

성전에서 임프란트 매식시 골형성단백 사용에 따른 골재생에 관한 연구

전남대학교 치과대학 보철학교실* · 구강의과학교실**

조진희 · 방몽숙* · 이증호**

I. 서 론

치아 상실 후에 일어나는 조직의 변형으로 인하여 보철물을 성공적으로 장착해 주기 어려운 경우에 구강전정 성형술, 골이식 또는 이물 성형술 등을 통하여 심하게 흡수된 치조제를 회복시켜주는 외과적 술식이 이용되어 왔다. 그러나 이러한 외과적 술식을 이용한 보철치료에는 한계가 있어 치과 영역에서 상실된 조직을 수복하는 방법으로 임프란트 보철이 시행되었다.¹⁻³⁾ 그러나 임프란트 주위 결합조직의 감염이나 골흡수 등으로 인하여 만족할 만한 결과를 얻지 못하였다.⁴⁾

스웨덴의 Bränemark^{5,6)}는 가토에서 골치유 과정을 밝히기 위해 골과 골수의 반응을 연구한 결과, 골과 금속간의 직접적인 결합현상을 발견하여 골유착의 개념을 보고하였다. 이후 골유착을 얻기 위한 요소로 환자의 선택, 재료의 새체 적합성, 주의 깊은 외과적 기술, 완전한 치유가 일어날 때까지 하중 전달을 피해야 한다는 등의 원칙이 정립되어져 왔다⁷⁾. 골유착을 얻기 위해서는 재료선택이나 세심한 술식 이외에도 치조골의 형태가 적절하고 질이 좋아야 하나, 발치후 급속한 치조골의 흡수^{8,9)}로 인하여 골이 완전히 치유된 후 부적당한 골 형태를 갖거나 또는 부적절한 위치에 임프란트를 매식하게 되면 임프란트가 노출되거나 심미적으로

불량한 경우가 발생하므로 발치후 치조골을 보존하기 위한 노력이 계속되었다.¹⁰⁾ 이러한 문제점을 해결하기 위해 생체 적합성이 우수한 다양한 인공 대체재가 개발되고 있다. 경조직에 대한 대체재로 성장하여 생체 고정을 얻을 수 있는 hydroxyapatite (HA)와 같은 생체 활성화 재료에 대한 연구¹¹⁻¹³⁾가 진행되어 Chiroff등¹⁴⁾은 동물에 골결손부를 만들고 HA 입자를 넣어 골형성 정도를 관찰하였다. Melcher와 Dreyer¹⁵⁾는 쥐의 대퇴골의 골결손부에 cellulose acetate shield를 적용할 경우에 골성장이가 빠르게 진행된다고 하였고, Todescan등¹⁶⁾은 쥐의 상악 제1대구치를 발제한 후에 임프란트를 매식하고 골분말도 교원질을 피개한 결과 임프란트와 골 사이에 대체재가 위치하는 것이 유리하다고 보고하였다.

골결손부에 대한 수복 물질로 여러 동물 조직이 사용되어 왔으며, 최근에는 소뼈를 다양한 방법으로 가공 처리하여 비교적 항원성이 적고 저장 가능한 이종골이 개발되었다. 교원질기질은 소뼈에서 무기질 성분을 제거한 단단한 교원질로서 면역 반응이 없고 골재생을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. Rutherford등²⁴⁾은 발치 직후 발치와에 어떤 외과적인 과정 없이 교원질기질만 충전한 경우보다 골형성단백과 교원질기질을 혼합하여 충전하고 임프란트를 매식한 경우에 신생골 형성이 훨씬 왕성하게

일어난다고 보고하였다.

그러나 이들 인공 이식재료들은 골유도(osteinduction) 능력을 갖지 못하여 자가골 이식과 같이 확실한 골대체제라고 할 수는 없다. 예전부터 골결손부의 수복 방법으로 생체 적합성이 우수한 신선 자가골 이식이 사용되었으나, 이식골 채취를 위한 부가적인 수술이 요구되고 채취량에 한계가 있어 여러 동물의 뼈를 다양한 방법으로 가공처리하여 비교적 항원성이 적고 저장 가능한 이종골이 개발되었다.¹⁷⁻²⁰⁾ 즉 골과 골수세포의 조정과 분화를 유도하는 골형성단백이 추출되어 골결손부에서 골대체제²¹⁻²³⁾로 사용되어 좋은 결과를 얻게 되었다. 또한 Urist⁴⁵⁾은 소의 탈회골기질에서 추출 정제한 골형성단백은 분자량 $18,000 \pm 500$ 의 산성 당단백질로 되어 있다고 하였으며, 골형성단백이 골조직을 형성하는 성자자리에 착안하여 골결손부에 골형성단백을 이식한 실험을 시행하여 양호한 결과를 얻었다고 하였다. 골형성단백의 골형성 기전을 살펴보면 골형성단백이 미분화된 간엽 세포에 작용해 연골세포로 분화되고, 연골 기질을 형성해 계속된 석회화를 통해 골을 유도하는 것으로 알려져 있다.

현재 치과영역과 정형외과를 비롯한 여러 분야에서 골형성단백에 대한 기초적 및 임상적 연구가 활발히 진행되고 있다. 임프란트 매식시 골의 양이 충분치 못하여 임프란트가 노출될 경우에 골형성을 유도하는 골형성단백을 골결손부에 충전하면 임프란트를 지지할 수 있는 충분한 골형성을 유도할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 아직까지 임프란트 매식시 주위에 생긴 골결손부나 간극에서 골형성단백이 골재생에 미치는 영향에 관한 연구는 많지 않았다. 본 연구는 임프란트 매식시 발생한 골결손부에 골형성단백과 골기질젤라틴 그리고 교원질기질을 충전하였을 때 신생골 형성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 시행되었다.

II. 실험재료 및 방법

가. 실험재료

실험 동물은 영구치가 완전히 맹출되고 체

중이 15kg 내외인 성견 7마리를 사용하였으며, 직경 3.3mm, 길이 8.0mm의 Titanium Plasma Sprayed IMZ 임프란트(IMZ®, Friedrichsfeld, Germany)를 14개 사용하였다.

골결손부의 대체재로는 소의 대퇴골에서 추출한 골형성단백과 골기질젤라틴 그리고 교원질기질(Osteovit®, Sigma Co., U.S.A)를 사용하였다.

