성 HAp 지지체를 제조함 (그림 1-42).



그림 1-42. HAp 다공성 지지체 제조과정.

(A) 원통형 스펀지, (B) HAp 코팅 스펀지, (C) 1200℃에서 소결된 HAp 지지체

- 제조된 다공성 HAp 지지체를 상기에서 제조한 오리부리 뼈 분말 슬러리에 침지한 다음 약하게 원심분리하여 오리부리 뼈 분말을 HAp 지지체 표면에 2차 코팅한 다음 다시 1200℃에서 3시간 동안 소결하여 HAp/부리 뼈 이중구조 지지체를 제조함 (그림 1-42).

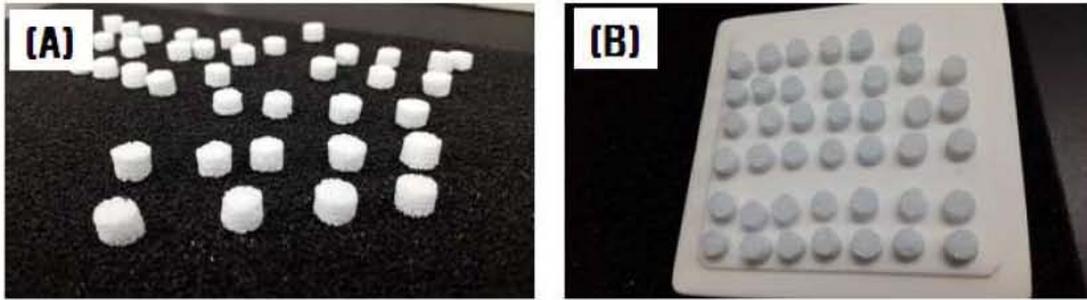


그림 1-43. HAp/부리 껍 이중구조 지지체.

(A) 부리 껍 분말 코팅 HAp 지지체, (B) 1200℃에서 소결된 HAp/부리 껍 이중구조 지지체.

(3) 제조된 HAp/부리 껍 이중구조 지지체의 형태학적 특성

- 제조된 오리부리 껍 분말은 백색을 나타내었고 원심분리에 의해 밀집된 덩어리가 다수 관찰되는 것을 확인하였음. 그리고 이러한 분말을 1200℃로 소결한 경우 밀집된 덩어리가 그대로 소결되어 불규칙한 블록형태가 형성됨을 관찰하였음 (그림 1-43).



그림 1-44. 제조된 오리부리 껍 분말(A) 및 1200℃에서 소결된 오리부리 껍 분말

- 오리부리 껍 마이크로입자의 형태학적 특성을 SEM으로 측정된 결과 소결 전과 소결 후의 입자 형태가 상당히 다른 것을 관찰하였음.
- 먼저 소결 전 오리부리 껍 입자의 경우 수십에서 수백 나노미터 크기의 입자들이 응집된 형태를 나타내었고, 1200℃에서 소결된 후에는 부리 껍 결정이 커지면서 큰 그래인 형태가 나타남을 확인함. 즉, 천연 세라믹인 오리부리 껍은 소결성이 우수하여 인체 부위 맞춤형 다양한 형태로 제조가 가능할 것으로 판단됨 (그림 1-45).
- 본 연구에서 제조된 오리부리 껍 입자의 입도 분포를 하기 그림에 나타내었음. 1200℃에서 소결된 부리 껍 입자의 경우 소결에 의한 그래인 크기가 증가하여 응집된 형태를 나타내기에 측정하지 않았음 (그림 1-46).
- 제조된 오리부리 껍 입자는 평균 9.4 um로 측정 되었으나, SEM 관찰 결과에서는 수십 나노미터 수준의 입자들이 상당히 존재함을 확인함. 이러한 결과는 부리 껍 건조과정에서 부리 껍 나노 입자들이 서로 응집되어 입도측정 시 수용액상에 완전히 분산되지 않았기 때문인 것으로 판단됨.

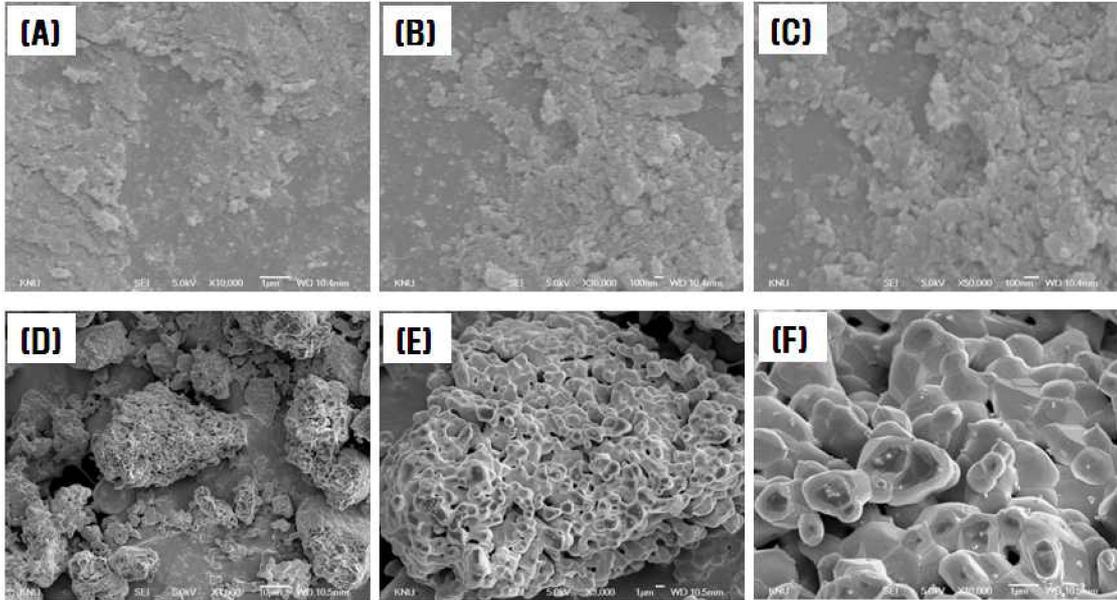


그림 1-45. 오리부리 마이크로입자의 SEM 사진.
 (A) $\times 10,000$, (B) $\times 30,000$, (C) $\times 50,000$) 소결전 오리부리의 뼈 입자,
 (D) $\times 1000$, (E) $\times 3000$, (F) $\times 10,000$) 1200°C 에서 소결된 오리부리의 뼈 입자.

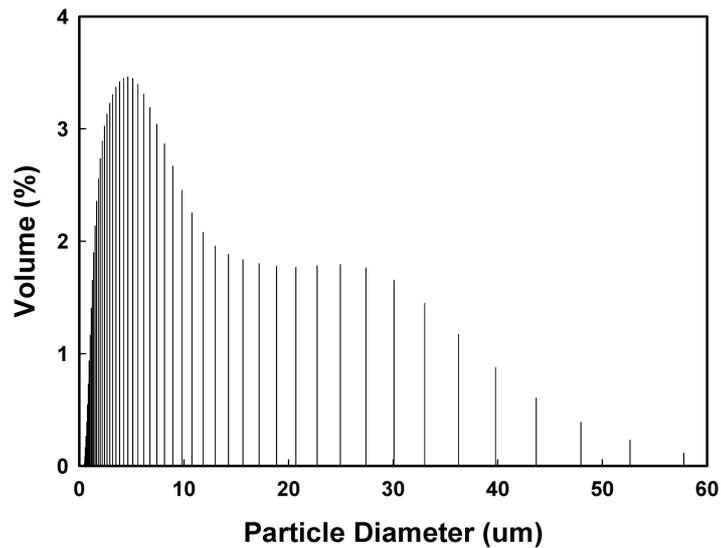


그림 1-46. 오리부리 뼈 분말의 입도 분포 그래프.

- HAp 나노분말로 코팅된 스펀지의 실체현미경사진에서 HAp 슬러리가 스펀지 표면에 잘 코팅되었으며 스펀지의 기공을 막지 않은 것을 관찰하였음. 그리고 1200°C 로 소결한 후에도 스펀지와 동일한 기공구조가 나타남을 확인함. 이러한 랜덤 지오메트릭 기공구조는 인체의 해면골 구조와 유사한 구조로서 인체 뼈 재생에 유리한 기공구조임 (그림 1-47).

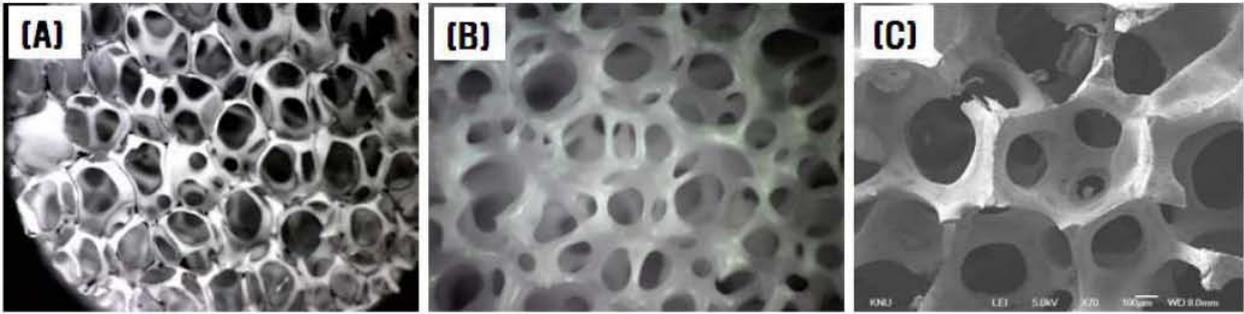


그림 1-47. HAp 슬러리 코팅 스펀지 및 1200°C 소결 후 HAp 다공성 지지체.
(A)와 (B) 실제현미경 사진, (C) SEM 사진

- HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체의 표면을 SEM으로 관찰하여 그 결과를 하기에 나타내었음. 순수한 HAp로 제조된 지지체 표면은 나노미터 크기의 HAp가 소결에 의해 결정이 커지면서 치밀하고 smooth한 표면이 나타남을 확인함 (그림 1-48).
- 그리고 HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체의 표면은 치밀한 HAp 표면위에 부리 뼈 입자가 코팅 및 소결되어 나노 및 마이크로미터 크기의 기공들이 상호 연결되어 열려진 채널 구조를 갖는 거친 표면이 나타남을 확인함.

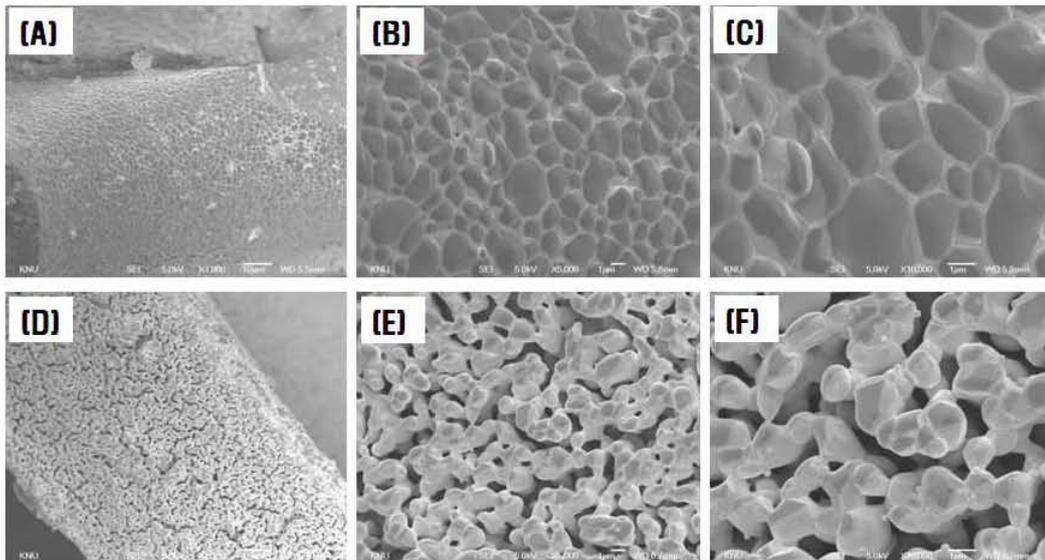


그림 1-48. HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체의 표면 SEM 사진.
(A ×1000, B ×5000, C ×10,000) HAp 지지체, (D ×1000, E ×5000, F ×10,000)
HAp/오리부리의 뼈 이중구조 지지체

- 이들의 단면 SEM 사진에서 순수한 HAp 지지체의 경우 기공이 없는 치밀한 단면구조 형태를 나타내었고, HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체의 경우 치밀한 HAp 표면위에 부리 뼈 결정이

성장하면서 큰 그레인들이 서로 연결되어 HAp 표면과 연결된 형태를 나타내었음. 즉, 인공합성 HAp 표면위에 천연 세라믹인 오리부리 뼈가 상분리 없이 잘 코팅된 이중층 구조가 나타남을 확인함.

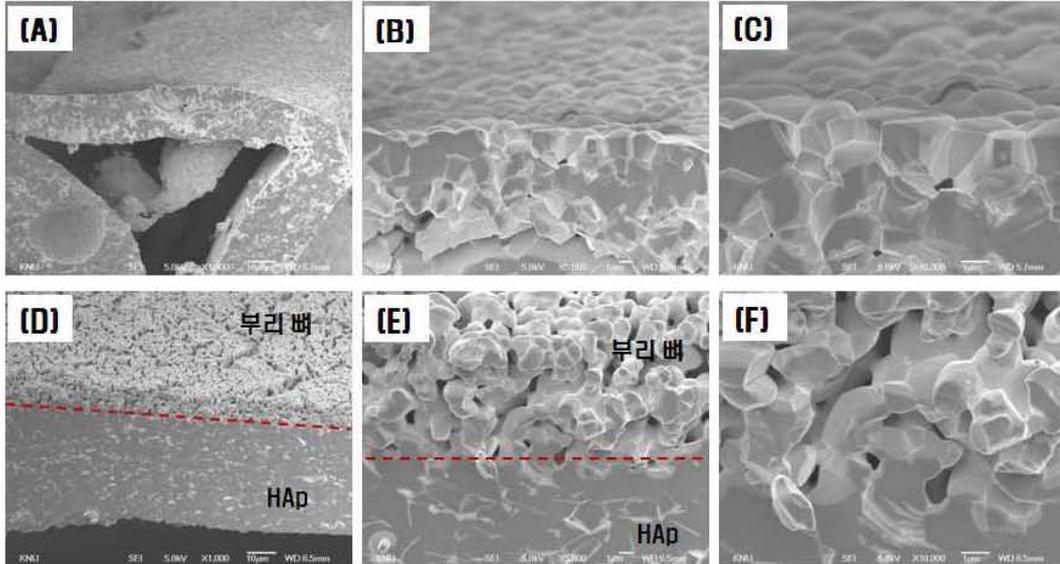


그림 1-49. HAp/오리부리의 뼈 이중구조 지지체의 단면 SEM 사진.

(A) ×1000, (B) ×5000, (C) ×10,000) HAp 지지체,
 (D) ×1000, (E) ×5000, (F) ×10,000) HAp/오리부리의 뼈 이중구조 지지체

(4) HAp/부리 뼈 이중구조 지지체의 압축강도

- 순수 HAp 다공성 지지체의 경우 평균 0.67 MPa의 압축강도를 나타내었고 오리부리의 뼈가 코팅된 HAp/오리부리의 뼈 이중구조 지지체의 경우 0.63 MPa의 압축강도를 나타내었음. 그러나 이들 두 지지체간 압축강도는 유의한 차이가 나타나지 않았음 (그림 1-50).
- 즉, 제조된 다공성 지지체의 압축강도를 결정하는 것은 스펀지에 1차로 코팅되는 HAp 양 및 소결 특성으로 결정되며 2차적으로 표면에 코팅되는 오리부리 뼈는 다공성 지지체의 압축강도에 미미한 영향을 미치는 것으로 판단됨.

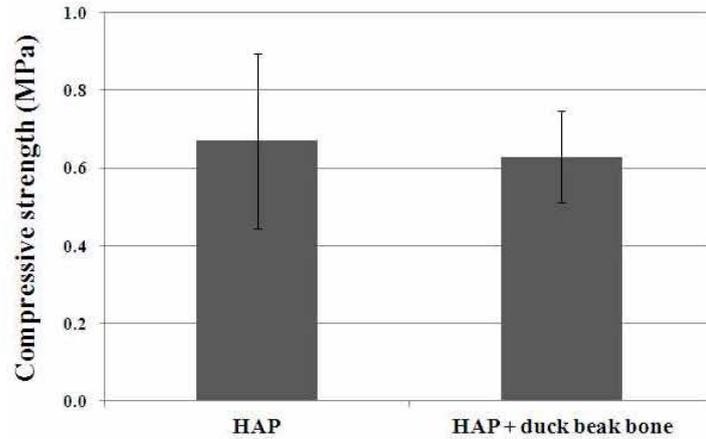


그림 1-50. HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체의 압축강도

(5) HAp/부리 뼈 이중구조 지지체의 세포증식 평가

- 이중구조 지지체의 세포친화성은 human pre-osteoblast cell인 MG63을 이용하였고, 지지체에 10×10^4 의 세포를 파종하여 2주 동안 배양하면서 그 특성을 파악하였음.
- 먼저 세포증식은 배양 1, 3, 7일에서 WST-8로 분석하였고, 그 결과를 하기의 그림에 나타내었음. 배양 3일차에서 순수 HAp 및 HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체에서 세포 증식이 증가하는 경향을 나타내었으나 배양 7일차에서는 배양 3일차와 유의한 차이를 나타내지 않았음 (그림 1-51).
- 그리고, 배양 3일차 이상에서 HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체에서 HAp 지지체 대비 세포증식이 다소 높게 나타났으나 유의한 차이를 나타내지은 않았음.

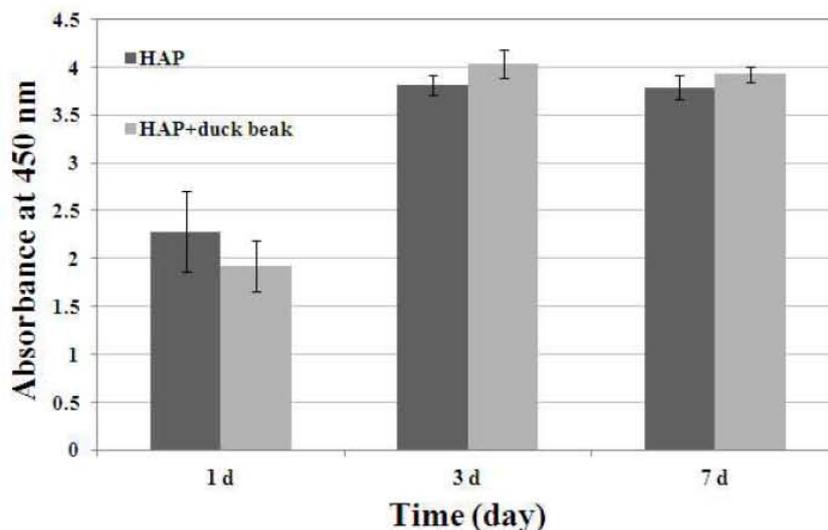


그림 1-51. HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체의 세포증식 평가

(6) HAp/오리부리의 뼈 이중구조 지지체 표면에서 세포의 형태학적 관찰

- HAp 및 HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체에 MG63세포를 파종한 후 1주 및 2주 동안 배양한 다음 SEM을 통해 이들 표면에서 성장하고 있는 세포의 형태학적 특성을 관찰하였음.
- 세포배양 7일차에서 순수 HAp 지지체의 경우 세포외기질(ECM)이 지지체 표면을 부분적으로 덮고 있는 반면 이중구조 지지체의 경우 지지체 표면 전체에 걸쳐 ECM이 생성된 것을 관찰하였음. 세포배양 14일차에서는 HAp 지지체 대비 HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체에서 보다 많은 세포 및 ECM이 성장하고 있는 것을 확인하였음 (그림 1-52).

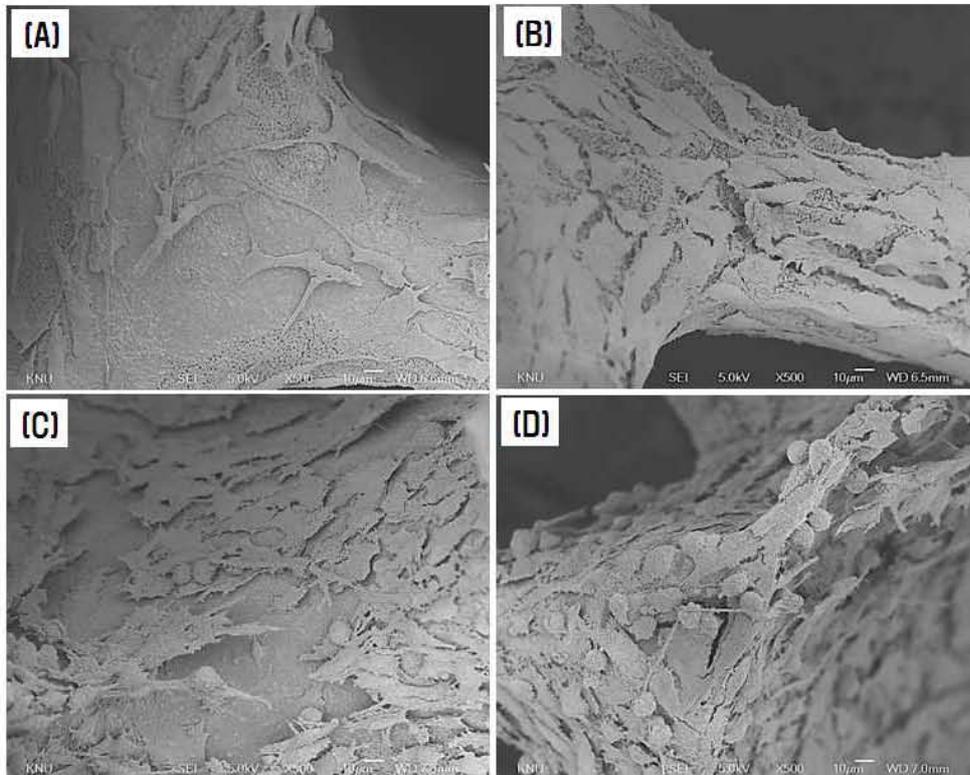


그림 1-52. HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체에서 세포의 SEM 사진.
(A)와 (B) HAp 지지체, (C)와 (D) HAp/오리부리의 뼈 이중구조 지지체.

(7) HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체 표면에서 세포의 형광관찰

- HAp 및 HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체에서 MG63세포의 형광관찰은 세포배양 1주 및 2주에서 시행하였음. 이때 세포의 핵은 DAPI로 염색하였고 세포의 액틴 단백질은 fluorescein isothiocyanate labeled phalloidin으로 염색하여 관찰하였음 (그림 1-53).
- 세포배양 7일차에서 DAPI로 염색된 세포는 순수 HAp 지지체 대비 HAp/오리부리 뼈 이중구조

지지체에서 더 많이 발현됨을 관찰하였고, 세포배양 14일차에서 더욱 현저하게 차이가 남을 확인하였음. 액틴 단백질의 경우도 HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체가 순수 HAp 보다 발현정도가 크게 나타남으로써 이중구조 지지체에서 세포의 활성이 높게 나타난다는 것을 알 수 있었음.

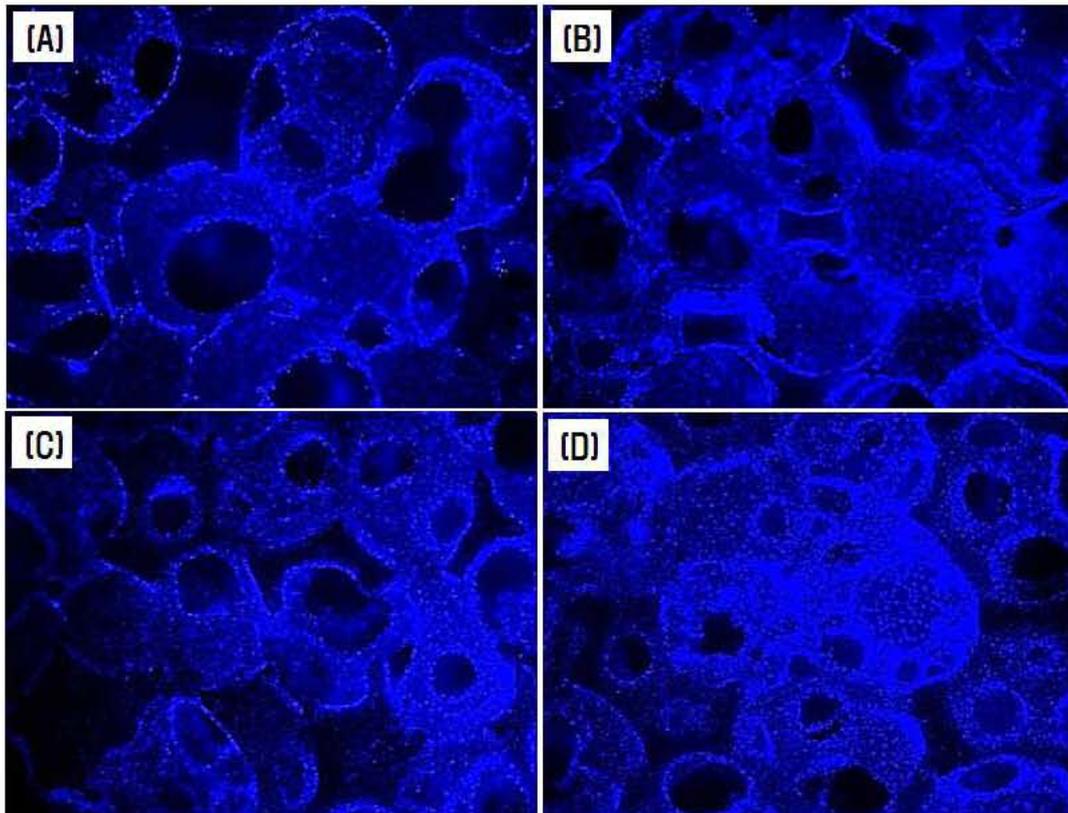


그림 1-53. HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체의 세포핵 형광사진.
 (A)와 (B) HAp 지지체, (C)와 (D) HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체.
 (A)와 (C) 7일, (B)와 (D) 14일 배양.

(8) HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체의 ALP 활성도 평가

- 세포배양 1주 및 2주에서 ALP 활성도를 측정하여 하기 그림에 나타내었음. 세포배양 7일에서 순수 HAp 지지체와 HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체의 ALP 활성도는 유의한 차이가 나타나지 않았음. 그러나 세포배양 14일에서는 이중구조 지지체가 순수 HAp 지지체 대비 더 높은 ALP 활성도를 나타내었음 (그림 1-55).
- 즉, HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체가 순수 HAp 보다 세포분화에 더 유리한 지지체임을 확인할 수 있었음.

- 일반적으로 인공합성 HAp는 널리 사용되고 있는 생체 세라믹으로서 골전도성은 우수한 반면 골유도성은 미미한 것으로 알려져 있음. 반면 소 뼈와 같은 천연 세라믹은 골유도성 및 골전도성이 인공합성 HAp보다 우수하여 치과 및 정형외과용으로 가장 널리 사용되고 있는 천연 생체재료임.

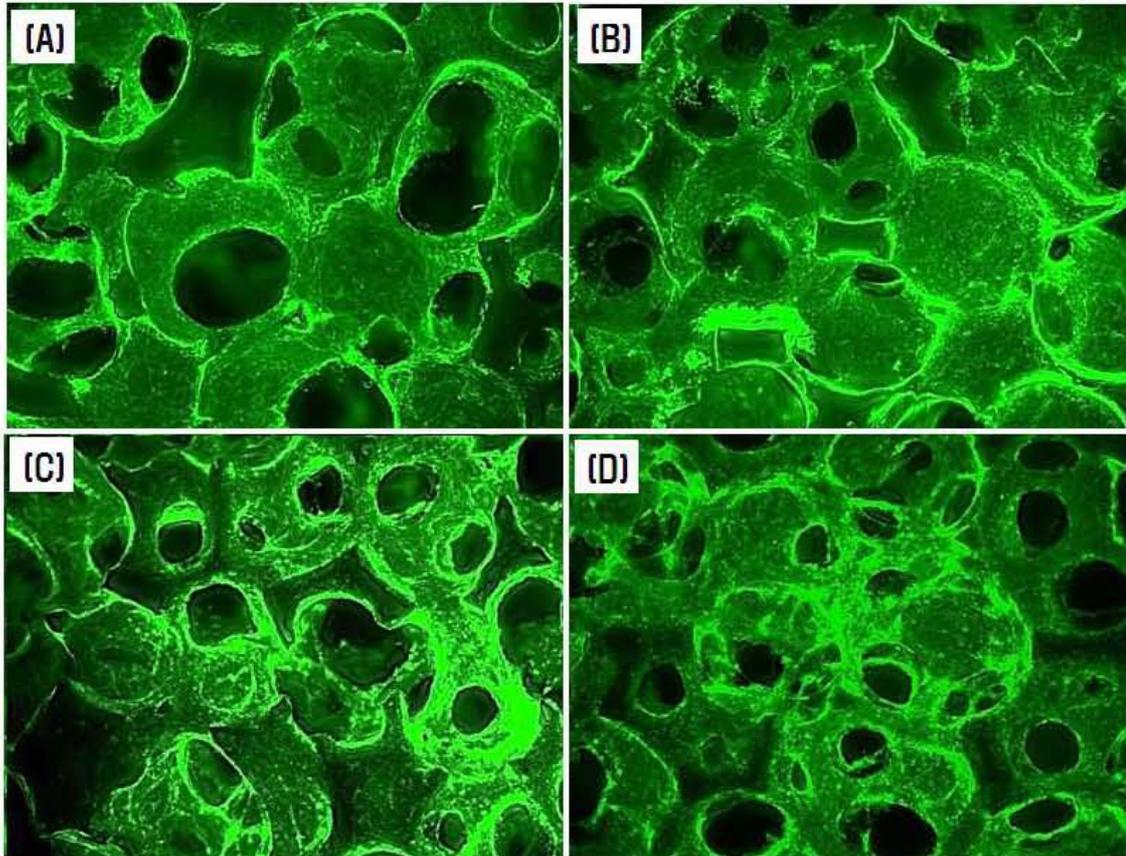


그림 1-54 HAp/오리부리 꿀 이중구조 지지체의 액틴 단백질 형광사진.

(A)와 (B) HAp 지지체, (C)와 (D) HAp/오리부리 꿀 이중구조 지지체.

(A)와 (C) 7일, (B)와 (D) 14일 배양.

- 이에, HAp을 기질로 하고 천연세라믹인 오리부리 꿀을 표면에 코팅할 경우 순수 HAp 대비 우수한 세포친화성을 나타냄으로서 오리부리 꿀의 용도전개를 위해 바람직한 방법이 될 것으로 판단됨.
- 또한 생분해성이 상이한 합성 생체세라믹과의 혼합을 통해 인체 맞춤형 형태(블록형 또는 그레놀 형태) 제조할 경우 이들 세라믹의 장점을 최대한 이용할 수 있는 우수한 생체재료의 제조가 가능할 것으로 생각됨.

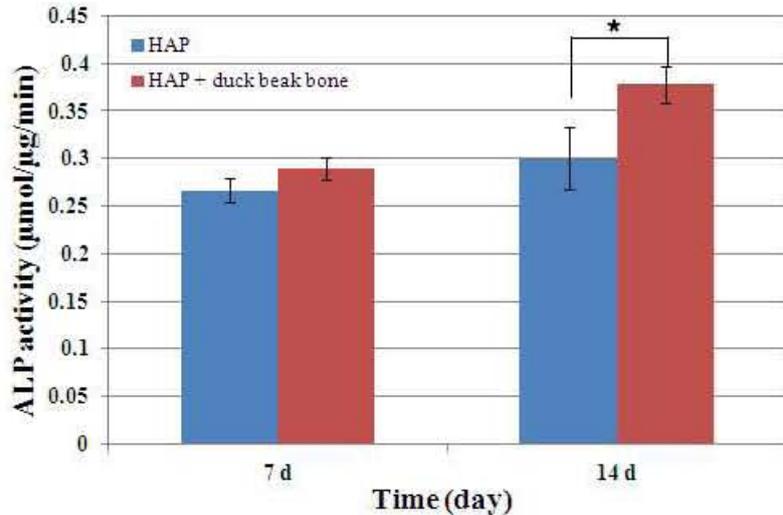


그림 1-55. HAp/오리부리 뼈 이중구조 지지체의 ALP 활성도.

(9) 결론

- 오리부리 뼈는 수용액 상에서 별도의 장치를 활용하지 않아도 서브마이크로 크기의 분말로 제조가 가능하고, 고온 열처리를 통해 소결성이 우수하게 나타나는 것을 알 수 있었음.
- 제조된 오리부리 뼈 분말을 이용하여 인공합성 HAp 표면에 오리부리 뼈가 코팅된 HAp/오리부리의 뼈 이중구조 지지체를 성공적으로 제조할 수 있었으며 HAp와 오리부리 뼈가 상분리없이 이중구조가 형성됨을 확인 할 수 있었음.
- HAp/오리부리의 뼈 이중구조 지지체의 경우 세포친화성이 순수 HAp보다 우수하게 나타나는 것을 확인함으로써 인체 맞춤형 다양한 형태로 오리부리의 뼈를 활용할 수 있음을 알 수 있었음.

3. 오리부리의 뼈 유래 생체소재의 생물학적 유효성 및 안전성 평가를 위한 동물실험

가. 오리부리의 뼈 유래 골대체제의 생체 치조의 적합성 평가

- 실험 동물
 - Beagle dog (오리엔트 바이오, 성남)
 - 5 마리(수컷, 1년령 이상), 체중 8-10 kg
- 동물실험윤리위원회(IACUC) 승인
 - 동물보호법 제4397호(1991. 5. 31제정)와 제8852호(2008. 2. 29. 일부 개정)에 따라 충북대학교 동물시험윤리위원회(IACUC)의 승인 후 실험하였다.
- 실험 동물실의 환경조건

- 설정온도 : $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 습도 : $50 \pm 20\%$
- 환기방식 및 회수 : 10회/hr
- 조명시간 및 명암주기 : 12hr/day/night
- 조도 : 150 - 300 Lux
- 사육케이지 : Stainless steel (W 895 x L 795 x H 765 mm)

• 실험군의 분류

- 실험군은 오리부리(duck beak)의 뼈 유래 골대체재인 시험군 (그림 1-56)과 세계에서 가장 많이 시판되고 있는 골대체재를 사용한 대조군 (Bio-Oss[®], Geistlich Co., Switzerland, 그림 1-56)으로 나누어 생체 안전성과 유효성을 비교 평가하였다.



그림 1-56. 실험에 사용한 대조군(시판용 Bio-Oss[®], A1, A2)과 시험군 (duck bone)의 골대체재 (B1, B2).

• 동물의 준비

- 실험동물을 구입한 후 1주일간 동물실험의 환경조건에 적응시킨 후 실험에 공시하였다.
- 건강한 비글견을 대상으로 실험하기 전에 전신 신체검사와 치아검사, 혈액학치, 혈청화학치 등을 검사한 후 건강한 동물의 좌, 우측 하악의 제1어금니를 발치하기 1주일 전에 모든 치아를 스케일링 하였고 구강검사를 하였다.
- 사료는 에완견용 고품사료 (도그람 헌터, 대주사료)를 1일 300-400g으로 제한 급여를 하였으며, 발치 후 발치부위를 보호하기 위하여 창상이 치유될 때 까지 유동식을 급여하였다.
- 물은 미세여과장치로 소독한 정제수를 자동급수 장치를 이용하여 급여하였다.

- 동물 마취
 - 비글견은 atropine (0.04 mg/kg, 광명당제약)을 피하로 주사한 후, zoletil 50[®] (Virbac, S.A., Carros, 프랑스) 5 mg/kg과 2% xylazine[®] (BAYER Co., 2 mg/kg)을 정맥으로 투여하여 마취를 유도하였다.
 - 흡입 마취가스 isoflurane (하나제약, 1.0 MAC, ETT ID 7.0, FiO2 1.0)으로 유지 마취를 하였다.
 - 동물을 전신마취한 후 chlorhexidine solution으로 구강을 세척하였고, 치아를 발취하기 전에 cefazolin (30 mg/kg, 세파졸[®], (주)이-글벳)을 정맥으로 투여하였다.
- 치아의 발취 및 골대체재의 이식
 - 동물치과전용 진료세트와 발취 겸자 (extraction forceps), Dental high-speed hand piece를 이용하여 비글견 하악의 좌, 우측 제1전구치를 발취하였고, 치아 발취 시 치주인대 (peridontal ligament)는 손상되지 않도록 조심스럽게 발취하였다 (그림 1-57).
 - 발취한 하악의 좌, 우측 제1전구치에 오리부리의 뼈 유래 골대체재용 생체소재를 이식하였다 (그림 1-58).

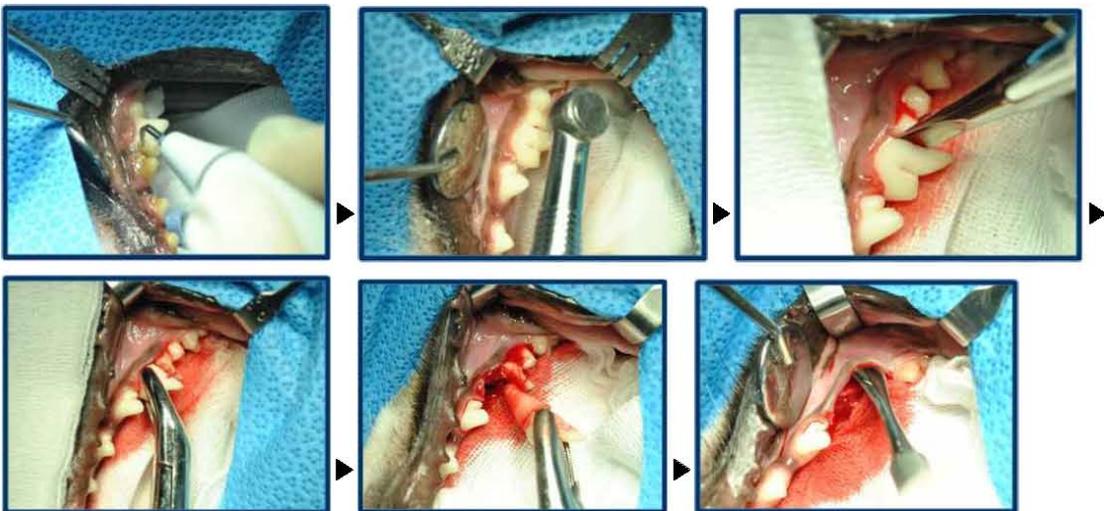


그림 1-57. 비글견에서 하악의 제1어금니를 발취하는 과정.



그림 1-58. 비글견의 하악 제1 전구치에 대조군(Bio-oss®, arrow)와 시험군(duck bone, arrow head)의 골이식재를 삽입한 후(A), 치조를 봉합한 사진 (B).

○ 방사선사진의 촬영

- 방사선 촬영장비 (BLD-150RK, LISTEM, 한국)를 이용하여 골대체재를 이식한 후 촬영 조건은 Kvp가 50이고, mAs는 8이며 노출시간(exposure time)은 0.05초로 하였다.
- 방사선 사진은 bone density phantom으로 sternal recumbency 자세에서 이식하기 전과 이식 후 촬영하여 골유합의 판단하였다.

○ Micro-computed tomography (Micro-CT 검사)

- 단순 방사선 사진에서는 골소주 (bone volume, BV)의 양과 골밀도 (Bone mineral density), 골체적비 (percent bone volume, bone volume/total volume, BV/TV) 등을 정확하게 알 수가 없기 때문에 micro-CT를 수술하기 전과 수술 후 4주 간격으로 Skyscan Desktop Micro-CT 1172 (Aartselaar, Belgium)를 이용하여 100 kV, 100 μ A, 해상도 26.7 μ m의 조건으로 촬영하였다.
- 골시편들은 포르말린 용액에 침지한 상태로 보관 유지하였다.
- 촬영을 통하여 3D 영상을 얻고, 결손후 이식부에 생성된 골소주의 양 (BV), 골밀도 (BMD) 및 골체적비 (BV/TV) 등의 8개 골질평가 항목에 대한 parameter를 CT-analyser 프로그램 (Skyscan CT-analyser software, Belgium)을 이용하여 산출하였다.
- CT 영상은 single-slice spiral CT (Hi Speed CT/e, GE Medical Co., USA)를 이용하여 120 kvP와 150 mA의 조건에서 1 mm 두께로 골 대체재를 이식하기 전과 이식 후 2주 간격으로 촬영하였다.

○ 병리조직학적 검사

- 골 대체재를 이식한 부위에 신생골 형성과 미네랄화를 판정하기 위하여 비글견을 안락사하기 4주전에 oxytetracycline HCl (25 mg/kg)를 정맥으로 투여하였고, 2주전에

calcein (Sigma-Aldrich Co, USA, 10 mg/kg)을 정맥으로 투여하였으며 안락사하기 3일전에 alizarin red S (Sigma-Aldrich Co., USA, 30 mg/kg)을 복강으로 투여하였다.

- 안락사시킨 비글견에서 포르말린에 고정된 시편을 에타놀에 탈수를 시킨 후 침지시키고 Technovit 7200VLC를 이용하여 침윤하였다.
- 비탈회 절단과 연마절편을 만들기 위하여 Exakt 310 CP series (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Germany)를 이용하여 fluorescence microscopy로 관찰하기 위하여 50- μ m로 절편을 제작하였다.

○ 통계 분석

- 모든 검사항목의 결과치는 평균과 표준 편차를 구한 후 모든 자료들에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하며, 분산이 동질성을 갖는 경우 one-way analysis of variance(ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의차가 있는 시험군을 알아내기 위하여 Fisher's LSD test를 실시하였다.

○ 실험 결과

- 단순 방사선사진 촬영에 의한 골유합 평가
 - 비글견의 발치된 하악의 치조와에 Bio-Oss[®]를 투여한 대조군과 duck bone을 투여한 시험군의 방사선 사진상은 아래와 같다.
 - 골대체제를 이식한 직후에는 골이식재의 파립이 보였지만, 이식 12주후에는 치조와 같은 콘트라스트를 보였고 대조군과 시험군에서 큰 차이는 없었다.
 - 본 실험의 결과에서 골대체제를 이식한 12주 후의 방사선 사진상에서 처럼 대조군과 시험군은 거의 같은 방사선 콘트라스트를 보여 골유합의 정도는 거의 같은 양상을 보였다 (그림 1-59).

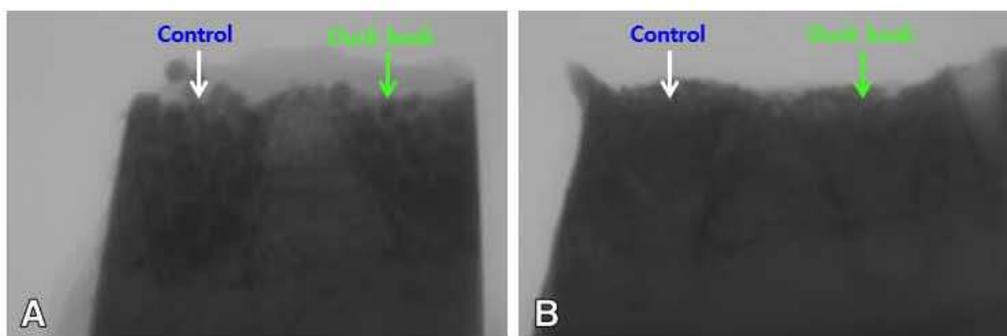


그림 1-59. 비글견에서 발치한 치조에 골대체재를 식립한 방사선 사진상. 발치한 직후에 골대체재를 식립(A)한 대조군(Bio-Oss[®])과 시험군(duck bone) 및 식립 12주 후에 촬영한 단순 방사선 사진 (B).

- Micro-CT 분석에서 골유합의 평가
 - 골대체재를 이식한 12 주 후의 골량의 분석 결과는 (표 1-6 와 1-7)와 같다.
 - 대조군과 시험군의 통계학적 유의차는 인정되지 않았다.
 - 골밀도와 골소주, 골체적비를 Micro-CT 사진상(그림 1-60)에서 관찰한 결과 대조군과 시험군간에 큰 차이가 없었다.

표 1-6. 골대체재를 이식한 12 주 후의 micro-CT 분석

Bone Volume Parameter	Control	Duck bone
Bone mineral density (g/cm ³)	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
Bone volume/total volume (%)	62.5 ± 9.2	61.6 ± 6.5
Bone surface/total volume (mm ⁻¹)	5.6 ± 1.2	4.8 ± 1.1
Bone surface/bone volume (mm ⁻¹)	9.4 ± 3.8	8.0 ± 2.3

Mean ± SD (n=5)

표 1-7. 골대체재를 이식한 12 주 후의 골소주의 양의 변화

Trabecular	Control	Duck bone
Thickness (mm)	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Number (mm ⁻¹)	1.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Space (mm)	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1

Mean ± SD (n=5)

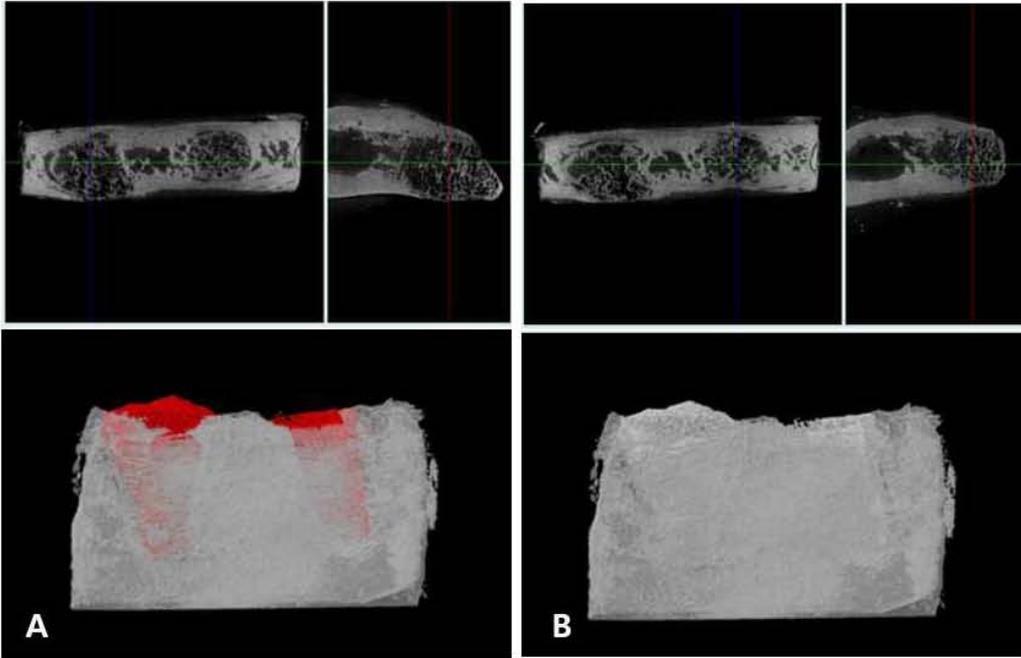


그림 1-60. 골대체재를 이식한 12 주후의 대조군(A, Bio-Oss[®])과 시험군(B, duck bone)의 micro-CT 사진.

- 병리조직학적 검사 소견

- Duck beak 유래 골대체재를 비글견의 하악의 치조에 이식한 12 주후의 병리조직학적 검사에서 치조내에 osteoblast (OB)와 blood vessel (BV)의 신생이 보였다 (그림 1-61).
- Confocal LASER microscope 에서 관찰한 결과 발치된 치조에서 신생골과 미네랄화는 비글견을 안락사하기 4 주전에 투여한 oxytetracycline 은 노란색 (그림 15A)으로 보였으며, 2 주전에 calcein 을 투여한 것은 초록색 (그림 1-62B)으로 나타났고 안락사하기 3 일전에 alizarin red 를 투여한 것은 빨간색 (그림 1-62C)으로 각각 나타났다.
- 제 1 차 연도에서 Duck bone 의 구조적 분석에서 보고한 바와 같이 골다공성(micro pore 및 meso pore)이 좋아서 치조에서 유합이 잘 되는 것으로 판단된다.

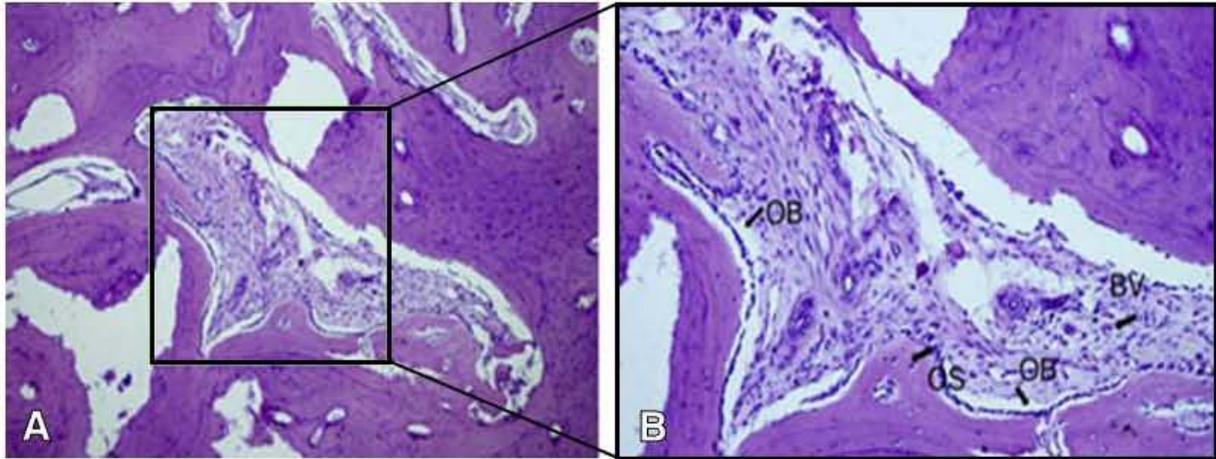


그림 1-61. 오리부리의 뼈(duck bone) 유래 골대체재를 이식한 부위의 조직사진.
(A)를 확대한 (B)에서 혈관 (BV)의 신생이 보임.

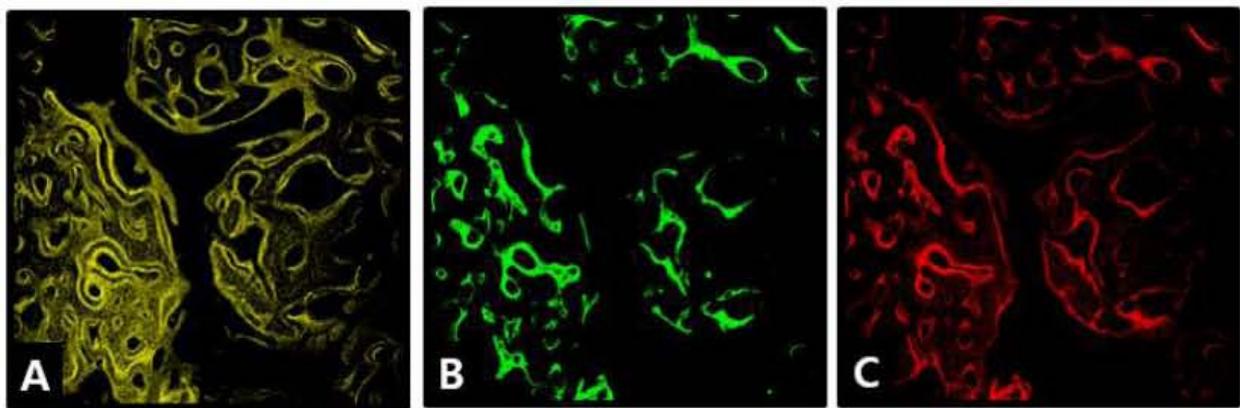


그림 1-62. 오리부리(duck bone)의 뼈 유래 골대체재를 이식한 부위의 Confocal LASER microscope 영상.

나. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 토끼 경골의 이식(implantation) 시험

- 시험규격

- 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격(식품의약품안전처 고시 제2014-115호)
- ISO 10993-10 (2010).

- 시험물질 및 재료

- 시료 : 시험군 (duck bone) 2 g, 대조군 (Geistlich Bio-Oss®) 2 g
- 멸균생리식염수 (중외제약(주), 한국)

- 면실유 (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)
- 항온 수조 (BS-11, JEIO TECH, Korea)
- 전자저울 (SW-02(CER002198), CAS Co., Ltd., China)



그림 1-63 토끼의 경골내에 이식을 위한 시료.

시험군: 400℃로 열처리된 오리부리 뼈 입자, 대조군: Bio-Oss (Geistlich, 스위스).

- 실험동물
 - 동물 : Rabbit (New Zealand White), 3 kg 이상, Female
 - 공급원 : 오리엔트 바이오
 - 환경적용 : 동물 구입 후 7일간 실험환경에 적응시킨 후 동물실험에 품시함
- 동물실의 환경
 - 환경조건 : 온도 22±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간, 조도 200-300 Lux
 - 사육 케이지 : 스테인레스 케이지(590×460×360 mm)에서 1마리씩 사육
 - 사료 : 토끼 전용사료 (퓨리나사료)를 자유 급식시킴
 - 물 : 음용수를 자유로이 섭취시킴
- 시험 및 재료
 - 렘폰 주사액 (바이엘코리아주식회사, 한국)

- 황산아트로핀 (대원제약, 한국)
 - 졸레틸혼합액 (Virbac Lab, 주식회사 버박코리아)
 - 리도카인 (광명약품, 한국)
 - 포비돈 요오드 용액 (주) 그린제약, 한국)
 - Gentamicin (대성미생물연구소, 한국)
 - Animal clipper (GOLDEN A5, Oster, USA)
 - Black Silk 3-0 (주)아이리, 한국)
- 시험장비
 - Implant engine X-cube (X-CUBE, SAESHIN PRECISION CO., LTD., Korea)
 - 수동저울 : 04-5764, Seoul Measuring, Korea)
 - 200312100, 효성정밀계기, Korea)
 - 현미경 (BX-51T, Olympus, Japan)
- 토끼의 경골내에 duck bone의 이식
 - 진통과 진정 효과와 근육이완 효과를 얻기 위하여 럽폰을 주사.
 - 거담제로 황산아트로핀을 주사한 5분 후 Zoretill[®] 혼합액을 주사하여 전신마취를 유지.
 - 전처치가 끝난 후 수술부위인 좌우측 경골부 내측 부위를 제모한 후 수술대로 옮김.
 - 수술 부위에 리도카인을 무릎 관절의 경골 골간단에 주사하여 국소마취와 함께 지혈작용이 나타나게 함.
 - 피부를 포비돈 요오드 액으로 깨끗하게 닦음.
 - 경골 골간단의 전내측에 절개를 한 후 피부와 근육, 근막, 골막을 거상하여 이식될 경골을 노출함.
 - 토끼의 좌우측 경골에 골이식재 분말을 담은 폴리에틸렌 튜브를 각각 2개씩 식립함 (실험군 12개, 대조군 12개). 이 때 모든 수술 과정에서 충분한 생리식염수를 점적하여 순차적인 크기의 드릴을 저속으로 사용하면서 드릴링한 후 식립함 (그림 1-64).
 - 골막과 피부를 흡수성 봉합사와 블랙 실크로 봉합하였고, 봉합한 후 감염 방지를 위해 항생제 gentamicin 1 cc를 근육에 주사함.
 - 수술 후 감염방지를 위해 3일간 항생제를 동일한 방법으로 주사.
 - 8주 이식 후 토끼를 안락사하여 시료를 채취함

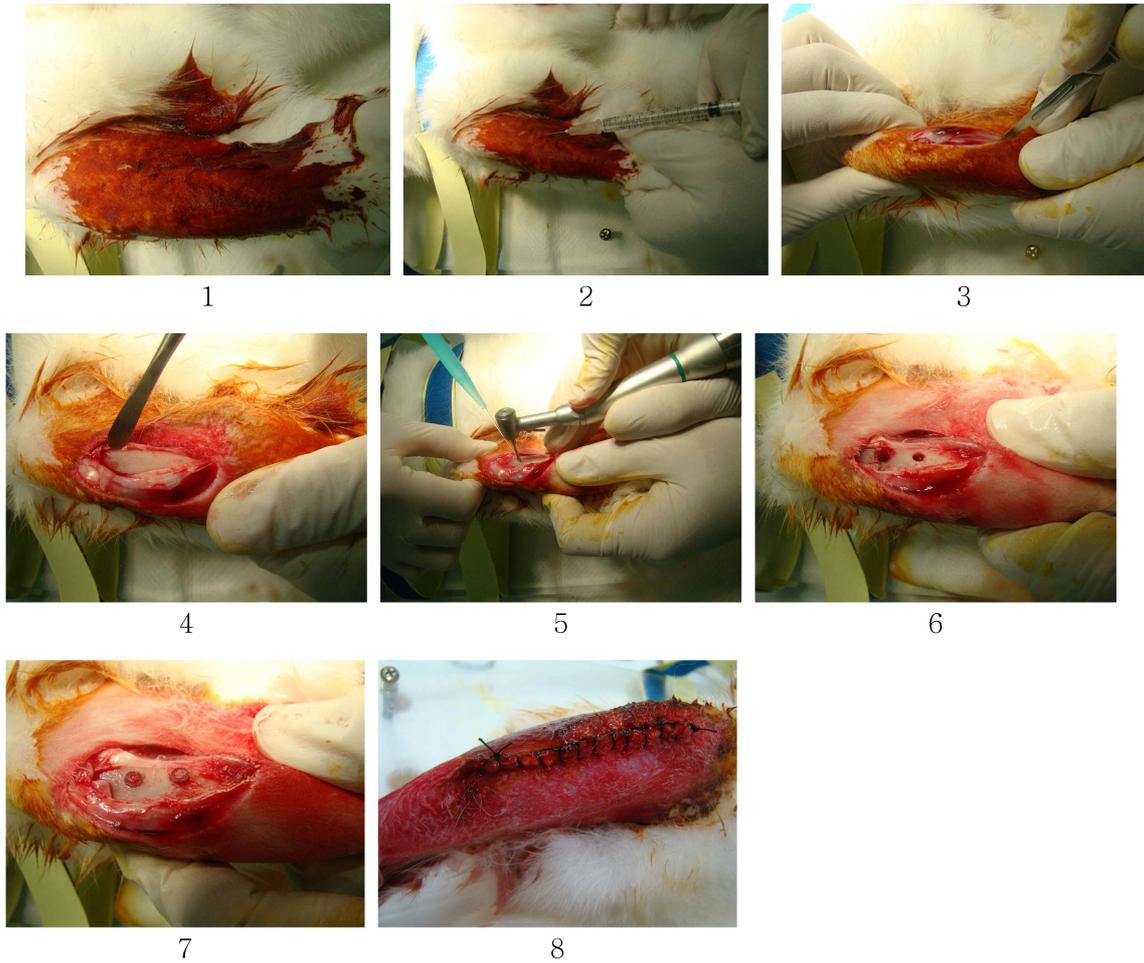


그림 1-64. Duck bone을 토끼의 경골내에 이식하는 과정

- 실험방법

- 육안적 관찰

: 토끼의 경골내 duck bone을 이식한 8주 후에 염증반응 또는 기타 조직 이상을 평가.

- 조직학적 분석

1) 비탈회조직의 조직학적 평가

- (1) 골이식재를 포함하여 골조직을 절취하여 10% 중성 포르말린에서 2-3일간 고정하고, Villanueva 용액으로 4일간 염색함.
- (2) 알코올로 탈수시킨 다음, 프로필렌옥사이드로 치환하여 에폭시 레진으로 포매하여 조직블록을 제작.
- (3) 제작된 레진 포매 조직블록을 경조직 절단기로 500 μm 전후의 두께로 절단한 다음, 연마기로 40 μm 전후의 두께로 섬세하게 연마하여 비탈회 조직표본을 제작함.
- (4) 제작된 비탈회 조직표본을 광학현미경으로 관찰하여 조직학적 소견을 현미경에 부착된 디지털 카메라로 촬영.

2) 탈회조직 표본의 조직학적 평가

- (1) 골이식재를 포함한 골조직을 절취한 조직을 10% 중성 포르말린에 2-3일 동안 고정하고, formic acid로 2주간 충분히 탈회함.
- (2) 골이식체가 포함된 골조직을 통법에 따라 계열 알코올로 탈수 시킨 다음, 파라핀에 포매함.
- (3) 제작된 파라핀 포매 블록을 박절기로 5 μ m 두께의 박절편을 만든 다음 H & E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였고, 조직학적 소견은 현미경에 부착된 디지털 카메라로 촬영한 후 평가기준표에 준하여 평가를 실시하였음.

표 1-6. 토끼의 경골내에 이식한 8주 후의 이식 시료의 육안적 관찰 결과

동물번호	검체번호		육안적 관찰 결과	
			염증반응	조직반응
No. 1	EXP	(1)	No	No
		(2)	No	No
	CON	(3)	No	No
		(4)	No	No
No. 2	EXP	(5)	No	No
		(6)	No	No
	CON	(7)	No	No
		(8)	No	No
No. 3	EXP	(9)	No	No
		(10)	No	No
	CON	(11)	No	No
		(12)	No	No
No. 4	EXP	(13)	No	No
		(14)	No	No
	CON	(15)	No	No
		(16)	No	No
No. 5	EXP	(17)	No	No
		(18)	No	No
	CON	(19)	No	No
		(20)	No	No
No. 6	EXP	(21)	No	No
		(22)	No	No
	CON	(23)	No	No
		(24)	No	No

표 1-7. 비탈회 조직표본의 병리조직학적 평가 결과

평가항목	Duck bone						Control					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Polymorphonuclear cells	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
Lymphocytes	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2
Plasma cells	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
Macrophages	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Giant cells	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUB-TOTAL (×2)	6	8	6	4	6	8	2	4	8	4	2	6
Neovascularisation	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fibrosis	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fatty infiltrate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUB-TOTAL	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
TOTAL	9	11	9	7	9	11	5	7	11	7	5	9
합계	56						44					
평균	9.33						7.33					
양성 대조군	2.0											

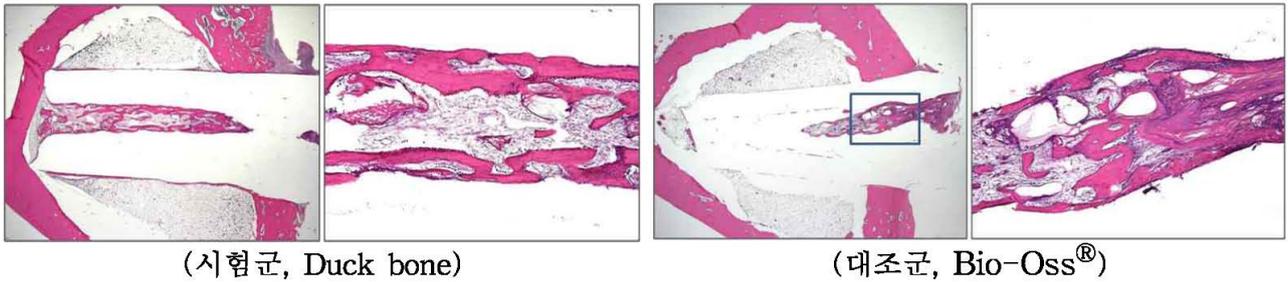


그림 1-65. 탈회법으로 제작된 병리조직 표본. H&E 염색.



그림 1-66. 비탈회법으로 제작된 병리조직 표본. H & E 염색.

- 실험 결과

- 육안관찰

- : 경골내 이식 8주 후에 염증반응 또는 기타 조직 이상을 평가한 결과 시험군 및 대조군 모두가 이상소견이 관찰되지 않았음.

- 조직병리학적 검사 결과

- 이식 8주 후에 시험군 및 대조군 다수의 골대체재 입자에서 염증세포의 침윤이 미약한 섬유성 결합조직으로 둘러싸여 있었으며 일부 골대체재 입자 주위로 미량의 신생골 형성이 관찰되었음
 - 평가 점수에서 시험군이 평균 9.33이고, 대조군이 평균 7.33로 나타났으며, 그 차이가 2.0으로 비자극성의 범위내 (0.0 - 2.9)에 포함되는 것으로 판단되었음.
 - 이상의 실험결과를 요약하면 400℃로 열처리된 오리부리의 뼈 입자는 동물의 근육내 안전성시험에서 문제가 없었으며 소 뼈 입자와 유사한 생체이식 결과를 나타내었음. 즉, 제품개발 시 식품의약품안전처의 의료용품 인허가에는 문제가 없을 것으로 사료됨.

다. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 생체안전성 골재생능의 평가

- 실험동물

- SD Rat, 오리엔트바이오(부산광역시 사상구 모라동 795-13)
 - 암컷, 7주령 이상, 20마리
 - 동물구입 후 7일간 실험동물 환경에 적응한 후 건강한 동물을 시험에 사용함

- 동물실험실의 환경

- 환경조건 : 온도 22±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간, 조도 200-300 Lux
 - 사료 : 마우스전용 사료를 자유 급식함
 - 물 : 음용수는 자유롭게 섭취하도록 함

- Duck beak의 골재생능을 평가하기 위해 랫드 두개골에 8 mm의 임계 골결손 모델을 유발하여 (그림 1-67) 시료 이식 후 4주 및 8주에 시료를 채취하여 micro-CT를 분석하였음.

- 이때 micro-CT는 Skyscan (Skyscan 1172, Aartselaar, Belgium)를 사용하여 48 kVp source voltage, 201 μ A source current, 8.77 μ m spatial resolution로 측정하였으며, NRecon software를 이용하여 3D 이미지를 얻었음.

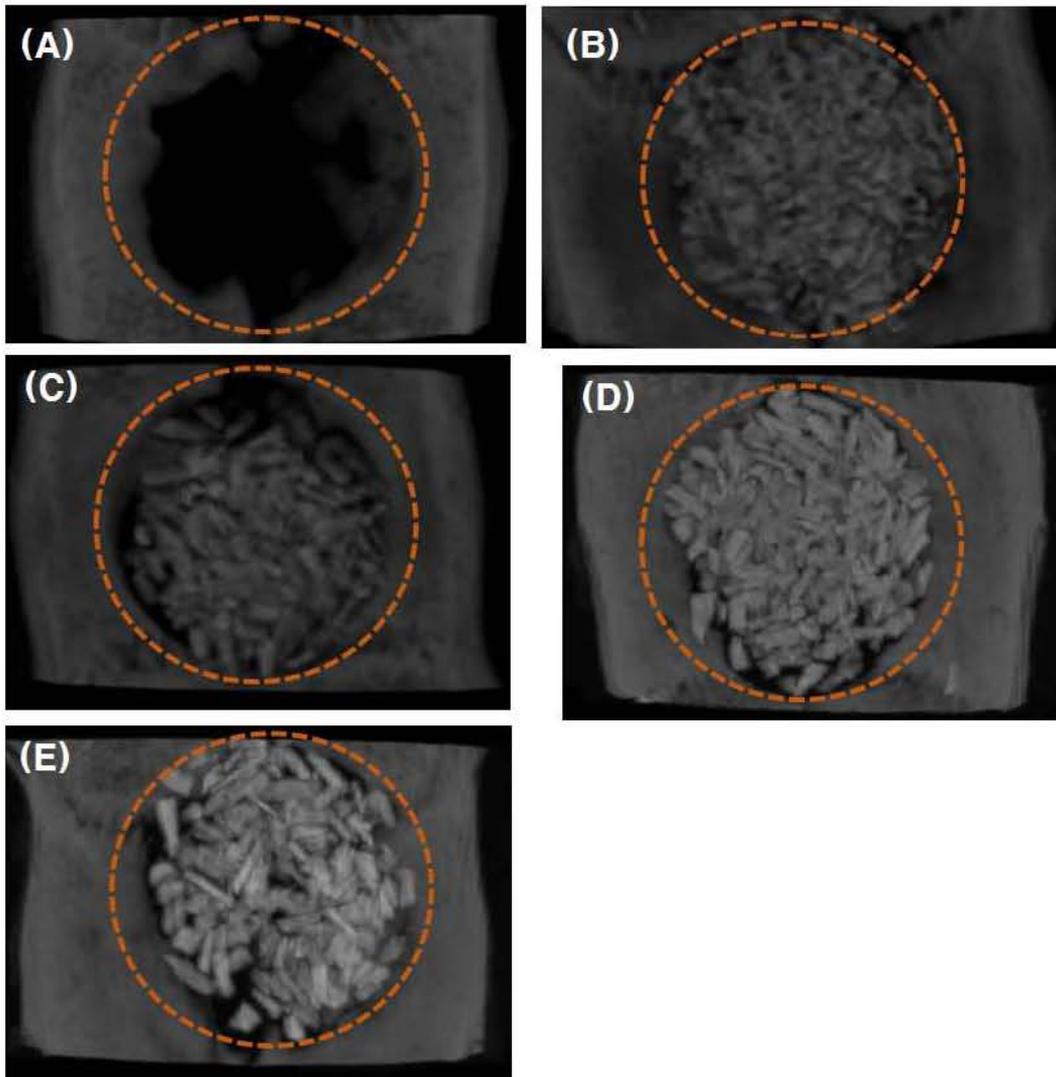


그림 1-67. 골대체재를 이식한 4주 후의 랫드 두개골의 micro-CT 사진
(A, 대조군; B, 제1군; C, 제2군; D, 제3군; E, 제4군).

- 4주 이식 후에 두개골의 입계 골결손 부위의 3D 이미지에서 대조군의 경우 결손부위에 신생골이 생성되지 않은 것을 관찰하였고, 모든 시험군의 경우 시료의 이식이 잘 진행되어 골결손부의 중앙부에 시료가 잘 채워져 있으며 골 결손부 가장자리 또한 이식된 입자들이 탈락되지 않은 것을 관찰함.
- 제1군인 소 뼈 입자의 경우 골결손 부위의 가장자리에서 신생골이 형성되고 있는 것을 관찰하였고, 오리부리 뼈 입자인 제3군과 제4군 또한 소 뼈 입자와 유사한 경향을 나타내었음. 그러나 제2군의 경우 이식부위 가장자리에 시료가 많이 탈리되어 호스트 본(host bone)과의 빈공간이 형성된 것을 관찰함.

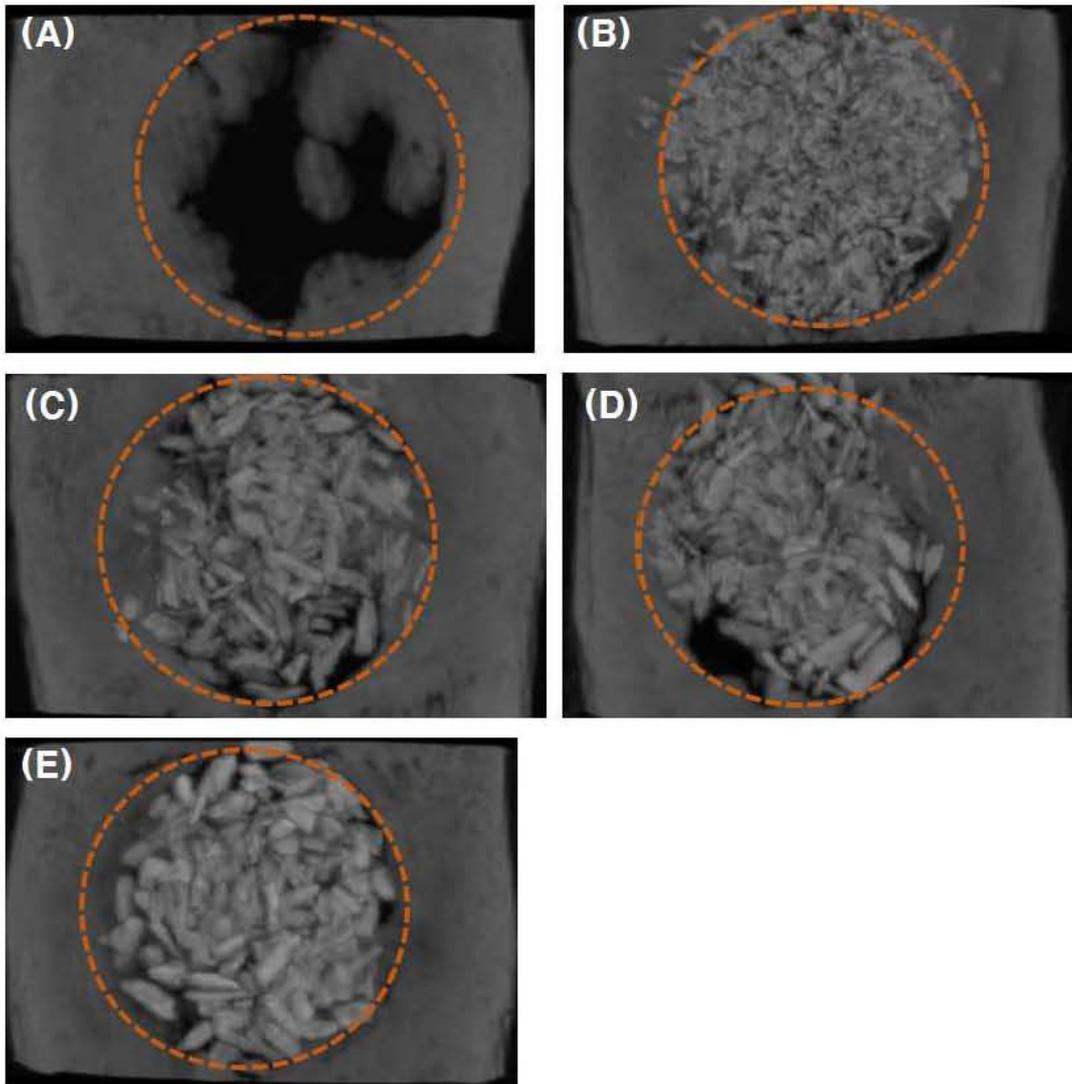


그림 1-68. 이식 8주 후의 랫드 두개골의 결손부위의 3D 이미지
(A, 대조군; B, 제1군; C, 제2군; D, 제3군; E, 제4군).

- 이식 8주 후의 대조군에서 결손부위에 신생골이 모두 형성되지 않는 것을 관찰함으로써 임계 골 결손 모델임을 확인하였고, 제1군인 소 뼈 입자와 같이 모든 오리부리 뼈 입자에서 결손부위 가장 자리로부터 신생골이 형성되고 있는 현상을 관찰하였음. 특히, micro-CT 이미지로는 120℃로 열처리한 제2군이 다소 우수해 보이는 결과를 보였음.

표 1-8. 랫드에서 duck bone을 이식한 후의 골 부피의 변화

실험군	이식 4주 후	이식 8주 후
대조군 (control)	10.78 ± 4.84	16.22 ± 6.63
제1군 (duck bone)	35.08 ± 6.63**	33.13 ± 1.41**
제2군 (duck bone)	30.67 ± 2.82**	35.70 ± 3.76**
제3군 (duck bone)	31.32 ± 3.00**	33.99 ± 4.17**
제4군 (duck bone)	31.92 ± 2.73**	28.15 ± 5.45*

Values are expressed in mean ± S.D. (n=5).

* $p < 0.05$ as compared with the control group.

** $p < 0.01$ as compared with the control group.

- Micro-CT로 분석한 이식 실험군의 골부피를 (표 1-8)에 나타난 바와 같이 아무것도 이식하지 않은 대조군은 가장자리로부터 중앙부위로 신생골이 형성되고 있지만 중앙부분은 골 형성이 이루어지지 않아 이식 8주에서 16%의 골 부피를 나타내었음.
- 소 뼈의 입자인 제2군은 이식 4주후에서 35%의 골 부피를 나타내었고 오리부리 뼈 입자 시험군은 약 30-32%의 골 부피를 나타내었음. 이식 4주후에서는 오리부리 뼈 시험군이 소 뼈 입자 대비 약간 낮은 골 부피를 보였으나 오차 범위 내에서 유사한 경향을 나타내었음.
- 이식 8주후에서 제1군인 소 뼈 입자는 33%의 골 부피를 보였으며 오리부리 뼈 실험군은 28-35%의 골 부피를 보였음. 특히 120와 400℃로 열처리한 제2군과 제3군이 소 뼈 대비 약간 높거나 유사한 골 부피를 보였으나 오차 범위에서 큰 차이 나타나지 않았음.
- 그러나 1,200℃에서 열처리한 제4군 오리부리 뼈 입자의 경우 골 부피가 28%로 다른 실험군 대비 다소 낮은 골 부피를 보였음.
- Micro-CT로 분석한 소 뼈 및 오리부리 뼈 입자를 이식한 실험군의 골 부피는 1,200℃에서 열처리한 제4군을 제외하고 이식 4주와 이식 8주에서 통계적으로 유의한 차이가 나지 않는 것으로 분석되었음.
- 이식 시간별 시험군의 골소주 두께, 골소주 수 및 골소주 간격을 Micro-CT로 분석하여 그 결과를 표에 나타내었음.
- 이식한 4주 후에서 소 뼈 입자인 제1군의 골소주 두께, 골소주 수 및 골소주 간격이 각각 0.163

mm, 2.157 1/mm, 0.34 mm로 나타났으며, 오리부리 뼈 입자 실험군은 1,200℃에서 열처리 한 제4군을 제외하고는 골소주 두께 및 골소주 수에서 통계적 오차 범위를 벗어나지 않았고, 골소주 간격에서 소뼈 대비 통계적 유의차가 있는 것으로 나타났음 (표 1-9).

- 그러나 이식 8주에서는 control을 제외하고는 소 뼈 입자 및 오리부리 뼈 입자 실험군 모두 골소주 두께, 골소주 수 및 골소주 간격이 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음 (표 18).
- 이상의 Micor-CT 분석결과, 오리부리 뼈로 제조된 골대체재는 소 뼈와 유사한 골재생 특성이 나타남을 확인하였고, 특히 120℃ 및 400℃의 낮은 온도에서 열처리한 제2군과 제3군의 오리부리 뼈 입자가 전체적으로 보다 우수한 골재생 특성을 나타내었음.
- 따라서 오리부리의 뼈 유래 골대체재를 제조할 경우 낮은 온도에서 열처리하는 것이 골재생에 보다 바람직하다는 것을 알 수 있었음.

표 1-9. 이식 4주후의 골소주의 두께, 골소주 수 및 골소주 간격

실험군	Tb.Th (mm)	Tb.N (1/mm)	Tb.Sp (mm)
대조군 (control)	0.172 ± 0.010 ^a	0.630 ± 0.285	0.547 ± 0.070
제1군(duck bone)	0.163 ± 0.006 ^a	2.157 ± 0.410 ^{**}	0.340 ± 0.100 [*]
제2군(duck bone)	0.177 ± 0.009 ^a	1.566 ± 0.316 ^{**}	0.426 ± 0.072
제3군(duck bone)	0.168 ± 0.003 ^a	1.870 ± 0.176 ^{**}	0.403 ± 0.096
제4군(duck bone)	0.135 ± 0.016	2.371 ± 0.715 ^{**b}	0.331 ± 0.020 [*]

Values are expressed in mean±S.D. (n=5).

^{*}*p* < 0.05 as compared with the control group.

^{**}*p* < 0.01 as compared with the control group.

^a*p* < 0.01 as compared with the 1,200 group (제4군).

^b*p* < 0.05 as compared with the 120 group (제2군).

Tb.Th: trabecular thickness; Tb.N: trabecular number; Tb.Sp: trabecular separation.

표 1-10. 이식 8주후의 골소주의 두께, 골소주 수 및 골소주 간격

실험군	Tb.Th (mm)	Tb.N (1/mm)	Tb.Sp (mm)
대조군 (control)	0.229 ± 0.021	0.736 ± 0.285	0.742 ± 0.128
제1군 (duck bone)	0.163 ± 0.014**	2.038 ± 0.162**	0.380 ± 0.038**
제2군 (duck bone)	0.167 ± 0.011**	2.205 ± 0.187**	0.297 ± 0.030**
제3군 (duck bone)	0.171 ± 0.007**	1.985 ± 0.180**	0.370 ± 0.015**
제4군(duck bone)	0.152 ± 0.008**	1.860 ± 0.401**	0.438 ± 0.071**

Values are expressed in mean±S.D. (n=5).

** $p < 0.01$ as compared with the control group.

Tb.Th: trabecular thickness; Tb.N: trabecular number;

Tb.Sp: trabecular separation.

4. 오리부리의 뼈 유래 생체소재의 유효성 및 안전성 평가

가. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 인체 면역세포에 대한 면역반응 검사

(1) 사람 말초혈액 면역세포(PBMC)의 분리 및 오리부리의 뼈 처리

- 건강한 사람의 혈액을 Na-Heparin이 들어있는 vacutainer를 사용하여 채혈하였다. 혈액은 동량의 histopaque-1077(Sigma)에 layering하고 400xg에서 30분간 원심 분리한 후 중간의 opaque interface에 있는 peripheral blood mononuclear cells (PBMC)을 채취하였다.
- Isotonic phosphate buffered saline으로 2회 이상 세척한 후 10% 혈청이 들어있는 RPMI에 재부유시켰다(2×10^6 /ml).
- 그 후 오리부리 골이식재를 혈청이 첨가되지 않은 RPMI 배지에 현탁한 후 40 μ m pore size의 cell strainer를 통과시켰다.
- 오리 부리의 뼈 유래 골이식재 현탁액의 단백질 농도는 bradford assay로 측정하였으며, 오리부리의 골이식재 뼈 현탁액을 일정 농도로 PBMC가 들어있는 culture plate에 첨가하였다.

(2) 사람 말초혈액 면역 세포의 증식

- PBMC의 증식 정도는 5,6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE, eBioscience) 희석법으로 측정하였다.

- PBMC의 단일세포부유액을 PBS로 두 차례 세척한 후 $5-10 \times 10^6$ 농도의 세포수가 되도록 가온한 PBS로 재부유시킨 후, 5 mM CFSE 0.2 μ l를 세포 부유액에 첨가함.
- 30분 뒤 상온의 암실에서 냉각된 완전배지를 부유액의 4-5배 용적으로 첨가하여 labeling을 중단시키고, 세포를 얼음 위에서 5분간 배양함. CFSE로 표지한 PBMC를 완전배지로 세 차례 세척하고 48시간 동안 오리부리 골이식재 현탁액을 처리함.
- 양성 대조군으로는 PHA (5 μ g/ml)를 사용함. 세포를 수확하여 PBS로 두 차례 세척한 후 Propidium iodide를 세포 부유액에 첨가하여 세포를 accuri flow cytometer (BD)로 최소 100,000개를 분석함.

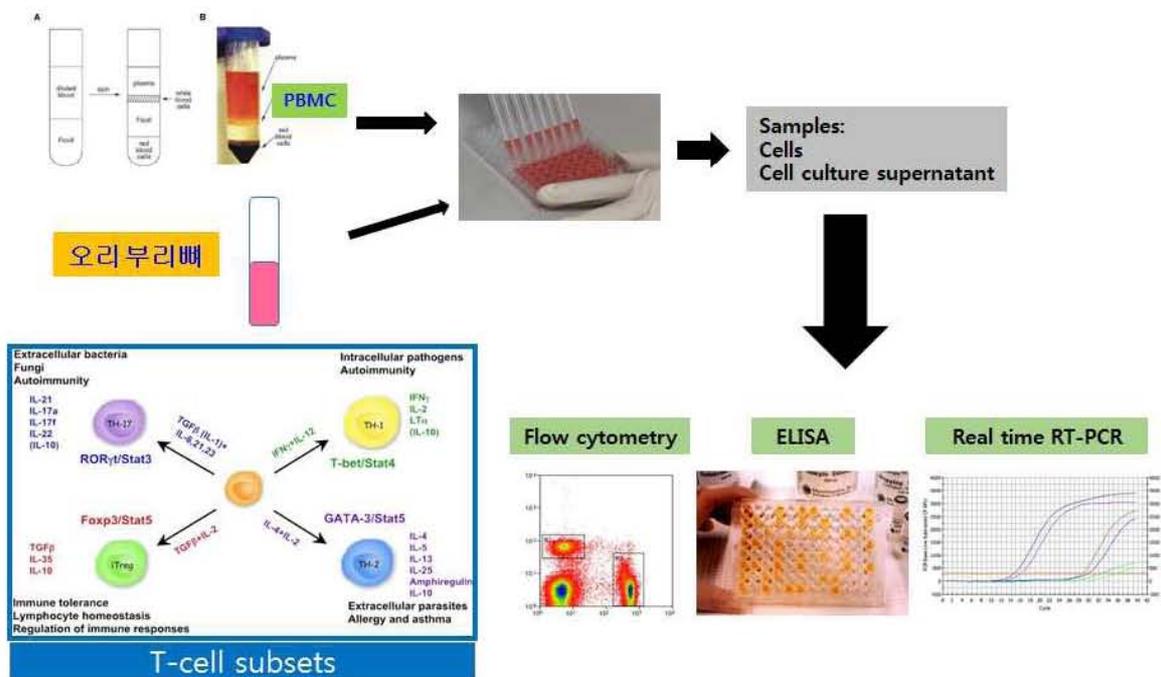


그림 1-69. 인체 면역세포에 대한 오리부리의 뼈를 이용한 골대체제용 생체소재의 면역반응 검사 모식도

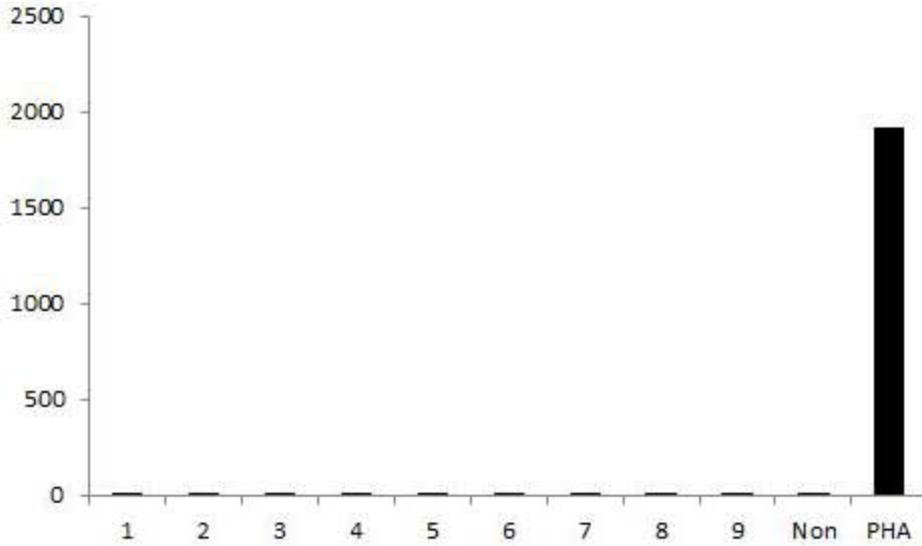


그림 1-70. 오리부리 껍에 의한 활성화 48시간 후 사람의 말초혈액 단핵구세포에 의해 생성된 TNF- α 농도.

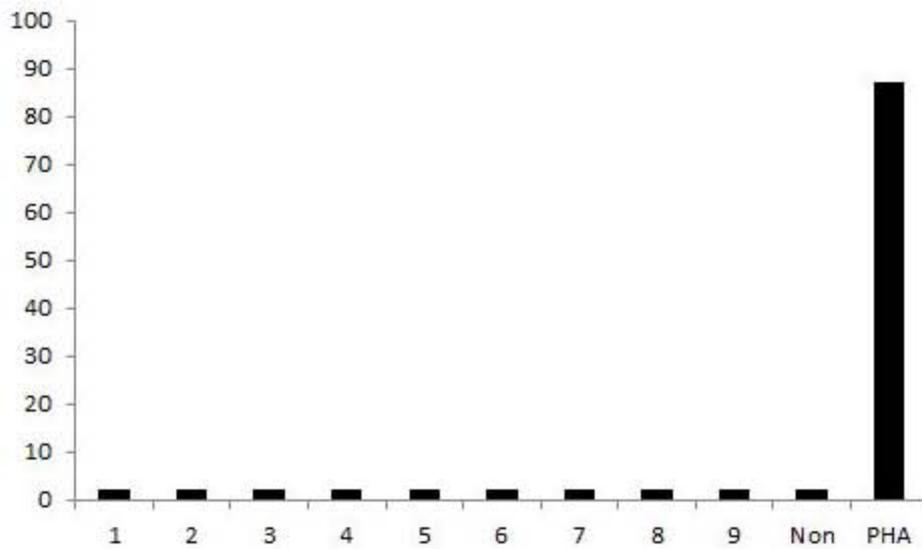


그림 1-71. 오리 껍에 의한 활성화 48시간 후 사람 말초혈액단핵구 세포에 의해 생성된 IL-1 β 농도(n=5).

(3) 연구의 결과

- 오리부리의 껍의 추출물로 사람 말초혈액단핵구 세포 활성화 시, TNF- α 와 IL-1 β 과 같은 면역 사이토카인의 농도는 측정되지 않을 정도로 낮았음.
- 오리부리 껍에 의해 활성화된 사람의 말초혈액 단핵구 세포로부터 얻은 상층액에서는 사이토카인이 거의 없거나 전혀 없었음(<1 pg/ml) (사이토카인 농도는 pg/ml로

나타냄).

나. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 세포독성 평가

(1) 시료의 검액준비

- 골이식재를 micro tube or 15 ml tube에 0.2 g/ml 의 농도로 FBS 10 %가 포함된 media에 넣고 37 ℃ incubator or water bath에서 24 h 동안 용출함.
- 용출 후 에는 tube를 spin down 시켜 골이식재와 상층액을 완전히 분리시킨 후 상층액을 검액으로 사용함.

(2) CCK-8 분석

- 96 well에 cell을 seeding 한 후 24 h 동안 incubator에서 배양함. 그리고 시료 하나당 3 well 이상으로 검액을 well 당 100 ul씩 처리함.
- 검액을 처리한 세포를 24 h 동안 incubator에서 배양한 후 CCK reagent를 10 ul씩 각 well에 처리하고 2시간 동안 incubator에서 반응 후 plate reader기를 사용해 450 nm에서 측정함.

(3) 연구 결과

- 아무 처리도 하지않은 대조군과 비교시에도 오리부리의 뼈를 이용한 골이식재의 세포 독성은 거의 나타나지 않은 것으로 관찰됨.

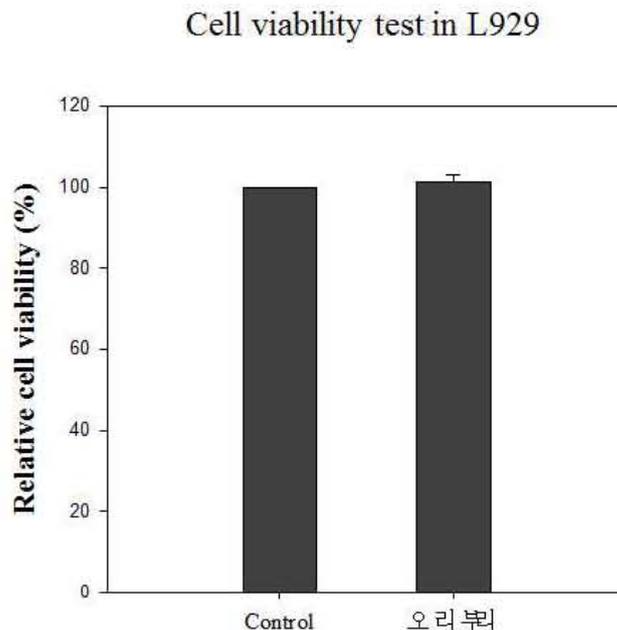


그림 1-72. L929 세포에서 오리부리의 뼈를 이용한 골이식재의 세포독성.

다. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 인간유래 지방줄기 세포와의 친화성 평가

(1) 목적

- 오리부리의 뼈 유래 골대체재용 생체소재의 제조 공정에 따른 세포의 친화성을 비교 및 분석하고자 하였다.
- *In vitro* 실험에서 인간 지방유래 줄기세포를 이용하여 오리부리의 뼈 유래 생체소재의 친화성을 확인하기 위해 생체소재의 증식능을 확인하고 형광현미경 촬영과 골 분화 배지에서의 alkaline phosphatase 활성도를 확인하였다.

