

# 가토 두개골 결손부에 이식된 Collagen bone filler (TERUPLUG®) 및 rhBMP-2의 골치유 능력

김주훈 · 김철환 · 김경욱

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2008;34:119-130)

## BONE HEALING CAPACITY OF THE COLLAGEN BONE FILLER (TERUPLUG®) AND RHBMP-2 IN THE RABBIT CRANIUM DEFECT

Ju-Hoon Kim, Chul-Hwan Kim, Kyung-Wook Kim

*Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University*

Absorbable atelo-collagen sponge (TERUPLUG®, Terumo Co. Tokyo, Japan) is inserted in the extraction wound where alveolar bone is exposed. It protects wounds and promotes the formation of granulation. This is made of atelo-collagen, to minimize antigenicity, which is cross-linked by heat treatment for biocompatibility.

TERUPLUG® consists of between 85 and 95 % of collagen type I and between 5 to 15 % of collagen type III. The raw material for the collagen is derived from bovine skin. It features a sponge block design and is shaped for easy insertion in the extraction wound.

This study was designed to find out the bone healing capacity of TERUPLUG®. We implanted TERUPLUG® (experimental group I) and TERUPLUG® with rhBMP-2 (experimental group II) in the rabbit cranium defect and then histologically analysed the specimen.

The results were as follows.

1. In the 4 weeks, a lot of the newly formed collagen fibers around material of the experimental group I implanted TERUPLUG® were observed. But, in the experimental group II implanted TERUPLUG® with rhBMP-2, a little of newly formed collagen fibers around material were observed. The cell proliferating activity and apoptosis of the experimental group I, II was positive in and around the implanted material.
2. In the 8 weeks, the amount of newly formed and matured bone in the experimental group II was more observed than the experimental group I and control group.

The results of this study indicate that absorbable atelo-collagen sponge (TERUPLUG®) is relatively favorable bone void filler with biocompatibility and has the better bone healing capacity in case of application with rhBMP-2.

**Key words:** TERUPLUG®, rhBMP-2, Bone healing capacity

## I. 서 론

구강악안면영역에서 골결손부의 완전한 수복을 위한 많은 실험적, 임상적 시도들이 오래전부터 진행되어 왔으며 그간의 노력으로 다양한 골이식재 및 골대치재 그리고 골성장 인자들이 연구, 개발되었다. 그러나 아직까지도 이상적이고 완벽한 골대체물은 개발되지 못 했으며 그것을 찾기 위한 여러 연구들이 다양하게 진행 되고 있다<sup>1,2)</sup>.

과거, 발치 후 발치와에 대한 치유는 다른 골결손부에 대한

수복 노력에 비해 그 관심도가 낮았으며, 대부분의 경우 자연적인 골치유 과정에 의존하여 처치하였다. 하지만 최근에는 환자 들의 심미적 요구가 증대함과 동시에 임플란트가 치과 치료의 중요한 부분을 차지하면서 그에 따른 발치와의 치조제 보존 및 치유 증진을 위한 연구들이 큰 관심 대상이 되고 있다<sup>3)</sup>.

정상적인 경우, 발치 후 발치와는 혈병의 형성, 다양한 세포 들의 이주 후 일어나는 증식기, 골모세포와 파골세포에 의한 골형성 및 골개조라는 일련의 과정을 거쳐 치유되게 된다. 그 과정동안 여러 성장 인자들이 분비되어 골형성에 영향을 미치게 된다<sup>4,7)</sup>.

하지만 아쉽게도 발치와의 자연 치유는 오직 부분적인 골형 성만이 일어난다. 즉, 발치와 내로 골 성장이 일어남과 동시에 협설측과 치근단측으로 치조제의 흡수가 예측 가능하게 일어난다는 것이다. 이런 흡수로 인해 치조제는 얇아지고 짧아지게 되며 전치 발거 후 6개월 안에 협설측과 치근단측 모두 3-4mm의 치조제 흡수가 일어난다고 하며, 이러한 치조제의 불

### 김 경 욱

330-716 충남 천안시 안서동 29

단국대학교 치과대학 부속병원 구강외과

**Kyung-Wook Kim**

*Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University,*

*29 Amseodong, Choeran, Chungnam, 330-716, Korea*

*Tel: 82-41-550-1994 Fax: 82-41-550-8988*

*E-mail: kkwoms@dku.edu*

완전한 수복은 임플란트 식립 시 골량 부족이라는 문제뿐만 아니라 최종 보철 후 심미적인 문제 또한 야기할 수 있다<sup>8,10</sup>.