나. 실험방법

1. 골형성단백의 추출

소의 신선한 대퇴골의 치밀골을 동결 건조하여 잘게 부순 뒤 수세하여 1:1 비율의 CM 용액(chloroform : methanol=1:1)을 이용하여 지방질을 제거하였고, 0.6N HCl용액에서 72시간 탈회 시키고 세척하였다. 2M CaCl₂용액에 1시간, 0.5MEDTA용액에서 1시간 담근 후 수세하였다. 10mM Nethylamid와 benzamidine HCl를 포함한 CaCl₂를, urea용액에서 혼합 진탕한 다음 40,000 RPM으로 20분간 원심분리 후 세척하였다. 0.5M CaCl₂와 6M urea에 용해시킨 후 citric acid buffer로 투석하고 원심분리한 후 CM용액에서 지방질을 제거하고 냉동건조기에서 골형성단백을 추출하였다.

골형성단백의 검색은 hydroxyapatite chromatography로 관찰한 결과 18,100의 분자량을 나타냈다.

2. 발치

Xylazine (Rampu®, Bayer Co., Korea) 2.5 cc와 Ketamine (Ketara®, Yu-Han Co., Korea) 15mg을 근육 주사하여 마취를 유도하고 기관 튜브를 삽입한 후 Halothane-N₂O-O₂로 전신마취를 유지하면서 구강 주위를 통법에 따라 소독하였다.

상, 하악 제1대구치 분지에서 제1소구치 근심부까지 치은연을 따라 절개하고 치아를 충분히 탈구시키면서 치조골의 파절을 피해서 상, 하악 좌측 제1소구치부터 제1대구치까지의 치아를 발거하였다. 발치와 및 치조골 부위의 골연마술을 시행하고 생리식염수로 세척한 후 3-0흡수성 봉합사(Vicryl®, Ethicon Co., United Kingdom)로 긴밀하게 봉합하였다. 술후

3일간 감염 방지를 위하여 1일 1.0g의 sodium[®] (Yu-Han Co., Korea)을 근육주사하고 유동식을 주었으며, 이후에는 일반적인 사료를 공급하였다.

3. 임플란트 매식

발치후 2개월 경과한 다음 전술한 방법과 동일하게 전신마취를 시행하고 구강주위를 소독하였다.

제1대구치 분지부에서 제1소구치 근심부까지 치조정을 따라 절개하였다. IMZ irrigated drill kit와 electric handpiece를 이용하여 임플란트 수용 범위를 형성하고 그 근, 원심부에 폭 3.0 mm, 깊이 4.0mm의 골결손부를 형성하였다. 임플란트의 상부가 편평한 골면보다 0.5mm 상방으로 돌출되게 매식한 후 근심측 골결손부에 교원질기질만 충전한 것을 대조군, 원심측 골결손부에 골형성단백과 교원기질을 충전한 것을 실험 1군, 근심측 골결손부에 골기질젤라틴을 충전한 것을 실험 2군으로 하였다. 이때 골형성단백과 교원질기질의 혼합비율은 3 : 1로 하였다. 생리식염수로 충분히 세척한 후 골점막을 봉합하였다(Fig. 1).

술후 3일간 감염 방지를 위하여 1일 1.0g의 Peracilin sodium을 근육 주사하고 유동식을

주었으며, 이후에는 일반적인 사료를 공급하였다.

4. 형광 약제 투여

골의 성장 방향 및 성장량을 알아보기 위하여 신생 골조직에 침착되어 밝은 황색 형광을 보이는 tetracycline hydrochloride[®] (Sigma Co., U.S.A), 녹색 형광을 보이는 calcein[®] (Sigma Co., U.S.A.)을 kg당 20mg씩 정맥주사하였다. 술후 1주에는 tetracycline Hcl, 3주에는 calcein, 5주에는 tetracyclin Hcl, 8주에는 calcein, 10주에는 tetracyclin Hcl를 투여하였다(Fig. 2).

5. 실험동물 희생 및 조직 표본 제작

1) 광학 현미경용 표본 제작

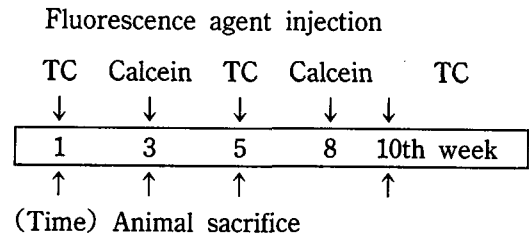


Fig. 2. Schedule of fluorescence agent injection and sacrifice of experimental animal.

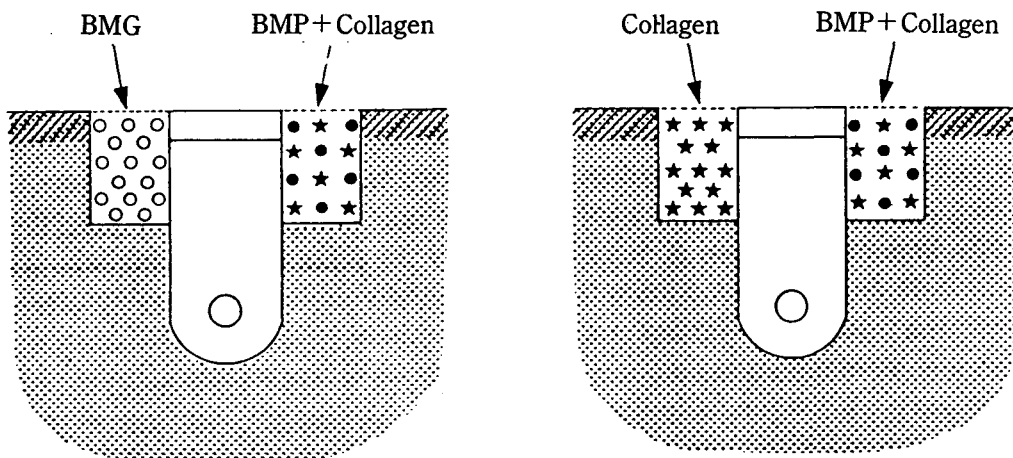


Fig. 1. Schematic diagram of implant and bone defect filled with bone substitutes.

Control group : Defect filled with collagen matrix, Experimental group 1 : Defect filled with BMP and collagen matrix, Experimental group 2 : Defect filled with BMG.

임프란트 매식후 1, 3, 5 및 10주에 각각 실험동물을 희생시켜 하악골을 적출하고 골막을 박리한 후 매식체 주변의 골을 절제하여 한개의 매식체가 포함된 골 블록을 제작하였다. 제작된 시편은 10% 중성완충 포르말린에 24시간 고정 후 5% nitric acid 용액으로 탈회하였으며 2일에 한번씩 탈회용액을 교환하였다. 탐침을 이용하여 탈회의 정도를 확인한 후 흐르는 물에 12시간동안 세척하고 통상의 방법에 따라 파라핀을 블록을 만들었으며 5 μ m 두께의 파라핀 절편을 제작한 후 헤마톡실린-에오신 염색을 하여 광학현미경으로 검정하였다.