(2) 실험군 분류

- 실험군은 오리부리의 뼈 유래 생체소재의 화학약품 처리와 비처리, 고온처리와 저온 처리에 따라 실험군을 아래와 같이 분류하였다 (그림 1-73).
- ① 제1 실험군 : 화학약품처리 후 400°C에서 20시간 처리
- ② 제2 실험군 : 화학약품처리 후 1200°C에서 3시간 처리
- ③ 제3 실험군 : 과산화수소(H₂O₂) 처리 후 400°C에서 20시간 처리

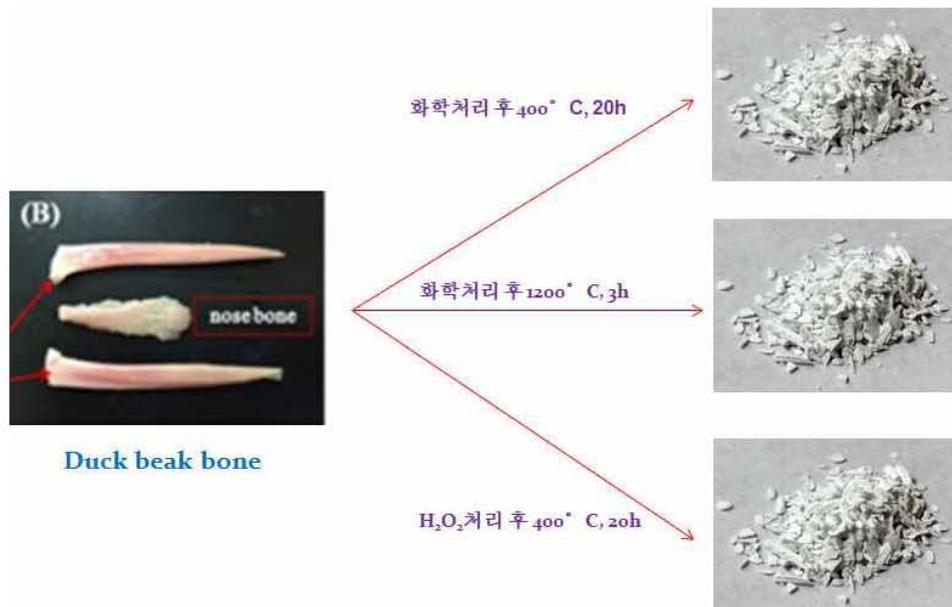


그림 1-73. 오리부리의 뼈 유래 생체소재의 제조공정에 따른 분류

(3) 오리부리의 뼈 유래 생체소재의 준비 및 세포배양

- 공정 처리별로 오리부리의 뼈 유래 생체소재를 50 μ l씩 24 well plate에 분주한 뒤 오리부리의 뼈 유래 생체소재 속까지 침투하여 멸균이 될 수 있도록 70% alcohol을 500 μ l를 넣고 30분간 침지 시켰다.
- 30분 후 alcohol을 제거하고 남은 alcohol을 제거하기 위하여 PBS를 이용해 5분씩 3번 세척하였다.
- 세척한 PBS는 Basal media (10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin을 포함한 α -modified Eagle medium)에 하룻밤동안 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 침지하여 In vitro 실험을 위한 준비하였다.
- 하룻밤동안 Basal media에 침지한 오리부리입자에 여섯 번째 계대배양상태의 human adipose-derived mesenchymal stem cell을 10⁴ cells/well 씩 카운팅하여 분주하였다.
- 배지는 3일 간격으로 교체해 주었다.

(4) 배지조성

- Control media (CM; basal media) : 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, U.S.), 100 units/mL penicillin 및 100 μ g/mL streptomycin (Gibco, USA)을 포함한 α -modified Eagle medium (α -MEM; Gibco, USA) 배지를 사용하였다.
- Osteogenic media (OM) : control media에 0.1 mmol/L dexamethasone, 10 mmol/L β -glycerolphosphate, 50 mmol/L ascorbate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 함유한 배지를 사용하였다.

(5) 세포 증식능

- 세포의 증식능은 cell counting kit (CCK)-8 (Dojindo, Cat. No. CK04-11)를 이용하여 측정하였다.
- Control media에서 배양한 24 well plates를 1, 3, 5, 7일 째에 배지를 제거하고 PBS를 이용하여 부드럽게 2회 세척한 후 CCK-8 용액 20 μ l와 배지 200 μ l를 첨가하였다.
- 빛을 최대한 차단한 상태에서 CCK-8 용액을 첨가한 후 24 well plate를 호일로 감싸 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 두 시간 동안 배양하였다.
- 2시간 후 plate의 각 well에서 100 μ l 씩 96 well에 옮겨 450nm 에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.
- 1일과 3일, 5일, 7일째 오리부리 입자에 부착된 세포의 수를 평가하였다. (그림 1-74)에서 확인한 결과 제2실험군의 오리부리입자에서 부착되어 증식하는 세포의 수가 다른 두 그룹에 비하여 월등하게 높은 것을 확인할 수 있었다.

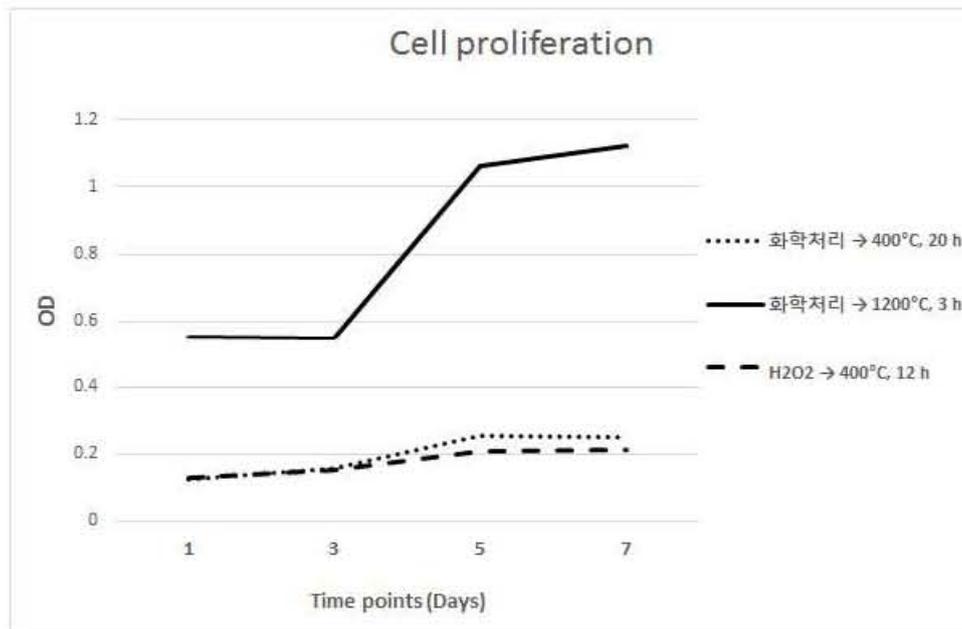


그림 1-74. 오리부리입자에서의 인간유래 지방줄기세포 증식능.

(6) 형광현미경 검사

- 형광현미경 촬영을 위해서 24 well plate의 오리부리의 뼈 유래 생체소재를 control media와 osteogenic media에서 각각 배양하여 비교 촬영하였다.
- 각각의 제조 공정별로 오리부리의 뼈 유래 생체소재들 세포배양 3주 후 형광현미경을 이용하여 촬영하였다.
- 3주 후 배지를 제거하고 PBS로 부드럽게 헹궈준 다음 세포를 고정하기에 적합한 고정액인 4% paraformaldehyde에 2시간 고정하였다. 고정액을 제거하고 PBS로 5분씩 2회 부드럽게 씻어낸 다음 세포투과성을 증가시켜 염색이 잘 되도록 1% Triton X-100을 5분간 처리해 주었다.
- 1% BSA는 비특이적으로 발생할 수 있는 결합을 차단시키기 위하여 30분간 처리해 준 후 actin 염색을 통해 세포질을 확인하기 위하여 phalloidin 염색을 30분간 실시한 후 PBS로 2회 헹궈주었다.
- 그 다음으로 핵을 염색하기 위하여 0.1ug/ml의 DAPI를 1분간 처리하고 PBS 세척 후 형광현미경으로 관찰하였다.
- 3주째에 오리부리 입자에 부착된 세포를 염색하여 형광현미경하에서 촬영하였다. control media에서 sample 2 그룹에서 가장 많은 부착세포가 관찰되었고, osteogenic media에서 다른 두 그룹에 비하여 부착된 세포의 수가 크게 증가하였다. 그 다음으로 sample 3 그룹이 두 배 정도 증가한 것을 알 수 있었다.

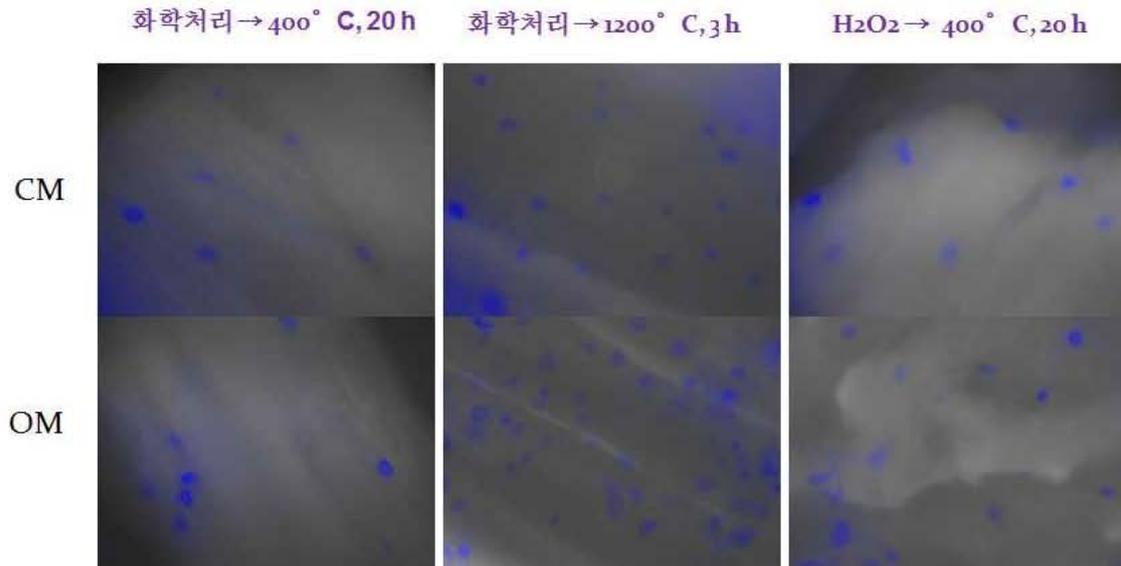


그림 1-75. 오리부리 입자에 부착된 지방유래 인간줄기세포의 형광현미경사진.
(x400, 3 weeks).

표 1-11. 형광현미경 사진에서 오리부리 입자에 부착된 지방유래 인간줄기세포의 세포 수

	400배 확대사진에서의 세포 수 (단위; cells, 평균 ± 표준편차)		
	화학처리 후 400 °C, 20 시간	화학처리 후 1200 °C, 3 시간	H ₂ O ₂ 처리 후 400 °C, 20 시간
CM	5.6 ± 1.1	21.0 ± 1.6	7.4 ± 1.1
OM	8.4 ± 1.1	69.8 ± 6.5	14.4 ± 2.3

(7) Alkaline phosphatase (ALP) assay

- Control media와 osteogenic media에서 오리부리베지와 세포가 배양된 24 well plate 를 7, 14, 21일 쯤에 alkaline phosphatase assay kit (AbCam, Cat. no. ab83369)을 이용하여 ALP activity를 측정하였다.
- ALP는 골분화의 대표적인 요소이며, p-nitrophenyl phosphate가 alkaline phosphatase에 의해 p-nitrophenol로 전환되면서 노란색상을 띄게 되며 alkaline phosphatase가 많을수록 노란색을 띠는 p-nitrophenol가 많아진다. 이를 흡광도로 측정하여 ALP activity

로 환산하는 방법이다. 405 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

- 증식능과 형광현미경 결과에서 확인한 바 화학처리 후 1200 °C, 3 hours에서 세포의 부착이 효율적이게 발생하였고 다른 두 그룹에서는 세포의 부착, 증식능이 미미하였으므로 제2 실험군에서만 ALP assay를 행하였다.
- 2주차부터 Osteogenic media에서 배양한 그룹이 control배지에서 배양한 그룹보다 더 높은 ALP activity를 나타내는 것을 확인하였다. Osteogenic media에서는 control배지에 배양된 경우와 비교하여 시간이 지남에 따라 ALP activity가 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 1-76).

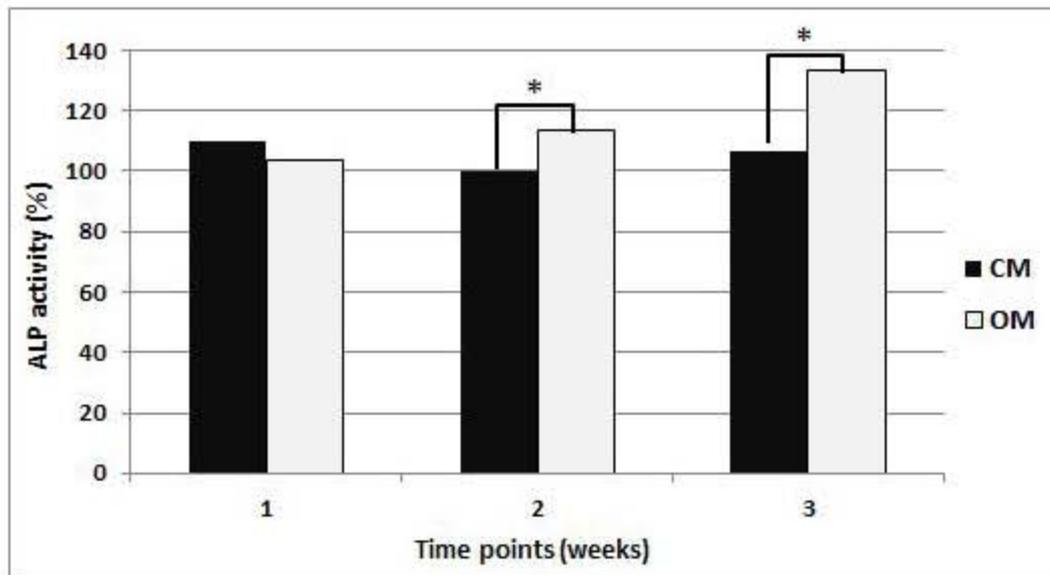


그림 1-76. Alkaline phosphatase assay
CM: control media, OM: osteogenic media

(8) 결과

- CCK-8 assay와 형광현미경 검사에서 1200°C에서 3시간의 제조공정을 거친 오리부리의 뼈 유래 생체소제가 가장 높은 세포 부착성과 증식능을 보였다.
- 형광현미경 검사에서 control media와 osteogenic media는 서로 뚜렷한 차이를 보였으며, osteogenic media가 세포의 친화성이 더 좋은 것으로 나타났다.
- 골분화 척도인 ALP 활성 검사에서도 osteogenic media에서 ALP 활성이 증가하였고,

오리부리의 뼈 유래 생체소재가 생체내의 골 결손 부위에 적용되면 주변 골 형성 인자들에 의해 조골 모세포의 친화성이 더 높아질 것으로 생각된다.

- 과산화수소를 처리한 그룹에서는 화학적 처리를 한 그룹보다 세포친화성이 높은 것으로 나왔지만, 그 차이는 1200℃와 400℃간의 차이보다는 적으며 1200℃로 가공하였을 경우 400℃ 보다 훨씬 더 높은 세포친화성을 가질 수 있음을 확인하였다.
- 이러한 결과는 오리부리의 뼈 유래 생체소재는 제조 공정에 따른 온도의 변화에 따라 뼈의 구성 비율이 달라지며, 1200℃에서 가장 훌륭한 골 형성능을 가질 수 있는 조건의 구성 비율인 HA : β -TCP = 7 : 3이라고 하였다 (Miculescu 등, 2012).

라. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 인간유래 치아줄기세포를 이용한 세포친화성 평가

(1) 세포 친화성 평가를 위한 골대체재의 준비 및 물리적 특성 평가

- 대조군으로 소 뼈로 제조된 Bio-OSS를 사용하였고, 1차 세포실험에는 2차년도에서 개발된 과산화수소 처리만으로 유기물을 제거한 오리부리 뼈 입자를 400℃ 및 1200℃로 열처리한 시료를 사용하였음 (그림 1-77).
- 2차 세포실험으로는 대조군으로 Bio-OSS와 1차년도에서 개발된 화학적 처리로 유기물을 제거한 오리부리 뼈 입자를 400℃ 및 1200℃로 열처리한 시료를 사용하였음.

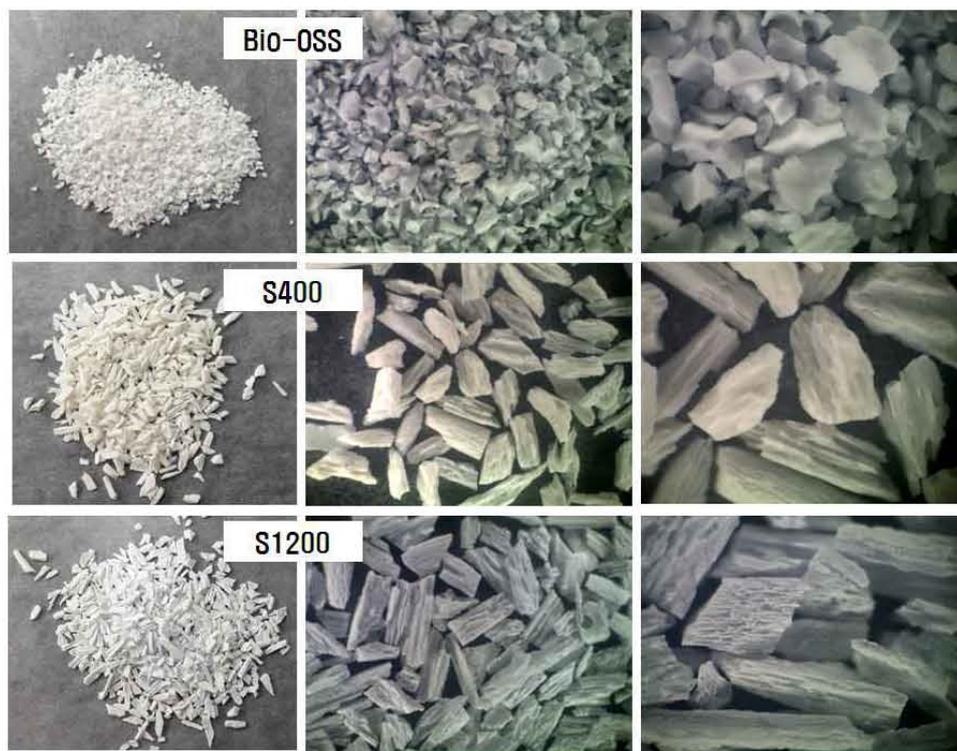


그림 1-77. 인간유래 치아줄기세포의 세포친화성에 사용된 시료의 디지털 및 입체현미경 사진

표 1-12. 세포실험에 사용된 시료군

1차 세포실험	
Bio-OSS	소 뼈로 제조된 G사의 제품
S400	과산화수소 처리 → 400℃ 열처리
S1200	과산화수소 처리 → 1200℃ 열처리
2차 세포실험	
Bio-OSS	소 뼈로 제조된 G사의 제품
S400	화학적 처리 → 400℃ 열처리
S1200	화학적 처리 → 1200℃ 열처리

- 제조된 오리부리 뼈 입자와 대조군인 Bio-OSS 입자의 중금속함유 여부를 확인하고자 ICP 분석을 진행하였음. 이때 분석한 중금속은 AS, Cd, Hg, Pb 임.
- ICP 분석을 위하여 1.0 mg의 시료를 10mL의 증류수에 침지한 다음 37℃에서 4주 동안 용출하여 그 용출액을 분석한 결과 모든 시료에서 중금속이 검출되지 않은 것을 확인함.
- 또한 오리부리 뼈 입자와 소 뼈 입자인 Bio-OSS의 Ca 및 P의 용출특성을 ICP 분석한 결과 침지 3주 동안 모든 시료에서 칼슘방출이 증가하는 경향을 나타내었고 그 이후에 방출량이 감소하는 경향을 나타내었음. S400의 경우 다른 시료 대비 가장 높은 칼슘 방출거동을 나타내었고, S1200이 Bio-OSS 보다 3주까지는 칼슘방출이 높게 나타났으나 그 이후에는 유사한 방출 거동을 보였음. 모든 시료에서 P의 방출거동은 Ca와 유사한 거동을 나타내었음.

표 1-13. 오리부리 뼈 입자의 중금속함량시험 결과

시료	성분	시험결과
Bio-OSS S400 S1200	AS	미검출
	Cd	미검출
	Hg	미검출
	Pb	미검출

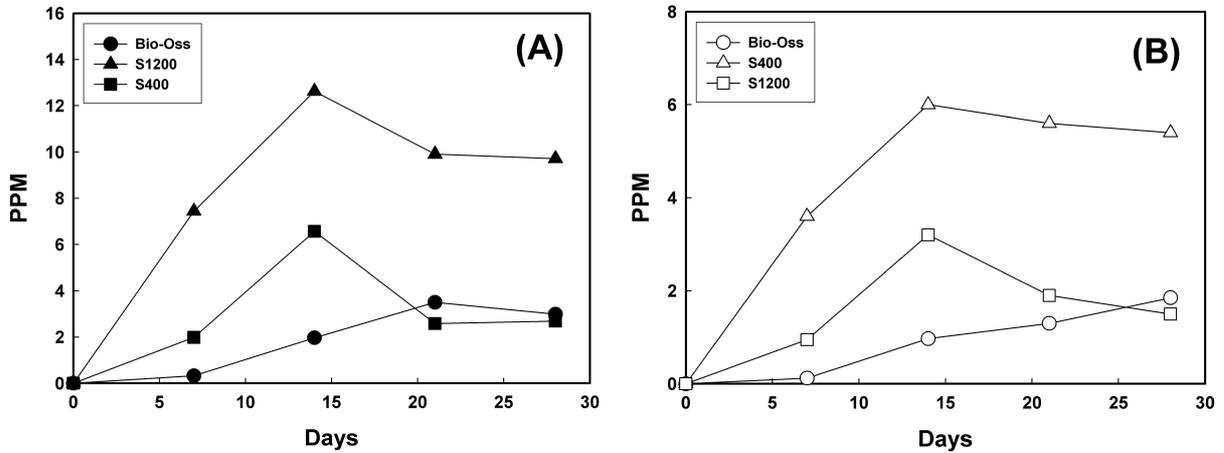


그림 1-78. 오리부리 뼈 및 Bio-OSS의 칼슘(A) 및 인(B)의 방출 거동

(2) 세포 친화성 평가를 위한 골대체재의 세포 파종

- 준비된 시료는 멸균기를 이용하여 121°C에서 20분 동안 멸균과정을 거친 후 60°C 오븐에서 24시간 동안 건조하여 사용하였음.
- 멸균된 각 골대체재는 세포 배양조에 옮긴 후 하루 동안 배양배지에 담가 각 골 대체재의 미세구조에 포함된 공기를 제거하고, 세포와 함께 배양 시 세포부착이 용이하도록 함. 골대체재의 세포 친화성 평가를 위해 사람유래 치아줄기세포를 이용하였고, 1차 실험에서는 세포의 수를 1×10^4 cells/cm²으로 사용하였음. 배양배지는 α -MEM, 10% FBS, 1% Penicillin/streptomycin을 사용하였음.
- 2차 실험에서는 세포의 수를 2×10^4 cells/cm²으로 사용하였고, 배지는 phenol red가 포함되지 않은 것을 사용함.

(3) 세포 친화성 평가를 위한 골대체재의 준비 및 세포 파종

- 각 골대체재와 함께 배양한 세포의 골모세포로의 분화를 유도하기 위해 10 mM β -GP, 50 μ g/mL ascorbic acid, 10 nM dexamethasone을 배양배지에 첨가하여 사용하였고, 분화유도 배지는 세포를 골대체재에 식립한 후 하루가 지난 후 처리함.
- 치아줄기세포는 골대체재와 함께 골모세포 분화유도 배지에서 배양되는 동안, 배양조 바닥에 있는 세포의 형태 확인을 통해 간접적으로 관찰하였음. 골모세포로의 분화를 확인하기 위해 alizarin red staining solution을 이용하여 침착된 칼슘 미네랄을 염색한 후 관찰하였음.

(4) 세포 친화성 평가를 위한 골대체재의 준비 및 세포 파종

- Cell Counting Kit-8 (CCK-8)은 highly water-soluble tetrazolium salt (WST)를 활

용한 방법임. WST는 전자전달이 일어나면 water-soluble formazan dye를 형성하는데, 이는 세포에 있는 dehydrogenases에 의해서 줄어들고 yellow-colored product (Formazan)가 culture medium에 녹아있는 상태로 존재하게 됨.

- 세포에서 dehydrogenases의 활성에 의해 생성된 Formazan dye의 양은 living cells의 수와 직선적 상관관계를 가지고 있으므로, CCK-8 은 MTT, XTT, MTS 또는 WST-1과 같은 tetrazolium salts보다 detection sensitivity 가 높은 방법임.
- 지지체위에 세포를 심고 배지 100 μ l에 CCK-8 (CellTiter 96A Queous one solution, promega)을 10 μ l 섞어 호일로 빛을 차단하고 5%의 CO₂농도를 유지하는 37°C 인큐베이터에서 1시간을 반응시킨 후 450 nm에서 측정함.

(5) 세포 친화성 평가를 위한 골대체재의 준비 및 세포 파종

- Alkaline phosphatase (ALP) activity (활성도)는 세포막 혹은 세포외에 자유롭게 존재하며 세포의 PPi를 Pi로 분해하여 충분한 인산기를 공급하여 칼슘과 결합, 세포외기질에 인산칼슘이 침착할 수 있게 하는 효소로 분화 초기 마커로 널리 알려짐.
- 이러한 효소의 활성정도를 측정하기 위해 세포를 심고 지지체 위에서 배양한 후 ALP 효소의 활성정도를 확인하기 위하여 세포를 수확하여 단백질 정량을 하고 일부를 ALP의 기질인 p-NPP (p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium Salt)를 넣어 분해되는 정도에 따른 효소 활성을 405 nm에서 측정하여 단위 단백질당 효소활성을 측정함.
- Real time polymerase chain reaction (RT-PCR)를 이용한 분화 마커발현 정도는 분화가 진행됨에 따라 단계적으로 발현되는 유전자들을 유전자증폭을 이용하여 확인함으로써 지지체위에서 세포가 분화하는 정도의 차이를 측정함.
- 세포를 심고 하루 후 분화유도 배지를 처리하여 지정된 시간에 세포를 수확하고 Trizol을 이용하여 total RNA를 분리.
- 1 μ g의 RNA를 cDNA synthesis kit(invitrogen)을 이용하여 역전사증합반응을 통하여 상보 DNA를 만들고 이를 주형으로 하여 각종 마커(ALP, OC, Type I collagen 등) 발현 정도를 확인함.
- 발현정도를 상대적 수치로 확인할 수 있는 LightCycler1.5 real time PCR장비를 이용하였으며, GAPDH를 internal control로 사용함.

(6) 오리부리의 뼈 골대체재의 세포성장 특성 평가

- 오리부리 뼈 골대체재가 사람유래 치아줄기세포의 증식에 미치는 영향을 알아 보기 위해 동일한 부피로 Bio-OSS, S400, S1200을 세포배양조에 넣고, 세포를 파종한 후 1일과 3일, 7일에 거쳐 세포의 성장을 관찰함. 매일 관찰한 결과 Bio-OSS와 S400은 배지내의 phenol red를 일부 흡수하고, 이로 인해 CCK-8 시약처리 시에도 데이터 값에 영향을 미치는 것을 확인하였음 (그림 1-79A).

- 그래서 phenol red가 없는 배지를 이용하여 다시 증식을 측정하였는데, 1차 결과를 바탕으로 세포수를 늘여서 실험을 수행하였음. 그 결과 S1200이 증식효율이 그 다음으로는 Bio-OSS가 좋았으나, S400과 큰 차이는 보이지 않았음 (그림 1-79B).

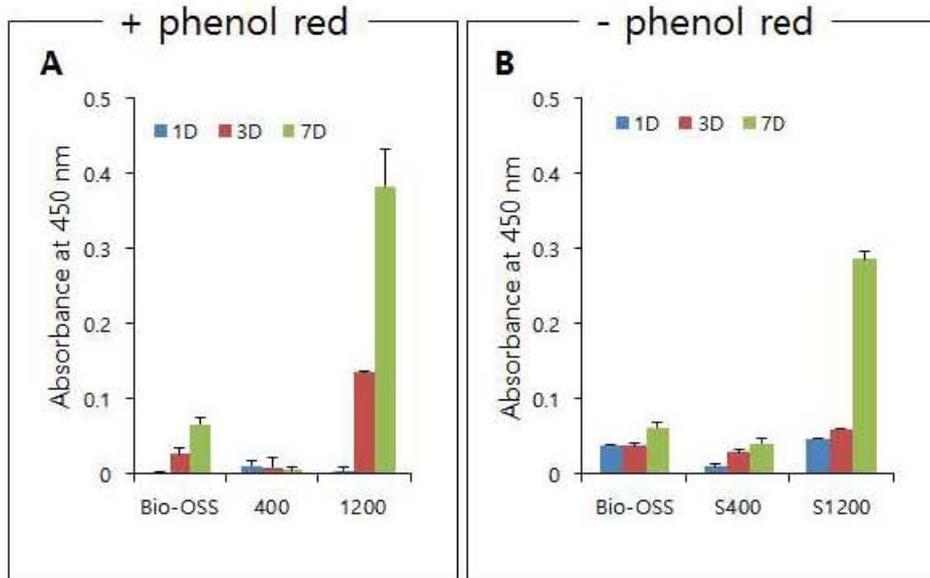


그림 1-79. CCK-8을 이용한 오리부리 뼈 골대체재의 세포증식 평가

(7) 형광염색을 이용한 골대체재 표면의 세포관찰

- 세포증식을 확인하면서 골대체재 표면에서 세포가 제대로 자라는지 확인하기 위해 증식배지 상에서 3일째 세포부착정도를 비교하기 위해 세포의 골격을 이루는 actin 단백질을 염색하는 phalloidin rhodamine과 핵을 염색하는 DAPI를 이용하여 골대체재 표면의 세포를 관찰하였음.
- Bio-OSS와 S400은 세포배양액의 phenol red를 흡수했던 것처럼 염색약도 흡착하여 수세를 여러 차례 수행하여도 배경이 진하게 염색되어 세포를 관찰하기 힘들었음.
- Bio-OSS는 phalloidin rhodamine과 DAPI가 약하게나마 관찰이 되었지만, S400의 경우에는 DAPI에서만 희미하게 세포의 존재를 확인할 수 있었음. 그림 2의 S400에서 DAPI 부분의 동그라미는 확대하였을 때 겨우 보이는 세포를 표시하여 둔 것임. 3일 차 세포 염색에서 보면 증식 데이터와 동일한 패턴으로 세포의 수가 관찰되었고, S1200에서는 지지체의 표면에도 세포가 뚜렷하게 잘 관찰되는 것을 확인할 수 있었음 (그림 1-80).

- 배양 7일차 증식배지에서 S1200 오리부리 글대체재 상에서 관찰되는 세포를 현미경으로 촬영하여 세포의 형태를 확인한 결과 세포가 길쭉하게 잘 연결되어 뻗어있는 것을 확인함으로써, 세포가 글대체재의 표면에서도 잘 자라고 있음을 확인함 (그림 3). Bio-OSS와 S400은 글대체재 자체가 형광염색으로 진하게 염색되어 세포를 관찰할 수 없었음.

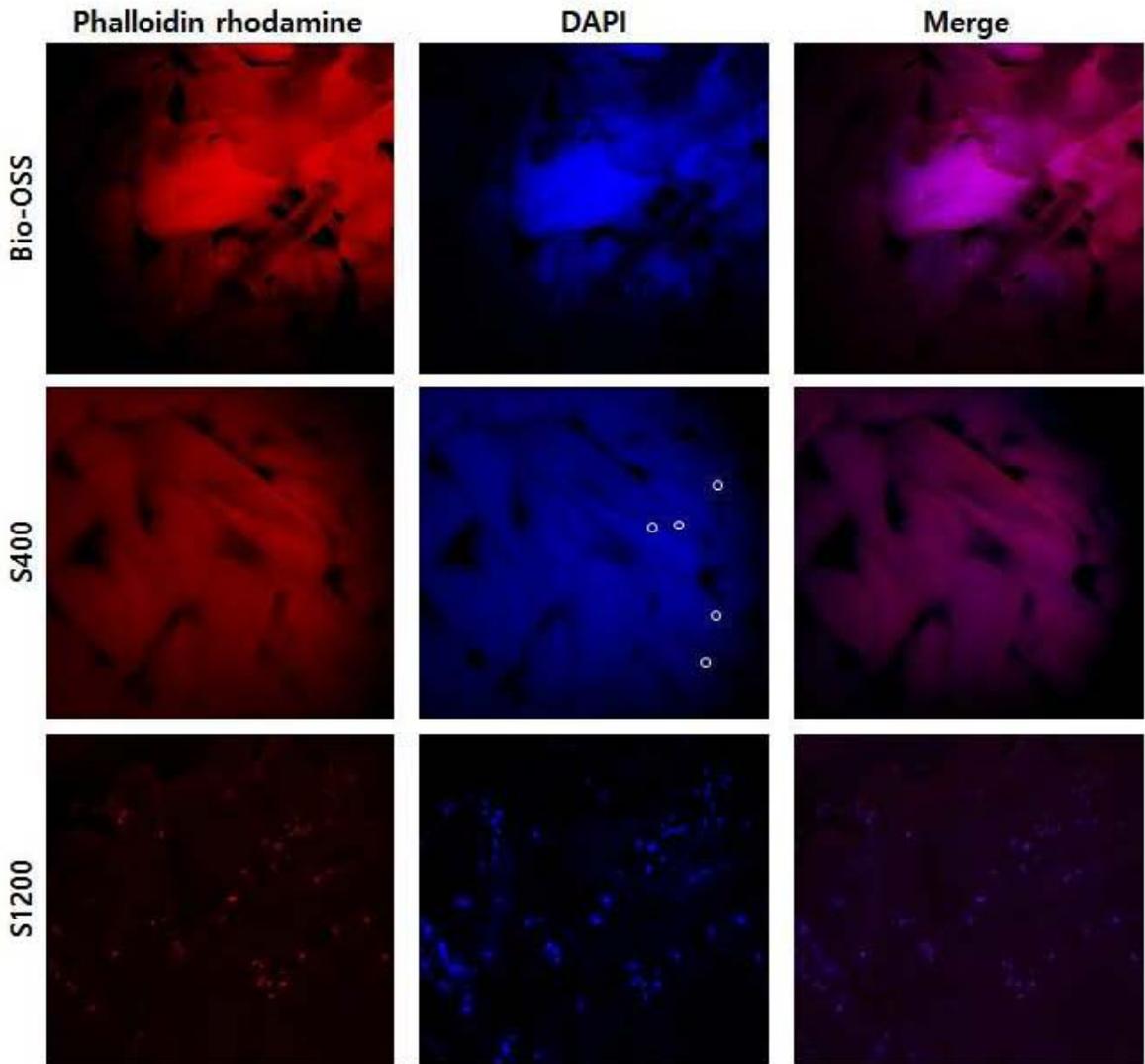


그림 1-80. 배양 3일차 글대체재 표면의 세포관찰

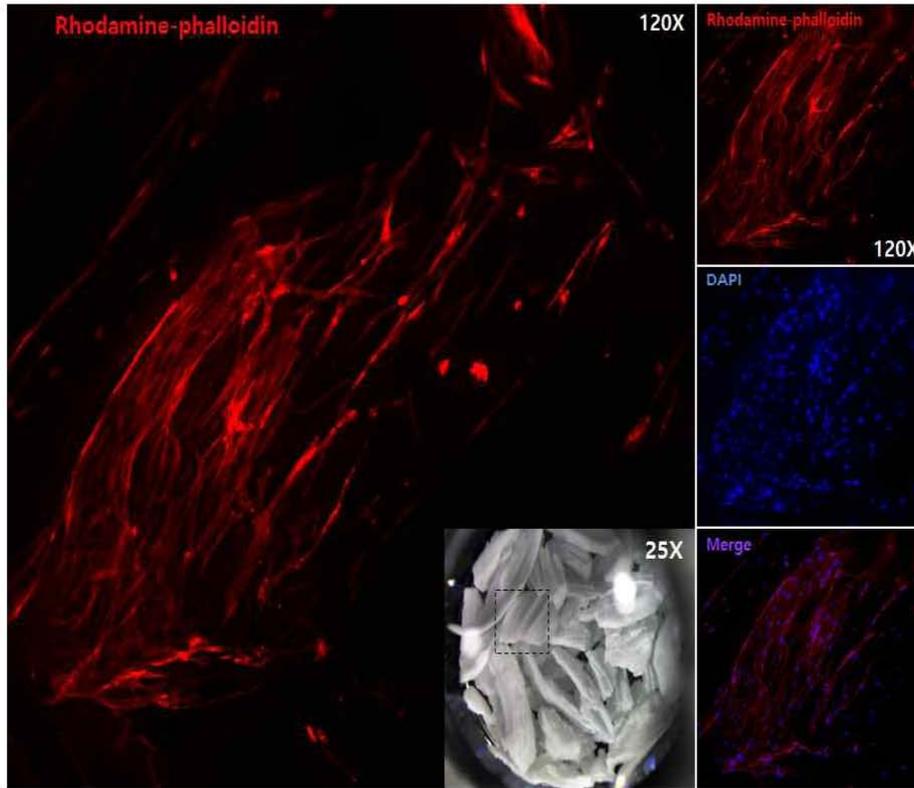


그림 1-81. 배양 7일차 S1200에서의 세포관찰.

(8) ALP 활성도 평가

- 분화 초기 마커로 알려져 있는 ALP 활성정도를 측정하여 지지체위 세포들의 분화초기 단계가 얼마나 빠르게 진행되는지 살펴보았음.
- ALP 활성정도를 측정하기 위해 동일 부피의 골대체재들을 배양조에 넣고, phenol red가 없는 골모세포 분화용 배지에서 7일과 14일 동안 배양한 후 이를 확인함.
- 그 결과 Bio-OSS의 경우 S400에 비해 모두 높게 나타났지만, S1200이 7일과 14일에서 가장 월등한 ALP 활성을 보이는 것으로 확인함 (그림 1-82).

(9) Real time PCR을 이용한 골모세포 분화마커 확인

- 본 실험실에서 사람유래 치아줄기세포는 평균적으로 24일에서 28일 사이에 mineralization이 관찰됨. 이에 오리부리 뼈 골대체재와 함께 사람유래 치아줄기 세포의 골모세포 분화를 유도하였을 때 분화마커의 거동을 평가하였음.
- 사람유래 치아줄기세포의 골모세포분화 과정동안 마커발현의 변화를 비교하기 위해 7일과 14일, 21일, 28일에 걸쳐 세포를 수확하여 real time PCR을 수행함. 분화를 확인하기 위해 사용한 골모세포 분화마커는 초기마커인 ALP, COL1을 비롯하여 중기부터 발현이 증가하는 OC, BSP, OPN 그리고 치아의 골모세포 특이 마커인 DSPP의 발현을 비교하였음 (그림 1-83).

- 배양 28일까지 유전자의 발현을 비교한 결과 ALP는 7일에 Bio-OSS®와 S400이 높고, S1200이 다소 낮게 나타났으나, 14일에는 S1200이 월동혀 높은 발현은 21일째 감소하였다가 다시 증가하는 패턴을 보임. COL1의 경우에는 7일과 14일에 S1200, S400, Bio-OSS 순으로 발현이 높게 나타났고, 21일째부터 S400의 발현이 증가하여 28일째에는 S400, S1200, Bio-OSS의 순으로 발현레벨이 달라짐.
- 중기부터 그 발현이 증가하는 OC의 경우 7일, 14일, 21일 까지 S1200에서의 발현이 월동혀 높았고, 28일째에는 그 발현이 감소하는 패턴을 보였음. BSP의 경우에는 7일 차에 S1200, S400, Bio-OSS의 순으로 발현 차이를 보였고, 14일 차에는 S1200의 발현이 가장 높았으나, 21일과 28일로 경과할수록 Bio-OSS의 발현이 증가하는 패턴을 나타내었음. OPN의 경우에는 7일과 21일에는 발현이 거의 차이를 보이지 않았지만, 14일에 S400에서 발현이 가장 높았고, Bio-OSS, S1200의 순으로 발현이 낮게 나타남.
- DSPP의 경우에는 전반적으로 동일한 패턴을 나타내었으나, Bio-OSS와 S1200에서의 발현이 비슷하게 높았고, S400에서는 발현이 약간 낮게 나타나는 경향을 보였음. 전반적인 골모세포 분화마커의 발현을 보면 S1200에서 골모세포 분화마커가 전반적으로 높게 나타났고, S400과 Bio-OSS에서는 분화마커의 패턴이 다양해 비교하기는 어렵지만 S1200 보다는 낮게 나타났음.

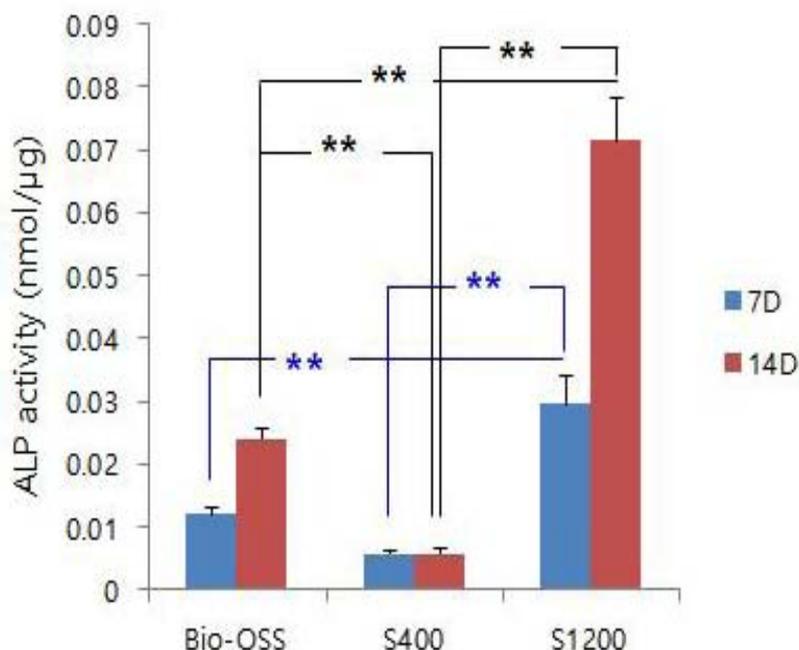


그림 1-82. ALP 활성도 측정 그래프

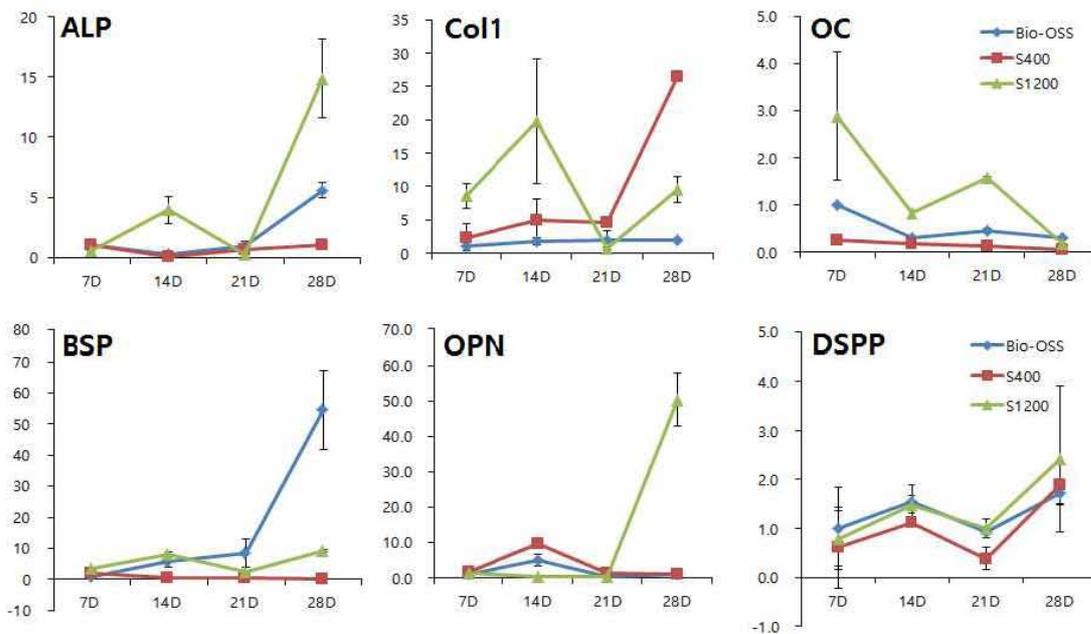


그림 1-83. 골모세포 분화 마커 발현 정도 비교

(10) 2차 세포친화성 평가

- 1차 세포실험에서 S1200의 효과가 가장 우수한 것으로 나타났는데, S400의 경우 과산화수소만을 처리하여 부리 뼈에 함유되어 있는 유기물을 제거한 상태이므로 미처 제거되지 못한 잔여 유기물이 세포반응에 영향을 미쳤을 가능성을 추측하게 되었음. 따라서 이를 해결하기 위해 가공법(화학적 처리)을 달리하여 제조한 S400, S1200을 이용하여 치아유래 줄기세포와의 반응을 다시 평가하였음.
- 또한 1차 실험을 통해 배양조에 담은 골대체재의 양을 줄이고 세포의 수를 늘이는 것이 세포가 성장하고 증식할 때 세포간의 상호작용에 유리할 것으로 판단되었음. 따라서 2차 실험에서는 골대체재의 양을 1차 실험보다 절반으로 줄이고 세포의 수는 2배로 늘여 실험을 진행함.

(11) 치아줄기세포의 증식 평가

- 1차 실험에서 S1200은 세포 수에 관계없이 일정한 패턴을 나타내었으나, Bio-OSS®와 S400의 증식이 세포수에 영향을 받는 것으로 보여 세포수를 이전 실험보다 1.5배 늘여서 다시 확인한 결과 Bio-OSS®와 S400은 증식패턴이 동일하지만, Bio-OSS®가 S400보다 약간 더 좋은 결과를 보였음.
- 그러나, 세포의 증식효율은 S1200이 비교할 수 없을 정도로 가장 우월하게 나타남(그림 1-84).

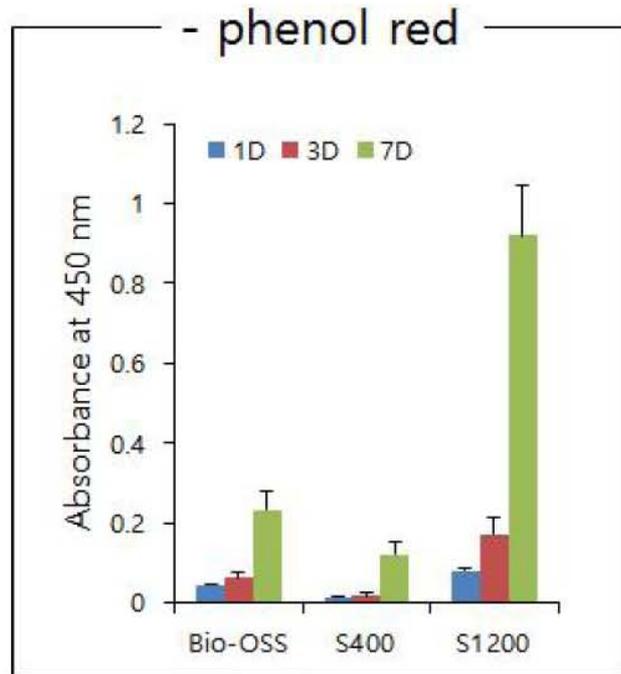


그림 1-84. CCK-8을 이용한 오리부리 뼈 골대체재의 세포증식 평가

(12) 골대체재 표면의 세포 관찰 및 미네랄 염색

- 2차 실험에서는 각 골대체재의 양을 줄였기 때문에 골대체재 사이의 간격을 통해 표면에 부착되어 자라는 세포의 관찰이 용이하였음. 따라서 골모세포 분화용 배지에서 각 골대체재와 함께 6일간 배양한 세포를 현미경으로 관찰하였음.
- 세포의 모양은 전반적으로 가늘고 긴 형태를 띠고 있었고, 세포의 개수는 세포증식 결과와 유사한 경향으로 관찰되었음(그림 1-85). 하지만 모든 경우에서 부분적으로 세포가 밀집된 부분도 함께 존재하였는데, S1200 골대체재와 함께 배양된 치아줄기세포의 경우에서 세포밀집 구역이 많았음.

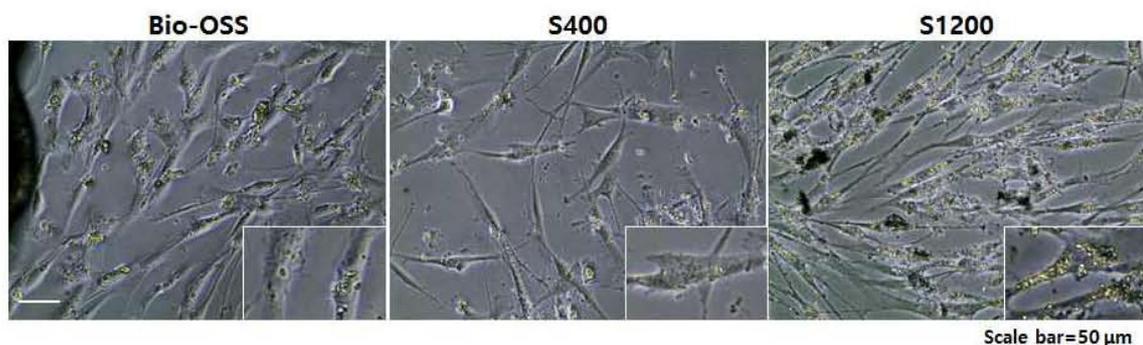


그림 1-85. 골대체재와 함께 배양된 치아줄기세포의 배양 7일째 세포 형태

- 세포관찰 결과를 토대로 오리부리 뼈 골대체재와 함께 배양된 치아줄기세포에 칼슘미네랄의 침착 정도를 확인하기 위해 Alizarin red 염색을 시행함 (그림 1-86). 이 때 Bio-OSS와 S400은 결정구조가 아직 hydroxyapatite의 구조를 가지고 있기 때문에 Alizarin red 염색에서 과하게 염색이 되었는데, 세포에 이러한 영향이 미치지 않도록 배양조를 기울여 염색을 실시하였음. 또한 염색된 세포 관찰 시에도 투과현미경을 사용하여 불투명한 골대체재는 까맣게 보이도록 하여 세포를 관찰함.
- Alizarin red로 염색한 결과 예상과는 다르게 S1200 골대체재와 함께 배양된 세포 표면에서 칼슘미네랄의 결정처럼 관찰되었던 부분에는 염색이 되지 않고, 도리어 결정구조가 거의 관찰되지 않았던 Bio-OSS와 S400과 함께 배양된 세포군에서 염색된 것이 관찰됨.
- Bio-OSS의 경우에는 거의 세포의 핵 쪽에서 주로 염색된 것으로 관찰이 되었는데, 그 정도는 희미하거나 약간 진하게 보이는 수준이었음. 또한 S400 골대체재와 함께 배양된 세포에서도 동일하게 핵 주변으로 염색된 것이 관찰되었는데, 한 개의 세포에서 염색된 범위가 Bio-OSS와 함께 배양한 세포보다 다소 넓고, 색깔도 진한 것으로 관찰이 되었음. 반면 S1200 골대체재와 함께 배양된 세포에서는 전체적인 세포 수에 비해 미네랄 염색이 현저히 낮았지만 부분적으로 여러 세포에 걸쳐 미네랄이 넓게 염색되는 양상을 보였음.
- 침착된 미네랄이 염색된 양상은 배양조 전반적으로 동일하게 관찰되지는 않았는데, 이는 조직에서 직접 추출되어 배양된 primary 줄기세포가 heterozygote 하게 존재하는 특성 때문인 것으로 추측됨. 따라서 이렇게 부분적으로 차이나는 미네랄 염색의 양상을 고려하였을 때 전반적으로 세포의 숫자와 비례하여 염색된 정도는 Bio-OSS와 S400의 골대체재와 함께 배양된 세포가 유사하게 나타났으나 미네랄화 된 정도는 S400 골대체재 쪽이 비슷하거나 약간 높은 경향을 보였음.
- 또한 S1200 골대체재와 함께 배양된 세포는 세포의 수는 많았지만 세포 수에 비례해 가장 낮은 미네랄화를 보임. 따라서 각 골대체재와 함께 배양되면서 골모세포 분화중인 치아줄기세포의 골모세포 마커의 확인은 7일 보다 좀 더 이른 시기에 관찰되어야 할 것으로 보였음.

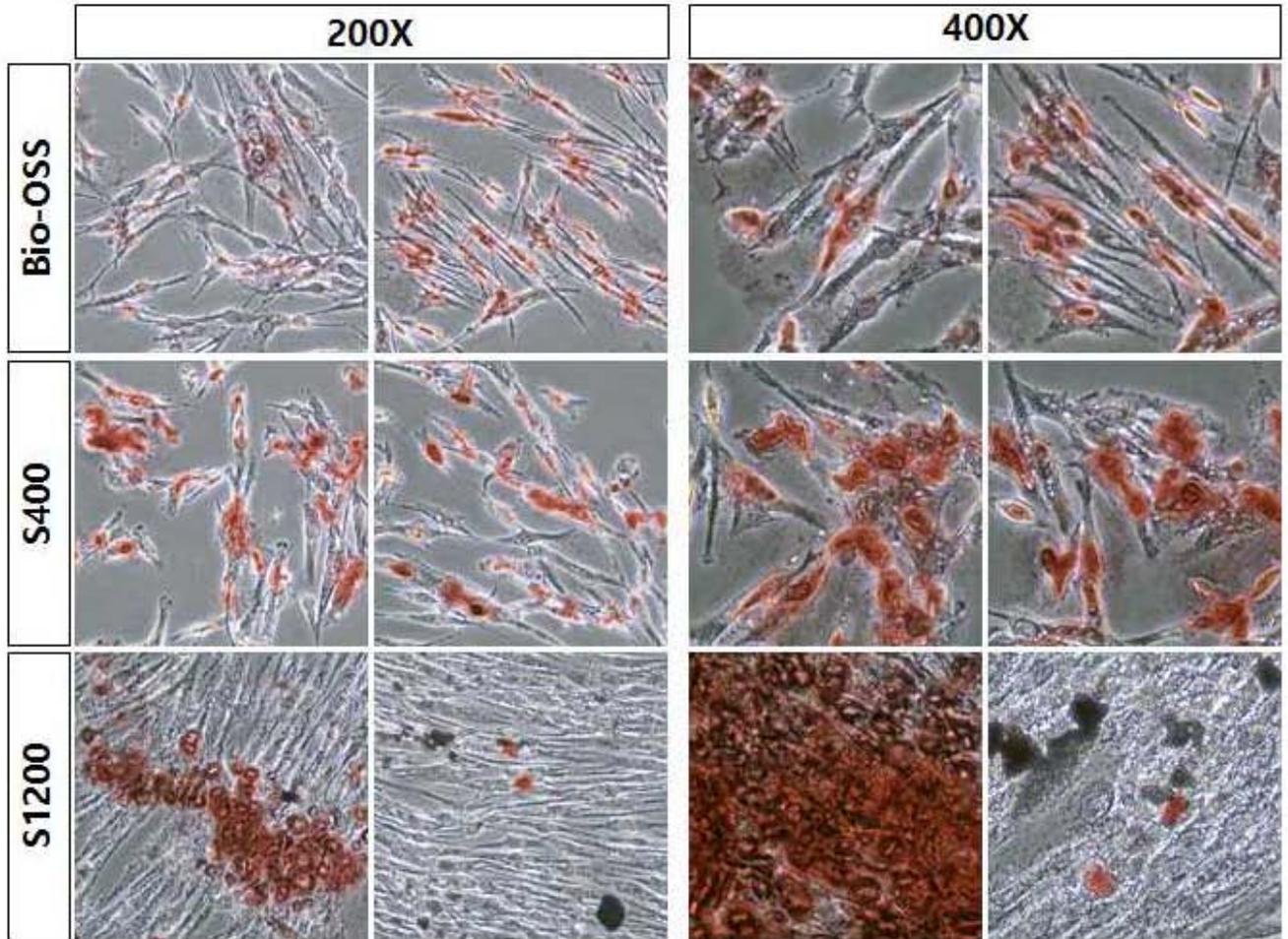


그림 1-86. 골대체제와 함께 배양된 치아줄기세포의 미네랄 침착 확인.
Alizarin red 염색.

(13) ALP 활성도 측정

- 각 골대체제와 함께 배양된 사람유래 치아줄기세포의 미네랄 침착은 확인하였고, 처음에 동일하게 배양이 시작되었던 세포의 7일과 14일에 ALP 활성정도를 확인해 보았음 (그림 1-87).
- ALP 활성을 확인한 결과 7일차에는 S1200과 함께 배양된 세포에서 높은 활성을 나타내었고, Bio-OSS와 S400의 순서로 활성이 높게 나타났음.
- 그러나, 결과 값의 차이가 거의 없이 유사한 경향을 보였음. 또한 14일째 결과에서는 서로 비교할 수 없을 정도로 동일한 ALP 활성을 보였음.

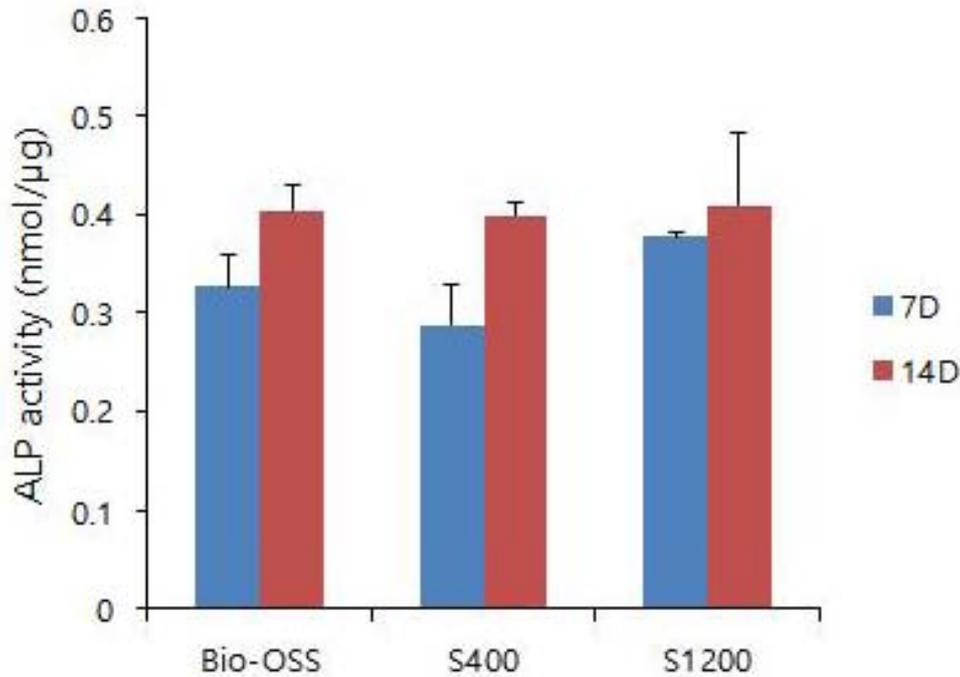


그림 1-87. 배양시간에 따른 ALP 활성도 변화

(14) 결론

- 1차 실험과 2차 실험의 결과를 종합 해 본 결과 Bio-OSS와 S400의 경우에는 초기에 함께 배양되는 세포의 수에 따라 골모세포의 분화가 영향을 받는 것으로 보였고, S1200의 경우에는 세포 수에 관계없이 증식을 촉진시키는 결과를 보였음. 하지만 골모세포의 분화에 있어서는 세포가 적을 때에는 S1200이 월등한 효과를 나타내었지만, 골대체재 주변에 세포가 많이 존재하는 상황에서는 Bio-OSS나 S400의 골모세포 분화정도가 더 좋은 것으로 보임.
- 일반적으로 골모세포분화 과정에는 세포의 증식억제가 우선시되기 때문에 Bio-OSS와 S400 골대체재에서 S1200보다 낮은 증식률을 보이는 것은 이때문인 것으로 추측되고, 각종 분화마커와 ALP 활성정도 역시 7일 이후에 관찰하였기 때문에 S1200보다 낮게 나온 것으로 예상됨.
- 따라서 다양한 가공공정 및 열처리 조건에 따라 제조된 오리부리 뼈 입자에서 치아줄기세포의 분화는 상이한 특성을 나타내었지만 대조군인 소뼈로 제조된 Bio-OSS와 유사하거나 좀 더 우수하게 나타남으로써 신규 골대체재로 그 활용이 가능할 것으로 판단됨.

5. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 신공정 개발

가. 오리부리의 뼈 유래 골대체재용 생체소재의 새로운 제조 공정의 개발

○ 새로운 제조공정의 개발

- 일반적으로 동물 뼈로부터 생체세라믹을 제조하기 위해서는 동물 뼈에 함유되어 있는 유기물(지방, 단백질 등)을 제거하고 순수한 수산화인회석 (hydroxyapatite, HA)로 제조하는 공정이 필수적임. 만약 소량이지만 이러한 유기물이 제조된 HA에 존재하면 이식 후 다양한 부작용이 나타날 수 있는 위험의 소지가 있음.
- 동물 뼈로부터 유기물의 제거는 크게 화학적 처리와 열처리 또는 이들을 병행하여 수행되고 있으며, 열처리로 이들을 제거하기 위해서는 400℃ 이상의 고온이 필요하며, 탄화된 유기물의 완전 제거는 이보다 더 높은 온도에서 오랜 시간 열처리 하는 것이 일반적임.
- 이와 같은 고온 열처리는 화학적 처리에 비해 짧은 시간에 유기물을 제거할 수 있는 장점이 있으나 고온에 의한 수산화인회석의 물리적 특성 변화가 동반되는 단점이 있음.
- 화학적 처리를 통한 유기물의 제거는 지방이나 단백질을 제거하기 위해 유독성의 화학약품을 사용해야 되고 이들의 잔류물을 제거하기 위해 오랜 시간 수세 과정이 수반됨. 만약 제조된 수산화인회석에 유독한 화학약품이 소량이라도 잔류할 경우 인체에 치명적인 영향을 줄 수 있음.
- 또한 제조공정이 길고, 막대한 양의 폐수 발생으로 환경 및 수질 오염에 큰 영향을 미치며 제조과정에서 인체 노출 시 인체에 악영향을 줄 수 있는 단점을 가지고 있음.
- 그러나, 이를 대체할 수 있는 효과적인 방법이 개발되지 않아 현재에도 화학적 처리 방법 및 열처리 방법이 사용되고 있음.
- 일반적으로 많이 사용하는 오리부리의 뼈 입자를 제조하기 위해서 화학적 처리 방법으로 유기물을 제거하고 열처리를 통해 부리 뼈 입자를 제조하였고 (그림 1-88), 열처리 온도에 따른 제조된 부리 뼈 입자의 물리화학적 특성을 분석하였음.

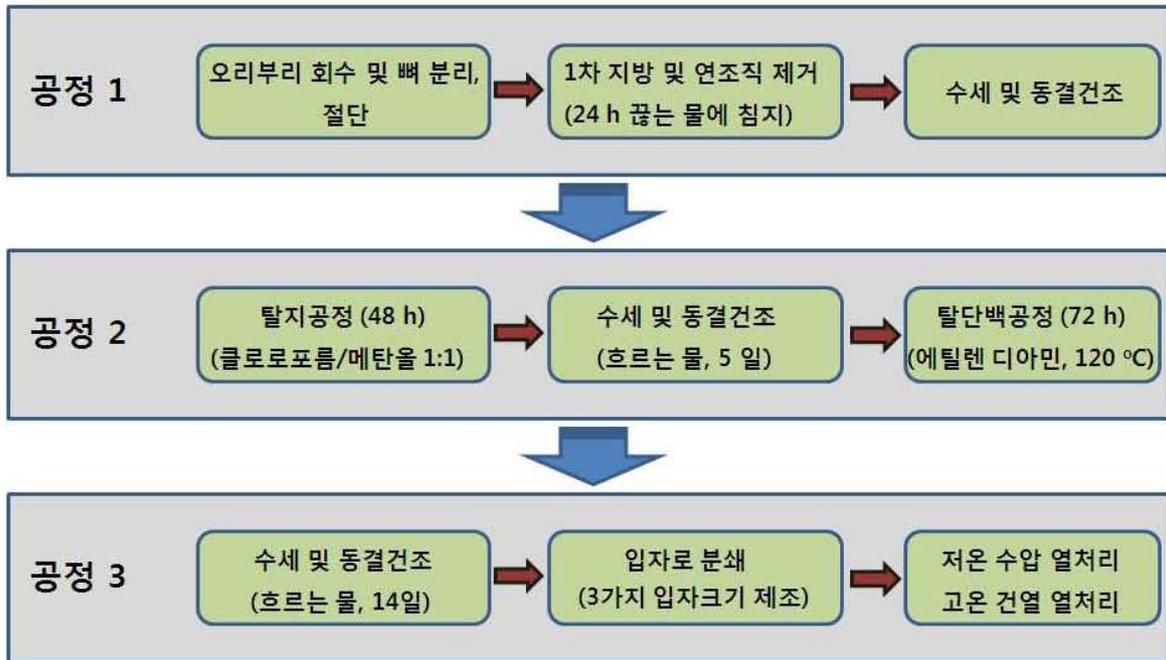


그림 1-88. 일반적으로 최적화된 오리부리의 뼈 입자의 제조 방법

- 본 연구에서는 유독한 화학약품을 사용하지 않고 낮은 열처리 온도를 사용하여 오리부리 뼈 입자를 제조하였음.
- 유기물을 제거하기 위해 탈지공정에서는 클로로포름/메탄올 혼합 용액을 사용하였고, 탈단백 공정에서 에틸렌 디아민을 사용하였다. 이러한 화학약품을 사용할 경우 대략 20-30일 정도의 시간이 소요되었음.
- 그러나, 이번 연구에서는 화학약품으로 환경 친화적인 과산화수소(hydrogen peroxide)만을 사용하고 낮은 열처리를 통해서 오리부리 뼈 입자를 제조할 수 있는 방법을 개발함으로써 기존 제조공정 대비 제조 소요시간을 대폭 축소하였을 뿐만 아니라 잔류물질, 에너지, 환경오염, 안전성 등의 많은 문제를 해결할 수 있었음.

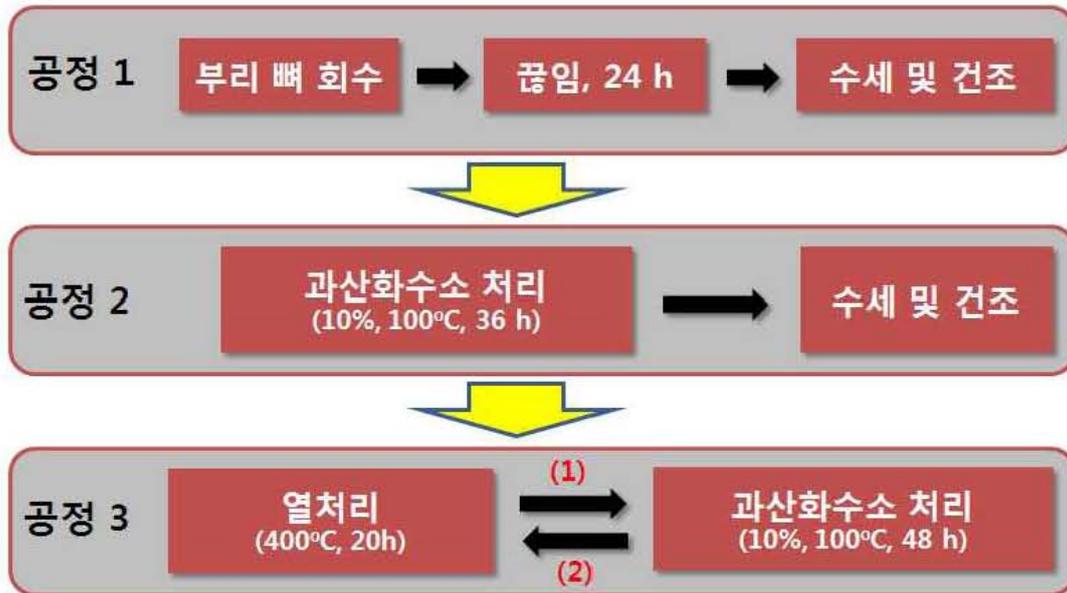


그림 1-89. 새로 개발한 오리부리 껍 입자의 제조공정 모식도

- 공정 1 (그림 1-89)
 - 오리부리의 껍으로부터 연조직 및 1차 지방을 제거하는 공정으로 회수된 오리부리의 껍을 끓는 물에 24시간 동안 침지한 후 여러 번의 수세과정을 거쳐 분리된 연조직을 제거하고 순수한 오리부리의 껍만을 회수하여 70℃에서 24시간 동안 건조하였음 (그림 1-90). 이때 끓이는 공정 중 12시간에서 새로운 물로 교체해 주었음.
- 공정 2
 - 건조된 오리부리 껍을 10% 과산화수소(hydrogen peroxide) 수용액에 침치하여 100℃에서 36시간 동안 끓여 주었음(8시간 단위로 과산화수소 수용액 교체). 이때 과산화수소의 분해에 의해 부리 껍에 포함된 색소, 지방, 단백질 등이 어느 정도 제거되게 됨 (그림 1-91). 이 후 증류수로 여러 번 세척 후 70℃에서 24시간 동안 건조하였음.
- 공정 3
 - 건조된 오리부리 껍은 전기로를 이용하여 400℃에서 20시간 동안 열처리하였음. 이때 잔류 유기물은 탄화되어 부리 껍의 색깔이 초기 흰색에서 회색으로 변하게 됨 (그림 1-92).



그림 1-90. 끓는 물에서 1차 유기물을 제거함 (공정 1).

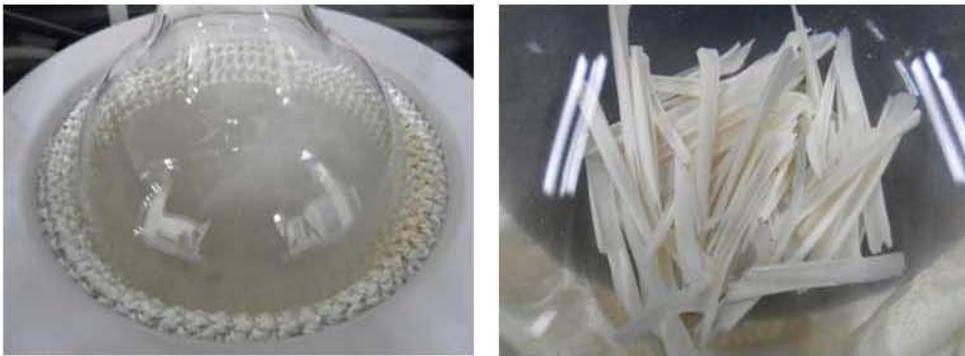


그림 1-91. Hydrogen peroxide을 처리하여 2차 유기물을 제거 (공정 2).

- 열처리 공정 후 부리 뼈 입자를 다시 10% hydrogen peroxide에 침지하여 100℃에서 48시간 동안 끓여 주었음 (6시간 단위로 hydrogen peroxide 교체). 이 과정을 통해서 부리 뼈에 탄화된 물질들을 제거하였음.
- Hydrogen peroxide 처리 후 흐르는 물에 72시간 침지하여 오리부리 뼈에 함유된 미분해 hydrogen peroxide 또는 초산(과산화수소 안정제)를 제거하고 다시 400℃에서 20시간 동안 열처리하였음. 이후 아세톤에 침지하여 초음파 세척 한 후 건조하여 입자(1.0-0.5 mm)로 제조하였음 (그림 35).



그림 1-92. 열처리 후 hydrogen peroxide 처리 및 유기 탄화물 완전 제거 (공정 3).

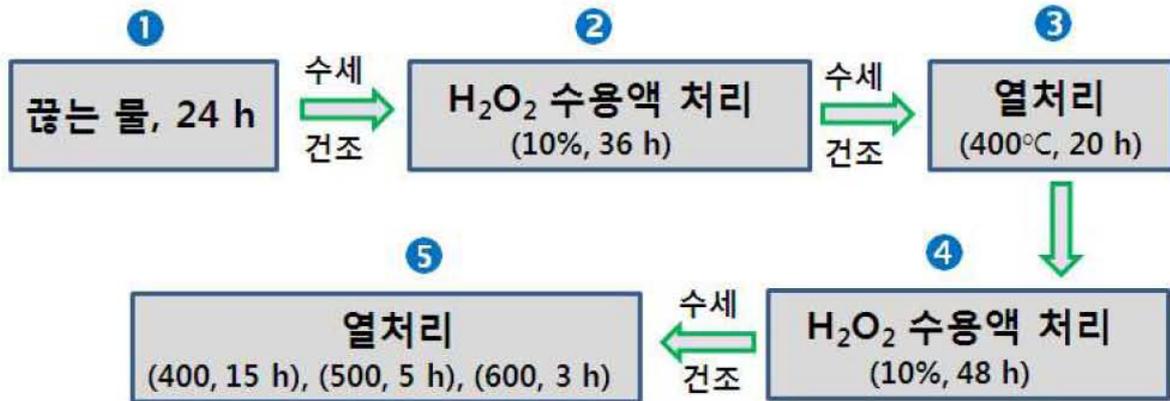


그림 1-93. 연속공정을 통한 오리부리의 뼈 입자 시료 제조과정

표 1-14. 새로운 공정으로 제조된 오리부리 뼈 입자의 실험군 분류

실험군	처리공정
제1군 (control)	소 뼈 입자(Bio-Oss [®] , Geistlich Co., Switzerland)
제2군 (화학적 처리)	화학적 처리→열처리(400°C, 20 h) (1차년도 제조공정)
제3군 (hydrogen peroxide 처리)	① → ② → ③ → ④ → 수세 및 건조
제4군 (hydrogen peroxide 처리)	① → ② → ③ → ④ → ⑤ (400°C, 15 h)
제5군 (hydrogen peroxide 처리)	① → ② → ③ → ④ → ⑤ (500°C, 5 h)
제6군 (hydrogen peroxide 처리)	① → ② → ③ → ④ → ⑤ (600°C, 3 h)

- 새로운 공정의 유효성을 확인하기 위하여 연속공정에서 마지막 단계에 변화를 주어 오리부리 껍질 입자를 제조하였음. 만약 제조공정 ④번 단계 후 ⑤번의 열처리 공정에서 오리부리 껍질에 유기물이 존재한다면 유기물이 고온에 의해 탄화되어 부리 껍질의 색깔이 변화하는 것을 관찰하기 위해서임 (표 1-14).
- 그리고 마지막 ⑤번 단계에서 열처리 시간의 변화를 준 것은 고온에서 오리부리 껍질을 구성하고 있는 수산화인회석의 물성에 변화를 주지 않기 위해서임.



그림 1-94. 새로운 공정으로 제조된 오리부리 껍질의 사진
(A, 제2군; B, 제3군; C, 제4군; D, 제5군; E, 제6군)

- (그림 1-94)은 공정별로 제조된 오리부리 껍질의 디지털 사진을 나타낸 것임. 화학적 처리 후 400℃에서 열처리한 제2군과 새로운 공정인 hydrogen peroxide 처리 후 400℃에 열처리한 제4군의 색깔은 거의 유사하게 옅은 흰색을 나타내었음. 그리고 500℃ 및 600℃로 열처리한 제5군과 제6군은 짙은 흰색을 나타내었음. 그리고 마지막 단계에서 열처리를 행하지 않은 제3군은 순백색을 나타내었음.
- 즉, 새로운 공정에서 마지막 단계인 ⑤번 공정을 분석한 결과 오리부리의 껍질 입자에 유기물이 함유되어 있을 경우 500℃ 및 600℃로 열처리할 시 유기물이 탄화되어 부리 껍질이 흑색을 나타내어야 하지만 흰색을 나타냄으로써 유기물이 모두 제거된 것을 알 수 있었음.

○ 형태학적 특성 분석

- 제조된 시료의 형태학적 및 표면 특성은 scanning electron microscope (SEM, JSM-6700F, JEOL, Japan)을 이용하여 측정하였음.
- 이때 완전히 건조된 시료를 카본테이프 위에 고정시키고 금박 코팅하여 이들의 각 배율별 SEM 사진을 촬영하였음.

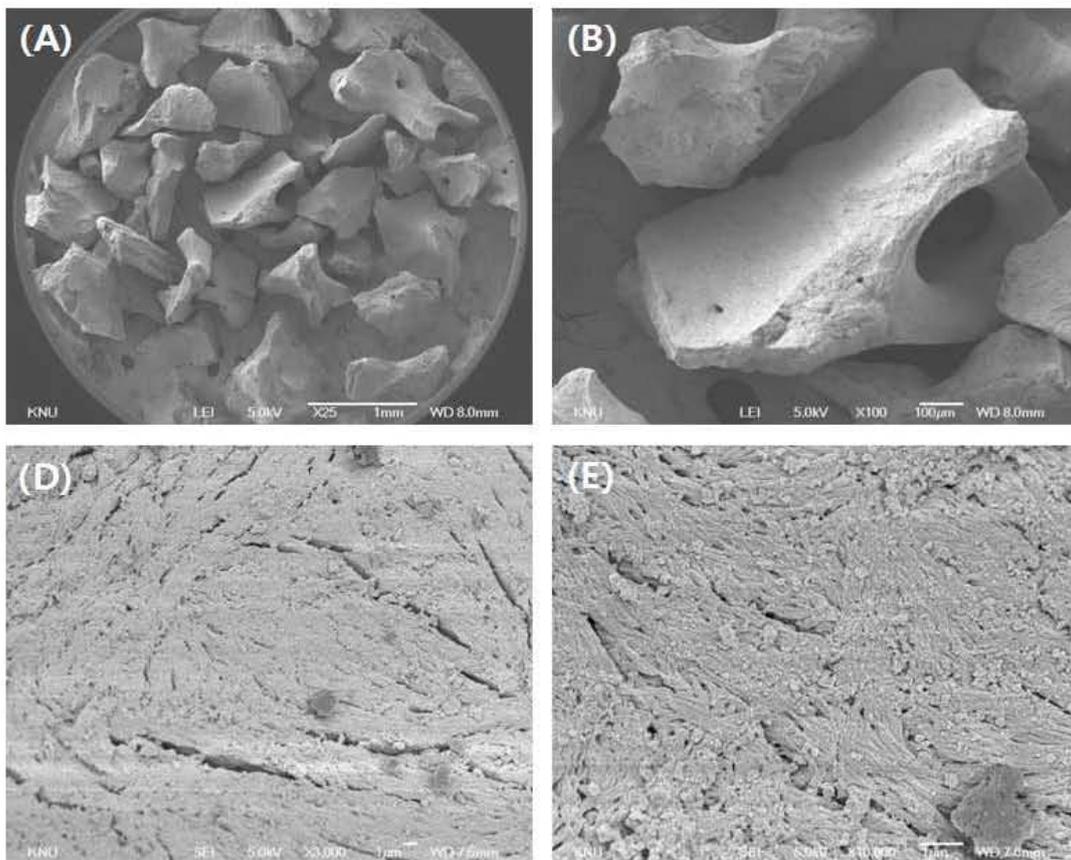


그림 1-95. 소 뼈 입자의 SEM 사진(제1군).

A, ×25; B, ×100; C, ×3,000; E, ×10,000.

- 제1군인 소 뼈 입자(그림 1-95)는 소 뼈에서 해면골만을 추출하여 제조한 제품으로 현재까지 국내 의에서 가장 널리 사용되고 있는 대표적인 골대체제용 생체재료(Bio-Oss[®])임.
- 저배율 SEM에서 해면골(스펀지 구조) 특유의 기공 구조가 나타나는 것을 확인하였고, 고배율 사진에서 입자의 표면은 나노수준의 세라믹 입자가 밀집되어 형성된 치밀한 표면이 형성되어 있음을 확인하였음. 또한 단백질 등 유기물 제거에 의한 meso pore들이 표면에 다수 형성되어 있는 것을

관찰하였음.

- 소뼈 입자의 제품은 탈지 및 탈단백 공정을 거쳐 300-400℃ 사이의 온도에서 장시간 (10시간이상) 열처리하며 제조되는 것으로 소 뼈를 구성하는 수산화인회석의 물성은 변화가 없는 것으로 알려져 있음.

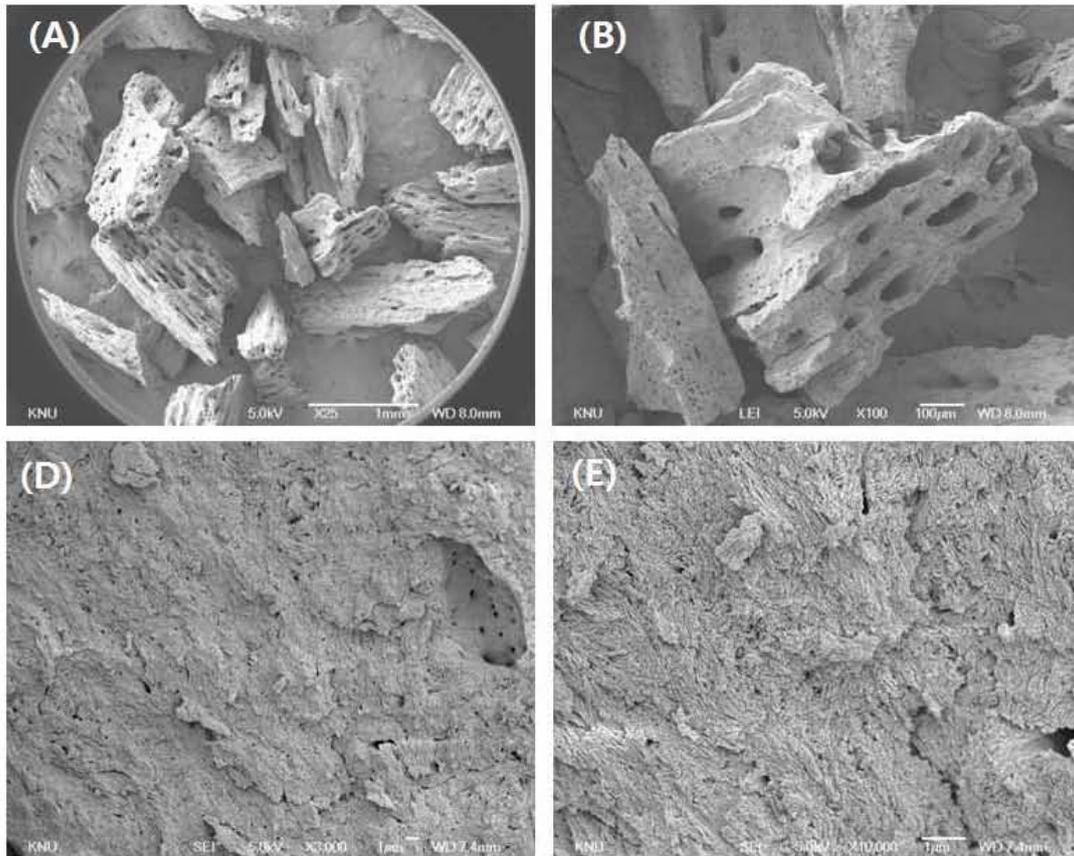


그림 1-96. 오리부리 뼈 입자의 SEM 사진(제2군).

A, ×25; B, ×100; C, ×3,000; E, ×10,000.

- 화학적 처리 후 400℃에서 열처리된 제2군 오리부리 뼈 입자(그림 1-96)는 소 뼈 입자와는 완전히 다른 형태를 나타내고 있으며 지금까지 보고된 세라믹 골대체재(동물 뼈, 폐각, 산호 등) 입자에서 볼 수 없었던 특이한 형태를 나타내고 있음.
- 입자 전체의 모양은 오리부리 뼈의 형태처럼 길쭉한 모양을 취하고 있으며 매크로 기공들이 입자 형태를 따라 길쭉하게 형성되어 있는 상호 연결된 기공구조가 관찰됨.
- 또한 입자의 내부 기질에서도 수많은 meso pore들이 관찰되었고 이는 혈관 또는 기타 유기물들이 제거되어 형성된 것으로 예측됨. 이러한 기공구조는 조직재생에 크게 유리한 방향으로 작용할 것

으로 판단됨.

- 고배율 SEM사진에서 100 nm 이하의 수산화인회석 결정들이 서로 응집되어 치밀한 표면구조가 형성되어 있는 것을 관찰하였고, 마이크로 및 나노 기공들이 표면에 상당량 존재하는 것을 관찰함.

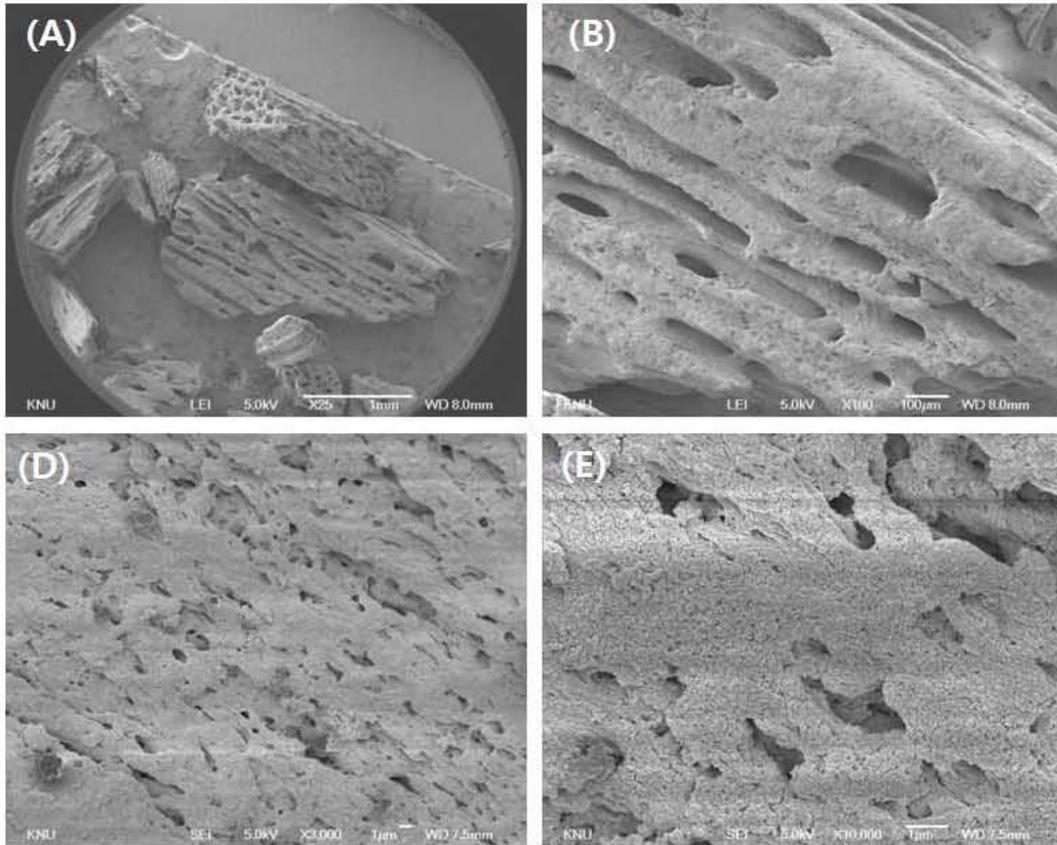


그림 1-97. 오리부리 뼈 입자의 SEM 사진(제3군).

A, ×25; B, ×100; C, ×3,000; E, ×10,000.

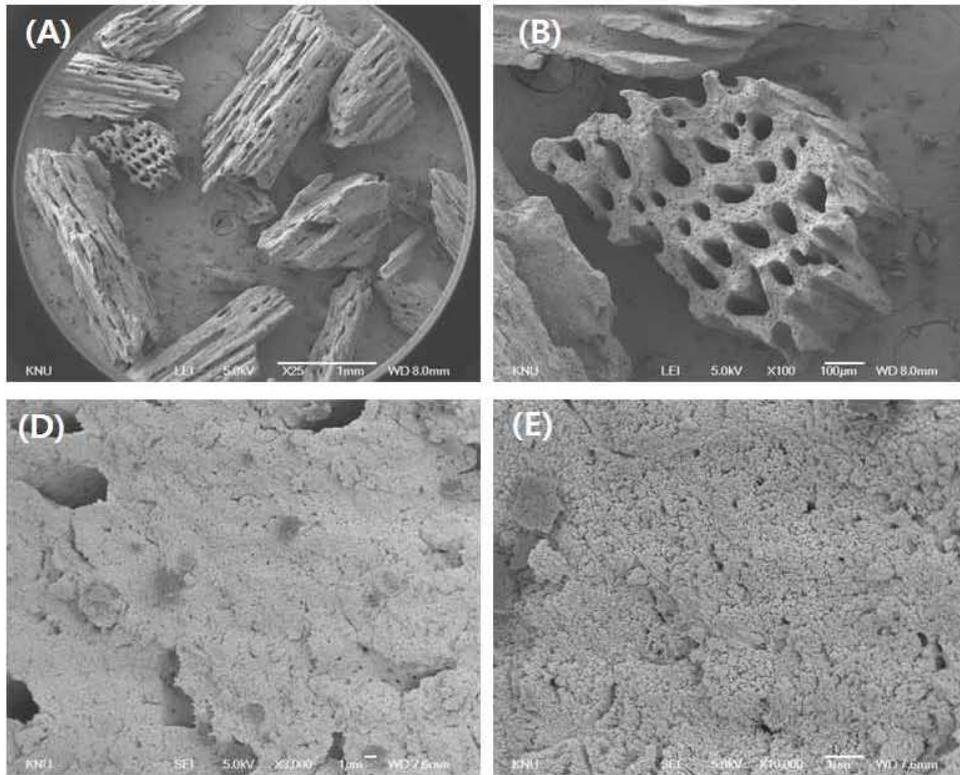


그림 1-98. 오리부리 뺨 입자의 SEM 사진(제4군).
A, $\times 25$; B, $\times 100$; C, $\times 3,000$; E, $\times 10,000$.

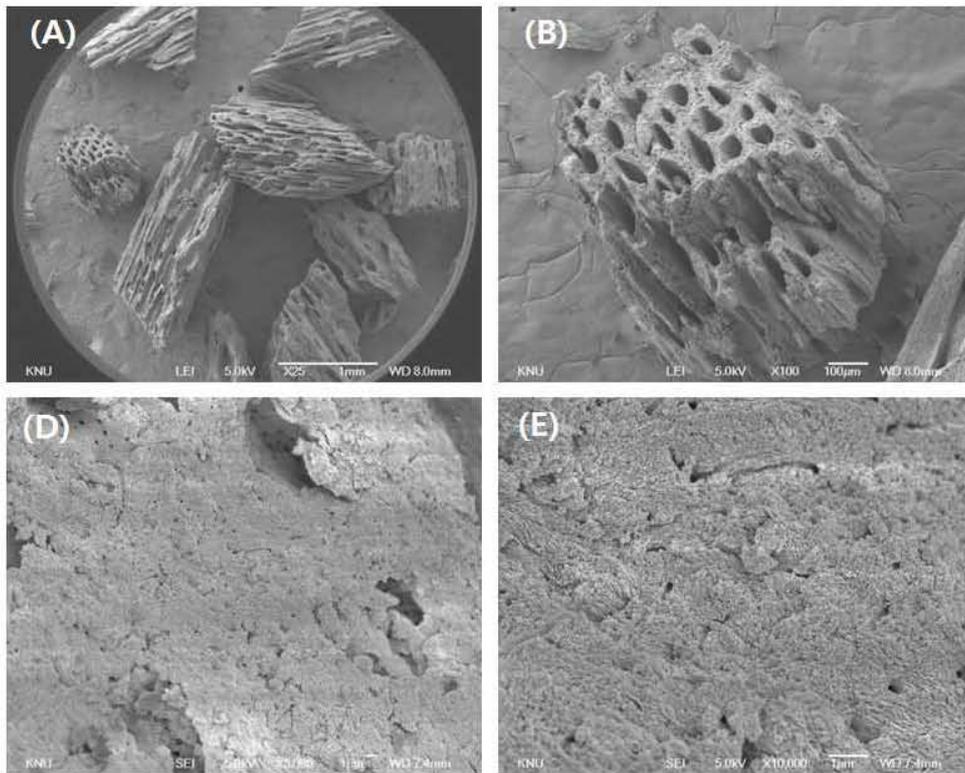


그림 1-99. 오리부리 뺨 입자의 SEM 사진(제4군).
A, $\times 25$; B, $\times 100$; C, $\times 3,000$; E, $\times 10,000$.