이러한 이유로 발치와의 치조제 보존 및 치유 증진을 위한 다양한 방법들이 시도되고 있다. 이를 위해서는 발치와 주변의 경조직과 연조직의 양 뿐만 아니라 형태까지 유지하는 것이 중요하며, 구강 환경으로부터 발치와를 격리시키고 감염의 기회를 줄여줄 수 있는 생체 재료와 임상 술식이 필요하다.

발치와내 골이식재, 골충전물의 이식은 치조제 보존을 위해 오랫동안 연구되어온 술식으로, 이식재로 발치와내 공간을 채워 육아조직(granulation tissue)과 골성장(bone ingrowth)을 위한 뼈대/framework) 역할을 하도록 하는 방법이다. 수산화인회석 또는 tricalcium phosphate 같은 bioceramics와 동종골 또는 이종골, polylactic acid, gelfoam, surgicel and collagen sponge 등이 이런 술식에 사용될 수 있는 재료들이다<sup>11-15</sup>.

또한 GTR(Guided Tissue Regeneration) 차폐막을 이용, 발치와를 피개하여 치조제 보존의 효과를 얻을 수 있다. 최근에는 부가적인 방법으로 골형성유도단백질(BMP) 같은 성장 인자들을 함께 적용하여 골성장을 촉진하거나 piezoelectric currents를 이용하여 조직에 전기적 자극을 주어 치유를 촉진하는 방법들도 연구되고 있다<sup>16,21</sup>.

발치와는 개방된 창상 부위로서 골이식재 및 차폐막의 사용 시 구강환경으로부터 격리를 위해 완전한 일차 폐쇄(primary closure)가 요구된다. 하지만 일차 폐쇄를 위해서는 이완 절개(releasing incision)를 통한 발치와 주변 판막 수술이 불가피하며 이것은 또 다른 연조직의 심미적 문제를 야기하게 된다. 따라서 치조제를 보존함과 동시에 판막 수술 없이 발치와를 구강 환경으로부터 격리하면서 연조직의 형태를 유지할 수 있는 생체 재료에 대한 기대가 높아지고 있으며 최근에 임상적으로 그 쓰임이 증가하고 있는 absorbable collagen material에 대한 관심이 커지고 있다<sup>22</sup>.

Absorbable Atelo-Collagen Sponge(TERUPLUG®, Terumo Co. Tokyo, Japan)는 뼈 보충용 확장물질(Bone Void Filler)로써 미국 FDA 승인된(FDA 승인번호 : #K040783) 재료이다. 주로 발치 후 발치와의 보존적 골 치유를 위해 발치와에 삽입하여 사용되는 콜라겐 성분의 Bone filling augmentation material(뼈 보충용 확장 물질)로 이용되며, 원재료는 소(bovine)의 피부에서 추출된 collagen으로써 생체 적합성을 향상시키고 항원성을 최소화하기 위해 열처리된 흡수성 atelo-collagen으로 가공되어 만들어졌다. 주요 성분은 콜라겐 type I(85-95%)과 콜라겐 type III(5-15%)로 구성되며 sponge block의 형태로 발치와 및 골결손부에 적용하기 용이하게 디자인되었다.

본 연구의 목적은 가토 두개골 결손부에 TERUPLUG®를 이식하여 그 조직학적 골치유능력을 평가하고 또한 TERUPLUG®와 recombinant human BMP-2(rhBMP-2)를 함께 이식한 실험군과 치유 양상을 비교 평가하는데 있다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. 연구 재료

실험동물로는 일정기간동안 동일 조건에서 사육된 체중 3kg 내외의 자성 가토 12마리를 사용하였다. 두개부에 직경 10mm의 골결손부 3개를 형성한 후 각각의 결손부를 차례대로 대조군(매식제를 이식하지 않은 군), TERUPLUG® 매식 실험군(실험군 I) 및 TERUPLUG®와 rhBMP-2 매식 실험군(실험군 II)으로 배정하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 동물 실험