2) 형광 현미경용 표본 제작

임프란트 매식 10주후에 실험동물을 희생시켜 임프란트를 포함한 인접 조직을 블록 절제하여 70% 에탄올에 1주일간 고정한 후, bone trimmer(Maruto Co., Japan) 상에서 다이아몬드 디스크를 이용하여 임프란트의 장축을 따라 근원심 방향으로 이등분 하였다. 70% 에탄올에 3일간 고정 후 Villanueva bone염색액에 3일간 침적하고, 에탄올의 농도를 상승시키며 탈수한 후, polymethylmethacrylate로 포매하여 40일간 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 경화시켰다. 경조직절단기인 crystal cutter(Maruto Co., Japan)를 이용하여 200 μ m의 두께로 절단하고 연마기인 hard tissue grinding system (Maruto Co., Japan)으로 30 μ m 두께의 시편을 만들어 Zeiss microscope(Germany)를 이용하여 형광현미경적 관찰을 하였다.

III. 실험 결과

임프란트 매식후 1, 3, 5 및 10주에 관찰한 광학현미경적 및 형광현미경적 소견은 다음과 같다.

가. 광학현미경적 소견

1. 교원질 기질 충전군

1주에는 골결손부위의 하방인 매식체 주위에서는 일부 신생골이 관찰되기도 하나 상부에 형성한 골결손부위와 매식체의 전 길이에 걸쳐

염증세포와 섬유조직이 관찰되었다. 골결손부위의 염증반응은 매식체 주위보다는 좀 더 심해서 약간의 호중구세포와 단핵세포의 염증세포 침윤이 관찰되고 주위에는 방추형의 섬유아세포와 소성결합조직이 보이나 혈관은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 1).

3주에는 골결손부에 신생골이 조금 관찰되기도 하나 매식체와 인접한 부위에서는 염증반응이 감소하여 소수의 단핵세포가 관찰되었다. 주위의 섬유조직은 1주와 유사하나 작은 크기의 모세혈관이 관찰되는 소성결합조직이 나타나고 그 하부인 매식체주위에는 골아세포로 둘러 싸인 골소주가 관찰되었다(Fig. 2).

5주에는 상피조직에 가까이 위치한 골결손부의 상부는 난원형의 섬유아세포와 많은 양의 콜라겐과 모세혈관으로 구성되어있는데 확장되거나 두터워진 벽을 갖는 혈관주위에서는 소수의 염증세포가 관찰되는 섬유조직이 관찰되었다. 골결손부위의 일부만 골조직이 관찰되어 골형성단백군에 비해 상피조직의 하방이주를 나타냈는데 이 때의 골조직은 광화작용이 안된 해면골로써 골소주를 둘러싼 골아세포와 골소주 내에서는 난원형의 골세포가 관찰되고 골소주 사이의 골수에서는 혈관이 풍부하게 관찰되었다. 그 하부의 매식체 주위에서는 골세포와 골아세포가 보이는 층판골이 관찰되었다(Fig. 3).

10주에는 골결손부위는 작은 혈관과 방추형의 섬유아세포, 많은 콜라겐으로 구성된 치밀 결합조직으로 대체되어 골형성단백군에 비해 골형성 정도가 낮게 나타났고 그 하부는 광화작용이 더욱 진행되어 골수가 거의 보이지 않는 층판골이 관찰되었다(Fig. 4).

2. 교원질기질과 골형성단백 충전군

1주에는 매식체주위는 골아세포로 둘러 싸인 조그마한 골소주로 이루어진 신생골이 관찰되었으나 상부에 인위적으로 형성한 골결손부위는 호중구세포와 많은 단핵세포로 구성된 염증세포가 관찰되었고 주위에는 소수의 혈관과 방추형의 섬유아세포로 구성된 소성결합조직이 관찰되었다(Fig. 5).

3주에는 골결손부위에서 염증반응과 함께

많은 혈관과 난원형의 섬유아 세포가 관찰되어 활발한 양상을 갖는 육아조직이 관찰되나 일부에서 적은 양의 신생골이 매식체에 유착되어 관찰되었다. 그하부인 매식체 주위에서는 골소주의 크기가 커지고 이러한 골소주내에서는 연골세포들이 관찰되어 연골내골 형성을 짐작할 수 있었다(Fig. 6).

5주에는 골결손부위에서 골소주의 양이 3주에 비해 증가하였는데 이 때의 골소주의 광화작용이 안된 해면골이 관찰되었으며 이와 유사하게 매식체 주위의 골소주에서도 골아세포와 골소주가 관찰되고 골수 조직에서는 혈관과 섬유조직이 나타났으며 매식체에서 약간 떨어진 골소주에서는 광화작용(mineralization)이 진행되어 부분적으로 층판골이 관찰되었다(Fig. 3).

10주에는 광화작용이 더욱 진행되어 골수의 크기가 감소하고 골세포나 골아세포가 거의 없는 층판골이 관찰되었으며 골결손부위와 매식체주위의 골조직사이에는 구분이 지어졌다(Fig. 4).

나. 형광현미경적 소견

1. 실험 1군(교원기질과 골형성단백 충전군)

골결손부가 골조직으로 상당히 채워져 굵고 가느다란 녹색의 선상 형광대가 밀접하게 배열된 양상으로 보였으며(Figs. 9, 10) 그 하방에는 골양조직이 수직 방향으로 성장하여 매식체 하부에서 긴밀한 골접촉을 보여 매식체와 인접한 부위에서 작고 가느다란 동심원상의 형광대와 크고 불규칙한 선상의 형광대가 관찰되었다(Figs. 11, 12).

2. 실험 2군(골기질젤라틴 충전군)

골결손부는 국소적으로 매식체와 부착되는 신생골이 형성되었으나 섬유조직으로 채워져 희미한 황색 형광대가 관찰되었고 매식체 하부에서는 녹색, 황색 형광대가 골내막으로부터 매식체에 부착된 것을 볼 수 있었으며 사이사에 섬유조직이 관찰되었다(Figs. 13, 14).

3. 대조군(교원질 기질 충전군)

굵은 선의 녹색 형광대가 관찰되나 상피조직이 하방 이주되어 골결손부는 매식체와 골

조직 사이에 섬유조직이 개재되어 있었고 매식체 하부에서만 신생골이 형성되어 골유착이 관찰되고 외측에서 넓고 굵은 녹색 형광대가 관찰되었다(Figs. 15, 16).

