

임플란트 매식시 골형성단백질 및 탈회동종골 사용에 따른 골재생 및 계면에 대한 연구

강상규 · 이종호 · 김명진

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

EVALUATION OF THE INTERFACES BETWEEN IMPLANTS AND REGENERATED BONE USING BONE MORPHOGENETIC PROTEIN AND DEMINERALIZED FREEZE-DRIED BONE.

Sang-Gyu Kang, Jong-Ho Lee, Myung-Jin Kim

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

Various methods and graft materials have been used to fill in the defect adjacent to the implants and considered as clinically acceptable. But it is not clear whether the regenerated bone increases the implant-bone contact and supports the implant. The purpose of this study is to evaluate regenerated bone surrounding implants using bone morphogenetic protein(BMP) and demineralized freeze-dried bone(DFDB), and the interfaces between implants and regenerated bone.

bBMP was extracted and partially purified from the bovine bone matrix using heparine chromatography. Demineralized freeze-dried bone was made from the dog. Inactive insoluble collagenous bone matrix(IBM) of dog was used as carrier of bBMP. Interfaces of titanium coated epoxy resin implants were processed for demineralized section for transmission electron microscopy(TEM) and those of screw type implants were for nondemineralized section for light and fluoromicroscopic examination.

Implants were inserted in the inferior border of mandible of adult dogs and artificial bony defects(3×3×4mm) were made at the mesial and distal side of implants. Defects were filled with BMP(BMP group) and DFDB(DFDB group). For the fluoromicroscopic examination, the fluorescent dyes(oxytetracycline, calcein green, alizarin red) were injected 2, 4, 6, 8, 12 weeks after implantation. The experimental animals were sacrificed at the 6th and the 12th week and their mandible were extirpated and processed for examination with light microscopy, fluoromicroscopy and TEM.

The obtained results were as follows :

1. By the light microscopic findings, the defects were filled with woven bone at the 6th week and compact bone at the 12th week, and the osseointegrations were seen in both groups. There was no histological difference between them.
2. On the basis of the histomorphometric analysis, BMP group(6th week: 40.25%, 12th week: 56.04%) had higher bony contact ratio than DFDB group(38.37%, 42.63%). There was significant difference between two groups at the 12th week(p<0.05).
3. The amount of bone formation in BMP group was more prominent than in DFDB group. Significant difference was noted among two groups at the 6th and the 8th week(p<0.05).
4. By the transmission electron microscopic findings, 0.4-2 μ m soft tissue layer was found in adjacent to the interfaces and over the collagen fibrils of bone at the 6th week. However, about 100nm amorphous layer was noted at the interface or collagen fibrils directly extended to the titanium surface at the 12th week. There was no significant difference between two groups.
5. These results suggest that BMP and DFDB can be used as good graft materials in the regeneration of bone adjacent to implant, and BMP is more valuable as a bone inducer than DFDB.

Key words : implant-bone interface, bBMP, demineralized freeze-dried bone, titanium coated epoxy resin implant.

I . 서 론

김 명 진

110-744, 서울특별시 중로구 연건동 28
서울대학교 치과대학 구강악안면외과

Myung-Jin Kim

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of dentistry, Seoul National Univ.
28 yungeon-Dong, Jongro-Gu, Seoul, 110-744, Korea
Tel:(02)760-2631, 2632 Fax:(02)766-4948

1969년 Branemark 등¹⁾이 티타늄 금속 표면에 골이 직접 유착한다는 논문을 발표한 후 15년 정도가 지나서야 비로소 금속 구조물이 골과 직접 유착할 수 있다는 가능성이 받아들여지기 시작하였고 그 동안에는 여러학자들²⁻⁴⁾에 의해 연조직 계면의 임플

* 본 연구의 일부는 한국과학재단 특정연구비의 지원으로 수행되었음(과제번호 97-0403-0701-3).

란트가 보고되었었다. 골유착(osseointegration)은 광학현미경하에서 부하가 가해진 임플란트와 주변골과의 직접적인 유착으로 정의되어져 있다²⁾. 이때 임플란트 표면의 대부분이 골과 접촉하고 있어야하나 임상적으로 기능적인 임플란트에 요구되는 골조직과 임플란트의 최소 접촉비율은 밝혀져 있지 않다. 광학현미경 소견으로부터 임플란트와 접해있는 조직에 대한 많은 정보⁵⁾를 얻을 수 있었으나, 초고배율 소견(ultrastructural data)을 얻기 위하여 전자현미경적 연구가 진행되었다. 그러나 주사전자현미경에 의한 연구는 표본제작을 위하여 임플란트-골 계면을 분리시키게 되고 이때 계면에 존재했는지도 모르는 연조직이 소실되어 골유착에 대한 위상(false image)을 보일 가능성이 있어 투과전자현미경에 대한 연구가 진행되었다. 투과전자현미경 연구를 위해서는 초박질표본이 요구되며 이를 위하여 다양한 표본제작법^{2,7-12)}이 시도되었다. 그 중 Albrektsson의 plastic plug 방법^{13,14)}은 bulk 임플란트 대신 플라스틱에 1000 Å의 티타늄피막을 입혀 사용하는 방법으로 이를 이용하여 계면에 대한 많은 정보를 얻을 수 있었다. Linder 등¹⁵⁾은 티타늄피막 폴리카보네이트 플라스틱 임플란트를 사용하여 티타늄과 골 사이의 초고배율 소견을 얻었고, 골과 티타늄사이에 연조직의 개재는 없었지만 20mm두께의 bone/ground-substance층이 있어서 직접적인 접촉이 이루어지지 않음을 알게 되었다. 투과전자현미경상에서의 이러한 소견은 이전에 광학현미경에서 정의되었던 골유착의 개념⁶⁾과 일치하는 것으로 간주되었다. 이후 많은 연구에서 골유착이 이루어진 임플란트의 계면에서의 무결정층(amorphous layer)은 두께는 다양할지라도 항상 관찰되는 소견으로 받아들여져 왔다. 그러나 1992년 Listgarten 등¹⁶⁾은 비매몰형(nonsubmerged) 티타늄피막 에폭시레진 임플란트에 의한 실험에서 무결정층의 개재없이 티타늄과 석회화된 골기질이 직접 접촉하였고 탈회표본에서 교원질 섬유가 역시 직접 접촉하는 소견을 토대로 골유착된 임플란트 주변에 proteoglycans층이 항상 존재하지는 않음을 시사하였다.

과거 수십년간 임플란트는 적절한 형태와 양의 치조골을 갖고 있는 환자에서 치아수복의 합리적인 방법으로 간주되어 왔다. 최근에는 치조골의 형태와 양이 적절치 못하더라도 임플란트를 적용하고자하는 노력이 시도되고 있고, 특히 정상적인 교합관계와 심미적인 요구가 높아짐으로 인하여 임플란트 시술시 부족한 치조골의 양을 수복하려는 술식이 많이 시행되고 있다. 이를 위해 여러 가지 방법과 골이식재가 개발되었으며 그중 조직유도재 생술과 탈회냉동건조골, 이종골, 합성물질(alloplastic material)등이 간편성과 효능의 입증으로 많이 사용되어 왔고, 골형성단백질은 우리가 추구하는 이상적인 이식재의 가능성과 함께 연구가 진행되고 있다. 합성물질로는 흡수성인 제삼칼슘인산염(tricalcium phosphate)^{17,18)}, 천연 산호^{19,20)} 등과 수산화인회석(hydroxyapatite)^{21,22)}과 같은 비흡수성 합성물질이 있으나 이들은 골형성을 자극하거나 유도하지 못하였다고 보고되고있다. 자가골이식은 생체 적합성, 숙주와의 친화력 그리고 조직 재생력에서 우수하나 부가적인 수술이 요구되고 채취량에 한계가 있어서 임상에 적용시키는데 많은 제약이 있다²³⁾. 이러한 단점을 보완하기 위하여 이종골이나 동종골이식이 각광을 받고 있는데 골형성단백질

의 변형을 막으면서 면역반응을 억제하는 냉동건조법²⁴⁾과 신생 골형성능력이 뛰어난 탈회법²⁵⁾을 병행해서 쓰고 있다. 그러나 골결손부에 차폐막없이 단독으로 탈회냉동건조골을 사용한 경우 흡수와 이동으로 인하여 좋지 못한 결과가 보고^{26,27)}된 바 있고, 차폐막과 동시에 사용되는 경우에서도 단지 공간유지기능만 있다는 부정적인 연구²⁸⁾도 있다.

Urist 등²⁹⁾은 탈회된 골기질이 새로운 골형성을 유도할 수 있음을 증명하였고 골과 상아질의 기질로부터 골형성단백질(bone morphogenetic protein, BMP)을 추출해 내었다. 그리고 많은 연구를 통하여 BMP는 미분화간엽세포(undifferentiated mesenchymal cell)를 연골세포나 골세포로의 분화를 유도하여 연골내 골화과정을 통해 신생골을 형성함이 밝혀졌다. Yan 등³⁰⁾은 티타늄 임플란트 말단부의 구멍에 bBMP를 첨가시켜 골유착이 향상된 결과를 얻었으며, 조 등³¹⁾은 임플란트 주변 골결손부에 BMP 이식시 빠른 골형성을 유도하였다고 보고하였다.

임플란트 매식시 골의 양이 충분치 못하거나 또는 임플란트 식립 후 치조골의 흡수등으로 인해 실패의 가능성이 있는 임플란트를 회복시킬 목적으로 다양한 방법과 골이식재가 사용되고 있다. 이러한 방법에 의하여 형성된 재생골에 대한 대부분의 연구가 형성된 재생골의 양과 광학현미경적 소견에 국한되어 있고 골접촉율이나 투과전자현미경을 통한 초고배율 소견이 부족하여 임플란트의 지지에 있어서 재생골의 역할이 명확하지 못하다. 본 연구의 목적은 이식재 중 널리 사용되어온 탈회동종골과 최근 가장 관심 있게 연구되고 있는 골형성단백질을 이식재로하여 임플란트 시술시 발생된 골결손부에 이를 충전하여 골재생에 미치는 영향과 임플란트와 재생골 사이의 계면을 광학, 형광 및 투과전자현미경으로 관찰하여 이식재에 의한 재생골과 임플란트사이의 관계를 알아보고자 하는데 있다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물로는 체중 15Kg 내외의 성견 6마리(실험군 5마리, 동종골 공여군 1마리)를 사용하였으며, 형광 및 광학현미경용 비탈회표본 제작을 위해 직경 3.75mm, 길이 10mm의 나선형의 임플란트(Lifecore biomedical, U.S.A.) 10개와 전자현미경용 탈회표본 제작을 위해 같은 규격으로 제작한 티타늄피막 에폭시레진 임플란트 20개를 사용하였다.

골결손부의 이식재로는 소의 대퇴골에서 부분정제한 골형성단백질, 개의 대퇴골 및 경골을 처리하여 얻어낸 탈회동종골과 골형성단백질의 운반체로 비활성화 골기질을 사용하였다.

2) 티타늄피막 에폭시레진 임플란트의 제작

실험에 사용된 임플란트 모델은 Listgarten과 Lai³²⁾, Gould 등³³⁾, Linder 등¹⁵⁾에 의한 티타늄피막 에폭시레진 임플란트를 기초로 하였다. 나선형 임플란트를 복제하기 위하여 vinyl polysiloxane-

(Exaflex)으로 인상을 채득하였다. Luft³⁴⁾의 방법에 따라 제조한 Epon-resin 혼합액(Poly/Bed 812 resin, Polyscience, Inc. U.S.A.)을 채득한 인상에 주입하고 3시간 정도 상온에서 방치한 후 60°C의 오븐 속에서 3일간 중합시키고 인상재로부터 분리시켰다. 복제된 레진 임플란트를 다듬고 70% 알코올로 세척한 후 DC-RF magnetic sputtering system(DAE RYUNG Co. Korea)으로 10-8mbar 또는 그 이하의 진공 상태에서 순도 99.999% 티타늄 봉을 사용하여 균일한 두께로 피막이 형성되도록 각도를 변경하면서 피복(두께 1000~1500 Å)시켰다. 피막을 형성한 후 포장하여 EO가스 소독을 하였다(Fig. 1).