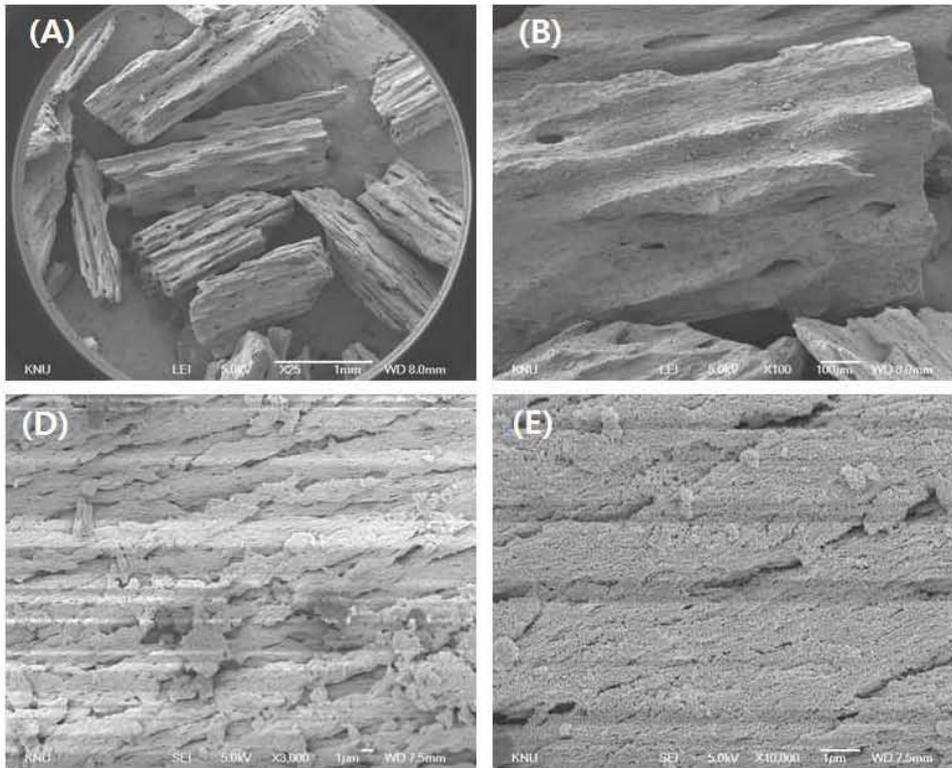


그림 1-100. 오리부리 뺨 입자의 SEM 사진(제4군).

A, ×25; B, ×100; C, ×3,000; E, ×10,000.

- 새로운 공정으로 제조된 제3군과 제4군 오리부리 뺨 입자는 제2군과 유사한 특성을 나타내었고 표면 또한 큰 차이가 없는 것을 관찰하였음. 그리고 고배율 사진에서 입자 표면에 수산화인회석 그레인(grain) 이외에 어떠한 이물질도 관찰되지 않았음.
- 제4군 오리부리 뺨 입자의 경우 저배율 SEM 사진에서 입자의 형태는 다른 시료와 차이가 나지 않았으나 고배율 SEM 사진에서는 약간의 차이를 나타내었음 (그림 1-100). 즉, 표면의 수산화인회석 그레인들이 길이방향으로 늘어선 표면 형태를 나타내었고, 다른 시료 대비 표면이 좀 더 치밀한 구조가 나타남을 관찰하였음. 이는 600℃의 열처리에 의해 수산화인회석의 결정화가 어느 정도 진행되어 나타나는 결과로 생각됨.
- 요약하면, 새로운 공정으로 제조된 오리부리의 뺨 입자는 기존 처리 방법과 동일하게 부리 형태와 같은 길쭉한 방향으로 입자화 되었고 많은 macro 및 meso 기공들이 입자방향으로 형성되어 있었음. 원형의 macro 기공들은 부리 뺨 방향으로 벌집형태를 나타내었고 서로 연결된 열려진 다공성을 나타내었음.

- 새로운 공정에서 열처리 온도가 500℃ 이하인 경우 수산화인회석 세라믹 입자들이 불규칙하게 밀집된 표면과 마이크로 기공들이 형성되어 있는 것을 관찰하였고 열처리 온도가 600℃일 경우 세라믹 입자의 결정화에 의한 과립 크기가 커지면서 부리 뼈 방향으로 정렬 되는 현상 및 보다 치밀한 표면형태가 나타남을 관찰하였음.
- 이러한 내부 및 표면구조는 지금까지 보고된 바 없는 독특한 구조로서 골대체재용 세라믹 소재로서 활용하기에 충분한 장점이 있는 것으로 파악됨. 또한 새로운 공정으로 제조된 오리부리 뼈 입자는 기존 공정으로 제조된 부리 뼈 입자와 형태학적 및 표면구조가 동일하였음.

○ 표면원소 분석

- 제조된 오리부리의 뼈 입자 실험군의 표면 원소 분석은 x-ray photoelectron spectroscopy (XPS, Quantera SXM, ULVAC-PHI, 일본)을 이용하여 측정하였음.
- 이때 조건은 Al K α ($h\nu = 1486.6$ eV, 25 W, 15 kV)선을 이용하여 pass energy 13.00 eV, beam size 100 μm 으로 측정하였고 photoelectrons의 emission angle은 45°로 유지하여 시료의 데이터를 얻었음.
- 새로운 공정으로 제조된 오리부리 뼈 입자에서 유기물이 완전히 제거되지 않았을 경우 아미노기에 의한 질소 원자가 나타날 수 있으므로 이의 확인을 위해 표면원소분석을 시행함.

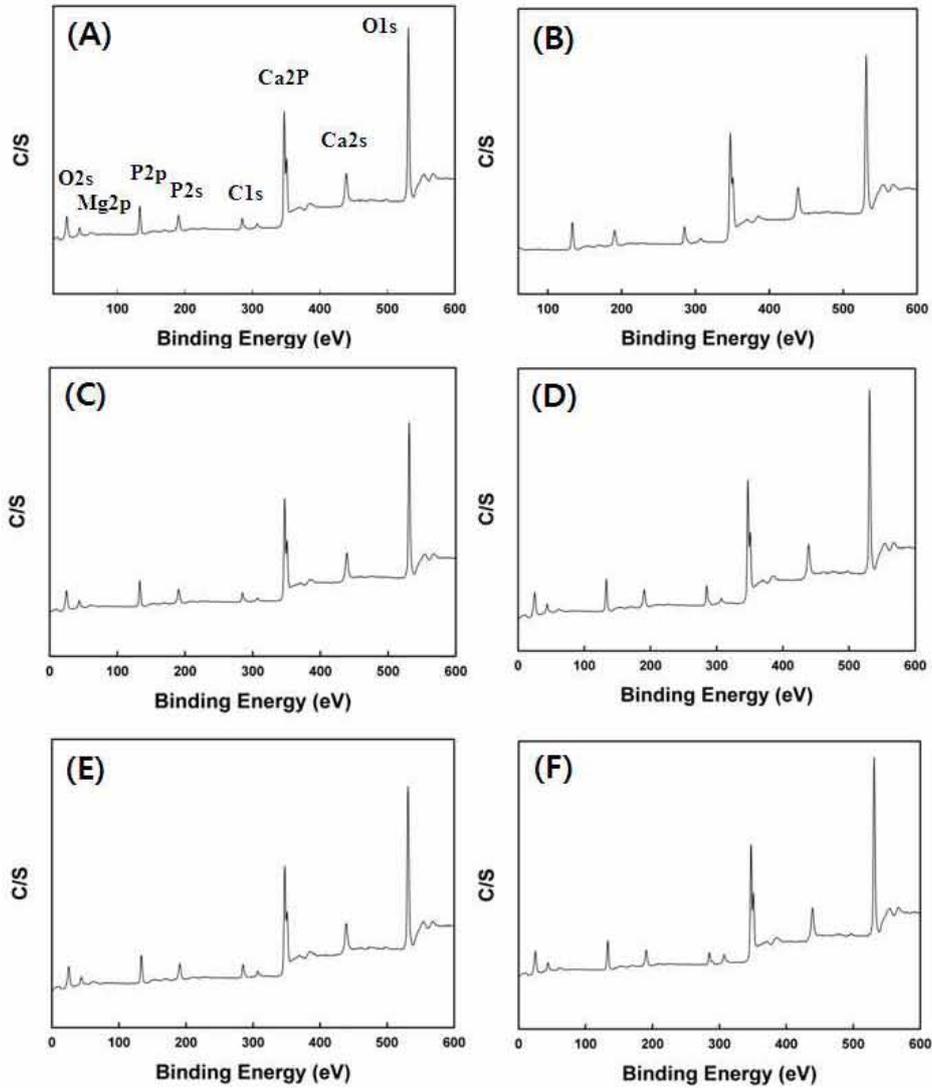


그림 1-101. 각 시료별 XPS의 스펙트럼.
(A, 제1군; B, 제2군; C, 제3군; D, 제4군; E, 제5군; F, 제6군)

- 먼저 모든 실험군에서 아미노기에 의한 질소 원소가 검출되지 않았음. 즉, 새로운 공정으로 제조된 오리부리 뼈 입자에서 유기물이 모두 제거되었다는 것을 나타냄. 따라서 유독한 화학약품을 사용하지 않고도 과산화수소와 열처리를 통해 유기물을 모두 제거할 수 있다는 새로운 공정의 유효성을 확인하였음.
- 소뼈의 입자는 탄소(C), 산소(O), 칼슘(Ca), 인(P)이 확인되었고, 소량의 마그네슘(Mg)와 검출되었지만 기타 중금속은 검출되지 않았음 (표 1-15).

표 1-15. 각 시료별 표면 원소의 함량

실험군	C (%)	O (%)	Ca(%)	P(%)	Mg(%)
제1군	11.8	57.6	17.2	11.7	1.7
제2군	11.8	57.9	17.5	11.9	0.9
제3군	16.2	55.0	16.6	11.5	0.7
제4군	10.6	58.5	17.7	12.6	0.6
제5군	16.7	54.2	16.5	11.7	0.9

- 오리부리의 뼈 입자는 소 뼈 입자와 같이 탄소, 산소, 칼슘, 인, 마그네슘 원소 피크가 확인되었고 소 뼈와 마찬가지로 중금속에 의한 원소 피크는 나타나지 않았음.
- 소량의 마그네슘은 신생골 형성에 필수적인 미네랄임. 소 뼈 및 오리부리 뼈 입자 모두에서 마그네슘이 검출되었고, 이는 소 뼈 입자와 마찬가지로 부리 뼈 입자를 인체에 적용할 경우 골형성에 유리한 영향을 미칠 것으로 판단됨.
- 각 실험군별 표면 원소 함량은 소 뼈 입자와 오리부리 뼈 입자가 크게 차이가 없었음.
- 따라서, 화학적 방법으로 제조된 기존 제조방법 및 신규 공정으로 제조된 오리부리 뼈 입자의 표면에서 같은 원소가 유사한 함량비로 나타남으로 신규 공정의 유효성을 다시 한 번 확인할 수 있었음.
- XPS의 결과를 요약하면 제조된 오리부리의 뼈 입자에는 유기물에 대한 피크가 존재하지 않았고 기타 중금속과 같은 이물질은 검출되지 않았음. 또한 골형성에 필수적인 마그네슘과 확인됨으로써 새로운 천연자원으로부터 제조된 생체세라믹으로 조직재생에 충분히 활용할 수 있는 안전한 재료임을 확인하였음.

○ 표면 작용기의 분석

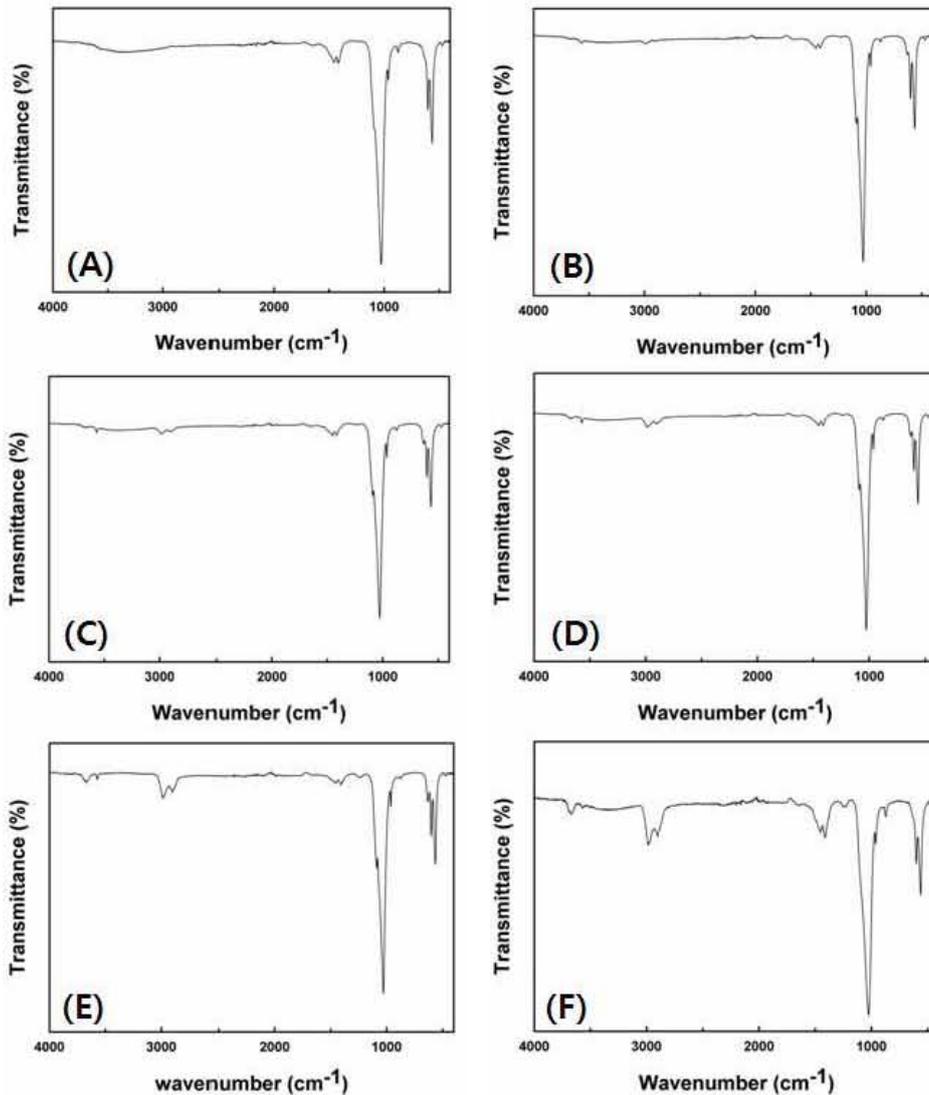


그림 1-102. 각 시료별 FTIR 스펙트럼.
(A, 제1군; B, 제2군; C, 제3군; D, 제4군; E, 제5군; F, 제6군)

- 새로운 공정으로 제조된 오리부리의 뼈 입자의 표면 화학적 작용기 분석은 attenuated total reflectance fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy (IRPrestige-21, Shimadzu, Japan)로 분석하였음.
- 이때 조건은 분해능을 4.0 cm^{-1} 로 하고 scan수를 30으로 하여 측정하였음. 각 시료 입자들은 막자사발을 이용하여 최대한 분쇄하여 스펙트럼을 얻었음 (그림 1-102).

- 각 시료에 대한 작용기를 확인하기 위하여 측정된 FTIR 스펙트럼에서 각 시료에 대한 특성 피크를 살펴보면 1026-1027 cm⁻¹에서 P-O stretching (ν₃), 962 cm⁻¹에서 P-O stretching (ν₄, symmetric), 3573 cm⁻¹에서 OH stretching, 1416-1456 cm⁻¹ 그리고 872 cm⁻¹에서 카보네이트 그룹(CO₃²⁻)에 의한 피크를 확인함으로써 아파타이트에 대한 특성피크임을 알 수 있었음.
- 따라서 모든 실험군에서 수산화인회석과 유사한 피크가 나타남을 확인할 수 있었음. 그리고 아미노기 또는 기타 유기물에 의한 특성피크가 관찰되지 않아 신규 공정으로 제조된 오리부리 뼈 입자에서 유기물이 모두 제거되었다는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었음.

○ 결정화도의 분석

- 제조된 오리부리 뼈의 입자 결정특성의 분석은 XRD (x-ray diffractometer, Rigaku, Max-2500, 일본)을 사용하여 분석하였음.
- 이때 측정조건은 Cu Kα x-ray를 이용하여 40 kV, 200mA에서 2°/min으로 하여 2θ 5도에서 60도 범위를 측정하였음. 그리고 이들 시료의 결정크기는 아래의 Scherrer 방정식을 이용하여 분석하였음.

$$D = \frac{0.94 \lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta}$$

- 여기서 D는 결정의 크기(domain size)이고, λ는 입사 x-ray 파장, β_{1/2}는 특정 회절 피크 (211)의 반가폭, θ는 최대 피크에서의 회절각임.
- 제조된 시료의 XRD 스펙트럼에서 소 뼈 입자는 2 theta가 10, 21, 22, 25, 28, 31, 32, 34, 39, 42, 43, 46, 49도에서 특성피크가 나타나고 있는 것을 확인하였으며, 이는 JCPDS File No. 9-432와 일치하는 것으로 순수 하이드록시아파타이트(HA)와 동일한 회절피크임을 확인하였음.

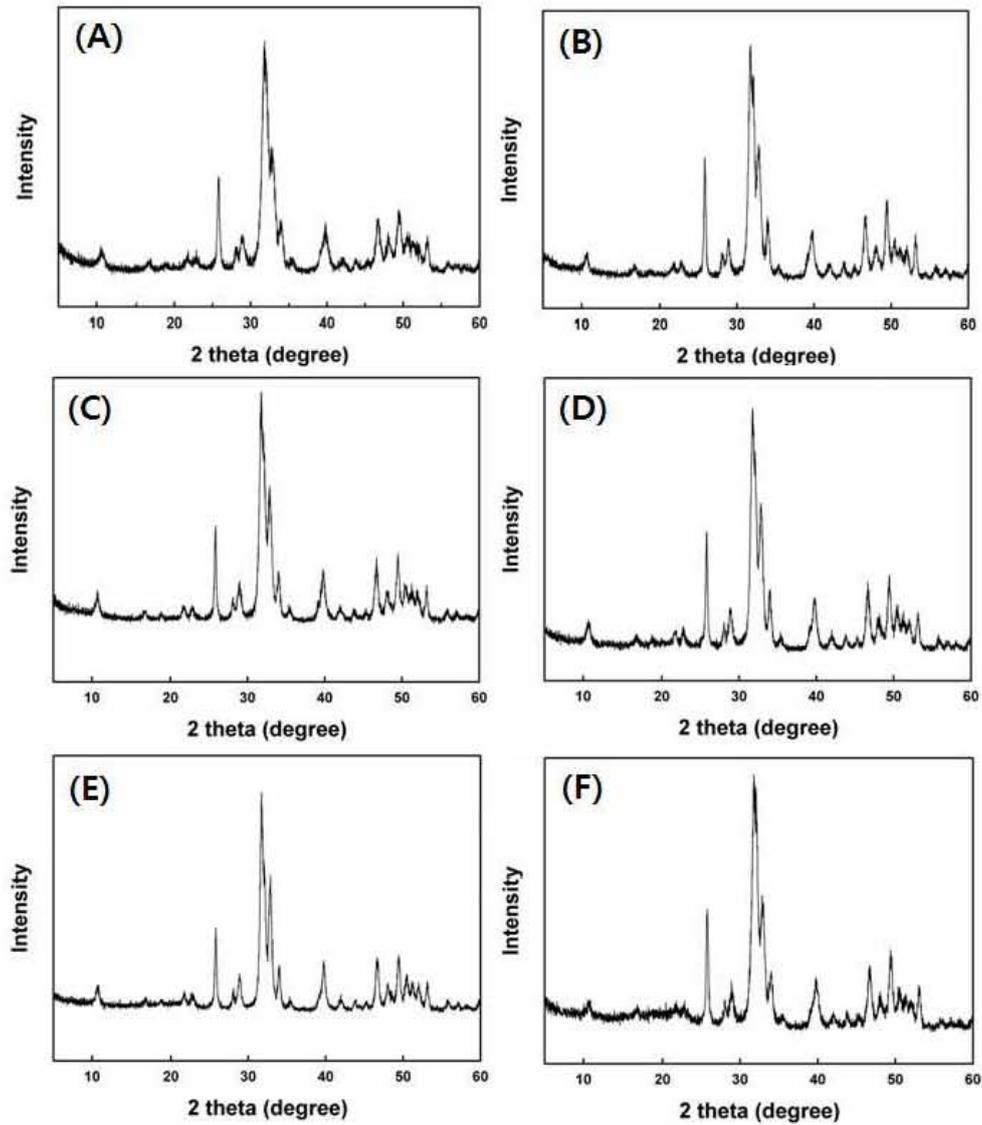


그림 1-103. 각 시료별 FTIR 스펙트럼.
(A, 제1군; B, 제2군; C, 제3군; D, 제4군; E, 제5군; F, 제6군)

• 또한, 회절피크가 대체적으로 broad한 특성을 나타냄으로서 저결정의 HA임을 확인하였음. 그리고 기존 공정으로 제조된 제2군 오리부리 뼈 입자도 소 뼈와 동일한 결정회절 피크를 보였음 (그림 1-103).

※ HA에 대한 JCPDS NO. 9-432 회절각: 21, 22, 25, 26, 28, 31, 32, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49 (2 theta) (그림 1-104).

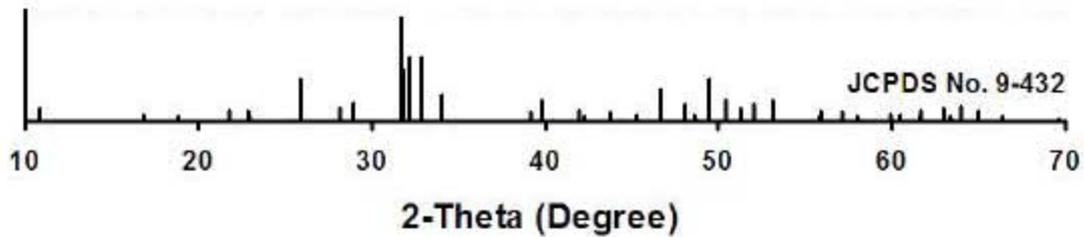


그림 1-104. HA에 대한 JCPDS No. 9-432 XRD 회절피크
[출처: Herliansyah et al., APIEMS 2012 1137-1146].

표 1-16. Scherrer 방정식을 이용한 실험군의 결정크기

실험군	반가폭 (FWHM)	Crystal Size (211) (Å)
제1군	0.809	2.10
제2군	0.920	1.85
제3군	0.886	1.92
제4군	0.855	1.99
제5군	0.648	2.62
제6군	0.594	2.87

- 새로운 공정으로 제조된 시험군 또한 다른 대조군과 동일한 결정회절 피크가 나타났으나 소 때 대비 회절피크의 강도가 다소 강하고 sharp한 피크를 나타내어 열처리에 의한 결정화도의 증가를 예측할 수 있었음.
- 이들 시료의 회절피크에서 2 theta 31.7 의 211면에 대한 결정크기를 scherrer 방정식으로 구하여 (표 1-16)에 나타내었음.
- 제1군 소 때 입자의 결정크기는 2.1 Å 및 제2군 화학적 처리 오리부리 때 입자의 결정크기는 1.85 Å으로 나타났음. 즉, 유사한 처리과정에서 소 때 입자 대비 오리부리 때 입자의 결정크기가 작은 것을 알 수 있었음.
- 기존 공정인 제2군과 새로운 공정인 제3군 부리 때 입자의 결정크기는 제3군의 결정크기가 증가하여 나타났음. 이는 신규 공정에서 400℃ 열처리 시간이 기존 공정보다 길기 때문인 것으로 판단됨.

- 새로운 공정인 제3군과 제4군의 오리부리 뼈 입자 결정크기는 제4군이 400℃에서 열처리를 한 번 더 시행한 결과로 증가한 결과를 나타내었음.
- 그리고 500 및 600℃로 열처리한 제5군과 제6군의 부리 뼈 입자 결정크기가 열처리에 의해 크게 증가하였음. 이는 500℃ 이상에서 오리부리 뼈를 구성하는 수산화인회석의 결정화가 크게 증가하는 것으로 판단할 수 있음.
- 고결정성을 갖는 수산화인회석의 경우 기계적 물성은 상승하는 반면 인체 이식시 인체 뼈와 비교해서 흡수되기가 상당히 어려움. 즉 생분해도가 많이 저하되는 특징을 나타냄.
- 그러므로 결정화도의 정도를 조절하여 인체 뼈와 유사한 흡수속도를 갖는 골대체제가 이상적인 세라믹이라 할 수 있음.
- 따라서, 적절한 열처리 온도와 시간을 설정한다면 생분해도가 제어된 적용하고자 하는 부위에 인체 맞춤형 수산화인회석의 제조가 가능하고, 이는 오리부리의 뼈 입자의 용도 전개측면에서 (치과 및 외과용) 상당히 유리한 장점이 될 것으로 전망됨.
- 결론적으로 오리부리 뼈를 구성하는 수산화인회석의 물성변화(결정화 등) 없이 부리 뼈 입자를 제조하기 위해서는 제3군 또는 제4군과 같은 공정이 바람직할 것으로 판단됨.

○ 결 론

- 새로운 공정으로 제조된 오리부리 뼈 입자는 화학적 방법으로 제조된 부리 뼈 입자와 형태학적 및 표면구조에서 차이가 없었음.
- 단지, 새로운 공정으로 제조된 부리 뼈 입자의 거시적인 유기물 확인을 위해 시행된 500 및 600℃의 열처리 공정에서 잔유 유기물 탄화에 의한 색깔 변화가 나타나지 않았으나 열처리에 의한 표면 미세구조는 좀 더 치밀해지는 결과를 보였음.
- 새로운 공정으로 제조된 오리부리 뼈 입자는 표면원소 및 작용기분석에서 아미노기에 기인한 피크를 확인할 수 없었으며 소 뼈 입자 및 기존 방법으로 제조된 부리 뼈 입자와 유사한 표면 원소 및 함량, 작용기가 나타남을 확인할 수 있었음.
- 새로운 공정에서 열처리 온도의 상승은 오리부리 뼈를 구성하는 수산화인회석의 결정크기의 증가를 유발하였지만 소 뼈 입자와 유사한 결정크기를 보여주었음.

- 따라서 새로운 공정은 기존 공정의 많은 문제점, 즉 유독한 화학약품 잔류, 오랜 제조 기간, 환경문제, 인체 유해문제 등을 근본적으로 해결할 수 있는 유익한 방법이 될 것으로 판단되며 이 방법으로 제조된 부리 뼈 입자는 안전성 및 경제성이 확보된 유익한 골대체재로 충분히 활용 할 수 있음을 알 수 있었음.

- 새로운 제조공정에 대한 특허 출원.

특허명: 친환경적 공정으로 제조된 가금류 부리 뼈 유래 천연세라믹 및 이의 제조 방법
출원국: 대한민국 특허청, 출원번호: 10-2014-0146052).

나. 오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 신공정의 생체적합성 검사

(1) 목적

- 오리부리의 뼈 유래 생체소재를 새로운 제조공정에 따른 골 형성능을 비교 분석하기 위하여 랫드의 두개골에 임계 골결손부를 유발하여 생체소재를 이식하여 동물실험을 하였음.
- 이식 12주 후에 micro-CT 촬영으로 이식부위를 영상으로 확인하고, 신생골의 단면적을 확인하고자 하였음.
- Skyscan 1176 (SkyScan, Kontich, Belgium)을 이용하여 촬영하였고, 촬영조건은 65 kVp의 전압과 378 uA의 X-ray 강도, 1 mm 알루미늄 필터, 18 um 해상도로 하였음.

(2) 실험군의 분류

생체소재의 제조공정에 따라 다음과 같이 실험군을 분류하였다.

- 제1 실험군 (Control): 임계골 결손부부위에 아무것도 이식하지 않음.
- 제2 실험군 : 상업용 Bio-Oss 이식 군
- 제3 실험군 (S1): 화학처리 후 400°C에서 20시간 처리한 군
- 제4 실험군 (S2): H2O2 처리 후 저온 400°C에서 20시간 처리한 군
- 제5 실험군 (S3): 화학처리 후 고온 1200°C에서 3시간 처리한 군

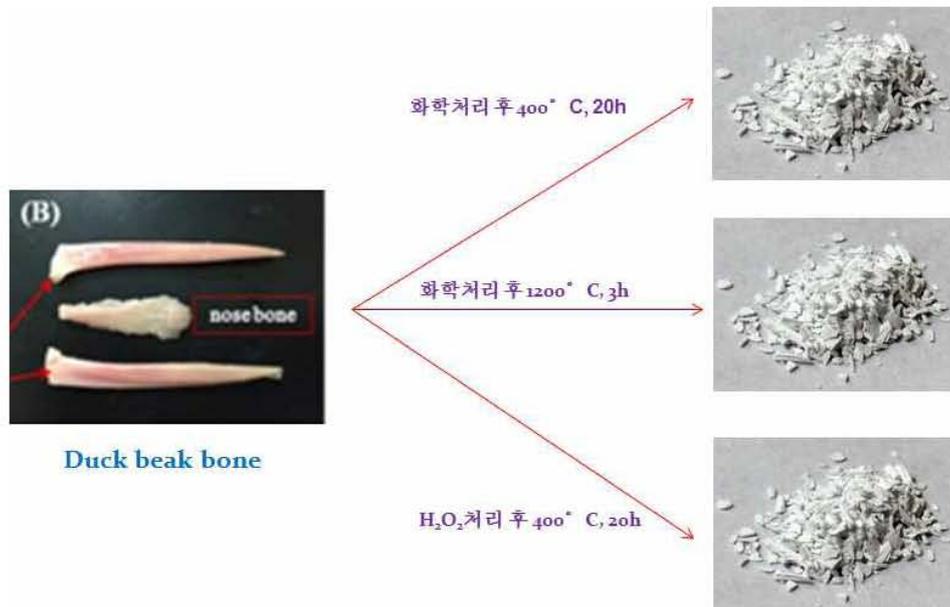


그림 1-105. 오리부리의 뼈 입자의 새로운 제조공정에 따른 실험군의 분류

(3) 오리부리의 뼈 유래 생체소재의 준비

- 각각의 제조공정별로 오리부리의 뼈 유래 생체소재를 SD 랫드의 두개골 임계 결손부에 이식하기 전에 결손부에 이식할 양인 50 ul를 eppendorf tube에 필요한 수만큼 나누어 담았다.
- 오리부리의 뼈 유래 생체소재 속까지 침투하여 멸균될 수 있도록 70% alcohol을 500 ul를 넣고 30분간 침지시켰다.
- 침지 30분 후 alcohol을 제거하고 남은 alcohol을 제거하기 위하여 PBS를 이용해 5분씩 3번 세척하였다.

(4) SD 랫드의 두개골 임계 골결손의 질환모델 동물 개발

- 생후 9주령의 SD 랫드를 이식술을 하기 1주일전에 실험동물실에 반입하여 적응기간을 거쳤다. 사료와 물은 자유롭게 급식하였다.
- 25마리의 랫드를 대조군(control)과 S1군 (화학처리 후 400°C, 20시간), S2군 (화학처리 후 1200°C, 3시간), S3군 (H₂O₂ 처리 후 400°C, 20시간)으로 분류하였다.
- 수술을 위한 마취제로 50 mg/kg의 Zoletil과 5 mg/kg의 Rompun을 병용하여 사용하였다. 그리고 진통제인 3 mg/kg의 tramadol와 항생제인 12 mg/kg의 amoxicillin을 수술 전 약물로 사용하였다.
- 마우스를 복와위로 위치시키고 수술부위를 제외하고 멸균수술포를 이용해 수술부위를 준비하였다. 수술부위를 포비돈과 알코올을 이용해 소독하고 10호 블레이드를 이용해

- 피부와 골막을 절개하고 골막거상기를 이용하여 골막을 벗겼다.
- 8 mm Trehine burr를 이용하여 지름 8 mm 크기의 골 결손을 유발하였다. Trehine burr의 작동에 의한 열로 조직이 손상되지 않도록 생리식염수를 계속 점적하였다.
 - 멸균하여 준비한 오리부리의 뼈 입자를 양쪽에 결손부에 채워 넣은 후 5-0 흡수성 봉합사를 이용해 피하조직을 봉합하고, 5-0 비흡수성 봉합사를 이용해 단순 단속 봉합하였다. 수술부위는 포비돈으로 소독하였다.

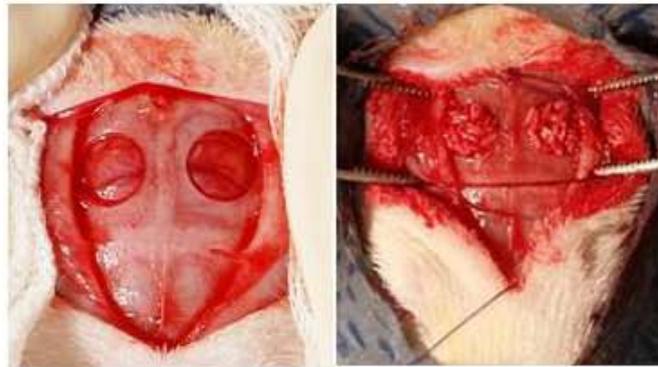


그림 1-106. 랫드 두개골 임계 골결손부에서 오리부리의 뼈 입자 이식

(5) 골결손 유발 모델동물을 통한 생체적합성 시험

- 오리부리의 뼈 입자를 이식한 후 4주와 8주째에 희생하기 전 랫드에서 이식과 관련하여 발생하는 임상증상이 있는지 관찰함.

(6) Micro-CT 분석

- 골 형성능을 평가하기 위하여 micro-CT로 분석하였다. 4주 및 8주째에 랫드를 희생하여 이식부위 조직을 채취하고 micro-CT (Skyscan, Aartselaar, Belgium)를 촬영하여 분석함.
- 이식 후 12주째에 수술한 랫드를 isoflurane으로 과마취하여 안락사한 후 병리부검을 통해 오리부리의 뼈 입자를 이식한 두개골조직을 채취하였다.
- 채취한 조직은 micro-CT로 촬영하기 전까지 보관하기 위하여 10% formaldehyde에 고정하고 하루 뒤 신선한 고정액으로 교체한 후 냉장고에 보관하였다.
- 촬영 중 건조되어 조직이 수축하여 촬영이미지에 영향을 주는 것을 막기 위하여 조직을 랩으로 감싸서 촬영을 진행하였다.
- 촬영이 끝난 후 3D 이미지 데이터를 Skyscan NRecon software를 이용해 재건하였고, 재건된 이미지들은 Skyscan CT Analyzer software를 이용하여 분석하였다.

(7) 생체적합성 관찰 및 판정

- 골이식재의 빠른 흡수나 주변골의 흡수 등은 보이지 않았으며 골소실부위 주변으로부터의 신생골 형성이 관찰되는 것으로 보아 랫드에서의 염증 또는 다른 임상 증상을 발생시키지 않으면서 골이식재로서 잘 작용하고 있는 것으로 관찰됨.
- 오리부리의 뼈 골이식재를 랫드에 이식 후 4주 및 8주째에 촬영한 micro-CT에서 골이식재인 BioOss와 유사한 양상을 나타냈음.
- 이식 후 12주차에 골형성능을 micro-CT로 분석한 결과 400℃에서 처리한 군들과 비교할 때 1200℃에서 3시간 가공한 샘플이 가장 높은 골형성능을 나타내었다.
- 뼈를 가공하는 온도에 따라서 뼈의 구성비율이 달라지는데 1200℃에서 가장 훌륭한 골형성능을 가지는 구성 비율인 HA : β -TCP = 7 : 3 임 (Miculescu 등, 2012).
- 400℃에서 처리한 두 처리군에서 과산화수소에서 초기 처리한 군이 좀 더 높은 골형성능을 나타냄을 확인하였다.
- 결론적으로 1200℃로 가공하였을 경우 400℃ 보다 더 높은 골형성능을 가질 수 있음을 확인할 수 있었으며 과산화수소 처리 후 1200℃에서 가공할 경우 화학처리를 했을 경우보다 더 높은 결과가 나타났다.
- 오리부리의 뼈 입자를 이식 후 12주째에 촬영한 micro-CT의 단면 영상결과에서 (그림 1-109)는 단면 사진과 이를 색채화하여 나타낸 사진으로, 랫드의 뼈는 노란색으로 오리부리의 뼈 입자는 파란색으로 나타났다.

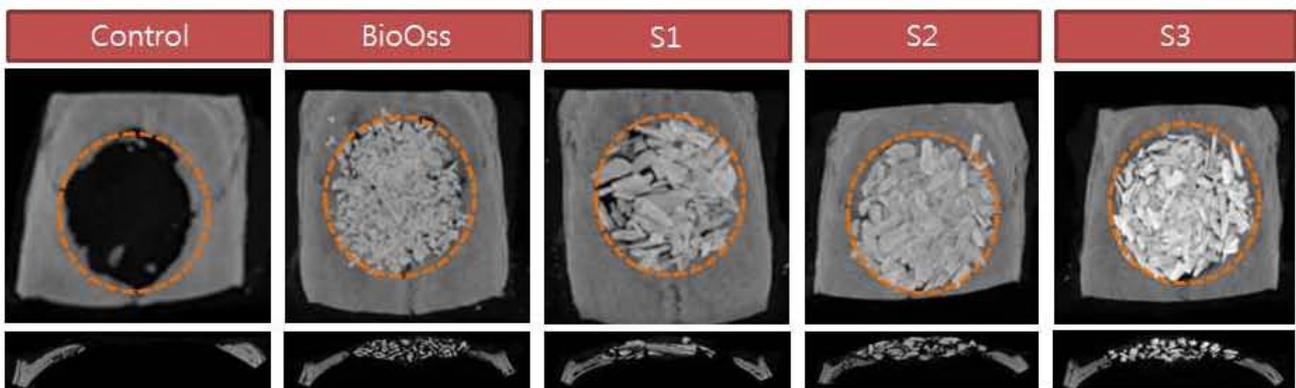


그림 1-107. 오리부리의 뼈 골이식재를 이식 4주째에 촬영한 micro-CT 3차원적 사진.

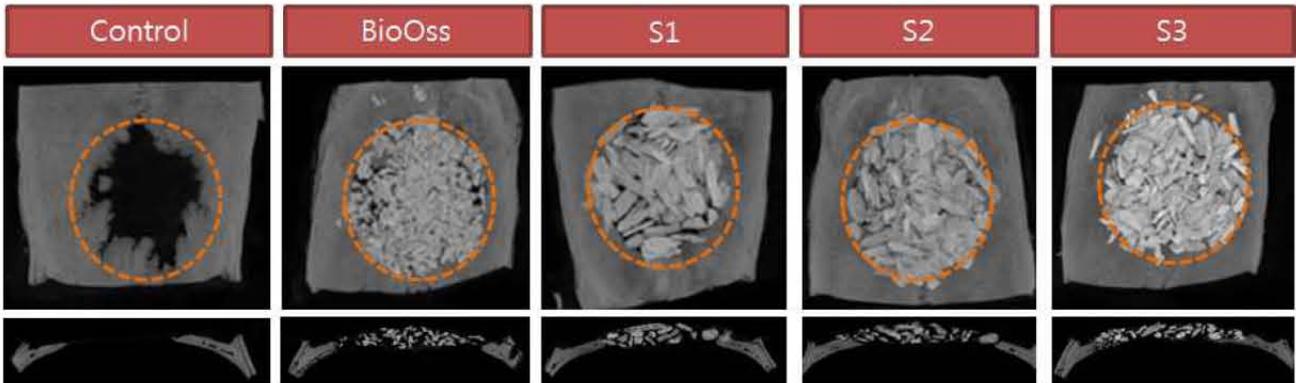


그림 1-108. 오리부리의 뼈 골이식재를 이식 8주째 촬영한 micro CT 3차원적 사진.

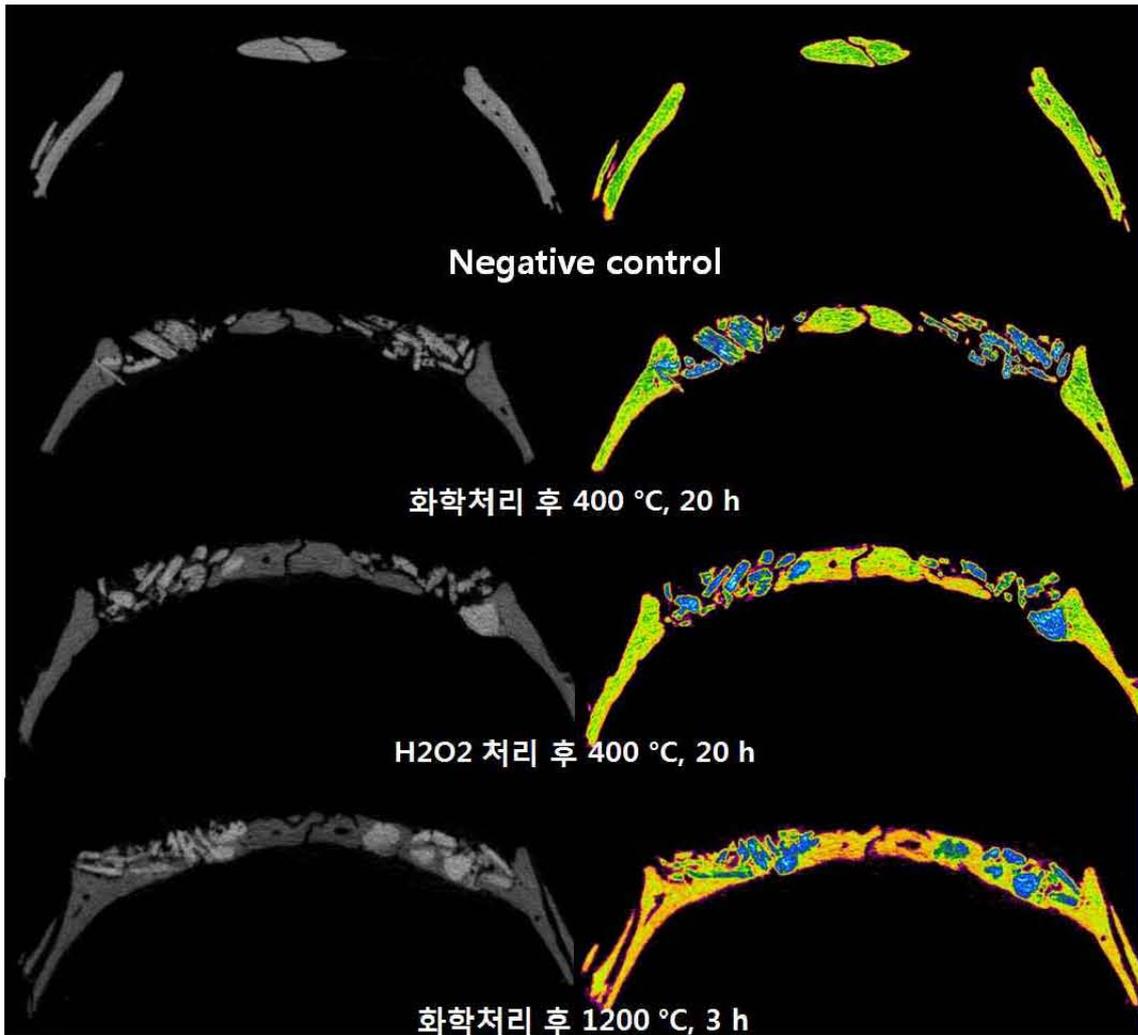


그림 1-109. 랫드의 두개골 골결손 모델에서의 micro-CT로 분석한 오리부리의 뼈 입자

이식부의 단면

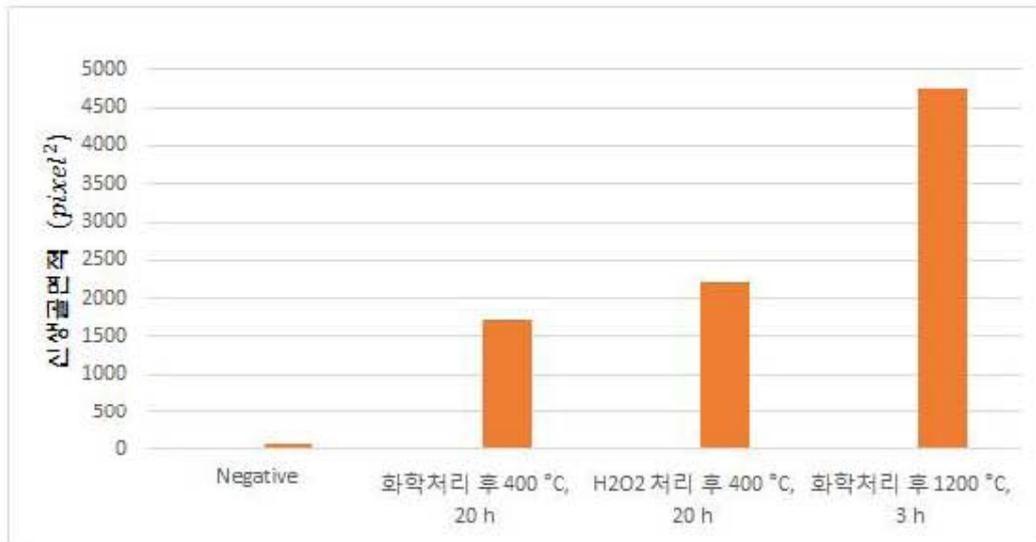


그림 1-110. 랫드의 골결손부에서 신생된 뼈의 단면적.

6. 시제품의 물리학적 성질 및 생물학적 안전성 평가

가. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 무균 시험

- 시험규격
 - 대한약전(大韓藥典) 일반시험법의 무균시험법(無菌試驗法)
- 시험장비
 - Autoclave (JSAC-80T, JS Research Inc., Korea)
 - Shankling incubator (VS-8480S, VISION SCIENTIFIC Co., Ltd, Korea)
 - 클린 벤치 (VS-1400LSN, 비전과학, Korea)
 - Micropipet (200 μ l), GILSON, Inc., USA)
- 시험물질 및 재료
 - 시험물질(duck bone) : 8개
 - 배양균주
 - (1) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)

- (2) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)
- (3) *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404)
- (4) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
- (5) *Candida albicans* (ATCC 10231)
- (6) *Aspergillus niger* (ATCC 16404)

- 배지

- (1) Fluid thioglycollate medium (DIFCO, USA)
- (2) Tryptic Soy Broth (DIFCO, USA)

- 삼각 플라스크 (250 ml)

- 시험관 (70 ml)

• 배지제조

- Validation test : Fluid thioglycollate medium 3 g과 Tryptic Soy Broth 3 g을 각각 증류수 100 ml에 녹인 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.
- 직접법 : Fluid thioglycollate medium 0.9 g과 Tryptic Soy Broth 0.9 g을 각각 증류수 30 ml에 녹인 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

• 실험방법

1) Validation test

- Duck bone를 넣은 시험군에 균주를 균종마다 100개 이하를 접종하였고, 대조군에는 duck bone 용액을 넣지 않은 배지성능 시험배지를 넣고 규정 온도 (25℃ 및 35℃)에서 5일간 각각 배양하였다 (표 1-17).
- 배양한 후 육안으로 관찰하여 시험군이 대조군과 비슷하게 미생물이 증식되었으면 항균성이 없거나 항균활성이 충분히 제거된 것으로 판단하였다.

표 1-17. Validation test의 시험균주와 배양온도

	배 지	배양온도	시험 균주	비고
대조균 (Control)	Fluid thioglycollate medium	35℃	<i>S. aureus</i>	
			<i>P. aeruginosa</i>	
			<i>C. sporogenes</i>	
	Tryptic Soy Broth	25℃	<i>B. subtilis</i>	
			<i>C. albicans</i>	
			<i>A. niger</i>	
시험균 (Duck bone)	Fluid thioglycollate medium	35℃	<i>S. aureus</i>	
			<i>P. aeruginosa</i>	
			<i>C. sporogenes</i>	
	Tryptic Soy Broth	25℃	<i>B. subtilis</i>	
			<i>C. albicans</i>	
			<i>A. niger</i>	

• 실험 결과

- Validation test에서는 아래와 같이 시험균 (duck bone)의 세균증식이 대조균과 비슷하게 나타남 (표 1-18).
- Validation test에서 시험균과 대조균이 서로 비슷하게 미생물이 증식되었으므로 오리부리의 뼈 유래 생체소재(duck bone)는 본 시험에서 항균성이 없거나 항균활성이 충분히 제거된 것으로 판단됨.

표 1-18. Validation test에서 시험균의 세균증식의 결과

시험 균주	시험균의 세균증식	판정
<i>Staphylococcus aureus</i>	대조균과 비슷함	적합
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	대조균과 비슷함	적합
<i>Clostridium sporogenes</i>	대조균과 비슷함	적합
<i>Bacillus subtilis</i>	대조균과 비슷함	적합
<i>Candida albicans</i>	대조균과 비슷함	적합
<i>Aspergillus niger</i>	대조균과 비슷함	적합

2) 무균시험 (직접법)

- Fluid thioglycollate medium에서는 35℃ (그림 1-111)에서 배양하였고, Tryptic Soy Broth에서는 25℃ (그림 1-112)에서 각각 14일간 배양하였다 (표 1-19).

- 배양기간 동안 세균의 증식 유무를 관찰하였다.

표 1-19. 무균시험에 사용한 배지와 배양온도

	배지	배양온도	비고
대조군 (Control)	Fluid thioglycollate medium	35℃	
	Tryptic Soy Broth	25℃	
시험군 (Duck bone)	Fluid thioglycollate medium	35℃	
	Tryptic Soy Broth	25℃	

표 1-20. 무균시험에서 세균증식의 결과

세균 증식 시간	배 지	시험결과	
		대조군 (Control)	시험군 (Duck bone)
7일	Fluid thioglycollate medium	무증식	무증식
	Tryptic Soy Broth		
14일	Fluid thioglycollate medium	무증식	무증식
	Tryptic Soy Broth		

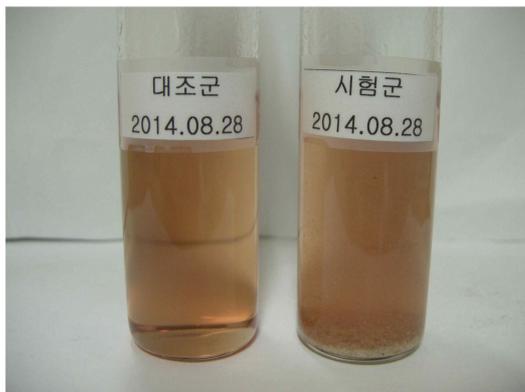


그림 1-111. Fluid thioglycollate medium에서 대조군(Bio-oss[®])과 시험군(duck bone)의 세균증식 시험

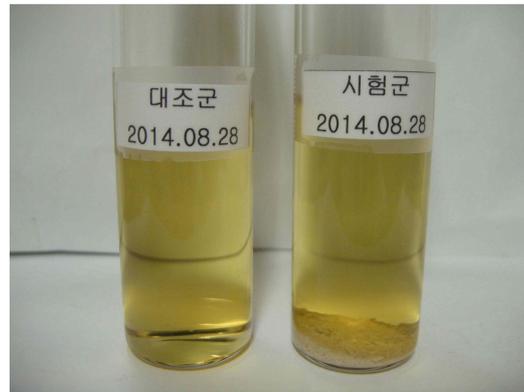


그림 1-112. Tryptic Soy Broth에서 대조군(Bio-oss[®])과 시험군 (duck bone)의 세균증식 시험

• 실험의 결과

- 무균시험에서는 배양 7일 후와 14일 후에 세균의 증식 유무를 관찰한 결과 대조군과 시험군 (duck bone)은 모두가 세균이 증식되지 않아 무균시험의 기준에 적합하다고 판정되

었다.

나. 오리부리의 뼈 유래 콜대체재의 피부 감작성 (skin sensitization) 시험

- 시험규격
 - 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준 규격
(식품의약품안전처 고시 제 2014-115호)
 - ISO 10993-10:2010 Murine Local Lymph Node Assay
 - OECD guideline for the testing of chemicals 442B
: Skin sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA
- 실험동물
 - Mouse (balb/c), 오리엔트바이오(부산광역시 사상구 모라동 795-13)
 - 암컷, 7주령 이상, 20마리
 - 동물구입 후 7일간 실험동물 환경에 적응한 후 건강한 동물을 시험에 사용함
- 동물실험실의 환경
 - 환경조건 : 온도 22±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간, 조도 200-300 Lux
 - 사육 케이지 : 스텐레스스틸(320 x 200 x 145)에 5마리씩 사육
 - 사료 : 마우스전용 사료를 자유 급식함
 - 물 : 음용수는 자유롭게 섭취하도록 함
- 실험군의 분류 : 피부감작성을 시험하기 위한 실험군은 (표 1-21)와 같다.

표 1-21. 마우스에서 피부 감작성을 평가하기 위한 실험군

실험군	피부 감작성 시험 (마리)	
	극성 (Polar)	비극성 (Non-polar)
대조군 (Control)	5	5
시험군 (Duck bone)	5	5
동물 합계	10	10

- 사용한 시약
 - Acetone (DUKSAN PURE CHEMICALS, Korea)

- Olive oil (KANTO CHEMICAL Co., Korea)
 - Physiological solution (중외제약(주), 한국)
 - Hydroxyethylcellulose (SIGMA, Germany)
 - Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit (Roche™, USA)
- 사용한 시험장비
 - 전자저울 (SW-02, CER002198), CAS Co., Ltd., China)
 - 내·외측 캘리퍼 (CD-15CP, Mitutoyo, Japan)
 - 항온 수조 (BS-11, JEIO TECH, Korea)
 - Microplate reader(면역흡광측정기) (SUNRISE, TECAN AUSTRIA GMBH, Austria)
 - Centrifuge (FLETA 5, HANIL SCIENCE INDUSTRIAL Co., Ltd., Korea)
 - Micropipet (Y51296E(20 μ l), Y63279D(200 μ l), Y57019E(1000 μ l), GILSON, Inc., USA)
 - Micropipette (446055194(200 μ l), HTL, Korea)
- 검사액 준비
 - 시료 : duck beak 12 g
 - 용출 조건 : 시험물질 무게 4 g 당, 용매 20 ml의 비율
 - 용출 온도 : 37 \pm 1 $^{\circ}$ C, 72 \pm 2 시간
 - 용출 용매
 - (1) 극성(Polar) : Physiological solution (Hydroxyethylcellulose 첨가)
 - (2) 비극성(Non-Polar) : Acetone : Olive oil = 4 : 1
 - 공 시험액 : 시험물질을 넣지않은 용출 용매
- 마우스 귀끝 피부의 감작성 시험 (skin sensitization test)
 - (1) 실험 1일차
 - 실험을 시작하기전에 마우스의 체중(그림 1-113)을 측정하고, 마우스의 정상 귀의 두께(그림 1-114)를 측정하였다.
 - 귀의 두께는 Day 1, Day 3 및 Day 6에 측정하였다.
 - 대조군의 용액과 시험군의 용액 (duck bone의 용출액)을 마우스 귀 끝의 한쪽에 각각 25 μ l씩 양쪽에 도포하였다 (그림 1-115).
 - (2) 실험 2일 및 3일차
 - 첫째 날과 같은 방법으로 반복하여 체중을 측정하였다.

(3) 실험 5일차

- 모든 마우스의 체중 변화를 측정하였다.
- BrdU 용액 0.5 ml (10 mg/ml)을 각 마우스의 복강내에 투여하였다 (그림 1-116).

(5) 실험 6일차

- 모든 마우스의 체중과 귀 두께를 측정하였다.
- 마우스를 안락사시킨 후 lymph node를 적출하였다 (그림 1-117).



그림 1-113. 시험기간 동안 매일 마우스의 체중을 측정함



그림 1-114. Duck bone의 시험물질을 귀끝 피부에 도포



그림 1-115. 시험물질을 도포한 마우스의 귀끝의 두께를 측정



그림 1-116. BrdU 용액을 마우스 복강내에 투여.



그림 1-117. 마우스에서 lymph node를 적출함

• 관찰항목

- 체중 및 일반 임상증상의 관찰
: 모든 실험동물에 대하여 시험기간동안 매일 체중과 외관적 이상 유무, 임상증상 등을 관찰하였다.
- 적용 부위(ear skin)의 피부 관찰

: 모든 마우스에서 귀끝 피부의 홍반지수(erythema score)와 자극 등을 관찰하였고 홍반지수의 판정은 (표 1-21)과 같다.

표 1-21. 마우스의 귀끝 피부의 홍반지수 (Erythema Scores)

Observation	Score
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2
Moderate erythema	3
Severe erythema (beet redness) to eschar formation preventing grading of erythema	4

- Cell proliferation ELISA, BrdU (Colorimetric) (Roche™, USA)
 - 마우스에서 림프절을 적출하여 nylon mesh에 림프절을 올려놓고 PBS 15 ml에 현탁하여 single cell 현탁액을 만든 후 96 well plate에 100 μ l/well씩 각각 분주하였다.
 - 2500 rpm의 속도로 10분간 원심분리(96 well plate, rotor centrifuge)한 후, 상층액은 제거하였다.
 - 상온에서 20분간 건조시킨 후, 고정액 200 μ l을 넣어서 상온에서 30분간 반응시킨 후 용액을 제거하였다.
 - BrdU 항체(anti-BrdU-POD)를 100 μ l/well 넣어 상온에서 90분간 반응시킨 후 용액을 제거하였다 (BrdU 항체는 사용하기 전에 1:100으로 희석).
 - 세척액 (Washing buffer, 1 : 10으로 희석) 200 μ l/well으로 각각 2회 세척하였다.
 - Substrate solution (tetramethyl bezidine)을 100 μ l/well 씩 넣은 다음 상온에서 5-30분 동안 반응시켰다.
 - Microplate reader를 이용해서 ABS_{370nm} 및 ABS_{492nm} 값을 각각 측정하였다.
 - 1) BrdU labeling index = (ABS_{em} - ABS blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS blank_{ref})
 - 2) SI 지수 = 각 시험군의 BrdU LI값의 평균 / 대조군의 BrdU LI값의 평균
(em: emission wave length, ref: reference wave length)
- 실험의 결과
 - 마우스의 체중변화 및 임상증상 (표 1-22)과 마우스의 귀끝 피부의 홍반지수 (표 1-23), BrdU labelling index (표 1-24)는 아래와 같다.

표 1-22. 마우스의 체중 및 임상증상

실험군		동물 번호	1일		2일		3일		5일		6일	
			체중 (g)	임상 증상								
극성 (Polar)	대조군 (Control)	1	19	-	19	-	20	-	20	-	21	-
		2	19	-	19	-	20	-	20	-	20	-
		3	20	-	20	-	21	-	21	-	21	-
		4	19	-	19	-	20	-	20	-	20	-
		5	19	-	20	-	20	-	20	-	20	-
	시험군 (Duck bone)	1	19	-	19	-	20	-	20	-	20	-
		2	19	-	19	-	20	-	20	-	20	-
		3	19	-	19	-	20	-	20	-	20	-
		4	18	-	19	-	19	-	19	-	19	-
		5	19	-	19	-	20	-	20	-	20	-
비극성 (Non- Polar)	대조군 (Control)	1	19	-	19	-	20	-	20	-	20	-
		2	18	-	18	-	19	-	18	-	18	-
		3	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-
		4	19	-	19	-	20	-	20	-	20	-
		5	19	-	19	-	19	-	19	-	19	-
	시험군 (Duck bone)	1	19	-	19	-	20	-	19	-	19	-
		2	20	-	20	-	20	-	21	-	21	-
		3	20	-	20	-	21	-	21	-	21	-
		4	20	-	20	-	21	-	21	-	21	-
		5	19	-	20	-	20	-	20	-	20	-

- : Non sensitization

표 1-23. 마우스의 귀끝 피부의 홍반지수 (erythema score)의 결과

실험군		동물 번호	도포 후 시간 (일)				
			1	2	3	5	6
극성 (Polar)	대조군 (Control)	1	0*	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0
	시험군 (Duck bone)	1	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0
비극성 (Non- polar)	대조군 (Control)	1	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0
	시험군 (Duck bone)	1	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0

*: erythema score

표 1-24. BrdU labelling index

		BrdU labeling index							피부자극 지수(SI)
		1	2	3	4	5	평균	편차	
극성 (Polar)	대조군 (Control)	0.41	0.46	0.31	0.37	0.41	0.39	0.14	1.00
	시험군 (Duck bone)	0.56	0.52	0.43	0.44	0.41	0.47	0.17	1.21
비극성 (Non-polar)	대조군 (Control)	0.38	0.53	0.33	0.55	0.56	0.47	0.22	1.00
	시험군 (Duck bone)	0.38	0.36	0.48	0.54	0.55	0.46	0.19	0.99

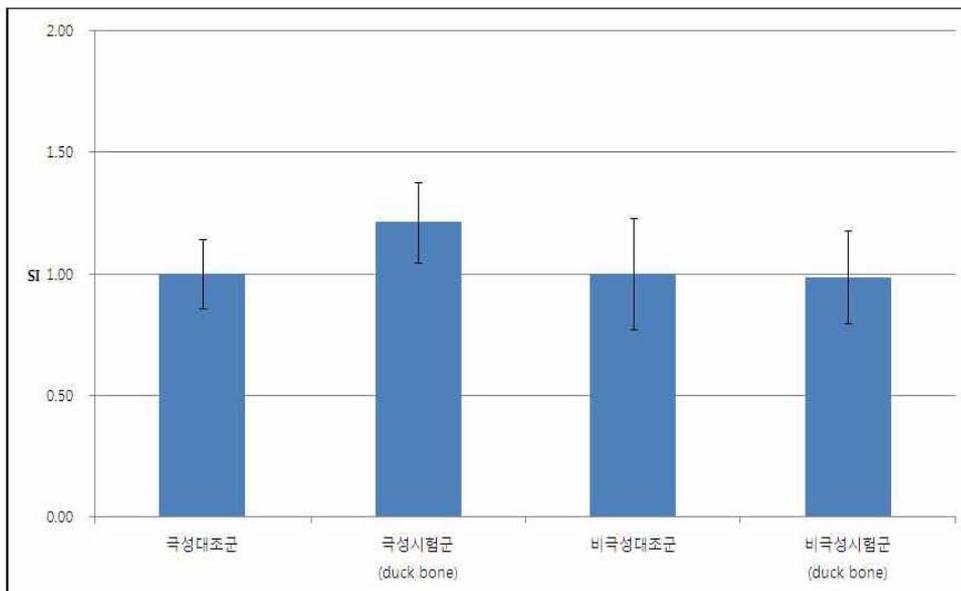


그림 1-118. 극성과 비극성 시험군의 피부자극 지수
대조군(Bio-oss), 시험군(duck bone).

• 피부 감작성의 실험결과

- 피부의 감작성 시험에서 시험기간 동안 실험동물이 임상적인 이상 징후나 폐사한 동물이 없었으며, 적용부위의 피부 부작용도 관찰되지 않았다.
- 대조군의 값을 기준으로 시험군(duck bone)의 피부 자극지수를 평가한 결과가 (그림 1-118)과 같이 1.6 미만으로 나타나 이러한 결과는 감작성 시험규격의 기준에 적합하다고 판단되었다.

다. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 세포독성 in vitro 시험

- 시험 규격
 - 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격 (식품의약품안전처 고시 제 2014-115호)
 - ISO 10993-5(2009), Tests for in vitro cytotoxicity

- 시험물질 및 재료
 - 시료(duck beak bone) : 3개
 - 세포주 (cell line) : NCTC clone 929 (L929) (한국세포주은행, 대한민국)
 - 배양조건 : $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, 5(v/v)% CO_2 incubator
 - 배양액 : 1 % penicillin-streptomycin과 10% FBS를 첨가한 RPMI-1640 (HyClone)
 - 양성 대조물질 : Natural Rubber Latex (Econ Disposable Supplies, Inc., Malaysia)
 - 음성 대조물질 : High Density Polyethylene Film (Hatano Research Institute, Japan)

- 시험장비
 - 클린벤치 (MJ728C13, MJ-LTD, Korea)
 - Micropipet (GILSON, Inc., USA): BG66464 ($20\ \mu\text{l}$), BG66370 ($200\ \mu\text{l}$), BJ50630 ($1000\ \mu\text{l}$)
 - CO_2 인큐베이터(MCO-18AIC, SANYO Electric Biomedical Co., Japan)
 - 현미경 (CKX41SF, OLYMPUS, Japan)
 - Centrifuge (VS-5000N, VISION Scientific Co., Ltd., Korea)

- 시험방법
 - L929 cell(NCTC clone 929)을 100 mm dish에 3.0×10^5 cell을 24시간 배양하여 80-90% confluent 상태로 만든다 (시료의 면적은 전체 면적의 1/10 가량을 덮음).
 - 배지를 제거하고 RPMI-1640 배지 + 20% FBS와 2% agar를 1:1 비율로 섞어 세포만 있는 dish에 10 ml 정도 첨가하여 20분 정도 놓아두어 굳힌 후 이때, agar의 최종농도는 1 %가 되게 하였다.

- 배지가 굳으면 0.01% Neutral red를 만든 후, 이 중 5 ml를 첨가하여 15분 정도 그대로 두어 스며들게 하고 위에 남아있는 용액은 제거하였다.
- 각각의 dish 위에 양성 대조군과 음성 대조군, 시험군 (duck beak)을 올려놓고 24시간 배양하여 현미경상에서 관찰하였다 (표 1-25).

Table 1-25. Reactivity grades for agar diffusion test and direct contact test

Grade	Reactivity	Description of reactivity zone
0	None	No detectable zone around or under specimen
1	Slight	Some malformed or degenerated cells under specimen
2	Mild	Zone limited to area under specimen
3	Moderate	Zone extending specimen size up to 1.0 cm
4	Severe	Zone extending farther than 1.0 cm beyond specimen

• 시험결과

- 세포독성 시험에서 골대체재의 육안관찰 결과(표 1-26)와 현미경상의 관찰 결과(표 1-27)는 아래와 같다.

표 1-26. 세포독성의 육안적 관찰의 결과

	Specimens	Reactivity	Grade
Test 1	Positive control	Moderate	3
	Negative control	None	0
	Duck bone	None	0
Test 2	Positive control	Moderate	3
	Negative control	None	0
	Duck bone	None	0
Test 3	Positive control	Moderate	3
	Negative control	None	0
	Duck bone	None	0

Test	Positive control	Negative control	Duck beak bone
I			
II			
III			

그림 1-119. 세포독성 시험의 결과.

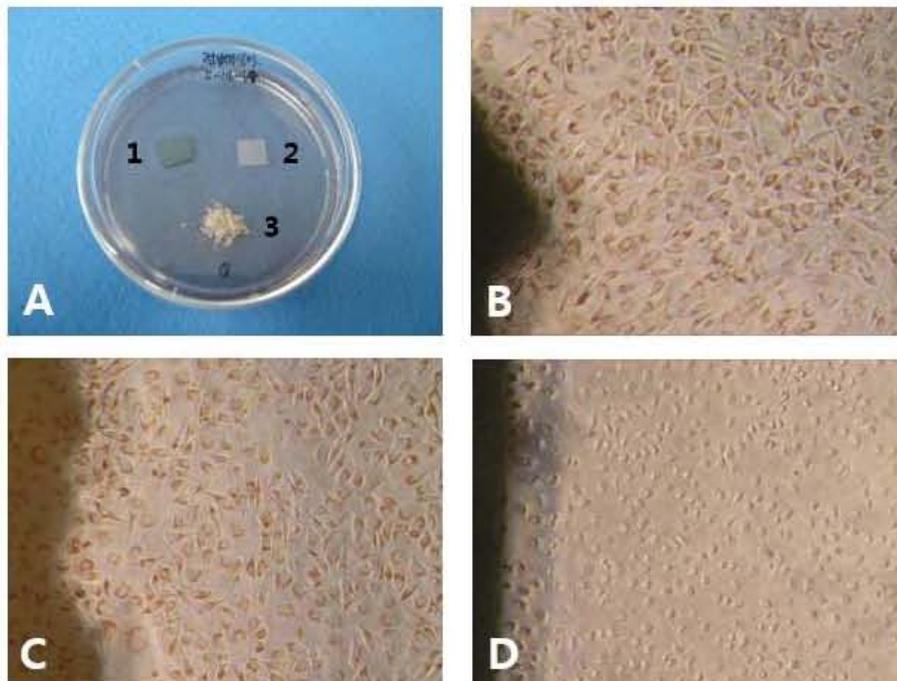


그림 1-120. L929배지에서 양성 대조군 (A1)과 음성 대조군(A2), 시험군(A3)을 24시간 배양한 현미경 사진 (양성대조군 C와 음성대조군 D, 시험군 B).

- 판정결과 : 시험군을 양성 대조군과 음성 대조군과 비교하여 볼 때 점미(mild)하게 나타나 독성이 없는 것으로 판정됨.

라. 오리부리의 뼈 유래 글대체제의 생체내에서 발열성(pyrogen) 평가

○ 실험재료

- 본 실험에 사용된 오리부리의 뼈 입자는 개발된 가공공정으로 제조된 제2군으로서 소 뼈의 입자 제품과 가공공정이 유사한 시료를 선택하였음.
- 제2군은 지방과 단백질을 화학적 처리를 통해 제거하고 400℃에서 15시간 열처리한 시료이며, 실험에 사용되는 모든 시료는 감마멸균 처리 후 사용되었음.
- 시험규격: 대한약전 일반시험법 중 발열성물질 시험법.
- 시험물질 및 재료
 - 시료(duck bone) : 20 g
 - 멸균생리식염수 (중외제약, 한국)
 - 주사기 (30 ml, 녹십자의료공업, 한국)
- 시험장비
 - 항온수조 (BS-11, JEIO TECH, Korea)
 - Pyrogen test recording system (PROBES BOX 30/15, PanLab, Spain)
 - 수동저울 (200312100, 효성정밀계기, Korea)
- 실험동물
 - 동물 : Rabbit (NewZealand White), 2 kg 이상, Female, 3마리
 샘타코 (경기도 오산시 서량동 77-1)
 - 환경 적응 : 동물을 구입한 후 7일간 실험환경에 적응시킴.
- 동물실의 환경
 - 환경조건 : 온도 22±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간, 조도 200-300 Lux
 - 케이지 : 사육 케이지(590×460×342)에 한 마리씩 사육
 - 사료 : 토끼 전용사료 (퓨리나사료)를 자유 급식시킴
 - 물 : 음용수를 자유로이 섭취시킴
- 검액 제조

- 제조조건 : Duck bone유래 골대체재를 4 g을 20 ml의 비율로 생리식염수에 용출
- 용출조건 : 37±1℃에서 72±2 시간

• 실험방법

- 먼저 시험군 시료(duck bone) 4 g을 20 mL의 생리식염수에 침지하여 37℃에서 72시간 용출함.
- 이어서 용출액을 37±2℃로 가온하여 토끼의 귀정맥에서 10분 이내로 서서히 주사함 (그림 1-121).
- 주사 후 3시간까지 30분 이내의 간격으로 직장내의 체온을 측정하여 대조 체온과 최고 체온과의 차를 체온 상승도로 하였고 1℃ 이하인 경우 음성으로 판정함.
- 이때, 시험용량은 시험동물 체중 1 kg 당 10 mL로 하고, 처음으로 시험에 공시하는 토끼는 시험하기 전 1~3일 이내에 주사를 제외한 전 조작이 포함된 플라시보시험을 하여 시험에 적응시킴.

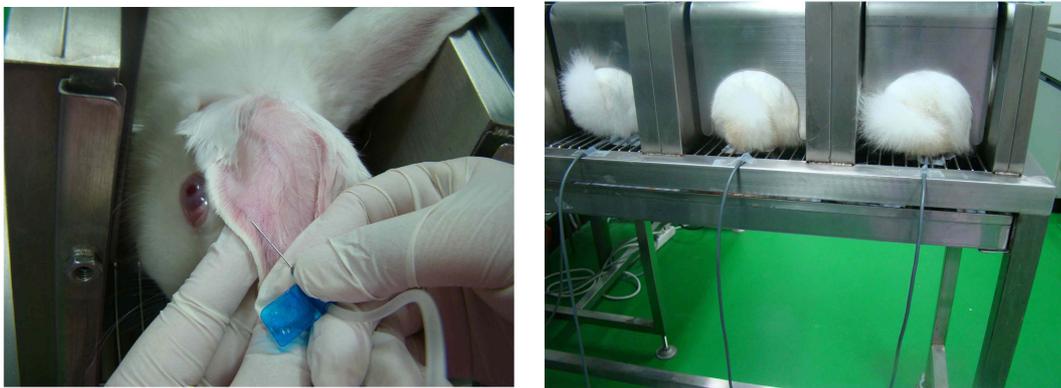


그림 1-121. 토끼에서 발열성 시험을 하는 모습
(왼쪽: 용출액을 귀 정맥에 투여, 오른쪽: 직장의 온도 측정)

• 실험결과

- 시험기간동안 동물에서 어떠한 이상 증상이 관찰되거나 폐사한 동물은 없었음.
- 시험결과 대조 체온과 최고 체온 차이가 0.1-0.3℃로 0.5℃ 이하를 나타내어 오리부리의 뼈 유래 골 대체재용 입자의 발열성은 음성으로 판단 (표 1-27, 28, 29).

표 1-27. 발열성 시험을 위한 토끼에서 플라시보시험의 결과

동물 번호	체중 (kg)	대조체 온 (℃)	측정 시간에 따른 체온 (℃)					
			0.5 시간	1 시간	1.5 시간	2 시간	2.5 시간	3 시간
1	2.6	39.25	39.1	39.0	39.0	38.9	39.0	38.9
2	2.7	39.10	39.0	39.0	38.9	38.8	39.0	38.9
3	2.6	39.10	39.0	39.1	39.1	39.0	39.0	38.9

표 1-28. 오리부리의 뼈 입자 용출액의 발열성 시험 결과

동물 번호	체중 (kg)	대조체 온 (°C)	측정 시간에 따른 체온 (°C)					
			0.5 시간	1 시간	1.5 시간	2 시간	2.5 시간	3 시간
1	2.6	39.20	39.3	39.3	39.4	39.3	39.5	39.4
2	2.7	39.00	39.1	39.0	39.0	38.9	38.9	39.0
3	2.6	39.00	39.1	39.1	39.1	39.3	39.2	39.2

표 1-29. 대조 체온과 최고 체온의 체온상승도 결과

동물 번호	대조체온 (°C)	최고체온 (°C)	온도의 차이 (°C)	비고
1	39.20	39.5	0.30	
2	39.00	39.1	0.10	
3	39.00	39.3	0.30	

마. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 급성 독성(acute toxicity) 평가

- 시험규격
 - 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격 (식품의약품안전처 고시 제2014-115호)
 - ISO 10993-11(2006)
 - USP <88> Biological reactivity test, in vivo
 - ASTM F750:2007 (Standard practice for evaluating material extracts by systemic injection in the mouse).

- 시험물질 및 재료
 - 시료(duck bone) : 8 g
 - 멸균생리식염수 (중외제약(주), 한국)
 - 면실유 (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)
 - 항온수조 (BS-11, JEIO TECH, Korea)
 - 전자저울 (SW-02(CER002198), CAS Co., Ltd., China)

- 실험동물
 - 동물 : Mouse (ICR), 20마리(극성 용매 10마리, 비극성 용매 10마리)
 - 체중 및 성별 : 17g 이상, Male
 - 공급원 : 샘타코(경기도 오산시 서량동 77-1)
 - 환경적응 : 동물 구입 후 7일간 실험환경에 적응 후 동물실험에 공시함

- 동물실 환경
 - 환경조건 : 온도 22±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12 시간, 조도 200-300 Lux
 - 사육 케이지 : 케이지(590×460×342)당 한 마리씩 사육
 - 사료 : 토끼 전용사료 (퓨리나사료)를 자유 급식시킴
 - 물 : 음용수를 자유로이 섭취시킴

- 실험방법
 - 실험에 사용된 마우스는 극성 용매 10마리와 비극성 용매 10마리로서 총 20마리를 사용하였고, 검액의 제조조건은 극성 용매와 비극성 용매로 나누어서 아래와 같이 제조하였음.
 - (1) 극성용매
 - 시험액 : 오리부리 뼈 시료 4 g/추출용 매량 20 ml 비율로 생리식염수에 용출
 - 공 시험액 : 시료 없이 생리식염수로만 용출
 - (2) 비극성용매
 - 시험액 : 오리부리 뼈 시료 4 g/추출용 매량 20 ml 비율로 면실유에 용출
 - 공 시험액 : 시료 없이 면실유로만 용출
 - (3) 용출조건 : 37±1℃에서 72시간

- 극성 시험은 마우스의 꼬리 정맥에 50 ml/kg의 용량으로 24 gauge needle syringe를 이용하여 대조군에는 극성 공 시험액을 시험군에는 극성 시험액을 0.1 ml/s의 속도로 주입하였음 (그림 1-122).
- 비극성의 시험은 마우스의 복막 내에 50 ml/kg의 용량으로, 24 gauge needle syringe를 이용하여 대조군에는 비극성 공시험액을, 시험군에는 비극성 시험액을 0.1 ml/s의 속도로 투여하였음 (그림 1-123).
- 시험물질을 투여한 모든 동물에 대하여 투여 4시간, 24시간, 48시간, 72시간 후에 일반 임상증상 관찰하고, 모든 동물에 대하여 시험물질 투여개시 전, 투여개시 후, 시험 종료 시에 체중을 측정하고 관찰기간동안 임상적 이상 또는 사망한 것이 있어서는 안 됨 (표 1-30).

표 1-30. 임상적 이상 판정 기준(Response to Systemic Injection Assay)

Response	Description
Normal, no symptom	Mouse exhibits no adverse physical symptoms after injection.
Slight	Mouse exhibits slight but noticeable symptoms of hypokinesia, dyspnea, or abdominal irritation after injection.
Moderate	Mouse exhibits definite evidence of abdominal irritation, dyspnea, hypokinesia, ptosis, or diarrhea after injection. (Weight usually drops to between 15 and 17 g.)
Marked	Mouse exhibits prostration, cyanosis, tremors, or severe symptoms of abdominal irritation, diarrhea, ptosis, or dyspnea after injection. (Extreme weight loss; weight usually less than 15 g.)
Dead, expired	Mouse dies after injection.



그림 1-122. 급성 독성검사를 위하여 마우스의 미정맥에 약물 투여.



그림 1-123. 급성 독성검사를 위하여 마우스의 복강내에 약물 투여.

• 실험 결과

- 오리부리의 뼈로 제조된 골대체재 입자의 급성독성 실험 결과 극성용매 10마리, 비극성용매 10마리 모두 이상 또는 사망이 관찰되지 않았으며, 체중감소 또한 관찰되지 않아 급성독성은 없는 것으로 판단됨 (표 1-31와 1-32).

표 1-31. 투여 후 마우스의 체중변화

구 분		동물번호	투여 전 무게 (g)	투여 직후 무게 (g)	4시간후 무게(g)	24시간후 무게(g)	48시간후 무게(g)	72시간후 무게(g)
극성 용매	대조군 (Control)	C01	21	21	20	21	23	25
		C02	22	22	22	23	24	26
		C03	22	23	22	23	24	26
		C04	23	23	22	25	25	27
		C05	21	21	21	22	23	24
	시험군 (duck bone)	E01	22	22	21	22	23	25
		E02	19	20	19	21	22	24
		E03	20	20	20	21	21	23
		E04	20	20	19	21	22	24
		E05	22	22	22	23	24	26
비극성 용매	대조군 (Control)	C01	19	19	19	20	21	23
		C02	22	22	22	23	24	25
		C03	20	21	20	22	22	24
		C04	20	20	20	21	22	24
		C05	22	22	21	23	23	26
	시험군 (duck bone)	E01	21	21	21	23	23	25
		E02	20	21	20	22	22	25
		E03	21	21	21	22	23	25
		E04	19	19	19	20	21	23
		E05	20	21	20	22	23	24

표 1-32. 오리부리 뼈 입자의 급성독성 실험 결과

구 분		동물번호	임상 판정	체중 감소
극성 용매	대조군 (Control)	C01	Normal	없음
		C02	Normal	없음
		C03	Normal	없음
		C04	Normal	없음
		C05	Normal	없음
	시험군 (duck bone)	E01	Normal	없음
		E02	Normal	없음
		E03	Normal	없음
		E04	Normal	없음
		E05	Normal	없음
비극성 용매	대조군 (Control)	C01	Normal	없음
		C02	Normal	없음
		C03	Normal	없음
		C04	Normal	없음
		C05	Normal	없음
	시험군 (duck bone)	E01	Normal	없음
		E02	Normal	없음
		E03	Normal	없음
		E04	Normal	없음
		E05	Normal	없음

바. 오리부리의 뼈 유래 골대체제의 토끼의 피내반응 평가

- 시험규격
 - 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격(식품의약품안전처 고시 제2014-115호)
 - ISO 10993-10 (2010)

- 실험물질 및 재료
 - 시료(duck bone) : 과립 4 g
 - 멸균생리식염수 (중외제약(주), 한국)
 - 면실유 (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)
 - 항온수조 (BS-11, JEIO TECH, Korea)
 - 수동 저울 (200312100, 효성정밀계기, Korea)
 - Animal clipper (GOLDEN A5, Oster, USA)

- 실험동물
 - 동물 : Rabbit (New Zealand White), 2.7-2.8 kg, Female, 3마리
 - 공급원 : 샘타코(경기도 오산시 서량동 77-1)
 - 동물구입 후 7일간 실험실 환경에 적응시킴

- 실험동물실의 환경
 - 환경조건 : 온도 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 조명시간 12시간, 조도 200-300 Lux
 - 사육 케이지 : 케이지(590×460×342)당 한 마리씩 사육
 - 사료 : 토끼 전용사료 (퓨리나사료)를 자유 급식시킴
 - 물 : 음용수를 자유롭게 섭취하도록 함

- 검액의 제조조건
 - (1) 극성 용매
 - 시험액 : duck bone 4 g당 추출 용매량 20 ml 비율로 생리식염수에 용출
 - 공 시험액 : 시료없이 생리식염수로만 용출
 - (2) 비극성 용매
 - 시험액 : duck bone 4 g당 추출 용매량 20 ml 비율로 면실유에 용출
 - 공 시험액 : 시료없이 면실유로만 용출
 - (3) 용출조건 : $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 72시간

• 실험방법

- duck bone으로 부터 용출된 용출물을 주사하기 위해 4-18시간 전에 동물의 등에 있는 털을 제모함.
- 극성 용출물 0.2 mL를 토끼의 한 쪽에 5군데씩 피내주사하였고, 비극성 용출물의 대조군 0.2 mL를 각 토끼의 같은 부위 반대쪽 5군데에 주사함 (그림 1-124).
- 비극성 용매를 이용하여 얻은 용출물과 비극성 용매 대조군은 각 토끼 후방에 상기와 같은 과정으로 피내 주사하였음 (그림 1-125).
- 주사 후 24시간과 48시간, 72시간 간격으로 투여부위를 관찰하고 분류처계에 따라 반응 등 급을 정하여 기록함 (표 1-33).

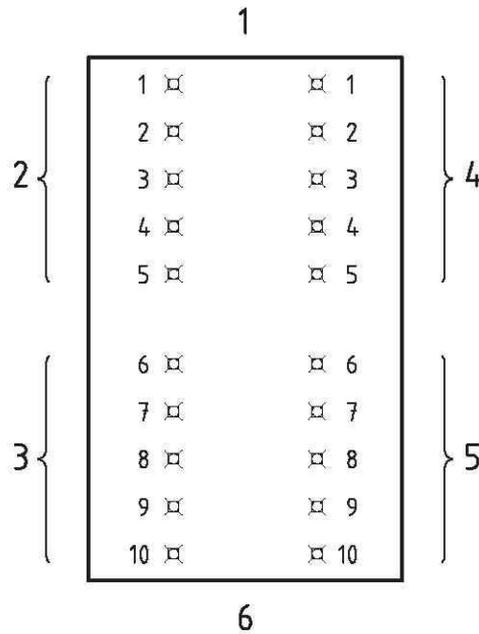


그림 1-124. 약물 주사위치의 배치도.

- 1, 머리쪽; 2, 극성 용출물 주사; 3, 비극성 용출물 주사;
- 4, 극성 대조 용매 주사; 5, 비극성 대조 용매 주사 위치.



그림 1-125. 피내반응 실험 과정(왼쪽: 제모, 중앙: 주사위치 선정, 오른쪽: 주사).

표 1-33. 토끼의 피내 반응에 대한 등급

반 응	등 급
홍반 및 가피 형성	
홍반 없음	0
아주 약간의 홍반(거의 지각할 수 없음)	1
명백한 홍반	2
중간정도의 홍반	3
심각한 홍반 (질은 붉은색) 내지는 홍반등급을 매기기에 어려운 가피 형성	4
부종형성	
부종 없음	0
아주 약간의 부종 (거의 지각할 수 없음)	1
감별이 가능한 부종 (주변 경계가 확실하게 솟아오름)	2
상당한 부종 (약 1 mm 솟아오름)	3
심각한 부종 (1 mm 이상 솟아오르고 노출 범위 이상으로 확장됨)	4
자극에 관한 가능한 종합점수	8
피부 부위에 나타나는 기타 부작용	

• 실험결과

- 실험기간 중 동물에서 실험물질 적용부위에 약간의 홍반이 관찰되었으나 시간이 지날수록 증상이 사라졌으며, 그 외 이상증상이나 사망 동물은 없었음 (표 1-34, 35, 36).
- 실험재료의 평균점수와 용매대조군 평균점수의 차이가 1.0 이하로 나타나 시험의 필요조건이 충족되었음.
- 시험 종료 후 시험물질 적용부위에서 홍반과 가피형성, 부종 등의 자극성이 거의 관찰되지 않아 오리부리의 뼈 유래 골대체재 입자의 피내이식 부작용은 없는 것으로 판단됨 (표 1-37).

표 1-34. Rabbit 1에 대한 피내 반응의 결과

반 응	관찰시간	주사부위																			
		2 영역					3 영역					4 영역					5영역				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
홍반 및 가피 형성	24	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
부종 형성	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

표 1-35. Rabbit II에 대한 피내 반응의 결과

반응	관찰시간	주사부위																			
		2 영역					3 영역					4 영역					5영역				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
홍반 및 가피 형성	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
부종 형성	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

표 1-36. Rabbit III에 대한 피내 반응 결과

반응	관찰시간	주사부위																			
		2 영역					3 영역					4 영역					5영역				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
홍반 및 가피 형성	24	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
부종 형성	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

표 1-37. 토끼에서 피내 반응의 최종 결과

	피내 반응 지수			평균
	Rabbit 1	Rabbit 2	Rabbit 3	
Extract	0.07	0.00	0.07	0.05
Control	0.00	0.00	0.00	0.00

사. 오리부리의 뼈 유래 골대체재의 세포친화성 검사

○ 세포의 증식 평가

- MG63 human osteoblast를 단층 배양법으로 증식시킨 후, 일정량의 오리부리의 뼈 입자에 세포를

파종하였고 이때 대조군에는 소 뼈 입자 제품인 Bio-Oss[®] 제품을 사용하였음.

- 세포 증식률(cell proliferation)은 살아 있는 세포내 소기관인 미토콘드리아 내막에 존재하는 dehydrogenase가 노란색의 tetrazolium salt가 보라색의 formazan 결정체로 전환되는 원리를 이용한 MTT assay를 통하여 측정하였음.
- 배양 플레이트(96 well)에 오리부리의 뼈 일정량을 투입한 다음 줄기세포를 파종(3000 cell)하고 배양 배지를 추가한 다음 인큐베이터(5% CO₂)에서 1, 3, 7일간 배양하였음. 일정 기간 배양한 플레이트에 5 mg/mL PBS로 녹인 MTT 용액 50 μ l를 첨가하고 4시간 동안 37°C에서 반응시켰음. 이어서 MTT 용액에 든 배지를 완전히 제거하고 생존하는 세포 안에 생성된 보라색의 formazan 결정체를 DMSO로 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였음.
- (그림 1-126)에서 보는 바와 같이 배양 초기(3일)에서는 대조군인 소 뼈 입자에서 MG63 세포의 증식이 약간 높은 값을 나타내었으나, 배양 3일과 7일에서는 소 뼈 입자와 유사한 증식률을 나타내었음. 즉, 오리부리의 뼈 입자는 소 뼈 입자와 마찬가지로 세포 증식에 문제가 없는 것으로 사료됨.

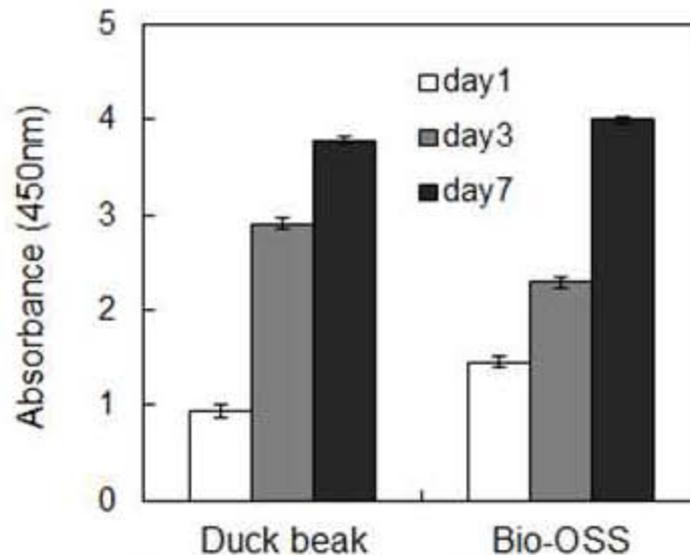


그림 1-126. 배양시간에 따른 BMSCs의 증식률.

○ ALP 활성의 측정

- Alkaline phosphatase (ALP)의 활성을 측정하여 MG63 세포의 골아세포 (osteoblast)의 분화 정도

를 측정하였음. 일정량의 오리부리 뼈 입자를 배양 플레이트에 투입한 다음 세포(40,000 cell)를 파종하여 7일 및 14일간 분화배지에서 배양하였음 (그림 1-127). 그리고 각 배양시간에 따른 ALP 활성은 ALP assay kit를 이용하여 측정하였음.

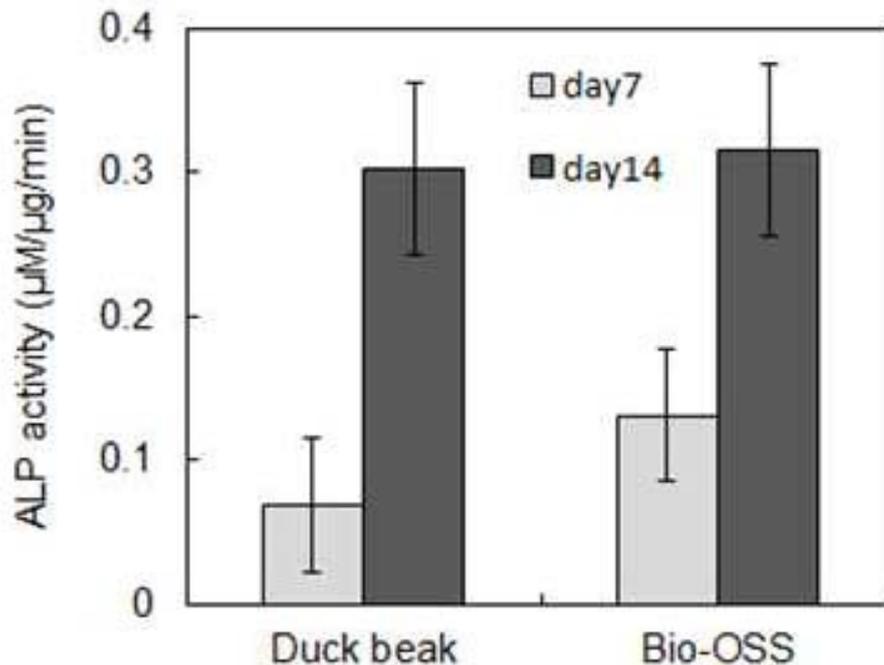


그림 1-127. 배양시간에 따른 BMSCs의 ALP 활성도

- 일반적으로 골의 형성과정은 osteoblast의 연속적인 발달단계로 이루어지며 초기 세포증식기로 DNA의 합성이 활발하여 세포의 수가 증가하고, 성장분이 점차 감소하면서 세포분화기로 이행되어 골 기질 형성 및 성숙이 일어남. 그리고 여기에 다양한 비교원성 단백질 유전자가 작용하여 석회화가 시작되어 점차 수산화인회석의 구조로 석회화가 진행됨.
- 따라서 ALP는 조골세포의 활성도를 반영하는 가장 대표적인 지표로, 일반적으로 골 기질이 성숙되는 시기에 ALP가 증가되고 그 이후로 무기질화가 진행된다고 알려져 있음.
- ALP 활성 측정 결과 오리부리 뼈 입자의 경우 소 뼈 입자와 큰 차이가 없는 것으로 나타났음. 배양 초기에는 소 뼈 입자 대비 다소 낮은 ALP 활성이 나타나지만 배양 14일에서는 소 뼈 입자와 통계적으로 유의하지 않은 결과를 나타냄으로써 오리부리 입자의 유효성을 확인할 수 있었음.

○ 유전자 발현의 분석

- MG63 세포를 오리부리의 뼈 입자에 파종하고 7일, 14일, 21일간 배양하여 각 배양시간별 MG63 세포의 분화는 total RNA를 분리하여 RT-PCR로 분석하였음.
- 배양 시간별 분리된 RNA는 reverse transcriptase로 역전사하여 cDNA 합성함. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 유전자증합연쇄반응(PCR) 실시하였음. 반응을 위한 primer 정보는 (표 1-38)에 나타내었음. PCR이 끝난 DNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동 (그림 1-128)한 다음 UV하에서 시각화하였음.
- 이때 대상 유전자는 runt-related transceiption factor-2 (Runx-2), type I collagen (collagen), alkaline phosphatase (ALP)임.