IV. 총괄 및 고찰

지금까지 발치, 치주질환, 낭종, 종양 등으로 인한 골결손부에 여러가지 대체제가 사용되어 왔으며 hydroxyapatite와 tricalcium phosphate에 대한 연구도 활발하게 진행되었다²⁵⁻²⁷. 이들은 생체 내에서 독성이나 염증반응 또는 이물반응이 없으며 접촉하는 골과 직접 결합하여 인위적인 분리가 거의 불가능한 장점을 지닌 반면 충격에 약하여 깨지기 쉬운 단점을 갖고 있다. Hydroxyapatite는 생체 내에서 흡수되지 않으나 tricalcium phosphate는 흡수와 함께 골로 대체되는 성질이 있고 그 흡수 속도를 예상할 수 없기 때문에 임상 적용에 결점이 되고 있다. 다공성의 hydroxyapatite를 치조골 증대술에 이용하면 골과의 인접면에서 신생골이 일어난다고 하였다²⁸⁻³⁰.

골결손부에 대한 대체물질로서 여러 동물조직이 사용되어 왔으나, 최근에는 소뼈를 다양한 방법으로 가공 처리하여 비교적 항원성이 적고 저장 가능한 이종골이 개발되었다⁴⁴⁻⁴⁷. Kiel bone은 소뼈를 탈단백 처리하여 약 31%의 단백질을 함유하고 있는 이종골로서 세공성 구조로 인하여 골의 수동적 성장을 유도한다고 하였다. 또 교원질기질^{31,32}은 소뼈에서 무기질 성분을 성분을 제거한 단단한 교원질로서 면역반응이 없고 골재생을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들 인공 생체 대체제는 골유도능을 지니지 못하여 자가골 이식과 같이 확실한 골대체 재료라고는 볼 수 없다.

따라서 짧은 기간내에 더욱 확실하게 골유도를 이룰 수 있는 골대체재로서 골형성단백에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. Glowaki와 Kaban³³이 악안면 두개부의 재건에 탈회골을 이용한 이후 골유도능을 지닌 탈회골이 임상에 응용되어 왔다. 그러나 사람의 동종골을 구하는 데는 한계가 있고 이종골은 구하기 쉬운

반면에 골유도능이 낮은 것으로 알려져 있다.³⁴⁾ 사람의 탈회골을 대상으로 구하는 것이 어렵고 또한 실험적 연구에 의하면 동물의 나이가 증가할수록 탈회골의 골유도능이 낮아진다고 알려져 있다.^{35,36)} 골형성단백은 Urist가 골재생을 유도한다고 발표한 이후 본격적인 연구의 대상이 되었다.^{37-40.)} 본 연구에서는 현재 치과임상에서 널리 사용되고 있는 임프란트 매식시에 발생될 수 있는 골결손부에서 골형성단백을 비롯하여 골기질젤라틴과 교원질기질이 골재생에 어떤 역할을 미치는지를 구명하기 위해 시행되었다.

Senn⁴¹⁾이 탈회골의 사용을 소개한 이래 Reddi와 Huggins⁴²⁾는 탈회분 골분말이 골간질의 표적면을 넓혀서 24시간 이내에 개개의 신생골형성판을 형성한다고 하였으며, 보관된 비탈된 동종골 이식시 수개월에서 수년에 걸쳐 천천히 흡수되면서 결손부의 변연으로부터 저밀도의 신생골을 형성하며(골전도: Osteoconduction), 탈회 동종골은 조직간엽세포로부터 조골세포로의 전환을 유도하며 고밀도의 신생골을 약 14일에서 29일 사이에 형성한다(골유도: Osteoinduction)고 하였다. 이때 골형성 기전의 중요한 역할을 골형성단백이 맡고 있다고 하였다. 정제된 사람의 골형성단백을 사용한 기초적 실험에서 골형성이 확실히 유도되는 것이 밝혀졌으나⁴³⁾ 골형성단백의 임상 응용을 위해서는 사람의 골형성단백은 소량에 불과하므로 다른 대용품이 필요하리라 생각된다. 본 연구에서는 소뼈에서 추출한 골형성단백, 골기질젤라틴 그리고 교원질기질을 사용하여 골재생에 미치는 영향을 관찰하였다. 골형성단백과 골기질젤라틴은 이식후 골유착이 관찰되었고 정도의 차이는 있으나 골형성 유도능이 있는 것으로 나타났다. 골형성유도능의 차이는 골기질젤라틴의 항원반응에 의해 나타나는 것으로 보인다. 골형성단백과 교원섬유를 혼합하여 주사해도 골형성을 유도하는 것이 가능하다. Izumi⁴⁴⁾는 역학적 강도를 부여하고 골형성단백의 양을 증가시킬 목적으로 골형성단백-교원섬유와 hydroxyapatite 과립의 복합 이식 실험을 시도하였는데 그 결과 교원섬유를 함유하지

않은 골형성단백-HA 복합체로부터도 활발한 골유도가 나타난다고 보고하였다. 최근 Takaoka⁴⁵⁾는 골형성단백과 교원섬유를 혼합하여 동결 건조한 것을 압축시켜 이식하면 이식한 형태대로 골이 형성된다고 보고하였다. 본 연구에서도 골형성단백과 교원질기질을 혼합하여 충전한 경우에 신생골의 형성을 관찰할 수 있었는데, 이것은 임상에서 치조제가 적절하지 못하여 임프란트 매식시 발생될 수 있는 골결손부에 골형성단백과 교원기질을 혼합 충전하므로 골재생을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

골형성단백의 분자량은 학자들에 따라 차이가 있으나 Mizutani등⁵⁰⁾은 소의 골형성단백을 추출하여 그 분자량이 17,684인 산선 친화성 당단백질이라 하였다. Ko등⁵¹⁾은 hydroxyapatite chromatography를 이용해 돼지뼈의 골형성단백을 분자량 26,000이며 6,000-14,000 사이에도 골형성단백이 존재하나 이런 경우에는 골형성능이 낮아진다고 하였다. 골형성단백은 사람, 원숭이, 소, 쥐에서 얻어지는데 골형성능은 동일하며 종별 특성을 갖는다고 하였다.⁵²⁾ 현재 골형성단백의 추출 방법은 크게 두가지로 구분되는데 하나는 Urist 등에 의해 행해진 탈회골 기질에서 분리 정제하는 방법이며 또 다른 하나는 Takaoka와 Yoshikawa⁴⁹⁾에 의한 Dunn 골육종에서 분리 정제하는 것인데 이는 쥐의 피하에 실험적으로 유발한 골육종을 이식해주는 것이다. 본 실험에서는 Urist등⁴⁶⁾의 방법에 따라 소의 탈회골기질을 분별 침전을 반복하여 분자량 18,100정도의 골형성단백을 추출하였는데 이는 Urist등이 보고한 분자량(18,000±500)과 비슷하였다.