3) 골형성단백질의 추출 및 부분정제

소의 대퇴골에서 골단부를 잘라내고 골체부의 연조직 및 골수를 기계적으로 긁어낸 다음, 피질골만을 -30°C로 동결시켰다. 쇠절구와 격자 간격 1.5mm인 분석용 체를 이용하여 골분말 약 1.2Kg을 준비하였다. 골분말 600g 당 8L의 CM용액(chloroform : methanol = 1 : 1)으로 실온에서 24시간 탈지하고 탈지 때와 동일한 용량의 0.6N HCl로 12시간마다 교환하면서 24시간 동안 실온에서 탈회한 후 동결건조시켰다. 이렇게 준비된 탈회골기질 80g 당 0.01M EDTA와 단백질분해효소 억제제를 첨가한 1.6L의 0.1M Tris-HCl 완충용액(PH 8)으로 28°C, 2시간 항온하에서 내원성 단백효소를 억제하였다. 항온 처리된 골기질에서 1.6L의 구아니딘 용액(4M guanidine-HCl, 0.1M Tris-HCl, 0.01M EDTA, 5mM NEM, 5mM IAA, 2mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, PH 7)으로 2차에 걸쳐 단백질을 추출하고 투석시킨 후 원심분리하여 얻어진 침전물을 동결건조하였다.

상기의 부분정제한 골형성단백질(crude BMP) 3g을 6M urea에 녹인 다음 원심분리하고 상청액을 heparine-sepharose CL-6B(Pharmacia, Sweden)로 충전된 크로마토그래피 column(internal diameter×height: 50×12.5mm, V = 270ml)에 1.5ml/분의 속도로 주입하였다. 이어서 300ml의 50mM Tris-HCl, 6M urea용액으로 겔 친화성을 역전시켜 빠져 나온 것을 모았다. 이 용액에 NEM 0.125g을 첨가한 다음 48시간 투석 후 동결건조하여 보다 정제된



Fig. 1. Photograph of epoxy resin implant replica and titanium coated epoxy resin implant. The coating thickness is 1000-1500 Å.

bBMP를 얻었다.

1.2Kg의 우골에서 heparine-sepharose affinity chromatography후 BMP활성을 가지고 있는 분획이 포함된 추출물을 24mg얻었다. BMP의 활성은 젖은 상태의 골의 0.001%³⁵⁾이므로 본실험의 추출물은 약 50%의 활성을 갖는 부분정제된 BMP로 추정되었다.

4) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동에 의한 bBMP의 검색

상기 방법으로 추출한 bBMP 성분의 균질성을 검색하기 위하여 12.5% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel로 전기영동하여 분자량을 확인하였다. BMP 10µg을 시료로 사용하였고, 시료의 2배의 부하완충용액(20% glycerol, 4% SDS, 10% mercaptoethanol, 0.12 M Tris-HCl, PH 7.2)을 넣고 섞은 후 95°C로 2분간 가열하였다. 판상의 겔에 다양한 분자량을 갖는 표식단백질(mark protein)과 시료를 적용한 후 100볼트의 전압으로 4°C에서 4시간 동안 전기영동 후, coomassie brilliant blue로 염색하여 methanol-acetic acid 용액으로 색조를 조정하였다. 다양한 분자량을 갖는 표식단백질(Bio-rad Co.; cytochrome C: 14,500Da, soybean trypsin inhibitor: 21,500Da, carbonic anhydrase: 29,000Da, aldolase: 40,000Da, ovalbumin: 45,000Da, glutamate dehydrogenase: 55,000Da, bovine serum albumin: 66,000Da, 및 phosphorylase B: 97,400Da, alcohol dehydrogenase: 150,000Da)이 각 분자량별로 명확한 띠를 나타내어 이것을 기준으로 하여 판상의 겔에 나타난 시료의 띠를 확인하고 분자량을 측정된 결과 14,500과 29,000Da 사이에서 수 개의 띠를 나타내었으며 그 분자량은 약 14.5, 20.5, 21.9KDa로 확인되었다(Fig. 2).

5) 비활성화 골기질의 준비(inactivated bone matrix: IBM)

동종골 공여 동물의 대퇴골 및 경골의 치밀골만을 분리하여

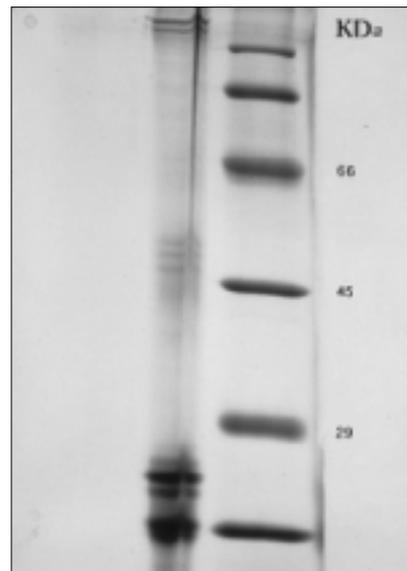


Fig. 2. Photograph of SDS-Page shows bands of author's partially purified bBMP between 14.5 KDa and 29 KDa.

액체질소와 골분쇄기(Retsch ZM 100, Germany)를 이용하여 500 μ m 이하의 분말로 만들고 탈지, 탈회하였다. 6일간 구아니딘용액으로 혼합 진탕하여 기질내 단백질성분을 제거한 후 동결건조시켜 골형성단백질의 운반체로 사용하기 위한 비활성화 골기질을 준비하여 냉장 보관하였다.

6) bBMP-IBM 이식재의 준비

40mg의 bBMP를 40ml의 구아니딘용액(4M Gu-HCl, 0.1M Tri-HCl, 0.01M EDTA)에 넣고 1시간 동안 실온에서 용해시켰다. 20개의 시험관을 준비하여 매 시험관당 20mg의 IBM을 넣고 상기 용액을 2ml씩 첨가하였다. 5분 간격으로 흔들어주면서 2시간 동안 실온에 방치한 후 미리 냉각시켜둔 8.5ml의 무수에탄올 시험관에 넣고 0°C로 30분간 유지하며 골형성단백질을 침전시켰다. 15분간 4°C, 2500g으로 원심분리하고 상층액을 버린 후 8.5ml의 85% 무수에탄올을 첨가시켜 원심분리하는 과정을 2회 반복하여 잔류 구아니딘을 제거하였다. 24시간 동결건조 후 -20°C에서 보관하였다.

7) 탈회동종골분말의 준비

동종골 공여 동물의 대퇴골 및 경골을 치밀골만을 분리하여 액체질소와 골분쇄기(Retsch ZM 100, Germany)를 이용하여 500 μ m 이하의 분말로 만든 다음 차가운 증류수로 2시간 동안 세척하였다. 무수에탄올로 1.5시간, 그리고 디에틸에테르로 1.5시간 처리하고 냉동건조하였다. 골편 5g당 0.5N HCl 250ml 비율로 90분 동안 2번 탈회하고 증류수로 세척하였다. 에탄올과 에틸에테르로 탈수한 후 탈회골을 다시 24시간 동안 동결건조하였다. 소독된 용기에 담아서 -20°C에서 보관하였다.

8) 추출된 bBMP의 활성 측정

추출된 bBMP의 활성을 측정하기 위해 각 실험동물의 종아리 근육낭(calf muscle pouch)에 bBMP-IBM 이식재와 탈회동종골분

말을 각각 이식하였다. 술후 6주째 이식부의 조직을 채취하여 EDTA로 탈회하고 헤마톡시린/에오진으로 염색하여 광학현미경으로 검경하였다. 이식재의 흡수와 신생골의 형성 조건이 bBMP-IBM 이식부와 탈회동종골분말 이식부에서 모두 관찰되어 골형성능이 있음을 확인하였다(Fig. 3, 4).

2. 동물 수술(임플란트 식립)

염산자일라진(Rompun, 한국바이엘) 5ml와 케타민(Ketalar, 유한양행) 5ml을 혼합한

후 근육 주사하여 마취를 유도하고 마취의 심도에 따라 5ml씩 추가로 주사하였다. 2% Lidocaine HCl로 국소 마취한 후 하악각에서 전방으로 약 5cm 정도 절개하여 하악체의 하연을 노출시키고, Lifecore irrigated drill kit와 electric handpiece를 이용하여 좌우측 하악골에 각각 3개씩의 임플란트 수용부를 형성하고 그것의 근원심부에 폭 3.0mm, 깊이 4.0mm의 골결손부를 형성하였다. 좌우측에 티타늄피막 에폭시레진 임플란트를 각각 2개씩 그리고 최전방부에 나선형 임플란트를 각각 1개씩 매식하고 원심측 골결손부에 BMP-IBM 이식재를 충전한 것을 BMP군, 근심측 골결손부에 DFDB만을 충전하여 DFDB군으로 하였다(Fig. 5, 6). 술후 3일간 감염 방지를 위하여 1일 1.0g의 penicillin sodium을 근주하고 물에 불린 일반적인 사료를 공급하였다.

3. 형광 약제 투여(polychromic bone labeling)

술후 세가지의 fluorochrome 염색제를 순서대로 5마리의 동물 근육내로 주입하였다. Oxytetracycline(25mg/Kg, Terramycin 한국 Pfizer Co.)은 술후 2주, 6주, calcein green(20mg/Kg, Sigma Co., U.S.A.)은 술후 4주, 8주에 그리고 alizarin red (30mg/Kg, Junsei chemical Co., Japan)는 술후 6주(6주군), 12주(12주군)에 각각 근육 주사하였다(Table 1).

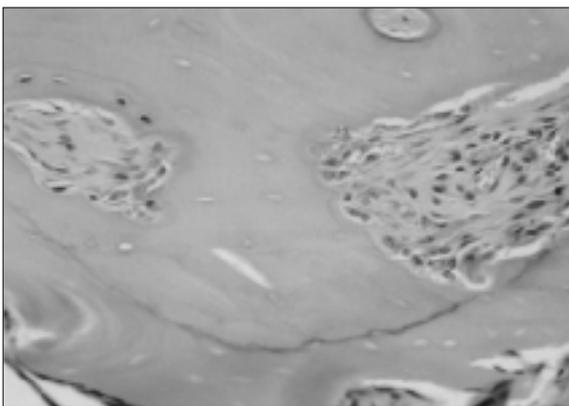


Fig. 3. Photomicrograph of 6th week specimen implanted in the calf muscle pouch for the bioassay of bBMP (H&E, x100). Bone resorption by osteoclast and bone formation lines are observed.

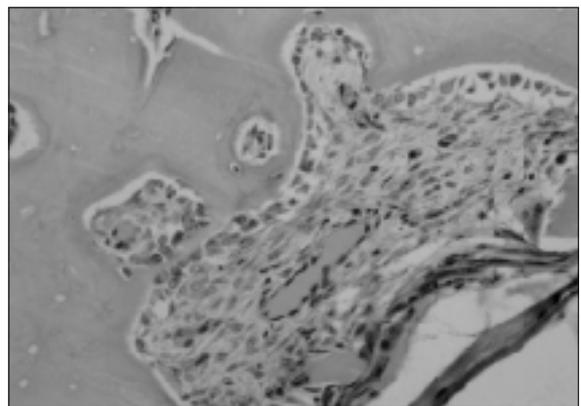


Fig. 4. Photomicrograph of 6th week specimen implanted in the calf muscle pouch for the bioassay of DFDB (H&E, x100). Bone formation by osteoblast is observed at the border and interior of graft material.