실험 I, II군, 대조군 공히 Ketamine hydrochloride(Ketalar®, 유한양행) 10mg/kg 및 0.15ml/kg의 2% xylazine hydrochloride(Rumpun®, 한국바이엘)을 근주하여 마취시키고 두개부에 털을 제거하고 베타딘 용액으로 소독한 후, 지혈을 목적으로 1:100,000의 epinephrine이 함유된 0.2% 염산 리도카인(광명제약)을 침윤 주사하였다. 절개 후 두개골을 노출시켜 버를 이용하여 직경 10mm의 결손부 3개를 형성한 후 차례대로 대조군은 어떤 처치도 하지 않았으며 실험 I군은 TERUPLUG® 5mg을 매식하였고 실험 II군은 TERUPLUG® 5mg과 함께 rhBMP-2 10µg을 매식하였다. 매식 후 흡수성 봉합사로 층별 봉합을 시행하였으며 모든 실험은 통상적인 방법에 따라 무균적으로 시술하였다.

#### 2) 희생

실험 동물들을 각각 4주, 8주째에 나누어 희생시킨 후 두개골 골결손 부위를 손상없이 노출시키고 결손부를 포함한 두개골 전체를 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정하였다.

#### 3) 표본 제작

##### 가. H&E 염색 및 MT 염색

10% 중성 포르말린에 고정시킨 채취 표본을 5% 질산으로 3일 동안 탈회를 시행하고 통상적인 방법에 따른 탈수, 명화 과정을 거쳐 4µm 파라핀 절편을 제작한 후 hematoxylin & eosin (H&E) 및 masson's trichrome(MT) 염색을 시행하였고, 광학현미경하에서 골치유 과정을 관찰하였다.

##### 나. 면역조직화학 염색

##### ; Streptavidin-biotin method

##### : PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

절취한 조직을 고정한 후 Poly-L-Lysine으로 처리된 슬라이드에 4-8µm 파라핀 절편을 제작하였다. 면역조직화학적 염색을 시행하기 위하여 절편을 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 5분간 부란시키고 10mM PBS 로 세척한 후 제 1차 항체로 PCNA를 사용하였다. LSAB (labelled streptavidine biotin)법으로 처리하고 발색제는 fluorescent

**Table 1.** Specifications of Antibody ; PCNA

Antibody	Dilution	Manufacturer
PCNA	1:100	MBL Co., LTD, Japan

dye을 사용하였고 prophanidium iodide로 대조염색 시행 후 글리세롤로 봉입한 다음, 형광현미경으로 관찰하였다(Table 1).

다. 면역조직화학 염색

; TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling) method  
: Apoptosis

PBS(protein buffer solution)와 증류수로 조직을 전처리한 후 상온에서 10분 동안 TdT(Terminal deoxynucleotidyl Transferase) buffer에 의한 DNA nick end labelling을 시행하였다. 37 ° C에서 60분 동안 TdT mixture를 적용하고 나서 Tris-buffer를 적용하였다. fluorescein-dUTP로 발색한 후, prophanidium Iodide로 대조염색 시행 후 형광현미경으로 관찰하였다(Table 2).

라. 편광현미경 관찰

10% 중성 완충 포르말린에 고정된 실험 조직을 90%와 100% 알코올과 아세톤으로 탈수시킨 후 Spurr's kit(EMS Co. USA) resin과 아세톤의 비율을 조절하면서 단계적으로 레진을 조직체로 침투 시켜서 최종적으로 레진으로만 침투시킨 조직을 음압(-70 ap) 상태로 70°C에서 8시간 동안 경화시켰다. 경조직 절단기(Exakt cutting grinding system, German)와 diamond wafering blade(Southbay Technology, Inc)를 이용하여 약 300µm두께로 절삭하고 Exakt microgrinding system으로 연마하여 약 30µm두께의 시편을 제작한 후 편광현미경으로 관찰하였다.

### III. 연구 결과

#### 1. H & E 염색 소견

##### 1) 대조군

4주째에는 혈관이 존재하지만 창상 치유가 진행되어 혈관이 정상적인 형태를 보여주며, 결손부위에 소량의 결합조직으로 채워져 있는 양상이 관찰 되었고 특이 염증소견은 보이지 않았다. 8주째 소견은 4주째 소견과 비교 시 큰 변화가 관찰되지 않았으며 또한 결손부위에서 골형성의 활동성도 보이지 않았다(Fig. 1, 2).