Tanabe⁵³⁾의 연구에 의하면 골형성단백에 의한 골격근 내에서의 골유도 과정은 섬유아 세포양세포의 생성과 증식에서 시작하여 연골세포로 분화되며 연골기질을 계속 형성해 연골내 골화에 의해 석회화된 골을 형성한다고 하였다. 이 과정은 1) 섬유아 세포양 세포의 증식기, 2) 섬유아세포의 연골세포의 분화기, 3) 연골기질 형성기, 4) 연골형성기, 5) 골 형성기, 6) 골 흡수기로 분류되며 이때 골형단백은 골유도 과정을 활성화하는 유용한 물질이라 생

각된다. 본 실험의 결과에서 광학현미경에서는 인위적으로 형성한 골결손부에서 매식 1주후에는 염증반응이 나타났으며, 3주째에는 골형성단백을 충전한 실험 1군에서 다소 감소된 염증반응과 함께 매식체와 유착이 되는 신생골이 나타났으며 대조군에서는 소성결합조직만 나타났다. 5주후에 실험 1군은 광화작용이 어느 정도 진행되어 골세포와 골아세포의 관찰이 가능하였으며 10주 후에는 골수의 크기가 감소하고 골세포와 골아세포가 거의 없는 층판골이 관찰되었다. 교원질기질을 사용한 대조군에서는 5주후에 골결손부가 소수의 혈관을 함유한 섬유조직으로 채워지고 10주후에는 골결손부위가 치밀결합조직으로 대체되어 골형성이 거의 미약하였다.

형광 현미경상으로는 골형성단백을 사용한 실험군에서는 골결손부가 골조직으로 상당히 채워져 녹, 황색의 선상 형광대를 보였으며 그 하방에는 골양조직이 수직 방향으로 성장함을 보여주었다.

골기질젤라틴을 사용한 실험 2군에서는 골결손부에 국소적으로 신생골이 형성되어 임프란트와 유착되기도 하였으나 나머지 부위는 섬유조직으로 채워져 있었으며, 교원질기질만 사용한 대조군에서는 상피조직이 하방 이주하여 골조직과 임프란트 사이는 섬유조직 개재되어 나타났다. 또한 경조직에서 세포 분화에 크게 관련되는 alkaline phosphatase의 활성이 세포의 기질의 성숙에 연관되어 연골 형성이 관련이 있는 것으로 보여진다.⁵⁴⁾

근래에는 골형성단백에 대한 유전자 수준에서의 해석이 진행되고 있는데 골형성단백은 발생 과정에서 세포 분화의 조절 및 세포외기질 형성에 크게 관여하는 Transforming growth factor- β (TGF- β)에 속한다고 하며⁵⁵⁾ 현재도 이에 대한 연구가 계속진행되고 있다.

골형성 단백질에 의해 골유도가 일어난다는 사실이 규명되고 그 정제가 쉽지 않지만 골형성단백의 본체를 규명함으로써 생리적 의의와 작용 기전 그리고 골과 연골의 발생 분화 또는 골개형 등의 골대사에 대한 이해가 가능할 것으로 여겨진다.

골형성단백을 골결손부에 충전하였을 때 골과 골수세포로의 조정과 분화를 유도하여 골의 재형성에 만족할만한 결과를 보이므로 치주 질환이나 낭종이나 종양에 의한 골결손부의 충전과 악골절제 후의 재건은 물론 치과 임프란트 매식시 골이 불충분한 경우에 이용하면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 또한 상피조직의 하방 성장을 억제하는 goretex membrane에 의한 조직 유도술을 병행한다면 더욱 좋은 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 성견에서 Titanium Plasma Sprayed IMZ 임프란트 매식시 골결손부에 소의 대퇴골로 부터 추출한 골형성단백 (bone morphogenetic protein, BMP)과 골기질젤라틴 (bone matrix gelatin, BMG) 그리고 교원질기질(collagen matrix)이 신생골 형성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 시행되었다.

임프란트 매식시 임프란트의 근원심부에 인위적인 골결손부를 형성하고 교원질기질만 충전한 것을 대조군으로 하고 골형성단백과 교원질기질을 충전한 것을 실험 1군, 골기질젤라틴을 충전한 것을 실험 2군으로 하였다. 매식후 1, 3, 5 및 10주에 각각 실험 동물을 희생시켜 골결손부의 치유 양상을 광학현미경으로 관찰하고, 1, 3, 5, 8 및 10주에 형광 약제를 투여하여 임프란트 주위와 골결손부에 형성된 골조직의 양상과 정도를 형광현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 추출된 골형성단백을 hydroxyapatite chromatography를 시행한 결과분자량은 18,100 이었다.
2. 임프란트와 골과의 계면에서는 실험 1군, 실험 2군 모두에서 골유착이 관찰되었으며, 골기질젤라틴과 골형성단백은 골형성 유도능을 가지고 있는 것으로 나타났다.
3. 골결손부의 신생골 형성은 실험 1군이 대조군에 비하여 현저하게 증가된 양상을 보였으며 대조군에서는 임프란트와 골과의

계면에 섬유조직이 관찰되었다.

4. 형광현미경 관찰조건에서 실험 1군에서는 골결손부에 재편성된 층판골 형태의 골개형이 관찰되었고 실험 2군에서는 부분적인 골개형이 나타났으나 대조군에서는 섬유조직이 개재되었으며 골개형의 소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과는 임플란트 매식시에 골조직과 임플란트 간에 발생할 수 있는 간극이나 골결손부에 골형성단백을 충전할 경우 신속한 골재생을 나타내어 임플란트의 성공에 기여할 수 있을 것임을 시사하였다.