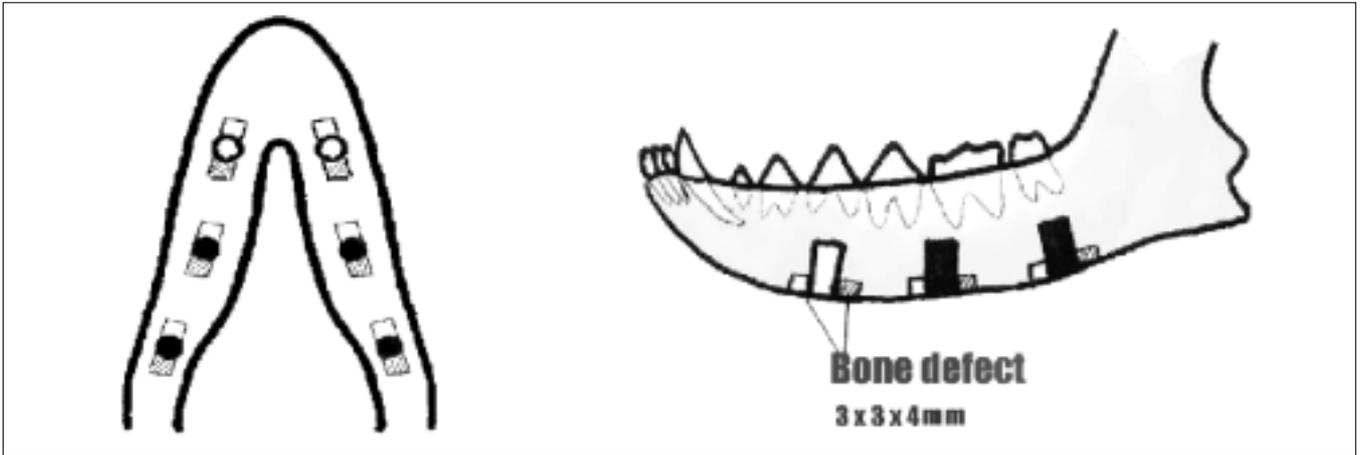


Fig. 5. Schematic drawing of implants, defects and grafted materials in the mandible of dog.

- Titanium coated epoxy resin implant
- Screw type implant
- ▨ BMP-IBM(Inactivated Bone Matrix)
- DFDB(Demineralized Freeze-Dried Bone)

4. 실험동물 희생 및 조직표본 제작

마지막 형광 약제 주입 3일 후(6주+3일; 2마리, 12주+3일; 3마리)에 염산자일라진(Rompun, 한국바이엘)과 케타민(Ketalar, 유한양행)으로 마취하였다. 경부 정중선을 따라 절개한 후 좌, 우측의 외경정맥과 외경동맥을 박리하고 polyethylene tube를 삽입 결찰하였다. 각각의 혈관을 1ml의 heparine으로 세척한 후 생리 식염수로 관류시키고 2% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde 용액으로 하악골체부에서 이식된 매식체가 포함되도록 골 블록을 절단하였다. 임플란트와 재생골이 포함된 최소한의 크기로 시편

Table 1. Times sequence of the experiment and administration of fluorescent labeling markers.

Week Group	0	2	4	6	6+3days	8	12	12+3days
6th Week		T	C	A	Sacrifice			
12th Week		T	C	T			C A	Sacrifice

Fluorescent labeling markers

T : Oxytetracycline

C : Calcein green

A : Alizarin red S



Fig. 6. Titanium coated epoxy resin implants and screw type implants were inserted in the inferior border of mandible of adult dog and artificial bony defects are filled with BMP-IBM and DFDB.

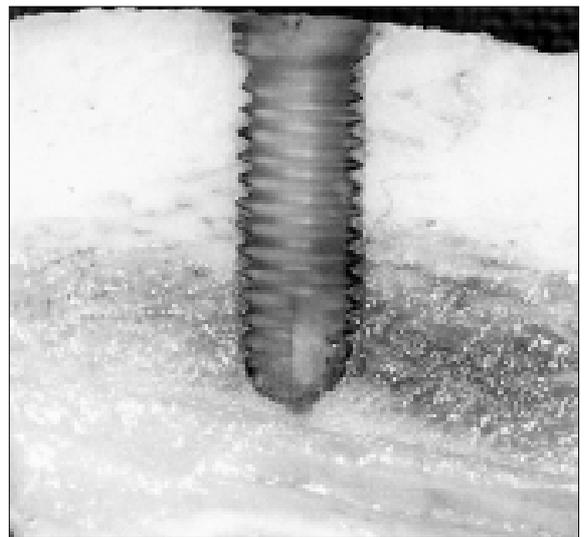


Fig. 7. Photograph of mesio-distally half sectioned specimen of titanium coated epoxy resin implant. The regenerated bone is seen indistinctly at the upper portion of implant.

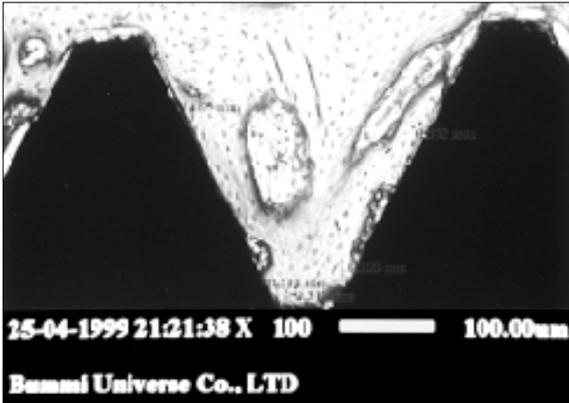


Fig. 8. Photograph of histomorphometric analysis using image analysis software (Bummi Universe Co.). Osseointegrated portion is marked with pink line and the figures are the measured values in 12th week specimen of BMP group (H&E, ×100).

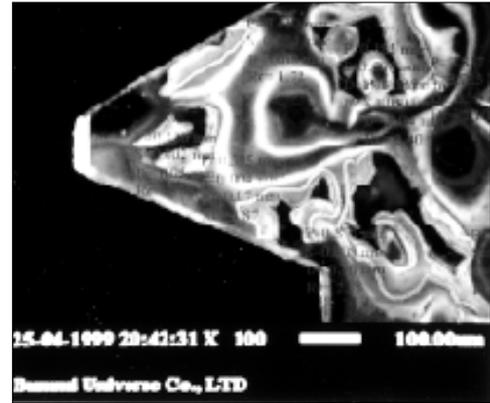


Fig. 9. Photograph of the analysis of the bone formation amount in the fluoromicroscopic finding by image analysis software(Bummi Universe Co.). The pink line is the 2th week fluorescent line and figures are the area within the lines (Fluoromicroscopy, ×100).

을 다듬은 후 에폭시레진 임플란트 시편은 경조직절단기(Exakt-cutting grinding system, Germany)를 이용하여 근원심으로 수직이 등분하였다(Fig. 7). 다시 협설방향으로 임플란트가 이등분이 되도록 절단한 후 5×3×10mm이하의 크기로 다듬어 전자현미경용 시편 제작을 위해 0.2M EDTA-2.5% glutaraldehyde용액에서 탈회를 시작하였다.

1) 형광 및 광학현미경용 표본 제작

나선형 임플란트 시편을 70% 에탄올에 3일간 고정하고, 에탄올의 농도를 상승시키며 탈수한 후, MMA(methyl methacrylate) III로 포매하여 경화시켰다. 레진이 완전히 중화된후 경조직절단기인 Exakt cutting grinding system으로 시편 블록을 약 100~150 μ m 두께로 증으로 절단하였다. 이렇게 준비된 절편들은 Exakt micro-grinding system으로 30 μ m 두께가 되도록 연마하였다. 완성된 절편을 봉입제로 마운팅한 후 형광현미경으로 관찰하고, 헤마톡시린과 에오진으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

2) 투과전자현미경용 표본 제작

에폭시레진 임플란트 시편을 0.2M EDTA-2.5% glutaraldehyde로 약 6개월간 탈회하고 이를 1% OsO₄용액(0.1M phosphate buffer PH 7.4, 4 $^{\circ}$ C)으로 2시간 동안 후고정한 다음, 계열알코올로 탈수하고 prophylyene oxide로 치환한 후, epon(Poly/Bed 812 resin, Polyscience, Inc., U.S.A.)으로 포매하여 경화시켰다. 이를 초미세 박절기(microtome 2050 supercut, Teichert-Jung, Germany)를 이용하여 1.5 μ m 두께의 박절편을 형성하고 1% toluidine 용액으로 염색한 후 관찰 부위를 설정한 다음 초미세박절기를 이용하여 60~80nm 두께의 초박절편을 만들어 uranyl acetate-lead citrate로 이중 염색하였다. 이 표본을 투과전자현미경(TEM-1200 EX, JEOL, Japan)으로 가속전압 80KV 에서 재생골과 임플란트 계면의 소견을 관찰했다.

5. 조직형태계측학적 분석

비교적 골접촉이 우수한 2개의 나사산의 광학현미경 소견을 video camera(Pixera)을 통해 영상분석소프트웨어(Bummi Universe Co.)에 저장하였다. 먼저 전체 나사산의 길이를 측정하고 나사와 접촉하는 골의 길이를 측정하여 백분율을 구하였다(Fig. 8). T-test를 이용하여 통계처리를 하였으며 p<0.05 수준에서 통계학적 유의정도를 비교하였다.

6. 형광약제 주입 시기별 골형성량 측정

12주의 표본을 형광현미경에서 확대한 후 video camera(Pixera)를 통해 영상분석 소프트웨어(Bummi Universe Co)에 저장하고 각각의 형광대(2주, 4주, 6주, 8주, 12주)를 선으로 연결하였다. 임의로 정한 화상(표본의 실제면적; 0.6×0.6mm²)에서 각각의 기간에 해당하는 선내에 있는 면적을 모두 합한 값을 각 시기별 골형성량으로 하였고 이를 전체면적(화상면적에서 임플란트의 면적을 뺀 나머지 면적)에 대해 백분율로 계산하였다(Fig. 9). T-test를 이용하여 통계처리를 하였으며 p<0.05 수준에서 통계학적 유의정도를 비교하였다.

Ⅲ. 연구 성적

1. 광학현미경적 소견

1) 6주군

골결손부의 대부분이 골로 채워져 있고 임플란트와의 계면에 연조직의 개재없이 골이 직접 임플란트에 접촉되어있는 소견을 보였다. 대부분의 신생골은 교직골(woven bone)의 양상을 띠고 있었으며 일부에서만 골개조의 소견을 보였다(Fig. 10, 11). 골세포(osteocyte)를 포함한 골소강(lacuna)은 크고 골소강들의 밀도

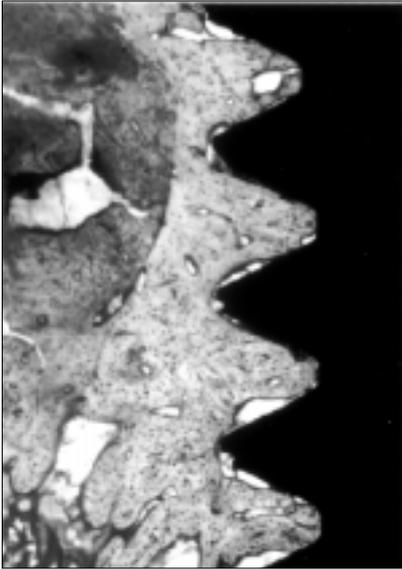


Fig. 10. 6th week of BMP group (H&E, × 40). Most of the defect is filled with the woven bone. The osseointegration is obtained.

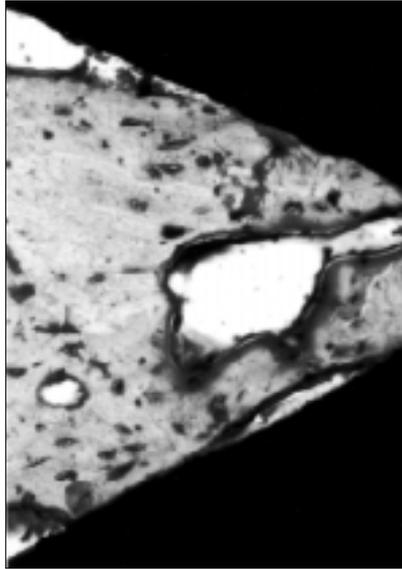


Fig. 11. 6th week of BMP group (H&E, × 200). The osteoclast and bone remodelling findings are rarely seen.