##### 2) 실험 I군(TERUPLUG® 매식군)

4주째에는 골결손부위에 이식재가 채워진 소견이 특징적으로 관찰되며 대조군과 마찬가지로 특이 염증 소견은 보이지 않았다. 8주째에는 상부의 이식재가 점차 흡수되어 아주 극소수만 남아있으며 이식재 하방의 새로이 형성된 결합조직 내부

**Table 2.** Specifications of Antibody ; 3'-OH DNA end

Antibody	Dilution	Manufacturer
3'-OH DNA end	1:100	MBL Co., LTD, Japan

로 기존의 정상골로부터 골소주가 성장해 들어오는 양상이 관찰되었다(Fig. 3, 4).

##### 3) 실험 II군(TERUPLUG® with rhBMP-2 매식군)

실험 I군과 마찬가지로 4주째 표본에서는 주변 정상골 사이로 골결손부위가 관찰되며 결손부내에 이식재가 채워진 소견을 보였으며 염증 소견은 관찰되지 않았다. 8주째에는 4주 소견과 비교하여 상부의 이식재는 소수만 남아있으며 이식재 하방의 새로이 형성된 결합조직 내부로 기존의 정상골로부터 골소주가 성장해 들어오는 양상뿐만 아니라, 이식재 직하부에 새롭게 골소주가 형성되었고 이 골소주가 하방으로 성장하는 모습이 관찰되었다(Fig. 5, 6).

#### 2. MT 염색 소견

##### 1) 대조군

4주째에는 소량의 신생 콜라겐 섬유가 결손부의 결합 조직 내에 형성된 소견을 보였다. 8주째에도 소량의 신생 콜라겐 섬유만이 관찰되었으며 결손부내에 골형성은 관찰되지 않았다(Fig. 7, 8).

##### 2) 실험 I군(TERUPLUG® 매식군)

4주째에 이식재 내에 다량의 신생 콜라겐 섬유가 형성되어 있으나 골의 형성은 관찰되지 않았다. 8주째에는 이식재가 있던 자리에 다수의 신생 콜라겐 섬유가 관찰되었으며, 주변 골조직으로부터 골소주가 성장해 들어오는 양상을 보였다(Fig. 9, 10).

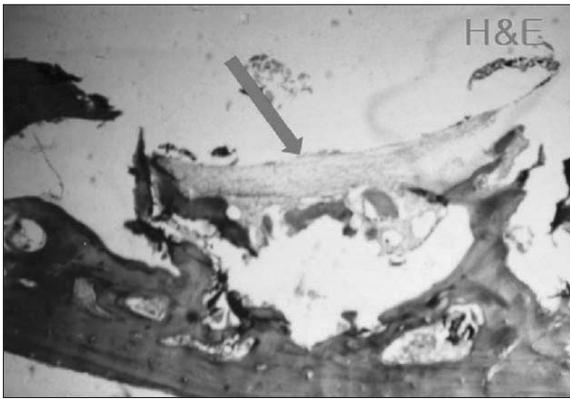
##### 3) 실험 II군(TERUPLUG® with rhBMP-2 매식군)

4주째에는 이식재내에 소량의 신생 콜라겐 섬유만이 형성되어 있는 것이 관찰된 반면, 8주째는 다량의 신생 콜라겐 섬유뿐만 아니라, 이식재 주변에 새로이 형성된 골소주들을 관찰할 수 있었다(Fig. 11, 12).