참고문헌

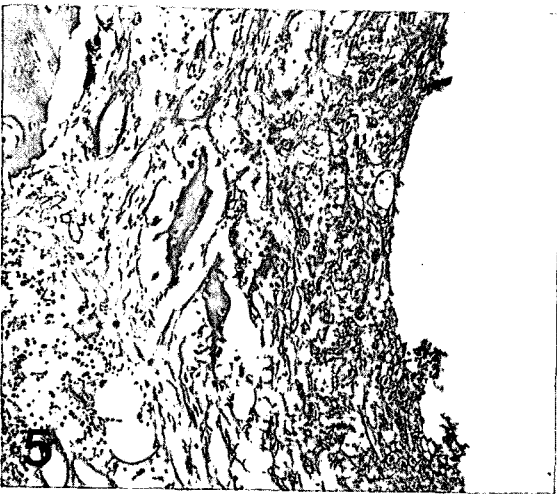
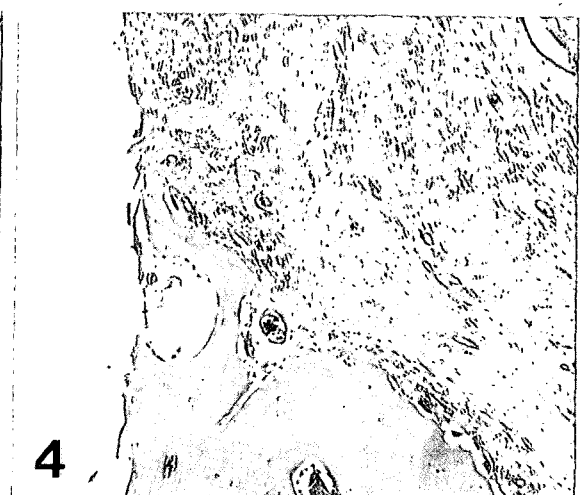
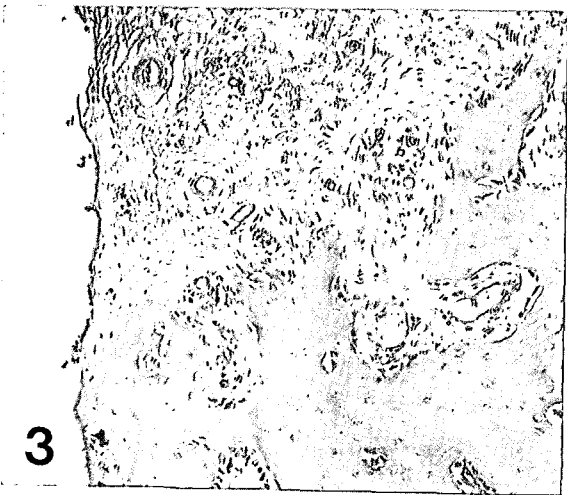
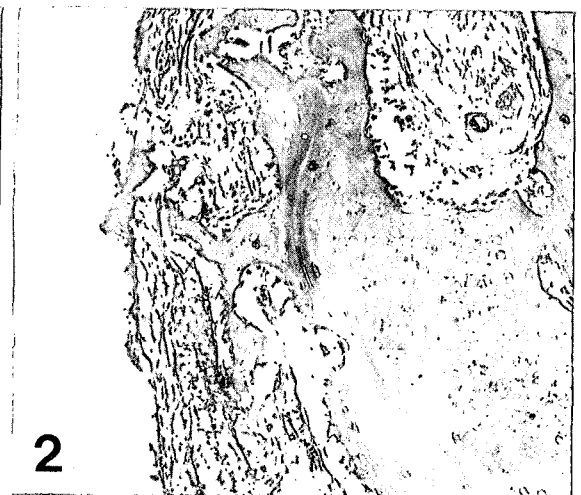
1. Bodine RL, Mohammed CI : Histologic studies of a human mandible supporting an implant denture. *J Prosthet Dent* 21 : 203, 1969.
2. Hobo S, Ichida E, Garcia LT : Osseointegration and occlusal rehabilitation. Chicago, Quintessence Publ Co. p265, 1989.
3. Branemark PI, Zarb GA, Albrksson T : Tissue-integrated prosthesis ; Osseointegration in clinical dentistry. Chicago, Quintessence Publ Co. p117, 1985.
4. Fonceca and Davis : Reconstructive pre-prosthetic oral and maxillofacial surgery. Philadelphia, W.B. Saunders Co., p167, 1986.
5. Branemark PI : Intra-osseous anchorage of dental prosthesis. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3 : 81, 1969.
6. Branemark PI : Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 50 : 399, 1983.
7. William RL : Selecting edentulous patients for tissue integrated prosthesis. *Int J Oral Maxillofac Implant* 1 : 129, 1986.
8. Denissen HW, de Groot K : Immediated dental root implants from synthetic dense calcium HA. *J Prosthet Dent* 42 : 551, 1979.
9. Pietrokovski J, Massler M : Residual ridge remodeling after tooth extraction in monkeys. *J Prosthet Dent* 26 : 119, 1971.
10. Lam RV : Effect of root implants on resorption of residual ridges. *J Prosther Dent.* 27 : 311, 1972.
11. Blumental NM : Enhancement of Osseointegration of tricalcium phosphate coated titanium endosseous implants with collagen gel. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2 : 129, 1987.
12. White E, Shors EL : Biomaterial aspects of interpore-200 porous HA. *Dent Clin Nor Amer* 30 : 158, 1986.
13. White RA : A new porous of preparing porous ceramic. metal and polymer prosthetic materials. *Science* 176 : 922, 1972.
14. Chiroff RT : Tissue ingrowth of replamine form implants. *J Biomed Master Res symposium* 6 : 29, 1975.
15. Melcher AH, Dreyer CJ : Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects. *J Bone joint Surg* 44B : 424, 1962.
16. Todescan R, Pillar RM, Melcher AH : A small animal model for investigating endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2 : 217, 1987.
17. Ko L, Ma GX, Gao HL : Purification and chemical modification of porcine bone morphogenetic protein. *Clinic Ortho and Related Res* 256 : 229, 1990.
18. Caplan AI : Bioactive factors in bone. *Texas Connect Tissue Res* 23 : 2, 1989.
19. Kuebler N, Urist MR : Allogenic bone and cartilage morphogenesis. *J Cranio-max Fac Surg* 19 : 283, 1991.
20. Urist MR, Strates BS : Bone Morphogenic Protein. *J Dent Res(Supplement)* : 1392, 1971.