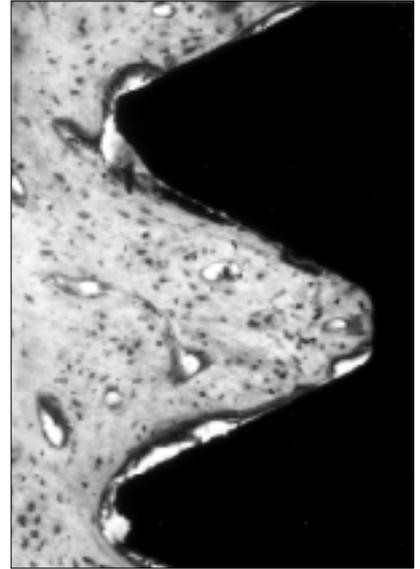


Fig. 12. 6th week of BMP group (H&E, × 100). The osteocyte lacunae are relatively large and its density is high. The bone marrow is narrow.

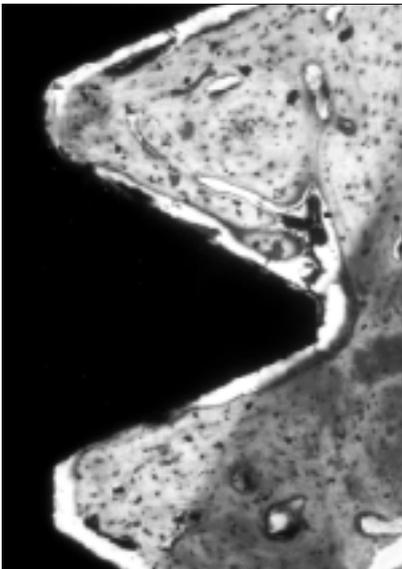


Fig. 13. 6th week of DFDB group (H&E, 100). The bone was detached from the implant inadvertently during processing specimen. The Haversian system is not prominent.

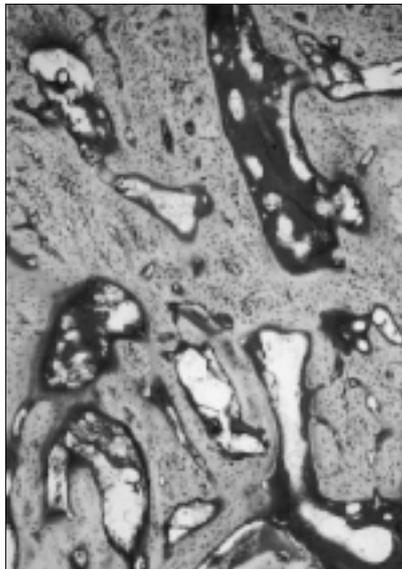


Fig. 14. 6th week of BMP group (H&E, × 40). Congestion, vascular dilatation and fibrous connective tissues are seen in the bone marrow. There are numerous osteocyte lacunae.

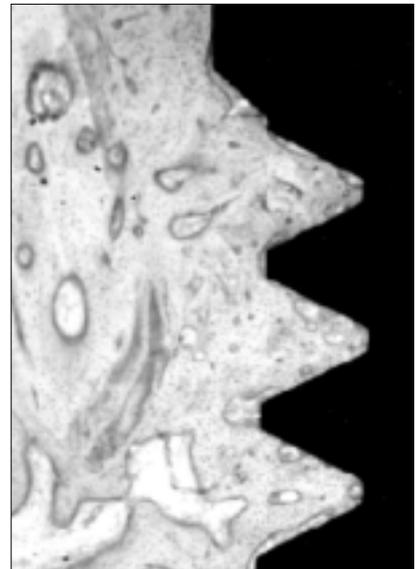


Fig. 15. 12th week of BMP group (H&E, × 40). Most of the defect is filled with the compact bone. The osseointegration is well obtained.

가 높았으며 하버스계(haversian system)의 발달은 뚜렷하지 않았다(Fig. 12, 13). 골수강(bone marrow)은 좁았으며 골수강내에는 섬유성 결합조직과 혈관 확장 및 충혈 소견을 보였고 염증세포는 발견되지 않았다(Fig. 14). DFDB군과 BMP군 사이의 소견의 차이는 보이지 않았다.

2) 12주군

골결손부는 대부분 치밀골로 채워져 있었으며, 많은 역전선(resting line, reversal line)이 관찰되었고 골수강내에서 조골세포의 배열을 보여 골개조의 소견이 뚜렷이 관찰되었다. 그리고 골흡수가 진행되고 있는 부위에서는 파골세포가 관찰되었다. 일부에서는 이식재가 신생골로 둘러싸여 있는 소견을 나타내었

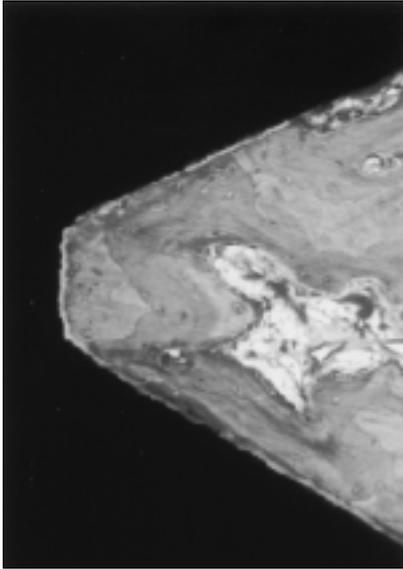


Fig. 16. 12th week of DFDB group (H&E, X200). Numerous reversal lines are prominent and osteoblast linings are seen.

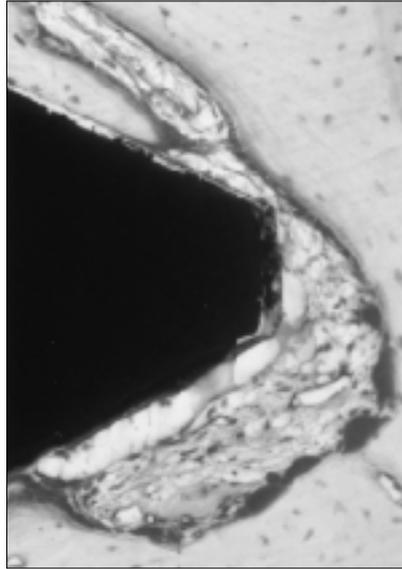


Fig. 17. 12th week of DFDB group (H&E, X200). Bone resorption is in progress by osteoclasts. Marrow space is filled with fibrous connective tissues.

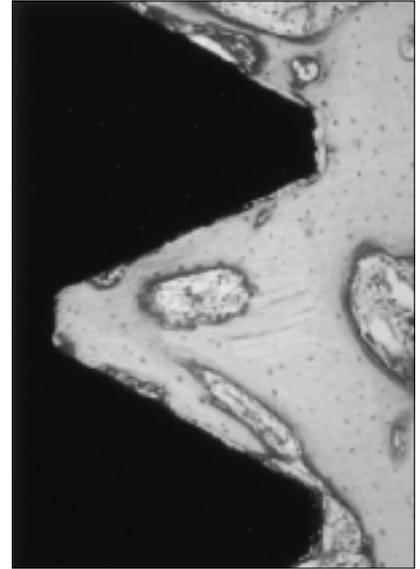


Fig. 18. 12th week of DFDB group (H&E, X100). A little grafted material remains and is surrounded by new bone.

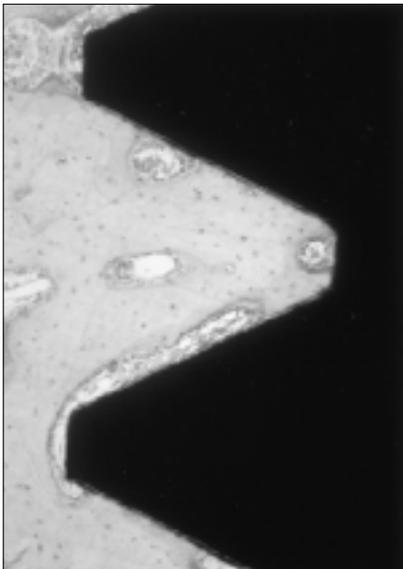


Fig. 19. 12th week of BMP group (H&E, X100). The size of osteocyte lacuna is smaller than 6th week specimen and the number is less than 6th week.

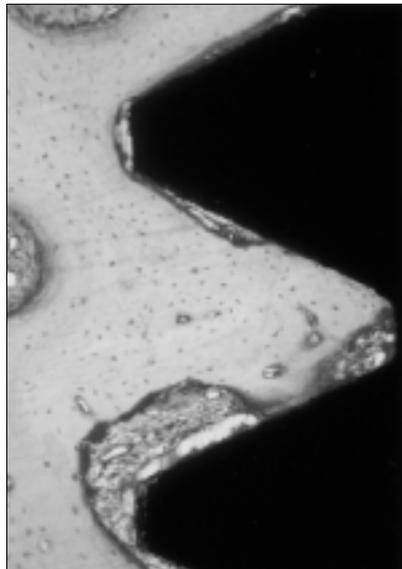


Fig. 20. 12th week of DFDB group (H&E, X100). Harversian systems are seen near the interface.

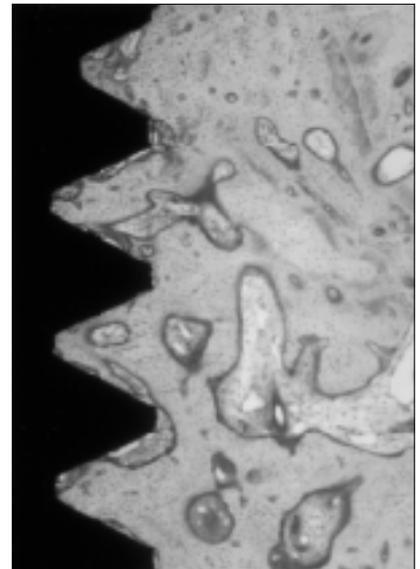


Fig. 21. 12th week of DFDB group (H&E, X40). The bone marrow spaces are wider than 6th week specimen.

다(Fig. 15~18). 골세포를 포함한 골소강의 크기는 6주군에 비해 작아졌으며 골소강의 수도 적어졌다. 새로 형성된 골은 6주군에 비해 골소강은 비교적 넓었으며 하버스계가 발달된 성숙골의 소견을 보였다. 골소강내의 혈관확장 및 충혈 소견은 없어졌고 대부분 섬유성 결합조직으로 채워져 있었으며 염증소견은 없었다(Fig. 19~22). 6주군에서와 마찬가지로 DFDB군과 BMP군

사이의 소견의 차이는 보이지 않았다.

2. 조직형태계측학적 분석

재생골과 임플란트 사이의 계면의 골접촉율을 계측한 결과는 표 2와 같다. 6주째 BMP군은 40.25 ± 18 (range: 20.02~71.26)이

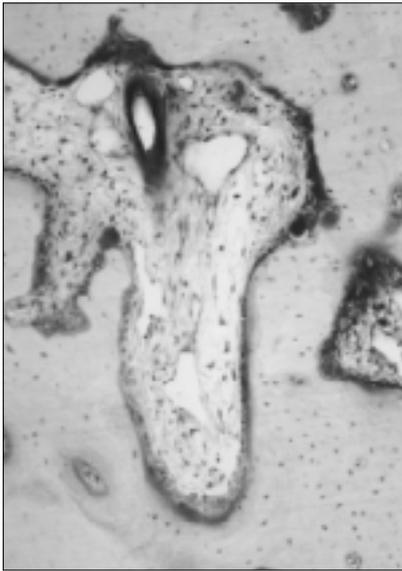


Fig. 22. 12th week of BMP group (H&E, × 100). The bone marrow has no congestion or vascular dilatation, and most part of it is filled with fibrous connective tissues.

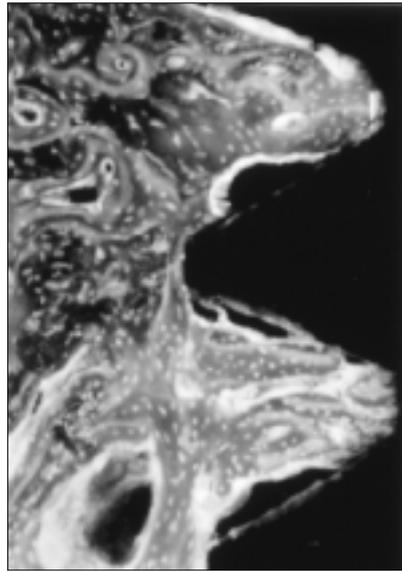


Fig. 23. 6th week of BMP group (×100). The woven bone formed before 2th week, is labeled diffusely with oxytetracycline (dark yellow). Yellow fluorescent lines of 2th week are seen near the interface.