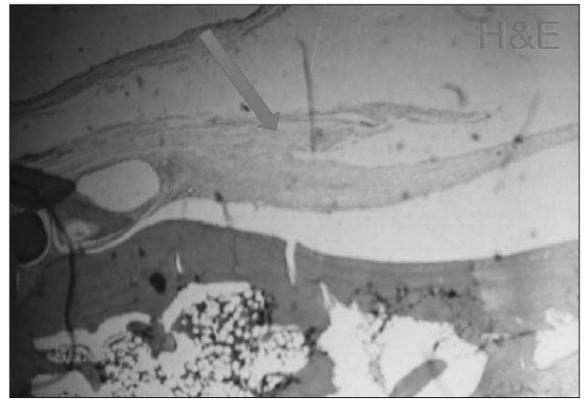
#### 3. 면역조직화학적 염색 소견

##### 1) 대조군

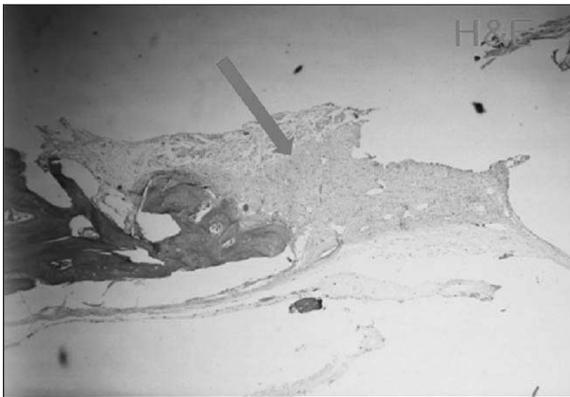
4주째 소견으로 이식재가 없는 대조군의 골결손부의 주변골에서만 apoptosis(세포死)에 양성을 보이는 세포가 소수 나타났으며, PCNA(세포의 증식성) 양성 소견은 결손부위에서는 나타나지 않았으며 주변골에서 한정적으로 왕성한 증식성이 관



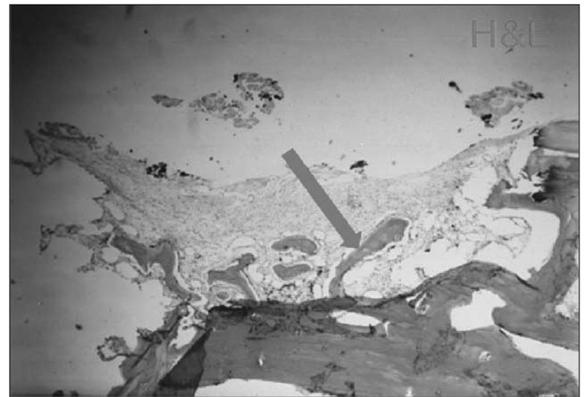
**Fig. 1.** H & E stain findings of control group, 4 weeks ( $\times 50$ ).



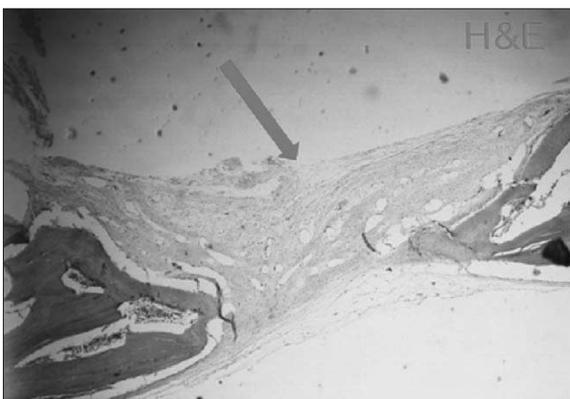
**Fig. 2.** H & E stain findings of control group, 8 weeks ( $\times 50$ ).



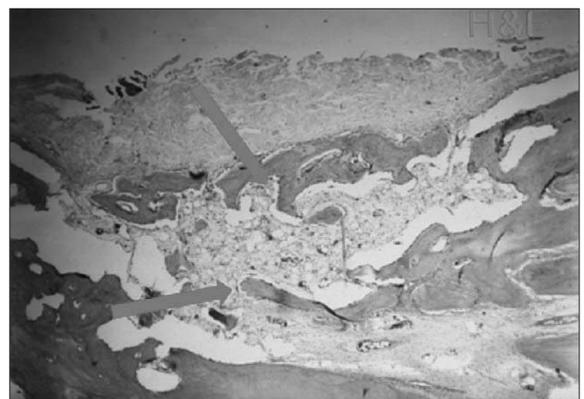
**Fig. 3.** H & E stain findings of experimental group I, 4 weeks ( $\times 50$ ).