표 1-38. The primer sequence of GAPDH, ALP, RUNX-2, and Collagen

Gene	Primer sequence	Product Size	Annealing Temperature
Type I Collagen	F : 5'-ATG TTC AGT TTT GTG GAC -3' R : 5'-ATC ATC TCC ATT CTT GCC AG-3'	663	58
Runx-2	F : 5'-ATG CTT CAT TCG CCT CAC AAA C-3' R : 5'-CCA AAA GAA GTT TTG CTG ACA TGG-3'	261	58
ALP	F : 5'-ACC ATT CCC ACG TCT TCA CA -3' R : 5'-AGA CAT TCT CTC GTT CAC CG-3'	162	55
GAPDH	F : 5'-CGA CCA CTT TGT CAA GCT CA-3' R : 5'-AGG GGA GAT TCA GTG TGG TG-3'	203	58

F: Forward, R: Reverse

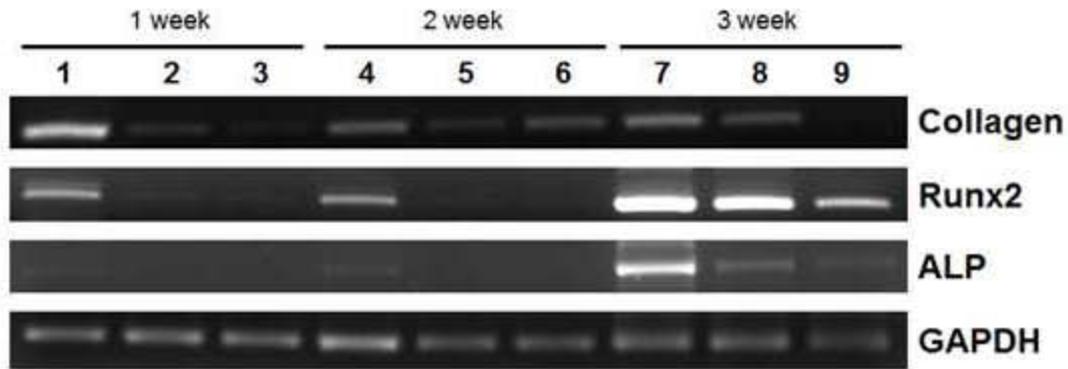


그림 1-128. 배양시간에 따른 MG63 세포의 유전자 발현
(BMSC 1, 4, 7; 소뼈 2, 5, 8; duck bone; 3, 6, 9).

- MG63 cell의 경우 배양시간에 따라 분화 유전자인 Runx-2, ALP의 발현이 증가하였고, 특히 배양 3주에서 크게 증가하는 경향을 나타냄. 소 뼈 입자 및 오리 부리 뼈 입자의 경우도 배양 1주 및 2주에서는 유전자 발현이 미약하지만 배양 3주에서 그 발현정도가 크게 증가하는 것으로 나타났음.
- 이상의 결과로부터 오리부리의 뼈 입자의 세포친화성을 1차적으로 평가한 결과 소 뼈 입자와 유사한 세포 증식률, ALP 활성, 유전자 발현이 나타남을 알 수 있었으며, 이외 결과는 오리부리의 뼈 입자가 소뼈 입자에 비해 세포 친화성이 낮지 않다는 바람직한 결과를 얻을 수 있었음.

제2절 말뚝을 이용한 골대체제용 생체소제의 개발

1. 말뚝을 이용한 골대체제용 생체소제의 개발 및 물리화학적 기본특성 조사

가. 말뚝 부위별 생체소제의 물리화학적 특성 분석

- 본 연구에서 원재료로 사용하고자 하는 제주산 말뚝을 부위별로 나누어 그 특성을 조사하였음. 실험군은 크게 등뼈와 다리뼈, 추가로 치밀골과 해면골이 준비되었음. 각각의 시료의 특성은 잔류 유기물 여부와 결정성을 중심으로 조사되었음.
- 골 분말의 제작과정은 (그림 2-1)에 도식화된 내용을 따라 제조되었음.



그림 2-1. 말뚝을 이용한 골대체제 생체소제의 제조 공정 모식도.

- 원재료는 식용으로 판매되는 말 등뼈와, 말 다리뼈가 사용되었음. 무기물을 분리하기 위하여 연조직 부분을 대략적으로 제거한 뒤, 상온의 물에 2시간씩 5회 이상 침지시켜 남은 혈액을 제거하였음.

- 혈액을 제거한 재료를 과산화수소에 부피비로 대략 1:3(뼈:과산화수소)이 되도록 양을 조절하여 48시간 침지함. 침지 후, 원료를 증류수로 1회 세척한 뒤 말의 뼈만을 회수하여 서늘한 곳에서 건조시킴.
- 뼈조직은 콜라겐등의 단백질로 이루어져있기 때문에 건조된 뼈는 유기물을 함유하고 있음. 잔존 유기물을 제거하기 위해 건조된 뼈를 600℃의 온도의 전기로에서 4 시간동안 소결시킴.
- 소결 후 얻어진 뼈를 막자와 막자사발을 이용하여 1 mm 이하로 분쇄함. 1 mm 이하의 입도를 갖는 입자만 분리하기 위하여 1 mm 의 망체를 사용하였음.
- 1mm 이하의 입자를 갖는 골 분말을 1300℃에서 10시간 동안 전기로에서 열처리 해 주었음. 열처리를 마친 분말은 Air leading Grinder를 이용해 10 μ m 이하의 입도를 가지는 분말로 제조됨.
- 모든 실험군(등뼈, 다리뼈, 치밀골, 해면골)은 상기한 실험방법과 동일한 과정을 거쳐 준비되었음.

(1) FTIR 분석

- 말뼈 소결입자의 유기물 잔류 여부와 Phosphate group의 존재 여부를 확인하기 위하여 분말의 작용기를 조사하였음. 작용기분석에 가장 널리 사용되는 FT-IR 분광광도계(fourier transform infrared spectroscopy, Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA)로 각각의 실험군을 관찰하였음.
- 분광광도계의 측정 조건을 2.5 μ m의 Mid-IR(Infra-Red) 에너지를 물질에 투과 한 뒤 scan수가 30이 되도록 설정하였음. 10 μ m 이하의 평균 입도를 가지는 실험군의 IR 흡수 특과 특성 밴드가 그림 2-2에 기록되었음.
- 아파타이트에 대한 특성피크는 1028-1100 cm^{-1} 에서 P-O stretching (ν_3), 960 cm^{-1} 에서 P-O stretching (ν_4 , symmetric), 3573 cm^{-1} 에서 HA의 OH stretching, 1400-1550 cm^{-1} 그리고 874 cm^{-1} 에서 카보네이트그룹(CO_3^{2-})에서 각각 나타나는 것으로 알려짐. 그림2-1의 각각의 FTIR 특성 밴드를 통하여 모든 시료가 동일한 특성 밴드를 보여주고 있음을 확인 할 수 있음. 앞서 언급한 아파타이트 재료의 영역대에서 특성 밴드가 나타나는 것으로 미루어 모든 재료는 아파타이트인 것으로 보이며, 이외 유기물은 존재하지 않는 것으로 볼 수 있음.

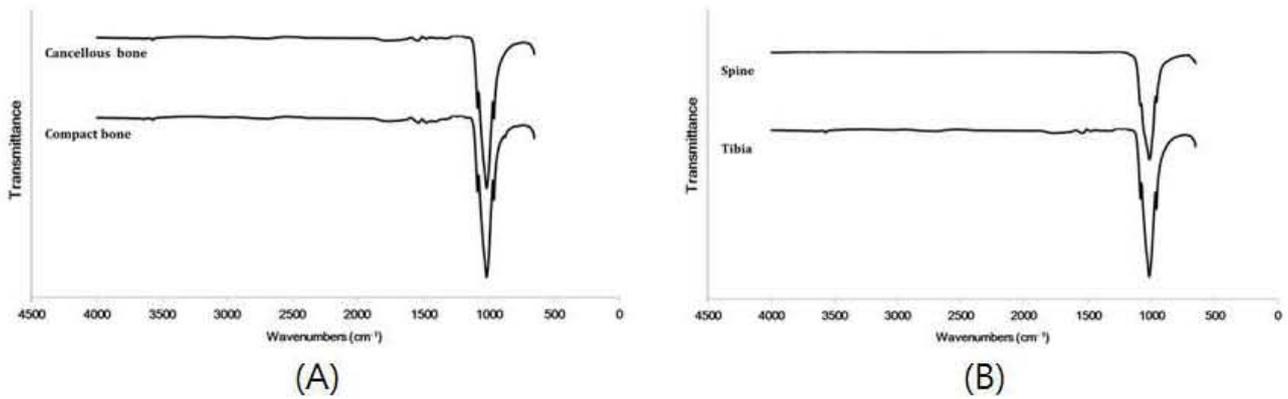


그림 2-2. 각 시료의 FT-IR 스펙트럼 (A, 치밀골-해면골; B, 등뼈-대퇴부뼈)

- 말의 대퇴부 장골 뼈에서 분리한 치밀골과 해면골 간의 특성 밴드는 거의 동일한 것으로 보이며, 등뼈와 대퇴부 장골 사이에서도 작용기는 차이가 나지 않는 것을 확인 할 수 있었음.
- 또한, 별도의 유기물의 특성 밴드가 나타나지 않는 것으로 보아 재료가 잔존 유기물을 갖지 않는 것으로 보임.

(2) XRD (x-ray diffractometer) 분석

- 말뼈 소결 입자의 결정학적 특성 분석은 X-선 분말 회절 분석기 (D8 Advance, Bruker, Germany)를 이용하였음. 이때 측정조건은 Cu K α x-ray($\lambda=154$ nm)을 이용하여 40 kV와 40 mA에서 1 °/min으로 하여 2 θ 20°에서 60° 범위를 측정하였음.
- 세라믹 소재들은 복잡한 결정구조를 가지기 때문에 XRD 측정 결과 그래프에서 여러개의 특성각을 갖는다. 실험군의 XRD 특성 그래프를 분석하기 위해 수산화인회석(HA, hydroxyapatite, Sigma aldrich, USA)가 대조군으로 사용되었음. 그림 2-3에서 수산화인회석의 회절각을 ◆로 표시하였음.
- 그림 2-3 에서 모든 실험군의 시료의 XRD 특성그래프에서 동일 각도에서 회절이 일어나는 것을 확인하였음. 이를 통해 모든 실험 군이 HA 결정을 포함하는 것을 알 수 있었음.

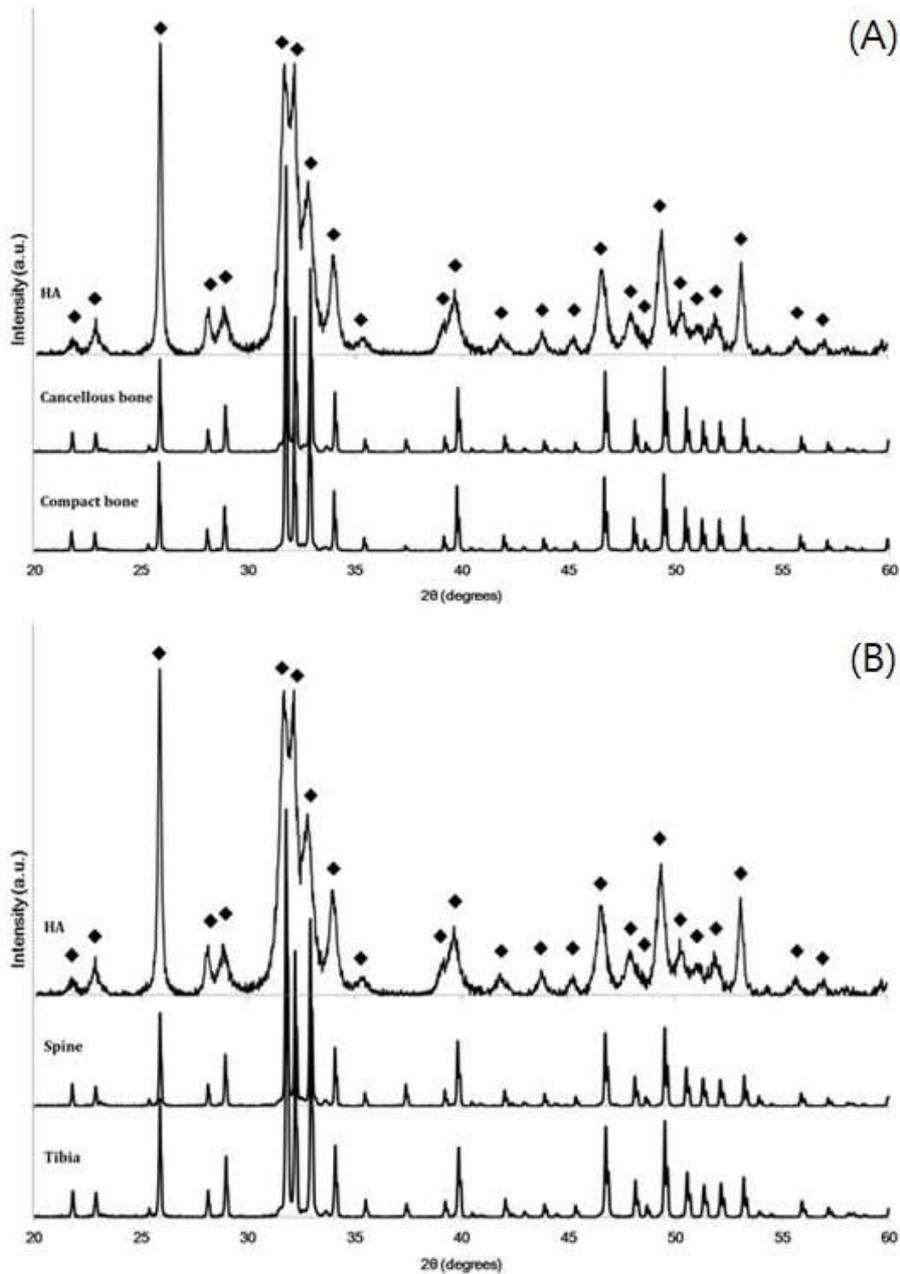


그림 2-3. 각 시료의 XRD 분석 결과 (A, 치밀골-해면골; B, 등뼈-대퇴부뼈; 대조군은 수산화 인회석,HA)

- 또한, XRD 실험법의 원리에 따라 회절 각에서 나타나는 피크의 간격이 좁을수록 결정화도가 높은 재료로 알려져 있음. 본 실험의 모든 실험군은 합성된 수산화인회석 보다 결정화도가 높은 수산화 인회석을 포함하는 것을 확인할 수 있었음. 참고 문헌을 통하여 열처리 온도가 높아지면 세라믹 계열의 재료의 결정성이 증가하는 것을 확인 할 수 있었음.

(3) XRF 분석

- 소결된 골 분말의 구성 원소를 정량분석하기 위하여 X-선 형광분석기(S4 PIONEER, Bruker AXS, Germany)가 사용되었음. 측정된 결과는 표 2-1에 기록되었음.

표 2-1. XRF로 측정된 소결한 말뼈 분말의 입자의 원소 질량비 (A, 치밀골; B, 해면골; C, 등뼈; D, 대퇴부 장골)

Group	Ca (wt %)	O (wt %)	P (wt %)	Na (wt %)	Mg (wt %)	etc (wt %)	Ca/P Ratio
A	41.4	39.4	16.7	1.1	0.6	0.8	1.92
B	42.7	39.3	16.7	0.5	0.5	0.8	1.98
C	43.8	38.9	15.7	0.3	0.5	0.8	2.17
D	42.0	39.4	16.9	0.6	0.5	0.6	1.92

- 말뼈 소결 입자의 주요 성분은 칼슘(Ca), 산소(O), 인(P), 나트륨(Na) 마그네슘(Mg)을 가지는 것을 확인 하였고, 기타로 분류된 미량 원소는 칼륨(K), 염소(Cl), 황(S), 철(Fe), 스트론튬(Sr), 규소(Si)등이 확인 되었으며, 별도의 중금속은 확인 되지 않았음.
- 각각 원소의 분자량을 이용하여 칼슘/인 몰비를 계산하였음. 등뼈를 제외한 나머지 시험군의 칼슘/인 몰 비율은 대략 1.92 - 1.98정도임을 알 수 있었음. 등뼈의 경우 칼슘/인의 몰 비율이 2.17로 다른 실험군에 비해 높은 값을 가지는 것으로 조사 되었음.
- 신생골 형성에 필수적인 마그네슘과 나트륨이 확인됨으로써 골 재생에 유리한 조건을 가지는 재료임을 보여주었음.
- FT-IR, XRD와 XRF의 결과를 종합 해 보았을 때, 모든 실험군은 수산화 인회석을 포함하는 분말임을 알 수 있었음. 또한, 합성된 수산화인회석의 Ca/P 몰비가 1.67임에 비해 본 재료들은 1.67을 상회하는 결과를 보여주었음. 참고문헌에 따르면 생체에서 얻어지는 수산화인회석은 CO_3^{2-} 그룹을 포함하고 있어 Ca/P 몰비가 높음을 알 수 있었음.

나. 말뼈의 세부 공정별 재료 특성 분석

(1) 수세 공정

- 본 연구는 효율적인 유기물 제거를 위한 공정 개선의 일환으로 원재료의 세척 과정을 조절 하여 효율적인 전처리 과정을 결정함. 기존의 꿀 분말의 세척과정은 과산화수소 침지를 통하여 이루어졌으며, 이 과정은 대략 48 시간 소요됨.
- 제조 효율의 향상을 위해 원재료를 끓는 물(100℃)에 1 시간 동안 처리함. 이후 건조과정을 통해 남아있는 유기물을 분리한 뒤, 600℃ 이상의 온도로 열처리하여 꿀 분말을 제작 함.
- 이에 대한 대조군으로써 상온의 물에 48 시간동안 담근 말뚝시료를 건조한 뒤 남은 유기물을 분리하여, 600℃ 이상의 온도로 열처리하여 꿀 분말을 제작 함.
- 끓는 물에 수세한 시료의 경우 지방 및 연조직 제거가 가장 용이 하였음. 과산화수소로 48 시간 처리한 시료는 상온의 물에서 48 시간 동안 처리한 시료보다 지방 조직 및 연조직 제거가 용이 함.

① FT-IR 결과

- 앞서 시행한 부위별 소결특성 분석과 같은 방법으로 제작된 꿀 분말의 특성을 측정함.

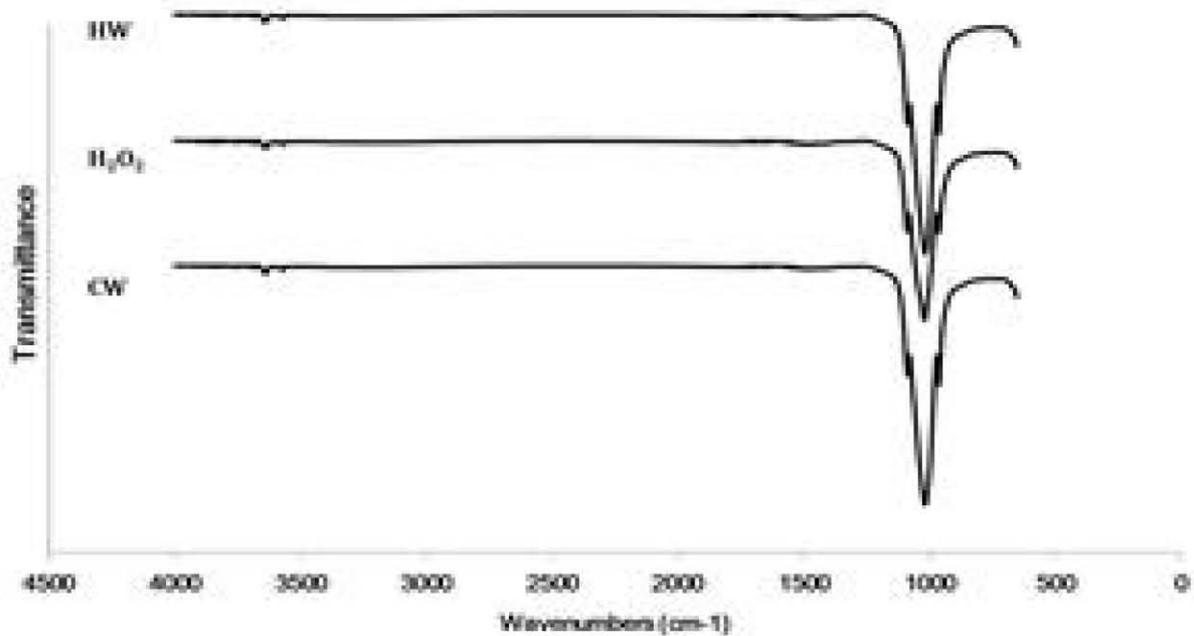


그림 2-4. 수세 방법 별 FT-IR 결과 (HW, 끓는물 전처리; H₂O₂, 과산화수소 전처리; C, 상온의 물 전처리)

- 그림 2-4에서 확인할 수 있듯이, 열처리를 거칠 경우 유기물이 모두 사라지는 것을 확인할 수 있었음. 또한 모두 아파타이트 계열 재료의 특성 밴드를 보여줌.

② XRD 및 XRF 결과

- 같은 조건으로 소결 하였을 경우 모든 시료 간 동일한 회절 각을 나타내는 피크를 가지는 것이 확인됨(그림 2-5). 모든 실험군의 특성 결과에서 수산화인회석과 동일한 회절 각을 가지는 것이 확인되었으므로 모든 실험군이 수산화인회석을 갖는 재료인 것으로 판단 할 수 있었음.

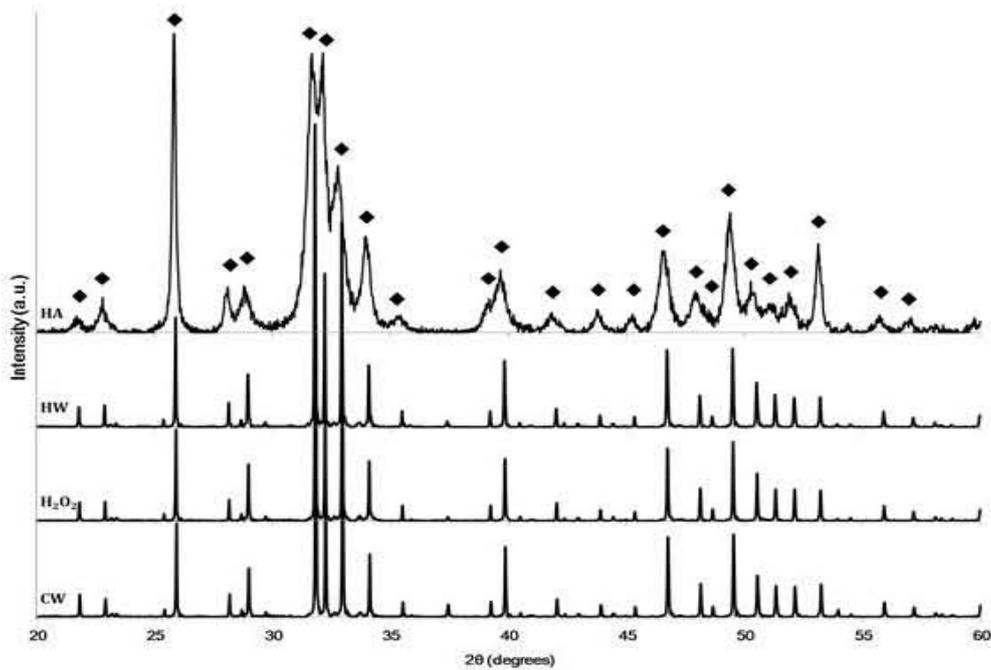


그림 2-5. 수세방법 별 시료의 XRD 분석결과. (HA, 수산화 인회석; HW, 끓는물; H₂O₂, 과산화수소; CW, 상온의 물)

- 표 2-2에는 XRF로 측정된 정량실험 결과가 기록되어있음. 정량분석 결과에 따르면 모든 시료에서 유의미한 차이는 관찰되지 않았음. 모든 실험군에서 칼슘/인의 몰비율이 2.1로 조사 되었음.

표 2-2. 수세 방법별 XRF 정량분석 결과

Group	Ca (wt %)	O (wt %)	P (wt %)	Na (wt %)	Mg (wt %)	etc (wt %)	Ca/P Ratio
HW	43.6	38.8	16.0	1.0	0.5	0.1	2.11
H ₂ O ₂	44.0	38.7	15.8	0.9	0.5	0.1	2.16
CW	44.0	38.7	15.8	0.8	0.4	0.3	2.15

(2) 열처리 시간별 특성

- 열처리가 골 이식재의 성질에 미치는 영향을 알기 위하여 고온의 소결로를 통해 열처리 시간별 특성을 조사하였음.

① TGA 분석 결과

- 말뚝 시료의 열 변화 특성을 조사하기 위하여 열중량분석기(Q-5000 IR, TA Instruments, USA)가 사용됨. 열중량분석을 통해 열처리 과정에서 말뚝의 온도별 특성변화를 조사함. 25-1300℃의 온도 범위에서 10℃/min으로 온도를 변화시키며 조사되었음.

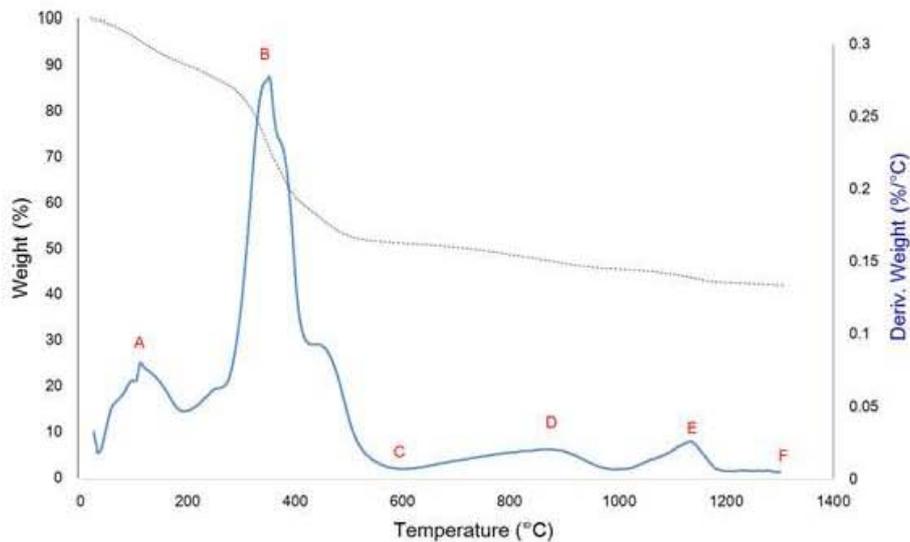


그림 2-6. 말뚝의 열중량분석 결과

- 그림 2-6은 열중량분석(TGA)결과를 나타냄. 검정색 점선은 재료의 총 질량의 감소를 나타내며, 파란색 실선은 질량의 감소량을 온도로 미분한 미분값(기울기)를 나타냄. 분석 결과에 따르면 6 지점의 온도에서 큰 질량변화가 관찰됨.
- 그림 2-6의 A지점은 물의 증발로 인하여 질량이 줄어든 온도 111.62℃, B지점 유기화합물의 증발로 인한 질량 변화가 크게 일어난 지점으로 351.11℃임을 알 수 있음. 그림 2-6의 특성 그래프에 따르면 D, E에 표시된 온도에서 큰 질량변화가 일어났음. 참고문헌에 따르면 인회석 제열의 재료가 600℃ 이상의 열처리 과정을 거칠 경우 재결정화가 일어나는 것으로 알려져 있어, 약 900℃와 1170℃ 구간에서 재 결정화가 일어난 것으로 보임.
- 뼈 분말을 전기로에서 열처리할 때, 지르코니아 또는 알루미늄 용기에 담아 전기로에 넣은 뒤 소결함. 용기의 모양 및 용기에 담긴 분말의 부피에 따라 도가니 안의 분말의 열전달 특성이 달라지고, 이러한 현상은 용기내부의 골 분말의 소결특성에 영향을 주는 것으로 보임. 따라서 적절한 용기의 모양과 용기에 담긴 분말의 부피를 결정해야 함.
- 전기소결로는 두 시간 동안 600℃로 승온한 뒤 두 시간동안 600℃로 유지한 뒤 상온이 될 때까지 냉각시킴. 이 과정을 1 cycle로 설정하고 이 과정을 각각 1, 2, 3 cycle 반복함.

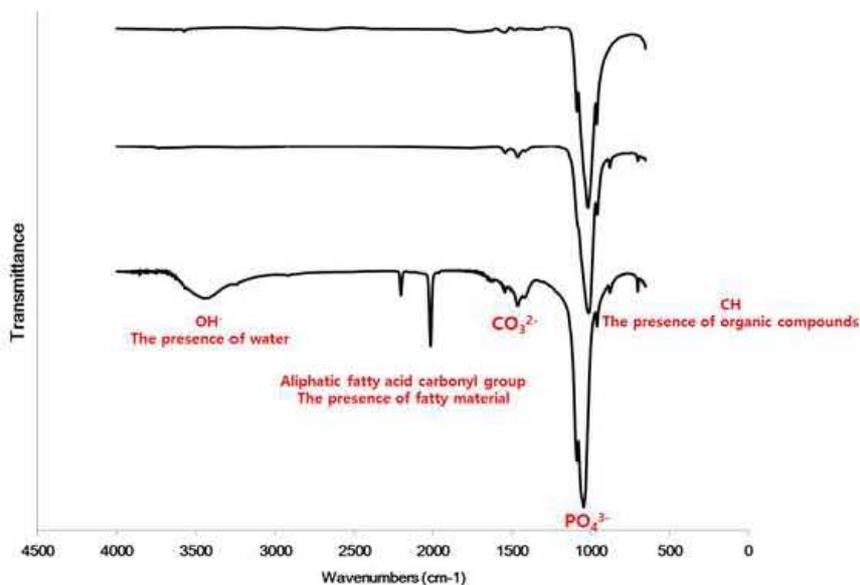


그림 2-7. 소결 시간별 시료의 FT-IR 결과. (아래에서부터 1-cycle, 2-cycles, 3-cycles 특성 밴드임)

- 1-cycle의 경우 지방족을 나타내는 밴드와 탄산을 나타내는 밴드가 나타나는 것을 확인 할 수 있으며, 2-cycles 소결 시료부터는 유기물이 가지는 특성 작용기 밴드가 나타나지 않는 결과를

확인 할 수 있음.

- 600℃ 온도에서 유기물이 사라지는 특성을 나타냈던 열 중량분석 결과와 비교해 보았을 때와 전기로에서 소결하였을 때의 결과가 일치 하지 않는 모습을 보여 줌. 이는 전기로 안에서 분말 내부에 전체적으로 열전달이 덜 되었을 것으로 확인 됨.
- 소결 온도에 따른 소결 시간을 최적화하기 위하여 각각 900℃, 1000℃, 1200℃, 1300℃의 온도로 열처리 시간을 측정하며 소결하였으며, 열처리 시간은 위의 실험에서와 같이 2 시간동안 온도를 올리고 2 시간 동안 온도를 유지한 뒤, 자연적으로 냉각하는 방식을 1 cycle로 하여 실험함. 이때, 100×100×150 mm(W×D×H)의 알루미나 도가니에 10 mm가 되도록 골 분말을 채우고 열처리를 함.
- 유기물의 잔존 여부만을 살피는 실험이었으므로, FTIR을 통해 시료의 특성 밴드를 조사함. 조사된 결과는 그림 2-8에 온도와 cycle 별로 정리함. 모든 온도조건에서 2 cycle 이상의 소결 조건에서 유기물이 존재하지 않음을 밝혀냄.
- 소량의 시료를 열처리 하는 경우는 온도에 관계없이 1 cycle에 모든 유기물이 증발하는 것을 확인함.

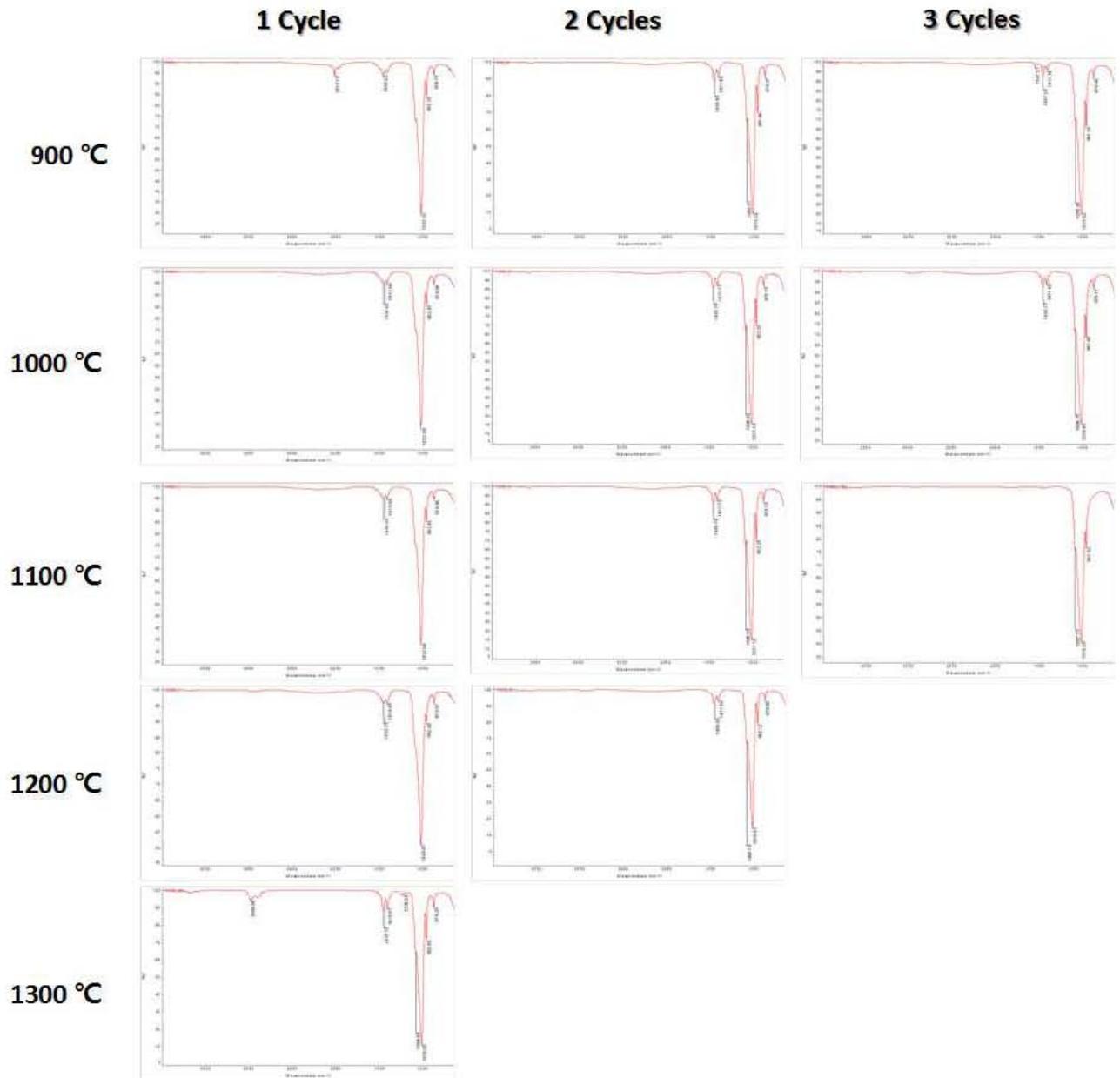


그림 2-8. 열처리 온도 및 처리 시간별 소결특성 그래프

- 골 분말의 양과 온도간의 관계를 조절해서 최적의 조건을 찾기 위한 일련의 실험을 통해 100×100×150 mm(W×D×H)의 알루미늄 도가니에 40 mm 가량의 시료를 넣고 12 시간(승은 2 시간, 유지 10 시간)동안 소결하는 조건을 결정함.
- 생체의 실험 결과를 통해서 1300℃에서 소결한 말뼈의 생체적합성이 좋았으므로 이 조건으로 가장 효율적인 공정을 설계함. 지금까지 언급했던 모든 분석 결과를 통한 효율적 골 대체재 생산 공정은 그림 2-9에 순서도로 표현됨.

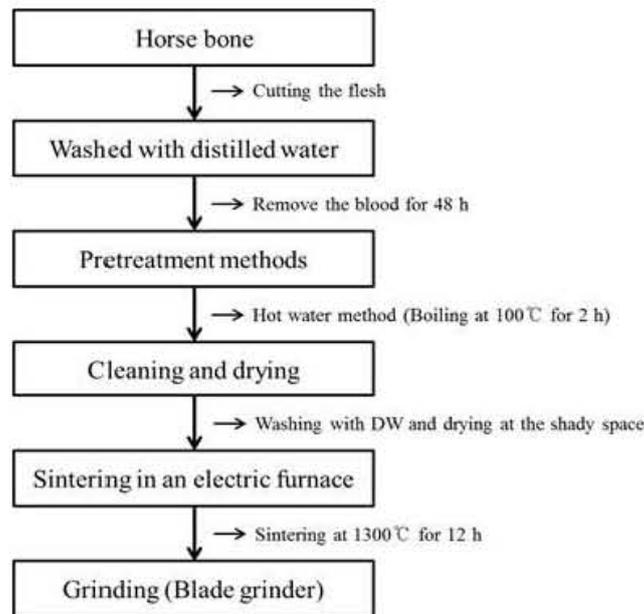


그림 2-9. 효율적인 골 소결 분말을 제작하기 위한 공정도.

- 열처리를 마친 시료를 온도별로 분류하여 XRD특성을 조사하여 TOPAS를 이용하여 결정의 크기를 계산함.

표 2-3. 각 분말의 결정크기. (HB 600 : 말뼈 분말을 600℃로 열처리한 시료, 뒤의 숫자는 열처리 온도를 나타낸다. BB 600 : 소뼈 분말을 600℃로 열처리한 시료, 뒤의 숫자는 열처리 온도를 나타낸다. HA : 수산화인회석(Hydroxyapatite, Sigma aldrich, USA))

시료명	결정의 크기 (nm)	시료명	결정의 크기 (nm)
HB 600	50.5	BB 600	228
HB 900	288	BB 900	428
HB 1100	556	BB 1100	312
HB 1300	116.7	BB 1300	98.6
HA	22.86		

- 두 시험군의 경우 900~1100℃ 사이에서 열처리한 골 분말의 경우에 가장 큰 결정크기를 갖는 결과를 얻었다. 1300℃에서 열처리한 시험군의 결정크기는 말뼈는 116.7 nm 소뼈의 경우는 98.6 nm를 갖는 것을 확인함.

다. 골 분말의 입도 크기가 물리적 특성에 미치는 영향에 대한 연구

(1) 마이크로 및 초미세(서브마이크로) 동물뼈 분말

- 유기물이 제거된 골 분말을 환부에 이식하는 치료법은 널리 사용되고 있음. 시중에 널리 사용되고 있는 이종 골 이식재의 경우 대략 0.2~1 mm의 입도를 가지는 분말이 주를 이루는 것으로 조사됨. 본 연구에서는 이식할 동물 뼈의 입자의 크기를 변화시켰을 때 물리 화학적 성질의 변화 여부를 관찰함.
- 그림 2-10, 11은 동물뼈 분말의 SEM 사진과 입도 분석 결과임. 유기물을 제거한 뒤 소결 과정을 거쳐 제작한 마이크로 입자의 동물뼈 분말은 돼지뼈의 경우 66-76 μm, 말뼈의 경우 56-83 μm의 입도 분포를 갖는 것으로 관찰됨. 초미세 사이즈의 골 분말을 제작하기 위해 고에너지볼밀(High energy ball mill, Deaga Powder, Korea)을 이용한 습식밀링법이 사용됨. SEM 이미지를 통해 입자의 크기 정도를 확인할 수 있음.

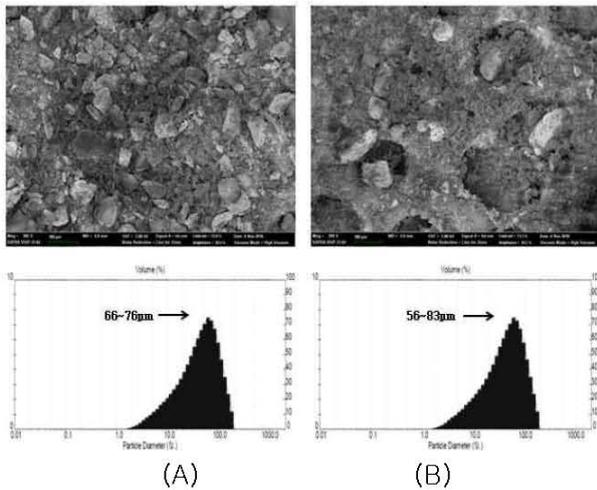


그림 2-10. (A) SEM image and particle size analysis of micro pig bone powders
(B) micro horse bone powders

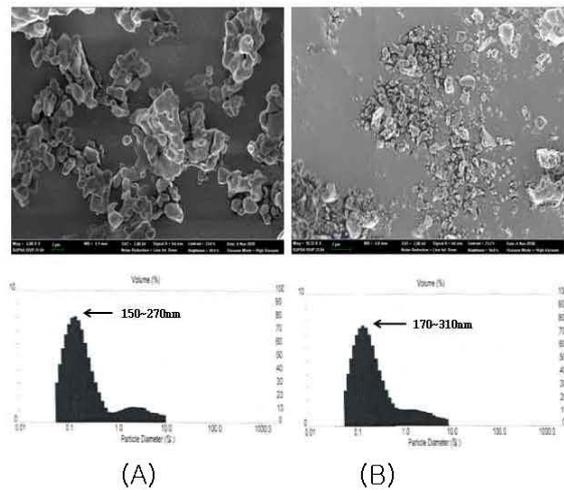


그림 2-11. (A) SEM image and particle size analysis of nano pig bone powders
(B) nano horse bone powders

- 초미세 사이즈의 분말의 경우 습식밀링 직후는 초미세사이즈를 갖는 것을 확인 할수 있었고, 사용을 위해 분말상태로 건조하는 과정에서 서로 뭉치는 현상이 발생됨.

(2) XRD, EDX 분석과 FTIR 스펙트럼

- 그림 2-12는 돼지와 말뼈, 수산화인회석 XRD 패턴을 나타내며, 돼지와 말뼈 분말의 분석을 위해 시중에서 판매되고 있는 수산화인회석(239396, Sigma Aldrich Korea, Korea)을 대조군으로 사용함. 돼지와 말뼈 모두 수산화인회석과 유사한 결정도를 나타냄. 즉, 돼지와 말뼈 분말이 수산화인회석과 비슷한 인산칼슘계 화합물임을 알 수 있음.
- 돼지와 말뼈 분말의 경우 수산화인회석의 것에 비해 피크의 높이는 증가했고 폭은 감소하여 더 뾰족한 모양을 보임. 이는 돼지와 말뼈 분말이 시중에 판매되고 있는 수산화인회석에 비해 결정화도가 높음을 의미함.
- 또한 돼지뼈 분말에 비해 말뼈 분말이 강도 값이 더 높고 뾰족한 피크를 나타냄을 확인할 수 있는데, 이 역시 말뼈 분말이 돼지뼈보다 높은 결정화도를 나타냄을 보여주었음.

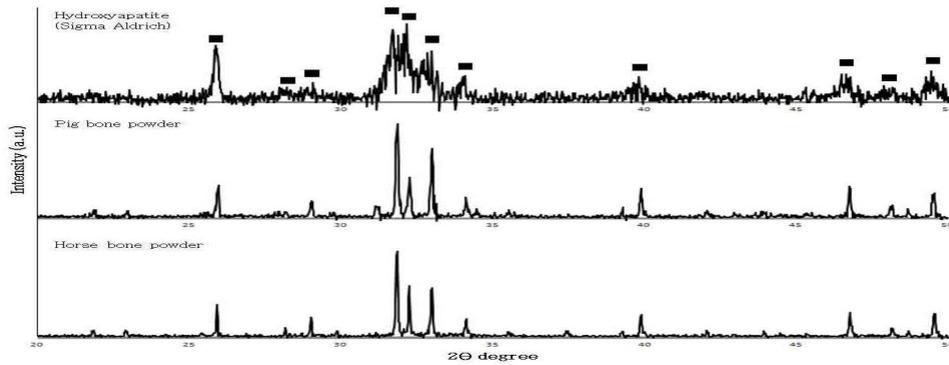


그림 2-12. XRD patterns of pig, horse bone powders and hydroxyapatite.
 (■: characteristic peaks of hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)

- 그림 2-13, 14는 돼지와 말뼈 분말의 FTIR 스펙트럼을 나타내며 FTIR 전에 알려진 참고문헌등을 통해 확인할 결과 모든 분말의 피크가 $3571\text{--}3572\text{ cm}^{-1}$, $1411\text{--}1457\text{ cm}^{-1}$, and $959\text{--}962\text{ cm}^{-1}$ 로 수산화인회석과 유사한 피크를 나타냄을 알 수 있음.
- 초미세(서브마이크로) 및 마이크로 동물뼈 분말의 FTIR 스펙트럼 결과, 포스페이트 결합, 하이드록시 결합과 카보네이트 결합이 존재함을 확인하였으며 $1500\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ 파장을 확대하여 얻은 그림 2-13의 결과 돼지뼈 보다는 말뼈, 마이크로 입자보다는 초미세 입자 분말의 투과율이 더 낮음을 확인함. 즉, 말뼈 그리고 초미세 입자가 해당 파장의 결합을 더 많이 보유하고 있음을 의미함.

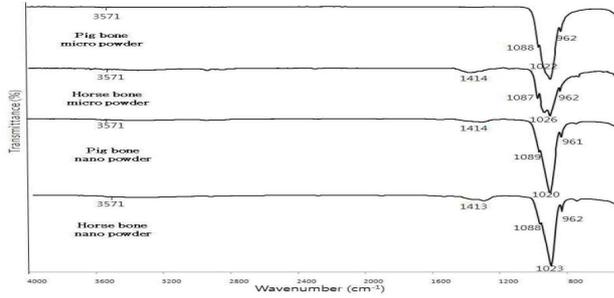


그림 2-13. FTIR spectrum on micro/submicro animal bone powders

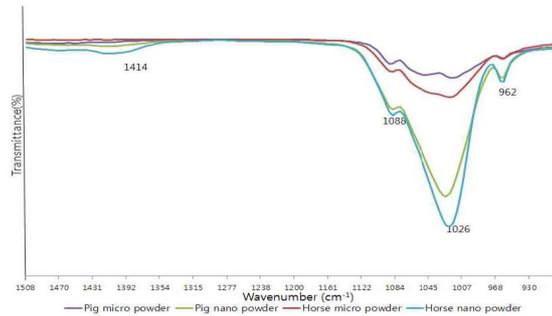


그림 2-14. The comparison of FTIR spectrum between pig/horse and micro/submicro powders

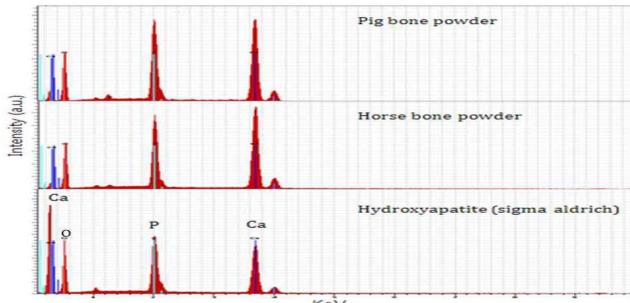


그림 2-15. EDX analysis of the chemical composition of animal bone powders and hydroxyapatite

표 2-4. Ca/P molal ratio of animal bone powders and hydroxyapatite

	Ca/P ratio(at%)
Hydroxyapatite	1.55
Pig bone powder	1.96
Horse bone powder	1.96

- 그림 2-15은 동물뼈 분말과 대조군으로 분석한 수산화인회석의 EDX 패턴을 나타낸 그래프임. 돼지와 말뼈 분말 모두 칼슘과 인을 나타내는 피크를 확인할 수 있으며 EDX 패턴 역시 수산화인회석의 것과 피크의 위치가 유사함을 관찰함.
- 하지만 분석 결과, 표 2-4와 같이 말뼈와 돼지뼈 분말의 칼슘과 인의 비율은 1.96으로 수산화인회석 1.55보다 높음을 확인함. 칼슘과 인의 비율은 세포의 접착과 성장에 매우 중요한 요소이며 칼슘과 인의 비율이 높으면 조골세포의 접착과 성장이 좋음을 밝힌 연구가 있음. 조골 세포가 골 시멘트의 표면에 흡착하기 위해 관계된 비브로넥틴(vibronectin)과 같은 단백질이 칼슘 바인딩 사이트를 갖고 있기 때문에 칼슘의 존재는 초기 단백질 흡착에 영향을 주어 조골세포의 부착 및 성장에 효과적이며 또한 장기적인 골유착(osteointegration)에도 긍정적 영향을 끼친다고 알려져 있음.

(3) 밀링 과정에서의 골 분말의 특성 변화

① 공기유입식 그라인더를 이용한 건식 밀링

- 미세한 크기의 동물뼈 입자 골 이식재를 제작하기 위하여 공기유입식 분쇄기를 사용함. 각각의 동물뼈 입자는 미세 분쇄 전 열처리를 하여 유기물을 모두 제거한 뒤 사용함. 골 분말은 공기유입식 분쇄기에 적용되기 전 1차적으로 분쇄하여 100 μm 망체로 거름.
- 공기유입식 분쇄기의 작동 원리는, 원통형의 용기 바닥면에 난류를 일으키는 스테인리스 블레이드가 고속으로 회전할 때, 용기 안에 들어있던 분말이 난류를 타고 빠르게 움직이며 분말 간의 강한 충돌이 일어남. 입자간의 충돌 에너지에 의해 입자가 잘게 분쇄됨.

표 2-5. 건식밀링

	Sample	d0.1 (μm)	d0.5 (μm)	d0.9 (μm)
1 cycle	5 μm	1.182	8.648	25.759
3 cycle	5 μm	0.872	4.501	17.133
5 cycle	5 μm	0.864	4.095	12.89
7 cycle	5 μm	0.837	3.501	10.161
	50 μm	1.089	7.183	59.647
	100 μm	11.059	130.067	191.27

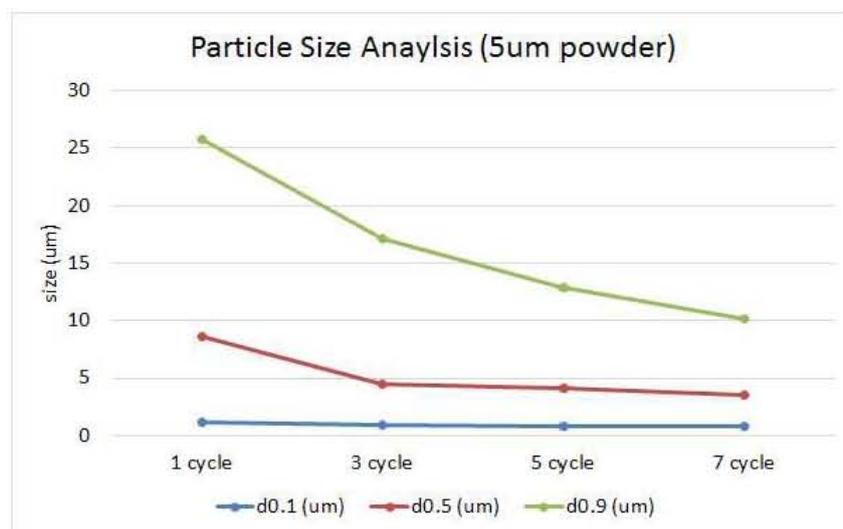
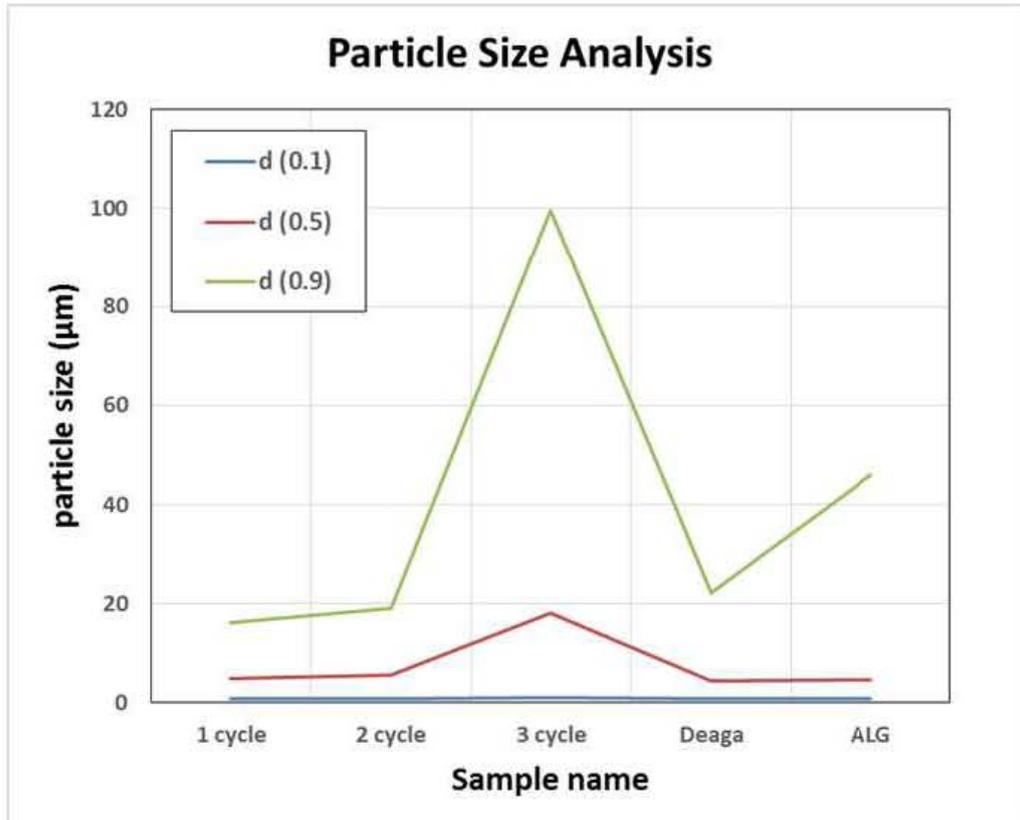


그림 2-16. 분쇄 횟수별 분말의 입도 변화

- 표 2-5 와 그림 2-16은 Air Leading Grinder로 분쇄한 결과임. 본 실험은 그라인더 내부에 골 분말을 50 g 가량 투입한 뒤, 30 초 그라인딩 15 초 휴식을 1 cycle로 정의하여 수행하였음.
- d0.1 입도는 3 cycle부터 0.8 μm 가량의 입도를 보이는 것으로 관찰되었음. 분쇄 cycle이 반복 될 수록 d0.9 입도가 줄어드는 것으로 보아 7 cycle 까지 분쇄하는 것이 가장 미세한 분말인 것으로 판단됨.
- 건식 밀링의 경우 분말의 공기 중 유출을 막을 수 없고, 시료의 채취가 어려운 단점이 있었음.

○ 고에너지 볼밀을 이용한 습식 밀링

- 건식 밀링의 경우 초미세 분쇄된 입자를 포집하는데 어려움을 겪었고, 분쇄중 발열에 의한 재 몽침 현상이 발생하는 등의 단점이 있었음. 이를 극복하고자 고에너지 볼밀로 습식 밀링을 진행 함.
- 초미세 분쇄를 위하여 Fine mill(Nano sizer, Deaga powder systems Co., LTD, Korea)를 이용 함.
- Fine mill은 Bead가 가득 차있는 용기의 내부에서 Bead와 회전체간의 강력한 마찰에 의해 분해 가 이루어지는 원리로 작동함. 이때 분쇄물질은 분산액과 함께 지속적으로 순환되며 냉각되는 과정을 거친다. 분산액으로는 물이 사용됨.
- 본 장비는 15 분에 1 회씩 분쇄할 용액이 기계를 한 바퀴 돌게 되며, 본 실험에서는 1 시간동안 분쇄한 결과를 1 cycle로 정의함.



	Particle size (μm)		
	d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)
1 cycle	0.821	4.774	16.235
2 cycle	0.795	5.649	19.147
3 cycle	1.141	18.129	99.709
Deaga	0.864	4.413	22.214
ALG	0.766	4.636	45.902

그림 2-17. 고크에너지 불밀을 이용한 습식 밀링 결과

- 그림 2-17에 분석한 결과를 기록 하였음. 1,2,3 cycle은 Fine mill로 분석한 시험군의 입도 분석 결과이며, Deaga는 Deaga powder 회사에 분쇄 의뢰한 시료임. 마지막으로 ALG는 본 연구팀이 보유한 공기유입식 분쇄기로 5 분간 분쇄하여 얻는 분말의 입도 분석 결과임.
- 그림 2-17의 불밀 결과에서 확인 할 수 있듯이, Fine mill에서 분쇄할 경우 분쇄 시간이 증가할 수록 끝 분말의 d(0.5)입도 d(0.9)입도가 증가함. 이와 같은 현상은 분쇄를 위해 가해진 에너지가 증가할수록 입자간의 결합력이 증가하여 다시 뭉치는 현상이 일어난 것으로 해석될 수 있음.
- 이전 습식 밀링에서, 밀링 시간이 증가할수록 분말 입자가 뭉치는 현상이 발견됨. 소결된 끝 분

말의 분쇄특성을 자세히 알아보기 위하여, 분쇄조건을 이전 실험과 같이 450 rpm으로 45 분 동안 분쇄 후 15 분 동안 쉬는 것을 1 cycle로 정의하고, 8, 16, 24, 32, 40, 48 cycle로 진행함. 분쇄 조건은 50 g의 골 분말에 100 g의 지르코니아 볼(3φ, Dorei, Japan)을 채운 뒤, 용기에 2/3 까지 증류수를 채운 뒤, PEG를 2 ml 첨가함.

- 밀링에 사용된 장비는 그림 2-98의 Planetary Mono Mill PULVERISETTE 6 classic line(독일, Fritsch)이 사용됨. 분쇄에 사용된 용기는 내부 용량 250 ml를 갖는 지르코니아 Jar(독일, Fritsch)임.

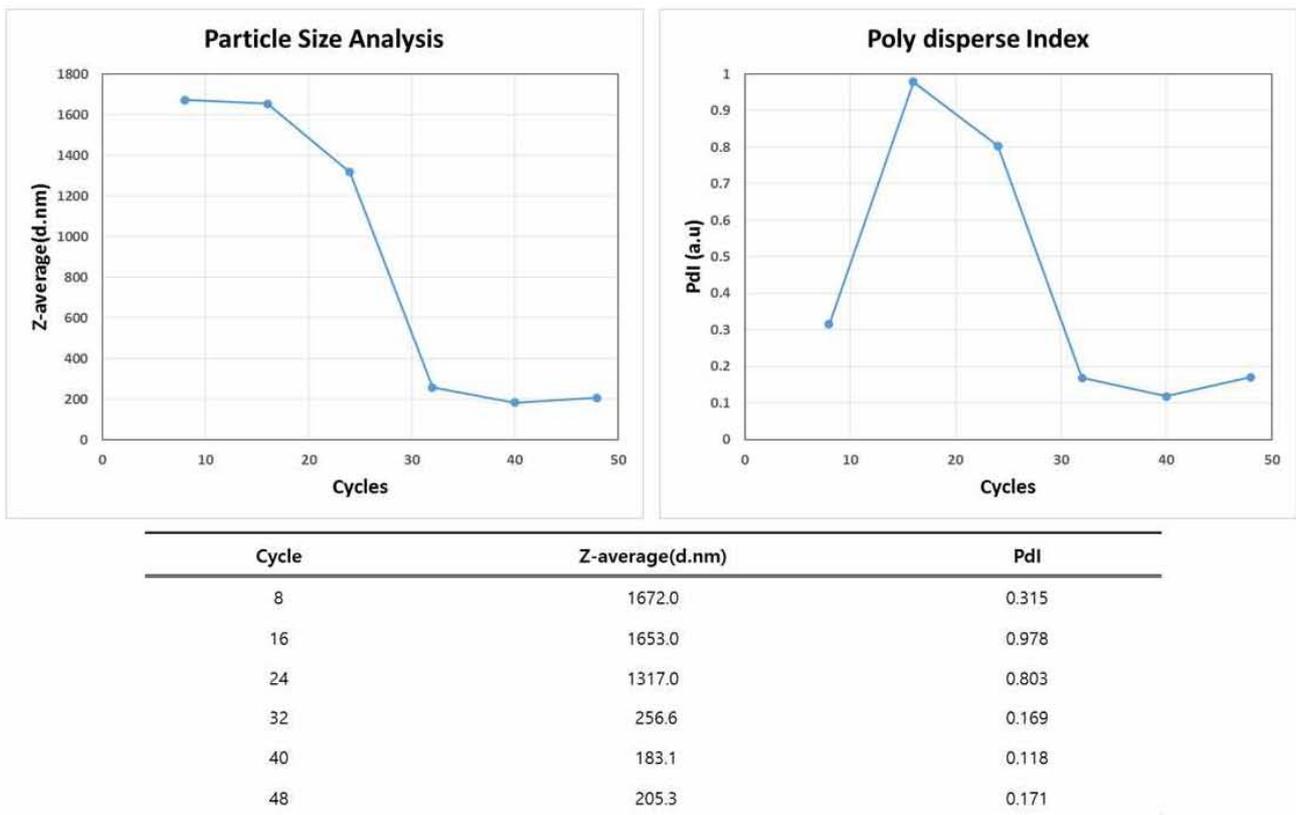


그림 2-18. 분산제를 이용하여 미세 분말을 안정화 시킨 그래프.

- 분산제 없이 실험한 결과와 다르게 분산제를 첨가한 경우 입자의 Z-potential 이 증가하여 입자의 안정성이 증가하는 것으로 예측됨. 밀링이 40 cycles 진행 될 동안 입자의 크기는 지속적으로 감소함.
- 분말의 입도 특성 중 Poly disperse index(PdI, 분산지수)수치를 이용하여 분말 입자의 입자크기 분포를 측정함(그림 2-18). 수치는 1에 가까울수록 여러 종류의 크기의 입자가 섞였음을 나타내며, 0에 가까울수록 한가지의 입도 범위를 갖는 다고 알려져 있음. 입자의 크기와 마찬가지로

분쇄가 진행될수록 입도 분포도 또한 감소하는 경향을 보여주었으며, 이를 통해 비슷한 크기의 입자들의 분포가 증가하는 것을 확인 함.

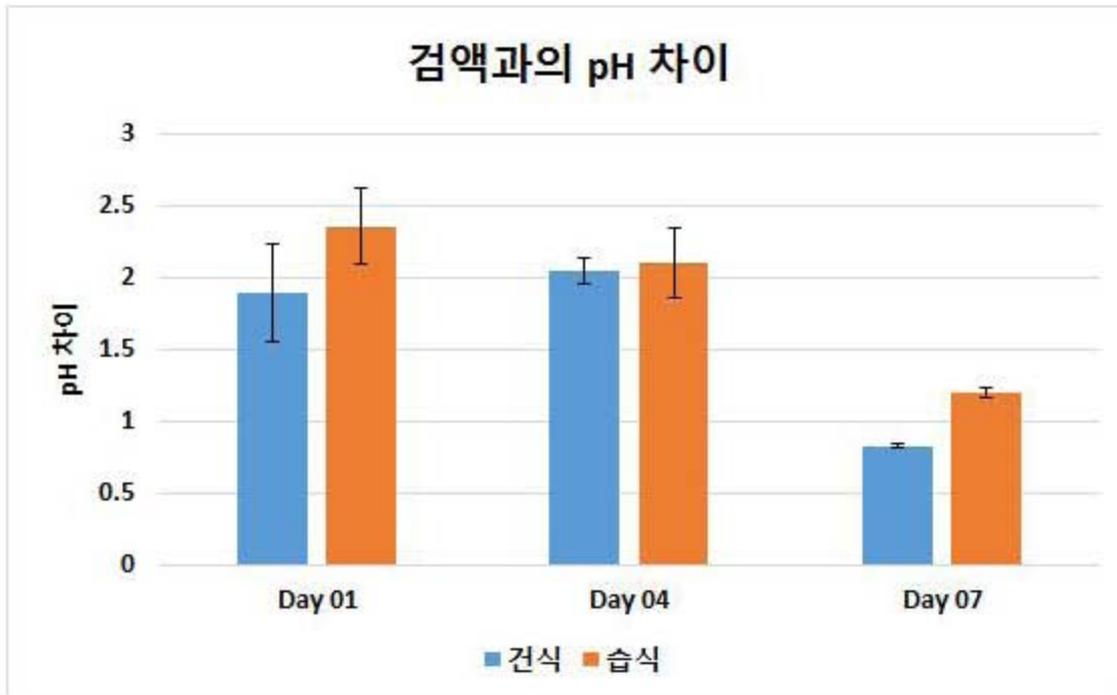


그림 2-19. 건식딜링과 습식딜링의 pH측정 그래프

- 그림 2-19의 결과는 건식딜링과 습식딜링의 차이에 따른 골 분말의 차이를 조사하는 일환으로 두 시료의 용출액의 pH를 측정하였음.
- 건식딜링한 분말과 습식딜링한 분말 모두 각각 15 ml conical tube (SPL) 에 0.2 g 씩 넣고 1차 증류수 10 ml 을 주입 함. 대조군으로 증류수 10 ml 만 주입한 군을 사용함. 각 군마다 3 반복 수행함. 실험 시작 후, 1일 차, 4일 차, 그리고 7일 차에 pH 를 측정하여 대조군과 실험군의 pH 차이를 계산함. pH 측정의 경우 S220 SevenCompact™ pH/ion meter (Mettler-Toledo, Switzerland)를 이용함.
- 실험결과 1일, 4일 차에서, 습식 딜링 시료의 경우 두 군 모두 검액과의 pH 차이가 2를 넘음. 7일 차로 넘어오면서 pH 차이가 1.5 정도로 줄어듬. 하지만 여전히 건식 딜링 분말과 검액과의 pH 차이인 0.8 보다는 현저히 높은 수치임. ($p < 0.05$) 전반적으로 습식딜링 분말의 경우 건식딜링 분말보다 검액과의 pH 차이가 더 크게 측정됨. 그리고 건식딜링 시료, 제 품 두 군 모두 시간이 흐를수록 검액과의 pH 차이가 감소하여서 7 일 차에는 그 차이가 4 일 차의 절반 이하로 떨어지게 됨. 추후에도 검액과의 pH 차이가 감소할 것으로 예상됨.

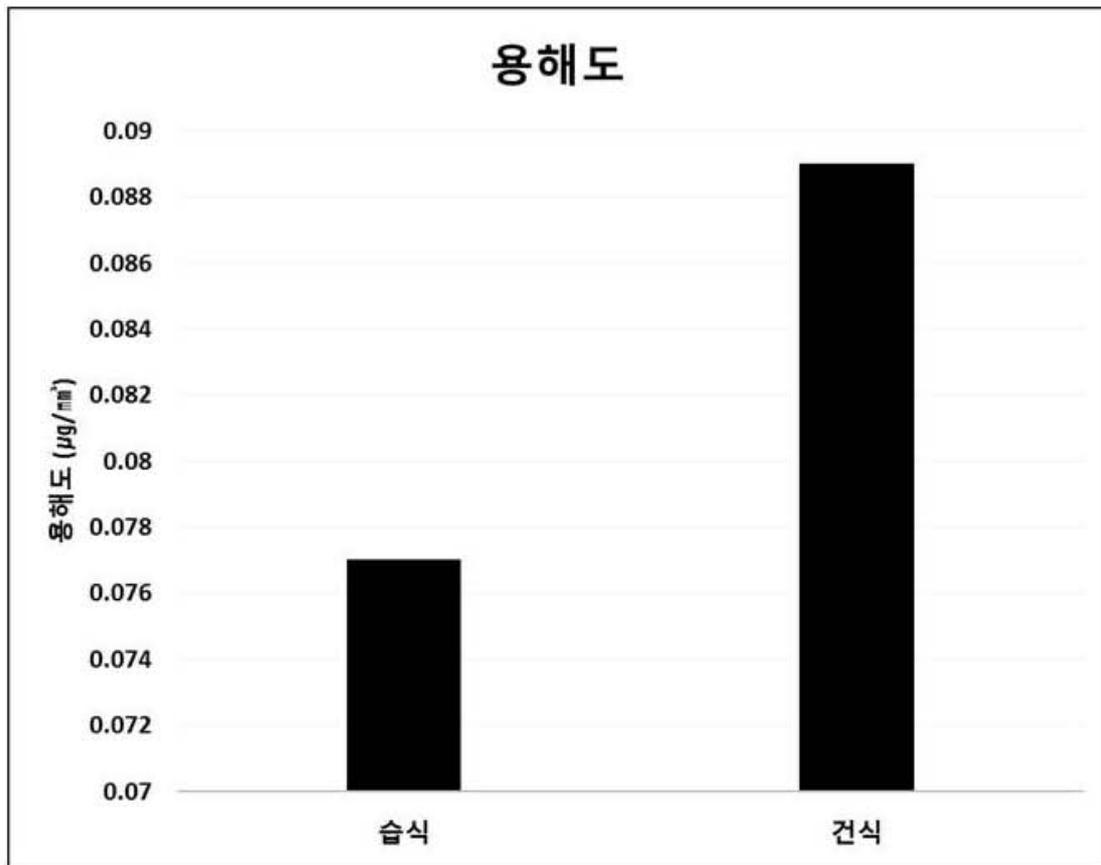


그림 2-20. 습식밀링 시료와 건식밀링 시료의 용해도 측정결과

- 용해도 측정을 위해, 건식밀링 시료와 습식밀링 분말을 각각 KBR pellet을 이용하여 일정한 부피의 디스크 타입으로 제조함. 초기 디스크 질량을 측정한 후, 충분히 큰 용기에 100 ml 의 1차 증류수를 담은 후, 그 안에 디스크를 넣어서 50 rpm 으로 rocking incubation을 진행함. 4일 후, 용액을 거름종이에 걸러 녹지 않은 분말과 디스크만 남긴 후 제거함. 분말과 디스크를 걸러낸 거름종이를 건조기에 넣어 하루 동안 60℃ 건조를 진행하여 거름종이에 남은 물기를 전부 제거함. 거름종이 위에 남은 분말과 디스크의 무게를 미세저울을 이용하여 측정함. 초기 디스크의 무게에 비해 손실된 질량을 용해된 분말의 질량으로 간주함. 용해된 분말의 질량을 용해시킨 증류수의 부피로 나누어서 용해도를 계산함.
- 실험결과, 습식밀링 시료의 경우 건식밀링 시료보다 용해도의 값이 적게 나옴. 이는 습식밀링 분말의 응집력이 건식밀링 분말의 응집력보다 더 높음을 나타냄. 그렇지만 초기 디스크 질량에 비해 제품의 경우 3.51%, 건식밀링 시료의 경우 5.45% 감소한 것을 볼 때, 두 군 모두 용해도 실험에서 큰 질량의 변화가 없음을 알 수 있음.

2. 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 생물학적 유효성 및 안전성에 대한 기본 연구

가. 열처리 온도를 달리한 생체소재에서의 세포 친화성 실험

- 동물의 뼈 및 인회석 계열의 세라믹 재료에 600℃ 이상의 고온의 열을 처리하게 되면 결정성의 변화를 일으키게 됨. 본 실험은 열처리 온도에 따른 결정성의 변화가 체외 조건에서의 세포 성장에 미치는 변화를 조사함. 총 4개의 실험군과 2개의 대조군으로 실험이 진행됨. 실험군은 600℃ 이상의 고온의 전기로에서 소결의 과정을 거침. 600℃에서 열처리된 실험군을 HB 600이라고 하고, HB 900은 900℃에서, HB 1100은 1100℃에서, HB 1300은 1300℃에서 열처리한 말뚝 분말을 의미함. 대조군은 2종류를 사용했으며, HA는 수산화인회석(Hydroxyapatite, sigma aldrich)이고, Bio-oss(Geistrich korea.)는 상용 골 이식제임.
- 사용된 세포는 MC3T3-E1(mouse calvarial osteoblasts)이며, 배양에 사용한 증식용 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS, #SH30919.03, Hyclone, USA)과 1% 항생제 ((#LS 203-01, WELGENE Inc., Korea)와 500ml α -minimum essential medium (#LM 008-02, WELGENE Inc., Korea)을 혼합하여 준비했다. 배양은 37℃ 와 100% 상대습도, 95%의 공기와 5% CO₂가 유지되는 배양기 내부에서 진행함.
- 실험군의 세포 독성을 평가하기 위하여, 뼈 분말의 추출물을 이용하여 세포에 미치는 독성을 조사함. 추출액은 증식용 배양액과 골 분말 및 대조군을 혼합하여 37℃의 조건에서 24시간동안 보관한 뒤, 원심분리 하여 분말제거 뒤 배양에 사용됨.
- 세포는 96 well plate에 1×10⁴개씩 시딩되었으며, 세포독성을 확인하기 위해 각각 12시간과 24시간 후의 세포 활성도를 WST-1 assay 법으로 조사함.

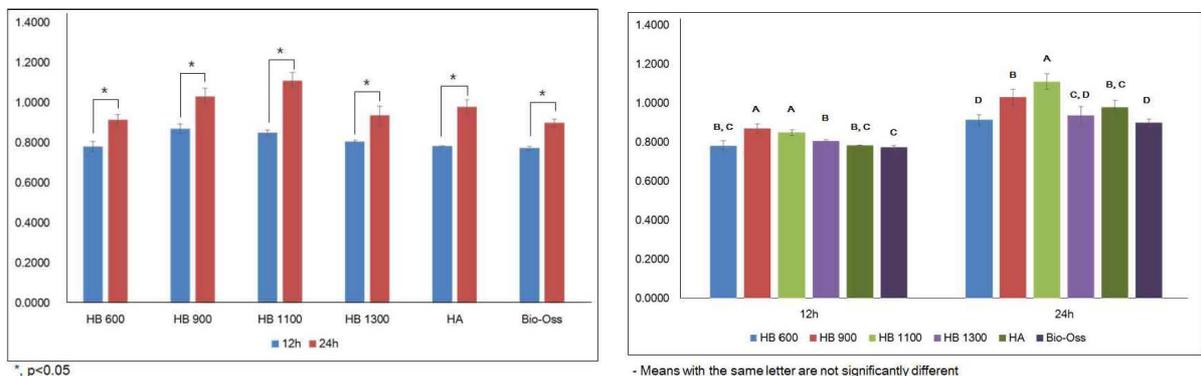
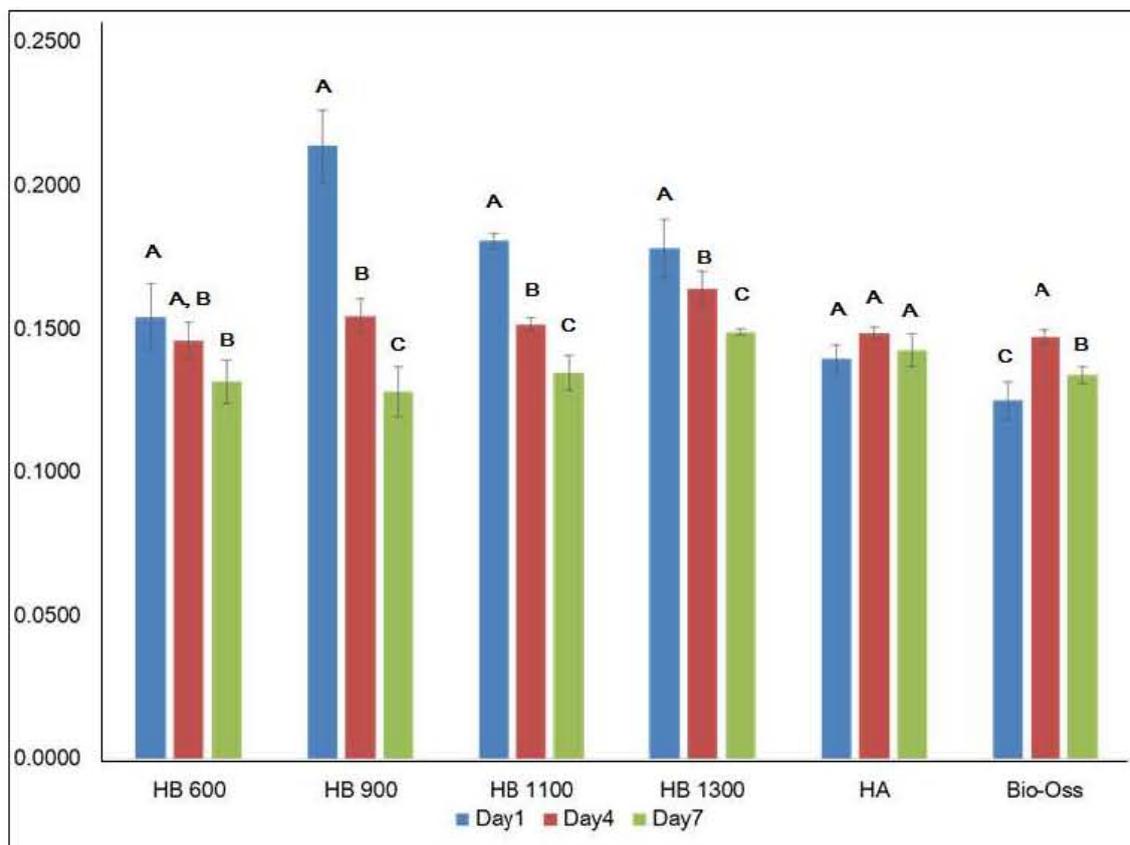


그림 2-21. MC3T3-E1 세포의 독성 실험

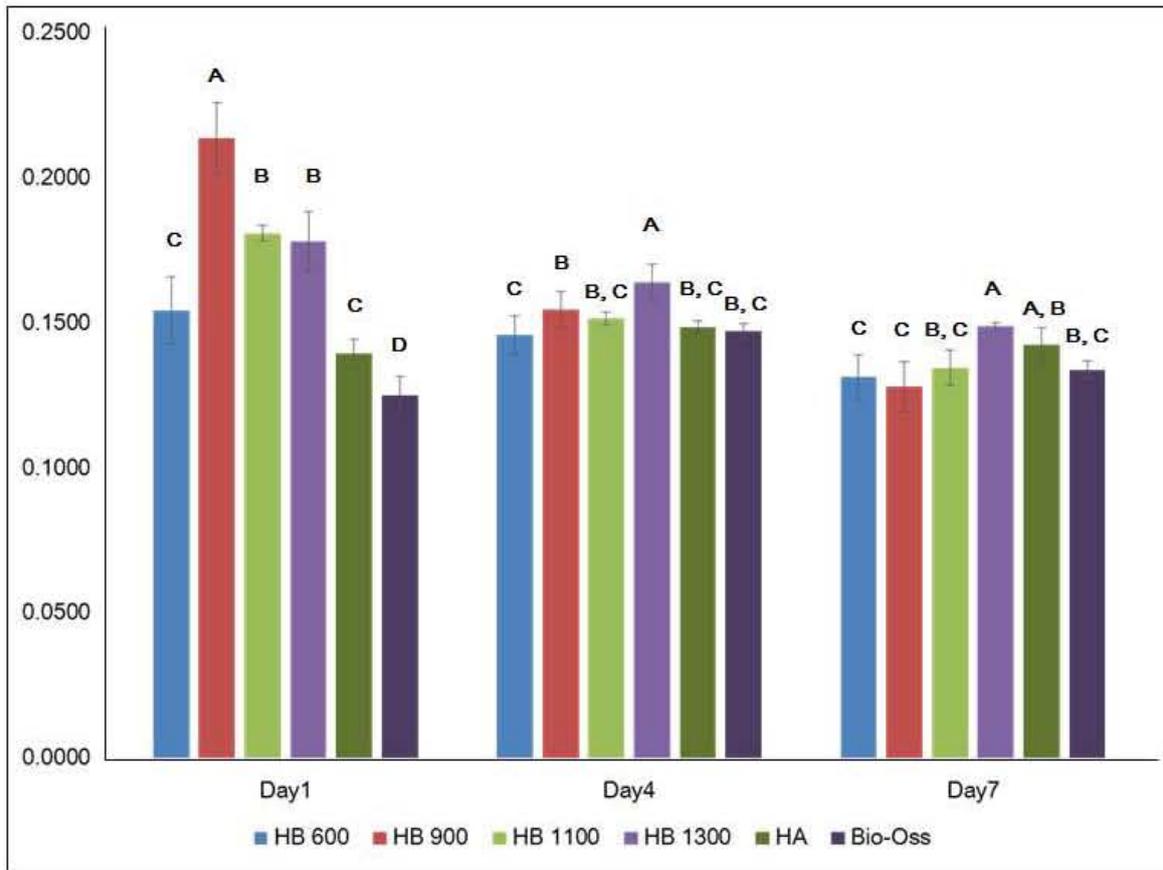
- 그림 2-21은 세포 독성실험 결과를 그래프로 표현한 것임. 왼쪽 그래프는 각 실험군별 12시간 24시간 독성실험 결과이며, 모든 군에서 세포의 활성도가 증가하는 결과를 보여줌. 또한 오른쪽 그림은 실험군간의 세포 활성도 비교 결과이며, 결과를 통해 HB 1100에서 가장 높은 세포활성도를 보임을 알 수 있었음.
- 골 분말에서 세포 증식을 측정하기 위해 다음과 같은 방법으로 배양용기가 제작 됨. 24-well 플레이트에 polydimethylsiloxane (PDMS, SYLGARD 184 SILICONE ELASTOMER KIT, Dow Corning, USA)를 얇게 코팅한 뒤, 제작된 골 분말을 제차 코팅함. 시험군은 코팅 후 완전히 건조가 끝난 뒤 배양에 사용함.
- 세포와 배양액 및 배양 조건은 독성 평가와 동일한 상태로 준비되었으며, MC3T3-E1 세포를 3×10^4 개씩 각웰에 시딩함. 배지는 2일에 한번씩 새로운 배양액으로 교체 되었으며, 1, 3, 7일에 WST-1 assay 법을 이용하여 세포의 활성도를 측정하여 세포의 증식을 관찰함.



- Means with the same letter are not significantly different

그림 2-22. 각 실험군별 세포 증식 그래프

- 그림 2-22는 각 실험군별 세포증식 결과를 표시함. 1, 3, 7 일 시험 결과 모든 군에서 세포의 활성이 감소하는 결과를 보여주었다.



- Means with the same letter are not significantly different

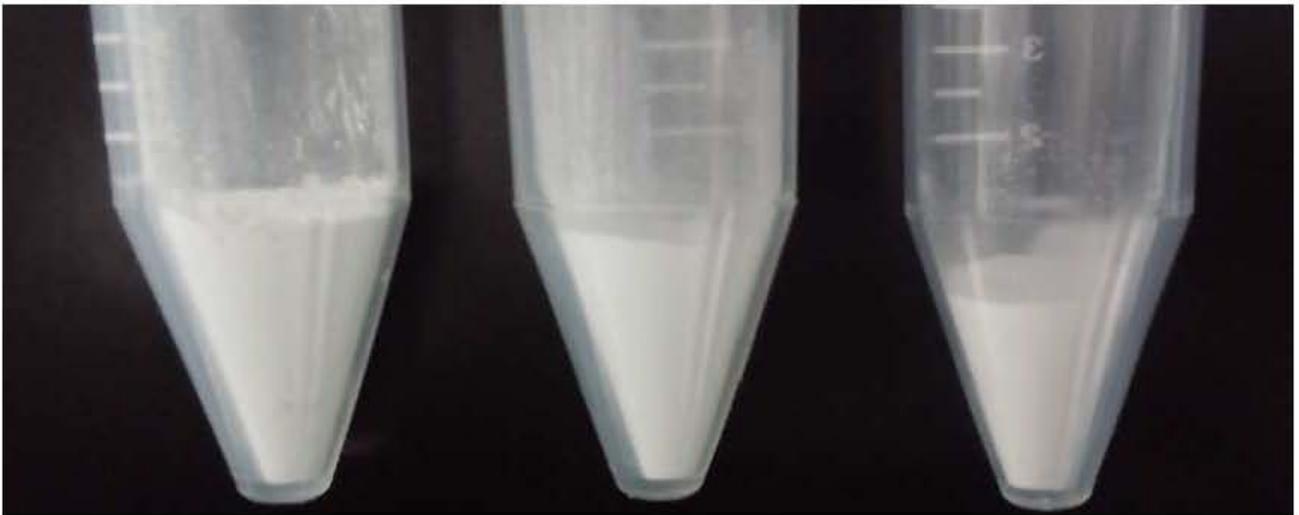
그림 2-23. 골 분말에서의 세포증식 시험

- 그림 2-23은 증식 시험 결과를 1, 3, 7 일 일자별로 정리한 결과 그래프임. 실험 결과는 SAS 소프트웨어를 통해 통계분석을 진행하였으며, 그래프 위의 알파벳이 같은 군은 유의성이 발견되지 않은 군이며, 알파벳이 다른 군은 통계적 유의성이 발견된 군임. 7 일차 결과를 통해 HB 1300과 HA에서 가장 높은 증식률을 보이는 것을 확인할 수 있었음.

나. 생체소재와 키토산 혼합물의 세포 친화성 실험

(1) Calcium Phosphate-Chitosan Composite 제조 및 기계적 강도 측정

- 키토산은 갑각류의 외골격인 키틴이라는 고분자어를 수화하여 얻을 수 있는 자연유래 고분자로 알려져 있음. 지난 45년간의 연구를 통하여 키토산과 수산화인회석을 조합하여 만든 혼합물이 골조직의 재생에 긍정적인 영향을 준다는 연구논문들이 출판되었음. 이러한 연구를 기초로 하여 본 연구팀에서도 수년간 키토산과 수산화인회석의 화합물에 세포를 적용한 실험을 진행함. 본 연구에서는 말뚝에서 얻어진 수산화인회석을 이용하여 키토산과 혼합물을 만들어 실험을 진행함.
- 탈아세틸화가 95%이상 진행된 3 mm 이상의 분말형태의 키토산(YB Bio, Koea)을 사용함. 혼합에 사용될 키토산 용액을 제조하는 데는, 2%의 아세트산용액이 사용됨. 이 때, 키토산용액은 3.5%wt의 농도를 갖도록 제조 됨.
- 본 실험실에서는 골 분말의 평균 입도에 따른 생체 적합성 및 기계적 특성을 조사하기 위하여, 골 분말을 각각 평균입도 5, 50, 100 μm 가 되도록 분쇄하였으며, 이를 키토산 용액과 혼합함. 뼈분말 1g당 3.5% 키토산 용액 0.5 ml를 혼합하여 반죽을 만들고, 다음으로 반죽을 8 × 2 mm (Diameter × Height)의 PDMS(Poly DM Siloxane)의 몰드에 넣음. 반죽이 채워진 몰드는 100 Φ Petri dish에 담겨 37 $^{\circ}\text{C}$, RH 95%의 배양기 안에서 72 시간 동안 보관됨. 이후 PDMS 몰드에서 건조된 Calcium Phosphate-Chitosan Composite (CPCC)를 분리하여 디스크 형태의 CPCC를 얻음. 또한 6 × 12 mm (Diameter × Height)의 원형 봉 모양의 테플론 몰드에 반죽을 넣고, 37 $^{\circ}\text{C}$, RH 95%의 배양기 안에서 72 시간 동안 보관됨. 이후 건조된 CPCC를 분리하여 봉모양의 CPCC를 얻음.
- 그림 2-24는 각각의 입도 크기별로 분리된 분말의 형상을 관찰한 사진이며, 분말의 크기에 따라 분말의 표면 모양이 다름. 아래의 사진은 Conical tube에 담긴 1.5 g의 분말 사진이다. 분말의 입도에 따라 부피가 달라지는 것을 알 수 있음.
- 그림 2-25, 26, 27은 제작된 골 분말의 FE-SEM 사진, XRD 특성 그래프, FTIR 특성 밴드를 나타내고 있음. 입도 크기에 따른 화학적 성질의 변화는 없는 것으로 관찰되었음.

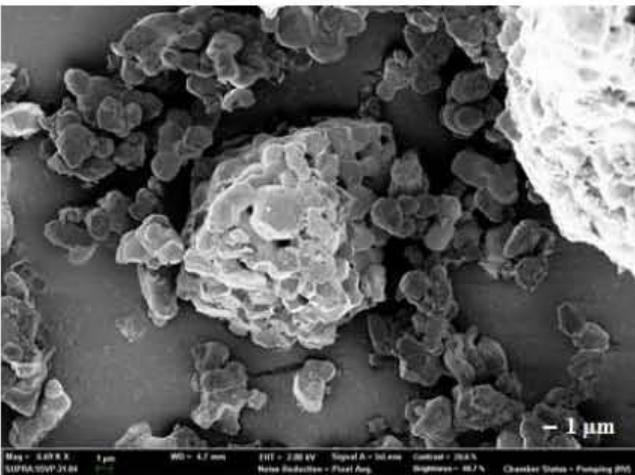


5 μm

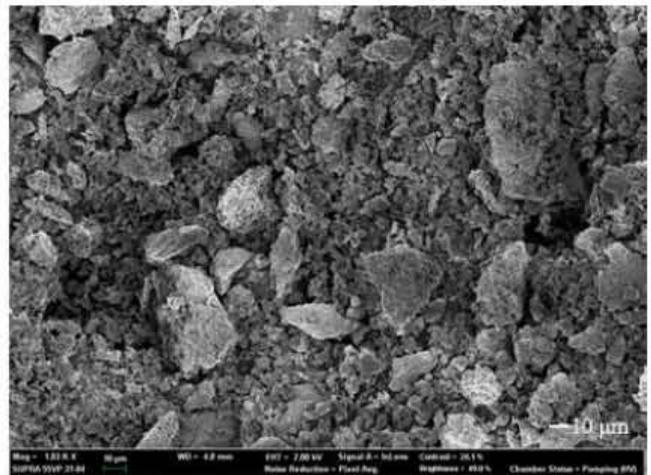
50 μm

100 μm

그림 2-24. 입도의 크기별로 분리된 소결된 말의 골분말



5 μm



50 μm

그림 2-25. 골 분말의 미세 구조를 측정된 FESEM 사진

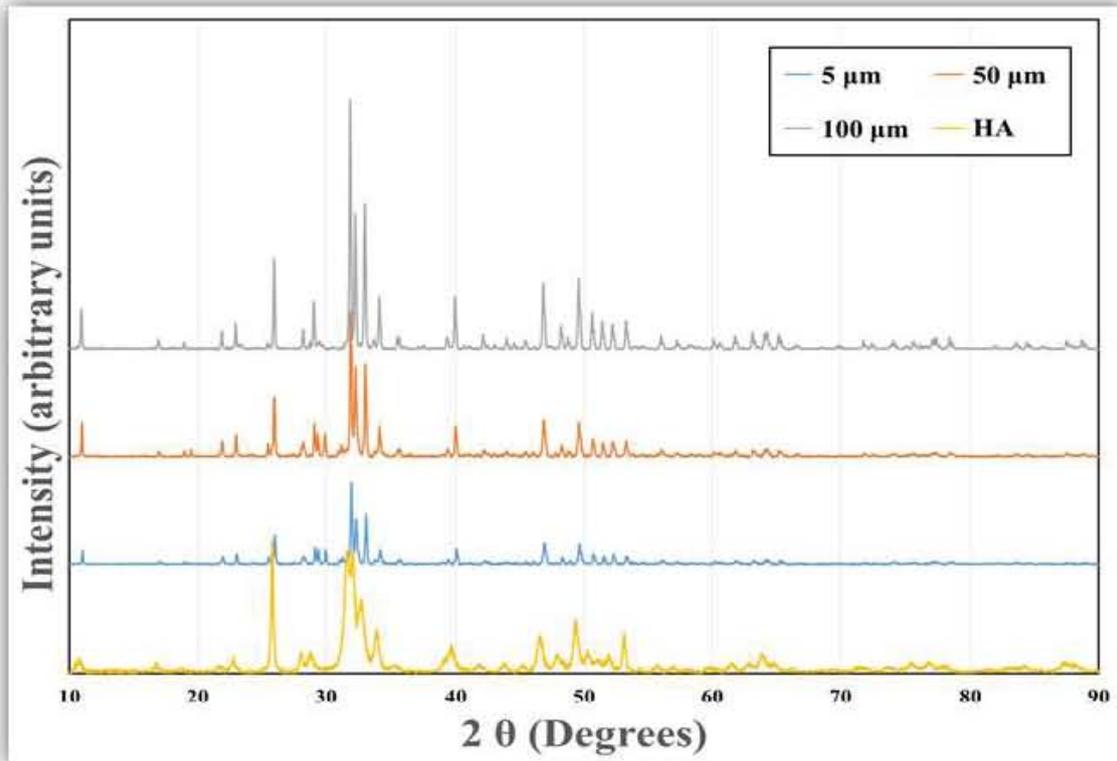


그림 2-26. 폴 분말의 결정 구조 및 결정화도를 나타낸 XRD 그래프

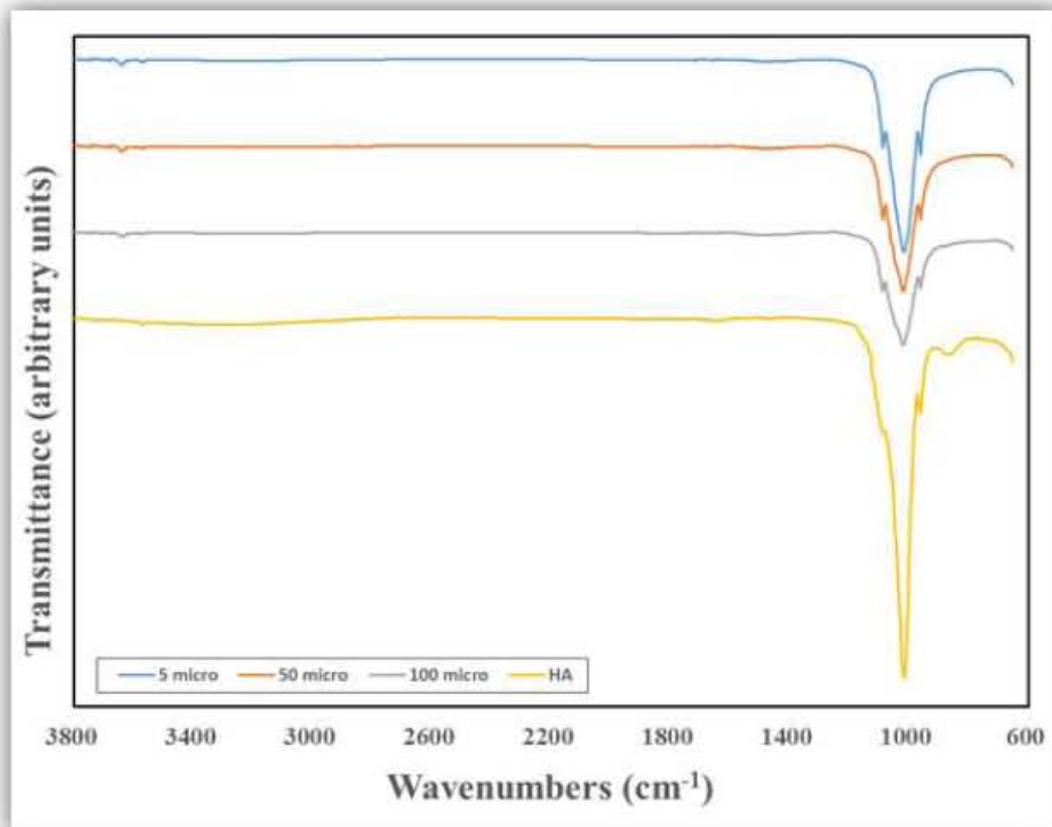


그림 2-27. 폴분말의 FTIR 그래프

- CPCCs의 압축강도를 측정하기 위하여 Texture analyzer(TAHDi, Stable Micro Systems, UK)가 사용됨. Texture analyzer의 cross head speed는 0.05 m/sec의 속도였으며, 변곡점이 생긴 부분을 최대압축응력 지점으로 판단함. 파괴실험에 사용된 샘플은 원형 봉 형태를 갖는 CPCC이다.
- 최대압축응력(Ultimate compressive strength)이 발생한 지점의 응력을 측정하여 압축강도를 계산하였으며 그 계산식은 아래와 같음.

$$\sigma_e = \frac{F}{A}$$

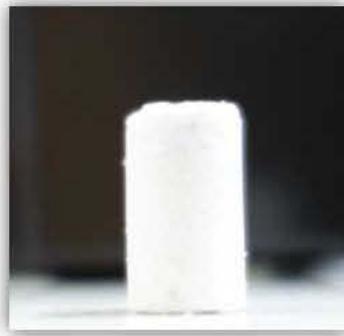


그림 2-28. 키토산 골분말 혼합물 6 × 12 mm (Diameter × Height)

- 그림 2-28은 파괴 실험을 위하여 제작된 CPCC의 사진임. DISC 형태로 제작된 CPCC는 압축강도 측정에 적합하지 않으므로 높이가 직경의 두 배가 되는 원 기둥 모양의 CPCC를 제작함.
- Texture analyzer의 head 부분이 시료를 눌러 파괴가 진행되면 대각선 모양으로 파괴가 일어났음. 파괴가 일어난 시점의 힘을 기록하여 공식에 적용하여 최대 압축 응력을 계산함.
- 측정은 각 실험군당 5회 반복되었으며, 계산된 CPCC의 압축 강도는 각 시료 간 근소한 차이가 관찰됨. 측정은 평균입도 5, 50, 100 μm 로 제작된 골분말과 키토산 혼합물의 순서로 진행되었고, 압축 강도의 평균은 각각 1.8575 MPa, 1.286 MPa, 1.842 MPa로 조사됨. 그림 2-29는 CPCC의 강도를 그래프로 나타낸 표이다. 50 μm 의 입도크기를 갖는 분말로 제조한 CPCC가 1.286 MPa로 가장 낮은 강도를 갖는 것으로 나타났으며, 나머지 두 실험군은 1.85 MPa의 비슷한 압축강도를 갖는 것으로 조사됨(그림 2-29).