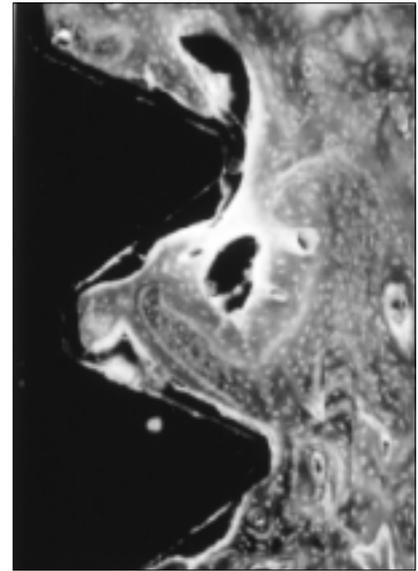


Fig. 24. 6th week of DFDB group (×100). There is no discontinuity of fluorescent lines.

Table 2. Profile of bone to implant contact ratio (%)

	BMP	DFDB
6th Week	40.25±18	38.37±14
12th Week	56.04±16	42.63±15

6th week: no statistical difference.

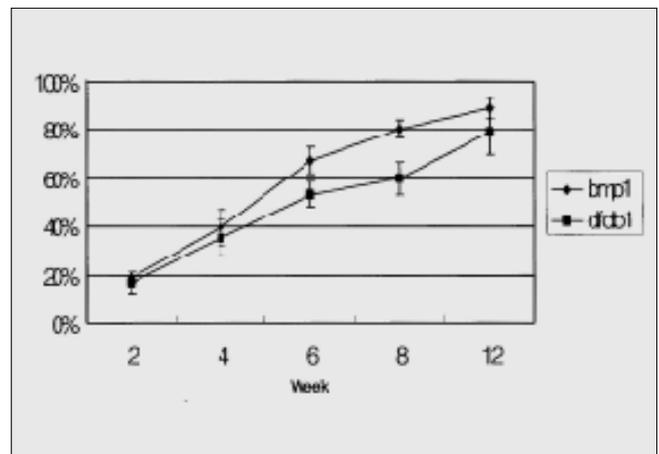
12th week: p<0.05

였으며 DFDB군은 38.37%±14 (range: 24.12~58.49)였다. 12주째의 BMP군은 56.04%±16 (range: 25.16~74.35)이었고 DFDB군은 42.63%±15 (range: 23.71~65.6)로 측정되었다. BMP군이 DFDB군에 비해 높은 골접촉율을 보였으며, 통계학적으로 6주에는 유의성이 없었고 12주에서는 유의한 차이를 보였다(p<0.05).

3. 형광현미경적 소견

1) 6주군

2주에 주입한 oxytetracycline이 황색형광대, 4주의 calcein green이 녹색 형광선으로 나타났다. 그러나 6주에 주입한 alizarin red는 형광현미경상 육안으로는 관찰 가능하였으나 촬영하기에 너무 어두워 사진상에는 밝은 노란색에 가깝게 보였다. 선상의 형광대가 골결손부에 인접한 숙주골의 골면에서 시작하여 층판구조를 이루고 연속적으로 주행하며 골흡수에 의한 형광선의 끊어짐은 관찰되지 않았다. 각 주 사이의 형광선의 간격은 전반적으로 규칙성을 보여 2주의 황색 형광선과 4주의 녹색 형광선 사이가 넓었고 4주의 형광선과 6주의 형광선 사이는 좁았으나, 일부에서는 불규칙한 형광선이 관찰되었다. 임플란트의 나사산 사이에서 2주의 형광선이 관찰되어 2주 이전에 결손부의 변연만 아



Graph 1. Comparison of bone formation amount according to fluorescent labeling time in 12th week BMP, DFDB group.

니라 임플란트면과 가까운 부위에서도 골형성이 시작되었음을 알 수 있었다. 2주 이전에 형성된 골의 전부에서 2주에 주입한 oxytetracycline이 미만성으로(diffusely) 표식(labeling)되어 이 시기에 형성된 골이 성긴 교직골(woven bone)임을 알 수 있었다. BMP과 DFDB군 사이의 특별한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 23, 24).

2) 12주군

2, 6주에 투여한 oxytetracycline은 황색선, 4, 8주에 투여한 calcein green은 녹색선 그리고 희생 직전에 투여한 alizarin red는 희미한 푸른빛의 형광선으로 나타났고 층판구조를 이루며 연속적으로 주행하였다. 골흡수에 의한 형광선의 끊어짐이 관찰되었으

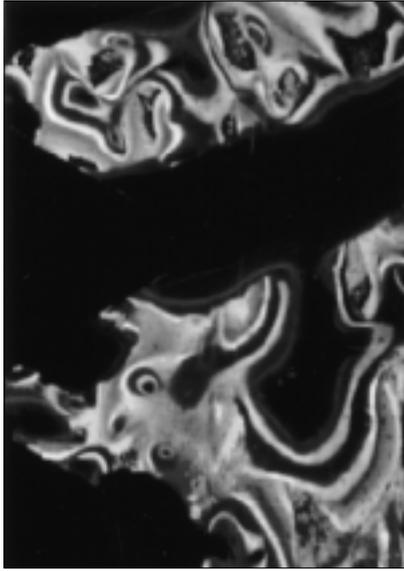


Fig. 25. 12th week of BMP group (×100). The intervals of fluorescent lines are relatively regular. The discontinuities of 2th, 4th, 6th week fluorescent lines are seen.

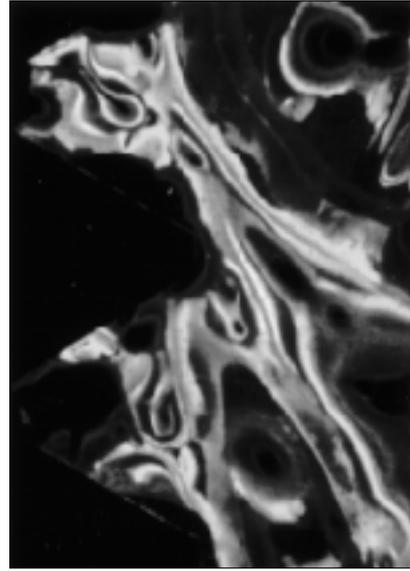


Fig. 26. 12th week of DFDB group (×100). The woven bone which is labeled diffusely with oxytetracycline, reduces remarkably.

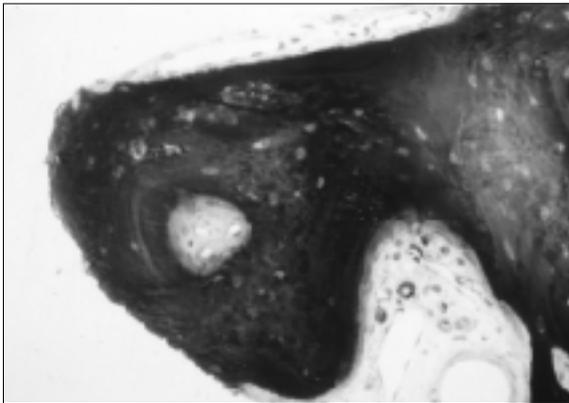


Fig. 27. 6th week of DFDB group (toluidine blue, ×200). The bone contacts directly with titanium coating (preliminary demineralized section for ultrathin specimen).

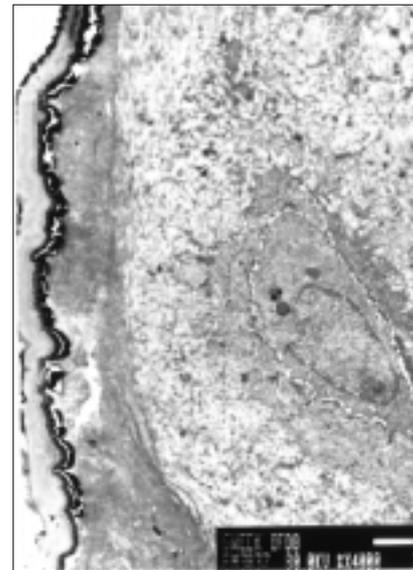


Fig. 28. 6th week of DFDB group (×4000). There are exudate or soft tissues between titanium coating and collagen fibrils.

며 선의 끊어짐은 6주에서 8주 사이와 8주에서 12주 사이에 주로 관찰되었고 이 시기에 골개조가 왕성하게 일어났음을 알 수 있었다. 2주에 주입한 oxytetracycline에 미만성으로 표식된 교직골은 6주군에 비해 현저히 줄어들었으며, 4주 이후에는 더욱 분명한 선상의 형광선이 관찰되어 증판상의 치밀골이 침착된 것으로 보였다. BMP군과 DFDB군 사이의 소견의 차이는 관찰할 수 없었다(Fig. 25, 26).

각각의 형광약제 투여 시기의 골형성량을 계측하여 전체면적에 대한 백분율을 비교한 결과 같은 기간 동안에 BMP군이 많은 골형성량을 보였으며, 통계학적으로 6주와 8주에서는 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$, Graph 1).

4. 투과전자현미경적 소견

1) 6주군

탈회표본의 광학현미경 소견에서 골접촉이 확인된 부위를 선택하여 전자현미경 시편을 제작하였으나, BMP군과 DFDB군 모두에서 교원질섬유나 무결정층(amorphous layer)이 티타늄과 직접 접촉되어 있는 소견을 얻을 수가 없었다. 티타늄과 교원질층 사이에 연조직이나 삼출액으로 보이는 층이 0.4~2 μ m 두께로 넓게 개재되어 있었고 그 상부에서 골세포와 교원질섬유, 석회화

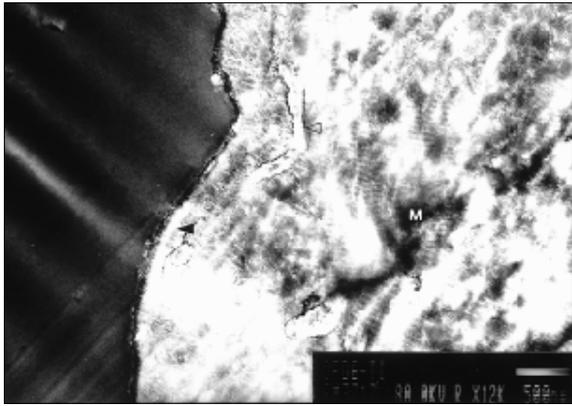


Fig. 29. 12th week of DFDB group ($\times 12000$). There is about 100nm proteoglycan layer adjacent to titanium coating(arrow head). Collagen fibrils are arranged irregularly, and canaliculi of bone(vacant arrow head) and mineral particles(M) are seen.

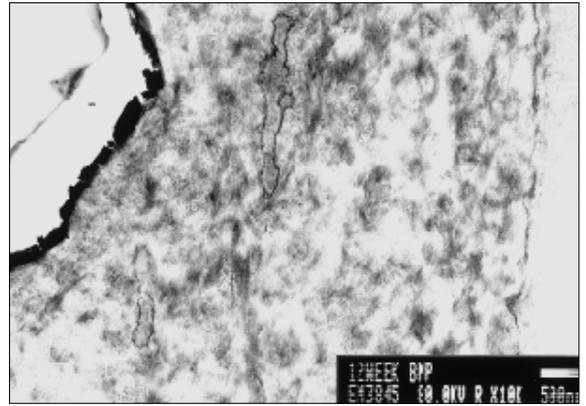


Fig. 30. 12th week of BMP group ($\times 10000$). Collagen fibrils extend to titanium coating without intervening layer.

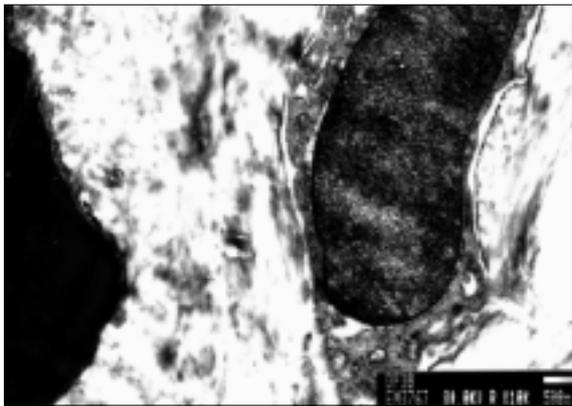


Fig. 31. 12th week of DFDB group ($\times 10000$). Osteocyte is seen near the titanium interface. Irregularly arranged collagen fibrils extend to the titanium coating.