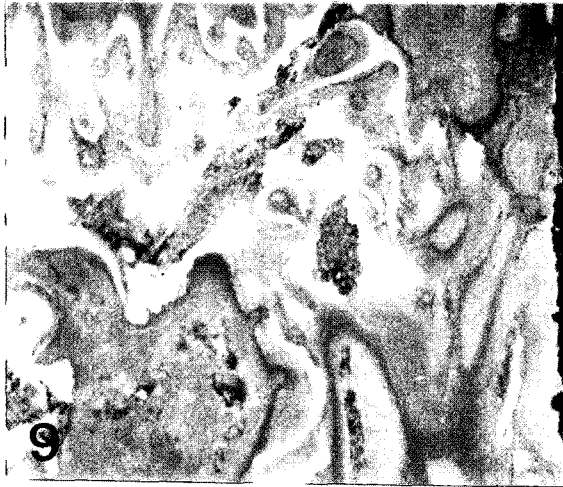
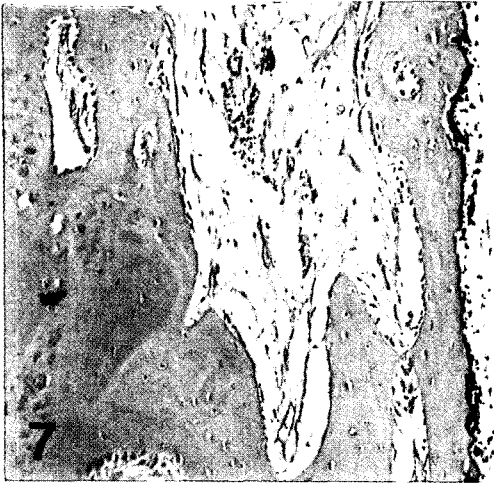
21. Kitaoka Y : An experimental study on bone formation ability of decalcified bone matrix particularly on effect of the rapping material. *Jpn J Oral Maxillofac surg* 33 : 9, 1987.
22. Tanabe T : Preparation of bone morphogenetic protein (BMP) and experimental studies on its osteoinduction. *Jpn J Oral Maxillofac surg* 36 : 2659, 1990.
23. Montandon D, Lehmann C, Chami N : The induction of bone by an osteogenic protein and the conduction of porous hydroxyapatite : a laboratory study in the rabbit. *Plast Reconstr Surg* 87 : 187, 1991.
24. Rutherford RB, Sampath TK, Rueger DC : Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7 : 311, 1992.
25. Wolford LM : Coralline Porous HA as a bone graft substitute in Orthognathic surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 45 : 1034, 1987.
26. White E, Shors EL : Biomaterial aspects of interporous-200 Porous HA. *Dent Clin Nor Amer* 30 : 158, 1986.
27. Nagahara K, Isoga M, Shibata KI : Osteogenesis of HA and tricalcium phosphate used as a bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7 : 72, 1992.
28. Erick HH, Worsaae N, Lemons JE : Histological response after implantation of porous HA ceramic in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 5 : 255, 1990.
29. Homes RE : Bone regeneration within a coralline HA implants. *Plast Reconstr Surg* 63 : 626, 1979.
30. Homes RE, Hagler H : Porous HA as a bone graft substitute in maxillary augmentation. *J Cranio-Maxillofac Surg* 16 : 199, 1988.
31. Rutherford RB, Sampath TK, Rueger DC, Taylor TD : Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endodontically dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7 : 297, 1992.
32. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL : Bone morphogenesis in implants of insoluble bovine gelatin. *Proc Nat Acad Sci USA* 70 : 3511, 1973.
33. Glowacki J, Kaban LB : Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. *Lancet* 1 : 959, 1981.
34. Urist MR : Bone formation by auto-induction. *Science* 150 : 893, 1965.
35. Irving JT, Lebolt SA, Schneider EL : Ectopic bone formation and aging. *Clin Orthop* 154 : 249, 1981.
36. Butler WT, Mikulski A, Urist MR : Non-collagenous proteins of a rat matrix possessing bone morphogenetic activity. *J Dent Res* 56 : 228, 1977.
37. Gebhart M, Lane J : A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. *Acta Orthop Belg* 57 : 130, 1991.
38. Ronningen H, Solheim LF, Langeland N : Bone formation enhanced by induction enhanced by induction. Bone growth in titanium implants in rats. *Acta Orthop Scand* 56 : 67, 1985.
39. Ronningen H, Solheim LF, Barth E, Langeland N : Osteogenesis promoted by bone matrix combined with marrow. Titanium implants studied in rats. *Acta Orthop Scand* 57 : 15, 1986.
40. Mullikan JB, Glowacki J, Kaban LB, Folkman J, Murray JE : Use of demineralized allogenic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. *Ann Surg* 194 : 366, 1981.
41. Senn N : On the healing of aseptic bone

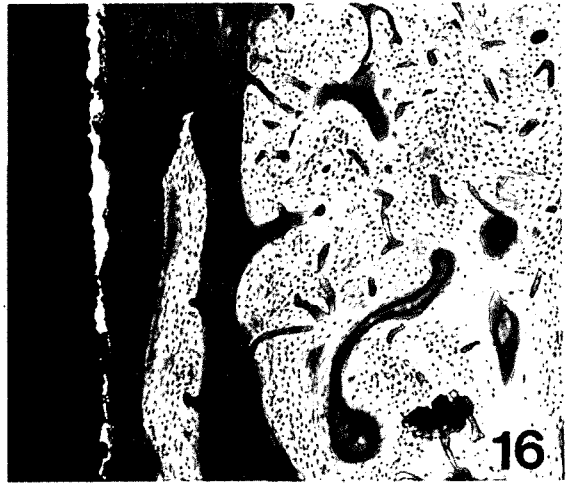
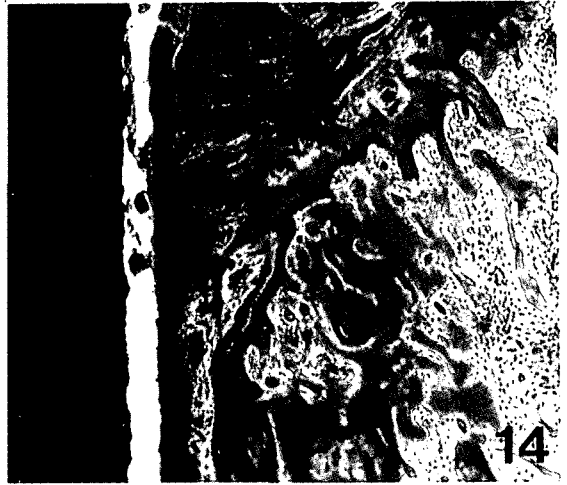
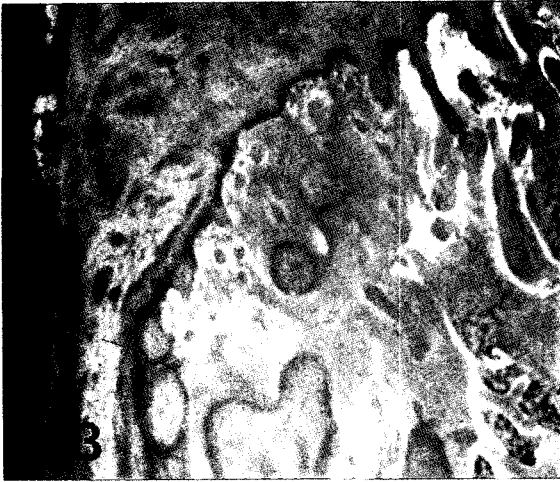
- cavities by implantation of antiseptic decalcified bone, *Am, J Med Sci* 98 : 219, 1889.
42. Reddi AH, Huggins C : Biochemical sequence in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 69 : 1601, 1972.
 43. Sato K, Urist MR : Induced regeneration of calvaria by BMP in dogs. *Clin Orthop* 197 : 301, 1985.
 44. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM, Chien C : Bone Morphogenesis in implants of insoluble bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 1447, 1976.
 45. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A, Tempst P, Hunziker M, DeLange PJ : Purification of bovine morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 371, 1984.
 46. Urist MR, Sati K, Brownell AG, Malinin TI, Lietze A, Huo YK, Prolo DJ, Oklund S, Finerman GAM, DeLange RJ : Human bone morphogenetic protein (hBMP). *Proc of the Society for EB & M*, 173 : 194, 1983.
 47. Urist MR, DeLang RJ, Finerman GA : bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220 : 680, 1983.
 48. Izumi A : Purification of bone morphogenetic protein (BMP) and fundamental studies on its clinical application. *J Stomatol Sci Jpn* 54(1) : 91, 1987.
 49. Takaoka K, Yoshikawa H : Purification of a bone-inducing substance (Osteogenic factor) from a murine osteosarcoma. *Bio-med Res* 2 : 466, 1981.
 50. Mizutani H, Urist MR : The nature of bone morphogenetic protein fractions derived from bovine bone matrix gelatin. *Clin Orthop* 171 : 213, 1982.
 51. Ko L, Ma G, Gao H : Purification and chemical modification of porcine bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 256 : 229, 1990.
 52. Sampath TK, Reddi AH : Homology of bone inductive proteins from human, monkey, bovine and rat extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 6591, 1983.
 53. Tanabe T : Preparation of bone morphogenetic protein (BMP) and experimental studies on its osteoinduction. *Jpn J Oral Maxillofac Surg* 36 : 2659, 1990.
 54. Ihoki M : Experimental studies on induction of cartilage and bone by human dentin matrix. *Jpn J Oral Maxillofac Surg* 37 : 1923, 1991.
 55. Kubler N, Urist MR : Allogenic bone and cartilage morphogenesis. *J Cranio-Maxillofac Surg* 19 : 283, 1991.