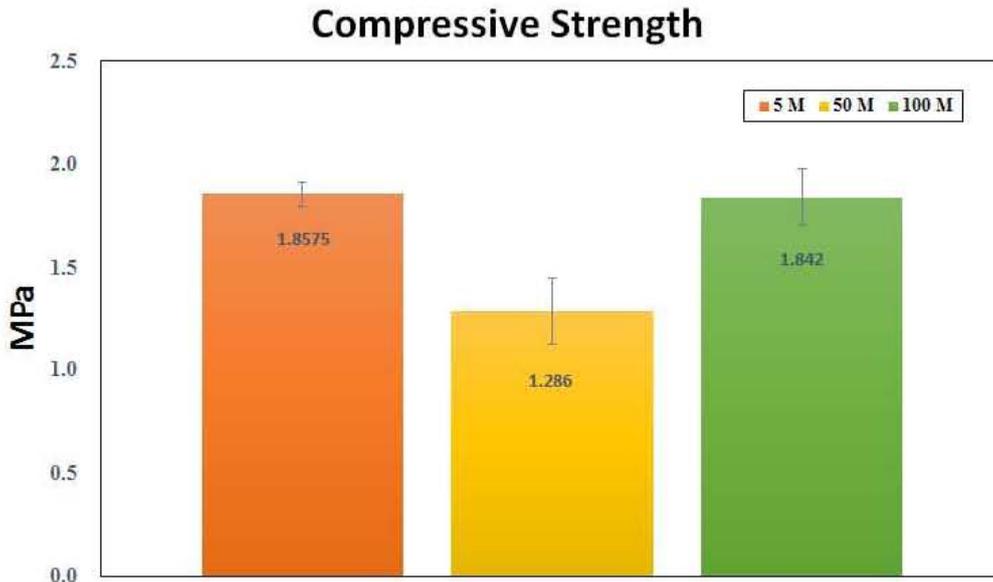


그림 2-29. CPCC의 압축강도시험 결과

(2) Calcium Phosphate-Chitosan Composite(CPCC)의 생체의 실험

- 파우더의 크기가 제작된 CPCC의 표면에 주는 영향을 확인하기 위해 결정구조와 표면 거칠기 (surface roughness)을 측정 하였음. 또한 표면의 차이에 따른 세포와 CPCC의 접착에 미치는 영향을 조사하였음.

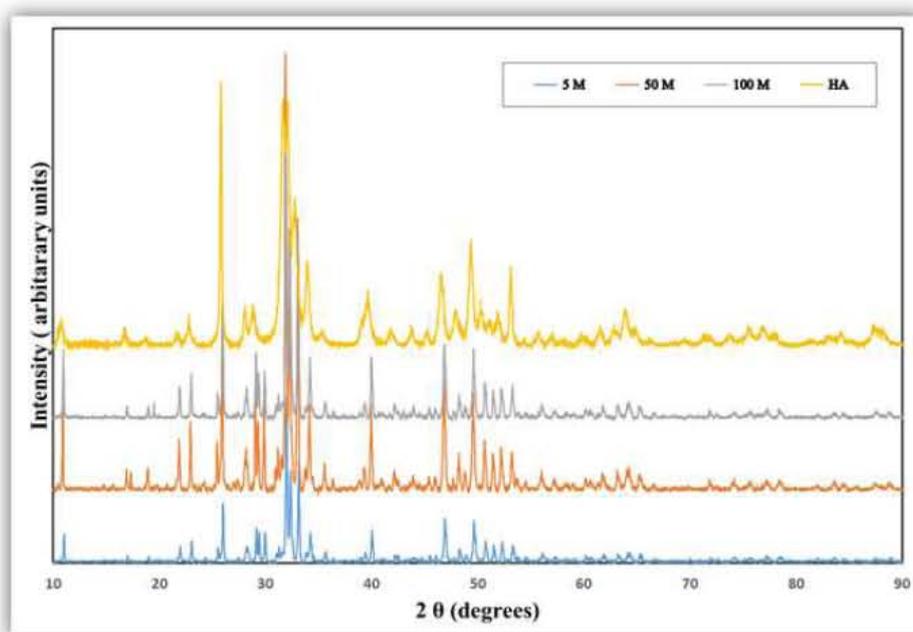
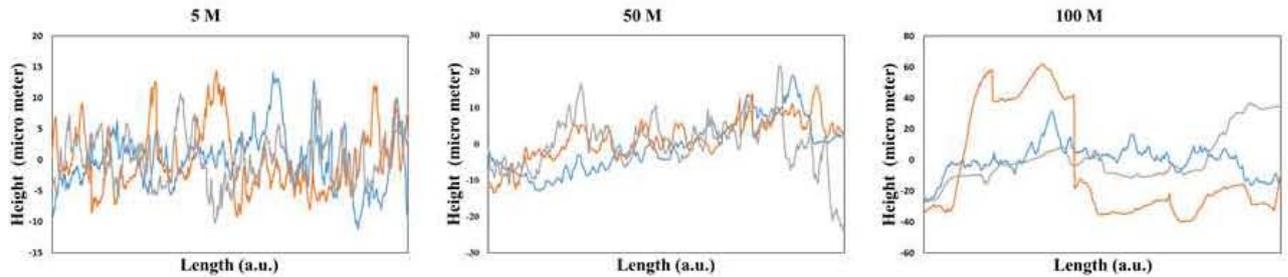


그림 2-30. 키토산 골분말의 혼합물의 XRD 측정결과

- XRD 측정결과 파우더의 측정결과와 거의 동일한 peak을 가진 특성 그래프가 발견 되는 것을 확인 할 수 있었음. 키토산과 hydroxapatite의 혼합은 CPCC의 결정구조를 크게 바꾸지 못하는 것으로 볼 수 있음(그림 2-30).



	5 M (μm)	50 M (μm)	100 M (μm)
Ra	3.574	5.765	11.132
Rq	4.487	7.353	14.873
Rz	23.199	43.274	69.701

그림 2-31. 키토산과 골분말의 혼합물의 표면 Roughness 측정 결과

- 그림 2-31을 통해서 키토산 골 분말 혼합물의 표면 거칠기를 살펴볼 수 있음. 표면의 거칠기를 2차원 적으로 표현한 결과로 아래 표에 Ra, Rq, Rz 값이 명시되어 있음. 분말의 크기에 따라 Rz 값이 가장 큰 영향을 받은 것을 확인 할 수 있음.
- 제조된 CPCC와 치과유래 세포를 포함한 골세포와의 친화성을 검증하기 위해, CPCC위에 세포를 시딩하고 1주일간 배양함. 세포배양에 사용된 배양액은 일반적으로 사용되고 있는 α -MEM (LM 008-50, Welgene, Korea), 10% FBS (hyclone, USA), Antibiotic Antimycotic Solution (100X) (LS 203-01, Welgene, Koca)을 혼합한 배양액을 사용함. 사용된 세포는 인간 유래 치아 줄기세포(PDL, PULP, ABMSC)와 마우스 유래 골세포(MC 3T3)임. 각각의 CPCC마다 1×10^4 개의 세포수로 시딩되었으며, 배지는 2 일에 한 번씩 새로운 미디어로 교체됨.
- 각각의 실험군의 세포 친화도 및 증식을 확인하기 위하여 1, 3, 7 일 배양한 실험군에 WST 시약을 첨가하여, 1시간 30분 동안 37°C에서 배양한 뒤 상층액을 추출하여 450 nm에서의 흡광도를 측정함.

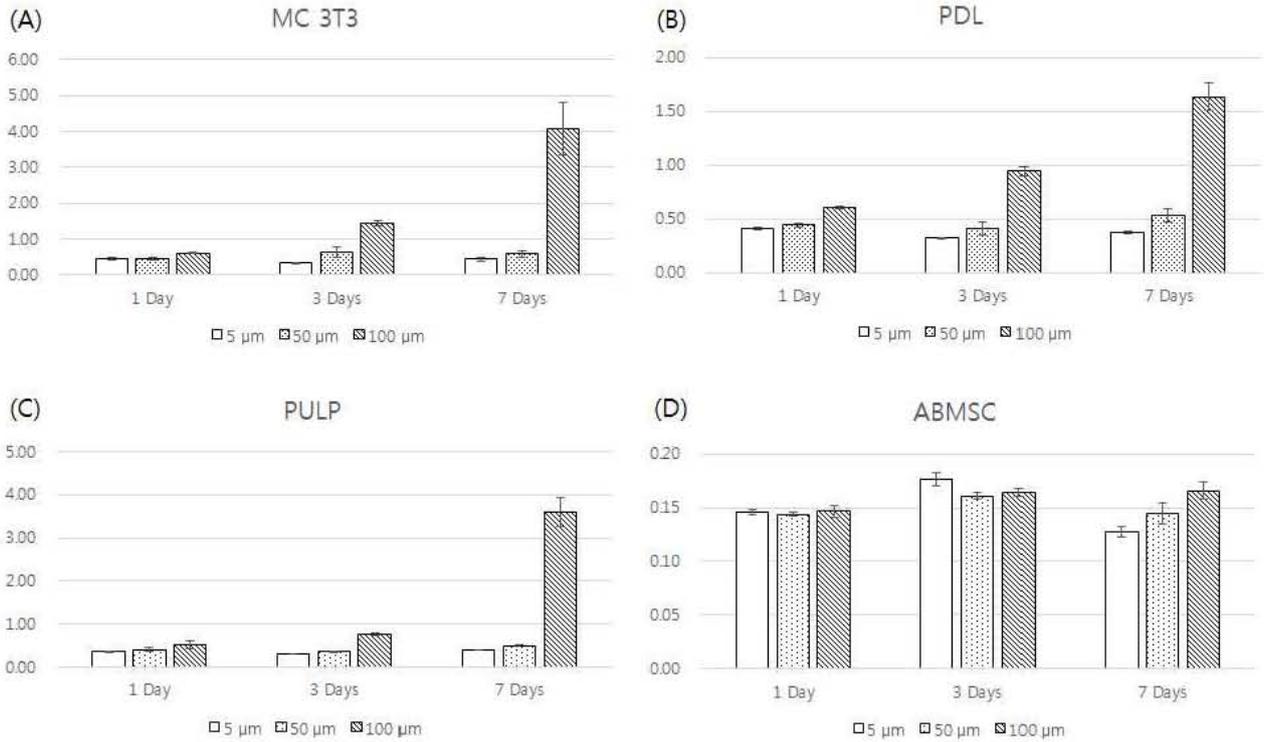


그림 2-32. CPCC와 여러 종류의 세포와의 친화성 시험.

- 시행된 모든 시험군에서 100 μm로 제작된 CPCC에서 배양된 세포군의 WST 결과가 가장 높은 흡광도를 보이는 것으로 조사됨. 1 일차의 경우는 모든 세포 군 간에 차이가 거의 나지 않는 것으로 미루어보아, 세포의 부착은 CPCC의 종류에 따른 차이가 미미하다고 볼 수 있음. 3, 7일차 결과에서 보면 대부분의 세포군에서 100 μm로 만들어진 CPCC에서의 증식을 다른 실험군에 비해 높음을 관찰 할 수 있었음. 또한, 5 μm와 50 μm로 만들어진 CPCC에서의 세포 증식은 유의성 있는 차이가 발견되지 않았음(그림 2-32).
- 위의 실험 결과를 통하여 100 μm의 골분말과 키토산과의 혼합물이 세포와의 친화력 및 증식이 가장 뛰어남을 확인할 수 있었음.
- CPCC가 인간 치조골 줄기세포의 골세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 혼합물 위에서 3주 동안 세포를 배양한 뒤, Alizarin Red 염색법을 통하여 생성된 칼슘의 양을 측정함. 세포배양에 사용된 배양액은 일반적으로 사용되고 있는 500 ml의 α-MEM, 10%의 FBS, 10%의 Antibiotics, ng의 Dexametathone을 혼합하여 제조함. 세포배양에 사용할 인간유래 치조골 줄기세포(hABMSC)를 각각의 혼합물위에 1×10^5 개를 시딩하였으며, 각각의 실험군은 5번씩 반복실험됨. 실험결과는 2주 3주에 각각 측정됨. 먼저 세포에 Alzarin Red 염색 용액을 적용하여 염색하였으며, 염색을 마치고 완전히 건조된 후, 탈 염색 용액을 이용하여 탈색함. 탈색 후 얻어진 용액을 흡광도 측정기에 넣고 405 nm영역대의 흡광도를 관찰함.

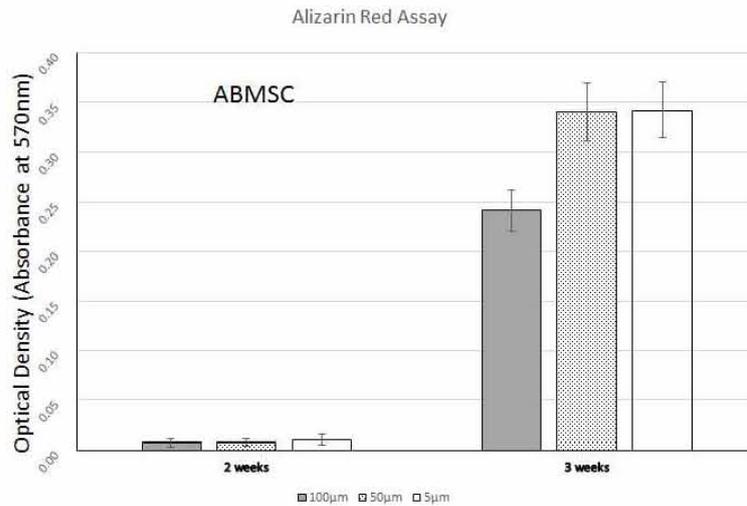


그림 2-33. CPCCs에서의 인간치조골줄기세포(hABMSC)의 골분화도 조사결과.

- 탈 염색 용액의 흡광도를 측정한 결과를 그림 2-31에 나타냄. 흡광도의 세기는 칼슘의 염색강도와 비례하므로, 높은 흡광도는 높은 칼슘 생성량과 비례하는 결과를 나타냄. 2주차 실험결과에서는 모든 실험 군에서 칼슘 생성량이 모두 적은 반면, 3주차에서는 100 µm로 만든 혼합물과 5, 50 µm로 만든 혼합물 간의 차이가 발견 됨. 결론적으로 100 µm로 만든 혼합물은 증식에는 유리하지만 분화에는 불리한 것이 위의 실험을 통해 확인 됨(그림 2-33).

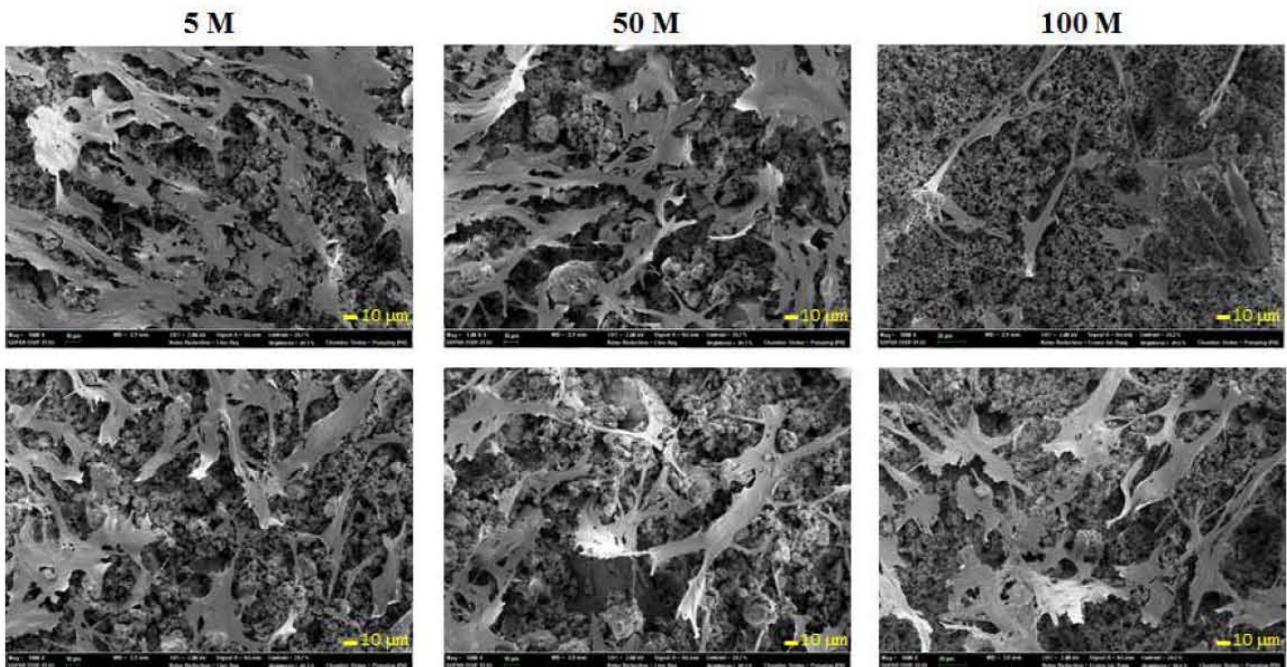


그림 2-34. 인간유래 치조골 줄기세포(hABMSC)가 키토산-글분말 혼합물에서 배양되는 모습을 관찰한 FE-SEM 사진

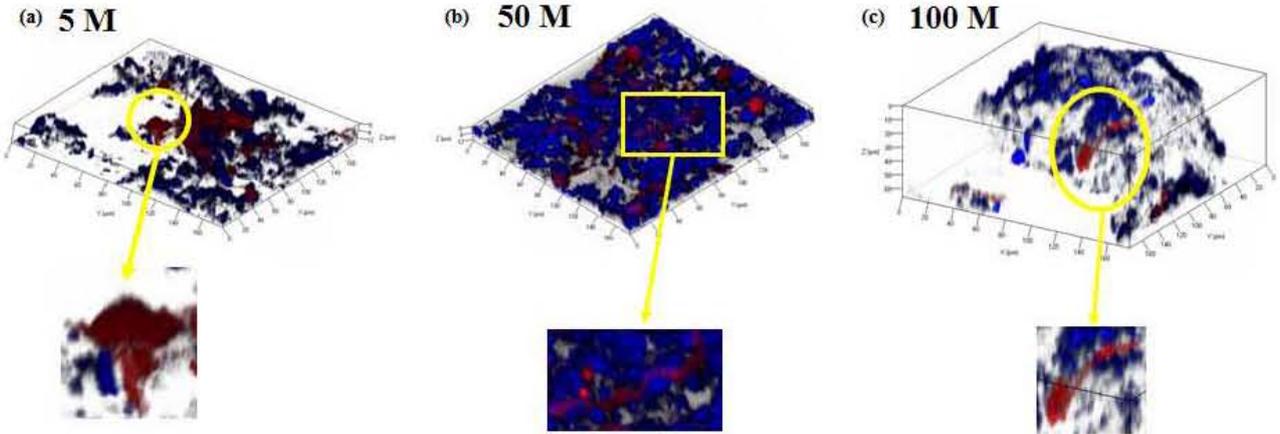


그림 2-35. 인간유래 치조골 줄기세포(hABMSC)가 키토산-폴분말 혼합물에서 배양되는 모습을 CLSM(Confocal Laser Scanning Microscopy)로 관찰한 사진

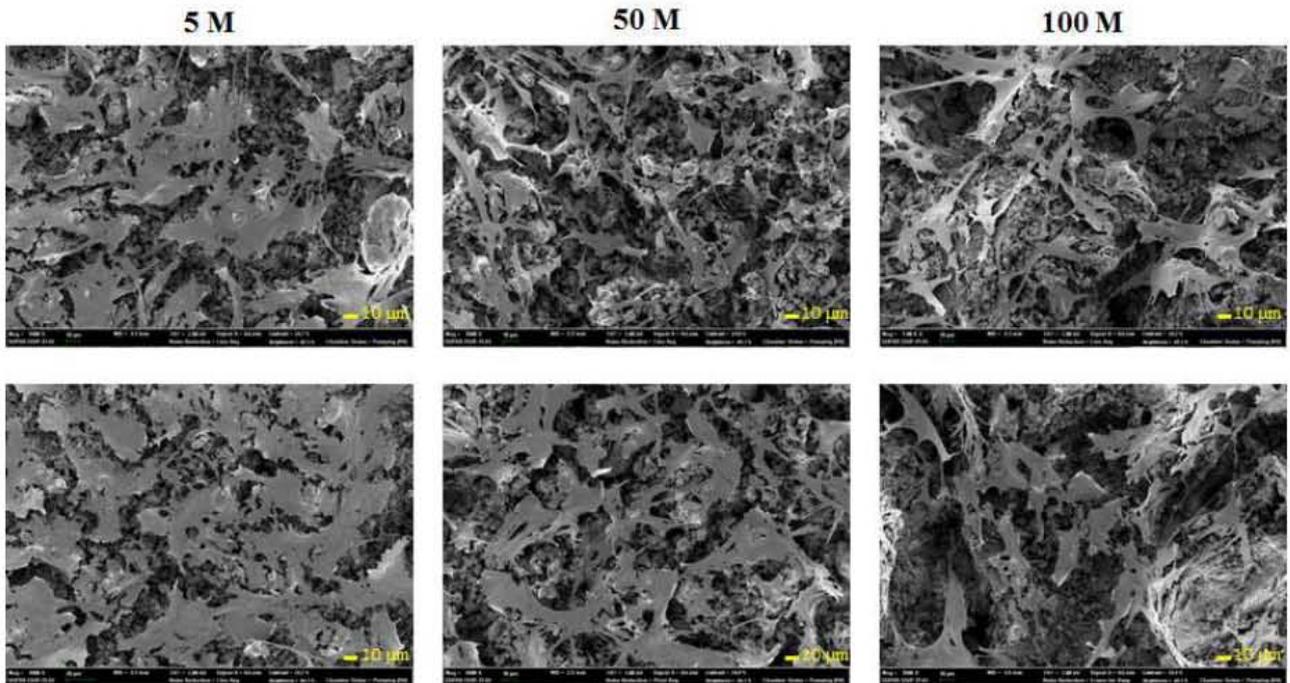


그림 2-36. 쥐유래 골세포 (MC 3T3)가 키토산-폴분말 혼합물에서 배양되는 모습을 관찰한 FE-SEM 사진

- 위의 그림들을 통해서 세포와 골세포와의 결합을 확인할 수 있었음. 각각의 실험군에서 사용된 세포는 모두 부착형 세포였으며, 부착되는 모양은 부착 단면에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있음. FE-SEM 사진과 CLSM 사진을 통하여 작은 입자로 만들어진 혼합물 위에서 세포의 모양이 더욱 원형에 가까운 모양을 갖는 것이 확인 되었고, 큰 입자로 만들어진 혼합물 위에서는 길쭉한 모양을 갖는 세포가 많은 것이 관찰 됨.

다. 생체소재를 이용한 골 조직재생을 위한 골 줄기세포의 증식과 분화 촉진에 관한 연구

- 본 연구에서는 바이오세라믹 소재를 이용하여 골 조직재생 효과를 구명하기 위해 선행연구로써 줄기세포의 증식과 분화 촉진에 관한 연구를 확인하였음.
- 말뚝을 이용한 골대체재의 줄기세포와 친화성 검증 및 골조직 재생 연구를 위해서는 제한적인 줄기세포의 증식과 골분화 촉진연구가 절대적으로 요구됨. 이에 골대체재의 줄기세포와의 친화성 검증을 위해서는 충분한 줄기세포가 요구되므로 골대체재 제조와 동시에 줄기세포 증식 촉진기술 개발이 요구됨. 이에 줄기세포의 증식 및 분화 촉진을 위해 물리적 자극기술을 선행연구로 수행함.
- 수행한 줄기세포의 증식과 분화 촉진에 관한 연구 내용은 다음과 같음.
 - 1) 치조골 줄기세포가 저장도 초음파 자극 (Pulsed Low-Intensity Ultrasound Stimulation)에 미치는 골분화의 영향
 - 2) 치조골 줄기세포가 전자기장 자극의 골분화에 미치는 영향
 - 3) Orbital Shear Stress가 치조골 줄기세포에 미치는 영향
 - 4) 치주인대 및 치수줄기세포가 공동배양이 가능한 디스크타입의 스캐폴드 제작 및 영향

(1) 저장도 초음파 자극이 치조골 줄기세포의 골분화에 미치는 영향

- 본 연구에서는 성체줄기세포 증식 및 분화에 초음파 자극기술을 개발하고자 다양한 조건의 초음파 자극을 이용하여 치조골 골수 유래 줄기세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 구명하고 적정의 초음파 자극 조건을 찾고자 하였음.
- 초음파는 조직 내의 세포를 물리적으로 자극할 수 있는 수단으로 초음파를 사용하여 뼈의 성장, 골절, 근육 조직의 치유 등 손상된 조직의 치료에 효과적이며, 특히 골절의 치유에 있어서 골형성 세포의 증식을 촉진하여 뼈의 유합을 촉진한다고 보고되고 있음.
- 초음파의 물리적인 자극이 세포활성에 영향을 줄 수 있다는 것을 확인하였지만 같은 강도를 갖는 초음파라 하더라도 어떤 duty cycle을 부여하느냐에 따라 세포활성에 부정적인 영향을 미칠 수도 있음.
- 저장도 초음파 자극은 세포의 대사 작용에 영향을 미쳐, 조직회복에 있어서 아주 중요한 방법으로 제안됨.

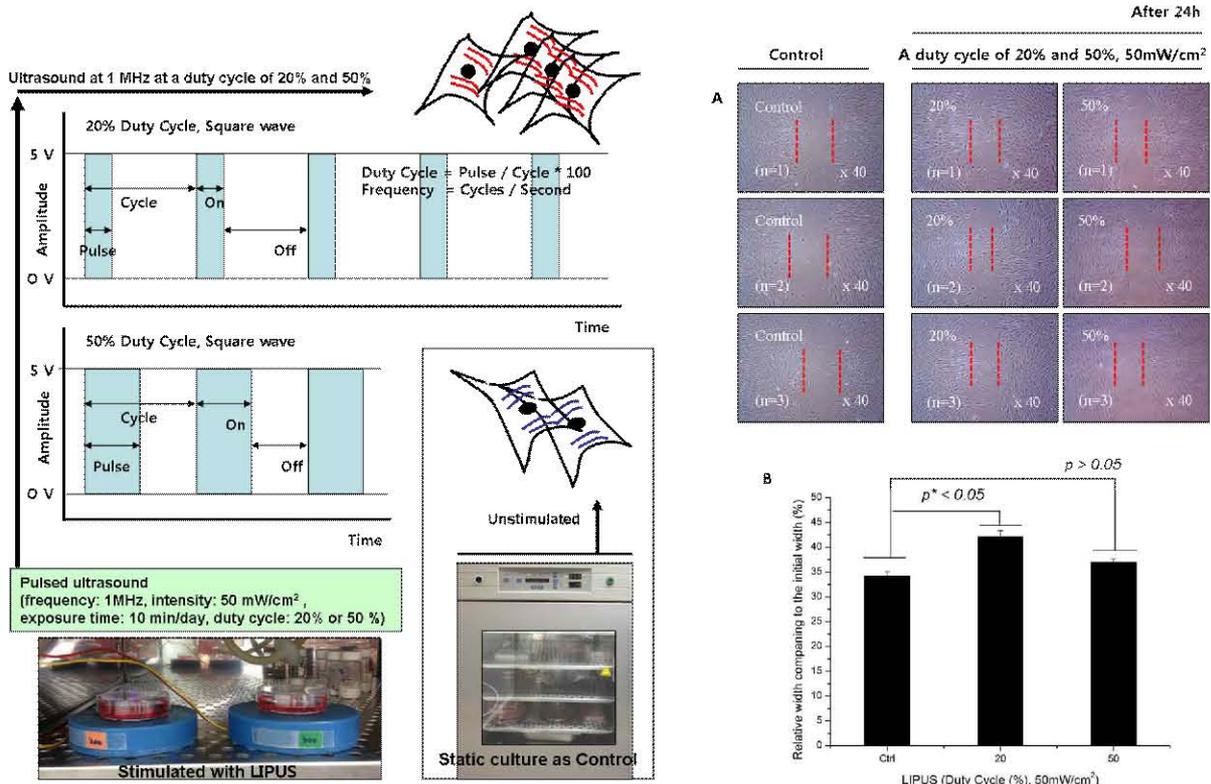


그림 2-37. Schematic diagram of LIPUS treatment (frequency: 1MHz, intensity: 50 mW/cm², exposure time: 10min/day and duty cycle: 20% or 50%), as compared to static culture as control. *In vitro* cell migration as representative optical microscopic images with LIPUS group compared to the static culture (A), indicating that the stimulation group exposed at 20% duty cycle LIPUS for 10 min/day was significantly different (*p<0.05) among groups (B) (n=3).

- 본 연구에서는 저장도 초음파 자극 조건 (frequency: 1 MHz, intensity: 50 mW/cm², exposure time: 10 min/day and duty cycle: 20% or 50%)을 기준으로 골분화에 대한 영향을 조사하였음.
- 실험 결과 duty cycle이 20% 내외의 조건에서 증식 및 분화 효과가 통계적으로 유의함을 확인하였음. 50% 이상의 long-term duty cycle은 external force가 세포내의 delivery 과정 중 세포에 스트레스를 주어 증식효과가 유의적이지 않았음.
- 본 연구를 통해 치조골 줄기세포에 저장도 초음파를 가할 때 10 min/day 동안 20%의 duty cycle 조건으로 설정하여 저장도 조건에 노출하였을 때 증식 및 분화 효과를 개발함. 그림 2-37은 이에 대한 실험설정 및 cell migration을 보여줌.
- 그림 2-38은 골분화 현상을 ARs 및 VKs 염색방법을 이용하여 bone nodules을 확인하였음. 뿐만 아니라, 컨포컬현미경 영상분석을 이용하여 세포의 Osteocalcin 현상을 확인하였음.

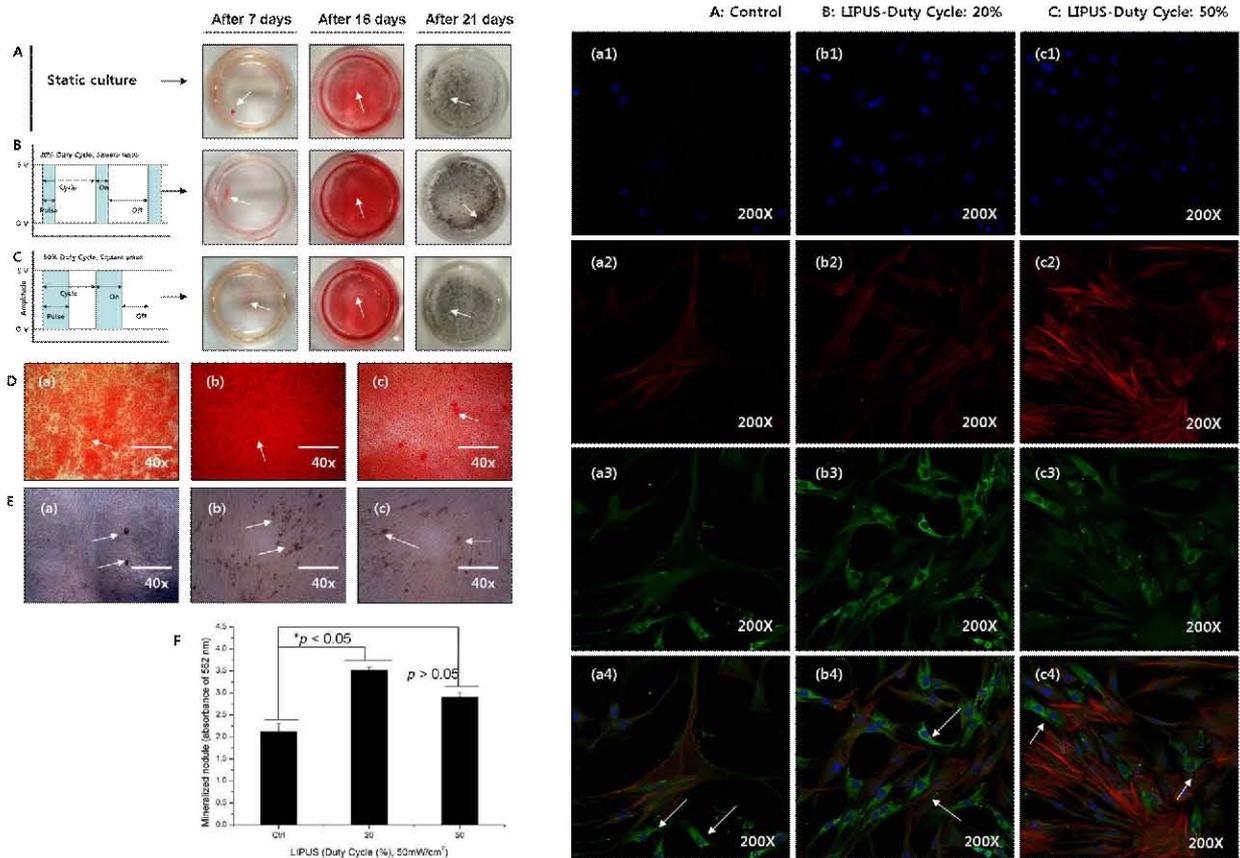


그림 2-38. Representative images of hABMSCs after Alizarin red and von-Kossa staining treatment in static condition (A), at 20% duty cycle (B), and at 50% duty cycle under LIPUS treatment (C) at 2-3 weeks after the addition of osteogenic differentiation media. Representative optical microscopic images of hABMSCs after Alizarin red staining treatment in static condition (a), at 20% duty cycle under LIPUS (b), and at 50% duty cycle under LIPUS (c) at 2-3 weeks were indicated (D). Mineralization images of von-Kossa staining are shown in Figure 2-38E. The short-pulsed duty cycle group was interestingly increased compared to the longer duty cycle group. Representative images were shown in 2-38D and 2-38E. Figure 2-38F shows the optical density value of a mineralized nodule (absorbance of 562 nm) measured after de-staining treatment. Representative confocal laser microscopy images of hABMSCs cultured for 7 days in static conditions (A) or LIPUS induction at 20% duty cycle (B), or 50% duty cycle (C) after the addition of differentiation media; cell nuclei (blue), actin filaments (red), vinculin (green) and merged images of the fluorescence stains. Confocal laser microscopy images showed more intense observation in the LIPUS group compared to the control group.

(2) 전자기장 자극이 치조골 줄기세포의 골분화에 미치는 영향

- 본 연구의 목적은 생체조직공학의 일환으로 전자기장의 자극을 이용하여 치조골의 비침투적 치료에 있어 최적화되고 특성화된 조건을 구명하는데 있음.
- 본 연구는 먼저 전자기장 자극이 치조골 세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 주는지를 구명하고자 하였음.
- 특히, 세포막은 높은 임피던스를 가지고 있기 때문에 전기장은 세포 막 물질들을 분극시키며, 수용기나 채널 등을 전기이동에 의해 이동시키고 위치를 변화시킴.
- 전자기장은 세포막 내의 이온 채널이 열리면서 세포막 분극의 변화를 가함. 즉, 세포막 양쪽에는 많은 수의 자유 이온(주로 K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , 등)이 분포 되어 있어, 세포의 체적을 조절하고, 신호 전달 과정에 중요한 역할을 하며, 세포막 양쪽 사이의 전압차이를 만들어 냄.
- 본 연구에서 대조군에 미치는 자기장의 평균 자속밀도는 자연적인 지구의 자기장 세기인 0.05 mT가 넘지 않도록 조절하였음. 자속밀도는 PASCO의 DataStudio software(CI-7599, PASCO Ltd, CA, USA)를 사용하여 측정하고 데이터를 수집, 분석하였음.
- 전자기장의 flux density를 $6\text{ G} \pm 0.5$ 로 고정 후, 10, 50, 100 Hz로 각각 자극을 가하였음. 이때 그림 2-39와 같이, 50 Hz의 자극조건에서 줄기세포의 증식 및 분화의 효과가 있었음.
- 특히, 칼슘 결합 단백질 중 세포 내 칼슘 균형을 조절하는 칼모듈린 (Calmodulin)의 컨포컬 영상 이미지를 본 연구에서는 전자기장 자극을 가할 때의 Activation을 영상화시켰음.
- 칼슘과 결합하는데 생체반응에 관여하는 단백질인 칼모듈린의 활성화 상태를 통해, 본 연구에서 가한 자극조건에서 칼슘이온의 활성화에 따른 골분화 메커니즘을 역추적할 수 있었음.
- 세포의 생존도 평가 (Cell viability), Bone mineralization, Alkaline Phosphatase activity 등의 골분화 평가 테스트 결과 전자기장의 지속적 노출보다는 간헐적 노출이 유의성 있는 긍정적 효과를 보였음.

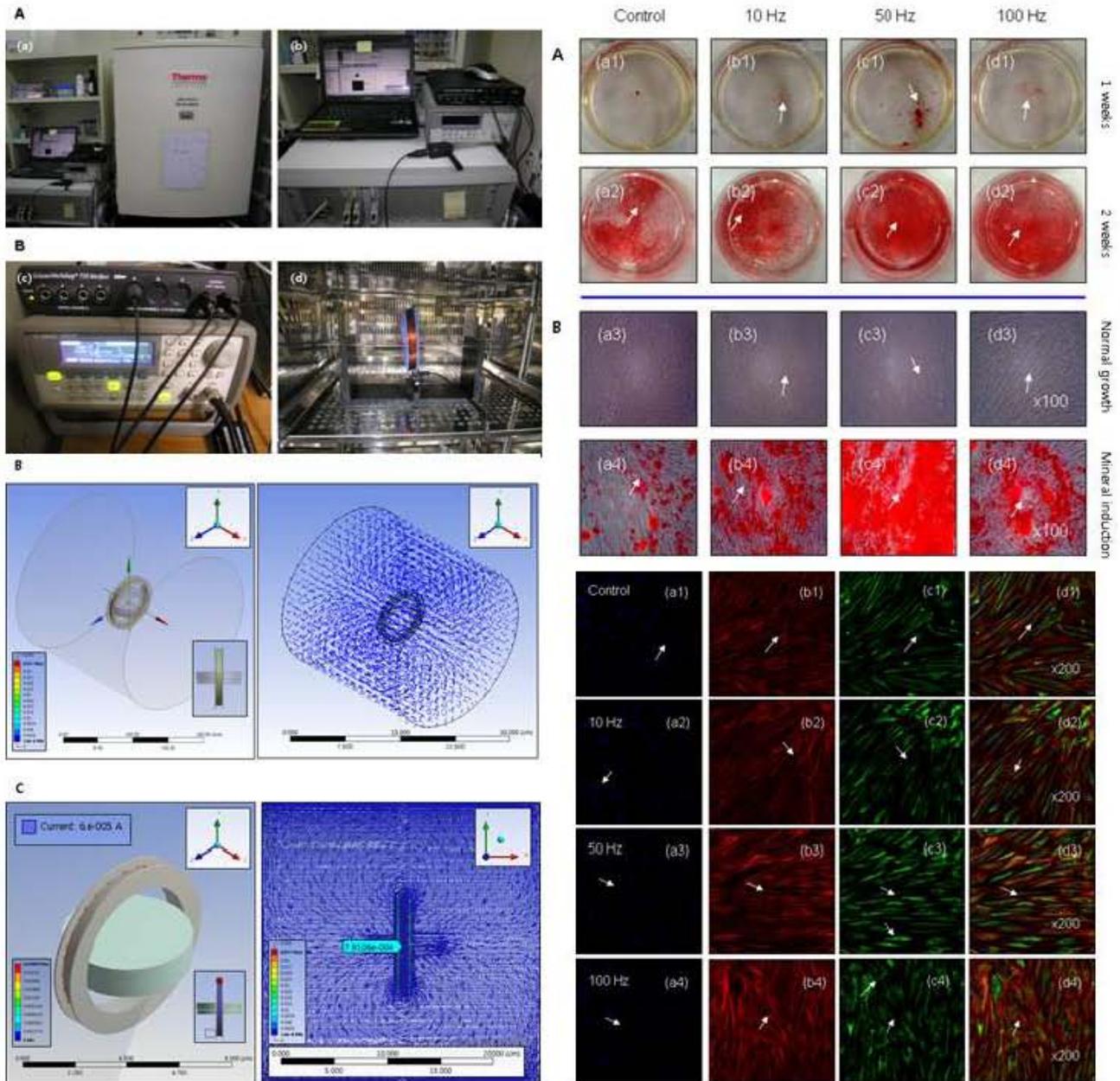


그림 2-39. Electromagnetic field apparatus system and CO₂ incubator (A: a); Electromagnetic field apparatus (B: c), The magnetic flux density was monitored via the PASCO's DataStudio software to collect and analyze data (C: a-c). Electromagnetic fields and modeling by CFD. Representative optical microscopic images of hABMSCs after alizarin red staining treatment with static condition (a1, a2) or ELF-PEMFs (intensity, 6 Gauss) at 10 Hz/day (b1, b2), 50 Hz/day (c1, c2), and 100 Hz/day (d1, d2) at 1, 2 weeks. ELF-PEMFs induction groups at 50 and 100 Hz/day were way too much intense compared to control (B, white arrows: mineral nodules stained in red). Representative confocal laser microscopy images of hABMSCs cultured for 7 days in static conditions (a1 - d1) or ELF-PEMFs induction (intensity, 6 Gauss) at 10 Hz/day (a2 - d2), 50 Hz/day (a3 - d3), and 100 Hz/day (a4 - d4) groups; cell nuclei (a1 - d4), actin filaments (b1 - b4), Vimentin (c1 - c4) and merged images (d1 - d4) of the fluorescence stains. Confocal laser microscopy images showed more intense observation at ELF-PEMFs induction groups compared to control group (arrows: cell direction).

(3) Orbital Shear Stress가 치조골 줄기세포에 미치는 영향

본 연구는 구강 내의 유체분포를 생체모방한 연구로써, 특히 다양한 유체자극 패턴 중에서 Orbital shear stress 분포에 대하여 조사하였음.

- 특히, 최근들어 뼈 조직공학에 대한 관심이 높음. 치과 임플란트의 빠르고 튼튼한 골 유착은 중요한 사항중 하나임. 빠른 골 유착은 기능 개선을 촉진할 수 있고, 환자의 불편을 감소시키는 동시에 수술 시간을 단축시킬 수 있음.
- 이러한, 기계적 자극은 조직의 신진대사에 중요한 역할 함. 골아세포, 파골세포, 중간엽줄기세포 등의 활동과 분화에 영향을 밝혀내고 있음. 특히, 저장도의 기계적 자극은 뼈의 부피, 골아세포의 수, 석회 침착물 그리고 뼈 형성률 등에 상승효과를 가함.
- 뿐만 아니라, 계면의 입자 증착과 칼슘과 인 이온과 같은 빠른 유착에 기여하는 이온들에 대한 요인들을 유발함.
- 여러 function 중에서, MSCs의 반응이 MAPK signal에 의해서 증대된다는 학설이 있을 뿐만 아니라 matrix metalloprotease (MMP)가 분화에 중요한 역할을 가지고 있음. 즉 MSCs 기능은 세포의 기계적 자극에 의해 조절된 MMP 활동에 의해 제어되며 특히 MMP-2, -3, -13의 단백질 발현의 상승과 metalloproteases (TIMP)-2의 조직 특정 억제제를 포함한 세포 밖의 gelatinolytic activity 를 높게 조절함.
- 이러한 기계적 자극 환경은 세포 내의 환경조절 중 Cytokine과 같은 조절신호 및 Physical factors를 제공함. 줄기세포 미세 환경에 대한 구성요소는 많은 Chemical, Biophysical signals를 가지고 있는 ECM임. 즉 이 ECM이 직간접적으로 세포환경을 제어할 수 있음.
- 이러한 역학적 분석을 보았을 때 본 연구에서 수행한 Orbital shear stress 의 기계적 자극이 치조골 줄기세포의 미세환경 조절 연구에 의미있는 연구임.
- (그림 2-40)은 이에 대한 실험결과임. 전단응력의 분포에 따른 유체환경은 Laminar shear stress이며, 이때 10, 20, 40 rpm 조건으로 회전 시 Cell metabolic activity의 변화가 나타났음. 이때 세포의 DNA 농도 변화 및 RT-PCR을 시행하였음. 약 2주 이내의 골분화 Genes을 확인한 결과 30 min/day 조건으로 자극을 주었을 때 OPN, OCN의 Gene level이 상승하는 결과를 얻을 수 있었음. 뿐만 아니라 이때의 세포골격 영상 또한 더 타이트함을 보여주었음.
- 이러한 중간레벨에서의 미케니즘 분석을 통한 골분화 레벨은 (그림 2-41)에 보여줌.
- (그림 2-41)은 Osteogenic Medium (OM)의 유무에 따른 실험결과로써, 왼쪽은 OM-이고, 오른쪽은 OM+ 이다. OM-상황에서도 외부자극의 Signal이 분화에 영향을 미치는 것으로 확인되었음. OM+상황에서는 시너지효과를 주어 골분화 Activation이 더 증가됨을 확인하였음.



Point	Distance (mm)	Optical absorbance (density)				
		5 rpm	10 rpm	20 rpm	30 rpm	40 rpm
A	1	0.00380	0.01276	0.03042	0.05089	0.0804
B	4	0.01521	0.04302	0.12163	0.22504	0.34416
C	8	0.03942	0.08604	0.24336	0.44700	0.68833
D	15	0.04941	0.13902	0.39941	0.72651	1.11854
E	17.5	0.06094	0.18822	0.53235	0.97799	1.50372

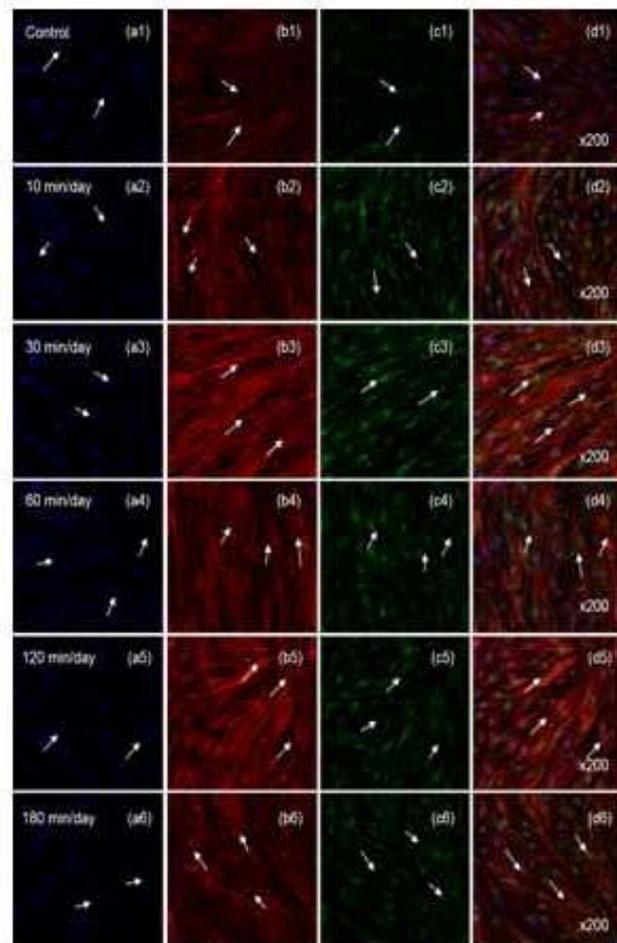
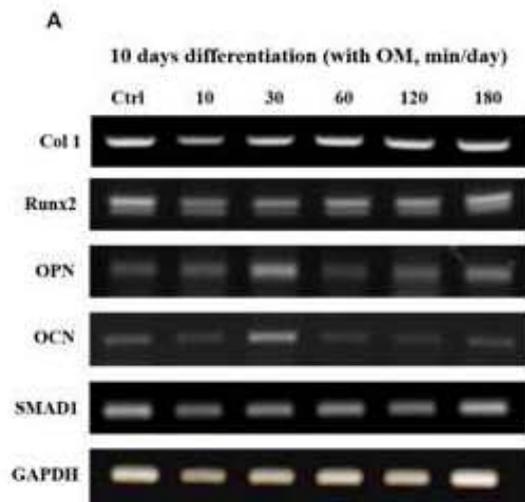
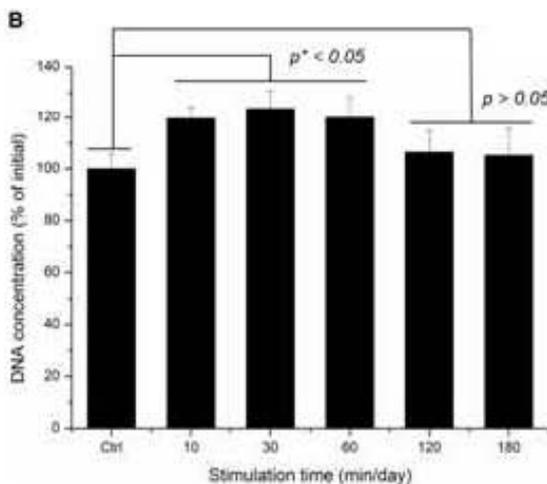
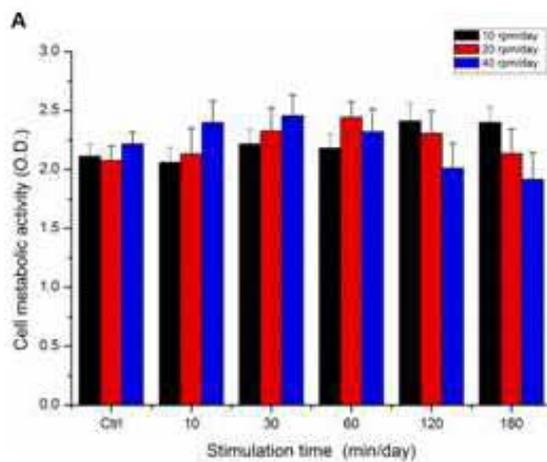


그림 2-40. The schematic diagram with temporal points for calculating OSS values. Cell metabolic viability as optical density of hABMSCs measured using WST-1. RT-PCR analysis of cell cultures between stimulus conditions (from 10 min/day to 180 min/day) and static culture for 10 days. Representative optical fluorescence microscopy images of hABMSCs cultured for 5 days in static conditions (a1 - d1) or at 10 min/day (a2 - d2), 30 min/day (a3 - d3), 60 min/day (a4 - d4), 120 min/day (a5 - d5) and 180 min/day (a6 - d6) by OSS without OM; cell nuclei (a1 - a6), actin filaments (b1 - b6), OCN (c1 - c6) and merged images (d1 - d6) of the fluorescence stains

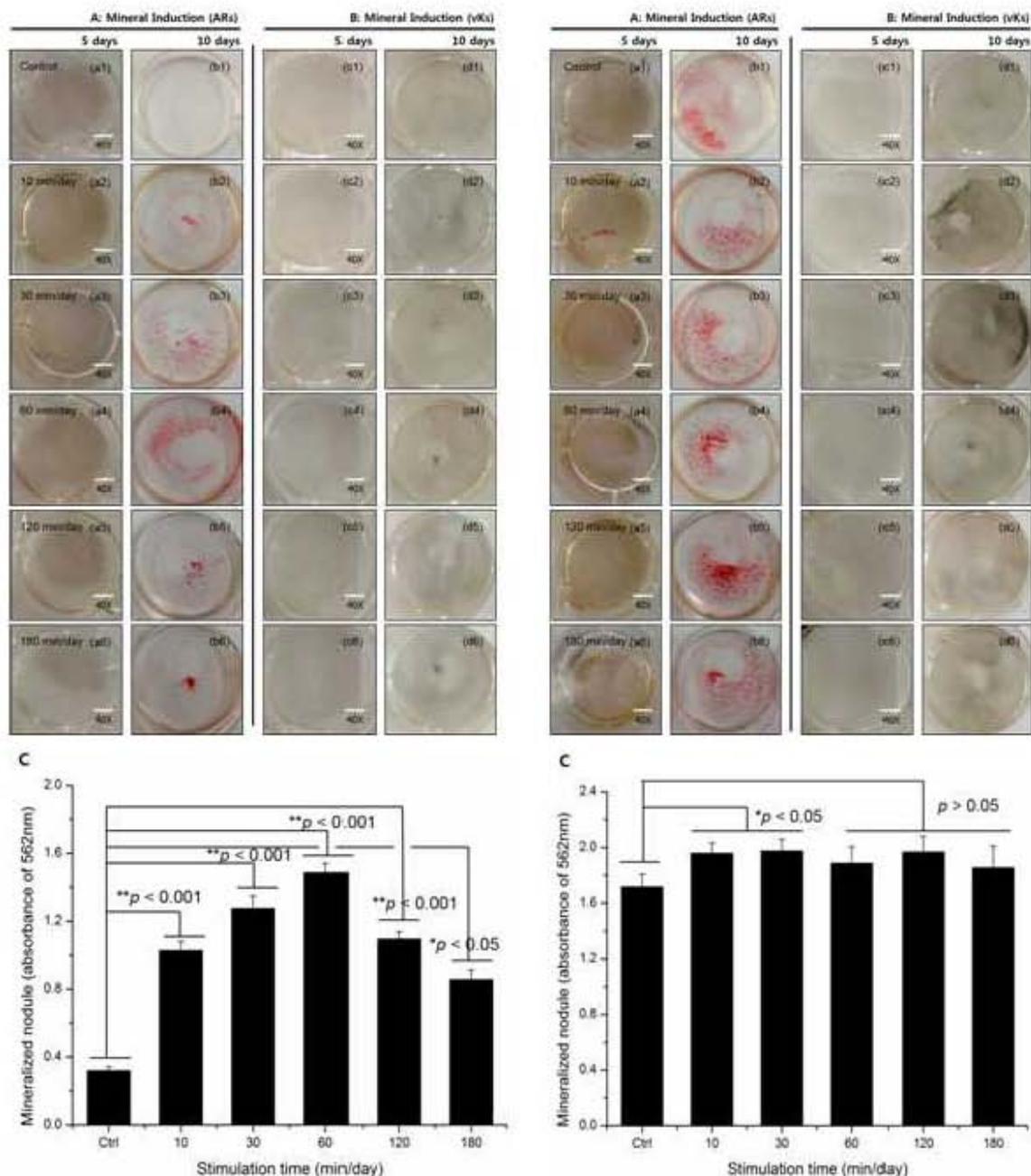


그림 2-41. Representative optical microscopic images of hABMSCs after Alizarin red staining treatment with static condition (a1, b1) or at 10 min/day (a2, b2), 30 min/day (a3, b3), 60 min/day (a4, b4), 120 min/day (a5, b5) and 180 min/day (a6, b6) by OSS treatment in the absence of OM on 5 days and 10 days, respectively. Representative optical microscopic images of hABMSCs after Alizarin red staining treatment with static condition (a1, b1) or at 10 min/day (a2, b2), 30 min/day (a3, b3), 60 min/day (a4, b4), 120 min/day (a5, b5) and 180 min/day (a6, b6) by OSS treatment with OM on 5 days and 10 days, respectively. Representative microscopic images of hABMSCs after Von-Kossa staining with static condition (c1, d1) or at 10 min/day (c2, d2), 30 min/day (c3, d3), 60 min/day (c4, d4), 120 min/day (c5, d5) and 180 min/day (c6, d6) by OSS treatment with OM. Mineralized nodule as optical density measured after de-staining treatment (C). OSS induction exposed at 10, 30, and 120 min/day groups was significantly different ($*p < 0.05$) among groups. (n=3, bar = 1 mm).

(4) 치주인대와 치수줄기세포의 공동배양이 가능한 디스크타입의 스캐폴드 제작 및 효과

- 본 연구에서는 바이오세라믹 소재를 이용하기 이전에 골 조직재생 효과를 구명하기 위한 연구이다. 줄기세포의 증식과 분화 촉진에 관한 연구를 공동배양이 가능한 디스크 타입의 스캐폴드를 제작하여 그 효과를 확인하였음.
- 특히, 본 연구에서는 치주인대 및 치수줄기세포의 공동배양이 가능한 디스크 타입의 스캐폴드를 개발하였음. 개발된 스캐폴드 및 몰드는 (그림 2-42)와 같음.
- 본 지지체의 결합도를 FE-SEM을 통해 확인한 결과 (그림 2-42)와 같이 Scaffold-Gap이 없는 것으로 보였음.
- 본 연구의 목적은 치주인대와 치수줄기세포를 각각 공동배양시킬 때 그 Interface에서의 Expression Factors를 찾는 것이 연구임.
- 2차년도에는 본 연구에서 개발된 디스크타입의 스캐폴드에 말뼈 세라믹 생체소재를 첨가하여 Osteogenic differentiation 에 대한 효과를 비교할 예정임.
- (그림 2-43)은 실험결과를 나타냄. 공동배양 실험결과에서 Osteogenic differentiation 효과가 더 상승되었음.
- 뿐만 아니라, H&E staining을 통한 In Vivo 조직염색 실험결과 DPSCs와 PDLSCs의 Interface에서 조직이 더 형성됨을 확인하였음.
- 2차년도에는 생체소재의 골 조직재생 인자를 고려할 뿐 아니라, 배지 내의 물질교환과 세포 성장 조건 하에서 전단응력 분배를 정량하기 위한 유체 역학적 모델을 고려한 조직 공학에 적용할 예정임.
- 골 대체재로서 유용한 재료인 말뼈를 이용하여 골 지지체를 제작하고, 이 지지체의 조직적합성을 평가하고자 함.

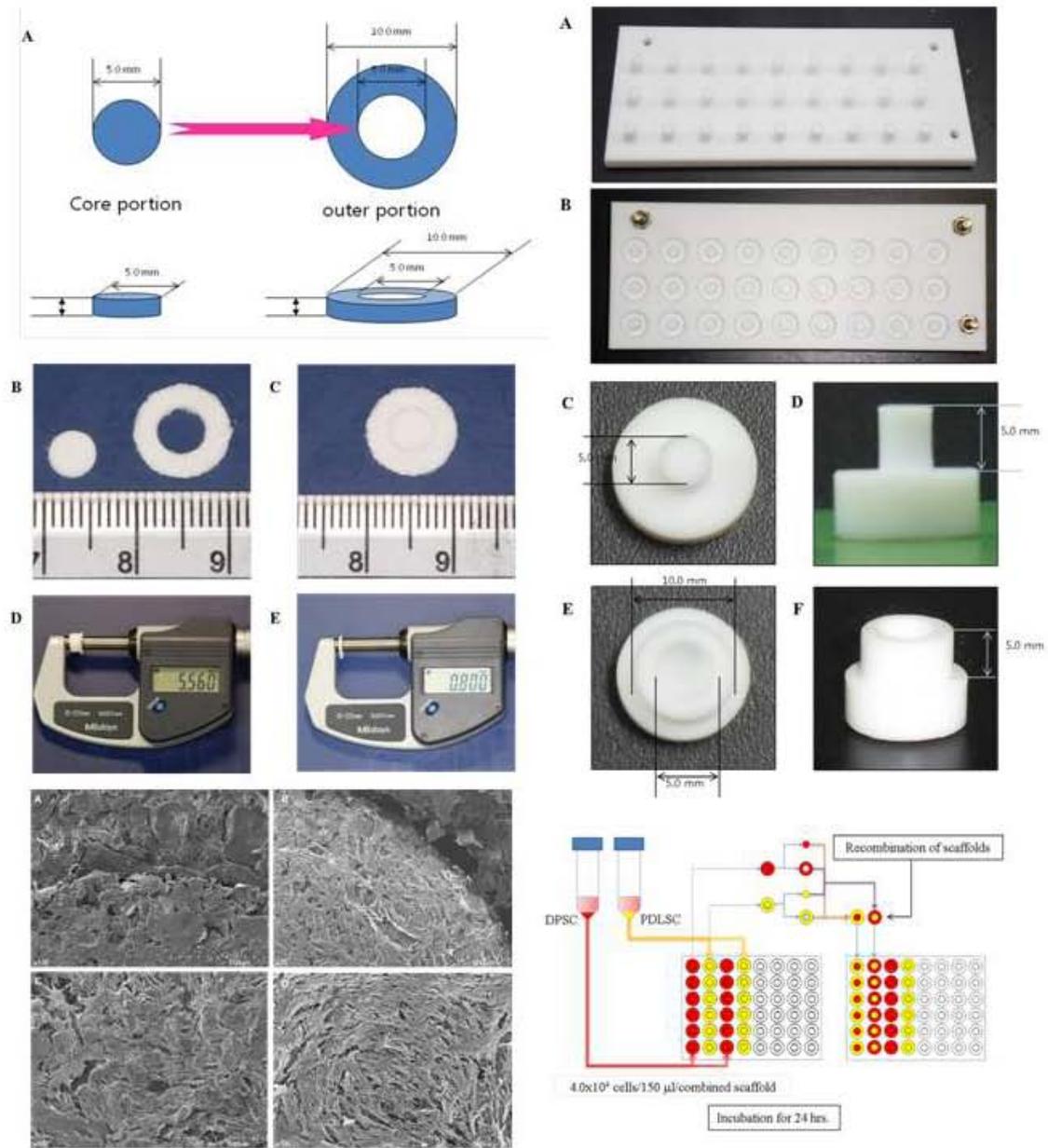


그림 2-42. Design of the core and outer portion of scaffolds. For co-culture of more than 2 cell types, the scaffold was designed to have more than 2 portions, which is composed of core and outer portions and could be separated into individual portions for further experiments in each portion. The outer diameter of the core portion is about 5.0 mm fit to the inner dimension of outer portion. The outer diameter of the outer portion is 10.0 mm. The core and outer portions of scaffold was assembled to be the final shape of a disc having diameter of 10.0 mm. Molds for fabrication of scaffolds. All types of molds had 5.0 mm thickness. Diameter of hole was determined according to design of scaffold.

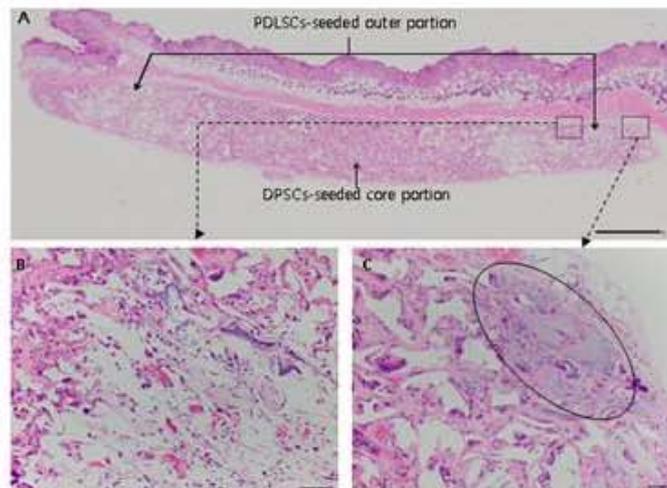
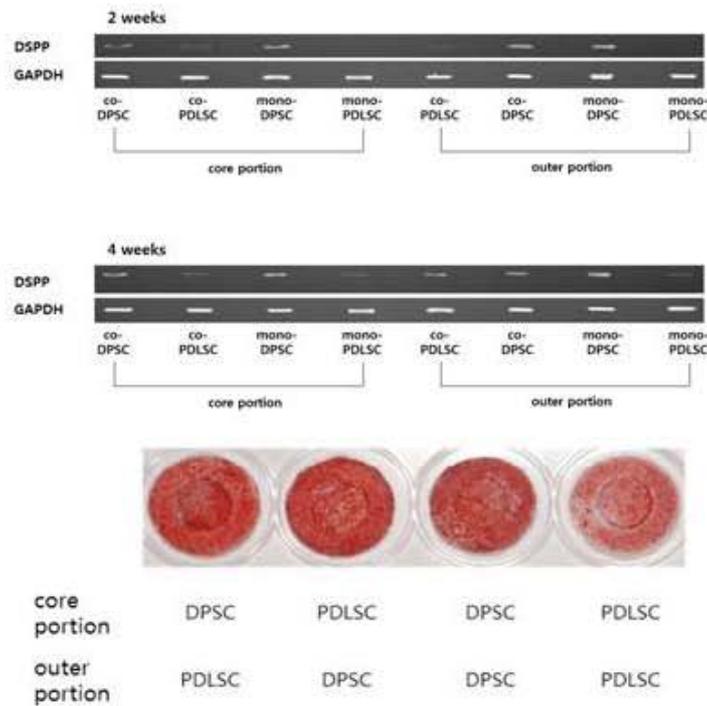


그림 2-43. RT-PCR at 2 and 4 weeks. At 2 weeks, the expression of DSPP mRNA could be observed in all parts of scaffold where DPSCs were seeded regardless of the types of culture. The expression of DSPP mRNA in PDLSCs-seeded co-culture could be observed. Mineralization assays with Alizarin Red staining after in vitro cultures for 21 days. The mineralization was greater in co-culture than in mono-culture. Immunohistochemical evaluations with antibody against DSP in in vivo culture for 4 and 8 weeks. The stronger intensity and broader ranges of the expression of DSP (brown color, arrow direction) could be found in DPSCs-seeded co-culture than in DPSCs-seeded mono-culture. x200.

라. 그래핀이 함유된 골시멘트의 개발

- 그래핀은 탄소가 6각형 모양으로 2차원으로 배열된 판상형 구조를 가지고 있는 물질로 그래핀이 가지고 있는 물리적, 전기적 성질로 인해 꿈의 물질로 주목을 받고 있음.
- 최근 연구를 통해 그래핀이 함유된 물질은 기계적 성질이 우수해짐은 물론 줄기세포의 골분화도 촉진시킨다는 것이 보고됨.
- 이를 골시멘트에 적용하여 인산칼슘계 골시멘트의 고질적 약점인 약한 기계적 강도를 보완하고 또한 골아세포 및 줄기세포의 골분화를 촉진시키고자 함.

(1) 그래핀이 함유된 골시멘트의 특성분석

① 그래핀 골시멘트의 제조

- 선행연구에서 마이크로/초미세(서브마이크로) 골시멘트의 비율이 50:50일 때 가장 골분화를 높인다고 보고됨. 따라서 본 연구에서는 비율이 50:50인 마이크로/초미세(서브마이크로) 골파우더를 준비함. 이에 그래핀 함량이 전체질량의 0, 0.01, 0.1, 1%가 되도록 준비함.
- 그 후 키토산 3.5% 용액을 0.45 g/ml의 농도로 섞어주고 몰드에 넣어 굳힘.

② 그래핀 골시멘트의 형태적, 구조적 특성분석

- 만들어진 그래핀 골시멘트를 전자현미경을 통해 확인한 결과, 그래핀이 더 많이 함유될수록 표면이 점점 더 매끄러워짐을 확인함.
- XRD 결과를 통해 골시멘트가 hydroxyapatite계열임을 확인하였고, 그래핀 함량이 높아질수록 25도 근처에서 RGO 특이피크가 나타남을 확인함.
- 이는 Raman spectroscopy를 통해서도 확인됨. 특히, 그래핀 함량이 높아짐에 따라 D peak (1300 cm^{-1}), G peak (1700 cm^{-1})가 높아짐을 확인함(그림 2-44).

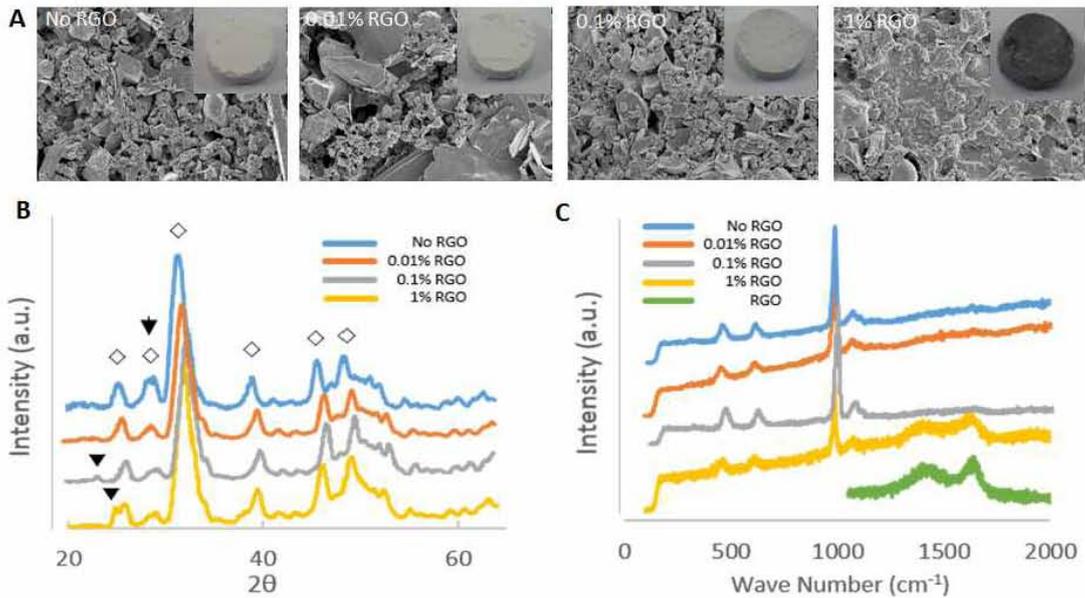


그림 2-44. 그래핀이 함유된 폴시멘트의 형태적, 화학적 특성.

- (A) 그래핀이 함유된 폴시멘트의 형태적 특성. (B) 그래핀이 함유된 폴시멘트의 XRD 결과.
 (C) 그래핀이 함유된 폴시멘트의 RAMAN spectroscopy 결과.

- EDS를 통해 분석한 결과, 키토산에 있는 C가 검출되기 때문에 모든 시멘트균에서 C의 함량이 있는 것으로 나옴. 다만, 그래핀 함량이 높은 시멘트균일수록 탄소 함량이 높은 경향을 보임.
- 그림 2-45는 그래핀이 함유된 폴시멘트의 탄소분포를 mapping한 결과임. 이를 통해 그래핀이 어느 한 군데에 몰린 것이 아니라 전체적으로 고르게 분포하고 있는 것을 확인할 수 있었음.

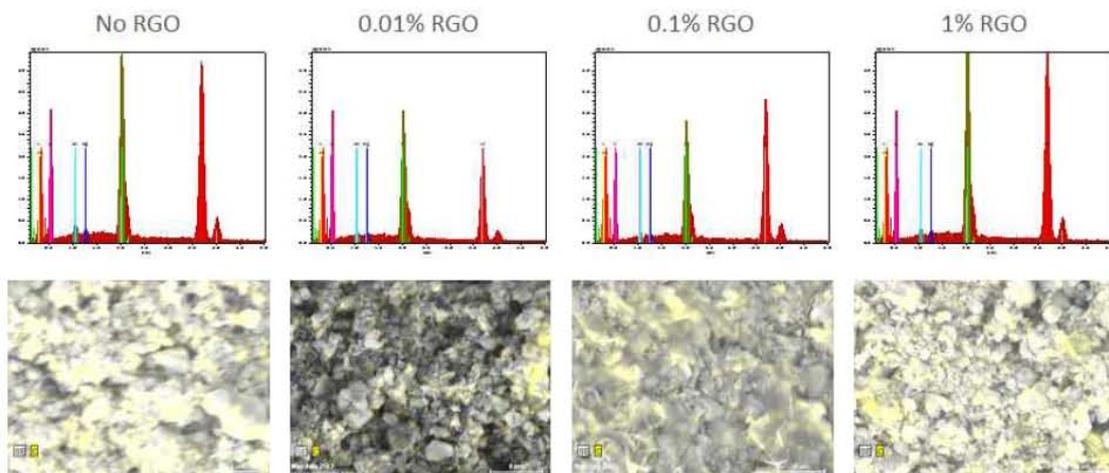


그림 2-45. EDS 및 mapping 결과

③ 그래핀 골시멘트의 기계적 특성

- 그림 2-46은 그래핀이 함유된 골시멘트의 기계적 강도를 측정한 결과임. 첫 번째 그래프는 그래핀 골시멘트의 경향을 나타내 주는 그래프이고, 두 번째 그래프는 그래핀 골시멘트의 탄성계수를, 세 번째 그래프는 그래핀 골시멘트의 maximum compressive strength를 나타내 주는 그래프임.
- 탄성계수의 경우 그래핀을 미량 섞어준 것 만으로 탄성계수가 높아지는 것을 확인함. 하지만 너무 많이 섞을 경우 탄성계수가 다시 떨어지는 것을 확인할 수 있는데, 이는 그래핀을 너무 많이 섞으면 키토산의 결합도가 떨어지기 때문인 것으로 추정됨.
- 최대압축강도의 경우에는 그래핀을 일정 수준 이상으로 섞어주면 최대압축강도가 계속 증가하는 것으로 나타남. 이는 그래핀이 압축용력을 받을 시 그 충격을 흡수하는 역할을 하기 때문으로 예상됨.
- 이로 봤을 때, 그래핀을 단순히 섞어주는 것 만으로도 골시멘트의 기계적 물성강도를 훨씬 높일 수 있는 것을 알 수 있음.

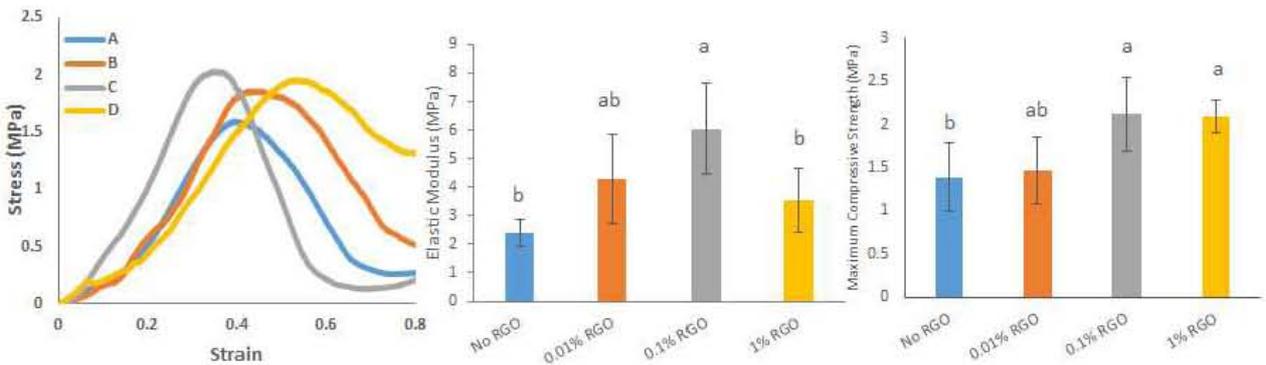


그림 2-46. 그래핀이 함유된 골시멘트의 기계적 강도

(2) 골아세포를 이용한 그래핀이 함유된 골시멘트의 생체의실험

① 그래핀 골시멘트의 세포생존율

- 그래핀이 함유된 골시멘트의 세포독성을 확인한 결과, 12 시간에는 그래핀이 많이 들어간 실험군에 약간의 독성이 있었으나 24 시간이 지난 후에는 별 차이가 없었음을 확인함. 이를 통해 그래핀 골시멘트의 독성에는 문제가 없는 것을 확인함.

- 그래핀 플시멘트에 초반에 세포가 얼마나 잘 달라붙는지를 확인함. 이를 통해, 초반에는 그래핀이 많이 들어간 플시멘트일수록 부착능력이 떨어지는 것을 확인함.
- 이를 면역염색을 통해 확인한 결과, 1일차에는 focal adhesion이 일어났을 때 생기는 단백질인 vinculin의 발현이 그래핀이 높을수록 낮아짐을 확인함. 하지만 7일 차에는 vinculin의 발현이 오히려 높아짐을 확인할 수 있음.
- 세포 생존율을 확인한 결과, 그래핀 함량이 높아질수록 세포생존율은 낮아짐을 확인함. 다만, 이는 그래핀 플시멘트가 세포독성이 있기 보다는 세포기능을 proliferation이 아닌 다른 방향으로 가게 할 것으로 예상됨.

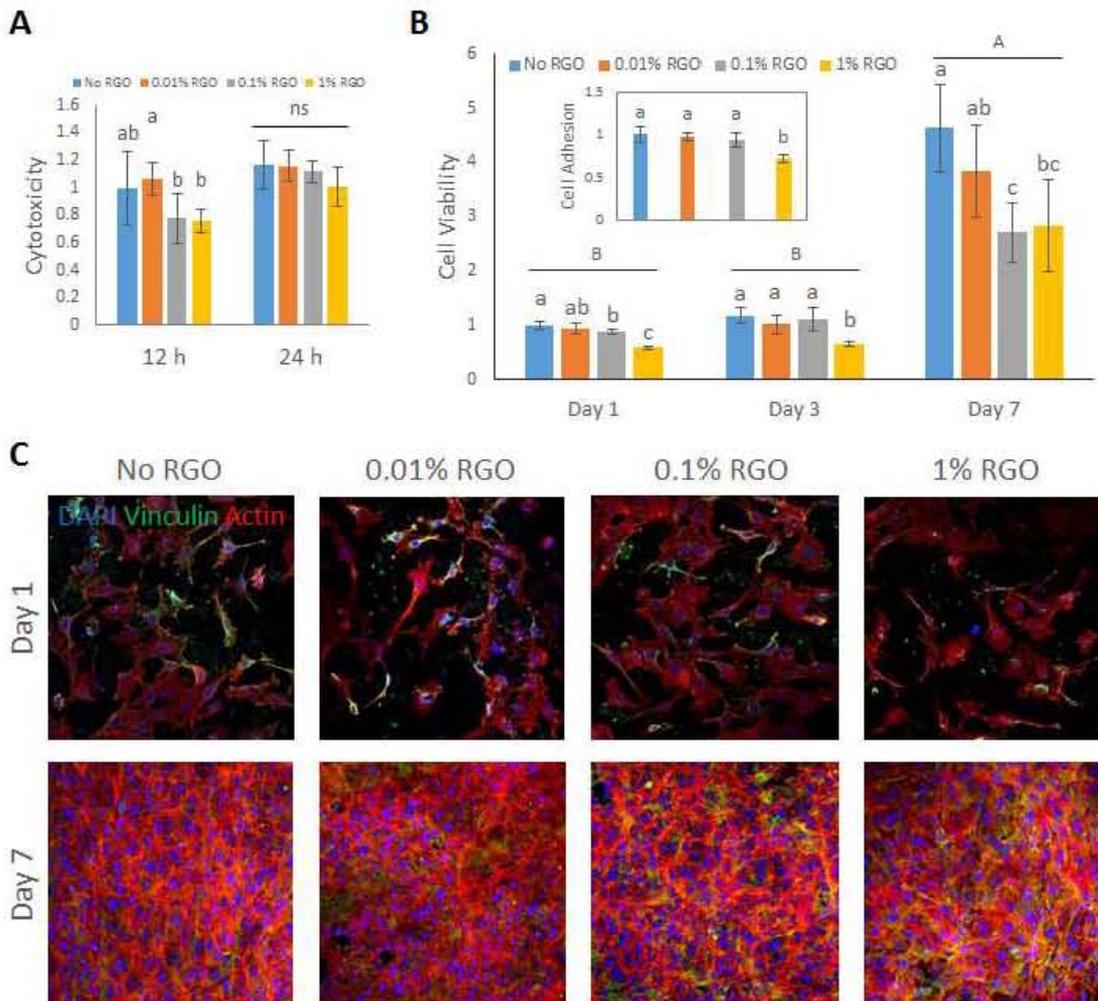


그림 2-47. 골아세포를 이용한 그래핀 플시멘트의 생체외실험

- 세포의 형태적 특징을 전자현미경을 통해 확인한 결과, 그래핀의 함량이 높을수록 세포가 덜 흡착하고 증식하는 것을 확인함(그림 2-47).

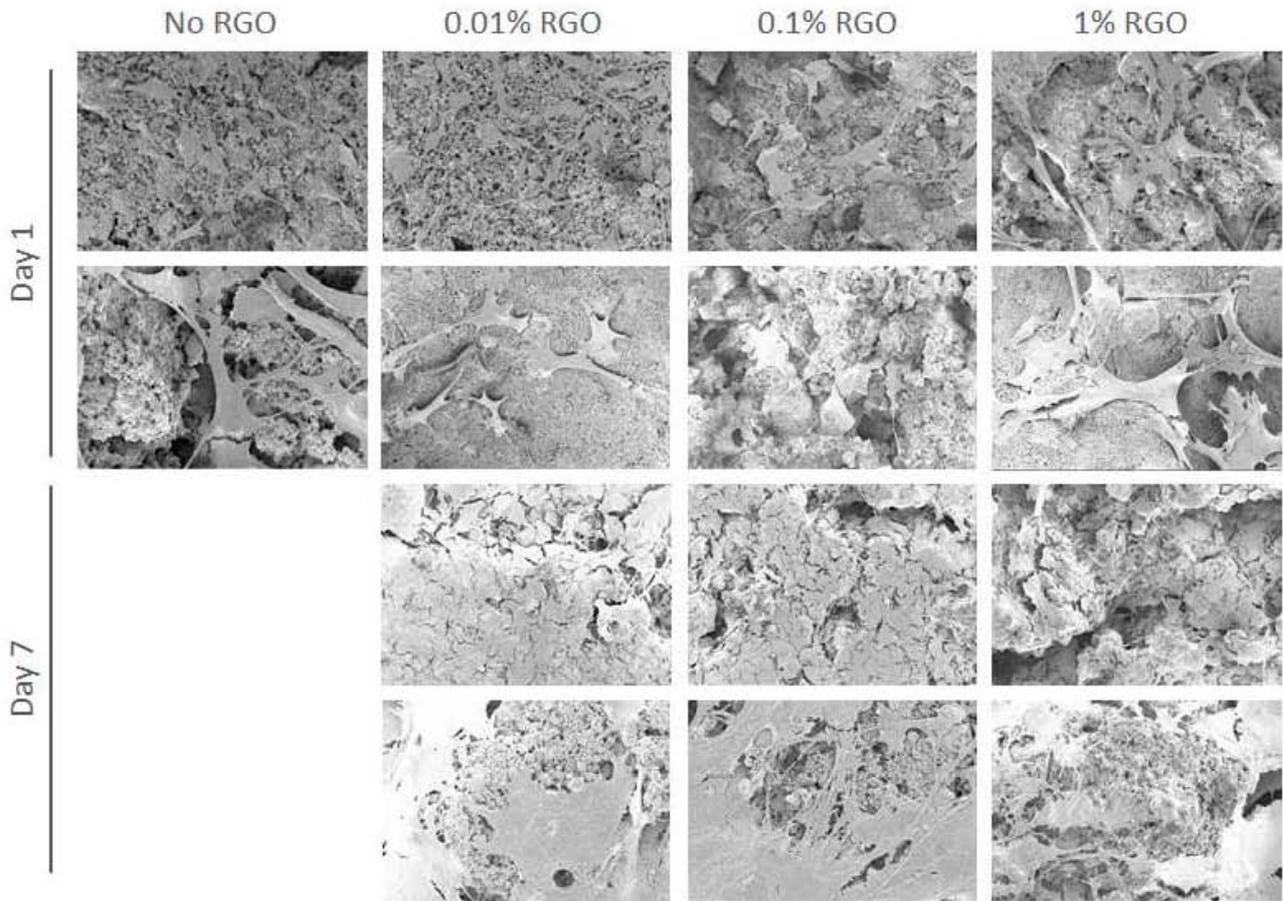


그림 2-48. SEM analysis

② 그래핀 골시멘트의 골분화

- 그래핀이 함유된 골시멘트가 골아세포의 골분화에 미치는 영향을 분석함. 골아세포를 그래핀 골시멘트 위에 심고 분화시킨 후 이를 alizarin red staining을 통해 분석함.
- 그 결과, 2 주에는 그래핀이 0.1% 함유된 골시멘트에서 골분화도가 높았지만 3 주에는 그래핀 함량이 1%인 골시멘트가 4 주가 지났을 때 골분화에 큰 차이를 보이는 것을 확인함 (그림 2-49).

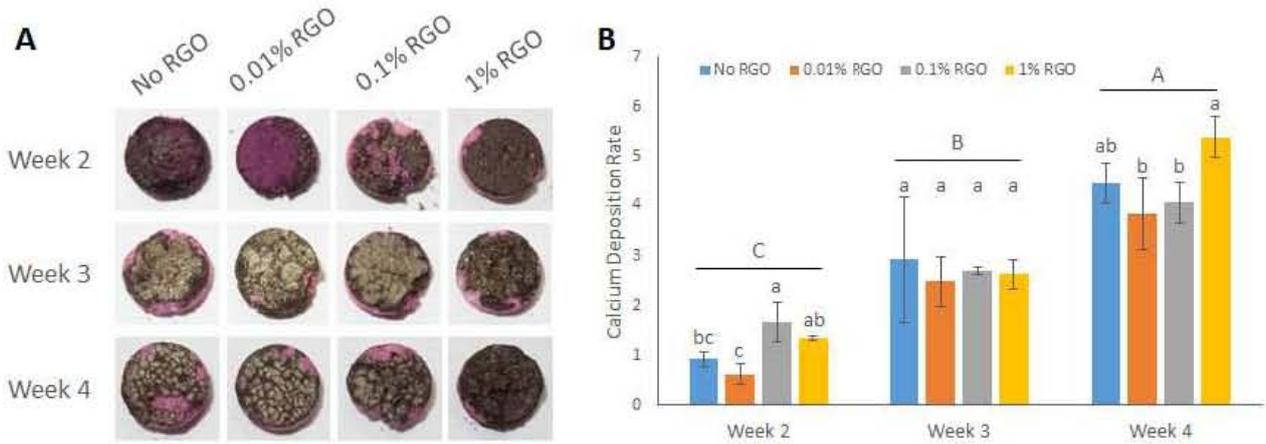


그림 2-49. Alizarin red 염색 결과

(3) 줄기세포를 이용한 그래핀이 함유된 골시멘트의 생체의실험

① 그래핀 골시멘트의 세포생존율

- 줄기세포를 이용하여 그래핀 골시멘트의 세포독성을 분석함. 그 결과, 그래핀이 함유된 골시멘트가 세포독성이 오히려 더 적음을 확인함.
- 세포부착율을 확인한 결과, 골아세포와 마찬가지로 그래핀이 많이 함유된 골시멘트에서 부착율이 떨어짐. 이를 면역염색으로 확인한 결과, 마찬가지로 vinculin의 발현이 떨어지는 것을 확인함. 그리고 7일이 지났을 때에도 그래핀이 많이 함유된 골시멘트에서는 vinculin 발현이 떨어지는 것을 확인함.
- 세포생존율을 분석한 결과, 그래핀이 미량 함유되어 있을 경우에는 세포생존율이 좀 더 좋아지는 것을 확인함. 그러나 그래핀의 함량이 높을수록 세포생존율은 다시 떨어지는 것을 확인함.