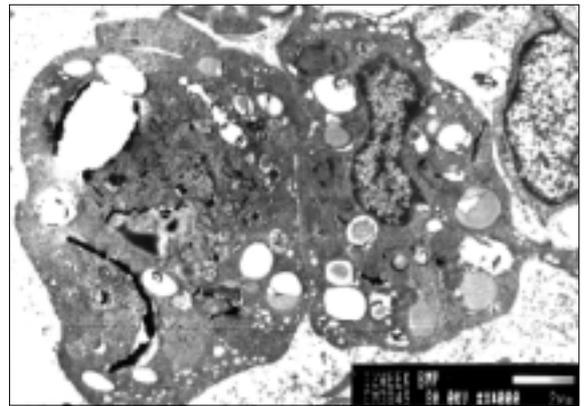


Fig. 32. 12th week of BMP group ($\times 4000$). Separated titanium coating is seen in the multinucleated giant cell.

과립(mineral particle)등이 관찰되었다(Fig. 27, 28).

2) 12주군

티타늄피막과 인접하여 약 100nm두께의 무결정층이 보였으나 많은 부위에서는 이 층의 개재없이 교원질섬유가 직접 티타늄과 접해있었다. Lamina limitans-like layer는 발견할 수 없었고 불규칙적으로 배열된 교원질섬유, 골세포, 골의 소관(canaliculi), 석회화 과립등을 관찰할 수 있었다. 교원질섬유의 밀도는 계면의 인접 부위로부터 수 m까지 거의 유사하였고, 일부에서는 계면에 가까워지면서 낮아졌다. 수개월간의 탈회에도 불구하고 석회화 과립(mineral particle)이 다수 나타났으며, 에폭시레진으로부터 탈락된 티타늄피막이 다핵거대세포에 의해 포식된 소견도 관찰되었다(Fig. 29~32).

IV. 총괄 및 고안

1969년 Branemark 등³¹⁾은 성견에서 탈회조직을 임플란트에서 분리하는 방법으로 티타늄면에 골이 직접 접촉하고 있음을 보고하였다. 이러한 보고에도 불구하고 1960년대와 1970년대에는 여러 학자들^{3,36,37)}이 연조직 계면의 임플란트를 보고하고 있었기 때문에 연조직의 개입이 없는 임플란트를 인정하지 않았고 Branemark의 논문이 발표된 후 15년 정도가 지나서야 비로소 급속 구조물이 골과 직접 유착할 수 있다는 가능성이 받아들여지기 시작하였다. 골유착(osseointegration)은 광학현미경하에서 부하가 가해진 임플란트와 골 사이의 직접적인 접촉으로 정의되어 있다²⁾. 이때 임플란트 표면의 대부분이 골과 접촉하여야 하나 최소한의 결합정도는 정해지지 않았다. 1985년 Albrektsson³⁸⁾은 임플란트와 티타늄계면에 대한 여러학자들의 의견을 요약하면서 이물질질을 체내 식립할 때 관계되는 여러가지 문제점을 깨닫지

못함으로써 연조직에 의한 유착을 주장하게 된다고 하였다. 임플란트 표면의 조건, 수술기법, 부하조건(*loading condition*) 등의 요건을 적절히 조절한다면 티타늄 임플란트의 골유착은 예견할 수 있으며 일단 이루어진 유착은 비생리적 부하가 가해지지 않는 한 수십년에 걸쳐 유지될 수 있다고 하였다²⁾.

조직계면의 관찰에 있어서 광학현미경의 해상력은 전체 임플란트 주변의 조직의 반응과 개재된 연조직의 계면을 관찰하기에 충분하다. 그러나 임플란트의 재료, 표면조건, 이식제와의 반응 등의 연구를 위해서는 전자현미경을 이용한 보다 깊은 연구를 필요로 하며 이를 위해 초박절표본의 제작을 위한 노력을 하게 되었다. 조직표본에 있어서 표본을 절단하기 전에 임플란트가 떨어져 나간 조직표본은 단지 간접적인 정보만을 제공하게 된다. 임플란트와 인접 조직이 분리될 때 그 사이에 존재했을 수 있는 연조직이 떨어져나가 골유착과 유사한 상을 보일 수 있기 때문이다³⁹⁾. 따라서 금속과 골이 온전한 결합상태로 표본을 절단할 수 있는 기술이 연구되어왔다.

Donath와 Breuner⁷⁾에 의한 연마방법은 수 μm 까지의 시편 제작을 가능하게 하였고 여러 개의 임플란트 나사산에서 고배율로 골유착의 상태를 관찰할 수 있게 하였다. 그러나 금속과 조직의 탄성율의 차이로 인하여 전자현미경을 위한 초박절표본 제작은 곤란하였다. 1981년 Gould 등⁴⁰⁾은 전자현미경적 관찰을 위하여 에폭시레진에 얇은 티타늄막을 입힌 후 구강상피세포를 그 위에 배양하여 임플란트와 주위 상피세포사이의 부착이 *basal lamina*와 *hemidesmosome*에 의한 것이라는 것을 밝혔으며, 1984년에는 사람의 구강내에 $3 \times 3 \times 0.5\text{mm}$ 의 티타늄피막 에폭시레진을 삽입하여 같은 결과를 얻었다. Albrektsson 등^{13,14)}은 폴리카보네이트 플라스틱 임플란트에 금속피막을 입혀 여러 금속에 대한 계면 반응을 상세히 분석할 수 있는 전자현미경 소견을 얻었다. 본 실험에서는 전자현미경용 초박절표본의 제작을 위하여 Listgarten과 Lai³²⁾, Gould 등³³⁾, Linder 등¹⁵⁾에 의한 에폭시레진 임플란트를 사용하였고 최근 보편적으로 사용되고 있는 나선형 임플란트를 기본형으로 하였다. 전자현미경표본 제작과정 중 여러 개의 시편에서 티타늄피막은 시편에 남긴 채로 레진 임플란트가 주변조직으로부터 떨어져 나오는 것으로 보아 좀더 나은 임플란트 실험 모델이 되기 위해서는 레진에 티타늄을 피막시키는 기술에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

1970년대까지는 골과 임플란트의 관계가 연조직 유착(*fibrous integration*)으로 알려져 있었고, 80년대에 골과 임플란트 사이에 골유착이 이루어짐이 인정되면서 임플란트의 식립시 골유착을 얻는데 모든 노력을 집중하였다. 그러나 1990년대부터는 교환관계 및 심미적으로 유리한 위치에 임플란트를 식립하는 것은 물론 과도하게 흡수된 치조재나 신선 발치외에 식립하려는 시도로 인하여 임플란트 주변의 골결손부 수복에 많은 노력이 시도되었다. 이를 위해 여러 가지 방법과 골수복제가 시도되고 있으나 그 중 조직유도재생술과 탈회동종골, 이종골, 합성물질(*alloplastic material*) 등이 사용의 간편함과 효능의 입증으로 많이 사용되고 있으며, 최근에는 골형성단백질에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

임상적으로 유용한 골재생물질은 골유도물질과 성장인자(*growth factor*)와 같은 단백질일 것이다. 골형성단백질(*bone morphogenetic protein, BMP*)은 골형성유도 물질로서 골속에 내재해 있으면서 태생기 이후 골성장에 따른 골개조에 관여하다가, 골의 외상이나 질병이 발생하면 다른 성장인자와 함께 골형성을 유도한다⁴¹⁾. BMP는 화학주성으로 미분화 간엽세포를 골결손부위로 유인하고, 연골전구세포(*chondroprogenitor cell*) 및 골전구세포(*osteoprogenitor cell*)로의 분화를 유도하면서 이들 세포의 증식에 관여한다. 최종적으로는 연골모세포 및 연골세포나 골모세포 및 골세포로 분화가 완료되면서 연골내 골화과정을 통해 신생골을 형성한다. Urist⁴²⁾에 따르면 BMP를 쥐(*rat*)의 근육낭에 매식하면 수술 후 10일경까지는 연골과 교직골이 형성되고 20일까지는 교직골에 골소주(*trabecular bone*)가 나타나다가 28일경이 되면 골수를 포함한 층판골로 변한다. 본 연구에서는 bBMP의 활성을 확인하기 위해 bBMP-IBM 이식제를 개의 종아리 근육낭(*calf muscle pouch*)에 이식하였고, 이식 후 6주 소견에서 이식제의 흡수와 신생층판골의 형성이 관찰되어 골유도능을 확인하였으며 뚜렷한 면역거부반응은 찾아볼 수 없었다. 본 실험에서 사용한 bBMP는 Bessho 등⁴³⁾과 Nagai 등⁴⁴⁾의 연구와 유사한 방법으로 추출되었고, SDS-Page에 의한 분자량 측정결과 14.5KDa에서 29KDa 사이의 물질로 확인되어 Bessho 등^{43,45)}과 Urist 등^{35,46)}이 보고한 분자량(18.0KDa)과 유사한 결과를 얻었다. SDS-Page상 수 개의 띠로 나타난 것은 골유도능이 없는 기타 단백질이 포함된 부분정제된 상태³⁹⁾이기 때문으로 사료되며 정제된 BMP를 얻기 위해서는 순도를 높인 후 아미노산 서열의 확인이 필요하나, 본 연구의 목적을 위하여 가급적 많은 양이 필요했기 때문에 부분정제된 BMP를 사용하였다.

동종골기질에서 BMP를 비롯한 기타 단백질성분을 제거시킨 비활성화 골기질(IBM)^{47,48)}을 운반체로 사용하였는데 이는 제작하기가 용이하였고 수술중 조작이 간편하였으며, 이식대상동물의 동종골기질이었으므로 면역학적으로 유리하였다. 이 운반체는 불용성 골기질⁴⁹⁾로서 이식초기에는 체내단백분해 효소로부터 어느 정도 골형성단백질을 보호하는 작용을 하고, 생분해되면서 결합되어있던 골형성단백질을 서서히 방출시켜 이식부위에서 골형성단백질이 조기 확산되지 않게 하며, 우골에서 추출한 BMP의 골형성능력이 발휘된 것으로 보아 실험상 적절한 운반체의 선택이라고 생각되었다. Sampath 등⁴⁹⁾은 탈회된 골기질을 4M guanidine, 8M urea/1M NaCl, 혹은 1% NaDodSO₄로 처리하면 골유도능을 완전히 상실하게 된다고 보고한 바 있어 운반체는 골형성에 영향을 주지 않았을 것으로 사료된다.

Simion 등⁵⁰⁾은 이식제로써의 한계를 갖고있는 자가골을 대신하여 탈회동종골(DFDB)의 사용을 제안하였으며 이는 DFDB가 공간유지 역할외에도 골형성능을 갖고있기 때문이었다. DFDB는 탈회과정에 의해 골기질내 골형성단백질의 골유도능이 표출되어 숙주의 미분화 간엽세포를 조골세포로 분화시킴으로써 골유도능을 나타내게 된다. Mahmoud 등⁵¹⁾은 원숭이의 대흉근에 0.6N HCl에 16시간 탈회시킨 탈회골분말 이식 후 20일에 연골성분이 처음 나타났고 40일에는 일부에서 골형성과 연골세포가

관찰되었으며 72일에 전체 시편에서 골성분이 발견되었다고 보고하였다. 연골이나 골은 탈회골분말의 변연부 뿐 아니라 이식분말 내에도 관찰되었다고 하였다. 그러나 Becker 등⁵²⁾, Yamashita와 Takagi⁵³⁾는 탈회골기질의 재석회화는 20~30 μ m의 원형의 석회화 과립(mineral particle)이 분산되어 나타나고 그 수가 늘어나면서 서로 뭉쳐져 신생교직골과 구별이 어려운 단계로 이행되는 무세포 석회화 침착(acellular matrix deposition) 과정에 의한 것이라고 하였다. 본 연구에서는 활성확인을 위해 0.5N HCl에 3시간 탈회시킨 냉동건조탈회골분말을 개의 종아리 근육낭(calf muscle pouch)에 이식하고 6주 후 소견에서 과골세포에 의한 이식재의 흡수와 조골세포에 의한 신생층판골의 형성을 탈회골분말의 변연부와 내부에서 관찰할 수 있었다.