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1. Light micrograph of 1st week of collagen side : consists of more inflammatory cells and loose fibrous tissue. H-E stain ($\times 100$)
- Fig. 2. Light micrograph of 3rd weeks of collagen side ; consists of fibrous tissue and a little new bone appeared. H-E stain($\times 100$)
- Fig. 3. Light micrograph of 5th weeks of collagen side ; consists of granulation tissue contains a few blood vessels which shows apical migration of connective tissue in bone defect area. H-E stain($\times 100$)
- Fig. 4. Light micrograph of 10th weeks of collagen side-consists of dense connective tissue and lamellar bone, H-E stain ($\times 100$)
- Fig. 5. Light micrograph of 1st week of BMP side ; consists of numerous inflammatory cells, blood vessels and loose fibrous tissue. H-E stain ($\times 100$)
- Fig. 6. Light micrograph of 3rd weeks of BMP side ; consists reduced inflammatory reactions and granulation tissue which shows a little osseointegration in the bone defect area. H-E stain($\times 100$)
- Fig. 7. Light micrograph of 5th weeks of BMP side ; consists increased bone trabeculae constains osteoblasts and osteocytes. H-E stain($\times 100$)
- Fig. 8. Light micrograph of 10th weeks of BMP side ; reversal line distinguish new bone from old bone and filled with lamellae bone in bone defect area, H-E stain($\times 100$)
- Fig. 9, 10 BMP side ; bone defect side filled with coarse and fine, linear fluorescence. Fig 9(FM), Fig. 10 (LM). Villanueva bone stain($\times 100$)
- Fig. 11, 12 BMP side ; apical to bone defect side appears osteoid tissue consists of small, fine fluorescence and large, irregular linear fluorescence. Fig. 11 (FM), Fig. 12(LM). Villanueva bone stain($\times 100$)
- Fig. 13, 14 BMG side ; filled with connective tissue and new bone formation. Fig. 13 (FM), Fig 14(LM). Villanueva bone stain($\times 100$)
- Fig. 15, 16 Fluorescent microscope of collagen side ; appears apical migration of connective tissue and fibrous tissue in bone defect side. Fig. 15(FM), Fig. 16 (LM). Villanueva bone stain($\times 100$)







Abstract

A STUDY OF EFFECTS OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN BONE REGENERATION OF IMPLANTS IN DOGS

Jin-Hee Jo. D. D. S. Mong-Sook Vang. D. D. S.* Jong-Ho Lee. D. D. S.**

Department of Prothodontics, Department of Oral and Maxillofacial
surgery,** College of Dentistry, Chonnam National University*

The purpose of this study is to evaluate the effect of the bone morphogenetic protein, bone matrix gelatin and collagen matrix on the amount and shape of generating new bone adjacent to the implant.

Implants were inserted in the mandible of adult dogs at 2 months after teeth extraction. Artificial bony defects, 3mm in width and 4mm in depth were made at the mesial and distal side of implant. Experimental groups were divided into three groups ; Group 1 : Defects filled with collagen matrix and bone morphogenetic protein, Group 2 : Defects filled with bone matrix gelatin.

Control group : Defects filled with only collagen matrix.

After implantation, the animals were sacrificed at 1, 3, 5 and 10 weeks for light microscopic examination. For the fluorescent microscopic examination, each tetracycline Hcl and calcein were injected at 1, 3, 5, 8 and 10 weeks after implantation.

The results obtained were as follows :

1. The molecular weight of bovine BMP was about 18,100 by hydroxyapatite chromatography.
2. Osseointegration was observed in experimental groups 1 & 2, and BMG and BMP had an excellent bone forming capability as a filling materials to the repair of the bone defects.
3. The degree of healing of bone defect area, the experimental group 1 showed more prominent bone formation than control group, and the control group showed fibrous connective tissue between the implant and the bone.
4. In the fluorescent microscopic findings, bone remodelling was observed regenerative lamellar bone at defect area in experimental group 1, and partial remodelling in experimental group 2, In the control group, fibrous connective tissue was observed between the implant and bone surface and sign of remodelling was not apperaed.

Above results suggest that BMP has rapid osteoinductive property and can be used clinically as a bone substitute on bone defects around implants.