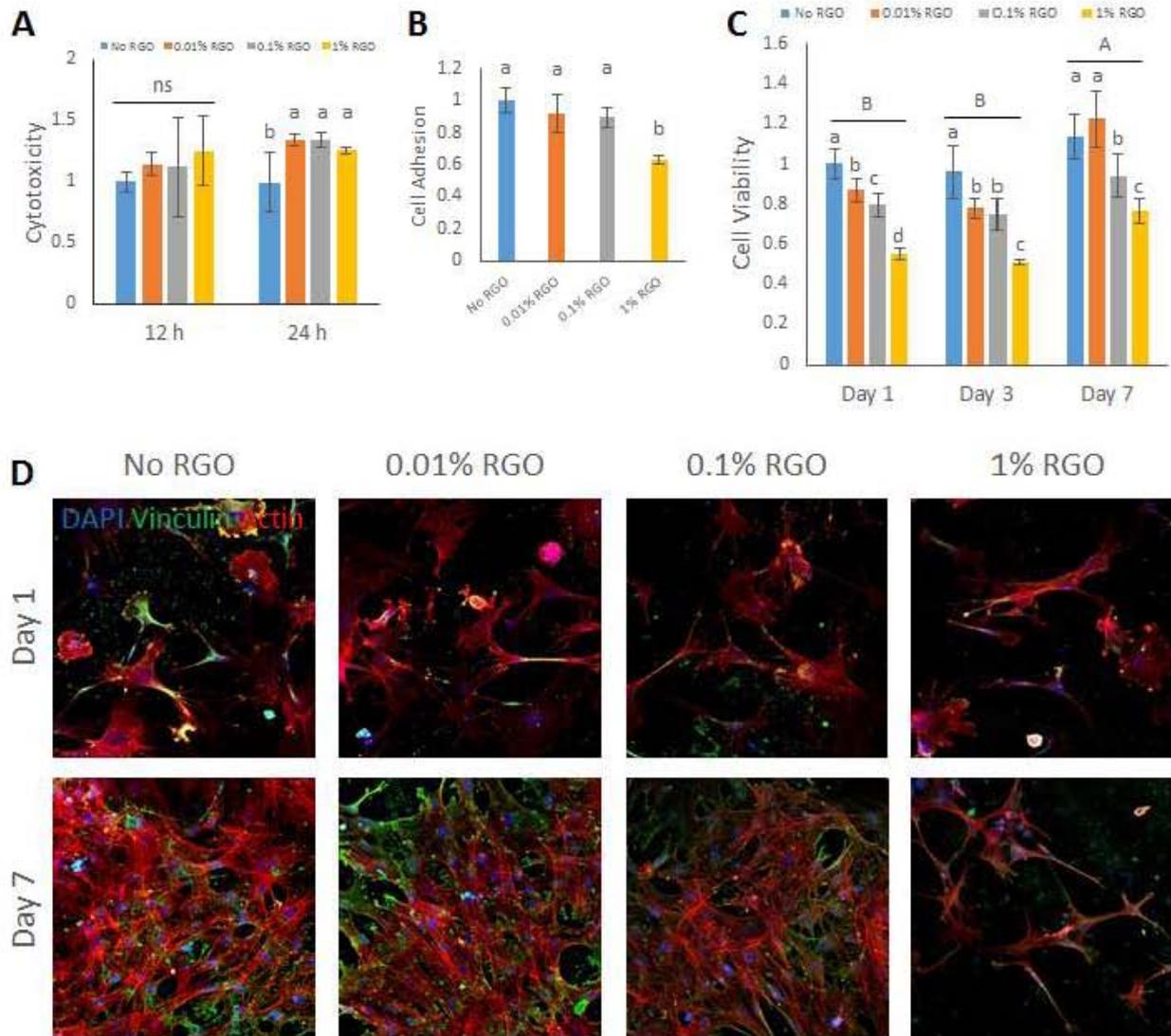


그림 2-50. 줄기세포를 이용한 그래핀 폴리머트의 생체외실험

- 이러한 결과는 전자현미경을 이용한 분석에서도 대동소이하게 나타남(그림 2-51).

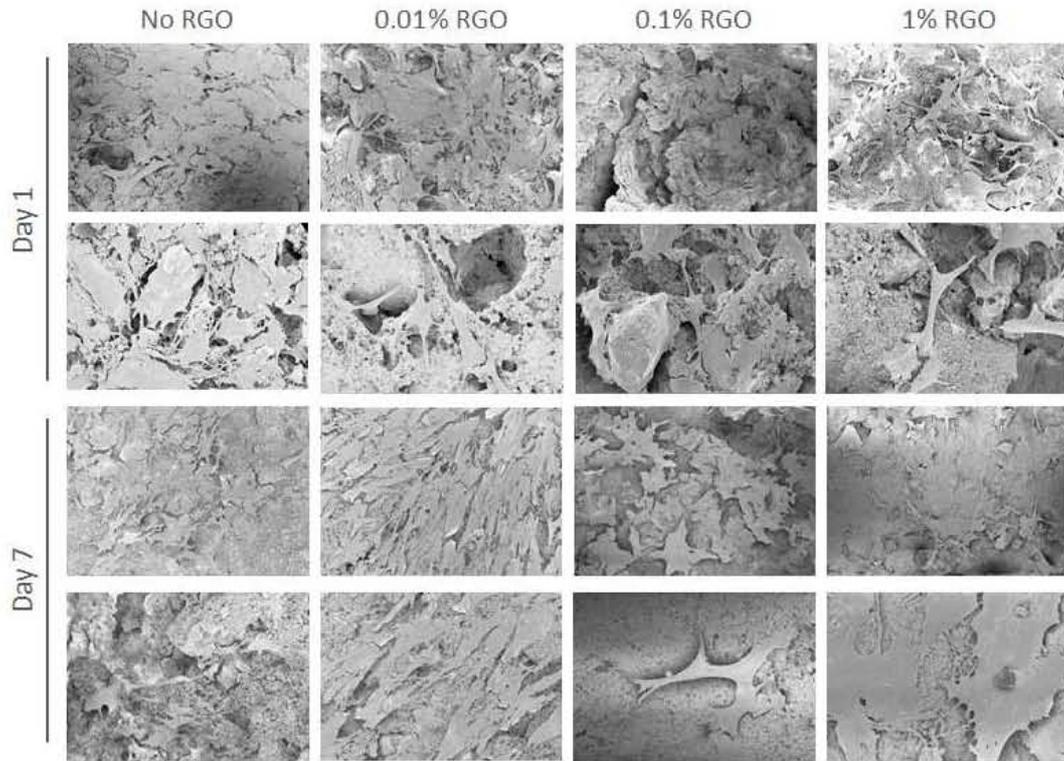


그림 2-51. SEM analysis

② 줄기세포의 골분화능

- 그래핀 콜시멘트 위에 줄기세포를 심은 다음 2~4 주에 걸쳐 분화시키고 줄기세포의 골분화 마커인 osteocalcein(OCN)을 면역염색함.
- 그 결과 2주에는 그래핀의 영향과 상관없이 OCN이 발현되지 않았으나, 3주, 4주에는 그래핀이 많이 함유될수록 더 높은 OCN 발현율을 보이는 것을 확인할 수 있었음(그림 2-52).

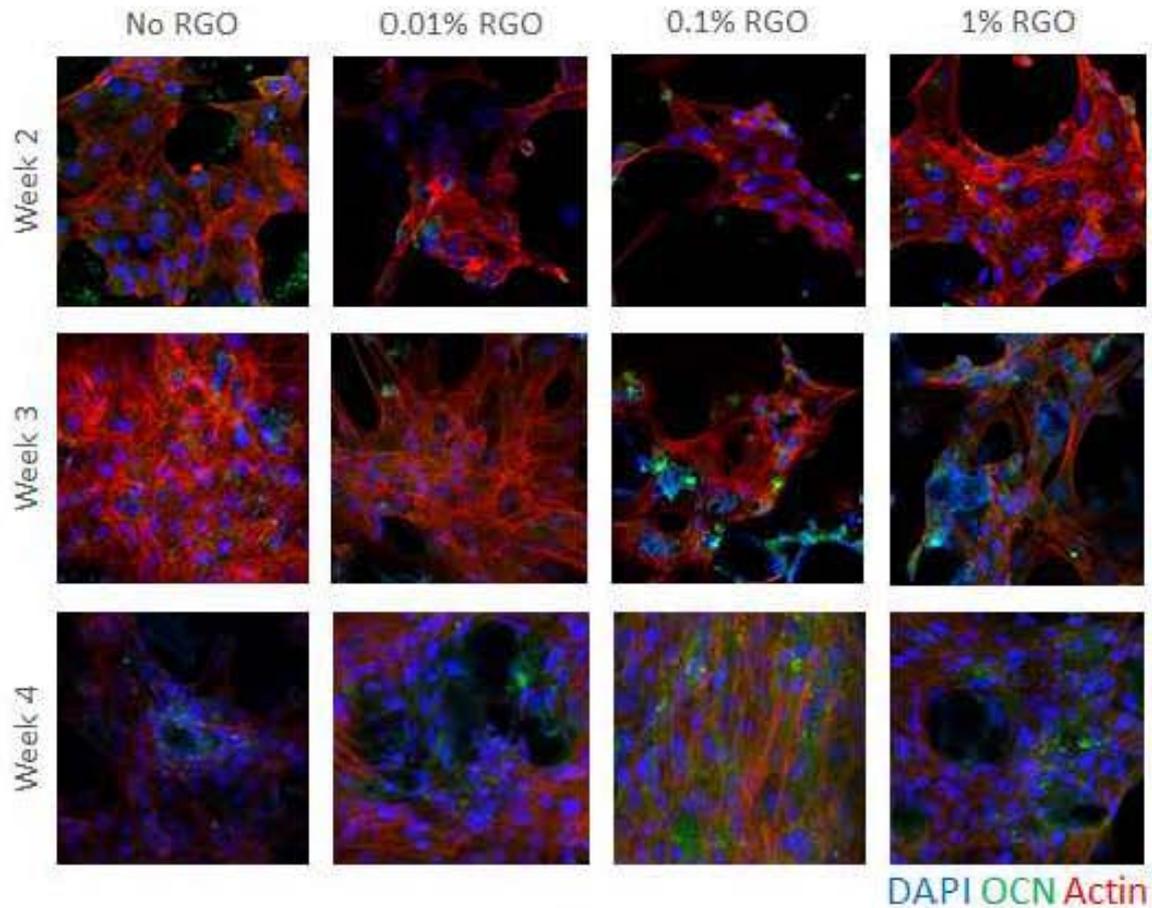


그림 2-52 면역염색결과

- 또한 Alizarin red 염색을 통해 줄기세포의 칼슘 생성을 확인함.
- 그 결과, 2주에는 그래핀이 들어간 글시덴트가 그래핀이 들어가지 않은 글시덴트보다 더 높은 칼슘 함량을 보임. 하지만 3주에는 글아세포의 경우와 마찬가지로 통계적 유의성을 보이지 않으나, 4주가 되었을 때 그래핀이 1% 함유된 글시덴트에서 가장 높은 칼슘 함량을 보임.
- 따라서 글아세포와 줄기세포의 경우를 모두 볼 때, 그래핀이 1% 함유된 글시덴트가 가장 높은 골분화율을 보이는 것을 확인함(그림 2-53).

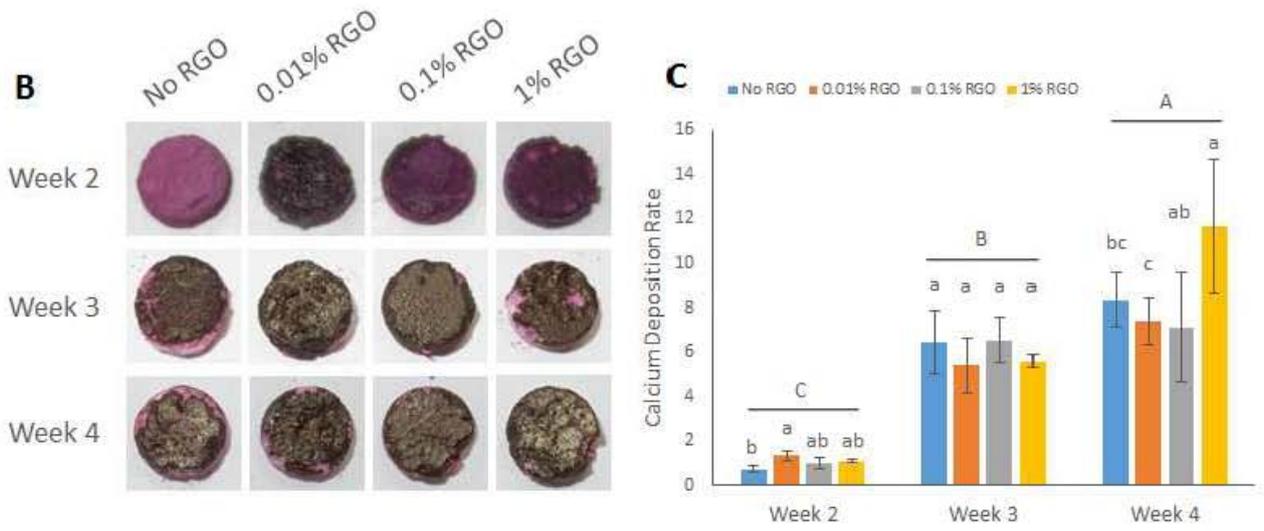


그림 2-53. 그래핀이 함유된 CPCC위에서의 칼슘형성 정도

마. 서로 다른 입도 크기를 갖는 꿀 분말과 키토산과의 혼합물에서의 줄기세포 반응에 관한 연구

- 본 연구를 통해 만들어진 초미세꿀분말과 기존에 개발되었던 100 μm 이상의 입도 크기를 갖는 꿀분말을 일정 비율로 혼합한 분말을 준비함. 준비된 분말을 각각 키토산 용액과 혼합하여 꿀분말-키토산 혼합체를 제조함.
- 시료는 세포배양용과 기계적 강도 시험용의 두 가지로 나누어 제작함. 세포배양용 혼합체는 키토산 3.5%wt 용액을 0.45 g/ml의 농도로 섞어주고 96 well plate에 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$, 100% 상대습도의 환경에서 48 시간 동안 건조됨. 기계적 강도 시험용 혼합체는 같은 비율의 키토산 용액을 섞은 뒤, 2x4 (diameter x height, mm)의 테프론 몰드에 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$, 100% 상대습도의 환경에서 48시간 동안 건조됨.

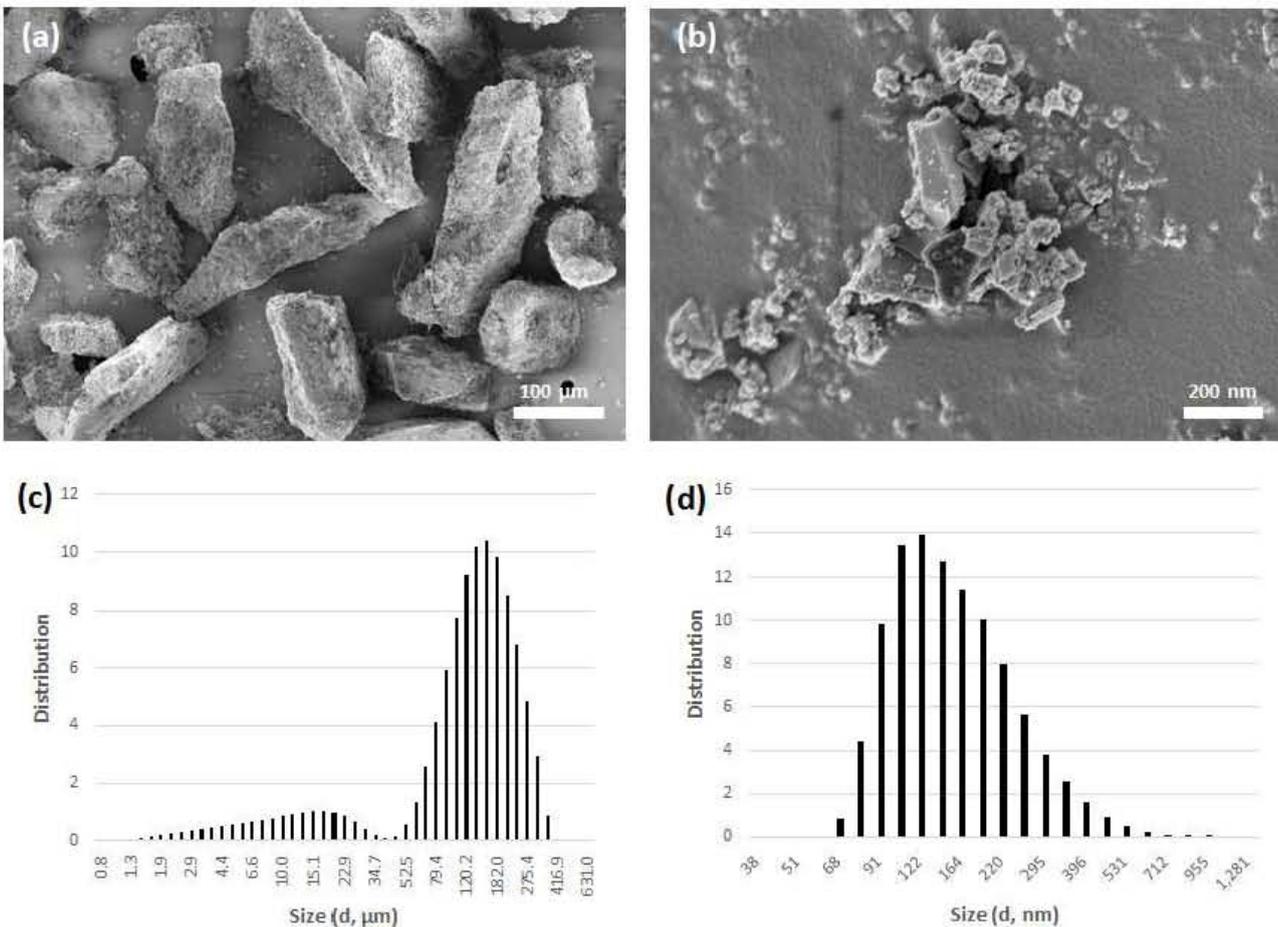


그림 2-54. 실험에 사용된 분말의 입도 특성 조사. (a,b: SEM 이미지, c,d: 입도분석 그래프)

- 그림 2-54에는 분말 사이즈에는 각각의 입도 크기를 조사하여 나타냄. 그림 2-54의 (a)는 100 μm 의 입도 크기를 갖는 분말의 전자 현미경 사진임. 입자의 크기는 균일하지 않지만 파우더 하나가 대략 100 μm 이상의 크기를 갖음을 확인 할 수 있음. 그림 2-54의 (b)는 초미세 분말의 전자 현미경 사진임. 1 μm 이하의 입자들이 넓게 분포하고 있음을 확인할 수 있음. 그림 2-54의(c),(d)는 입도 분석기를 이용하여 입자의 크기를 나타낸 그래프임.
- 입자의 크기가 큰 분말의 시료를 M이라 명명하고, 입자의 크기가 작은 분말의 시료를 N이라 명명함.
- 시료M 경우 평균 입도 값이 대략 120 μm 를 형성하는 것으로 조사 되었고, 시료N의 평균입도의 경우는 160 nm를 형성하는 것으로 조사됨.
- 시험군은 다음과 같은 규칙으로 글분말-키토산 혼합체의 이름을 정의함. 시료M만 사용한 M100/N0, 시료 M이 질량의 75% 시료N이 질량의 25%를 갖는 M75/N25와 같은 형식으로 총 다섯 개의 시험군이 설정됨.
- 제조된 혼합체의 표면 성질 및 형상을 관찰하기 위하여 FE-SEM을 이용하여 표면을 촬영함. 그림 2-55에 촬영 결과를 나타냄. 입자의 크기가 큰 시료 M의 비율이 높은 시험군의 경우 표면이 더 거칠고 공극이 존재가 많은 현상이 발견됨. 또한 시료N의 비율이 높은 시험군의 경우(그림 2-55, (j-0)) 표면의 형상이 비교적 매끈하며, 공극의 크기도 작음을 알 수 있음.

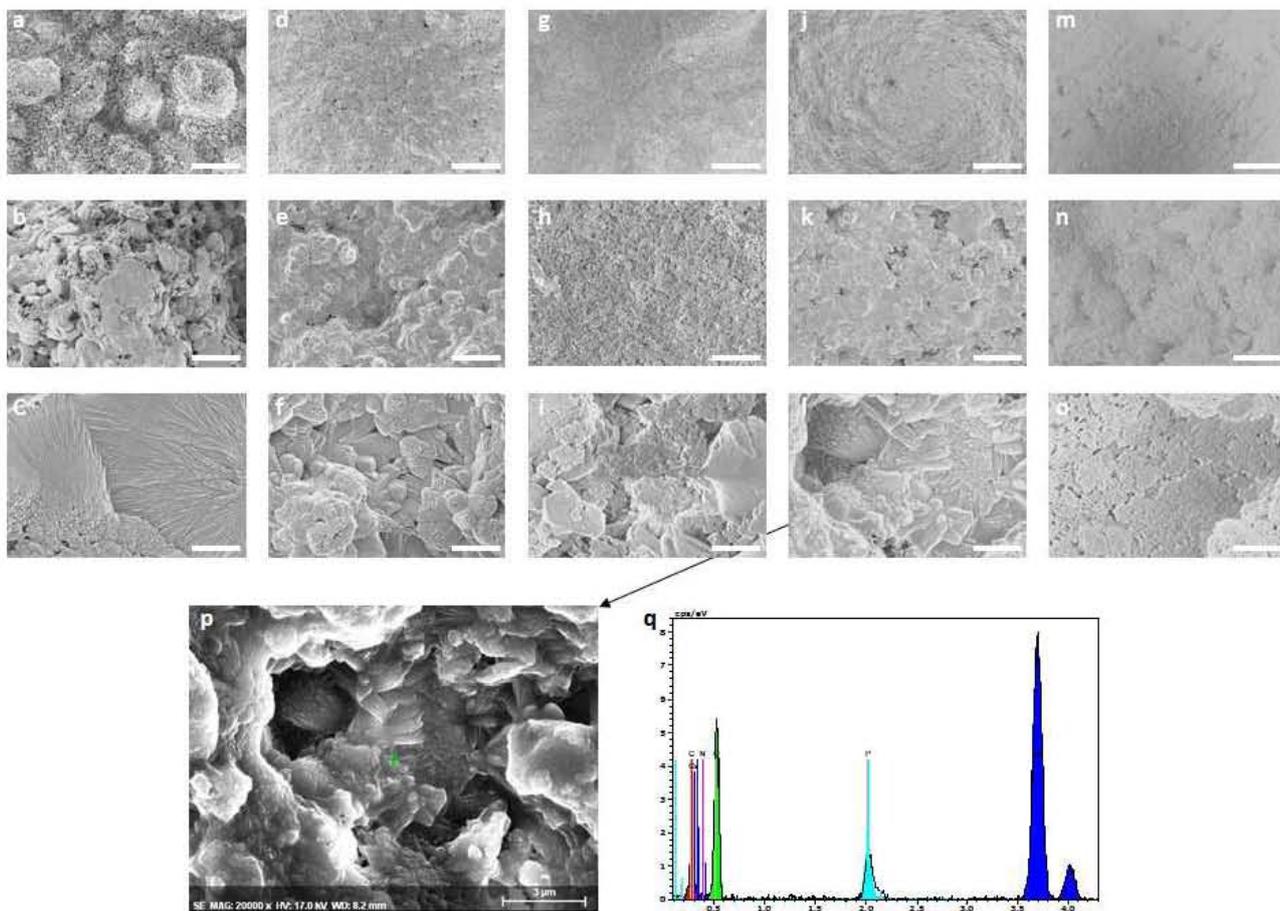


그림 2-55. FESEM images of calcium phosphate-chitosan composites(CPCCs) with various m/n calcium phosphate powder(CPP) ratios. CPCCs with the following different m/nCPPs were fabricated: M100/N0 (a · c), M75/N25 (d · f), M50/N50 (g – i), M25/N75 (j – l), and M0/N100 (m – o). The arrows (Ⓢ) indicate large pores on the surfaces and arrowheads (▶) indicate nanostructures caused by nCPPs.

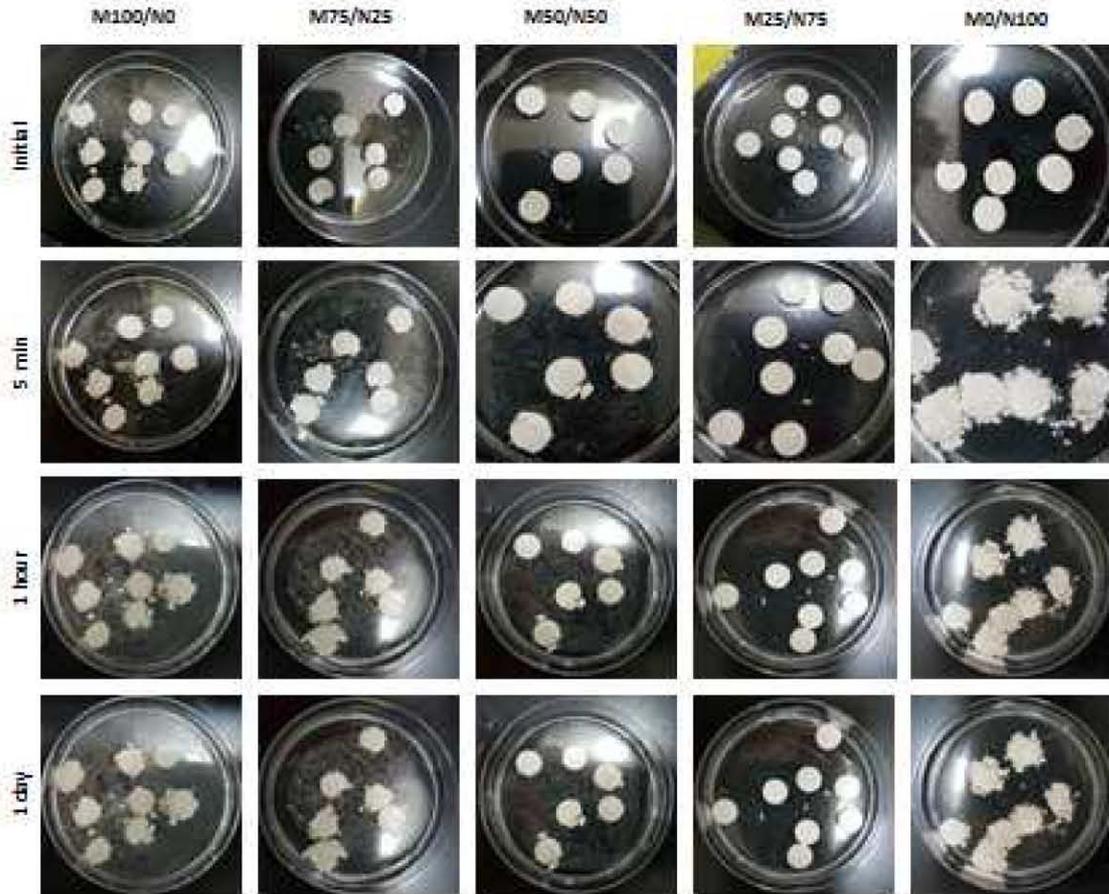


그림 2-57. Cohesion 실험결과

- 그림 2-57은 코히전(Cohesion) 실험결과를 사진으로 나타내었음. 분말과 키토산 용액을 혼합한 직후 PBS를 채운 Petri dish에 CPCC를 넣음. 사진은 각각, 투입 즉시, 5분, 1시간, 1일 후의 시점에서 촬영되었고, 모양을 잘 유지하는 시료가 코히전이 높은 시료임을 알 수 있음.
- 본 실험은 체내에 CPCC가 바로 적용되었을 경우 기계적 강도를 유지할 수 있는지 여부를 알아보는 실험임.
- 따라서 M25/N75 시료가 가장 체내에서 형상 유지에 가장 유리한 시험군으로 판단 할 수 있음.

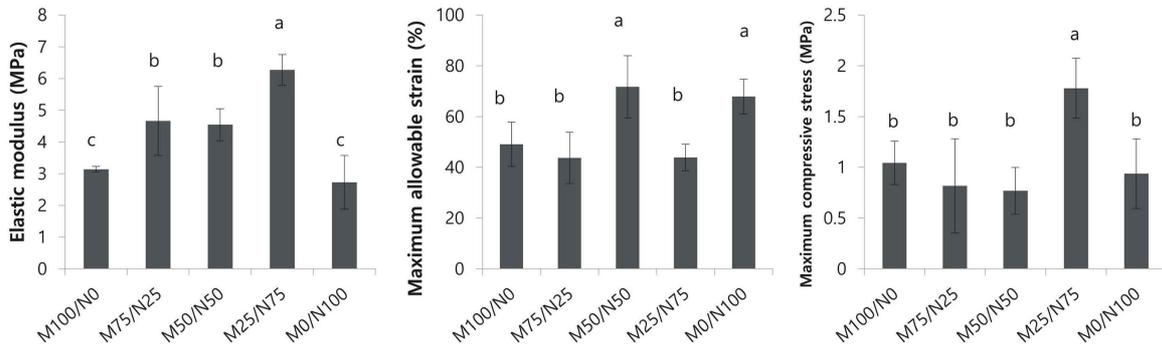


그림 2-58. 골분말-키토산 혼합체의 기계적 강도 실험. 실험 결과 값은 좌측으로부터, 탄성계수, 최대 변형률, 최대압축응력을 나타낸다.

- 최대 압축 응력이 가장 큰 시험군은 M25/N75로 그 값은 약 1.5 MPa를 나타냈다. 나머지 시험군들은 통계적 유의성 없이 1 MPa 정도의 값을 보이는 것으로 추정 됨. 탄성계수가 가장 좋은 시험군 역시 M25/N75 군으로 약 6 MPa의 값을 보이는 것으로 추정됨(그림 2-58).
- 측정된 결과에 따르면 M25/N75 군에서 가장 뛰어난 기계적 강도를 가지는 것으로 조사됨.
- 또한 혼합체의 생체 활성 반응을 추적하기 위하여, 유사체액에 7, 14, 21, 28일 동안 담근 후 기계적 강도를 측정함.

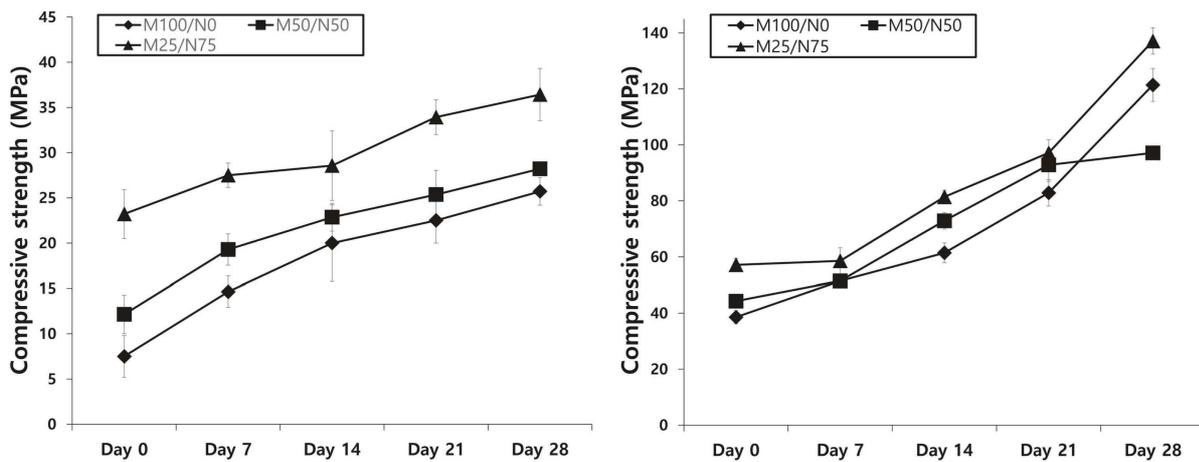


그림 2-59. 유사체액에 담근 후의 기계적 강도 변화

- 유사체액에 담그는 실험결과 M25/N75 시험군에서 기계적 강도가 증가하는 결과를 보여 주었다. 두 가지 강도 실험 결과 M25/N75 시험군이 생체 적용시에 가장 뛰어난 성능을 보여 줄 수 있는 물성을 가졌다고 결정함(그림 2-59).



그림 2-60. 각각의 실험군 위에서의 세포 친화성 실험. (a) 세포부착률 시험(1일차 WST-1Assay), (b) 세포 증식을 측정하기 위해 3,5,7일 세포 활성도를 WST-1 assay를 통해 관찰함.

- 세포증식 실험 결과 M100/N0 과, M50/N5에서 다른 군들이 비해 세포 성장률이 높은 것으로 관찰 됨. 하지만 그 차이가 아무 크지 않았으며 다섯 가지의 실험군 모두가 세포가 자라는데 적합한 환경을 가진다고 볼 수 있다.(그림 2-60)

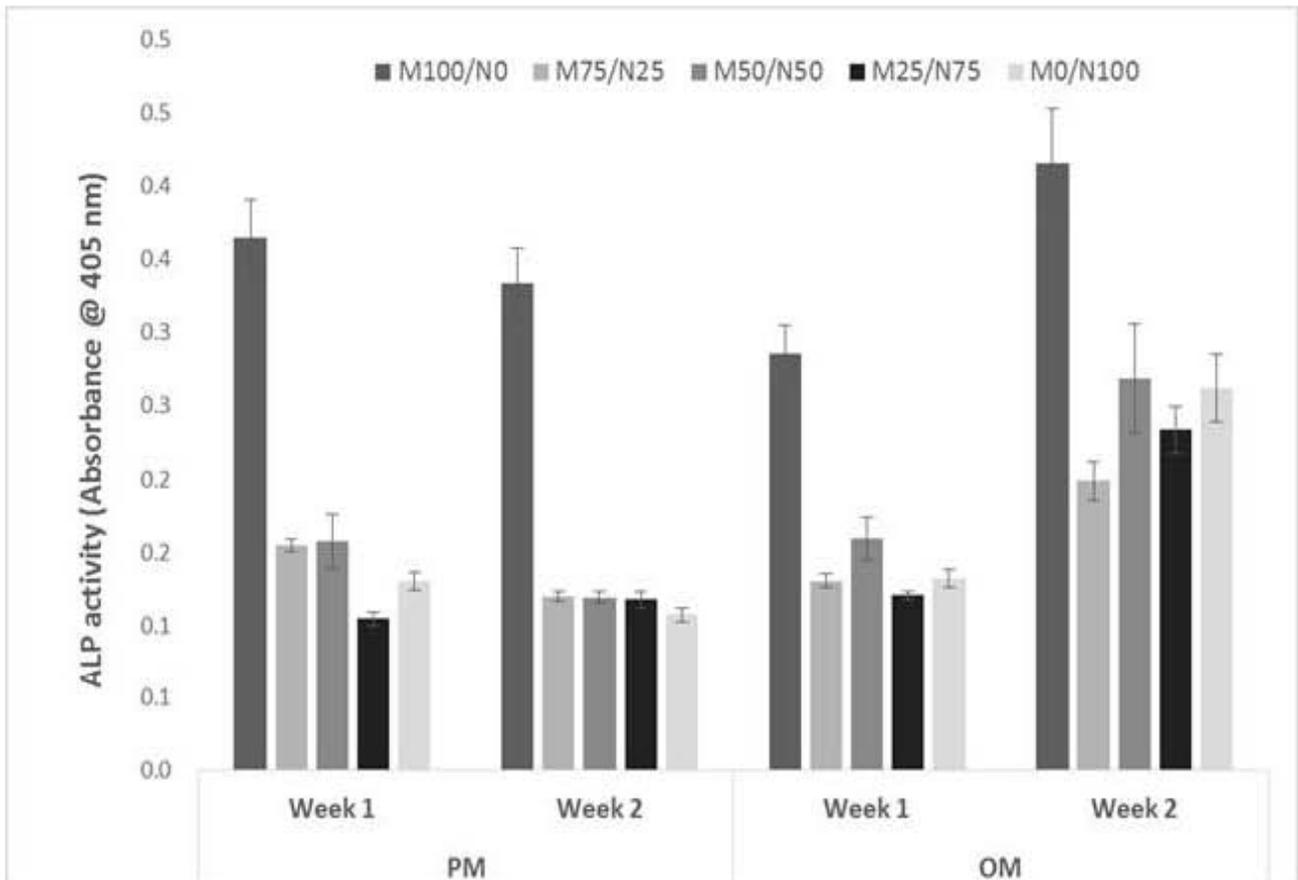


그림 2-61. ALP activity 측정결과

- 줄기세포가 골세포로 변화 할 때의 초기 마커인 Alkaline Phosphatase(ALP)의 활성도를 측정하여 골 분화의 정도를 예측한 실험을 진행함. 그림 2-61에 ALP의 흡광도 측정 결과가 나타나 있음.
- 시험은 배양액의 종류에 따라 두 가지로 나뉘어 진행되었음. 줄기세포 증식용 배지 (Proliferation media, PM)과 줄기세포 골 분화용 배지(Osteogenic Media, OM)의 두가지 배양액이 사용되었음.
- 그림 2-61에 결과를 보면 증식용 배지로 시험한 시험군의 ALP의 발현량은 골 분화용 배지에 비해 작은 값을 보임. 골 분화용 배지를 사용한 시험군의 7 일차 시험 결과에서 M0/N100에서 가장 높은 활성을 보임. 또한 시료N이 많이 혼합된 샘플에서의 ALP 활성도가 높은 것을 확인할 수 있었음. ALP가 골분화 초기에 나타나는 마커임을 고려할 때 작은 크기의 골 분말이 섞였을 경우에 빠른 골분화가 일어날 가능성이 있다는 결론을 내릴 수 있었음.

3. 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 유효성 및 안전성 평가를 위한 동물실험

가. 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재(골시멘트) 생체적합성 평가(I)

- 연구의 목표: 말뚝을 이용한 생체소재의 유효성 및 안전성을 검증하기 위하여 실험동물에 제작된 말뚝 분말(powder, 파우더)을 적용하였음.
- 대략적인 연구의 내용 및 방법은 다음과 같음:
 - 말뚝 분말을 이용한 생체소재의 동물실험 및 생체적합성 평가
 - in vivo 동물실험
 - 말뚝 분말을 이용한 생체소재의 동물 (rabbit) 실험 및 생체적합성 평가
 - computed tomography (CT) 검사
 - Micro-CT 검사 및 분석
 - 생체조직 이식부위의 병리조직학적 검사
 - 말뚝 분말의 생체소재를 이용한 동물실험의 안전성 및 유효성 평가
- 실험동물은 아래와 같은 순서로 준비 되었음
- 체중이 2500-3,000 g이고 생후 8 주령의 수컷 New zealand white rabbit (Koatech Co., Korea) 10 마리를 온도 23±2℃, 상대습도 60±10%로 유지하고 12 시간 명암주기가 유지되는 아주대학교 실험동물 연구지원센터에서 사료와 식수를 자유롭게 공급하면서 사육하였음.
- 토끼는 수술 6 주, 12 주 후에 안락사 시켜 CT, micro CT, Histomorphometry를 통해 New bone formation을 확인함. 개략적인 실험의 내용은 그림 2-62에 도식화 하였음.

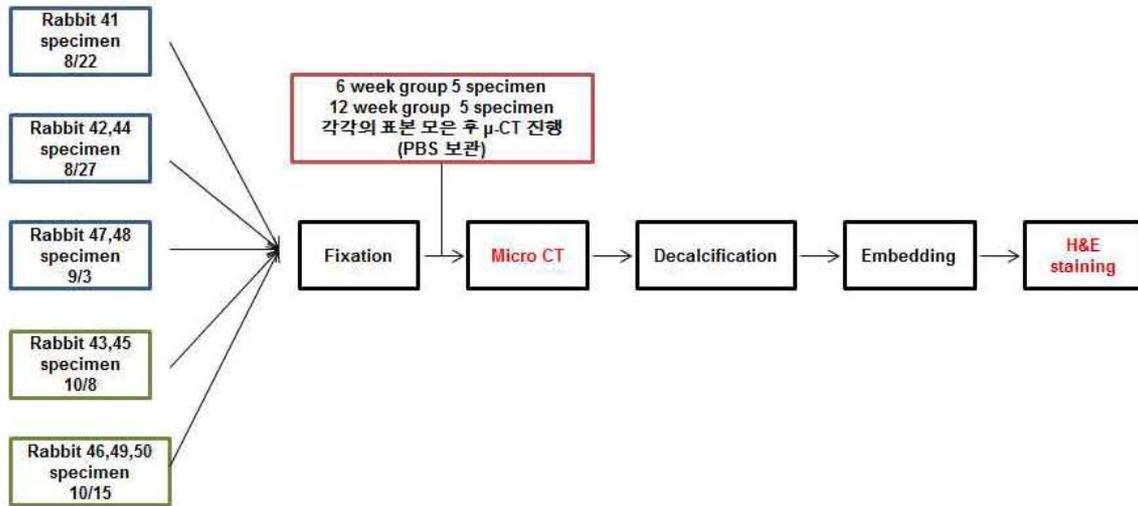


그림 2-62. Rabbit 동물실험 개요

- 두개골의 임계 골결손부 유발 및 골 이식재의 이식은 그림 2-63에 그 대략적인 순서를 나타냄.
- 항생제(Baytril, Bayer Co.)를 주사하고 마취제 (Zoletil, virbac Co.)로 토끼를 전신 마취를 한 후 토끼의 두개골 부위를 전모한 후 포비돈 용액으로 소독하였음.
- 토끼의 두개골 정중부위의 피부를 메스로 절개하고 골막하를 박리하여 self-retainer를 이용하여 두개골을 노출시켰음.
- 생리식염수를 두개골 부위에 관주하면서 리머 (Reamer drill)를 이용하여 뇌경막이 손상되지 않도록 두개골 두정골의 양쪽에 각각 2개씩 원형으로 임계 골결손부 (calvarial defect model)를 유발하였음.
- 원형 임계 골결손부에 아무것도 이식을 하지 않은 음성 대조군, Bio-oss[®]을 이식한 양성대조군, 5 μm , 100 μm 크기의 말뚝 분말과 키토산 용액(3.5%)의 혼합체(Horse bone chitosan composite, HBCC)를 이식한 이식군으로 분류하였음.
- 두개골 부위의 피부는 3-0 비흡수성 봉합사 (black silk, Ailee Co, Korea)로 단순 결절봉합을 하였음.
- 두개골 결손부 유발과 동물실험은 아주대학교 실험동물연구지원센터의 규정에 따라 수행하였음.

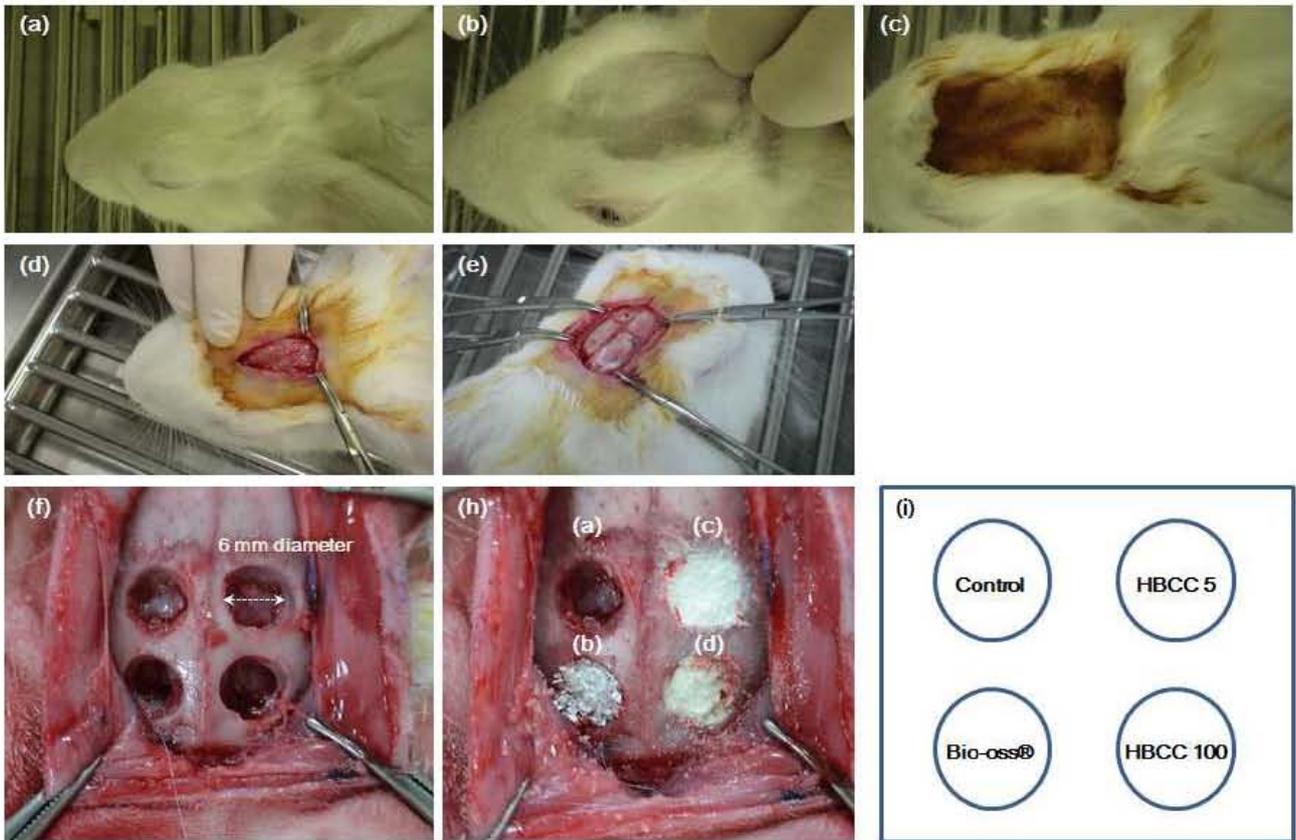


그림 2-63. (a) 마취시킨 후 토끼의 두개골, (b) 두개골 부위를 전모한 상태, (c) 전모한 후 포비돈 용액으로 소독, (d) 메스를 이용하여 두개골을 노출시킴, (e) 골결손부를 만들지 않은 상태의 두개골, (f),(h) 두개골을 노출 시킨 후 두정골에 reamer drill을 이용하여 6 mm의 defect를 준 후 각각의 골결손부에 Bio-oss®, Horse bone-chitosan composite(HBCC) 를 넣어줌, (i) 토끼 두개골 표본의 모식도

- Micro-CT 촬영은 아래와 같은 순서로 실험을 진행하였음.
- 임계 골결손 부위에 생체소재를 이식한 6 주 후에 토끼를 안락사 시킨 후에 diamond disc로 두개골의 이식체를 포함하여 토끼의 두개골을 절취하였음.
- micro-CT로 촬영한 골결손 부위의 단면상에서 골부피 (Bone volume)을 분석한 결과 말의 뼈를 이식한 부위가 Bio-oss®를 이식한 부위보다 더 많았음.
- 임계 골결손만을 유발한 음성 대조군에서는 수술 후 6 주체에 가장 낮은 골부피 (Bone volume)를 보여 골이 거의 형성되지 않았음을 알 수 있음.
- 양성 대조군 (Bio-oss®)에서는 이식 후 6 주체에 이식부의 가장자리부터 골과 융합되어가는 것을 보이고, 음성대조군에 비해 골부피 (Bone volume)가 높아진 것을 확인할 수 있음.

- 말뚝 분말을 이식한 모든 골결손 부위에서 골부피의 증가를 보였으며, 그 중 HBCC 5를 이식한 부위의 골부피 (Bone volume)이 가장 높았음.

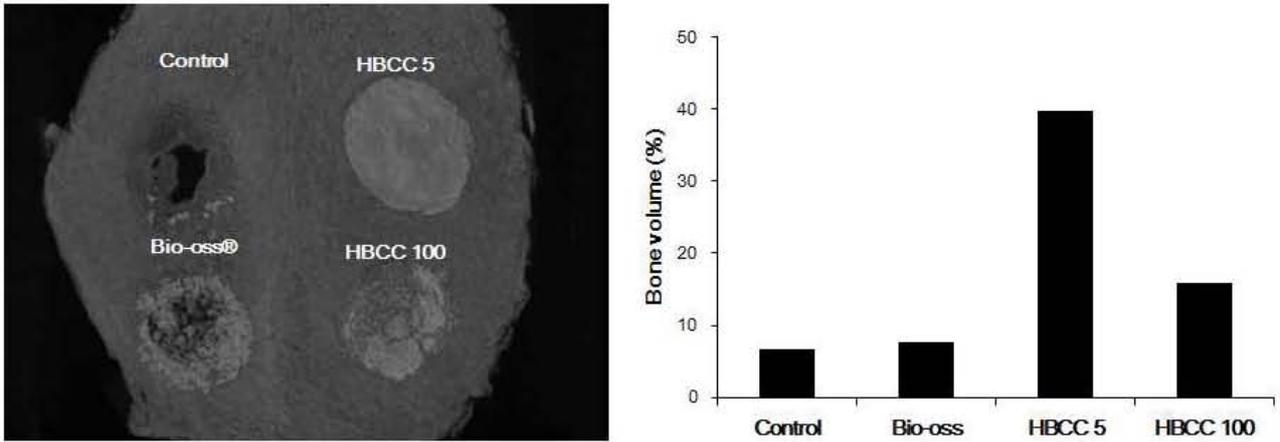


그림 2-64. (a) HBCC를 이식 6주 후의 micro-CT 사진. (b) 수술 6주 후 골결손 부위 각각의 골 부피

- 말뚝 분말을 이용한 골 이식재의 유효성 및 안전성 평가
- 본 연구의 목표는 말뚝 분말을 이용한 생체소재의 동물실험 및 생체적합성의 평가임.
- 연구의 내용 및 방법은 다음과 같음.
- 말뚝 분말을 이용한 생체소재의 동물실험 및 생체적합성 평가함.
- in vivo 동물실험은 말뚝 분말을 이용한 생체소재의 동물 (rabbit) 실험 및 생체적합성 평가함.
- computed tomography (CT) 검사
- Micro-CT 검사 및 분석
- 생체조직 이식부위의 병리조직학적 검사
- 말뚝 분말의 생체소재를 이용한 동물실험의 안전성 및 유효성 평가

나. 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 생체적합성 평가(II)

① 실험 동물

- 체중이 3500-4000 g이고 생후 8 주령의 수컷 New zealand white rabbit (Koatech Co., Korea) 10 마리를 온도 23±2℃, 상대습도 60±10%로 유지하고 12 시간 명암주기가 유지되는 아주대학교 실험 동물연구지원센터에서 사료와 식수를 자유롭게 공급하면서 사육하였음.

- 토끼는 수술 8 주, 16 주 후에 안락사 시켜 CT, micro CT, Histomorphometry를 통해 New bone formation을 확인함. (그림 2-65)

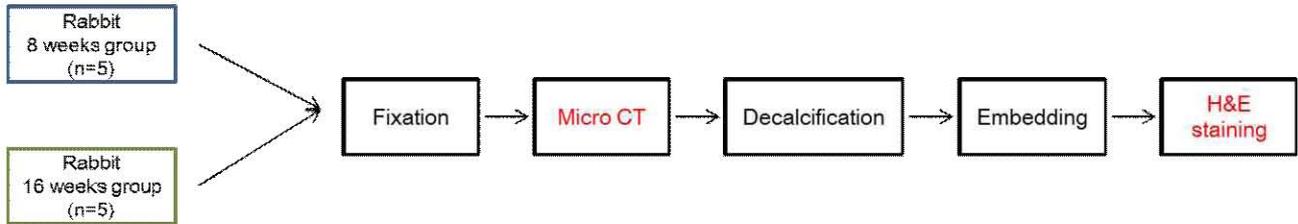


그림 2-65. 실험개요

② 두개골의 임계 골결손부 유발 및 골 이식재의 이식 (그림 2-66)

- 항생제(Baytril, Bayer Co.)를 주사하고 마취제 (Zoletil, virbac Co.)로 토끼를 전신 마취를 한 후 토끼의 두개골 부위를 전모한 후 포비돈 용액으로 소독하였음.
- 토끼의 두개골 정중부위의 피부를 메스로 절개하고 골막하를 박리하여 self-retainer를 이용하여 두개골을 노출시켰음.
- 생리식염수를 두개골 부위에 관주하면서 트래핀 버 (Trehine bur)를 이용하여 뇌경막이 손상되지 않도록 두개골 두정골의 양쪽에 각각 2개씩 원형으로 임계 골결손부 (calvarial defect model)를 유발하였음.
- 원형 임계 골결손부에 아무것도 이식을 하지 않은 음성 대조군, Bio-oss®을 이식한 양성대조군, 5 μm , 100 μm 크기의 말뚝 분말만을 이식한 이식군으로 분류하였음.
- 두개골 부위의 피부는 3-0 비흡수성 봉합사 (black silk, Ailee Co, Korea)로 단순 결절봉합을 하였음.
- 두개골 결손부 유발과 동물실험은 아주대학교 실험동물연구지원센터의 규정에 따라 수행하였음.

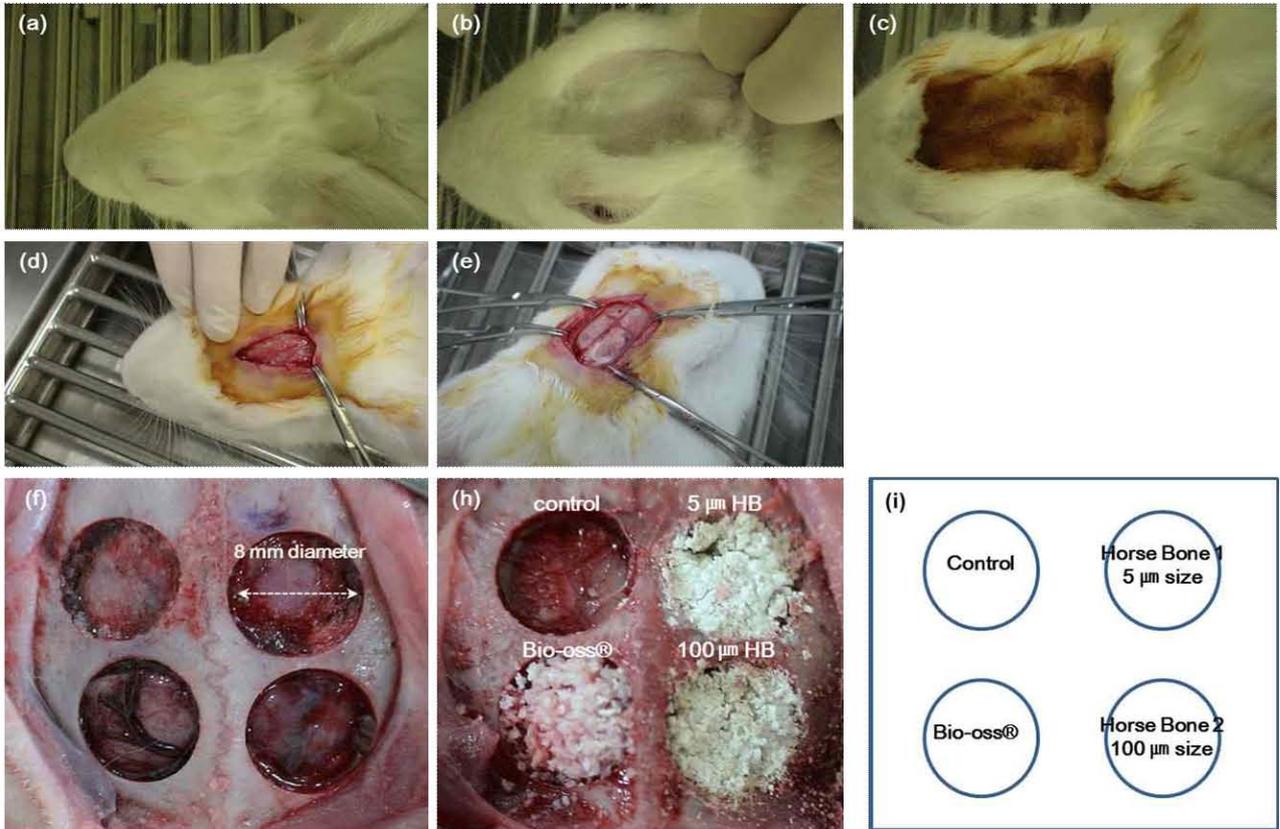
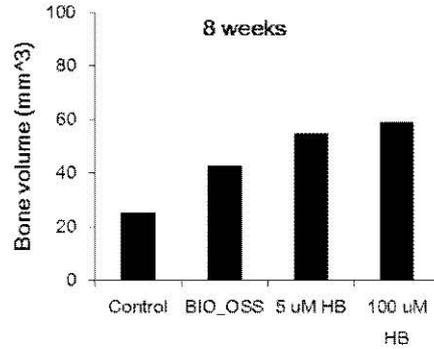
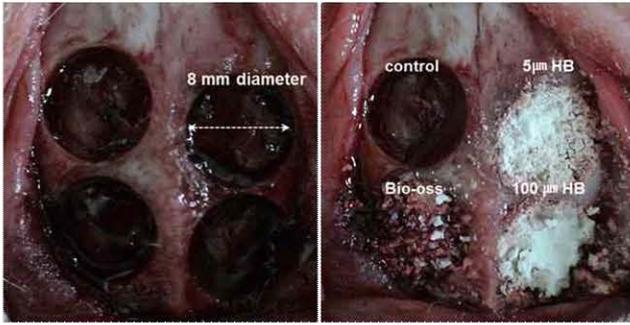


그림 2-66. (a) 마취시킨 후 토끼의 두개골, (b) 두개골 부위를 전모한 상태, (c) 전모한 후 포비돈 용액으로 소독, (d) 메스를 이용하여 두개골을 노출시킴, (e) 골결손부를 만들지 않은 상태의 두개골, (f),(h) 두개골을 노출 시킨 후 두정골에 Trephine bur를 이용하여 8 mm의 골결손부를 만들어 준 후 각각의 골결손부에 Bio-oss®, Horse Bone powder를 넣어줌, (i) 토끼 두개골 표본의 모식도

③ Micro-CT 촬영

- 임계 골결손 부위에 생체소재를 이식한 8, 16 주 후에 토끼를 안락사 시킨 후에 diamond disc로 두개골의 이식재를 포함하여 토끼의 두개골을 절취하였음.

Surgery



Micro-CT analysis

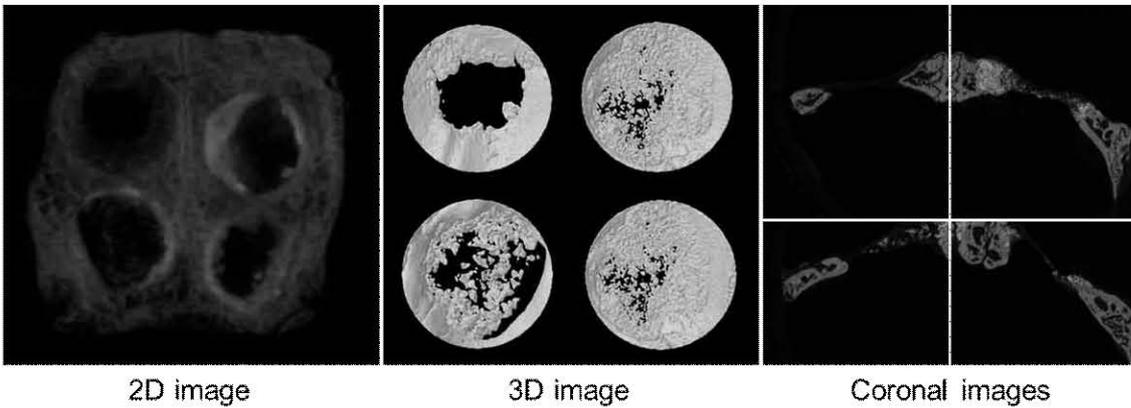
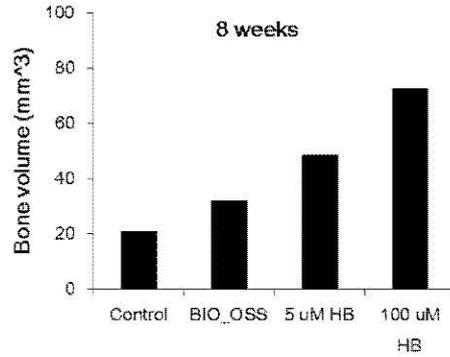
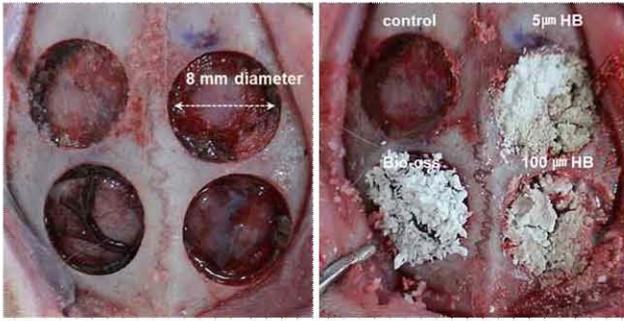


그림 2-67. Rabbit 1 Micro-CT 결과

- 그림 2-67은 8 주차 토끼 1번의 Micro-CT 결과임. Micro-CT 분석 레퍼런스를 통해 확인한 결과 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위의 Bone volume은 59.0140 mm³ 으로 control 결손 부위의 Bone volume인 25.402 mm³ 보다 Bone volume이 높게 나왔음. Bio-oss와 5 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위의 Bone volume은 각각 42.8702 mm³, 54.8937 mm³ 으로 Control 결손부위보다는 높았지만 100 μm size의 Bone volume보다는 낮은 수치를 보인 것을 확인할 수 있었음.

Surgery



Micro-CT analysis

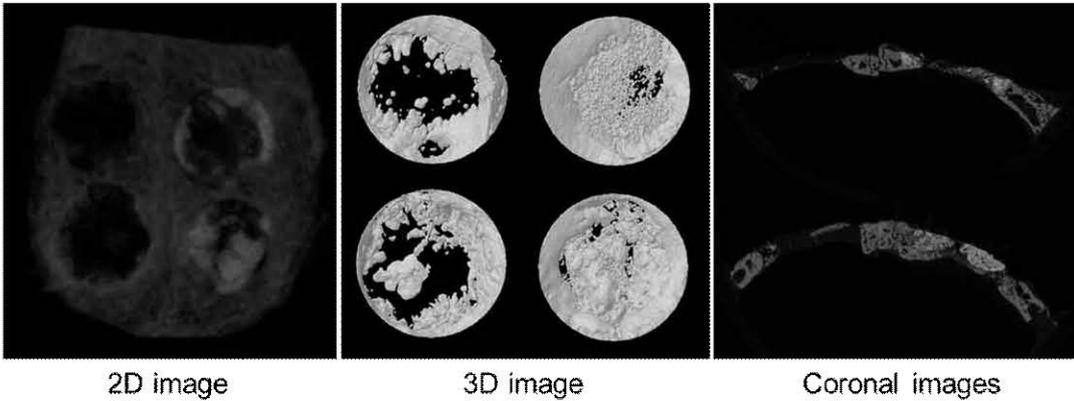
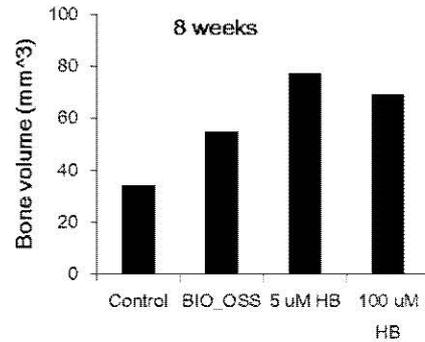
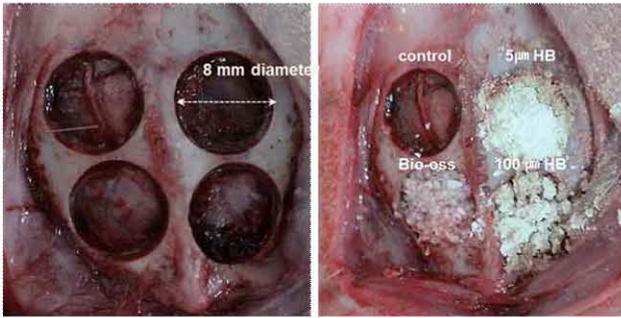


그림 2-68. Rabbit 2 Micro-CT 결과

- 그림 2-68는 8 주차 토끼 2번의 Micro-CT 결과임. Micro-CT 분석 레퍼런스를 통해 확인한 결과 100 μm size의 말뼈 분말을 넣은 결손부위의 Bone volume은 72.4508 mm^3 으로 control 결손 부위의 Bone volume인 20.8706 mm^3 보다 Bone volume이 높게 나왔음. Bio-oss와 5 μm size의 말뼈 분말을 넣어준 결손부위의 Bone volume은 각각 32.0708 mm^3 , 48.5741 mm^3 으로 Control 결손부위보다는 높았지만 100 μm size의 Bone volume보다는 낮은 수치를 보인 것을 확인할 수 있었음.

Surgery



Micro-CT analysis

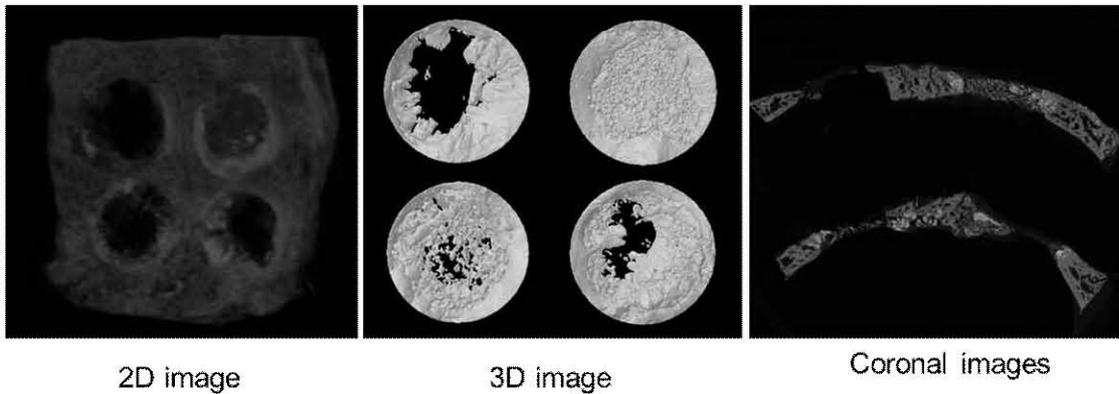
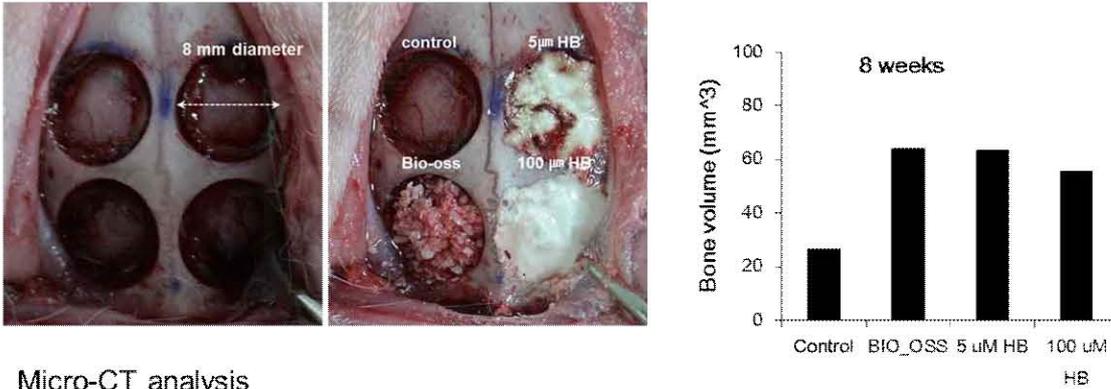


그림 2-69. Rabbit 3 Micro-CT 결과

- 그림 2-69는 8 주차 토끼 3 번의 Micro-CT 결과임. Micro-CT 분석 레퍼런스를 통해 확인한 결과 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위의 Bone volume은 69.4016 mm^3 으로 control 결손 부위의 Bone volume인 34.4021 mm^3 보다 Bone volume이 높게 나왔음. Bio-oss와 5 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위의 Bone volume 또한 각각 54.8548 mm^3 , 77.6828 mm^3 으로 Control 결손부위보다는 높음. Rabbit 3에서 5 μm 와 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위 모두 Bio-oss보다 높았고, 그 중 5 μm size의 Bone volume이 가장 높음.

Surgery



Micro-CT analysis

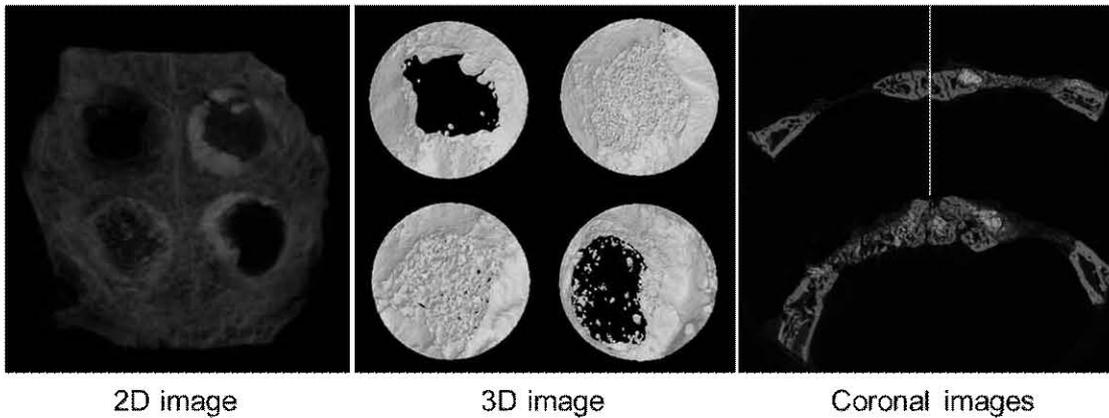
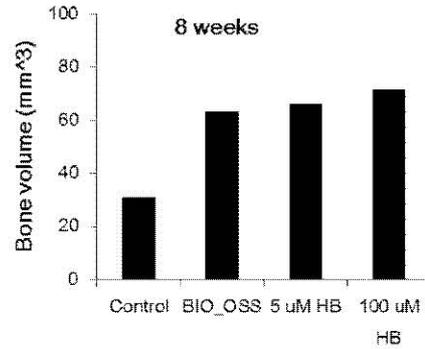
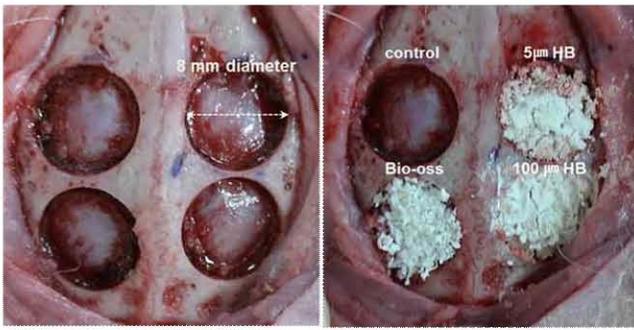


그림 2-70. Rabbit 4 Micro-CT 결과

- 그림 2-70은 8 주차 토끼 4 번의 Micro-CT 결과임. Micro-CT 분석 레퍼런스를 통해 확인한 결과 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위의 Bone volume은 55.8415 mm³ 으로 control 결손 부위의 Bone volume인 26.8009 mm³ 보다 Bone volume이 높게 나왔음. Bio-oss와 5 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위의 Bone volume 또한 각각 64.0492 mm³, 63.3788 mm³ 으로 Control 결손부위보다는 높음. Rabbit 4에서는 5 μm와 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위 모두 Control 보다 높았고, Bio-oss를 넣어준 결손부위의 Bone volume과 비슷함.

Surgery



Micro-CT analysis

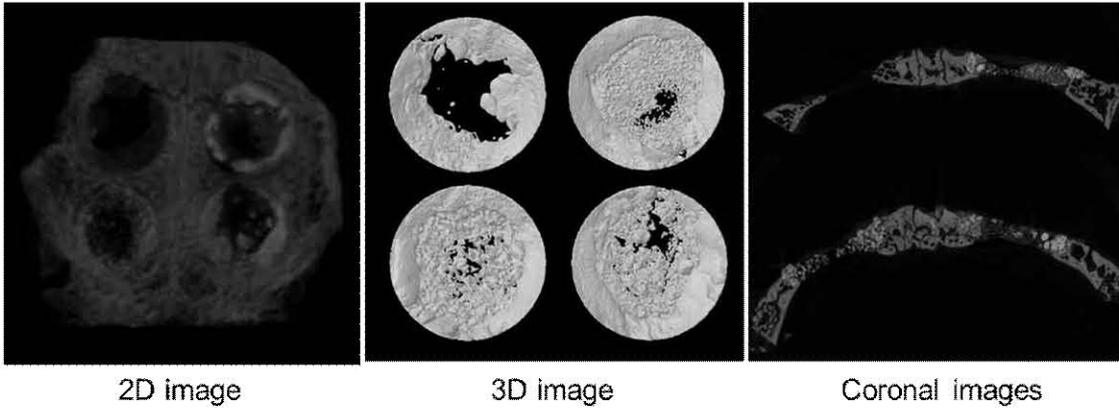
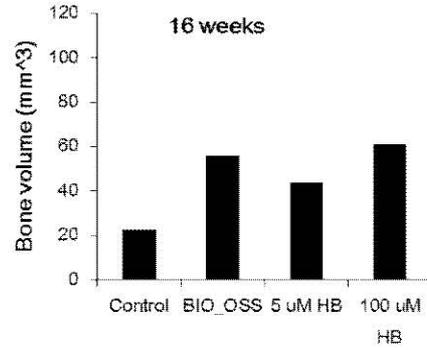
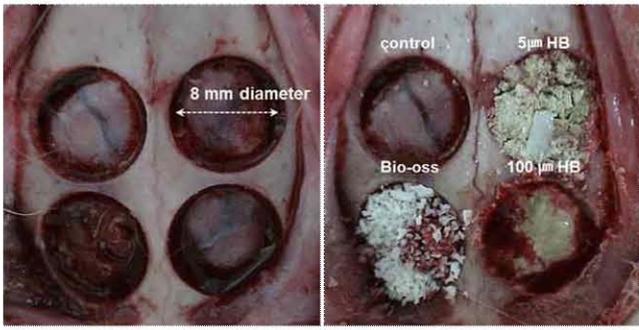


그림 2-71. Rabbit 5 Micro-CT 결과

- 그림 2-71은 8주차 토끼 5번의 Micro-CT 결과임. Micro-CT 분석 레퍼런스를 통해 확인한 결과 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위의 Bone volume은 71.8100 mm^3 으로 control 결손 부위의 Bone volume인 31.0848 mm^3 보다 Bone volume이 높게 나왔음. Bio-oss와 5 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위의 Bone volume은 각각 63.4224 mm^3 , 65.9857 mm^3 으로 서로 유사한 수치를 보였으며 Control 결손부위보다는 높았지만 100 μm size의 Bone volume보다는 낮은 수치를 보인 것을 확인할 수 있었음.

Surgery



Micro-CT analysis

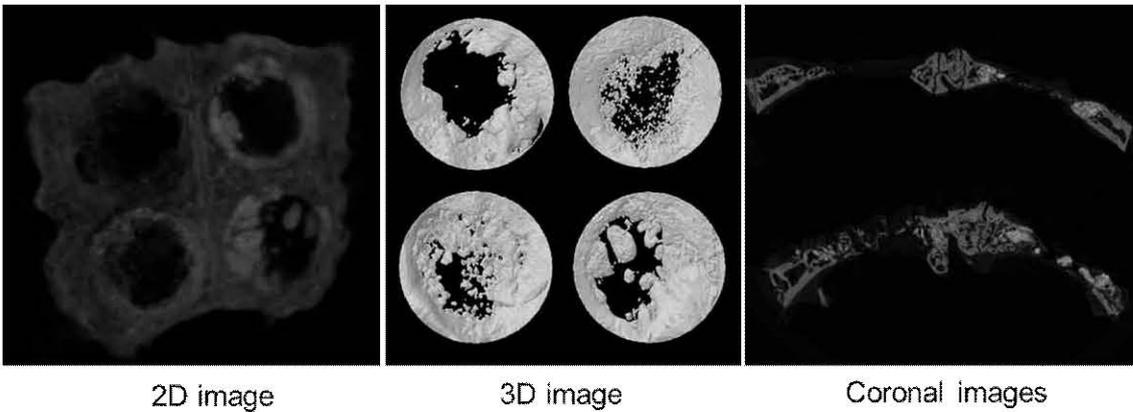
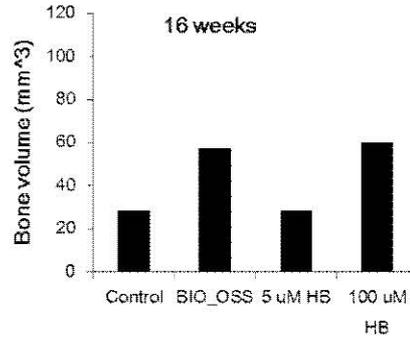
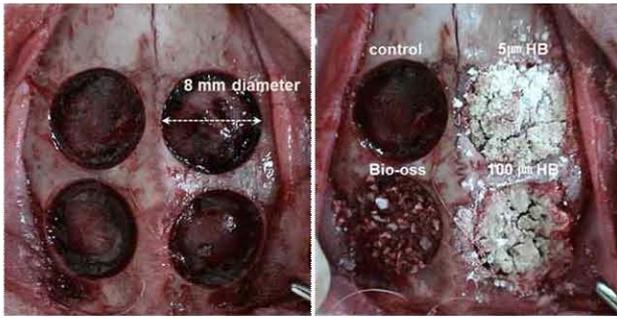


그림 2-72. Rabbit 6 Micro-CT 결과

- 그림 2-72은 16주차 토끼 6번의 Micro-CT 결과임. Micro-CT 분석 레퍼런스를 통해 확인한 결과 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위의 Bone volume은 61.1140 mm³ 으로 control 결손 부위의 Bone volume인 22.3082 mm³ 보다 Bone volume이 높게 나왔음. Bio-oss와 5 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위의 Bone volume은 각각 55.8240 mm³, 43.9257 mm³ 으로 Control 결손부위보다는 높음. Bio-oss는 100 μm size 말뚝 분말과 비슷한 수치의 bone volume을 보였지만 5 μm size의 말뚝 분말은 100 μm size의 Bone volume보다 낮은 수치를 보인 것을 확인할 수 있었음. 하지만 모든 결손 부위의 Bone volume은 8주차 결과들에 비해 증가하지 않거나, 감소한 수치를 보였음.

Surgery



Micro-CT analysis

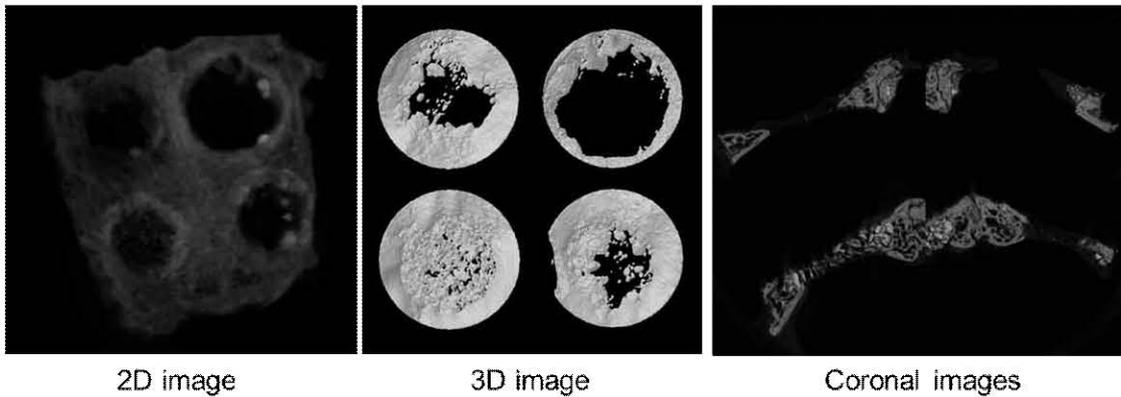
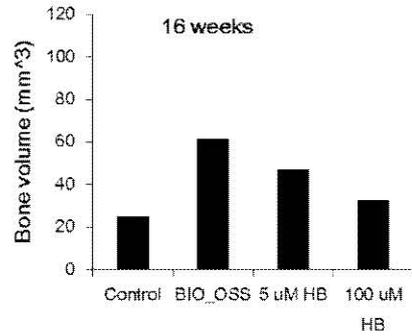
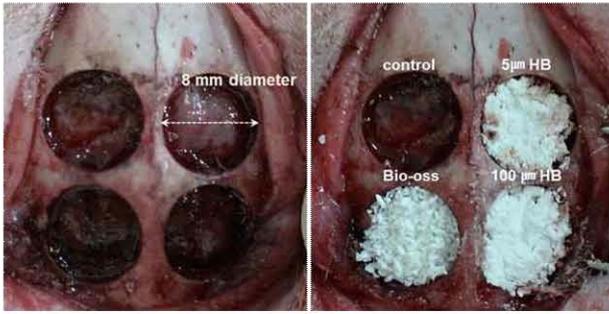


그림 2-73. Rabbi71 Micro-CT 결과

- 그림 2-73은 16 주차 토끼 7번의 Micro-CT 결과임. Micro-CT 분석 레퍼런스를 통해 확인한 결과 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위의 Bone volume은 60.1009 mm^3 으로 control 결손 부위의 Bone volume인 28.2598 mm^3 보다 Bone volume이 높게 나왔음. Bio-oss와 5 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위의 Bone volume은 각각 57.5125 mm^3 , 28.4794 mm^3 으로 Bio-oss는 Control 결손부위보다는 높았지만, 5 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위는 Control과 유사한 Bone volume을 보였음. Bio-oss는 100 μm size 말뚝 분말과 비슷한 수치의 bone volume을 보였음. 하지만 모든 결손부위의 Bone volume은 8주차 결과들에 비해 증가하지 않거나, 감소한 수치를 보였음.

Surgery



Micro-CT analysis

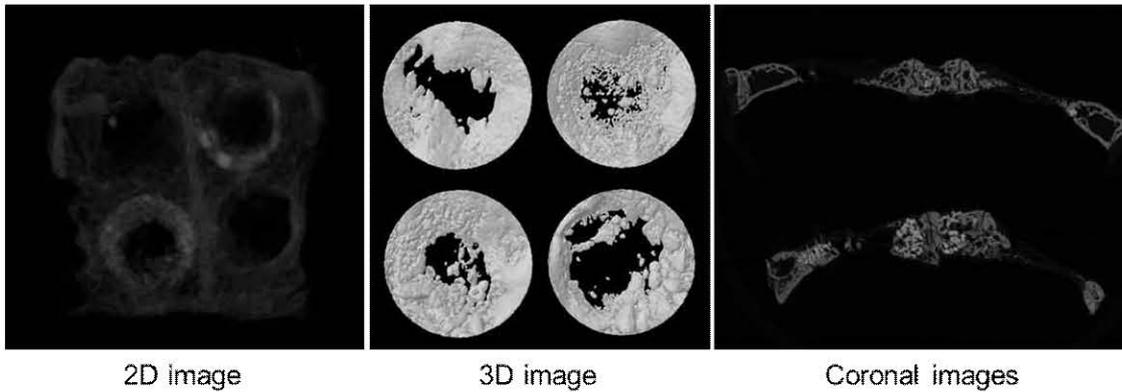
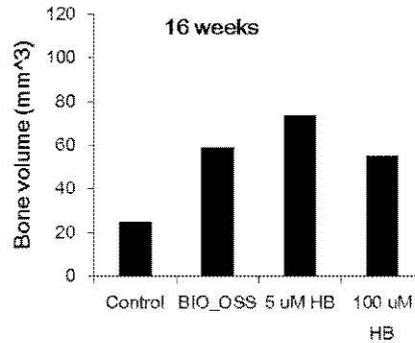
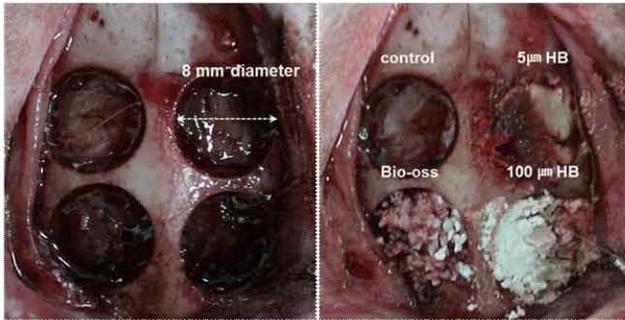


그림 2-74. Rabbit8 Micro-CT 결과

- 그림 2-74는 16주차 토끼 8번의 Micro-CT 결과임. Micro-CT 분석 레퍼런스를 통해 확인한 결과 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위의 Bone volume은 32.8926 mm^3 으로 control 결손 부위의 Bone volume인 25.1951 mm^3 보다 Bone volume이 높게 나왔음. Bio-oss와 5 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위의 Bone volume은 각각 61.8076 mm^3 , 47.1387 mm^3 으로 Control 결손부위보다는 높음. 토끼 8 번에서는 100 μm size 말뚝 분말을 넣은 결손부위의 결과가 Control보다 약간 높은 결과로서 다른 16주차 결과보다 낮은 수치의 Bone volume을 보였음. Bio-oss와 5 μm size의 말뚝 분말 결손부위의 Bone volume은 다른 토끼들과 비교했을 때 유사한 수치의 결과를 확인할 수 있었음. 하지만 모든 결손 부위의 Bone volume은 8 주차 결과들에 비해 증가하지 않거나, 감소한 수치를 보였음.

Surgery



Micro-CT analysis

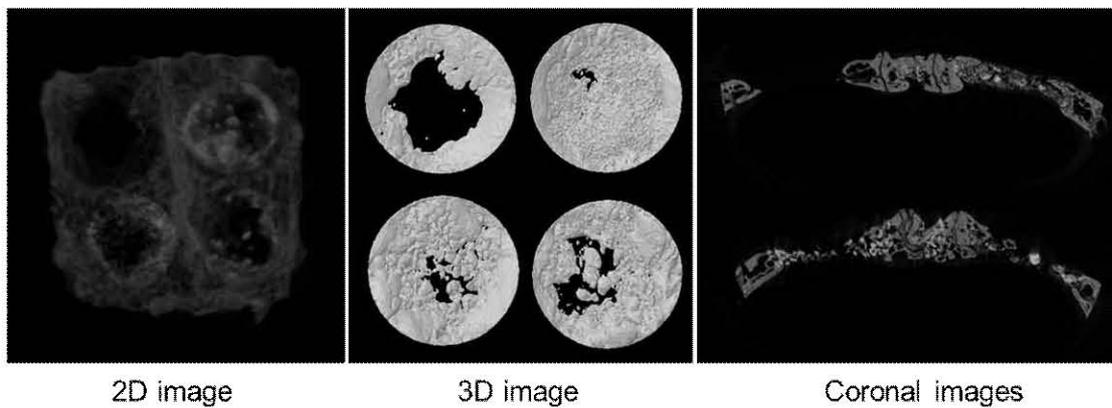
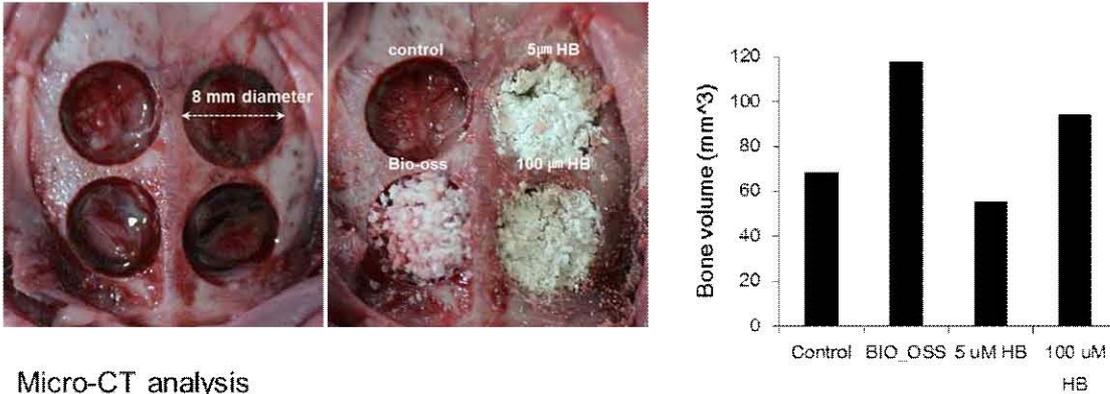


그림 2-75. Rabbit9 Micro-CT 결과

- 그림 2-75는 16 주차 토끼 9 번의 Micro-CT 결과임. Micro-CT 분석 레퍼런스를 통해 확인한 결과 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위의 Bone volume은 54.8613 mm^3 으로 control 결손 부위의 Bone volume인 24.8139 mm^3 보다 Bone volume이 높게 나왔음. Bio-oss와 5 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위의 Bone volume 또한 각각 59.1049 mm^3 , 73.5919 mm^3 으로 Control 결손부위보다는 높음. 토끼 9에서 5 μm 와 100 μm size의 말뚝 분말을 넣은 결손부위 모두 Control보다 높았고, 그 중 5 μm size의 Bone volume이 가장 높음. 하지만 모든 결손 부위의 Bone volume은 8주차 결과들에 비해 증가하지 않거나, 감소한 수치를 보였음.

Surgery



Micro-CT analysis

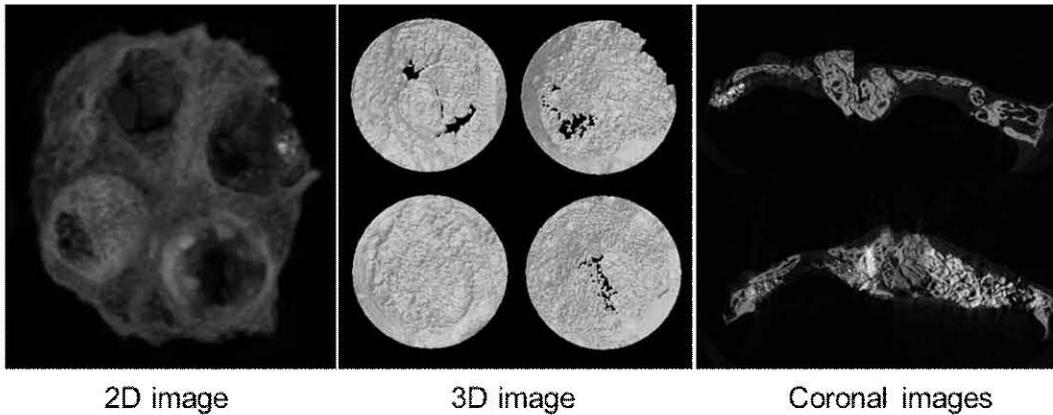
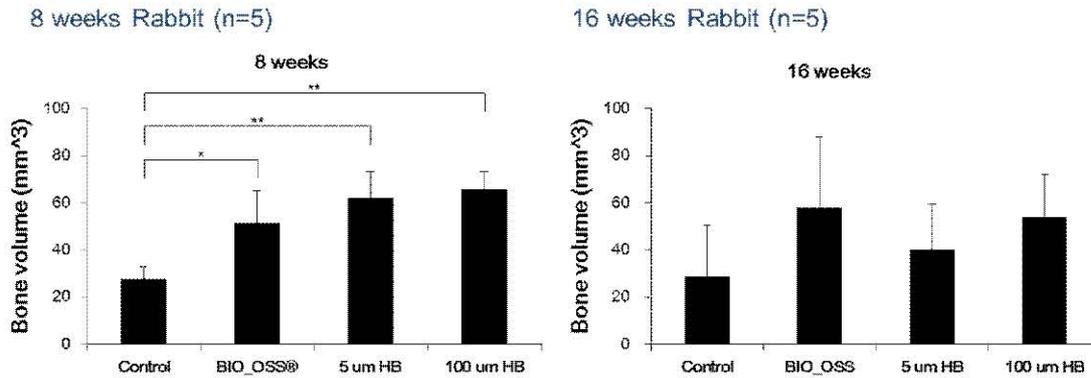


그림 2-76. Rabbit10 Micro-CT 결과

- 그림 2-76은 16 주차 토끼 10 번의 Micro-CT 결과임. Micro-CT 분석 래퍼런스를 통해 확인한 결과 100 µm size의 말뼈 분말을 넣은 결손부위의 Bone volume은 94.2630 mm³ 으로 control 결손 부위의 Bone volume인 68.5167 mm³ 보다 Bone volume이 높게 나왔음. Bio-oss와 5 µm size의 말뼈 분말을 넣어준 결손부위의 Bone volume 또한 각각 117.6901 mm³, 55.6064 mm³ 으로 Bio-oss는 Control 결손부위보다 높았지만, 5 µm size의 말뼈 분말을 넣어준 결손부위는 그렇지 않음. 또한, 말뼈 분말을 넣어준 결손부위 모두 Control보다는 높은 Bone volume을 보였지만 Bio-oss보다 낮은 결과를 보였음. 토끼 10 의 Bone volume은 다른 토끼들의 volume 수치보다 40~60가량 높은 volume 수치를 보였지만, 경향성은 유사하게 나왔음. 토끼 10에서 유일하게 8 주차 토끼들과 다르게 더 높아진 Bone volume을 확인할 수 있었음.



P value vs control, *p<0.05, **p<0.01 (Mann-whitney test)

	Rabbit 1	Rabbit 2	Rabbit 3	Rabbit 4	Rabbit 5	Rabbit 6	Rabbit 7	Rabbit 8	Rabbit 9	Rabbit 10	8 weeks	16 weeks
Control	25.40209	20.87061	34.40218	26.80098	31.08482	22.30823	28.25982	25.19519	24.81394	68.51676	27.71214	33.81879
BIO_OSS	42.87024	32.07088	54.85489	64.04923	63.42245	55.82406	57.51256	61.80767	59.10496	117.6901	51.45354	70.38788
5 um HB	54.8937	48.57421	77.68284	63.37886	65.96573	43.92578	28.47945	47.13877	73.59192	55.60648	62.09907	49.74848
100 um HB	59.01401	72.45081	69.40163	55.84193	71.81003	61.11406	60.10099	32.89261	54.86135	94.26301	65.70368	60.6464

그림 2-77. Rabbit 1~10 Micro-CT results.