Huggins 등⁵⁴⁾, Mellonig 등⁵⁵⁾, Narang와 Wells⁵⁶⁾은 탈회냉동건조골을 동종이식하였을 때 2~3주에서 신생골 형성을 확인하였고 8주 후에는 이식부위가 완전히 신생골로 채워진다고 하였다. Block과 Kent⁵⁷⁾는 발치후 임플란트 식립시 4mm이상의 결손부에 탈회골 이식을 권장하였으며 골이 상부에까지 형성됨을 보고하였고, Sonis 등⁵⁸⁾, Mellonig 등^{59,60)}은 치주질환에서 탈회동결건조골이 BMP의 매개에 의해 골유도능을 보이는 것을 보고하였다. 그러나 Becker 등⁵²⁾은 차폐막과 함께 탈회동결골을 개에 이식한 후 12주에 이식된 DFDB가 40~50%정도 남아 있었고 교직골이 45%, 층판골이 8%정도 관찰됨을 보고하였다. 육안에 의한 재생골량의 측정치와 조직학적소견과는 차이가 있었고 임플란트 주변 골결손부에 이식한 이식재가 골-임플란트 접촉을 증가시키지는 못하고 단지 노출되었던 나사산을 단단한 골이 덮고 있는 듯한 소견만을 보일 뿐이며 부하가 가해졌을 때 이러한 조직이 기능을 할 수 있을지는 미지수라고 하였다. DFDB가 임상에 적용되는 이유는 BMP의 내재가능성 때문인데, 극히 소량의 BMP을 얻기 위해서도 많은 양의 DFDB가 필요하며⁶¹⁾, hBMP 5~10mg정도가 되어야 비로소 작은 소골(ossicle)의 형성을 얻을 수 있으므로 DFDB에 의한 골유도는 기대하기 어렵다는 부정적인 의견을 제시하였다.

광학현미경 및 형광현미경소견에서 BMP군과 DFDB군 모두에서 만족할만한 골형성을 보였으나 골형성속도와 계면의 골접촉율(12주 BMP군; 56.04%, 12주 DFDB군; 42.63%)에서 BMP군이 우수하였다. 이는 DFDB군에서 탈회동결골 기질내의 BMP가 작용할 수 있는 환경이 만들어져 골유도과정이 진행되기는 하지만 BMP군에 비해 BMP농도가 떨어지기 때문에 사료되며, 보다 객관적인 자료를 위해 두 군에 충전된 이식재내의 BMP농도를 측정하는 실험이 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다. BMP군과 DFDB군 모두에서 6주에는 교직골로 결손부가 채워졌고 12주에는 치밀골로 채워졌으며 형광현미경상 골개조가 6주와 8주, 8주와 12주 사이에 주로 관찰되어, 6주 이전에 빠른 속도로 성긴 교직골이 형성된 후 6주와 12주 사이에 골개조가 일어나면서 치밀골로 대체되었다고 사료된다. 재생골형성 양상을 볼 때 2주 이전에 교직골의 형성이 있었고, 12주 소견에 소량이지만 이식재가 잔존되어있는 소견이 관찰되어 Huggins 등의 연구결과^{54,55,56)}와 약간의 차이가 있었다. 그러나 이식재의 내부나 주변에서 석회화

과립의 형성은 관찰할 수 없어 Becker 등⁵²⁾, Yamashita와 Takagi⁵³⁾에 의한 무세포 석회화침착과는 전혀 다른 소견만을 얻을 수 있었다. 형광현미경상 나사산 사이에서도 2주 이전에 골형성이 관찰되어 골재생이 골결손부의 변연부 뿐 아니라 임플란트 표면에 인접한 부위에서도 시작됨을 알 수 있었고 이는 이식재의 골유도능에 의한 것으로 사료된다.

Albrektsson과 Jacobsson³⁹⁾은 치밀골부에서 임플란트와 최소 90~95%이상의 골접촉이 필요하다고 하였고, 임플란트 전체표면의 골접촉율에 대해 Johansson 등⁶²⁾은 37.4%, Sennerby 등⁶³⁾은 도끼의 슬관절에서 58%, 경골에서 40%, Hipp와 Brunski⁶⁴⁾, Deporter 등⁶⁵⁾은 50%정도, Yavari 등⁶⁶⁾은 40~65%의 골접촉율을 보고하였다. 이는 실험동물과 치유기간, 골조직의 성질등의 차이에 의한 것으로 사료된다. 본 실험에서는 성견의 하악골 하연의 피질골내에 형성한 결손부에서 골접촉율을 측정할 때 12주의 BMP군에서는 56%, DFDB군에서는 43%의 골접촉을 얻었다. 정상골에 식립된 임플란트 전표면에서 측정된 선화들의 골접촉율^{62~66)}과는 유사하였으나 Albrektsson³⁹⁾의 치밀골내 최소 골접촉율에는 훨씬 못 미치는 결과였다. 동일군내에서도 시편간에 심한 차이를 보였으며 이는 한 시점에서 임플란트 계면의 골의 35~60%정도가 골개조 과정중에 있다는 보고⁶⁷⁾에서도 보듯이 임플란트-골 계면은 시간에 따라 변하는 동적인 계면이기 때문에 사료된다.

Albrektsson 등^{13,14)}의 plastic plug 방법에 의한 실험 결과에 따르면 티타늄 표면으로부터 200~400 Å 정도의 부위에 proteoglycans와 glucoseaminoglycan으로 구성된 부분적으로 석회화된 무결정구조(amorphous ground substance)가 존재하였다. 티타늄 표면으로부터 0.1~0.5 μ m 되는 부위에는 교원질 다발이 불규칙적으로 배열된 교원질 섬유로 변하며 이는 200 Å 되는 부위까지 뻗어 있었고 티타늄 표면에서 수백 Å 되는 부위는 석회화의 정도가 떨어지기는 하지만 비석회화 부위(decalcified space)는 없었다고 보고하였다. 이러한 소견이 광학현미경상에서 내려진 골유착 개념과 일치하는 것으로 간주되었고 많은 학자들^{13-15,68)}이 임플란트 계면의 초고배율 소견에서 내용물의 종류(mineral, collagen, proteoglycans)와 폭의 차이(20~500nm)는 보이지만 임플란트 계면에는 무결정층이 존재하여 임플란트와 교원질을 분리시키고 있다는 결과를 보고하였다.

Albrektsson 등^{39,68)}, Linder 등⁶⁹⁾, Johansson 등⁷⁰⁾의 실험에 따르면 광학현미경상에서 골유착이 이루어진 것으로 확인된 titanium, zirconium, titanium alloy, chrome cobalt alloy, Ti6Al4V 등의 계면에 대한 투과전자현미경 소견에서 20~1000nm의 다양한 두께의 proteoglycans층이 존재하였다. 이 층의 두께가 얇을수록 보다 조직에 자연스러운 조직반응(nature like tissue reaction)을 보인 것으로 생각하였고 광학현미경상 유사한 골유착 상태일지라도 proteoglycans층의 두께에 따라 장기간 하중을 가했을 때 임상적 차이를 보일 수 있을 것으로 추론하였다. 그러나 Linder⁷¹⁾는 골유착을 특정 재료에 대한 골의 반응이라기보다는 골의 불특정한 기본적인 치유과정으로 간주하였고 재료의 종류보다는 골의 치유능력을 최대화시켜줄 수 있는 외과적 술식이 보다 더 중요하다고 주장하였다.

참고문헌

골유착의 전자현미경상에서의 소견은 3가지로 정리될 수 있다. 첫째는 석회화 교원질 섬유가 직접 임플란트 표면에까지 뻗어있는 소견^{16,72)}이며 둘째는 기존의 Albrektsson 등^{13,14)}과 Linder 등¹⁹⁾에 의한 소견으로 얇은 electron dense coating⁷⁹⁾이 교원질섬유와 임플란트사이에 개재되어 있는 소견, 그리고 보다 가는 석회화된 섬유성 기질이 교원질섬유와 임플란트사이에 개재되어 있는 소견이다.⁷⁴⁻⁷⁶⁾ 본 실험에서는 일부에서 약 100nm 정도의 무결정층이 관찰되었으며 여러 부위에서 교원질 섬유가 바로 티타늄에 접촉하고 있는 소견을 얻어, 현재까지 임플란트-골 계면에서 관찰되었던 유형중 2가지를 임플란트-재생골 계면에서 확인하였다. 개재층(intervening layer, proteoglycans layer)이 나타나지 않았던 이유는 Listgarten 등¹⁶⁾의 가설에 따라 실험에 사용된 임플란트의 거친 표면등의 물리적 특성이 초고배율 소견에 영향을 주었거나 혹은 티타늄-골 계면의 치유 과정에서 나타나는 일반적인 소견으로 추론할 수 있겠다.

과거의 연구와는 달리 티타늄 임플란트-골 계면은 동적인 상태로 이해되어지고 있고 또한 초고배율 소견이 다양하게 보고되고 있으므로 광학현미경하에서 내려진 골유착의 정의는 치유의 과정에 따른 일련의 전자현미경소견으로 재 정의되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

성견의 하악골 하연에 나선형 티타늄 임플란트와 티타늄피막 에폭시레진 임플란트를 식립한 후 근원심부에 형성한 3×3×4mm의 결손부에 각각 우골에서 추출한 골형성단백질(BMP군)과 탈회동종골분말(DFDB군)을 이식하고 6주와 12주에 동물을 희생시켜 골결손부의 골재생과 재생골-임플란트 계면을 광학, 형광 및 투과전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 광학현미경 소견에서 두 실험군 모두에서 6주에는 골결손부가 교직골로 채워졌고 12주에는 치밀골로 채워졌으며, 연조직의 개재가 없는 골유착을 보였으나 두 군사이의 소견의 차이는 관찰할 수 없었다.
2. 조직형태측학적 분석에서 6주와 12주에 BMP군(40.25%, 56.04%)이 DFDB군(38.37%, 42.63%)보다 높은 골접촉율을 보였으며 12주에서는 유의한 차이를 보였다(P<0.05).
3. 형광현미경적 소견에서 시간 경과에 따른 골형성량은 BMP군이 DFDB군 보다 많게 나타났으며 6주와 8주에서는 유의한 차이를 보였다(p<0.05).
4. 투과전자현미경 소견에서 6주에서는 임플란트 계면에 약 0.4~2 μ m의 연조직이 개재된 소견만을 관찰할 수 있었으나, 12주에서는 100nm정도의 무결정층이 계면에 접해있거나 교원질섬유가 직접 티타늄 표면에까지 뻗어있었다. BMP군과 DFDB군 사이의 소견의 차이는 발견할 수 없었다.
5. 이상의 결과는 골형성단백질과 탈회동종골이 임플란트 주변의 골결손부에 효과적인 이식재로 사용될 수 있으며 특히, 골형성단백질은 보다 빠른 골재생을 나타내어 임플란트의 지지에 기여할 수 있을 것임을 시사하였다.