- 그림 2-77의 Graph와 Table은 8 주차, 16 주차 토끼 Bone volume값과 평균값을 보여줌. 8 주차 Micro-CT 분석 결과, Bio-oss, 5, 100 μm size 말뼈 분말 모두 control 결손부위보다 Bone volume이 높음. 8 주차 분석 결과값의 평균값을 구했을 때, 5와 100 μm size의 말뼈 분말은 Bio-oss보다 더 높은 Bone volume을 보인다는 것을 유의성 있게 확인할 수 있었음. 또한 Coronal image들을 확인하였을 때, 5 μm size 말뼈 분말의 결손부위는 파우더의 입자들이 결손부위에 남아있는 것을 확인할 수 있는 반면, 100 μm size 말뼈 분말의 결손부위는 결손부위 안쪽으로 골이 재생되고 있음을 확인할 수 있다 (그림 6771). 16주차 Micro-CT 분석 결과, 말뼈 분말을 넣어준 결손부위가 Control 결손부위보다 Bone volume이 높게 나왔고, 특히 100 μm size 말뼈 분말을 넣어준 결손부위는 8주차와 유사한 경향을 보였음. 하지만 토끼 10을 제외한 나머지에서 Bone volume이 8주차보다 더 증가하지 않았으며, Coronal image를 보았을 때도 말뼈 분말을 넣어준 결손부위가 8주차에 비해 크게 안쪽으로 재생되지 않음. 결론적으로 sub-critical size의 골 결손에서 말뼈 분말과 Bio-oss 모두 control 결손부위보다 높은 Bone volume을 보였으나, 8주 이후에는 효과가 더 나타나지 않음을 확인할 수 있었음. 하지만 100 μm size의 말뼈 분말은 Bio-oss보다 더 효과적인 골재생을 유도하여 골재생체로서의 가능성을 확인할 수 있었음. 또한, 5 μm size의 말뼈 분말 또한 장기간 골결손 부위에 많은 양이 남아있는 것을 통해 다른 재료와 조합하여 골 대체재로서의 가능성을 확인할 수 있었음.

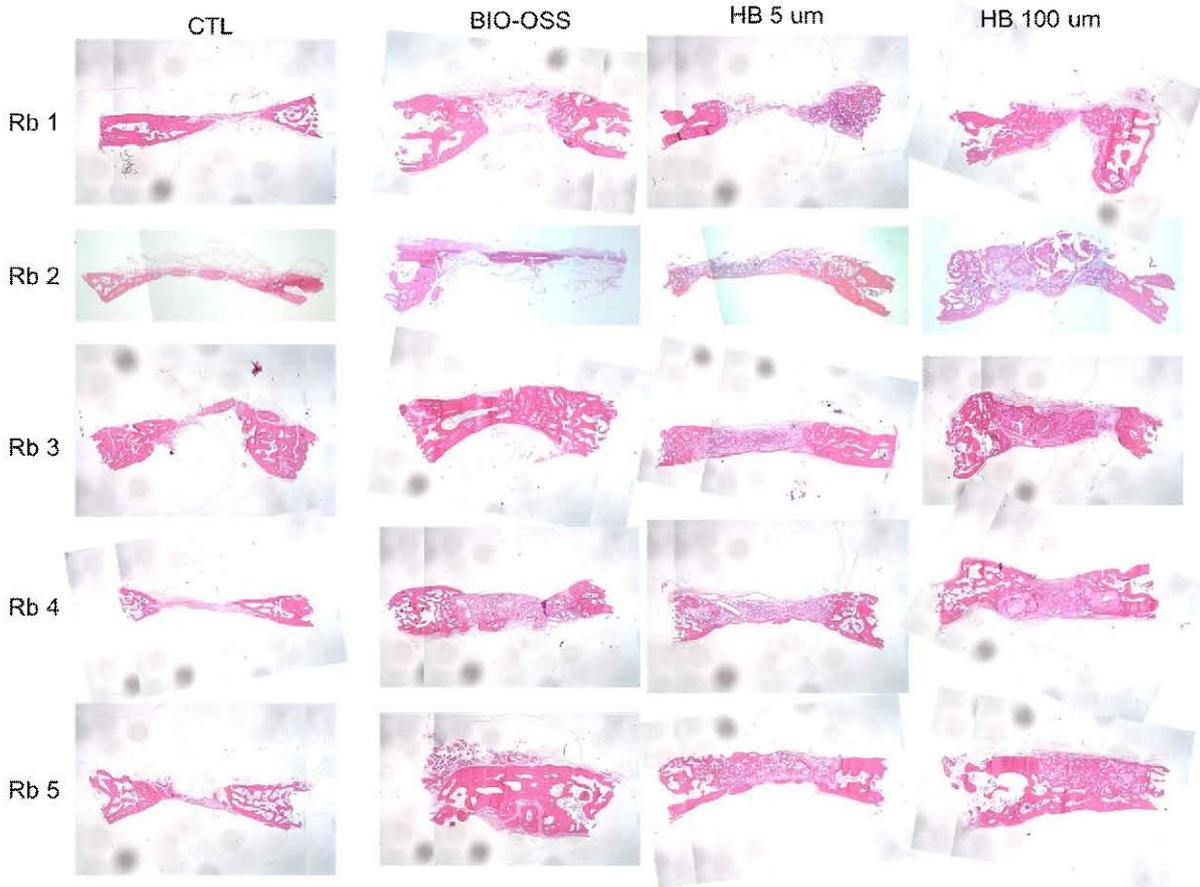


그림 2-78. 8 weeks H&E staining Results

- 그림 2-78은 8 주차 결손부위의 H&E staining 결과를 보여줌. Control 결손부위는 토끼 1~5 모두 양 끝쪽 부분에서 재생이 되었지만 가운데 부분은 Fibrotic 조직으로 거의 골재생이 되지 않았음을 보여줌. 5 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위는 토끼 5번을 제외하고 나머지 모든 토끼에서 Control 결손부위와 비슷한 수준의 H&E staining 정도를 보였음. 또한, 작은 size의 구멍들을 확인할 수 있는데, 말뚝 분말이 있었던 공간으로 보임. Bio-oss를 넣어준 결손부위는 토끼 3, 5에서 Control 결손부위보다 더 두껍고 더 진한 염색정도를 보여 Bone으로 재생되었음을 보여주지만 토끼 1, 2, 4에서 확인할 수 있듯이, control 결손부위와 마찬가지로 가운데부분까지 재생되지 않거나 제한적인 재생을 보였음. 100 μm size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위는 control 결손부위보다 더 두껍고 진한 색의 H&E staining 결과를 보여주어, 더 재생이 잘 되었음을 확인할 수 있었음. 각 토끼별로 비교하였을 때, 토끼 5를 제외하고 모든 토끼에서 100 μm size의 말뚝 분말을 넣어줬을 때, H&E staining이 더 진하게 나타나며, 골재생이 다른 결손부위보다 더 잘되었음을 확인할 수 있었음.

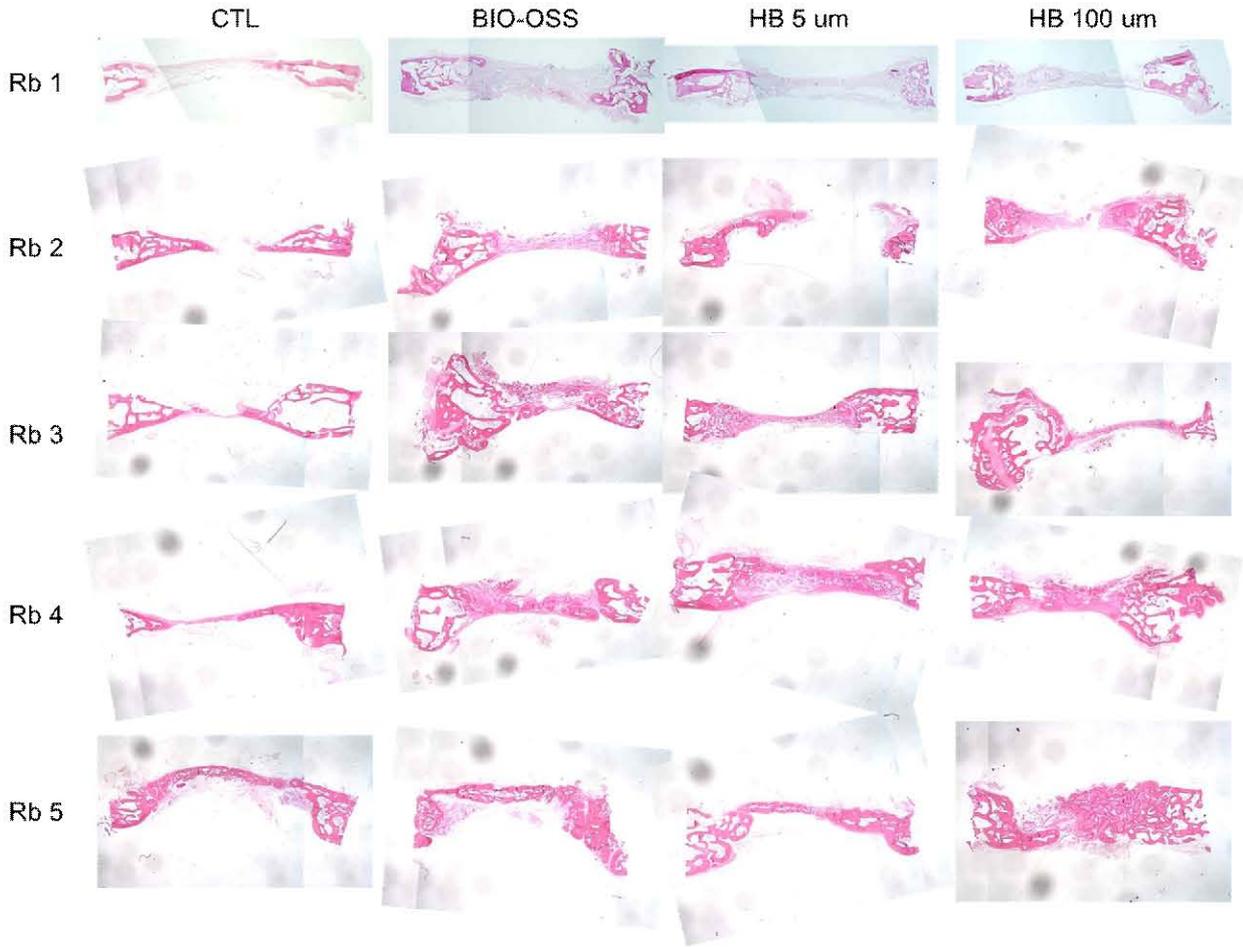


그림 2-79. 16 weeks H&E staining Results

- 그림 2-79는 16 주차 결손부위의 H&E staining 결과를 보여줌. Control 결손부위는 토끼 1~5 모두 양 끝쪽 부분에서 재생이 되었지만 가운데 부분은 Fibrotic 조직으로 거의 골재생이 되지 않았음을 보여 줌. 5 μ m size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위는 토끼 4번을 제외하고 나머지 모든 토끼에서 Control 결손부위와 비슷한 수준의 H&E staining 정도를 보였음. Bio-oss를 넣어준 결손부위는 Control 결손부위보다 더 두껍고 더 진한 염색 정도를 보여 Bone으로 재생되었음을 보여주지만 토끼 1, 2, 5에서 확인할 수 있듯이, control 결손부위와 마찬가지로 가운데부분까지 재생되지 않거나 제한적인 재생을 보였음. 100 μ m size의 말뚝 분말을 넣어준 결손부위는 control 결손부위보다 더 두껍고 진한 색의 H&E staining 결과를 보여주어, 더 재생이 잘 되었음을 확인할 수 있었음. 각 토끼별로 비교하였을 때, 토끼 3을 제외하고 모든 토끼에서 100 μ m size의 말뚝 분말을 넣어줬을 때, H&E staining이 더 진하게 나타나며, 골재생이 다른 결손부위보다 더 잘되었음을 확인할 수 있었음. 즉, 100 μ m size의 말뚝 분말은 Bio-oss나 5 μ m size의 말뚝 분말보다 효과적인 골재생 능력을 지니고 있음을 확인할 수 있었음.

4. 말뼉을 이용한 골대체재용 생체소재의 유효성 및 안전성 평가 및 제품화 방안

- 이식에 사용될 골 분말의 경우 평균입도크기 5 μm , 100 μm 를 갖는 백색의 분말의 형태를 갖음. 이 분말을 중 동물로 분류되는 비글견의 하악골에 이식하여 생체적합성과, 이식재의 성능을 평가하는데 사용하였음.

가. 말뼉 유래 골 분말과 인간줄기세포를 이용한 하악골재생을 위한 동물실험

① 실험목적

- Beagle dog mandible defect에 말뼉을 이용한 골 분말을 이식하여 골 재생을 확인함.
- Beagle dog mandible defect에 말뼉을 이용한 골분말과 serum-free 배지에서 키운 사람치아줄기세포를 함께 이식하였을 경우의 골재생을 확인하였음.

② 실험방법

- 세포배양군의 경우 사람치아줄기세포 중 치주인대줄기세포 (hPDLSCs) 를 serum-free 배지에서 배양한 뒤, 목표로 하는 세포 수에 이르면 트립신을 처리하여 획득함.

㉠ 마취방법

• 실험재료

- 마취약(3 ml)군의 경우 럼푼(1 ml), 졸레틸(1 ml), 아트로핀황산염주(1 ml)
- 진통제(도란진)군의 경우 한 마리당 1개(1 ml)
- 세파졸린주(항생제)군의 경우 1 ml

• 투입 순서

- 모든 실험군의 경우 마취약을 5 ml 투입하고 마취된 다음 진통제와 항생제를 각각 투입함. 투입 후 호흡을 확인하고 나서 마취약을 5 ml 마저 투입함 추가 마취할 때군의 경우 럼푼 (0.3 ml) 군의 경우 졸레틸 (0.7 ml) 군의 경우 아트로핀황산염주 (1 ml)의 비율로 만들어서 투입함.

㉡ 동물모델

- 동물군의 경우 beagle dog (나이군의 경우 6 개월, 성별군의 경우 수컷)
- Defect size
Depth 군의 경우 5 mm, Diameter군의 경우 6 mm, Interval군의 경우 10 mm
- 시술 부위군의 경우 하악(mandible) 오른쪽과 왼쪽의 두 부위 (그림 2-80)
- Sacrifice time군의 경우 6 주, 12 주

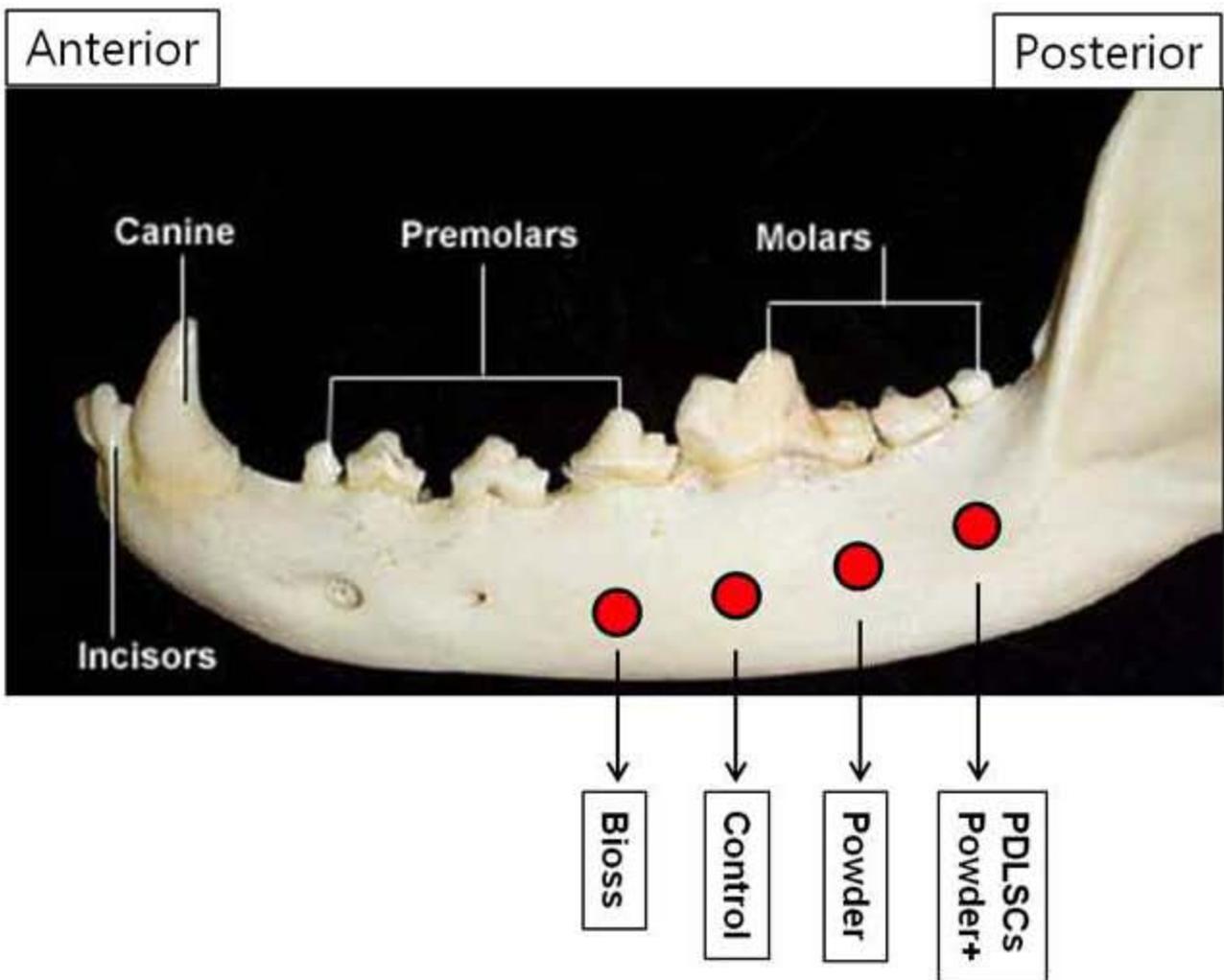


그림 2-80. 비글견 실험 디자인

⊕ 결과관찰

- Histologic processing and histomorphometry

- Micro-CT 스캐닝 이후, 에탄올을 이용하여 샘플을 탈수화 시킨 후, 레진 속에 침투시킴. 레진을 경화 시킨 후, 샘플을 30 μm 두께로 저름.
- 그 후 toluidine blue로 염색함. 염색 후 광학현미경을 통해 샘플을 관찰함. Image J (National Institute of Health)를 이용하여 뼈와 이식물의 넓이를 측정함.

- Histological procedures

- 하악골의 수확 후 주위 연조직을 제거한 시편은 2 일간 4% 포르말데하이드를 이용하여 고정함.
- 이후 10%의 ethylenedinitrilo-tetraacetic acide (EDTA)를 통하여 탈회과정을 거치고, 일련의 에탄올을 단계적으로 처리하여 탈수화 함.
- 마지막으로 파라핀으로 시편을 포메시키고 마이크로톰을 이용하여 절편을 제조하함.
- 절편에 Haematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하고 연이은 절편은 elastic-van Gieson (EVG) 골 조직을 검증함.

㉔ 결과의 해석

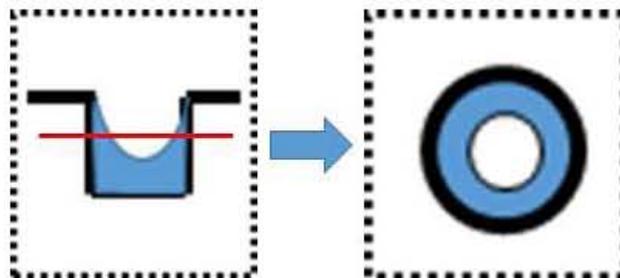


그림 2-81. 실험동물의 defect부위에서 골 재생 모식도 (좌측의 경우 cross-section, 우측의 경우 transverse)

- defect의 사이즈가 직경 6 mm에 깊이 5 mm의 원통형이고 그 안에 분말을 채운 것이기 때문에, 그림 2-81의 좌측 그림과 같은 형태로 골 재생이 일어남. 본 동물 시험의 경우 그림 2-81의 우측 그림과 같이 샘플링 되어 있으므로 하방에 더 많은 골 재생이 일어났음을 알 수 있음.
- 세포 없이 powder를 넣은 동물실험에서의 골 재생의 해석은 defect 경계면부위에서 powder 주변으로 골생성 여부를 판단함. 따라서 powder부터 powder의 테두리부분을 해석하고, 이후 defect 중심부의 powder 주변의 테두리를 살펴보았음. 단순히 defect 경계면에 신생골이

침착되는 것은 모든 샘플에서 정상적으로 당연히 일어날 수 있는 현상이기 때문에, powder에 의한 골재생효과를 확인하기 위해 다양한 상황을 고려해야 하였음. defect경계면 근처에 powder가 보이지 않는다면 powder가 해당시기에 녹아서 보이지 않는 것인지 국소적으로 powder가 이식되지 않았는지 파악했음.

- PDLSCs 세포와 powder를 넣은 군의 해석은 PDLSCs는 기본적으로 bone과 cementum-PDL 을 모두 형성할 수 있는 세포이기 때문에, 본 실험 디자인에서는 세포 유무에 따른 차이만 고려하여 해석함.



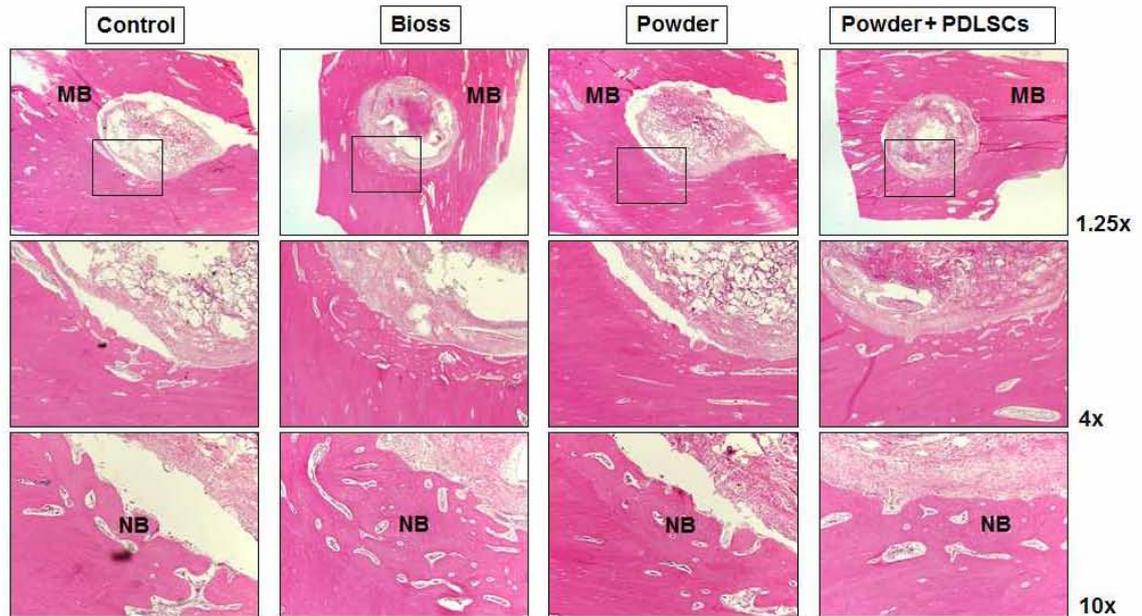
그림 2-82. 비글견 샘플의 제작

③ 실험결과

- 이식한 달팽이래 골 분말 mandible defect에서 골재생을 유도할 수 있는지를 확인함.
- 이식한 달팽이래 골 분말 시중에 판매되고 있는 Bio-Oss 간의 골재생 효과에 차이를 규명함.
- 달팽이래 골 분말 serum-free 배지에서 키운 사람줄기세포를 같이 이식을 하였을 때

mandible defect 에서의 골재생 효과를 살펴유래 본 파우더만 이식하였을 때와 비교함.

#1 Rt 6주

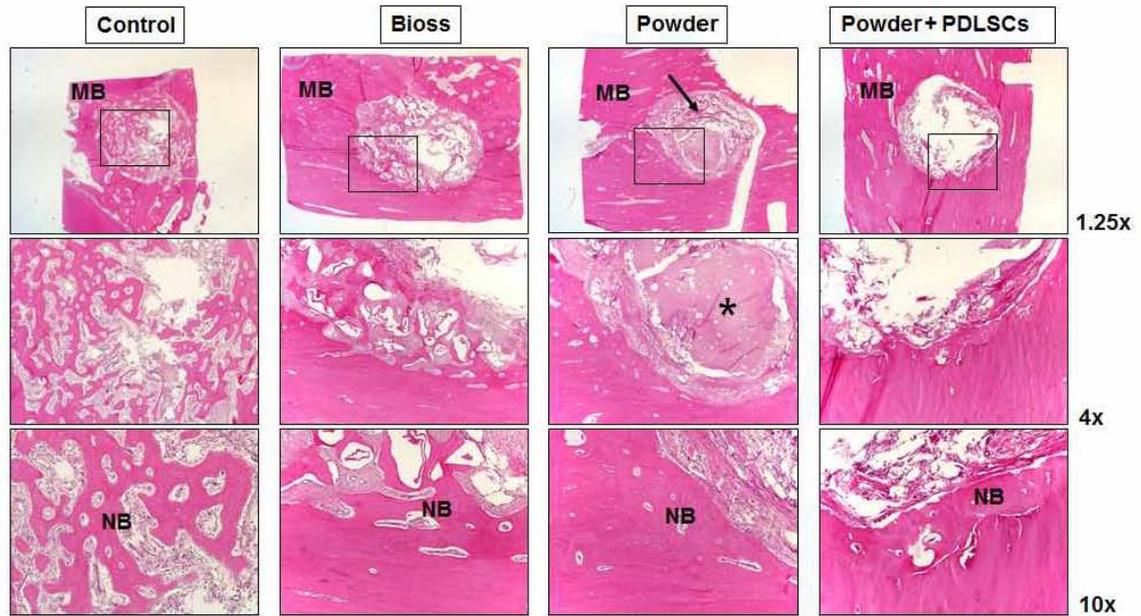


NB: new bone
MB: Mandible bone

그림 2-83. 6주차 비글견의 조직염색 결과

- Control군의 경우 defect 경계에서 신생골이 조금 차 들어왔음.
- Bio-Oss군의 경우 defect 경계에서 신생골이 control보다는 좀더 차 들어온듯 보이나, Bio-Oss particle이 관찰되지 않는 점을 감안해야함. 저배율에서 defect 중간쯤에 골이 약간 생긴듯한 소견이 보임.
- Powder군의 경우 defect 경계에서 신생골이 조금 차 들어왔음. Defect core부위에서는 powder가 관찰됨.
- P+PDLSCs군의 경우 powder 군과 유사한데 보다 더 dense fibrous tissue 가 많이 형성되었음. (PDL-like cell이라 할 수는 있을 것 같음)
- 아직 6주라 많은 골이 재생되지 않았음을 고려해야 할듯함. 명확한 차이를 논하기 어려움.

#1 Lf 6주



NB: new bone
MB: Mandible bone

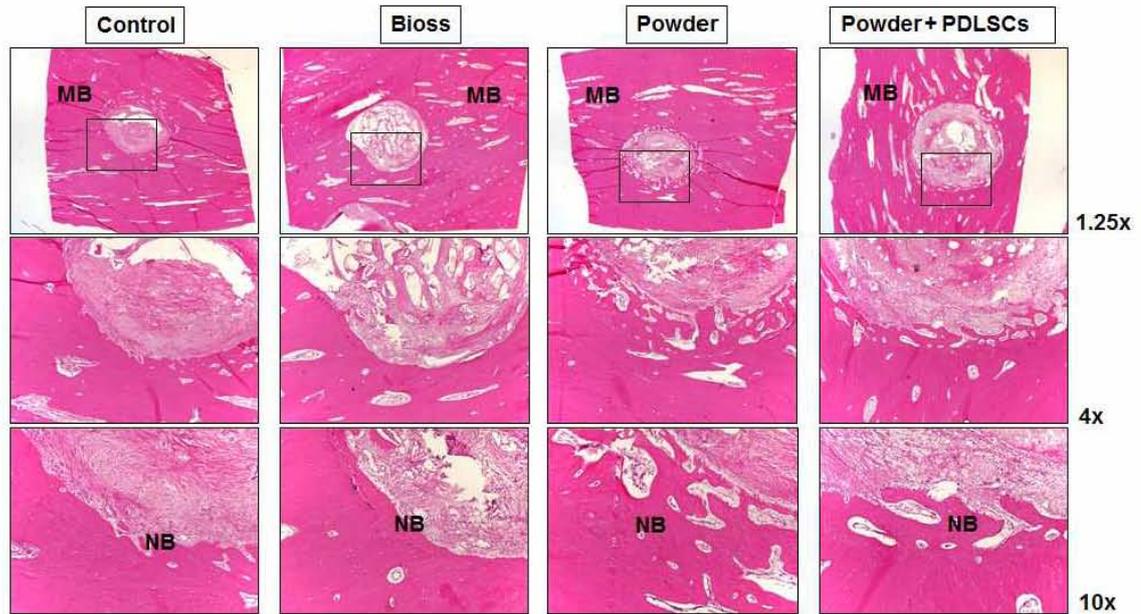
그림 2-84. 6주차 비골전의 조직염색 결과

- Control군의 경우 전반적으로 골 형성이 뛰어났음.
- Bio-Oss군의 경우 defect 경계에서 Bio-Oss particle 주변으로 골이 약간 자라들어옴.
- Powder군의 경우 defect 경계에서 신생골이 조금 차 들어왔음. 저배율에서 powder 주변에 골이 약간 생긴 듯한 소견이 보임 (화살표 부위). Defect core부위에 dense한 fibrous tissue 와 함께 powder와 연관된 것으로 판단되는 무정형의 기질 (amorphous matrix)의 형성이 관찰되나 (* 표 부위) 골형성이 될 기질이라고 확인하기는 어려움.
- P+PDLSCs군의 경우 defect 경계에서 신생골이 조금 차 들어왔으며 역시 앞선 군과 유사하게 dense fibrous tissue 가 많이 형성되었음.

- Bio-Oss군과 powder군 모두에서 골이 약간씩 형성되었다고 판단됨. Bio-Oss군보다 powder군에서 골형성을 위한 matrix들이 비교적 다수 형성되었음이 추정됨.

- 6주차 시험군이므로 차후 추이를 지켜봐야 함.

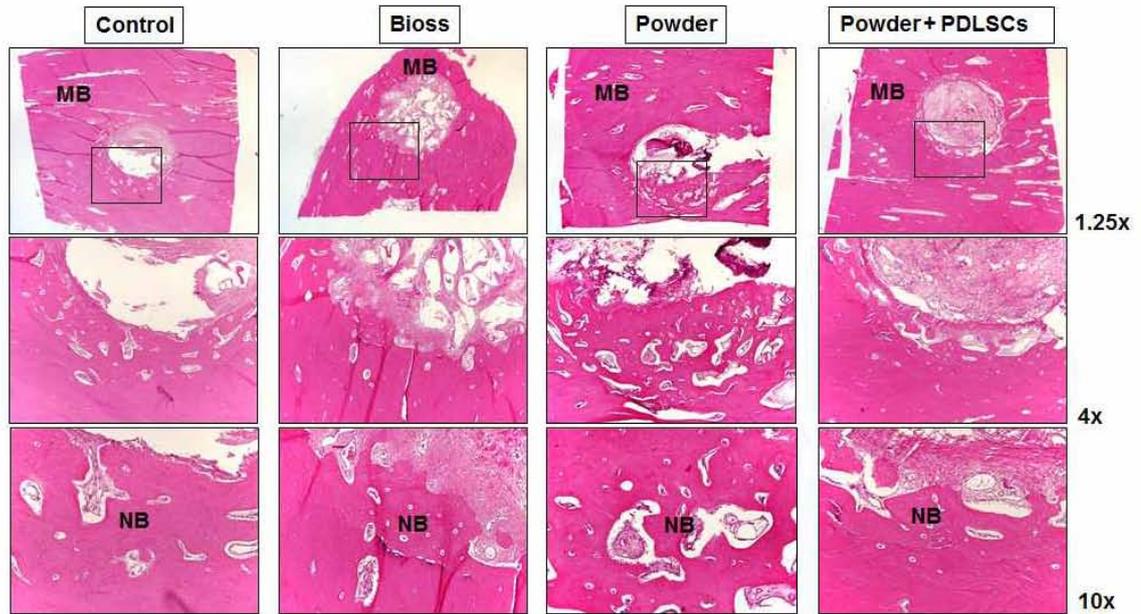
#2 Rt 6주



NB: new bone
MB: Mandible bone

그림 2-85. 6주차 비골견의 조직염색 결과

- Control군의 경우 defect 경계에서 신생골이 조금 차 들어왔음.
- Bio-Oss군의 경우 저배율에서 보면 Bio-Oss particle 주변으로 골이 어느정도 생긴 것을 볼 수 있음. 또한 골형성을 위한 기질 matrix와 collagen 등의 deposition이 어느정도 관찰되는듯함.
- Powder군의 경우 defect 경계에서 신생골이 제법 차 들어왔음. powder에 의하여 골형성이 되었을 가능성이 존재함. 또한 골형성을 위한 기질 matrix와 collagen 등의 deposition이 상당부분 관찰되는듯함.
- P+PDLSCs군의 경우 powder군과 유사한데, defect core부위에 powder와 관련된 것으로 보이는 무정형의 기질(amorphous matrix) 형성이 관찰됨. 골형성이 될 기질일 가능성이 높음.
- Bio-Oss군과 powder군 모두에서 골이 약간씩 형성되었다고 판단되고, Bio-Oss군보다 powder군에서 defect경계부분에서 신생골의 형성이 비교적 많은 결과를 보임. Powder + PDLSCs군에 대해서는 아직까지 눈에 띄는 차이는 발견되지 않음.

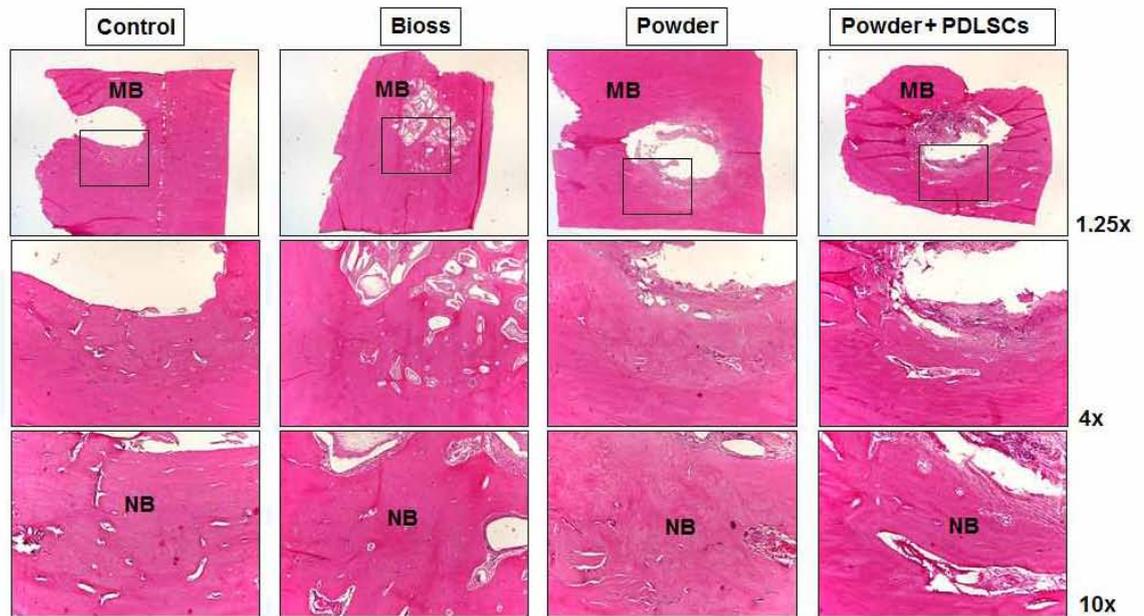


NB: new bone
MB: Mandible bone

그림 2-86. 6주차 비골건의 조직염색 결과

- Control군의 경우 defect 경계에서 신생골이 제법 차 들어왔음.
- Bio-Oss군의 경우 저배율에서 보면 Bio-Oss particle 주변으로 신생골이 아주 미세하게 형성되었음을 관찰 할 수 있음.
- Powder군의 경우 defect 경계에서 신생골이 다른군에 비해 비교적 많이 형성되어 들어왔으며, 형성된 골 기질 안에 powder가 존재하므로 powder와 관련하여 골형성이 일어난 것으로 보임. Powder가 녹아서 골로 치환되었을 가능성도 존재함.
- P+PDLSCs군의 경우 powder 군과 유사한 결과를 보임. defect core부위에 powder와 연관되었을 가능성이 높은 기질의 형성이 관찰되며, 차후 골형성이 일어날 기질일 수 있음. 앞선 군과 유사하게 dense fibrous tissue 가 많이 형성되었음.
- 결론적으로, Bio-Oss군보다 powder군에서 defect경계부분에서 신생골의 형성이 비교적 활발한 것으로 관찰됨. 세포가 들어간 군은 아직까지 큰 차이가 발견되지 않았음.

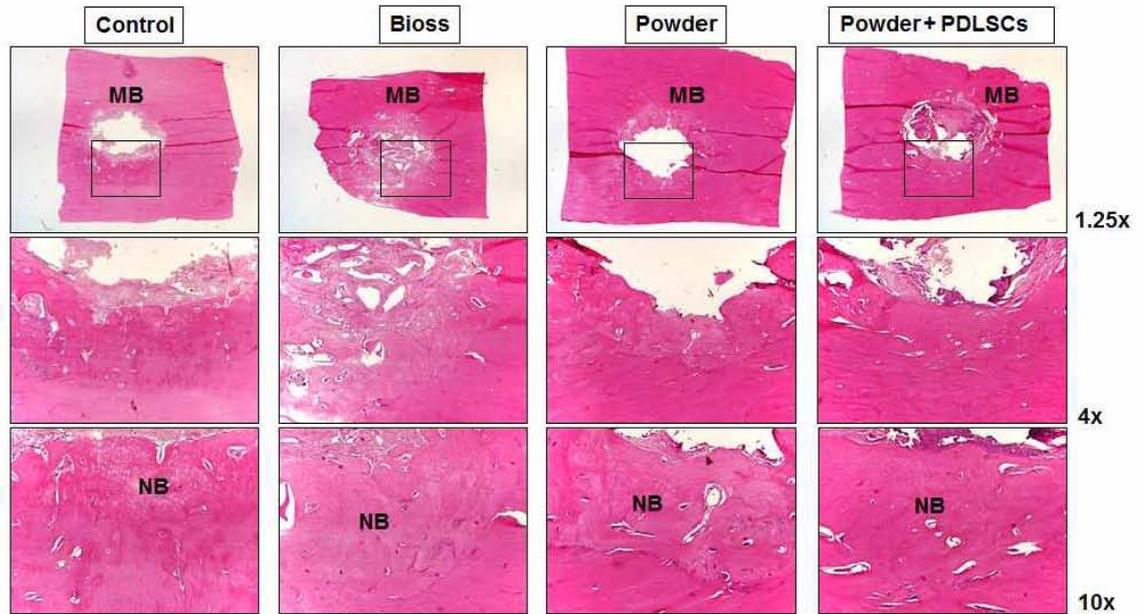
#3 Rt 14주



NB: new bone
MB: Mandible bone

그림 2-87. 14주차 비글견의 조직염색 결과

- Control군의 경우 defect 경계에서 신생골이 형성되었음. 결손의 중심 부분까지 연조직이 상당부분 자라났을 가능성이 높으나, 샘플 제작과정에서 소실된 것으로 판단됨.
 - Bio-Oss군의 경우 defect 경계부터 신생골이 전반적으로 Bio-Oss particle 주변 모두에서 상당히 많이 형성된 것을 볼 수 있음.
 - Powder군의 경우 defect 경계에서 신생골이 제법 차 들어왔으나 중심부분이 불분명함.
 - P+PDLSCs군의 경우 powder 군과 유사한 결과가 관찰됨.
-
- 6주에 비해 전반적으로 골형성이 많이 되었음. Bio-Oss군은 전반적으로 골재생이 잘 되었으나 powder군과 세포를 넣은 군에서는 중심 부분의 해석이 불가.

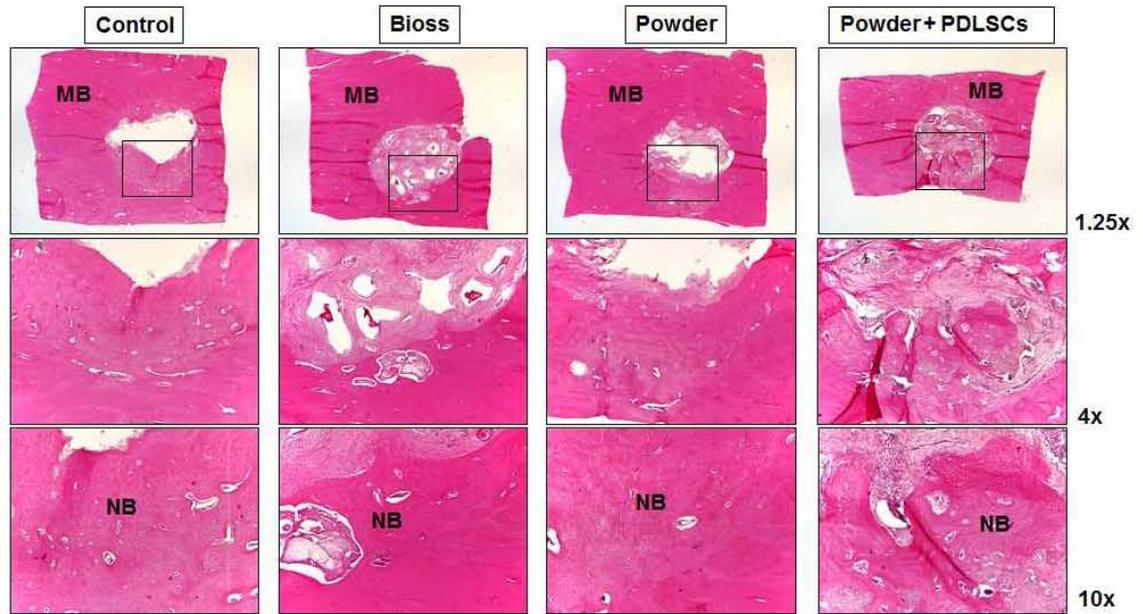


NB: new bone
MB: Mandible bone

그림 2-88. 14주차 비글견의 조직염색 결과

- Control군의 경우 defect 경계에서 신생골이 제법 차 들어왔음. Core부분은 아마도 연조직이 자라들어왔는데 제작과정에서 소실된 듯함.
- Bio-Oss군의 경우 defect 경계부터 신생골이 제법 차 들어왔고, 전반적으로 Bio-Oss particle 주변으로 그림 2-87 슬라이드보다는 다소 골이 덜 형성된 것을 볼 수 있음.
- Powder군의 경우 defect 경계에서 신생골이 제법 차 들어왔으나 core부분이 불분명하며 아마도 연조직부분인데 제작과정에서 소실된 것으로 판단됨. Powder가 거의 보이지 않음.
- P+PDLSCs군의 경우 powder 군과 유사함.
- 전반적으로 그림 2-87과 유사한 결과를 보임.

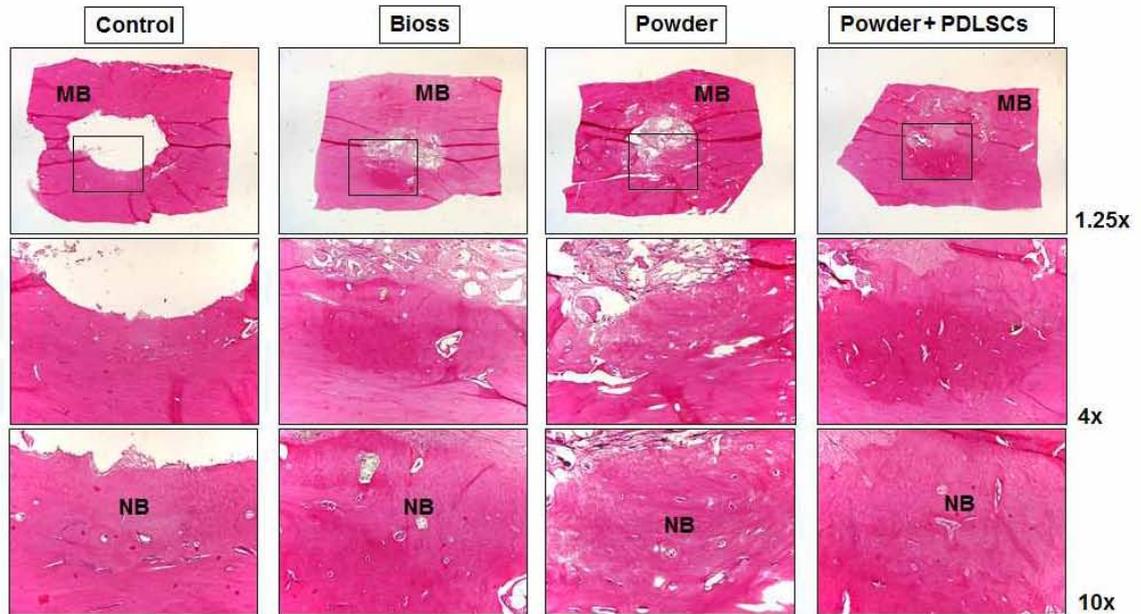
#4 Rt 14주



NB: new bone
MB: Mandible bone

그림 2-89. 14주차 비글견의 조직염색 결과

- Control군의 경우 defect 경계에서 신생골이 제법 차 들어왔음. Core부분은 아마도 연조직이 자라들어왔는데 제작과정에서 소실된 듯 함.
- Bio-Oss군의 경우 defect 경계부터 신생골이 제법 차 들어왔고, 전반적으로 Bio-Oss particle 주변으로 Control 슬라이드보다는 다소 골이 덜 형성된 사진을 수 있음.
- Powder군의 경우 defect 경계에서 신생골이 제법 차 들어왔으나 core부분이 불분명하며 아마도 연조직부분인데 제작과정에서 소실된 것으로 보임. Powder가 거의 보이지 않음.
- P+PDLSCs군의 경우 powder 군과 유사하지만, 상대적으로 dense fibrous tissue 가 많이 형성되었음.
- 그림 2-87과 유사한 결과를 보이는 것으로 관찰됨.



NB: new bone
MB: Mandible bone

그림 2-90. 14주차 비글견의 조직염색 결과

- Control군의 경우 defect 경계에서 신생골의 형성이 상당부분 발견됨. 중심 부분은 연조직이 형성이 예상되나 제작과정에서 소실되었을 가능성이 보임.
- Bio-Oss군의 경우 defect 경계부터 다수의 신생골 생성이 관찰되었고, 결손의 중방부까지는 앞선 두 그림의 결과 보다는 골생성이 적게 발견됨.
- Powder군의 경우 defect 경계에서 신생골이 상당히 생성된 결과를 보여주었으며, Bio-Oss군과 유사한 정도로 골재생됨.
- P+PDLSCs군의 경우 전반적으로 신생골이 가득 형성되었음.
- Bio-Oss군과 powder군 모두에서 유사한 정도의 골재생 효과를 보였고, 세포가 들어간 군에서는 골이 상당히 많이 형성된 것이 관찰되었음.

④ 동물실험 결과의 종합적 해석

- Control vs 골분말이식군에 대해서는 Control 보다 Powder군에서 골재생/형성능이 좋다고 판단됨.
- Bio-Oss군 vs Powder군의 경우에는 6 주의 샘플에서는 Powder군이 Bio-Oss군보다 신생골의 형성이 뛰어난 결과를 보였으나, 14주차의 실험군에서는 결손 중앙부분이 불분명한 샘플이 있어, Powder군과 Bio-Oss군의 회복 능력은 비슷한 정도를 가지는 것으로 판단됨.
- 결론적으로 확실히 “Positive control인 Bio-Oss군과 비교하여 Powder군에서도 골이

비슷한 정도로 잘 형성된다” 평가가 가능함. 비교적 골형성의 초기에 해당하는 6주차 실험의 경우 Powder군에서 조금 더 많은 골 형성이 일어나는 것으로 미루어 초기 골 재생에 골분말이 효과가 있음을 알 수 있음.

- Powder군 vs Powder + PDLSCs군의 비교는 다음과 같음. 세포를 같이 이식한 실험군의 경우 그림 5-10의 실험군에서 신생골의 형성이 결손부의 전체에 걸쳐있는 결과를 보여 줌. 골 재생 치료효과를 증진시킬 수 있는 가능성이 보이는 결과임.

나. 말뚝유래 골분말 시멘트와 그래핀(Reduced Graphene Oxide, RGO)의 혼합물의 동물실험.

- 그래핀의 골분화 유도능과 Calcium Phosphate Chitosan Composite(CPCC)의 기계적 강도 증대 능력에 관심을 가짐. 본 실험에서는 그래핀을 함유한 골 이식재의 골 형성 증진에 초점을 두어 동물 실험을 진행하였음.
- 제작된 골 이식재의 응용활용을 위해 최근 신물질로 각광 받고 있는 그래핀과 골 이식재와의 혼합물을 동물 모델에 적용함.

㉞ CPCC-Graphene 만을 랫드에 두개골에 이식하여 골재생에 미치는 영향을 관찰

- 본 실험은 골 이식재에 그래핀을 혼합하여 골 재생 능력을 확인하였음.

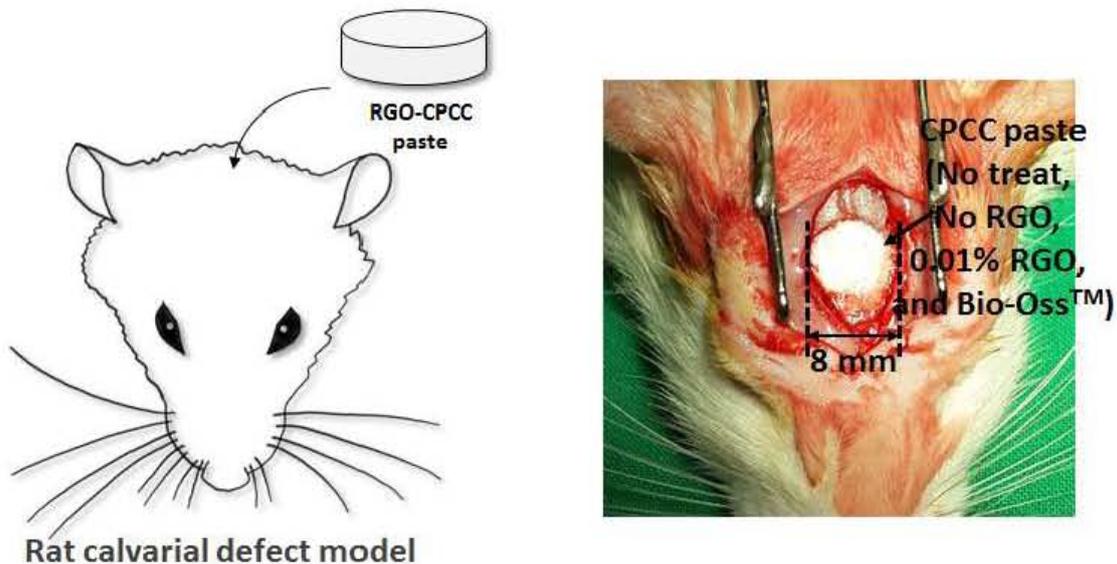


그림2-91. 동물실험 디자인

- 실험에 사용된 동물은 8 주된 랫드이며, 실험동물은 다음과 같은 순서로 제작되었다. 마취제 (Zoletil, virbac Co.) 랫드를 전신 마취한 후 두개골 부위를 소독함.
- 랫드의 두개골 정중부의 털을 제거하여 감염을 방지하였고, 이후 메스를 이용하여 두피를 절개함. 또

한 골막을 메스로 절제한 뒤, self-retainer를 이용하여 두개골을 노출 시켰다.

- 생리식염수를 두개골 부위에 관주하면서 리머 (Reamer drill)를 이용하여 뇌가 손상되지 않도록 두개골 두정골에 원형으로 지름 8 mm의 결손을 생성시켰음.
- 결손부위를 빈 곳으로 두고 봉합한 군을 Control군으로 설정하고, 파우더만 이식한 군은 No RGO, 파우더에 RGO가 질량비로 0.01% 섞인 실험군을 0.01% RGO, 마지막으로 Bio-oss 군과의 비교 실험을 진행하였음.

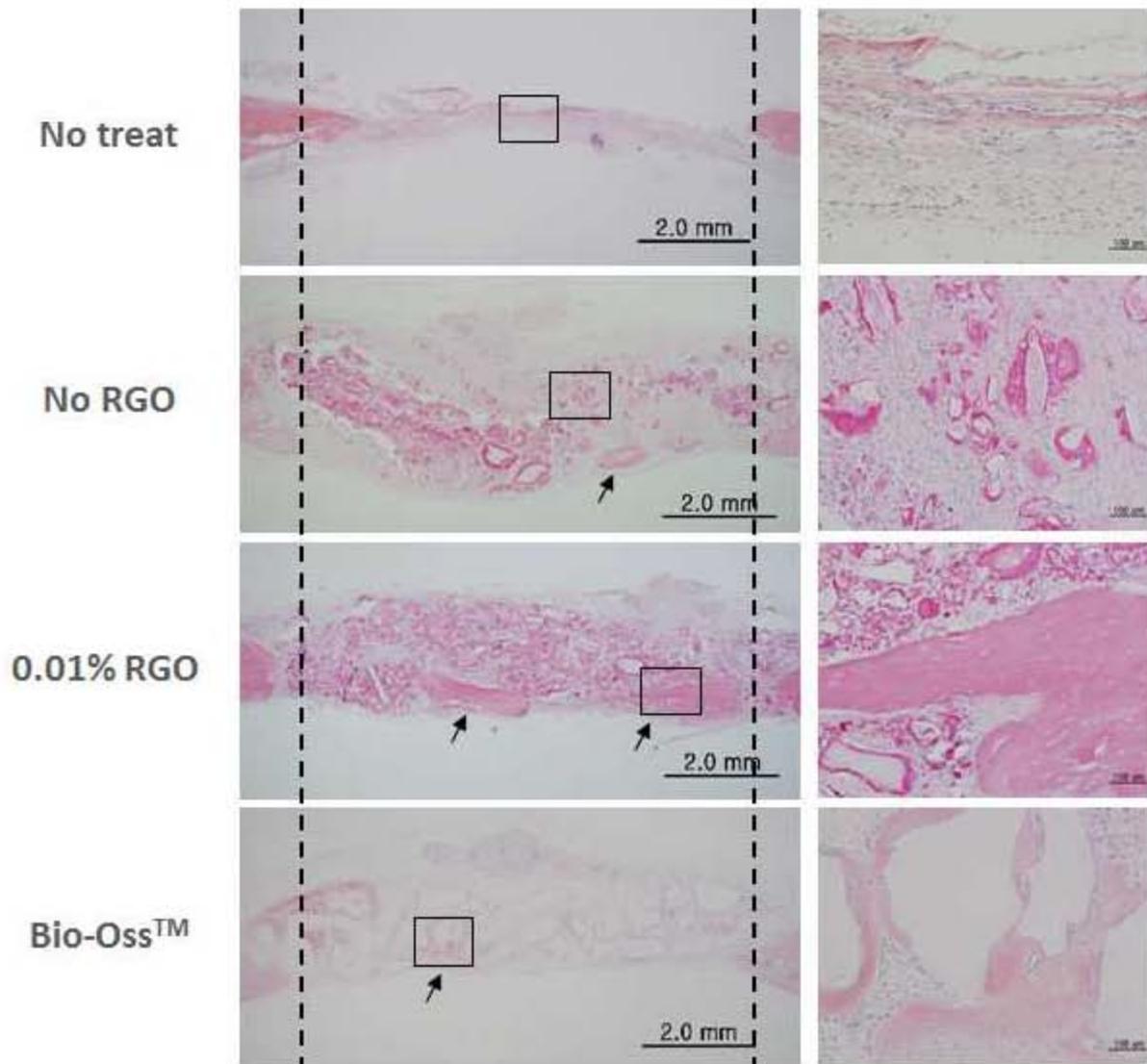


그림 2-92. RGO가 함유된 골이식제를 적용한 랫드의 조직염색 결과 사진.

- 그림 2-92는 랫드의 6 주차 두개골의 cross-section 조직염색 결과임. 사진에서 검은색 사각형 부위에 있는 결과를 확대하였음. 옅은 적색으로 보이는 부위가 연조직 부위이며, 흰색으로 염색되지 않은 부위는 골 이식제로 보임.

- 그림 2-92에 따르면 0.01%의 RGO를 섞은 실험군에서 가장 많은 골 재생이 일어난 것으로 관찰되었음.

㉔ CPCC-Graphene 혼합물에 인간유래 줄기세포를 혼합하여 신생 골 재생 능력을 확인함

- 그래핀이 함유된 골 이식체의 골유도 능력을 시험하기 위하여 골 이식체를 disk 형태로 만든 뒤 그 위에 인간 치조골 유래 줄기세포(hABMSCs)를 시딩하여 마우스의 피하에 이식함.

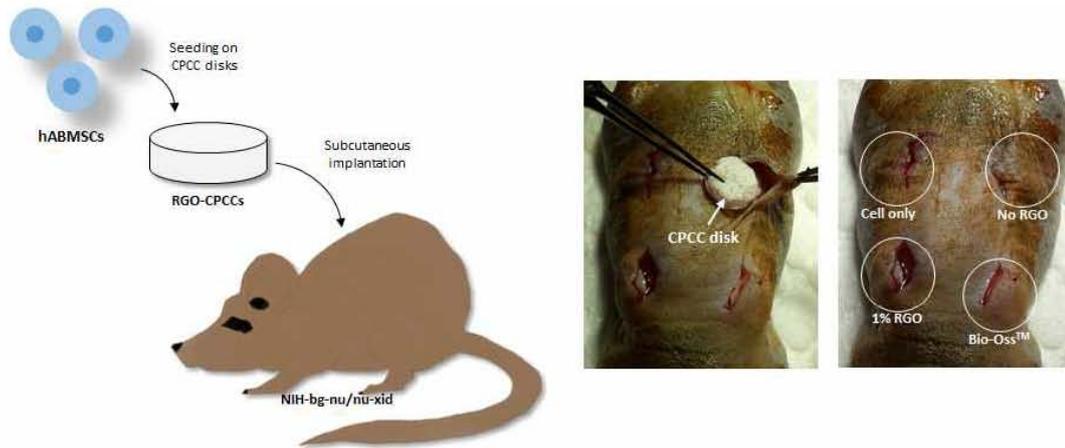


그림 2-93. 줄기세포와 골이식체를 이식한 쥐의 골 형성 실험 모식도

- 본 실험은 그림 2-93과 같은 순서로 진행됨. 마우스의 피하에 줄기세포와 함께 골이식체를 이식하게 되면 골 이식체 위에서의 줄기세포 분화를 확인할 수 있음. 또한 분화된 줄기세포에 의한 신생골 재생을 관찰할 수 있음.

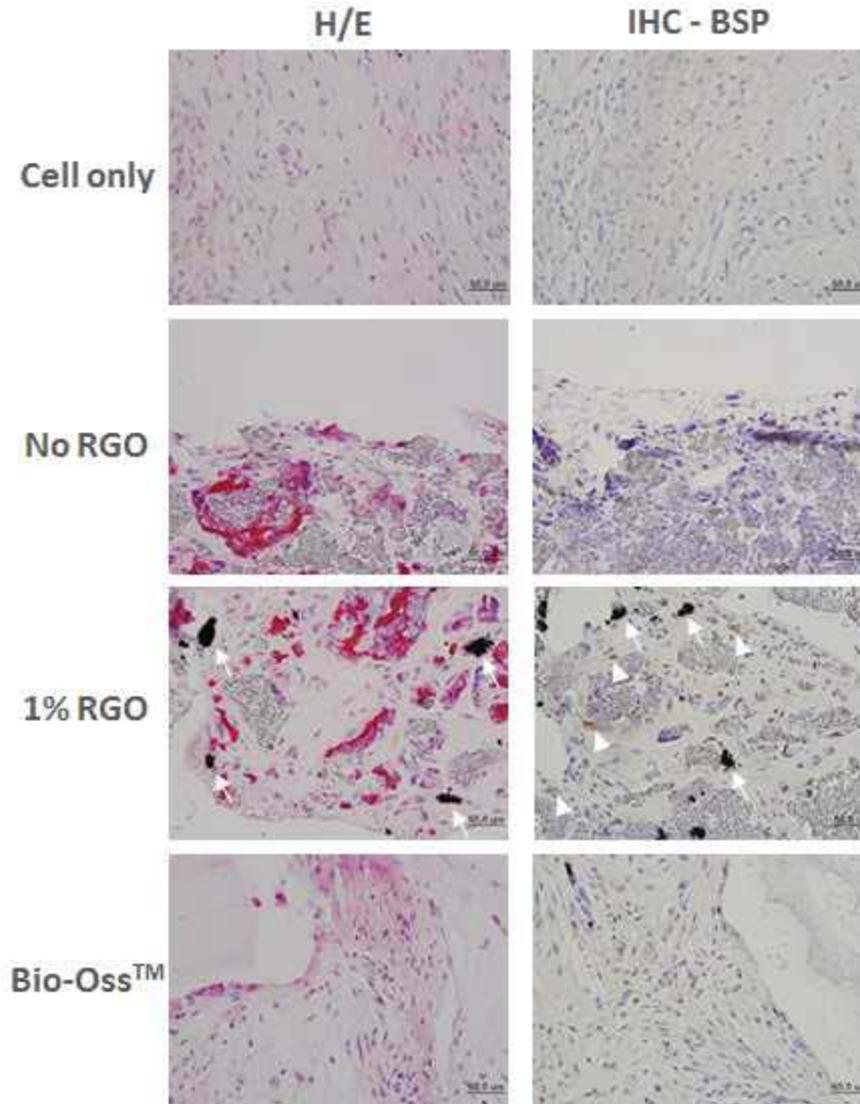


그림 2-94. CPOC-Graphene 혼합물과 줄기세포를 이식한 시험군의 조직염색 결과

- 그림 2-94의 결과에 따르면 줄기세포(인간유래치조골줄기세포)만 적용한 시험군에서는 새로운 조직이 형성되지 않음이 확인 됨.
- H/E 염색 사진 상 진한 붉은 색이 신생 골이 형성된 부분임. Bio-oss에서는 신생골 형성이 거의 되지 않은 결과를 보임. 반면 CPOC와 CPOC-Graphene에서 높은 신생골 형성 결과를 보임. 1% RGO의 화살표 부분은 함유된 그래핀이 관찰된 것으로 보임.
- 결론적으로 Graphene을 혼합한 시험군의 골 재생이 활발하게 일어나는 것으로 결정할 수 있음.

5. 말뚝을 이용한 굴대체제용 생체소재의 생산 설비 개발

가. 생산 설비의 기계화 계획

- 말뚝의 부산물(유기물 및 골)을 이용하기 위하여 유기물과 잔류하고 있는 바이러스성 병원균 등의 물질이 완전히 제거되어야 함. 효율적인 공정을 위하여 아래의 그림과 같은 기계화 공정을 계획함.

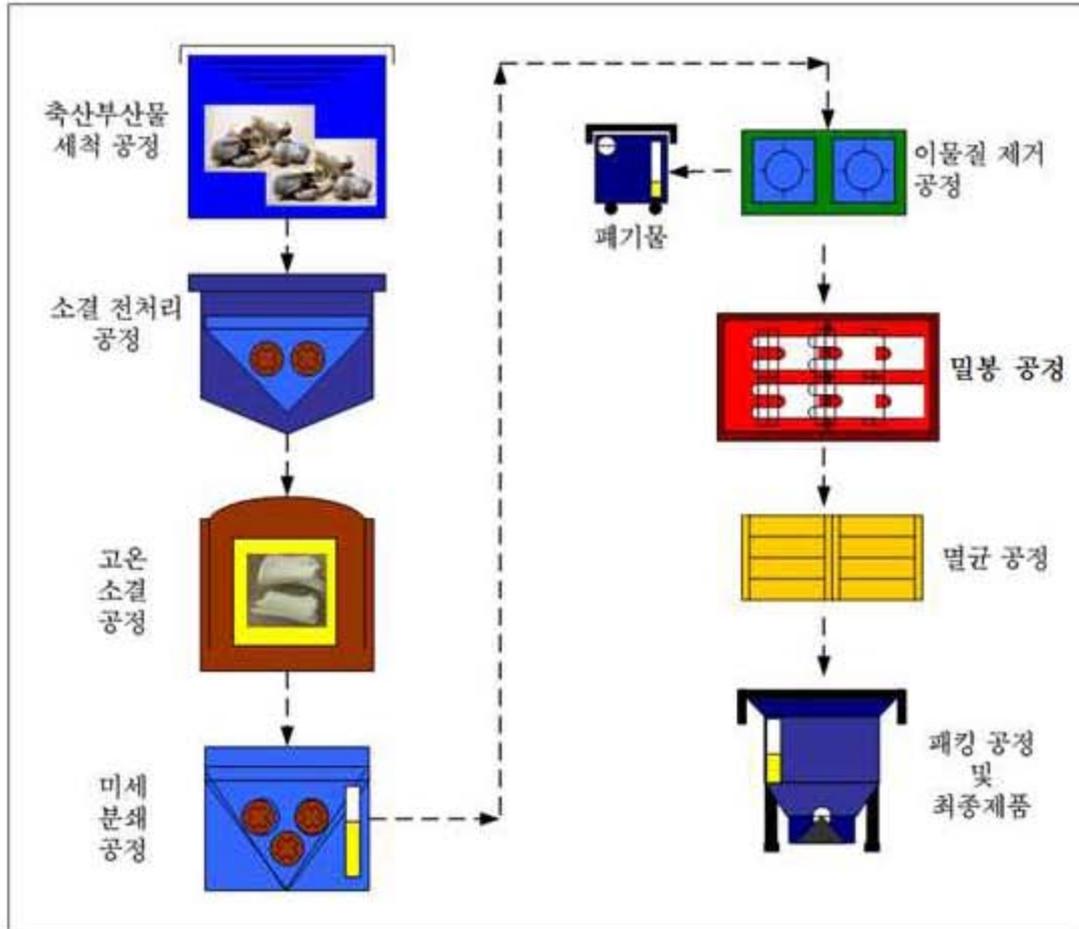


그림 2-95. 말뚝을 이용한 생체소재의 제조공정 흐름도

- 말뚝의 무기물 부분만 이용하기 위하여, 원재료를 염기성 용액에 24시간 침지시켜 염기성 용액에 녹는 유기물 및 잔존 물질을 제거함.
- 고온의 소결을 거치기 전, 조분쇄 하여 3 mm 이하의 입도를 가지는 분말을 제작함.
- 조분쇄를 통해 제작된 분말을 전기로에 넣고 900℃이상의 온도로 유기물이 완전히 제거될 때까지 열처리를 해줌.

- 소결된 골 분말을 150 μm 의 입도를 가지도록 분쇄함. 이후, 고에너지 볼밀(High energy ball mill)을 통하여 원하는 초미세 입도로 분쇄함.
- 분쇄가 완료된 분말에서 바이오세라믹 이외의 금속류·SUS 이물질을 제거할 선별과정을 거침.
- 골 분말을 멸균하기 위해 바이얼에 일정량의 골분말을 넣고 밀봉처리 함.
- 생체소재의 체내 적용을 위해서 감마선 조사법을 통하여 골 분말을 최종 멸균함.

나. 생체소재 제조공정의 기계화

- 골 분말의 소결 및 분쇄 공정에 사용되는 장비를 설정함.

(가) 분쇄기

- 골 분말의 입도의 크기를 조절하기 위해 공기 유도식 분쇄기(Air Leading Grinding Machin, ALG-2, Tiwan)가 사용되었다.



Model	Motor(HP)	Capacity (KG/HR)	Dimension (L*W*H mm)	Weight(KG)
ALG-2	2	1~4	300*250*450	14

그림 2-96. Air Leading Grinding Machine

- 습식 밀링 실험을 진행하기 위해 Ball mill (모델 PL-BM5L, Korea)이 사용되었다. 내부 용량

500 ml 갖는 원통 내에 지르코니아 볼 (NIKKATO, Japan)과 소결된 골 분말을 혼합하여 작동시켰다.

Model	Motor(W)	Capacity (ml)	Dimension (L*W*H mm)	Weight(kg)
PL-BM5L	50	1000	630*490*300	15

그림 2-97. 볼밀 사양

- 원료 분말의 초미세 분쇄를 위해 고에너지볼밀(High energy ball mill, spec, Germany)이 사용되었다. 고에너지 볼밀 내부의 용기가 자전하는 동시에 궤도를 돌며 편심이 발생하게 되는데, 이때 용기 내부에 들어있는 지르코니아 볼과 분말이 충돌하며 그 에너지로 분말의 분쇄가 이루어진다.



그림 2-98. Planetary Mono Mill PULVERISETTE 6 classic line(독일, Fritsch)

(나) 전기소결로



그림 2-99. 전기로

- 그림 2-99에 본 공정에서 사용한 전기로의 사진을 보임. 본전기로는 1400℃까지 온도를 올릴 수 있으며, 본 공정에서는 1200-1300℃의 온도에서 안정적으로 온도를 유지시키는 것을 확인할 수 있었음.

(다) 기타 후처리 공정에 사용되는 장비

- EO 가스 멸균기: Ethylene oxide gas 를 사용하여 병원균 및 미생물을 제거하는 화학적 멸균기임. 본 연구에서 제작된 파우더를 EO가스 처리하여 멸균시킴.



그림 2-100. Ethylene oxide (EO) gas sterilizer

- 바이알 실링기 (Vial cap sealing machine): 바이알 전용 알루미늄 캡 실링 타입임. 말뚝 생체소재 분말을 바이알에 넣은 후 밀봉 시키는데 사용함.

6. 시제품의 물리화학적 성질 및 생물학적 안전에 대한 보고서

가. 생물학적 안전성에 관한 보고서

(1) 말뚝 유래 폴리식재의 세포독성 시험

▣ 시험방법

- 1) 지름 5 cm Petri dish 9개에 NCTC Clone 929(ATCC CLC-1) 세포를 5% CO₂, 37°C incubator에서 24시간 이상 배양한 후 80% 정도 monolayer 형성을 확인 한다.
- 2) 배지를 제거한 뒤 한천용액(2.0%)과 배지(2X MEM)를 섞어 5 ㎖을 중층하고 양성대조군(3 회), 음성대조군(3회), 실험군(3회)을 각 배양용기에 올려놓는다.
- 3) 한천평판을 5% CO₂, 37°C incubator에서 24 시간 배양한 뒤 0.02% neutral red 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하고 세포등급을 측정한다.

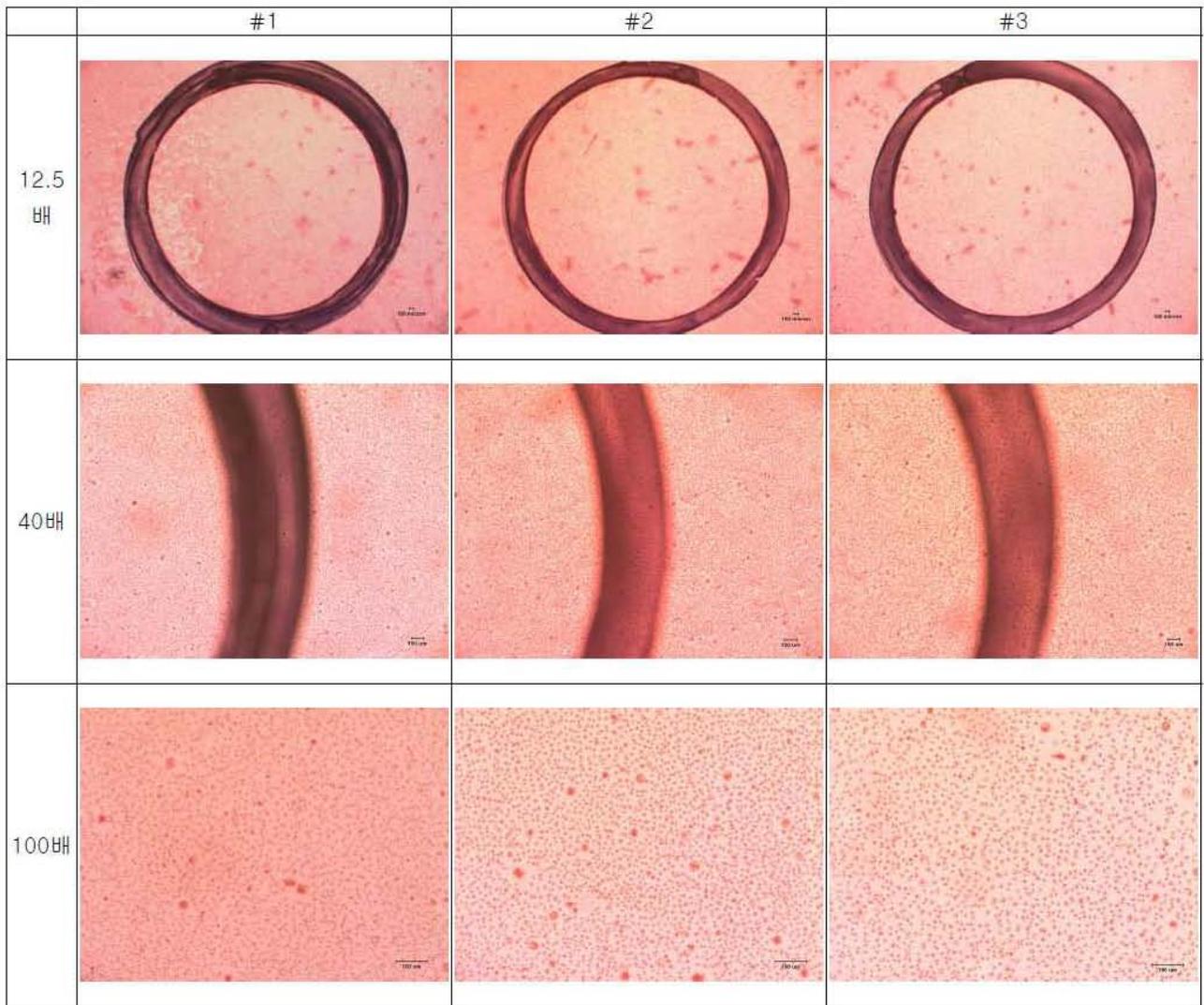


그림 2-101. 음성대조군의 세포독성 시험결과

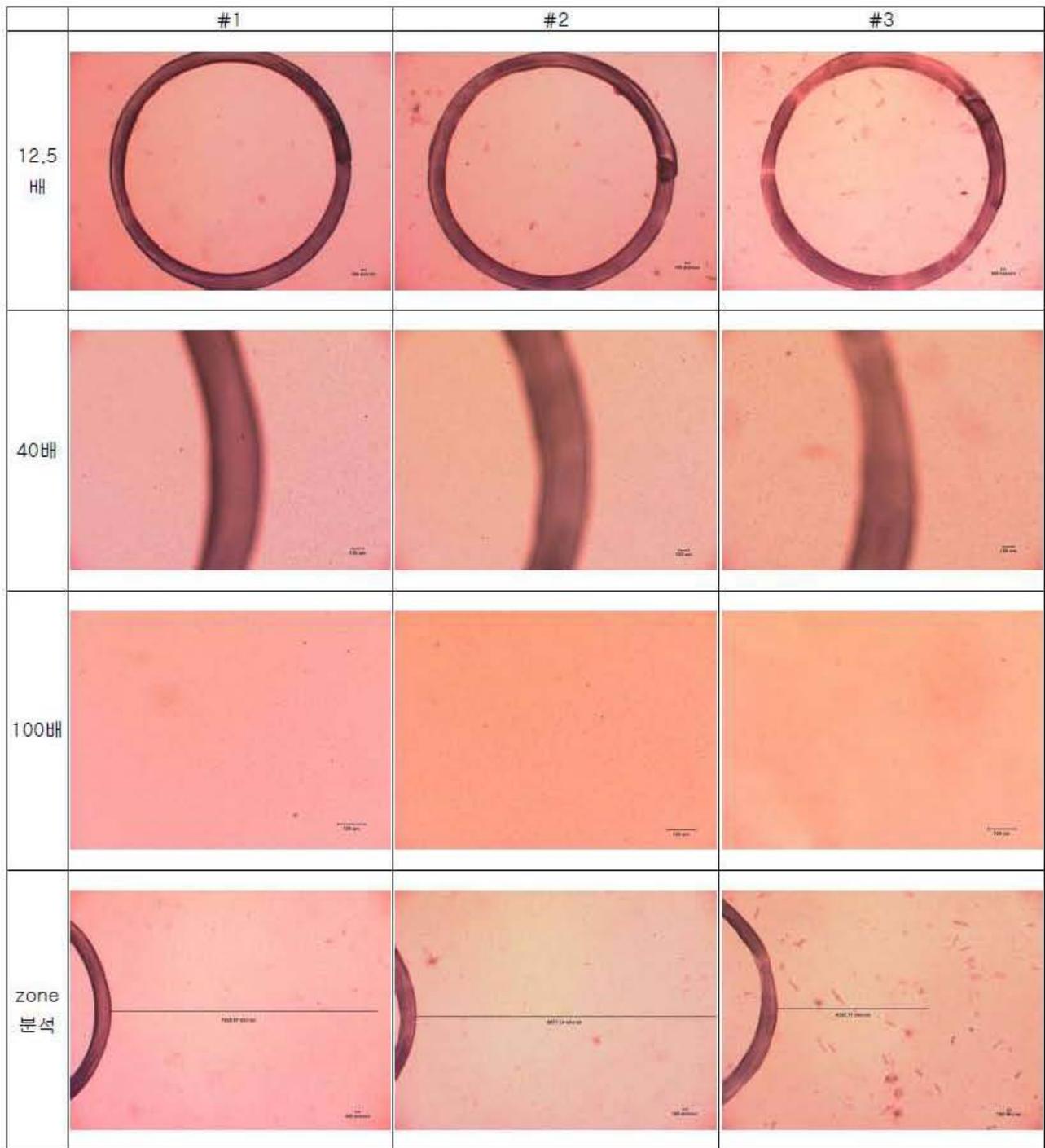


그림 2-102. 양성대조군의 세포독성 시험 결과

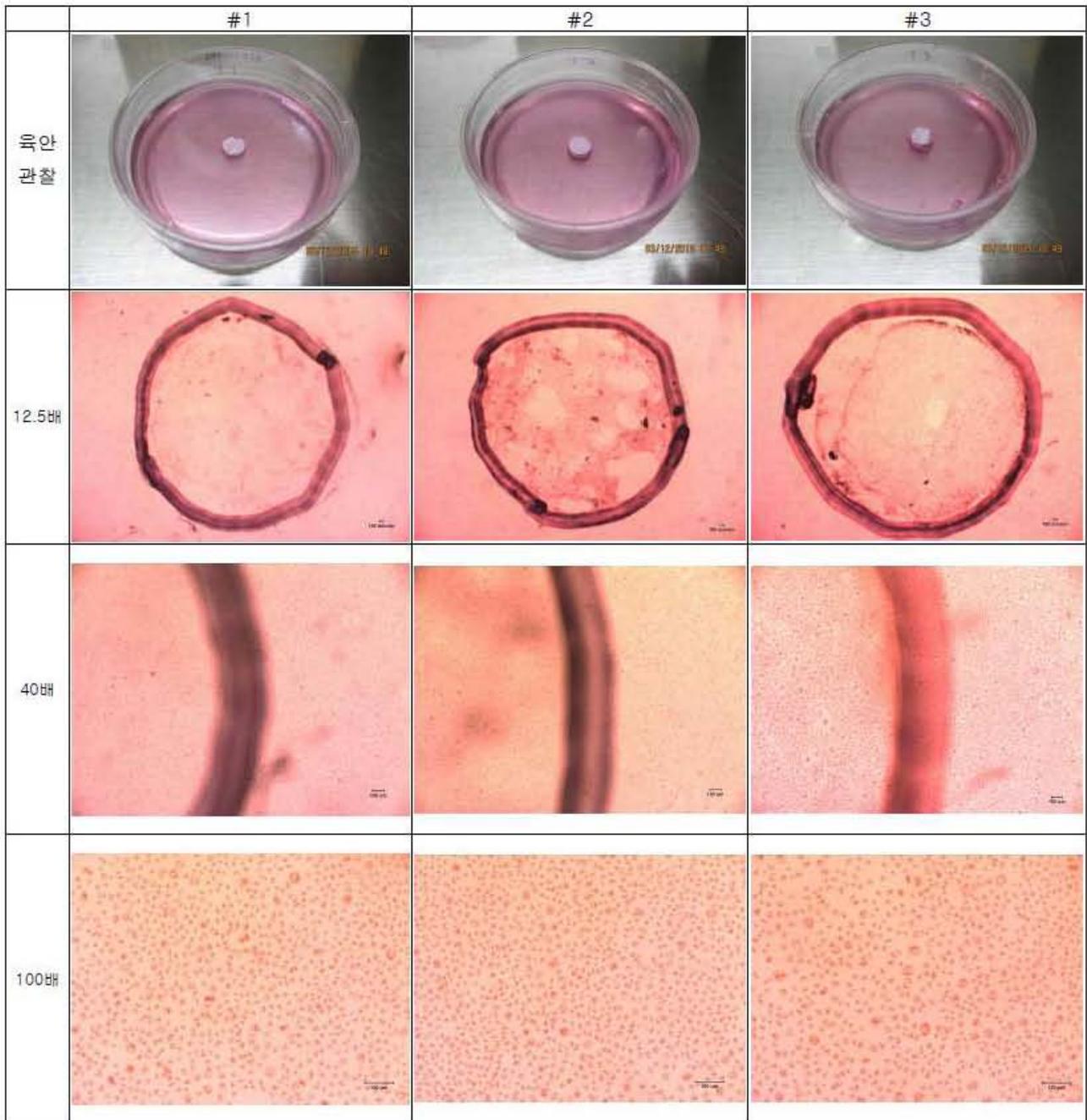


그림 2-103. 시험균의 세포독성 시험 결과

■ 시험결과

- 현미경 사진으로 관찰한 결과 음성 대조군과 큰 차이가 나지 않은 점에 미루어 세포 독성이 없는 것으로 확인됨.

(2) 감작성 시험

▣ 시험방법

1) 동물 감작 절차

- 가. Day 1-3 : 마우스의 양쪽 귀 등 부분에 극성/비극성 실험군, 극성/비극성 음성대조군, 양성대조군을 각각 1 회씩 3 일간 도포한다.
- 나. 도포 후 귀 등 부분의 홍반반응을 관찰하여 등급을 기록한다.
- 다. Day 5 : 마지막 도포로부터 48 시간 후에 BrdU solution (5 mg/mouse/ injection)을 0.5 ml씩 단일 복강 투여한다.
- 라. Day 6 : BrdU solution 투여 24 시간 후에 mouse의 양쪽 이개 림프절을 개체별로 채취한다.
- 마. 임상증상을 실험시작일로 부터 매일 관찰하고 기록한다.
- 바. 동물의 무게를 실험시작일과 실험종료일에 측정한다.
- 사. 컷바퀴두께를 버니어캘리퍼스를 이용하여 도포 전, 도포 후, 시험종료 일에 측정한다.

2) 림프절 세포 단일화

- 가. 채취한 림프절을 완전히 분쇄한 후 # 70 nylon mesh를 사용하여 단일화된 세포를 회수한다.

3) BrdU-ELISA assay

- 가. BrdU-ELISA Cell proliferation assay kit를 사용하여 극성/비극성실험군, 극성/비극성 음성대조군, 양성대조군의 단일화된 세포 현탁액을 96 well-microplate에 100 μ l(n=3) 씩 넣고 blank로 PBS 100 μ l를 넣는다.
- 나. 300 x g로 10 분간 원심분리하여 생리식염수를 제거한 후 60°C drying oven에서 1 시간 동안 완전히 건조 시킨다.
- 다. 각 well에 200 μ l Fix-Denat solution을 넣어 준 후, 실온에서 30 분간 incubation한 다음 Fix-Denat solution을 완전히 제거한다.
- 라. Anti-BrdU-POD antibody working solution을 각 well당 100 μ l 넣어 준 후 실온에서 60 분간 incubation한 후 anti-BrdU-POD antibody working solution을 완전히 제거한다.
- 마. wash solution을 각 well당 200 μ l씩 넣어서 pippetting한 후 wash solution을 완전히 제거하고 이 과정을 2회 반복한다.
- 바. TMB substrate solution을 각 well당 100 μ l 넣어 준 후 실온(차광)에서 15 분간 incubation한다.
- 사. ELISA 370 nm와 492 nm에서 흡광도를 측정한다.

O.D 370nm						
Blank	Neg 1	Neg 2	Neg 3	Pos 1	Pos 2	Pos 3
0.315	0.513	0.561	0.542	1.810	1.835	1.590

O.D 490nm						
Blank	Neg 1	Neg 2	Neg 3	Pos 1	Pos 2	Pos 3
0.074	0.071	0.068	0.067	0.123	0.120	0.109

Stimulation Index (SI) =

$$\frac{\text{BrdU labeling index for each test animal}}{\text{Mean BrdU labeling index for concurrent vehicle control group}}$$

	ABS ₃₇₀ – ABS _{blank370}	ABS ₄₉₀ – ABS _{blank490}	BrdU labeling index	Neg mean	SI
Neg 1	0.198	0.000	0.198	0.224	0.89
Neg 2	0.246	0.000	0.246		1.10
Neg 3	0.227	0.000	0.227		1.01
Pos 1	1.495	0.049	1.446		6.46
Pos 2	1.520	0.046	1.474		6.59
Pos 3	1.275	0.035	1.240		5.54

그림 2-104. LLNA 예비실험 결과

O.D 370 nm						
Pos	Blank	Pos1	Pos2	Pos3	Pos4	Pos5
1	0.058	1.949	1.984	1.990	2.099	2.301
2	0.066	2.468	1.994	1.974	2.690	2.336
3	0.069	2.021	2.651	2.921	2.539	3.183
Average	0.064	2.146	2.210	2.295	2.443	2.607
AOO - Control		control1	control2	control3	control4	control5
1		0.777	0.765	0.996	1.010	0.740
2		0.769	0.752	1.226	1.140	0.805
3		0.774	1.088	1.136	1.026	1.016
Average		0.773	0.868	1.119	1.059	0.854
Saline - Neg	Blank	Neg1	Neg2	Neg3	Neg4	Neg5
1	0.183	1.050	0.849	0.767	0.618	0.180
2	0.180	0.852	0.838	0.766	0.502	0.532
3	0.210	0.872	0.805	0.744	0.531	0.567
Average	0.191	0.925	0.831	0.759	0.550	0.426
Saline - Test		Test1	Test2	Test3	Test4	Test5
1		0.728	0.598	0.606	0.734	0.808
2		0.808	0.496	0.557	0.738	0.742
3		0.698	0.629	0.457	0.615	0.867
Average		0.745	0.574	0.540	0.696	0.806
CSO - Neg		Neg1	Neg2	Neg3	Neg4	Neg5
1		1.040	0.682	0.840	0.965	0.758
2		1.007	0.634	0.765	0.846	0.786
3		1.036	0.592	0.788	0.941	1.030
Average		1.028	0.636	0.798	0.917	0.858
CSO - Test		Test1	Test2	Test3	Test4	Test5
1		0.869	0.772	0.913	0.834	0.883
2		0.894	0.932	0.913	0.873	0.832
3		1.010	1.032	1.017	1.255	0.955
Average		0.924	0.912	0.948	0.987	0.890

그림 2-105. LLNA 실험결과 (흡광도 측정결과 : 370nm)

O.D 492 nm						
Pos	Blank	Pos1	Pos2	Pos3	Pos4	Pos5
1	0.057	0.135	0.133	0.105	0.161	0.161
2	0.057	0.112	0.133	0.118	0.172	0.197
3	0.057	0.117	0.168	0.173	0.153	0.195
Average	0.057	0.121	0.145	0.132	0.162	0.184
AOO - Control		control1	control2	control3	control4	control5
1		0.078	0.081	0.085	0.089	0.081
2		0.078	0.078	0.093	0.091	0.082
3		0.077	0.092	0.091	0.090	0.099
Average		0.078	0.084	0.090	0.090	0.087
AOO - Neg	Blank	Neg1	Neg2	Neg3	Neg4	Neg5
1	0.063	0.102	0.087	0.081	0.076	0.066
2	0.058	0.090	0.088	0.083	0.070	0.074
3	0.059	0.089	0.087	0.081	0.073	0.075
Average	0.060	0.094	0.087	0.082	0.073	0.072
Saline - Test		Test1	Test2	Test3	Test4	Test5
1		0.081	0.077	0.076	0.082	0.084
2		0.085	0.072	0.074	0.080	0.081
3		0.082	0.078	0.069	0.076	0.087
Average		0.083	0.076	0.073	0.079	0.084
CSO - Neg		Neg1	Neg2	Neg3	Neg4	Neg5
1		0.097	0.079	0.086	0.089	0.083
2		0.093	0.078	0.087	0.085	0.082
3		0.094	0.076	0.084	0.090	0.091
Average		0.095	0.078	0.086	0.088	0.085
CSO - Test		Test1	Test2	Test3	Test4	Test5
1		0.087	0.083	0.088	0.083	0.105
2		0.089	0.090	0.087	0.084	0.082
3		0.091	0.092	0.093	0.100	0.091
Average		0.089	0.088	0.089	0.089	0.093

그림 2-105. LLNA 실험결과 (흡광도 측정결과 : 492nm)

	ABS ₃₇₀ - ABS _{blank370}	ABS ₄₉₂ - ABS _{blank492}	BrdU labeling index	Neg mean	SI	SI 평균	오차
Pos 1	2,082	0,064	2,017	2,184	2,40		
Pos 2	2,145	0,088	2,058		2,44		
Pos 3	2,231	0,075	2,156		2,56	2.59	0.19
Pos 4	2,378	0,105	2,273		2,70		
Pos 5	2,542	0,127	2,415		2,87		
AOO - Control 1	0,709	0,021	0,688	0,842	0,82		
AOO - Control 2	0,804	0,027	0,777		0,92		
AOO - Control 3	1,055	0,033	1,022		1,21	1.00	0.17
AOO - Control 4	0,994	0,033	0,961		1,14		
AOO - Control 5	0,789	0,030	0,759		0,90		
Saline - Neg 1	0,734	0,034	0,700	0,486	1,44		
Saline - Neg 2	0,640	0,027	0,612		1,26		
Saline - Neg 3	0,568	0,022	0,546		1,12	1.00	0.40
Saline - Neg 4	0,359	0,013	0,346		0,71		
Saline - Neg 5	0,235	0,012	0,224		0,46		
Saline - Test 1	0,554	0,023	0,531	0,462	1,09		
Saline - Test 2	0,383	0,016	0,368		0,76		
Saline - Test 3	0,349	0,013	0,336		0,69	0.95	0.22
Saline - Test 4	0,505	0,019	0,485		1,00		
Saline - Test 5	0,615	0,024	0,591		1,22		
CSO - Neg 1	0,837	0,035	0,802	0,630	1,27		
CSO - Neg 2	0,445	0,018	0,427		0,68		
CSO - Neg 3	0,607	0,026	0,581		0,92	1.00	0.22
CSO - Neg 4	0,726	0,028	0,698		1,11		
CSO - Neg 5	0,667	0,025	0,642		1,02		
CSO - Test 1	0,733	0,029	0,704	0,712	1,12		
CSO - Test 2	0,721	0,028	0,693		1,10		
CSO - Test 3	0,757	0,029	0,727		1,15	1.13	0.06
CSO - Test 4	0,796	0,029	0,767		1,22		
CSO - Test 5	0,699	0,033	0,666		1,06		

그림 2-106. 최종 감작성 시험 결과

■ 시험결과

- 피부의 감작성 시험에서 시험기간 동안 실험동물이 임상적인 이상 징후나 폐사한 동물이 없었으며, 적용부위의 피부 부작용도 관찰되지 않았음.
- 대조군의 값을 기준으로 시험군(duck bone)의 피부 자극지수를 평가한 결과가 그림 2-106 과 같이 1.6 미만으로 나타나 이러한 결과는 감작성 시험규격의 기준에 적합하다고 판단됨.

(2) 피내반응 시험

▣ 시험방법

- 시험규격

- 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격(식품의약품안전처 고시 제2014-115호)
- ISO 10993-10 (2010)

- 시험물질 및 재료

- 시료(horse bone powder) : 과립 4 g
- 멸균생리식염수
- 면실유
- 항온수조
- 수동 저울
- Animal clipper

- 검액의 제조조건

- (1) 극성 용매

- 시험액 : duck bone 4 g당 추출 용매량 20 ml 비율로 생리식염수에 용출
 - 공 시험액 : 시료없이 생리식염수로만 용출

- (2) 비극성 용매

- 시험액 : duck bone 4 g당 추출 용매량 20 ml 비율로 면실유에 용출
 - 공 시험액 : 시료없이 면실유로만 용출

- (3) 용출조건 : 37±1℃에서 72시간

- 실험방법

- duck bone으로 부터 용출된 용출물을 주사하기 위해 4-18 시간 전에 동물의 등에 있는 털을 제모 함.
- 극성 용출물 0.2 ml를 토끼의 한 쪽에 5군데씩 피내 주사하였고, 비극성 용출물의 대조군 0.2 ml를 각 토끼의 같은 부위 반대쪽 5군데에 주사함
- 비극성 용매를 이용하여 얻은 용출물과 비극성 용매 대조군은 각 토끼 후방에 상기와 같은 과정으로 피내 주사하였음
- 주사 후 24 시간과 48 시간, 72 시간 간격으로 투여부위를 관찰하여 피내 반응을 확인함.

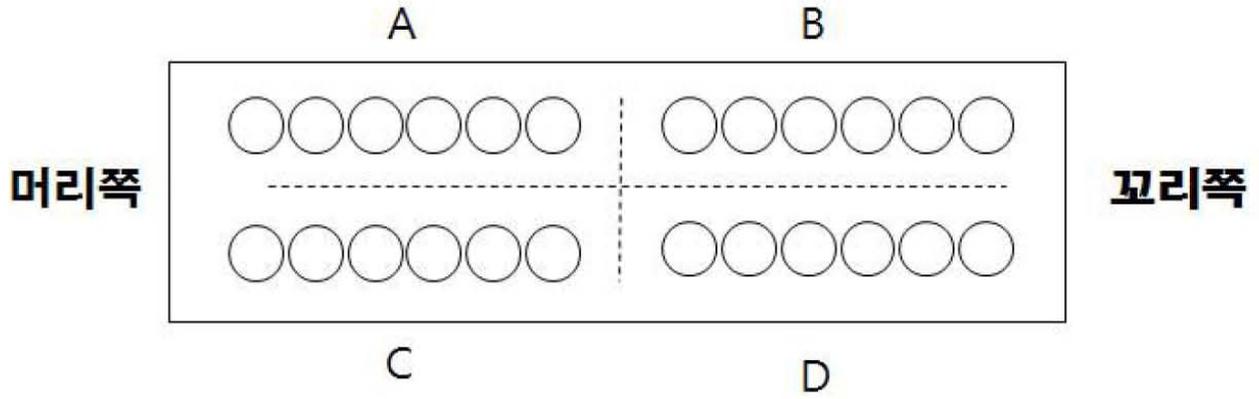


그림 2-107. 약물 주사위치의 배치도.
 A 극성용매 투여부, B 비극성용매 투여부,
 C 극성 용매 추출물 투여부, D 비극성용매 추출물 투여부.

피내반응시험

실험 결과 (DM150925)



그림 2-108. 피내반응 실험 결과



■ 시험결과

- 실험기간 중 동물에서 실험물질 적용부위에 약간의 홍반이 관찰되었으나 시간이 지날수록 증상이 사라졌으며, 그 외 이상증상이나 사망 동물은 없었음. (그림 2-108)
- 실험재료의 평균점수와 용매대조군 평균점수의 차이가 적어 실험의 필요조건이 충족 되는 것으로 판단됨
- 시험 종료 후 실험물질 적용부위에서 홍반과 가피형성, 부종 등의 자극성이 거의 관찰되지 않아 말뚝 유래 플대체제 입자의 피내이식 부작용은 없는 것으로 판단됨 (그림 2-108)

(3) 급성 독성(acute systematic toxicity) 평가

▣ 시험방법

- 시험규격

- 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격 (식품의약품안전처 고시 제2014-115호)
- ISO 10993-11(2006)

- 시험물질 및 재료

- 시료(horse bone powder) : 8 g
- 멸균생리식염수
- 면실유
- 전자저울

- 실험동물

- 동물 : Mouse , 20마리(극성 용매 10마리, 비극성 용매 10마리)
- 체중 및 성별 : 17g 이상, Male

- 실험방법

- 실험에 사용된 마우스는 극성 용매 10마리와 비극성 용매 10마리로서 총 20마리를 사용하였고, 검액의 제조조건은 극성 용매와 비극성 용매로 나누어서 아래와 같이 제조하였음.

- (1) 극성용매

- 시험액 : 말뼈 시료 4 g/추출용 매량 20 ml 비율로 생리식염수에 용출
 - 공 시험액 : 시료 없이 생리식염수로만 용출

- (2) 비극성용매

- 시험액 : 말뼈 시료 4 g/추출용 매량 20 ml 비율로 면실유에 용출
 - 공 시험액 : 시료 없이 면실유로만 용출

- (3) 용출조건 : 37±1℃에서 72시간

- 극성 시험은 마우스의 꼬리 정맥에 50 ml/kg의 용량으로 대조군에는 극성 공 시험액을 시험군에는 극성 시험액을 0.1 ml/s의 속도로 주입하였음.

- 비극성의 시험은 마우스의 복막 내에 50 ml/kg의 용량으로, 24 gauge needle syringe를 이용하여 대조군에는 비극성 공시험액을, 시험군에는 비극성 시험액을 투여하였음.

- 시험물질을 투여한 모든 동물에 대하여 투여 후 24시간, 48시간, 72시간 후에 일반 임상증상 관찰하고, 모든 동물에 대하여 시험물질 투여개시 전, 투여개시 후, 시험 종료 시에 체중을 측정하고 관찰 기간동안 임상적 이상 또는 사망한 것이 있어서는 안 됨 (표 2-6).

표 2-6. 임상적 이상 판정 기준(Response to Systemic Injection Assay)

Response	Description
Normal, no symptom	Mouse exhibits no adverse physical symptoms after injection.
Slight	Mouse exhibits slight but noticeable symptoms of hypokinesia, dyspnea, or abdominal irritation after injection.
Moderate	Mouse exhibits definite evidence of abdominal irritation, dyspnea, hypokinesia, ptosis, or diarrhea after injection. (Weight usually drops to between 15 and 17 g.)
Marked	Mouse exhibits prostration, cyanosis, tremors, or severe symptoms of abdominal irritation, diarrhea, ptosis, or dyspnea after injection. (Extreme weight loss; weight usually less than 15 g.)
Dead, expired	Mouse dies after injection.

▣ 시험결과

- 말의 뼈로 제조된 콜리식재 입자의 급성독성 실험 결과 극성용매 10마리, 비극성용매 10마리 모두 이상 또는 사망이 관찰되지 않았으며, 체중감소 또한 관찰되지 않아 급성독성은 없는 것으로 판단 됨 (표 2-7과 8).

표 2-7. 투여 후 마우스의 체중변화

구 분		동물번호	투여 전 무게 (g)	24시간후 무게(g)	48시간후 무게(g)	72시간후 무게(g)
극성 용매	대조군 (Control)	SN1	19.90	21.30	22.10	23.50
		SN2	19.60	21.20	22.30	24.30
		SN3	19.90	20.80	22.00	23.20
		SN4	20.90	21.40	22.30	24.10
		SN5	18.80	19.60	20.80	22.60
	시험군 (horse bone)	SS1	20.10	21.30	22.60	24.50
		SS2	20.80	22.10	24.20	26.40
		SS3	20.30	21.90	23.40	25.40
		SS4	19.20	20.50	22.10	24.30
		SS5	18.60	19.80	20.50	22.70
비극 성 용매	대조군 (Control)	CN1	20.50	22.00	24.10	26.30
		CN2	19.50	21.60	23.40	24.40
		CN3	19.40	21.40	22.90	24.70
		CN4	20.30	22.60	24.80	26.50
		CN5	19.80	22.10	24.50	26.70
	시험군 (horse bone)	CS1	20.40	22.10	24.50	26.30
		CS2	19.10	20.80	22.60	24.50
		CS3	18.60	20.00	22.40	24.30
		CS4	19.00	20.10	23.10	24.70
		CS5	20.30	22.10	24.50	25.90

표 2-8. 말뼈 분말의 급성독성 실험 결과

구 분		동물번호	임상 판정	체중 감소
극성 용매	대조군 (Control)	SN1	Normal	없음
		SN2	Normal	없음
		SN3	Normal	없음
		SN4	Normal	없음
		SN5	Normal	없음
	시험군 (horse bone)	SS1	Normal	없음
		SS2	Normal	없음
		SS3	Normal	없음
		SS4	Normal	없음
		SS5	Normal	없음
비극성 용매	대조군 (Control)	CN1	Normal	없음
		CN2	Normal	없음
		CN3	Normal	없음
		CN4	Normal	없음
		CN5	Normal	없음
	시험군 (horse bone)	CS1	Normal	없음
		CS2	Normal	없음
		CS3	Normal	없음
		CS4	Normal	없음
		CS5	Normal	없음

(4) 무균시험

▣ 시험방법

- 시험규격

- 대한약전(大韓藥典) 일반시험법의 무균시험법(無菌試驗法)

- 시험물질 및 재료

- 시험물질(horse bone powder sample) : 8개

- 배지

(1) Fluid thioglycollate medium (DIFCO, USA)

(2) Tryptic Soy Broth (DIFCO, USA)

- 배지제조

- Validation test : Fluid thioglycollate medium 3 g과 Tryptic Soy Broth 3 g을 각 증류수 100 ml에 녹인 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

- 직접법 : Fluid thioglycollate medium 0.9 g과 Tryptic Soy Broth 0.9 g을 각각 증류수 30 ml에 녹인 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

- 실험방법

1) 배지의 적합성시험

- 시험에 사용되는 배지의 적합성을 확인하는 시험으로 액상티오글리콜산배지는 30~35℃, 대두제인소화효소배지는 20~25℃에서 14일간 배양한 뒤 미생물의 증식 유무를 육안 관찰함.
- 배양한 후 육안으로 관찰하여 시험군이 대조군과 비슷하게 미생물이 증식되었으면 항균성이 없거나 항균활성이 충분히 제거된 것으로 판단하였음.

2) 무균시험

- 시료의 무균상태를 확인하기 위한 시험으로 각각의 배지에 시료 1개씩을 넣고, 액상티오글리콜산배지는 30~35℃, 대두카제인소화효소배지는 20~25℃에서 14일간 배양한 뒤 미생물의 증식 유무를 육안 관찰함.

■ 시험결과

- 14일간의 배양 실험결과 무균시험에 적절한 배지인 것이 판명되었음.

배지 적합성 시험	15.11.18 (-1일차)		15.11.19 (0일차)		15.12.03 (14일차)	
	대두카제인소화효소 배지	액상티오글리콜산 배지	대두카제인소화효소 배지	액상티오글리콜산 배지	대두카제인소화효소 배지	액상티오글리콜산 배지
						

그림 2-109. 배지 적합성 시험 결과

- 무균시험에서는 배양 7일 후와 14일 후에 세균의 증식 유무를 관찰한 결과 대조군과 시험군(horse bone powder)은 모두가 세균이 증식되지 않아 무균시험의 기준에 적합하다고 판정되었음 (그림 2-110)

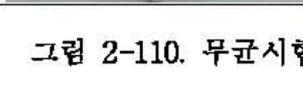
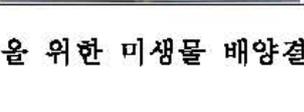
		0일차(15.11.19)		5일차(15.11.24)		14일(15.12.03)	
		대조군	시험군	대조군	시험군	대조군	시험군
무균 시험	대두카제인 소화효소배지						
							
	액상티오글리콜산배지						
							

그림 2-110. 무균시험을 위한 미생물 배양결과.

(5) 생체내 발열성(pyrogen) 시험

■ 실험방법

- 시험규격: 대한약전 일반시험법 중 발열성물질 시험법.
- 시험물질 및 재료
 - 시료(horse bone powder) : 20 g
 - 멸균생리식염수
 - 주사기
- 시험장비
 - 항온수조
 - Pyrogen test recording system
 - 수동저울 (200312100, 효성정밀계기, Korea)
- 실험동물
 - 동물 : Rabbit (NewZealand White), 2 kg 이상, Female, 3마리
- 검액 제조
 - 제조조건 : 말뼈유래 골이식재 분말을 4 g을 20 ml의 비율로 생리식염수에 용출
 - 용출조건 : $37\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 72 \pm 2 시간
- 실험방법
 - 먼저 시험군 시료(horse bone powder) 4 g을 20 ml의 생리식염수에 침지하여 37°C 에서 72시간 용출함.
 - 이어서 용출액을 $37\pm 2^\circ\text{C}$ 로 가온하여 토끼의 귀정맥에서 10분 이내로 서서히 주사함.
 - 주사 후 3시간까지 30분 이내의 간격으로 직장내의 체온을 측정하여 대조 체온과 최고 체온과의 차를 체온 상승도로 하였고 1°C 이하인 경우 음성으로 판정함.
 - 이때, 시험용량은 시험동물 체중 1 kg 당 10 ml로 하고, 처음으로 시험에 공시하는 토끼는 시험하기 전 1~3일 이내에 주사를 제외한 전 조작이 포함된 플라시보시험을 하여 시험에 적응시킴.

■ 실험결과

- 시험기간동안 동물에서 어떠한 이상 증상이 관찰되거나 폐사한 동물은 없었음.
- 시험결과 대조 체온과 최고 체온 차이가 $0.1\text{--}0.3^\circ\text{C}$ 로 0.5°C 이하를 나타내어 말뼈 유래 골대체재용 입자의 발열성은 음성으로 판단함 (그림 2-111, 112).

Pyrogen Test Program

Date: 11/18/2015
Time: 10:24:07 AM

Group No 1

Test's Date : 11/18/2015
Product Name : DM150925-placeb
Batch/Ref. :
Dose : 0.00 Ml/Kilo
Operator 1 : KEN
Operator 2 :
Selected pharmacopeia : Default (American USP)
Calculate inc.temp. using samples each 30 min

Test decision:	Pyrogen Free: ($\Delta T \geq 0.5$) ≤ 0
	Repeat: ($\Delta T \geq 0.5$) > 0
	Pyrogen Contaminated:

Pr	Code	Comments	Weight (kg)	Dose	Ini.	T30	T60	T90	T120	T150	T180	Inc
1	1		2.100	0.000	39.60	38.3	38.4	38.5	38.5	38.6	38.6	0.00
2	2		2.100	0.000	39.10	38.6	38.7	38.7	38.6	38.8	38.8	0.00
3	3		2.100	0.000	39.80	39.7	39.8	39.7	39.5	39.5	39.4	0.00

Increment of temperature observed in this group (according to the pharmacopeia selected): 0.00

CONCLUSION : *Free*

ENVIRONMENTAL CONDITIONS

	Temperature °C	Humidity %
Animal Facility	20.00	55.00
Laboratory	20.00	55.00

그림 2-111. 플라시보군의 발열성 결과

Pyrogen Test Program

Date: 11/20/2015

Time: 1:03:30 PM

Group No 1

Test's Date : 11/20/2015
 Product Name : DM150925-test
 Batch/Ref. :
 Dose : 10.00 Ml/Kilo
 Operator 1 : KEN
 Operator 2 :
 Selected pharmacopeia : Default (American USP)
 Calculate inc.temp. using samples each 30 min

Test decision:	Pyrogen Free: ($\Delta T \geq 0.5$) ≤ 0
	Repeat: ($\Delta T \geq 0.5$) > 0
	Pyrogen Contained:

Pr	Code	Comments	Weight (kg)	Dose	Ini.	T30	T60	T90	T120	T150	T180	Inc
1	1		2.200	22.000	39.30	39.4	39.5	39.5	39.5	39.4	39.3	0.20
2	2		2.100	21.000	39.60	39.1	39.1	38.8	39.4	39.6	39.4	0.00
3	3		2.100	21.000	39.70	39.7	39.4	39.4	39.6	39.4	39.3	0.00

Increment of temperature observed in this group (according to the pharmacopeia selected): 0.20

CONCLUSION : *Free*

ENVIRONMENTAL CONDITIONS

	Temperature °C	Humidity %
Animal Facility	20	55
Laboratory	20	55

그림 2-112. 말뚝유래 골이식제의 발열성 시험 결과

나. 물리·화학적 안전성에 관한 보고서

(1) 말뚝 유래 골이식제의 성상시험

▣ 시험방법

• 시험규격

- 식품의약품안전처, 치과용 골이식제의 물리화학적 특성 평가가이드라인
- Guidance for Industry and FDA Staff, Class II Special Controls Guidance Document: Resorbable Calcium Salt Bone Void Filler Device; Guidance for Industry and FDA (2003)

- 사용한 시험장비
 - 전기식 지시저울 (MSE125P-000-DA, Sartorius, Germany)
- 분석방법
 - (1) 시제품의 내용물의 양을 미세저울로 측정함
 - (2) 육안으로 관찰함
 - (3) 제품에 이물질이 없는지, 분말에 덩어리가 없는지 관찰함

■ 시험결과

- 정상시험 결과



그림 2-113. 정상시험 결과

- 정상시험 결과(그림 2-113), 제품에 이물질이 없음을 확인함. 작은 크기의 덩어리가 관찰되었지만 잘게 고운 입자로 다시 부수기 수월하기 때문에 제품으로서 큰 문제가 없다고 판단함.

(2) 형태 및 입자크기분석

■ 시험방법

- 시험규격
 - 식품의약품안전처, 치과용 골이식재의 물리화학적 특성 평가가이드라인
 - Guidance for Industry and FDA Staff; Class II Special Controls Guidance Document:

Dental Bone rafting Material Devices (2005)

- 사용한 시험장비
 - 주사전자현미경(SEM) (JSM-7500F, JEOL Ltd., Japan)
- 형태 및 입자크기분석
 - (1) 백금 코팅을 이용한 전처리를 진행함
 - (2) 주사 전자 현미경 (Scanning Electron Microscopy, SEM)을 이용해 분석함
 - (3) 1,000 / 5,000 / 10,000 / 20,000 / 50,000 배의 배율로 시제품의 표면 형태와 입자크기를 분석한다.

■ 시험결과

- 형태 및 입자크기분석 결과

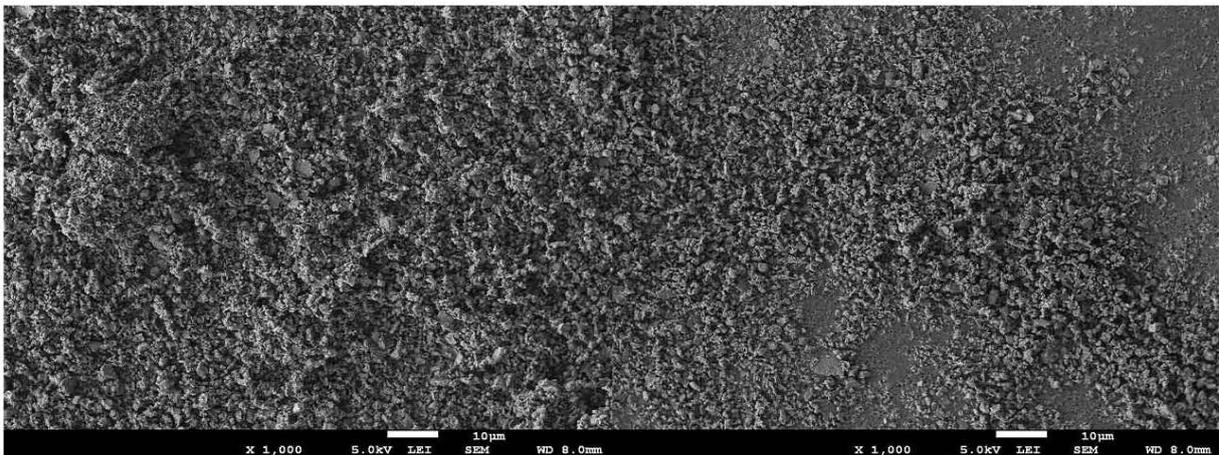


그림 2-114. 시제품 1,000 배 확대 사진

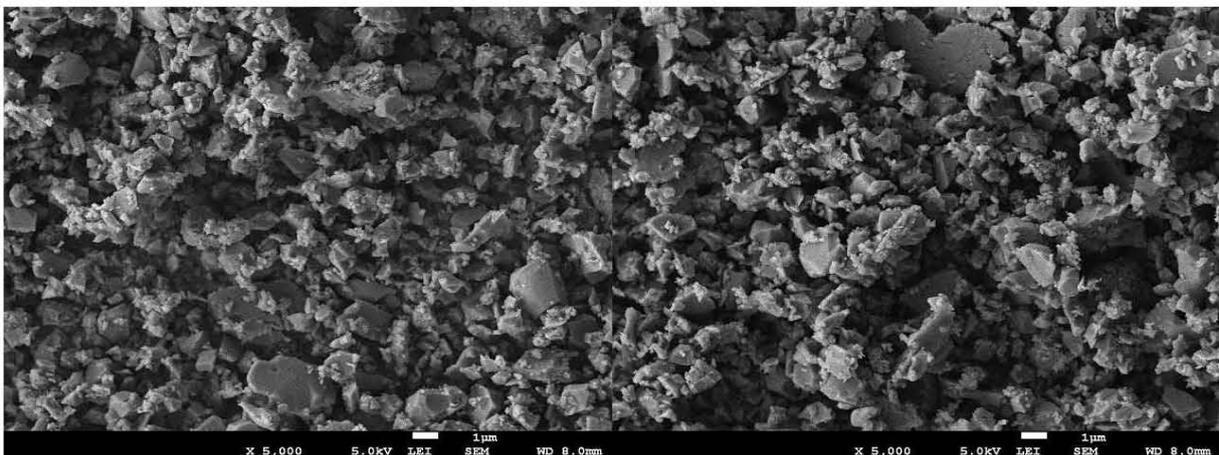


그림 2-115. 시제품 5,000 배 확대 사진

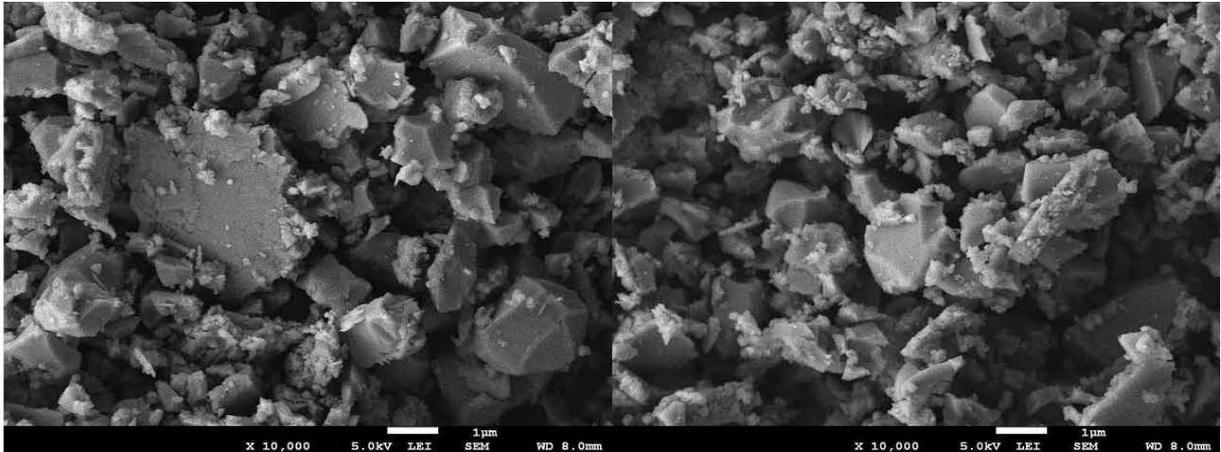


그림 2-116. 시제품 10,000 배 확대 사진

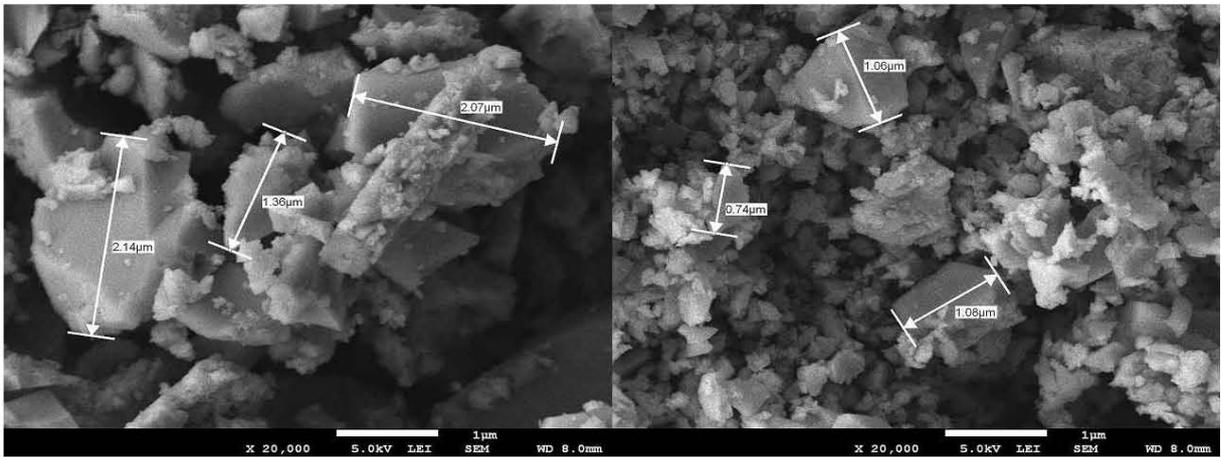


그림 2-117. 시제품 20,000 배 확대 사진 및 치수측정

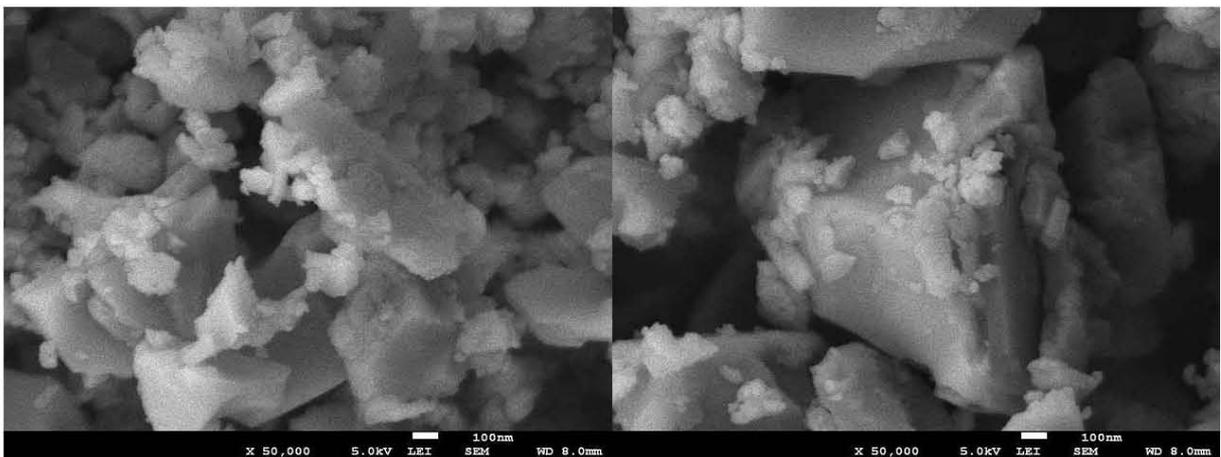


그림 2-118. 시제품 50,000 배 확대 사진

- 1,000 / 5,000 배 확대 시 (그림 2-114, 115), 입자들이 큰 덩어리로 뭉치지 않고 비교적 균일한 크기로 퍼져 있는 것을 볼 수 있음.

- 10,000 / 20,000 배 확대 시 (그림 2-116, 117), 비교적 큰 입자들 표면에 작은 입자들이 표면에 덮여 있는 것을 볼 수 있음. 큰 입자들은 각진 다면체의 결정을 이루고 있었음. 입자의 크기 측정결과, 큰 입자들은 0.5-3.0 μm 크기를 가지고 있음.
- 50,000 배 확대 시 (그림 2-118), 큰 입자 주위에 작은 결정을 가지는 입자들이 많이 관측됨. 작은 입자들의 크기는 수십-수백 초미세(서브마이크로)미터 정도로 측정됨.

(3) 포장시험

▣ 시험방법

- 시험규격
 - 식품의약품안전처, 치과용 골이식재의 물리화학적 특성 평가가이드라인
 - Guidance for Industry and FDA Staff; Class II Special Controls Guidance Document: Resorbable Calcium Salt Bone Void Filler Device; Guidance for Industry and FDA (2003)
- 포장시험
 - (1) 육안으로 관찰함
 - (2) 제품의 유출, 누액 등이 없는지 관찰함

▣ 시험결과

- 포장시험 결과



그림 2-119. 포장시험 결과

- 포장시험 결과 (그림 2-119), 제품의 유출이나 누액 등이 관찰되지 않음.

(4) 용량시험

▣ 시험방법

- 시험규격
 - 식품의약품안전처, 치과용 골이식재의 물리화학적 특성 평가가이드라인
 - Guidance for Industry and FDA Staff; Class II Special Controls Guidance Document: Resorbable Calcium Salt Bone Void Filler Device; Guidance for Industry and FDA (2003)
- 사용한 시험장비
 - 전기식 지시저울 (MSE125P-000-DA, Sartorius, Germany)
- 용량시험
 - (1) 전자저울을 이용하여 측정함
 - (2) 시제품 내의 분말의 용량이 표시치의 $\pm 5\%$ 인지 확인함

▣ 시험결과

• 용량시험 결과

표 2-9. 용량시험

	1	2	3	4	5	평균
측정용량 (g)	1.995	2.017	2.006	2.016	2.000	2.006
오차비율 (%)	-0.272	0.837	0.290	0.751	-0.016	

- 측정 결과(표 2-9), 5번 모두 표시치인 2 g의 $\pm 5\%$ 이내의 범주에서 용량이 측정됨. 표시된 값에 적절하게 분말이 제품 안에 들어 있음을 확인함.

(5) 성분분석

▣ 시험방법

• 시험규격

- 식품의약품안전처, 치과용 골이식재의 물리화학적 특성 평가가이드라인
- Guidance for Industry and FDA Staff; Class II Special Controls Guidance Document: Resorbable Calcium Salt Bone Void Filler Device; Guidance for Industry and FDA (2003)

• 사용한 시험장비

- X선 형광분석기(XRF) (EDX-720/800HS Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometers, Shimadzu, Japan)

• 성분분석

- (1) X선 형광분석기(XRF)를 이용하여 제품의 구성성분을 측정
- (2) Ca/P, Ca/S 비율을 표시함.

▣ 시험결과

• 성분분석 결과

표 2-10. XRF 결과

성분	Concentration(%)
Ca	37.74
O	41.36
P	17.90
Si	2.22
S	0.39
K	0.24
Sr	0.06
Zr	0.05
Fe	0.04
Cu	0.01
Zn	0.00

- 성분분석 결과(표 2-10), Ca 37.74 %, P 17.90 %, Si 2.2 %, S이 0.39 % 를 가지고 있으며, 나머지 원소들이 미량 존재함으로 나타남
- Ca와 P의 몰 비율은 약 1.63 , Ca와 S 의 비율은 약 0.019로 계산됨. 이는 생체 내의 뼈에서 발견 되는 CDHA(Calcium Deficient Hydroxyapatite)의 Ca/P 비율인 1.5와 유사한 값을 가지는 것으로 판단됨.

(6) 용해도 시험

▣ 시험방법

- 시험규격
 - 식품의약품안전처, 치과용 골이식재의 물리화학적 특성 평가가이드라인
 - Guidance for Industry and FDA Staff: Class II Special Controls Guidance Document: Dental Bone rafting Material Devices (2005)
- 시험장비
 - (1) 분석저울 (BP221S, Sartorius, Germany)
 - (2) Shaking Incubator (VS-8480SF, Vision Scientific Co., Ltd., Korea)
 - (3) Oven (Drying Oven, DAI HAN GAUGE TRADING Co., Korea)
 - (4) 버니어 캘리퍼스 (Vernier calipers, Mitutoyo, Japan)

• 분석방법

- (1) 시료를 디스크 형태로 만들고 직경과 높이를 측정 (그림 2-120)
- (2) 뚜껑 없이 용기의 무게를 측정(M1)
- (3) 용기와 시료의 무게를 측정(M2)한 후, 시료의 질량(M2 - M1)을 계산하여 기록(M3)
- (4) (100 ± 1) ml의 증류수를 용기에 넣어 시료와 완전히 접촉하도록 함 (그림 2-121)
- (5) 20 °C, 2 Hz(120 rpm)의 shaking incubator에서 (120 ± 1) 시간 동안 시료가 담긴 용기를 교반시킴 (그림 2-122)
- (6) 용기와 시료를 옮긴 후 실온에서 방치함
- (7) 잔류물이 없는 여과지의 질량을 측정(M4)
- (8) 흡입 여과기를 통하여 시료를 제거함
- (9) 여과 잔류물과 여과지를 증류수로 3 번씩 세척한 후 (100 ± 2) °C의 오븐에서 일정한 질량이 될 때까지 건조함
- (10) 여과 잔류물이 있는 여과지의 질량을 측정(M5)한 후, 시료의 질량 (M3)과 여과 잔류물의 질량(M5 - M4)의 차이를 용해된 질량으로 기록함
- (11) 시료의 용해도($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)를 계산하여 기록함



그림 2-120. 디스크 형태로 압착시킨 시료



그림 2-121. 시료가 들어있는 용기에 증류수를 채움



그림 2-122. shaking incubator를 이용하여 시료를 교반함

▣ 시험결과

- 용해도 시험 결과

표 2-11. 용해도 측정을 위한 각 요소의 질량, 부피와 길이 측정치

시료	용기+ 시료 무게 (M2)	M2-M1 =M3 (시료 무게 g)	여과 지질 량 (M4)	잔류물 여과지 (M5)	M5-M 4	M3-(M5-M 4) ug	디스크 직경 (mm)	디스크 높이 (mm)	부피 (mm ³)
1	12.5329	0.2009	3.1361	3.3325	0.1964	4490.0	10.0000	1.2000	94.2000
2	12.5029	0.1286	3.1711	3.2965	0.1254	3170.0	10.0000	0.9000	70.6500
3	12.6424	0.2156	3.1700	3.3832	0.2133	2310.0	10.0000	1.3000	102.0500
4	12.5323	0.1677	3.1744	3.3377	0.1633	4450.0	10.0000	1.0000	78.5000
5	12.5026	0.1661	3.1530	3.3154	0.1624	3690.0	10.0000	1.0000	78.5000

표 2-12. 각 시료의 용해도(ug/mm³)

시료	용해도(ug/mm ³)
1	47.665
2	44.869
3	22.636
4	56.688
5	47.006
평균	43.773
편차	12.653

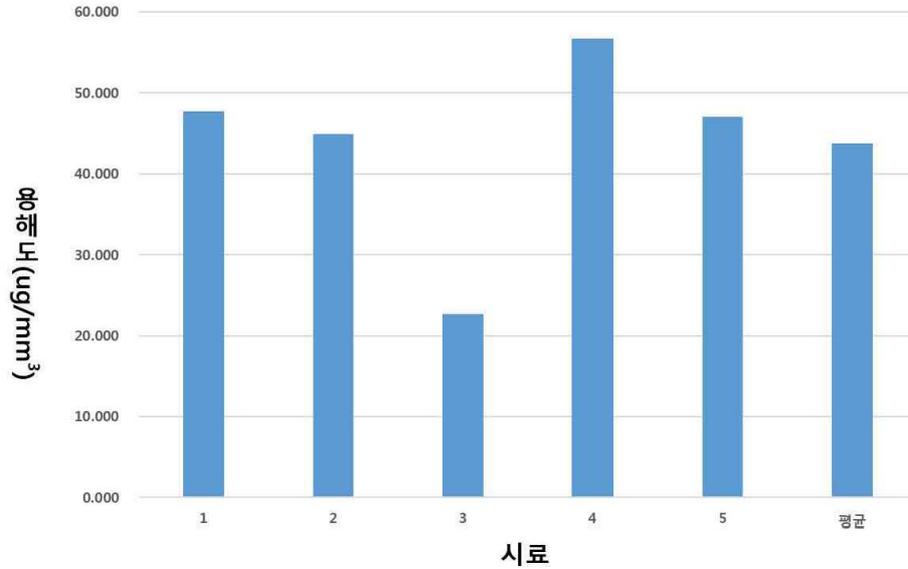


그림 2-123. 각 시료의 용해도(ug/mm³)

- 용해도 측정 시험 결과(표 2-11, 2-12 / 그림 2-123), 측정된 시료들의 용해도 평균은 43.773 ug/mm³ 으로써 시험기준인 120 ug/mm³를 넘지 않음으로 기준에 충족한다고 볼 수 있음.

(7) Ca, P 용출속도시험(ICP)

▣ 시험방법

- 시험규격
 - 식품의약품안전처, 치과용 골이식재의 물리화학적 특성 평가가이드라인
 - 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격(식약청 고시 제2009-55호, 2009.08.04.)
 - Guidance for Industry and FDA Staff; Class II Special Controls Guidance Document: Dental Bone rafting Material Devices (2005)
- 시험장비
 - ICP-AES (Perkin Elmer Optima 7300DV, USA)
- 분석방법
 - (1) 약 15 ml 용량의 원심분리관을 준비한다.
 - (2) 본 용출시험에서 사용되는 검액은 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격(식약청 고시 제2009-55호, 2009.08.04.)의 '검체 준비와 표준물질'에 따라 준비한다.

- (3) 튜브를 부드럽게 움직여 골이식재 사이에 차 있을 공기 방울을 제거한다.
- (4) 일정 기간(3, 7, 14 일) 동안 37 ℃로 유지한다.
- (5) 정해진 추출 시점에 원심분리(1000 rpm, 5 분)하여 상등액을 채취한다.
- (6) ICP(Inductively coupled plasma) 분석(ICP-MS, ICP-OES에 구애받지 않음)을 실시하여 채취된 상등액에 존재하는 칼슘과 인의 양을 정량 분석한다.

■ 시험결과

- Ca, P 용출속도시험 결과

표 2-13. Ca/P 용출속도(mg/l)

	3일	7일	14일
Ca	0.000	0.000	0.000
P	0.089	0.081	0.000

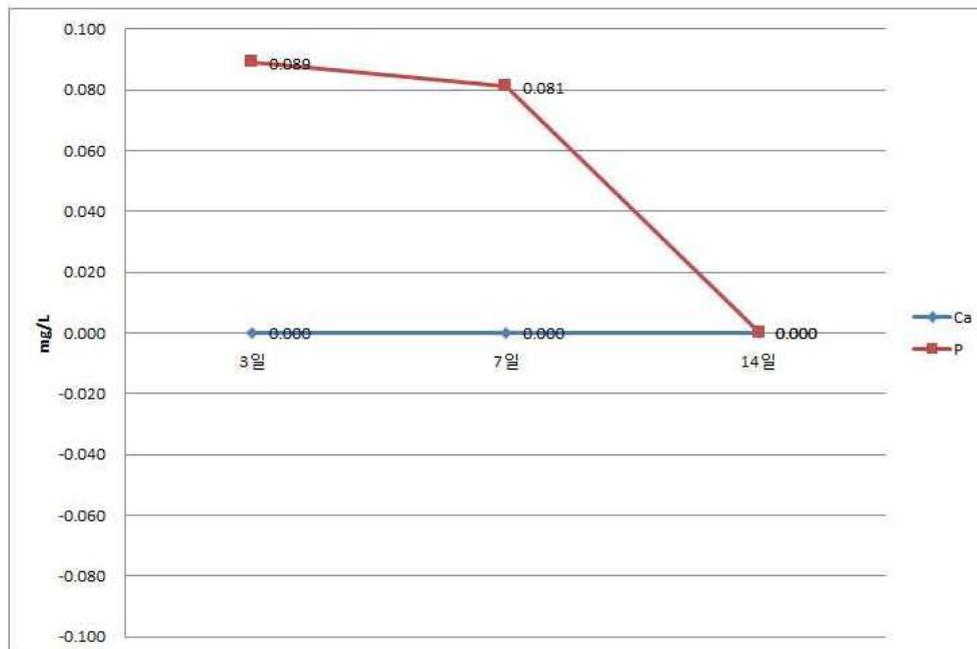


그림 2-124. Ca/P 용출속도(mg/l)

- Ca의 경우(표 2-13, 그림 2-124), 3일차, 7일차까지는 0.081-0.089 mg/l의 속도로 용출되다가, 14일부터는 용출되지 않음.
- P의 경우(표 2-13, 그림 2-124), 시험 기간 내내 거의 용출되지 않음.

(8) 중금속시험(ICP)

▣ 시험방법

- 시험규격
 - 식품의약품안전처, 치과용 골이식재의 물리화학적 특성 평가가이드라인
 - ISO/DIS 17294-1:2003 Water Quality - Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of elements - Part 1: General guidelines and basic principles
- 분석방법
 - (1) 왕수에 제품의 분말을 녹임.
 - (2) 분말이 완전히 용해된 후, ICP 장비로 분말 내의 중금속을 검출함.
- 사용한 시험장비
 - ICP-AES (Perkin Elmer Optima 7300DV, USA)

▣ 시험결과

- 중금속시험 결과

표 2-14. ICP-AES 측정결과

	Sample Conc. Units (wt%)
As	0
Cd	0
Pb	0
Hg	0

- 분석 결과(표 2-14), As, Cd, Pb, Hg와 같은 중금속이 검출되지 않음. 각 중금속에 대한 ICP의 검출한계가 1 ppm 이하임을 볼 때, 전체 중금속 잔류량이 50 ppm 이하여야 한다는 식약처 시험기준에 충족하는 결과임.

(9) pH 측정

▣ 시험방법

- 시험규격
 - 식품의약품안전처, 치과용 골이식재의 물리화학적 특성 평가가이드라인
 - 대한약전 일반시험법 (2014.12.05. 개정)
 - Guidance for Industry and FDA Staff; Class II Special Controls Guidance Document: Dental Bone rafting Material Devices (2005)
- 사용한 시험장비
 - pH Meter (ORION 4 STAR, Thermo, USA)
- 분석방법
 - (1) 50 ml conical tube에 증류수 20 ml을 넣고 시료 4g을 넣어줌. (3반복)
 - (2) 항온수조를 70℃로 맞추고 24 시간동안 방치함.
 - (3) 원심분리기를 이용하여 상층액만 취하여 pH를 측정함.
 - (4) 시료에 따른 pH를 측정함.

▣ 시험결과

- 측정결과



그림 2-125. 시료의 pH 측정 결과

표 2-15. 시료의 pH 측정 결과

	pH
글이식제(실험군)	12.22
	12.23
	12.23
평균	12.23
표준편차	0.01

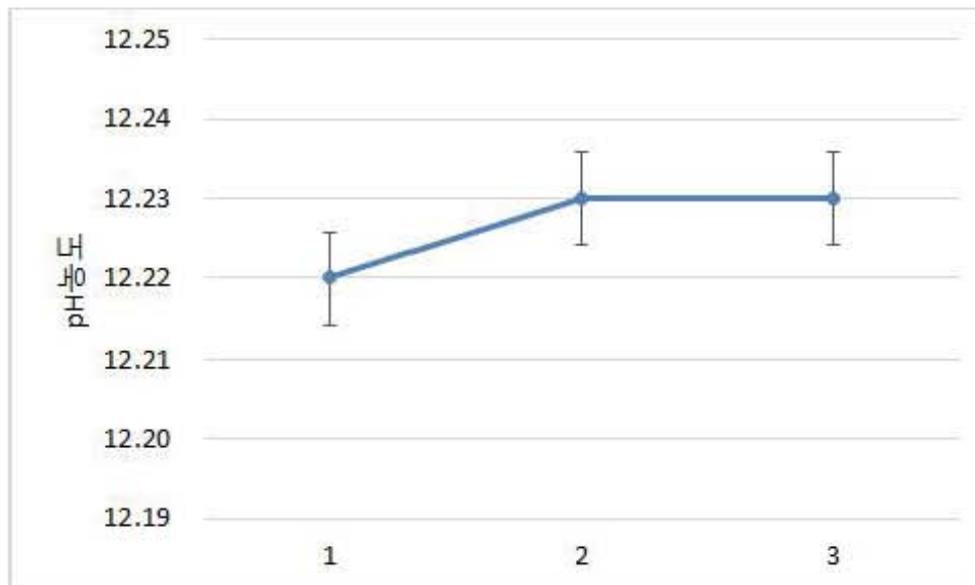


그림 2-126. 시료의 pH 측정 결과

- 분석 결과(그림 2-125, 2-126 / 표 2-15), 시료에 따라 큰 차이 없이 거의 일정한 pH의 값을 가지고 있는 것으로 나타남.

(10) 단백질 함량 분석

▣ 시험방법

- 시험규격
 - 식품의약품안전처, 치과용 골이식재의 물리화학적 특성 평가가이드라인
- 사용한 시험장비
 - 전기식 지시저울 (MSE125P-000-DA, Sartorius, Germany)
 - 전기로(MF-12GH, JEIO tech Ltd., US)
- 단백질 함량 분석
 - (1) 500mg의 시료를 정량함 (m1)
 - (2) 전기로를 이용하여 정량한 시료를 1200℃까지 승온하여 12시간 이상 소결함
 - (3) 잔유물의 질량을 측정함 (m2)
 - (4) 열 분해된 유기물의 증량비율(R)을 계산함
 - $R = \frac{m1 - m2}{m1} \times 100\%$ 의 수식을 사용하여 계산 함.
 - (5) 총 7회를 실시하여 최댓값과 최솟값은 제외한 5개의 유효한 증량비율로부터 평균과 표준편차를 추출함.
 - (6) 시료의 변화된 질량을 관찰함

▣ 시험결과

- 분석 결과

표 2-16. 골이식재의 질량 변화에 따른 증량비율

	골이식재 질량(m1)	잔류물의 질량(m2)	증량비율(R)	비고
1	0.50231	0.49990	0.48	
2	0.50146	0.49885	0.52	
3	0.49975	0.49727	0.50	
4	0.50034	0.49785	0.50	
5	0.50123	0.49926	0.39	최솟값
6	0.50087	0.49650	0.87	최댓값
7	0.50078	0.49791	0.57	
평균값			0.51	최대·최소값 제외
표준편차			0.04	최대·최소값 제외

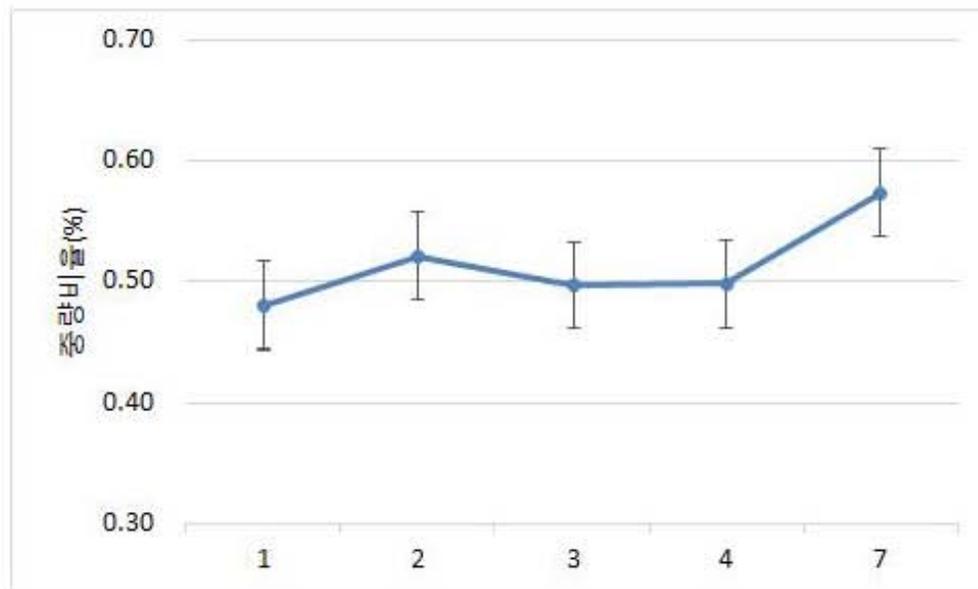


그림 2-127. 콩이식제의 질량 변화에 따른 중량비율

- 시험 결과(표 2-16, 그림 2-127), 평균 0.51 %의 중량감소가 측정되었음. 모든 시료에서 1 % 미만의 단백질이 있음이 관측됨.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

가. 연차별 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012/3)	오리부리(duck beak)의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 개발	오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 원료와 공정개발	100	오리부리의 뼈 유래 생체소재의 제조공정 개발 및 생체적합성 동물시험
				오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 물리, 화학적 특성 분석
	말 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 개발	말 부산물을 이용한 생체소재 원료 제조 부위별 생체소재 원료의 특성 구명	100	말 부산물을 이용한 생체소재 원료 제조
				부위별 생체소재 원료의 특성 구명
	생체소재의 제조 공정 개발		생체소재 제조 공정 개발 (전처리·화학반응·소결·분쇄·선별·멸균·품질검증)	
		생체소재 원료 제조공정의 기계화 및 품질검사 설계		생체소재 원료 제조공정의 기계화 및 품질검사 설계
2차 년도 (2013/4)	오리부리(duck beak)의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 개발	오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 제조 및 동물 안전성 시험	100	오리부리의 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 생체적합성 및 안전성 동물시험
				대량 생산 기술 및 열처리 온도에 따른 오리 뼈의 물리화학적 특성 구명
				오리부리의 미생물 및 이화학적 검사
	말 뼈를 이용한 골대체재용 생체소재의 개발	생체소재 원료의 제조 시스템 성능 보완 부위별 생체소재의 물리 화학적 특성 구명	100	공정이 빠르고 생산시간을 단축하는 원료 시스템의 개발
				생체소재 원료의 특성 구명
				세포 독성 및 뼈모세포의 활성화도 평가
	생체소재의 생체의 실험 생체적합성 분석		독성평가	
	in vivo 동물실험		Computed tomography 검사 Micro-CT 검사 및 분석 생체조직 이식부위의 병리조직학적 검사	
	생체소재의 생체의 실험		생체적합성 분석	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2014/5)	오리부리(duck beak)의 뼈를 이 용한 골대체재용 생체소재의 개발	오리부리의 뼈를 이용한 골 대체재용 생체소재의 인체줄 기 세포와의 친화성 검사와 조직재생 실험	100	오리부리의 뼈를 이용한 골대체 재용 생체소재의 인체줄기 세포 와의 친화성 검사
				오리부리의 뼈를 이용한 골대체 재용 생체소재의 조직재생 검증
				오리부리의 뼈를 이용한 골대체 재용 생체소재의 인체면역 세포 에 대한 반응 검사
	말 뼈를 이용한 골 대체재용 생 체소재의 개발	인체줄기세포를 이용한 생체 소재의 생체외 실험	100	인체 줄기세포와의 친화성 검사
				동물시험을 통해 생체소재의 골 유도능력을 확인함
				동물실험을 통해 독성을 검사함
				식약처 기준에 맞춘 의료기기 제작

나. 관련분야 기여도

- 본 연구에서 연구기간동안 골 이식재관련 세계 유일의 원천기술을 포함하여 국제 특허 및 출원이 7건과 국내특허 등록이 3건이 등록 되었음.
- 본 연구를 수행하는 동안 국제 전문 학술지(SCI)에 논문이 16건 게재되었으며, 국내 논문은 7건을 게재하였음.
- ‘오리부리로부터 유래된 세라믹 소재, 소재의 제조기술 및 노하우’는 의료기기 전문 업체인 ㈜에프비바이오세라믹에 전용 실시권으로 기술 이전이 되었음 (2015년 9월 18일).
- 국내에서 연간 1억마리이상의 오리부리가 소각되어 완전 폐기 처분되는 축산부산물을 의료용 생체소재로 재탄생시켜 오리 농가의 소득에 크게 기여할 것으로 생각된다.
- 최근에 인간수명이 길어지면서 다발하는 잇몸질환과 어르신에게 치과 임플란트 시술이 건강보험에도 적용되면서 골 이식재의 수요가 연평균 10%이상이 증가하고 있다. 2015년의 골 이식재 시장은 세계는 3억 8,000달러(약4,200억원)이고, 국내는 366억원이상으로 추정되고 있으며 국내에서 사용하는 치과용 골 이식재는 80%이상을 외국에서 수입하고 있으며, 아시아태평양 시장의 85%를 차지하고 있다. 본 연구의 결과물인 골이식재는 고부가가치 농생명 생명기술이라고 생각된다.
- 오리부리와 말 뼈는 사람의 뼈와 비슷한 칼슘과 인의 구성비로 되어 있고, 다공성이 우수하고 가공하기가 쉬워 다양한 형태의 골 이식재를 만들 수도 있다. 수입대체 효과와 치과 진

료비의 감소, 녹색 환경 및 창조경제 실현 등에 크게 이바지할 것으로 기대된다.

가. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기타	
	출원	등록	SCI	비 SCI										
최종목표	6	2	10	3	-	2	2	-	-	-	-	2	-	
1차년도	목표	2	0	2	1	-	-	1	-	-	-	-	0	-
	실적	3	1	4	1	4	-	1	-	-	5	-	2	-
2차년도	목표	2	0	4	1	-	-	-	-	-	-	-	0	-
	실적	2	0	6	5	15	-	2	-	-	6	-	1	-
3차년도	목표	2	2	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	실적	2	2	6	1	13	1	1	-	-	4	-	2	-
합 계	실적	7	3	16	7	32	1	4	-	-	15	1	5	-
	%	117	150	160	233		50	200	-	-		-	250	-

- 기술거래와 사업화는 연구종료 2년이내에 할 예정이었지만 연구기간내에 1건의 기술을 이전하였음.
- * 단계별 연구성과 목표는 중간평가의 정량적 평가지표로 활용됨
- ** 연구성과는 연구개발계획에 맞춰 도출하고 예시와 같이 작성

나. 지식재산권

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격], 신품종, 프로그램개발 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로) 기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]									
구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	조류부리로부터 유래된 세라믹을 이용한 생체 의료용 및 산업용 재료의 제조 방법	대한민국	최석화 손준식 강성수	2011	10-2011-0 122754	최석화 손준식 강성수	2013	10-129568 6	
발명특허	조류 부리로부터 유래된 세라믹을 이용한 생체 의료용 및 산업용 재료의 제조 방법	대한민국 특허청 서울사무 소	최석화 손준식 강성수	2012	PCT/KR2 012/00997 7				
발명특허	Production method for biomedical and industrial material using ceramic derived from birds beaks	유럽연합 (EU)	최석화 손준식 강성수	2013	EU 12850966.5				
발명특허	Production method for biomedical and industrial material using ceramic derived from birds beaks	미국 (USA)	최석화 손준식 강성수	2014	14/360169 2014.5.22				
발명특허	친환경적 공정으로 제조된 가금류 부리 뼈 유래 천연세라믹 및 이의 제조 방법	한국	최석화 손준식 강성수	2014. 10. 27	10-2014-0 146052				
발명특허	말뼈를 이용한 나노 세라믹 골시멘트 및 이의 제조 방법	대한민국	정종훈 백수정 정연훈 정필훈	2014	10-2014-0 030553	정종훈 백수정 정연훈 정필훈	2014	10-147344 7	
발명특허	말뼈를 이용한 나노 세라믹 골시멘트 및 이의 제조 방법	대한민국	정종훈 백수정 정연훈 정필훈	2011	10-2011-0 006785	정종훈 백수정 정연훈 정필훈	2014	10-138110 8	

다. 논문게재 및 학술회의 발표

(1) 논문게재 성과

논문(국의 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Effects of Electromagnetic Fields on Osteogenesis of Human Alveolar Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells	Journal of Biomedicine and Biotechnology	Ki taek Lim	2013: 296019, 1-14	USA	Hindawi	SCI
2	In Vitro Effects of Pulsed Low-Intensity Ultrasound Stimulation on the Osteogenic Differentiation of Human Alveolar Bone-derived Mesenchymal Stem Cells	Journal of Biomedicine and Biotechnology	Ki taek Lim	2013: 269724, 1-15	USA	Hindawi	SCI
3	Effects of Co-Culture of Dental Pulp Stem Cells and Periodontal Ligament Stem Cells on Assembled Dual Disc Scaffolds	Tissue Engineering and Regenerative Medicine	Je-Duc k Suh, Kitaek Lim	11(1):4 7-58, 2014.2	Korea	KTERM	SCI
4	Synergic Effects of Orbital Shear Stress on <i>In Vitro</i> Growth and Osteogenic Differentiation of Human Alveolar Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells	Biomed Research International	KT Lim	2014, 316803, 1-18	USA	Hindawi	SCI
5	Preliminary evaluation of bone graft substitute produced by bone of duck beak	Materials Letters	JS Son	121, 181-184, 2014	USA	Elsevier	SCI
6	Comparable bone healing capacity of different bone graft matrices in a rabbit segmental defect model	Journal of Veterinary Science	JM Kim	15(2), 289-295, 2014	Korea	Kor Soc Vet Sci	SCI
7	Synergistic Effects of Orbital Shear Stress on In Vitro Growth and Osteogenic Differentiation of Human Alveolar Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells	Journal of Biomedical Research International	KT Lim	2014, 1-18, 2014.1	USA	Hindawi	SCI
8	Density of nanopatterned surfaces for designing bone tissue engineering scaffolds	Materials Letters	J Kim	130: 227-231, 2014.5	USA	Elsevier	SCI

논문(국외 전문 학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
9	Development and Characterization of Fast-hardening Composite Cements using Natural Ceramics derived from Horse Bones and Chitosan Solution Tissue Engineering and Regenerative Medicine	Tissue Engineering and Regenerative Medicine	KT Lim	11(5)::362-371, 2014.10	Korea	KTERM	SCI
10	Antibacterial Releasing Titanium Surface Using Albumin Nanoparticle Carriers	Journal of Nanoscience and Nanotechnology	Son JS	14(11), 8422-8426, 2014	USA	American Scientific Publishers	SCI
11	Manufacture of Duck-beak Bone Particles with Gamma-ray Irradiation for Bone Graft	Tissue Engineering and Regenerative Medicine	SE Kim	11(6), 453-457, 2014	Kor	K T E R M	SCI
12	<i>In Vitro</i> Evaluation of Hydroxyapatite-Coated Titanium Implant with Atmospheric Plasma Treatment	Journal of Nanoscience and Nanotechnology	JS Son	15, 5593-5596	USA	American Scientific Publishers	SCI
13	Nano- and Micro-Scale Oxidative Patterning of Titanium Implant Surfaces for Improved Surface Wettability	Journal of Nanoscience and Nanotechnology	IH Kim	2015	USA	American Scientific Publishers	SCI
14	Hyperosmotic polydixylitol for crossing the blood brain barrier and efficient nucleic acid delivery	Chemical Communications	P Garg,	51(17): 3645-3648 2015.1	USA	Elsevier	SCI
15	Bio-inspired configurable multiscale extracellular matrix-like structures for functional alignment and guided orientation of cells	Biomaterials	WG Bae	69:158-164, 2015.8	USA	Elsevier	SCI
16	Guided extracellular matrix formation from fibroblast cells cultured on bio-inspired configurable multiscale substrata	Data in Brief	WG Bae	5:203-207, 2015.9	USA	Elsevier	SCI

논문(국내 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Cell Image Processing Methods for Automatic Cell Pattern Recognition and Morphological Analysis of Mesenchymal Stem Cells	Journal of Biosystems Engineering	Ki taek Lim	38(1):5 5-63, 2013.3	한국	(사)한국 농업기 계학회	KCI
2	Effects of Micro-Electrical Stimulation on Regulation of Behavior of Electro-Active Stem Cells	Journal of Biosystems Engineering	Ki taek Lim	38(2): 113-1 20, 2013.6	한국	(사)한국 농업기 계학회	KCI
3	Design, Fabrication, and Application of a Microfluidic Device for Investigating Physical Stress-Induced Behavior in Yeast and Microalgae	Journal of Biosystems Engineering	J Kim	39(3):2 44-252, 2014.9	한국	(사)한국 농업기 계학회	KCI
4	Development of Long-Term Storage Technology for Chinese Cabbage - Physiological Characteristics of Postharvest Freshness in a Cooler with a Monitoring and Control Interface	Journal of Biosystems Engineering	KT Lim	39(3):1 94-204, 2014.9	한국	(사)한국 농업기 계학회	KCI
5	Preparation and Characterization of Natural Material Extracted from Germinated Brown Rice	Journal of Biosystems Engineering	KT Lim	39(3):2 35-243, 2014	한국	(사)한국 농업기 계학회	KCI
6	Development and Evaluation of Natural Hydroxyapatite Ceramics Produced from Pig Bones through Heat Treatment	Journal of Biosystems Engineering	KT Lim	39(3):2 27-234, 2014	한국	(사)한국 농업기 계학회	KCI
7	Development and Characterization of Horse Bone-derived Natural Calcium Phosphate Powders	Journal of Biosystems Engineering	KJ Jang	39(2): 122-13 3, 2014.6	한국	(사)한국 농업기 계학회	KCI

(2) 국내 및 국제 학술회의 발표 성과

국내 및 국제 학술회의 발표(학술회의명을 세부적으로 전부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록.- 본 연구과제의 수행결과로 발표한 것만 기재합니다.)					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	국제 TERMIS-AP 2013	J.M. Kim	2013.10.24-26	Shanghai	China
2	국제 TERMIS-AP 2013	J.S. Son	2013.10.24-26	Shanghai	China
3	국제 TERMIS-AP 2013	Shambhavi Pandey	2013.10.24-26	Shanghai	China
4	국제 ICSE 2013	J.S. Son	2013.11.18-21	Busan	Korea
5	국제 2014 The 10 th Asia Pacific Poultry Conference	S.J. Son	2014.10.19-23	Jeju	Korea
6	국제 TERMIS-AP 2014	S.J. Son	2014.9.24-27	Daegu	Korea
7	국제 TERMIS-AP 2014	S.J. Son	2014.9.24-27	Daegu	Korea
8	국제 TERMIS-AP 2014	J.S. Son	2014.9.24-27	Daegu	Korea
9	국제 TERMIS-AP 2014	S.S. Kang	2014.9.24-27	Daegu	Korea
10	국제 TERMIS-AP 2014	H. Sunwoo	2014.09.24.-27	Daegu	Korea
11	국제 ICNST 2014	J.S. Son	2014.11.6-7	Mokpo	Korea
12	국제 TERMIS-EU 2014	S.J. Son	2014.6.10-13	Jenova	Italy
13	국제 TERMIS-EU 2014	J.M. Kim	2014.6.10-13	Jenova	Italy
14	국제 TERMIS-EU 2014	J.S. Son	2014.6.10-13	Jenova	Italy
15	국제 TERMIS-EU 2014	S.S. Kang	2014.6.10-13	Jenova	Italy
16	‘13한국농업기계학회 추계학술대회	WJ Cho	2013.10.31	제주	한국
17	‘14한국농업기계학회 추계학술대회	장경제	2014.10.31	천안	한국
18	‘14한국농업기계학회 추계학술대회	최정문	2014.10.31	천안	한국
19	‘14한국농업기계학회 추계학술대회	염승민	2014.10.31	천안	한국
20	국제 Hybrid Materials 2015	S.J. Son (P1.074)	2015.3.9-13	Sitges	Spain
21	국제 Hybrid Materials 2015	J.S. Son (P1.307)	2015.3.9-13	Sitges	Spain
22	국제 Hybrid Materials 2015	J.S. Son (P1.308)	2015.3.9-13	Sitges	Spain

국내 및 국제 학술회의 발표(학술회의명을 세부적으로 전부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록.- 본 연구과제의 수행결과로 발표한 것만 기재합니다.)					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
23	국제 2015 Organ Donation Congress	J.Y. Lee (P572)	2015.10.17-20	Seoul	Korea
24	국제 2015 Organ Donation Congress	J.Y. Lee (P573)	2015.10.17-20	Seoul	Korea
24	국제 2015 Organ Donation Congress	J.Y. Lee (P574)	2015.10.17-20	Seoul	Korea
29	국제 Hybrid Materials 2015	J.S. Son	2015.3.9 - 13	Sitges	Spain
30	국제 Hybrid Materials 2015	J.S. Son	2015.3.9 - 13	Sitges	Spain
31	‘15한국농업기계학회 춘계학술대회	이명철	2015.04.29-30	전주	Korea
32	OMICS	선우 훈	2015.08.17-18	Chicago	USA

라. 기술거래 및 기술료

기술거래(이전)					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	전용 실시	조류부리로부터 유래된 세라믹 소재, 소재의 제조 기술 및 노하우	에프비바이오세라믹스(주)	2015. 9. 18	

마. 교육 및 지도활동 내역

교육 및 지도활동 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	메디컬 섬유&바이오 소재 리더스 포럼	유인물	생체재료의 동물실험방법	2013. 8. 29
2	아시아태평양 조직공학재생학회	학술대회 프로시딩	팔 결손부위에 인공 골이식재의 적용	2014. 9. 24.
3	아시아태평양 가금국제학술 대회	학술대회 프로시딩	조류 부리를 이용한 생체 소재의 개발	2014. 10. 19
4	한국임상수의학회 춘계학술대회	학술대회 프로시딩	Evaluation of bone healing capacity and oxidantive stress status of PCL/PLGA/duck scaffold in a rabbit model with critical bone defects (P-48-OS)	2014. 5. 16.

바. 사업화

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용창출	R&D 기여율

사. 기술 및 제품 인증

기술 및 제품 인증						
구 분	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		

아. 인력활용/양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력양성	2013	1	1	2	1	4	1	2	3	-	-	-
2	인력양성	2014	1	2	2	1	4	2	2	3	-	1	-
3	인력양성	2015	-	1	2	1	2	2	2	2	-	-	-

자. 정책활용 내역

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도
1	농정시책 반영	교육부	창의적 지식재산권 실용화사업 시제품제작비 수혜	2015

차. 홍보/전시

(1) 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	신문	충북일보의	농기평(IPET) 기획연구 과제 수주	2012. 12. 6
2	신문	뉴시스외	메디컬 섬유 & 바이오 소재 리더스 포럼 참가	2013. 8. 25
3	신문	충청타임즈외	성봉수의학술제 교육대상 수상	2015. 11. 4
4	신문	충청일보의	치과용 끝 이식재의 기술이전	2015. 12. 10

(2) 전시회 등 참여

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	전시회	메디컬 섬유 & 바이오 소재 리더스 포럼	생체소재 시제품	대구	2013

(3) 기타 활용 및 홍보실적

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용계획

가. 연구성과의 활용계획

- 생체소재의 제조 공정을 환경 친화적인 방법으로 개발하여 개선된 생체소재의 제조 방법을 국내외에 특허를 출원하였거나 등록할 예정임.
- 열처리 온도 및 입자 크기를 조절한 골 이식재의 대한 연구로 골 이식재에 관한 연구 레퍼런스로 사용될 가치가 있음.
- 줄기세포의 골 분화에 관한 연구 성과를 통해 심도 있는 골 조직 재생 연구 및 골이식재가 포함된 줄기세포 치료법 개발에 활용 계획임.
- 초미세분말을 포함한 골 재생용 지지체개발 및 지지체의 물리화학적 특성 및 생체적합성 등을 조사하는 향후 연구 논문에 기초 자료로 활용할 계획임
- 초미세분말과 각종 기능성 화합물을 포함하는 골 이식재 개발에 기초 자료 및 원료 물질로 활용할 계획임
- 최근 조직공학용 3D bio-printer가 활발히 연구개발 되고 있는 가운데, 본 연구를 통하여 얻어진 초미세분말 및 시멘트 제조기술을 활용하여 동물뼈 분말을 포함하는 골 조직 재생용 3D 지지체 개발 연구에 활용할 가능성이 높음.
- 말뼈를 이용하여 얻어진 입도 크기별 분말을 이용하여 제조한 골 시멘트에 대한 연구 결과를 활용하여 국내외 전문학술지에 투고할 예정임.
- 골시멘트 관련 특허와 연구 논문을 기반으로, 기능성 골 재생용 골시멘트 개발에 대한 연구 과제 신청 계획중임.

나. 실용화 계획

- 지적재산권인 ‘조류부리로부터 유래된 세라믹 소재, 소재의 제조기술 및 노하우’를 의료기기 전문업체인 에프비바이오세라믹스(주)에 기술 이전을 하였고(2015년 9월 18일), 이전 업체가 사업화를 추진하고 있음.
- 오리부리는 체외로 노출되어 있어 쉽게 절취할 수 있고 전량이 완전 폐기되고 있어, 구제역(FMD)과 광우병에 노출되어 있는 소와 돼지에서 재료를 구매하는 것 보다 가격과 원료 확보에서 산업화에 아주 유리한 조건임.
- 현재 보유중인 골 이식재의 원재료 개발 및 골시멘트 제조 관련 특허를 활용하여 의료기기 전문업체와 함께 골이식재 제품화를 추진 중임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

(1) 연구논문의 수집

연도	제 목	저자	저널	참고내용
2012	Substituted hydroxyapatites for bone repair	Shepherd J.H. et al	Journal of Materials Science: Materials in Medicine	수산화인회석 계열의 골 이식재 전반에 관한 내용 참고
2013	A nano-hydroxyapatite - Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering	Fricain J.C. et al	Biomaterials	나노 크리스탈을 가진 수산화 인회석이 골조직 회복에 도움을 줌
2013	A novel low temperature sol-gel synthesis process for thermally stable nano crystalline hydroxyapatite	Bakan F et al.	Powder Technology	나노 크리스탈을 가진 수산화 인회석의 줄겔 제조방법에 관한 논문. 나노 크리스탈 수산화 인회석을 물성을 참고
2013	Comparative studies on ectopic bone formation in porous hydroxyapatite scaffolds with complementary pore structures	Wang H. et al.	Acta Biomaterialia	수산화 인회석 지지체의 기공구조가 골 형성에 미치는 영향에 대한 연구
2014	Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape	Lin K. et al	Acta Biomaterialia	인회석 계열의 재료의 결정구조에 대한 참고
2014	Effect of nano-structured bioceramic surface on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells	Xia L. et al.	Biomaterials	나노구조 표면을 가지는 Bioceramic에서 골조직 형성 연구에 대한 참고
2014	Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits	Yang C. et al.	Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials	Biodegradation 되는 생체소재의 대한 동물 연구 참고
2015	Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties	Kane R.J et al.	Acta Biomaterialia	콜라겐과 수산화 인회석의 혼합체에 대한 연구, 혼합물 물성에 관한 연구 부분 참고
2015	Effects of adding resorbable chitosan microspheres to calcium phosphate cements for bone regeneration	Meng D. et al	Materials Science and Engineering C	키토산의 골 조직 재생과 관련된 연구분야 참고

(2) 해외특허 참고

연도	제 목	발명인	출원국	참고내용
2012	Composite bone graft material	Simon, Bruce J. 외 2인	유럽연합 (E.U)	뼈 이식물의 성분등 제조법을 참고
2013	Bioactive Bone Graft Substitutes (생물 체에 작용한 골 이식물 서브스티튜트)	Jevon Nyemsce k 외 2인	미국	동물뼈의 탈지 및 감염방지 기술 참고
2015	Bone Grafts and Methods of Making and Using Bone Grafts (골 이식물을 제조하고 사용하는 골 이식물과 방법)	Ophir Ortiz 외 3인	미국	DBM제작 과정 참 고 및 크리스탈 크 기 조절 기술에 관 한 참고

제 7 장 연구시설 장비 현황

연구기자재 및 연구시설	규격	수량	활용용도	확보상태	비고
Multimeter	Yokokawa 73302	1대	계측용	확보	-
Microscope	Nikon TS-100	1대	세포배양실험용	확보	-
음이온추정장비	inti ITC-20	1대	음이온 추정용	확보	-
Chlorophyll meter	Minolta SPAD-502	1대	엽록소 측정용	확보	-
Refractometer(sugar)	DBR-SA-1	1대	당 측정용	확보	-
전기방사시스템 (1)speed controller (2)DC High-V Generator (3)Metal drum controller	SPG-S8KA20B CPS-40K03VIT CPS-mpc95	1대 1대 1대	스케폴드 제작용	확보	-
냉장고	Lassele LD-1140RF	1대	세포배양 실험용	확보	-
전계측정기	PULSE E-TESTER	1대	전계 측정용	확보	-
자계측정기	PULSE PSMA-01A	1대	자계 측정용	확보	-
Centrifuge	대한과학 HA1000-6	1대	세포배양실험용	확보	-
Stirrer	대한과학 MSH-10	1대	스케폴드 제작용	확보	-
Function Generator	Agilent 33220A	1대	계측용	확보	-
Clean Bench	한백 HB-4025MD	1대	세포배양실험용	확보	-
Autoclave	대한과학 ST-01045	1대	세포배양실험용	확보	-
Furnace	대한과학 CLF-M20	1대	재료 열처리용	확보	-
Incubator	존샘	1대	세포배양실험용	확보	-
Electrophoresis system	Consort E835	1대	스케폴드 제작용	확보	-
액체질소저장탱크	MVE 2000 XC20	1대	세포배양 실험용	확보	-
분쇄기	IKA-WERKE A10	1대	분쇄용	확보	-
건조기	한성공업 HSD-360	1대	건조용	확보	-
적외선수분계	Kett FD-600	1대	수분측정	확보	-
조직분석기	식품용	1대	강도측정	확보	-
영상처리장치	영상 계측용	1대	생육검사	구입	-
살균장치	오존	1대	물살균검사	제작	-
전류처리장치	DC	1대	생리활성	제작	-
초음파장치	검사용	1대	생리활성	제작	-
전기장장치	전기 실험용	1대	전기측정	제작	-
데이터수집장치	NI-labview	1대	데이터수집	구입	-
pH 측정장치	Metter-toledo GmbH	1대	pH측정용	구입	-
DO 측정장치	Ingold Electrodes	1대	DO측정장치	구입	-
Glucose측정장치	Glucose 측정용	1대	장기배양 측정용	구입	-
이온 센서	이온농도 측정	1대	배지 모니터링용	구입	-

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

● 충북대학교

1. 2012년도

가. 대상기간: 2012년 1월 1일 - 6월 30일

- 1) 전반기 실험실 일상점검 실시 (온라인 점검 및 점검표 점검)
- 2) 전반기 신규 연구원 안전교육 실시

나. 대상기간: 2012년 7월 1일 - 12월 31일

- 1) 후반기 실험실 일상점검 실시 (온라인 점검 및 점검표 점검)
- 2) 후반기 신규 연구원 안전교육 실시

2. 2013년도

가. 대상기간: 2013년 1월 1일 - 12월 31일

- 나. 정기 실험실 일상점검 실시 (온라인 점검 및 점검표 점검)
- 다. 자체 정기 안전교육 훈련 실시 (6시간 이상)
- 라. 신규 연구원 안전교육 실시

3. 2014년도

가. 대상기간: 2014년 1월 1일 - 12월 31일

- 나. 정기 실험실 일상점검 실시 (온라인 점검 및 점검표 점검)
- 다. 자체 정기교육 훈련 실시(6시간 이상)
- 라. 신규 연구원 안전교육 훈련 실시

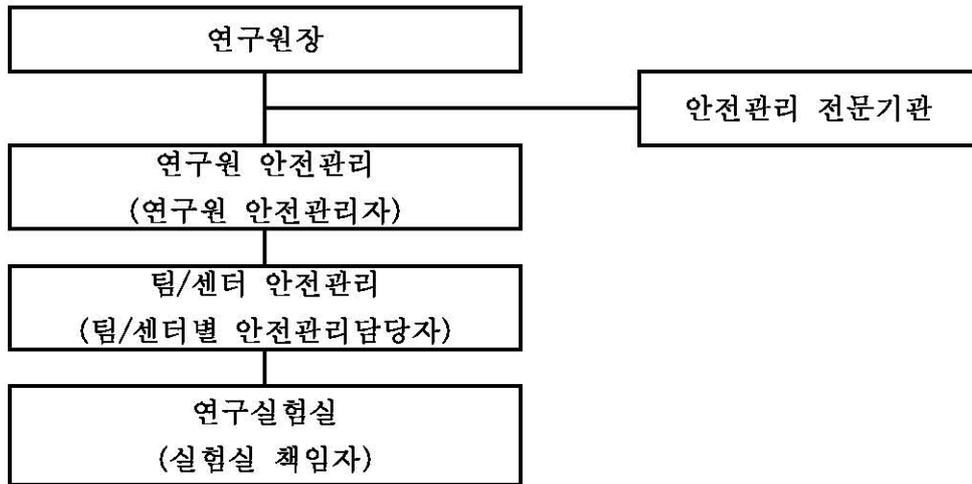
4. 2015년도

가. 대상기간: 2015년 1월 1일 - 6월 30일

- 나. 정기 실험실 일상점검 실시 (온라인 점검 및 점검표 점검)
- 다. 자체 정기교육 훈련 실시(6시간 이상)
- 라. 신규 연구원 안전교육 훈련 실시

● 한국섬유개발연구원

1. 연구원 안전관리조직



2. 연구자 안전&보건 교육

구분	교육시기	교육대상	교육자
안전교육	1회/월	연구활동 종사자	전문기관
보건교육	1회/월	연구활동 종사자	전문기관

3. 연구실 안전점검 및 보수

구분	점검주기	점검대상	점검자
일상점검	1회/일	분석 시험실	시험실 관리자
정기점검	2회/월	Pilot/시제품 시험실	전문기관

4. 연구활동자 건강검진&상해보험

구분	내용	대행기관	비고
건강검진	인체에 치명적인 위험물질, 소음 등 정기적 인체피해상황에 노출될 위험성이 있는 종사자	특수건강진단 기관	1회/연
상해보험	연구활동자의 인체피해에 대한 안정적 지원	보험전문기관	년중

5. 기타

구분	내용	비고
연구실 안전관리규정	연구실 안전관리규정 비치	안전관리자
연구실 안전시설 보수	실험기동 작동 점검 및 보수	보전관리자
연구실 출입자 관리	연구실 출입자 관리	행정지원팀
화학약품 관리	연구실별 보유 화학약품 보관&폐기관리	
실험폐기물 관리	실험폐기물처리 준수사항 이행 및 관리	
MSDS관리	연구실별 화학약품의 MSDS 비치	
가스 안전관리	가스안전시설 설치 및 관리	
연구실 소화시설 설치	위험성이 큰 실험실에 소화설비 설치&관리	

● 서울대학교

- 실험실 안전관리는 서울대학교에서 발간한 '2014년도 서울대학교 연구실험실 안전관리 이행 계획'에 근거하여 시행하였다.

A유형 실험실	B유형 실험실	C유형 실험실	D유형 실험실	합계
310	345	303	223	1,181

* 실험실 분류 기준 :

- A형: 미생물 및 동물(LMO), 방사성동위원소 물질 등을 사용하는 실험실
- B형: 화학약품 등을 사용하는 실험실
- C형: 기계·전기 설비 등을 사용하는 실험실
- D형: 실험·실습을 수행하지 않는 설계·컴퓨터 관련 등의 실험실

그림 8-1. 2013년 서울대학교 안전점검 실험실 수
(출처:2014년도 서울대학교 연구실험실 안전관리 이행계획)

- 본 연구팀은 B유형 실험실에 해당하며, 이행계획에 근거하여 사고대응 매뉴얼(연구실 사고 대응 매뉴얼, 2014.09, 미래창조과학부 연구환경안전팀)을 비치하고 분기당 교육을 1회 실시하였다.

● 아주대학교

- 본 연구팀은 아주대학교 실험실 안전관리 규정을 근거하여 실험실 안전 체계를 확립하여 시행하였음.

※ 관리위험등급

- A등급 : 가연성가스, 미생물 및 동물, 인화성시약, 독극물, 방사성 동위원소, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 발열성 기계장비
- B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

그림 8-2. 아주대학교 실험실 관리위험등급표

- 본 연구팀은 실험동물을 관리하는 A등급의 연구실로 분류되어 있음. A등급 안전 점검 체제에 따라 연구책임자는 1회/일, 연구실 1회/분기의 규정에 따라 안전 점검을 하였다.

● 국제치아줄기세포은행 주식회사

- 본 연구팀은 ‘연구실 안전환경 조성에 관한 법률 시행령 (약칭: 연구실안전법 시행령)’에 의거하여 실험실 안전관리를 이행함.
- 본 연구팀은 실험실 안전사고 사고대응 매뉴얼(연구실 사고대응 매뉴얼,2014.09, 미래창조과학부 연구환경안전팀)을 비치하고 분기당 교육을 1회 실시하였다.

제 9 장 참고문헌

- Artzi Z, Nemcovsky CE. The application of deproteinized bovine bone mineral for ridge preservation prior to implantation. Clinical and histological observations in a case report. *J Periodontol* 1998; 69: 1062-1067.
- Balsly CR, Cotter AT, Williams LA, et al. Effect of low dose and moderate dose gamma irradiation on the mechanical properties of bone and soft tissue allografts. *Cell Tissue Banking* 2008; 9; 289.
- Benson RS. Use of radiation in biomaterials science. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 2002; 191; 752.
- Chang MC, Tanaka J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomater* 2002; 23; 4811.
- Choi SH, Son JS, Kang SS, Lee CH. PCT/KR2012/009977 patent; 2012.
- Costain DJ, Crawford RW. Fresh-frozen vs. irradiated allograft bone in orthopaedic reconstructive surgery. *Injury* 2009; 40; 1260.
- Cornu O, Banse X, Docquier P, et al. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone. *J Orth Res* 2000; 18; 426.
- Currey JD, Foreman J, Laketiæ I, et al. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orth Res* 1997; 15; 111.
- Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 1996; 35; 413.
- Endres S, Kratz M. Gamma irradiation. An effective procedure for bone banks, but does it make sense from an osteobiological perspective. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; 9; 25.
- Ehrler DM, Vaccaro AR. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 371; 38-45.
- Figueiredo M, Gamelas J, Martins A. Characterization of bone and bone-based graft materials using FTIR spectroscopy. In: Theophanides T. ed. *Infrared spectroscopy-Life Biomed Sci*. Rijeka: In Tech 2012; 315.
- Fleet ME, Liu XJ. Carbonate apatite type A synthesized at high pressure: new space group and orientation of channel carbonate ion. *J Solid State Chem* 2003; 174; 412-417.
- Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg* 1995; 3; 1-8.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36; S20.

- Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9; 151-162.
- Herliansyah MK, Muzafar C, Tontowi AE. Natural Bioceramics Bone Graft: A Comparative Study of Calcite Hydroxyapatite, Gypsum Hydroxyapatite, Bovine Hydroxyapatite and Cuttlefish Shell Hydroxyapatite. *APIEMS* 2012: 1137-1146.
- Im AL, Chung JH, Lim KT, Choung PH, Hong JH. *J Biosyst Eng* 2007; 32; 50-56.
- Kalfas IH. Principles of bone healing, *Neurosurg Focus* 2001; 10; 1.
- Kim SE, Shim KM, Choi SH, Jeong SI, Son JS, Lim YM, Kang SS. Manufacture of Duck-beak Bone Particles with Gamma-ray Irradiation for Bone Graft. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2014; 11; 453-457.
- Kim SH, Shin JW, Park SA, et al. Chemical, structural properties, and osteoconductive effectiveness of bone block derived from porcine cancellous bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 68; 69.
- Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001; 71; 354.
- Miculescu F, Stan GE, Ciocan LT, Miculescu M, BerBecaru A, Antoniac I. Cortical bone as resource for producing biomimetic materials for clinical use. *Dig J Nnanomater Bios* 2012; 7; 1667-1677.
- Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes, *Periodontol* 1999; 19; 74.
- Nguyen H, Morgan DA, Forwood MR. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell Tissue Banking* 2007; 8; 93.
- Nguyen H, Morgan DA, Forwood MR. Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? *Cell Tissue Banking* 2007; 8; 81.
- Ooi CY, Hamdi M, Ramesh S. Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone. *Ceram Inter* 2007; 33; 1171-1177.
- Paschalis E, DiCarlo E, Betts F, et al. FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone, *Calcif Tissue Int* 1996; 59; 480.
- Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog* 2009; 25; 1539.
- Schimandle JH, Boden SD. Bone substitutes for lumbar fusion: present and future. *Oper Tech Orthop* 1997; 7; 60.
- Son JS, Jang SH, Kwon TY, Kim KH, Kang SS, Choi SH. Preliminary evaluation of bone graft substitute produced by bone of duck beak. *Materials Letters* 2014; 121; 181-184.

- Son JS, Lee KB, Kim SG, Kwon TY, Kim KH. Porous calcium phosphate granules containing drug-loaded polymeric nanoparticles for bone regeneration. *Mater Lett* 2012; 76; 243-246.
- Stanciu GA, Sandulescu I, Savu B, Stanciu SG, Paraskevopoulos KM, Chatzistavrou X, et al. Investigation of the Hydroxyapatite Growth on Bioactive Glass Surface. *J Biomed Pharm Eng* 2007; 1; 34-39.
- Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res* 1998; 13: 94-117.
- Sukumar S, Drizhal I. Bone grafts in periodontal therapy. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2008; 51; 203.
- Suzuki Y, Matsuya S, Udoh K, Nakagawa M, Tsukiyama Y, Koyano K, Ishikawa K. Fabrication of hydroxyapatite block from gypsum block based on $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ treatment. *Dent Mater J* 2005; 24; 515-521.
- Voggenreiter G, Ascherl R, Blümel G, et al. Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts, *Arch Orthop Trauma Surg* 1994; 113; 294.
- Yoo D, Giulivi A. Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses. *Can J Vet Res* 2000; 64; 193.
- Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 1998; 9; 723-726.
- 김대준, 김현이. 2005. 수산화아파타이트 경조직대체 생체세라믹스의 특성 및 합성. *Journal of the Korean Ceramic Society*. 18(5): 45~53.
- 이무성, 나춘기, 박희열, 김옥배, 권문선, 1998. 중금속 오염 정화용 무기이온교환체로서 천연 수산화아파타이트(동물뼈)의 재활용성에 관한 연구. *J.Korea Solid Wastes Eng. Society Vol 15(1)*: 66~75.
- 심중식, 태산솔루션(주). 2003. 생체적합성이 뛰어난 이중 골수복제의 개발. 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 최종보고서.
- 김철영, 최상홀, 고재성. 1994. 표면활성 세라믹스의 개발. 한국과학재단 연구결과보고서.
- 정필훈. 1999. 동물 뼈를 이용한 골 대체물의 제조방법. 대한민국 특허청, 특허등록번호 1003934690000 (2003. 7. 22).
- JH Shepherd, DV Shepherd, SM Best. 2012. Substituted hydroxyapatites for bone repair. *Journal of Materials Science*. Vol 23(10): 2335~2347.
- Jean Christophe Fricain, Silke Schlaubitz, Catherine Le Visage, 외. 2013. A nano-hydroxyapatite - Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials*, Vol 34(12): 2947~2959.
- Feray Bakan, Oral Laçın, Hanifi Sarac. 2013. A novel low temperature sol-gel

synthesis process for thermally stable nano crystalline hydroxyapatite. Powder Technology. Vol 233:295~302.

- Hao Wang, Wei Zhi, Xiong Lu, 외. 2013. Comparative studies on ectopic bone formation in porous hydroxyapatite scaffolds with complementary pore structures. Acta Biomaterialia. Vol 9(9): 8413~8421.
- Kaili Lin, Chengtie Wu, Jiang Chang. 2014. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. Acta Biomaterialia. Vol 10(10): 4071~4102.
- L Xia, K Lin, X Jiang. 2014. Effect of nano-structured bioceramic surface on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells. Biomaterials. Vol 35(30): 8514~8527.
- C Yang, O Unursaikhan, JS Lee. 2014. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. Vol 102(1): 80~88.
- RJ Kane, HE Weiss-Bilka, MJ Meagher. 2015. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. Acta biomaterialia. Vol 17: 16~25.
- D Meng, L Dong, Y Wen. 2015. Effects of adding resorbable chitosan microspheres to calcium phosphate cements for bone regeneration. Materials Science and Engineering: C. Vol 47: 266~272.
- Bruce J. Simon, Robert M. Ronk, Paul D'Antonio, 외. 2009. Composite bone graft material. 미국. 특허번호(US 7621963 B2).
- Jevon Nyemscek, Vipin Kunjachan, Allison Adams. 2013. Bioactive Bone Graft Substitutes. 미국. 특허번호(US 20130331898 A1).
- Ophir Ortiz, Archana Bhat, Allison Adams, 외. 2015. Bone Grafts and Methods of Making and Using Bone Grafts. 미국. 특허번호(US 20150223937 A1).

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

○ 특허 분석

- 대다수의 특허는 화학처리에 의한 바이오 세라믹을 제조하고 있으며, 축산 부산물을 이용한 고부가가치의 바이오 세라믹재료 개발 방향으로 연구를 추진하여 제조기술, 생산시스템 설계, 응용기술 등을 국내외에 출원하고 있음.
- 아파타이트계 바이오세라믹 합성물질은 생체재료로서 이용 가능하여 화학시 약의 부분적인 치환도 가능함. 특히, 인공뼈의 재료는 알루미나가 주류인데 다결정 알루미나제와 단결정 알루미나제가 사용되고 있음.
- 국내의 골이식재 제조에 관한 것은 2010년대 이래로 소, 돼지를 제외한 다른 동물에서 얻어진 골이식재의 제조에 관한 특허들이 등록되고 있음.
- 국내에서 골이식재관련 특허는 소 뼈를 이용한 골이식 대체재 및 그 제조 방법(2002. 3. 25)과 이종골을 이용한 골 대체물의 제조방법(2003. 7. 22, 2013. 12. 26), 돼지 뼈를 이용한 골이식재 제조방법(2013. 6. 3, 2014. 3. 25), 참치 뼈 유래 수산화인회석의 제조 방법(2012. 10. 16), 갑오징어 뼈를 이용한 골이식재 및 이의 제조방법(2015. 11. 16) 등으로 다양한 생물자원을 활용하고 있음.
- 해외에서는 소뼈(미국 31,584건, 유럽 5,889건, 일본 75건)를 이용한 골이식재가 가장 많은 등록과 출원이 되고 있으며, 이러한 결과는 연구 논문의 검색 결과와도 비슷하며, 가축의 사육 두수가 많은 소를 중심으로 골이식재 시장이 형성되어 있는 것을 알 수 있음.
- 돼지 뼈 유래 골이식재는 미국이 9,375건으로 가장 많이 출원과 등록되어 있으며 유럽 1457건, 일본 43건이 등록 또는 출원되어 있음.
- 미국은 이종골 이식재관련 특허가 유럽에 비해 3.5배, 일본에 비해 400배 정도의 많은 특허를 보유하고 있음.
- 그러나, 축산부산물로부터 산화칼슘을 제조하고, 이를 화학적 수식을 통해 체내에서 이용 가능한 칼슘 화합물로 제조하여, 칼슘 공급원으로서의 생물학적 유용성과 타당성을 조사함으로써 체내에서의 흡수율을 증가시킬 수 있는 제품 개발 기술도 필요함.
- 축산부산물로부터 소결한 뼈가루(bone powder)인 세라믹 생체재료는 골대체물로 또는 골 시멘트(bone cement)의 재료인 골분(bone powder)으로 직접 사용 가능함. 이것으로 골지지체(Bone scaffold)를 만드는데 사용되고, 수산화인회석을 화학적으로 제조하는 데 사용됨. 이러한 생체재료의 응용연구 및 기술도 요구되고 있음.
- 축산부산물은 대부분 칼슘화합물로 이루어져 있어 이를 활용하면 현재 수입에

대부분을 의존하고 있는 칼슘 화합물들을 국내에서 자체 생산할 수 있을 것으로 생각됨.

○ 논문 분석

- 국내외를 막론하고 동물에서 얻은 무기 소재인 뼈를 이용한 골이식재 개발에 관한 연구가 다양하게 활발히 진행되고 있음.
- 현재(2015. 12. 16) Scopus의 키워드 검색(www.scopus.com)에서 소뼈가 1,327건으로 가장 많으며 돼지 525건, 조류 39건, 말 뼈 133건으로 검색되어, 전세계적으로 사육두수가 많은 소의 뼈를 이용한 골이식재에 관한 연구가 가장 활발하게 이루어진 상태임.

○ 제품 및 시장분석

- 국내외 시장을 분석한 결과 고가의 인공 바이오 세라믹 재료 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 고가로 인해 사용량에 한계가 있음.
- 현재 국내에서 유통되고 있는 대표적인 이종골 이식재는 NIBEC사 (말, 소)과 Geistlich사 (소), 푸르고 바이오로직스사 (돼지), inoteb사 (산호)가 있지만 대부분의 이종골 이식재가 소뼈를 이용하여 만들어져 있음을 알 수 있음.
- 소뼈 유래 골이식재는 국내에서는 Ostec (Biocera-F, 100% 해면골 사용; InduCera, 코팅기술을 적용 해 골재생 능력을 높임), 셀로메드(면역거부 인자 및 전염성 바이러스 등을 제거) 등이 대표적이며 미국 제품으로는 Sigmagraft (저온 살균 공정을 거쳐 내부 표면적을 높임), Biomet3i (비흡수성 물질로 흡수되어서는 안되는 부위의 골재생에 탁월함)가 있으며, 독일 제품으로는 Botiss(2년 이상의 성숙한 소를 이용하여 해면골의 비중이 높음)가 있음.
- 대부분 수입에 의존하는 바이오 세라믹 재료는 부가가치가 대단히 높아서 축산 부산물을 재활용한 칼슘 화합물의 대량 제조시스템 개발은 경제적으로나 산업적 측면으로 효과를 가져올 것이 명확한 사실임.
- 축산부산물의 생물자원을 재활용한 생체재료를 확보하고, 이를 조직공학용 생체조직 및 생체기관의 제품 실용화를 통해서 손상된 기관(뼈, 연골 등)의 일부분을 대체할 수 있는 바이오산업 기술에 기여하리라 사료됨.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업(오리 및 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 개발)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업(오리 및 말뚝을 이용한 골대체재용 생체소재의 개발)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.