1. Branemark PI, Breine U, Lindstrom J, Adell R, Hansson BO, Ohlsson A: Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3: 81-100, 1969.
2. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J: Osseointegrated titanium implants. Requirements for enduring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 52: 155-170, 1981.
3. Manderson RD: Experimental intra-osseous implantation in the jaws of pigs. *Dent Pract* 222: 225-231, 1972.
4. Meenaghan MA, Natiella JR, Armitage JE, Wood RH: Evaluation of the crypt surface adjacent to metal endosseous implants. *J Prosth Dent* 31: 574-581, 1974.
5. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K, Ljunstrom I, Mcqueen DH, Skalak R: The interface zone of inorganic implants in vivo: Titanium implants in bone. *Ann Biomed Eng* 11: 1-27, 1983.
6. Schroeder A, Van der zyden E, Stich H, Sutter F: The reaction of bone, connective tissue and epithelium on endosteal implants with sprayed titanium surfaces. *J Maxillofac Surg* 9: 15-25, 1981.
7. Donath K, Breuner G: A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Saegge-Schliff technique. *J Oral Pathol* 11: 318-326, 1982.
8. Linder L: High-resolution microscopy of the implant-tissue interface. *Acta Orthop Scand* 56: 269-272, 1985.
9. Thomsen P, Ericson LE: Light and transmission electron microscopy used to study the tissue morphology close to implants. *Biomaterials* 6: 421-424, 1985.
10. Brown SA, Simpson J: Electrochemical dissolution of metallic implants prior to histologic sectioning. *J Biomed Mater Res* 13: 337-338, 1979.
11. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE: Early tissue response to titanium implants. I. Light microscopic observations. *J Mater Sci Mater Med* 4: 240-250, 1993.
12. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE: Early tissue response to titanium implants. II. Ultrastructural observations. *J Mater Sci Mater Med* 4: 494-502, 1993.
13. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Ivarsson B, Jonsson U: Ultrastructural analysis of the interface zone of titanium and gold implants. *Advances in Biomaterials* 4: 167-177, 1982.
14. Albrektsson T: Response of bone to surgical preparation and non-biological material. In: Glantz PO, Leach SA, Ericson T eds. *Oral interfacial reactions of bone, soft tissue and saliva*. pp115-130, IRLpress, oxford, 1985.
15. Linder L, Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Ivarsson B, Jonsson U, Lundstrom I: Electron microscopic analysis of the bone-titanium interface. *Acta Orthop Scand* 54: 45-52, 1983.
16. Listgarten MA, Buser D, Steinemann SG, Donath K, Lang NP, Weber HP: Light and transmission electron microscopy of the intact interfaces between non-submerged titanium-coated epoxy resin implants and bone or gingiva. *J Dent Res* 71: 364-371, 1992.
17. Jarcho M: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 157: 259-278, 1981.
18. Nagahara K, Isogai M, Shibata K, Jeenaghan MA: Osteogenesis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate used as a bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7: 72-79, 1992.
19. Souyris F, Pellequer C, Payrot C, Servera C: Coral, a new biomedical material. Experimental and first clinical investigations on Madreporaria. *J Maxillofac Surg* 13: 64-69, 1985.
20. Guillemin G, Patat JL, Fourie J, Chetail M: The use of coral as a bone graft substitute. *J Biomed Mater Res* 21: 557-567, 1987.
21. Froum SJ, Kushner L, Scopp IW, Stahl SS: Human clinical and histologic responses to durapatite implants in intraosseous lesions, case reports. *J Periodontol* 53: 719-725, 1982.
22. Kent JN, Quinn JH, Zide MF, Guerra LR, Boyne PJ: Alveolar ridge augmentation using non-resorbable hydroxyapatite with or without

- autogenous cancellous bone. *J Oral Maxillofac Surg* 41: 629-642, 1983.
23. Schliephake H, Neukam FW, Scheller H, Bothe KJ: Local ridge augmentation using bone grafts and osseointegrated implants in the rehabilitation of partial edentulism: Preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 9: 557-564, 1994.
 24. Urist MR: Surface decalcified allogenic bone(SDAB) implants. A preliminary report of 10 cases and 25 comparable operations with undecalcified lyophilized bone implants. *Clin Orthop* 56: 37-50, 1968.
 25. Van de Putte KA, Urist MR: Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop* 43: 257-270, 1965.
 26. Becker W, Becker E: Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: Surgical techniques and case reports. *Int J Periodont Rest Dent* 10: 377-392, 1990.
 27. Becker W, Becker E, Handelsman M, Ochsenbein C, Albrektsson T: Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets. *J Periodontol* 62: 703-709, 1991.
 28. Jovanovic S, Spiekermann H, Richter E: Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscenced defect sites: A clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7: 233-244, 1992.
 29. Urist MR, Dowell TA, Hay PH, Strates BS: Inductive substrate for bone formation. *Clin Orthop* 59: 59-96, 1968.
 30. Yan J, Xiang W, Baolin L, White FH: Early histologic response to titanium implants complexed with bovine bone morphogenetic protein. *J Prosth Dent* 71: 289-294, 1994.
 31. 조진희, 방몽숙, 이종호: 성견에서 임플란트 매식시 골형성단백 사용에 따른 골재생에 관한 연구. *대한치과보철학회지* 32: 593-607, 1994.
 32. Listgarten MA, Lai CH: Ultrastructure of the intact interface between an endosseous epoxy resin dental implant and the host tissues. *J Biol Buccale* 3: 13-28, 1975.
 33. Gould TRL, Brunette DM, Westbury L: The attachment mechanism of epithelial cells to titanium in vitro. *J Periodont Res* 16: 611-616, 1981.
 34. Luft JH: Improvements in epoxy-resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 409-414, 1961.
 35. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A, Tempst P, Hunkapiller M, DeLange RJ: Purification of bovine morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 371-375, 1984.
 36. Meenaghan MA, Natiella JR, Armitage JE, Wood RH: Evaluation of the crypt surface adjacent to metal endosseous implants: An electron microscopic study in clinically successful implants. *J Prosth Dent* 31: 574-581, 1974.
 37. Linkow L, Glassman PE, Asnis ST: Macroscopic and microscopic studies of endosteal blade-vent implants(six months dog study). *Oral implantology* 3: 281-309, 1973.
 38. Albrektsson T: The response of bone to titanium implants. *CRC Crit Rev Biocompat* 1: 53-84, 1985.
 39. Albrektsson A, Jacobsson M: Bone-metal interface in osseointegration. *J Prosth Dent* 57: 597-607, 1987.
 40. Gould TRL, Westbury L, Brunette DM: Ultrastructural study of the attachment of human gingiva to titanium in vivo. *J Prosth Dent* 52: 418-420, 1984.
 41. Chai Y, Slavkin HC: Biology of bone induction and its clinical applications. *Oral and Maxillofac Surgery Clinics of North America* 6: 739-753, 1994.
 42. Urist MR: Bone grafts & bone substitutes(Habel MB, Reddi AH eds.). pp70-83, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1992.
 43. Bessho K, Tagawa T, Murata M: Purification of bone morphogenetic protein derived from bovine bone matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 595-601, 1989.
 44. Nagai N, Qin CL, Nagatsuka H, Inoue M, Ishiwari Y: Age effects on ectopic bone formation induced by purified bone morphogenetic protein. *Int J Oral Maxillofac Surg* 28: 143-150, 1999.
 45. Bessho K, Tagawa T, Murata M: Analysis of bone morphogenetic protein(BMP) derived from human and bovine bone matrix. *Clin Orthop* 268: 226-234, 1991.
 46. Urist MR, DeLang RJ, Finerman GA: Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220: 680-686, 1983.
 47. 김병린, 김종원: 백서에서 냉동건조골, 표면탈회골, 탈회골분말을 골형성단백질과 병용시 골유도 과정에 대한 비교 연구. *대한구강악안면외과학회지* 24: 380-395, 1998.
 48. Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumar N, Hammonds RG, Nevins WB, Wood WI, Reddi AH: Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 264: 13377-13380, 1989.
 49. Sampath TK, Reddi AH: Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 78: 7599-7603, 1981.
 50. Simion M, Dahlin C, Trisi P, Piattelli A: Qualitative and quantitative comparative study on different filling materials used in bone tissue regeneration: A controlled clinical study. *Int J Periodont Rest Dent* 14: 199-215, 1994.
 51. Mahmoud H, Mahamed S: Osteoinduction in rhesus monkeys using demineralized bone powder allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 43: 837-844, 1985.
 52. Becker W, Schenk R, Higuchi K, Lekholm U, Becker E: Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: A study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 10: 143-154, 1995.
 53. Yamashita K, Takagi T: Ultrastructural observation of calcification preceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. *Acta Anat Basel* 143: 261-267, 1992.
 54. Huggins C, Wiseman S, Reddi A: Dentin matrix transformation: Rapid induction of alkaline phosphatase and cartilage. *Science* 167: 896-898, 1970.
 55. Mellonig J, Bowers G, Bailey R: Comparison of bone graft materials. part I. New bone formation with autograft and allografts determined by strontium 85. *J Periodontol* 52: 291-296, 1981.
 56. Narang R, Wells H: Stimulation of new bone formation on intact bones by decalcified allogenic bone matrix. *Oral Surg* 32: 668-675, 1971.
 57. Block MS, Kent J: Placement of endosseous implants into tooth extraction sites. *J Oral Maxillofac Surg* 49: 1269-1276, 1991.
 58. Sonis ST, Kaban LB, Glowacki J: Clinical trial of demineralized bone powder in the treatment of periodontal defects. *J Oral Medicine* 38: 117-123, 1983.
 59. Brunsvold MA, Mellonig JT: Bone grafts and periodontal regeneration. *Periodontology* 2000 1: 80-91, 1993.
 60. Mellonig JT: Freeze-dried bone allografts in periodontal reconstructive surgery. *Dent Clinics of North America* 35(3): 505-520, 1991.
 61. Urist MR, Sato K, Brownell AG, Malinin TI, Lietze A, Huo YK, Prolo DJ, Oklund S, Finerman GAM, DeLange RJ: Human bone morphogenetic protein(hBMP). *Proc Soc Exper Biol Med* 173: 194-199, 1983.
 62. Johansson CB, Sennerby L, Albrektsson T: A removal torque and histomorphometric study of bone tissue reactions to commercially pure titanium and vitallium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 6: 437-441, 1991.
 63. Sennerby L, Thomson P, Ericson IE: A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7: 62-71, 1992.
 64. Hipp JA, Brunski JB: Investigation of "Osseointegration" by histomorphometric analysis of fixture-bone interface. *J Dent Res* 66(Spec. Issue): 186, 1987.
 65. Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Melcher AH, Winslow J, Howley TP, Hansel P, Maniopoulos C, Rodriguez A, Abdulla D, Parisien K, Smith DC: A histological assessment of the initial healing response adjacent to porous-surfaced, titanium alloy dental implants in dogs. *J Dent Res* 65: 1064-1070, 1986.
 66. Yavari J, Steflink DE, Parr GL, Sisk AL, Hanes PJ, Patterson JW:

- Histomorphometry of the dental implant bone interface. *J Dent Res* 72(Spec Issue): 389, 1993.
67. Steflik D, Parr G, Sisk A, Lake F, Hane P, Berkery D, Brewer P: Osteoblast activity at the dental implant-bone interface: Transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations. *J Periodontol* 65: 404-413, 1994.
 68. Albrektsson T, Hasson HA, Ivarsson B: Interface analysis of titanium and zirconium bone implants. *Biomaterials* 6: 97-101, 1985.
 69. Linder L, Obrant K, Boivin G: Osseointegration of metallic implants: II. Transmission electron microscopy in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 60: 135-139, 1989.
 70. Johansson C, Lausmaa J, Ask M, Hasson HA, Albrektsson T: Ultrastructural differences of the interface zone between bone and Ti6Al4V or commercially pure titanium. *J Biomed Eng* 11: 3-9, 1989.
 71. Linder L: Osseointegration of metallic implants. I. Light microscopy in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 60: 129-134, 1989.
 72. De Lange GL, De Putter C, De Wijs FL: Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite-bone interface. *J Biomed Mater Res* 24: 829-845, 1990.
 73. Chehroudi B, Ratkay J, Brunette DM: The role of implant surface geometry on mineralization in vivo and in vitro: A transmission and scanning electron microscopic study. *Cells Mater* 2: 89-104, 1992.
 74. Steflik DE, Parr GL, Sisk AL, Hanes PJ, Lake FT, McKinney RV: High voltage electron microscopy and conventional transmission electron microscopy of the interface zone between bone and endosteal dental implants. *J Biomed Mater Res* 26: 529-545, 1992.
 75. Steflik DE, Parr GL, Sisk AL, Hanes PJ, Song MJ, Lake FT: High voltage electron microscopy and conventional transmission electron microscopy of the bone and osteocyte activity adjacent to dental implants. *J Periodontol* 63: 443-452, 1992.
 76. Steflik DE, Sisk AL, Parr GL, Gardner LK, Hanes PJ, Lake FT, Berkery DJ, Brewer P: Osteogenesis at the dental implant interface: High voltage electron microscopy and conventional transmission electron microscopic observations. *J Biomed Mater Res* 27: 791-800, 1993.