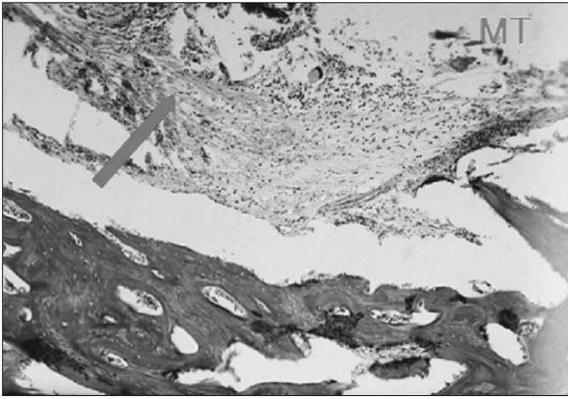
**Fig. 4.** H & E stain findings of experimental group I, 8 weeks ( $\times 50$ ).



**Fig. 5.** H & E stain findings of experimental group II, 4 weeks ( $\times 50$ ).



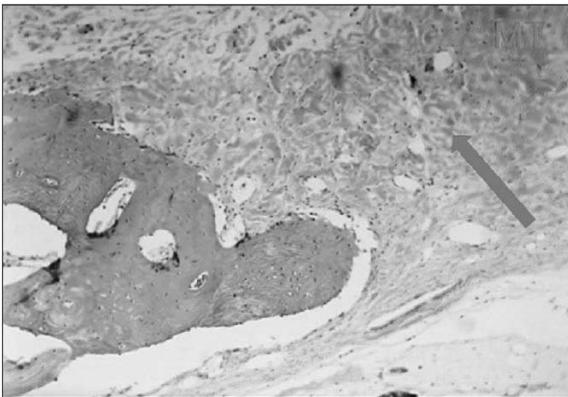
**Fig. 6.** H & E stain findings of experimental group II, 8 weeks ( $\times 50$ ).



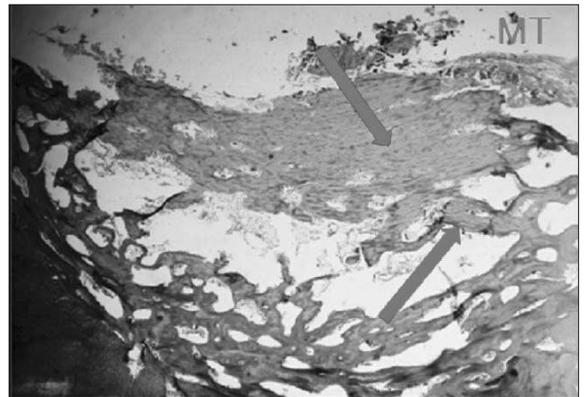
**Fig. 7.** MT stain findings of control group, 4 weeks ( $\times 50$ ).



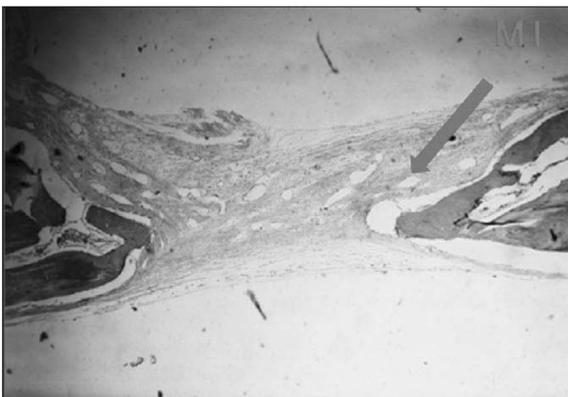
**Fig. 8.** MT stain findings of control group, 8 weeks ( $\times 50$ ).



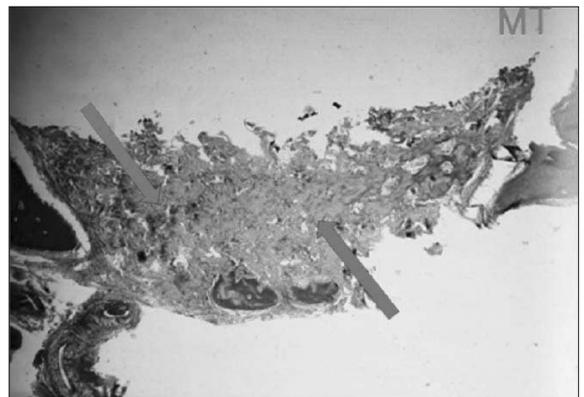
**Fig. 9.** MT stain findings of experimental group I, 4 weeks ( $\times 50$ ).



**Fig. 10.** MT stain findings of experimental group I, 8 weeks ( $\times 50$ ).



**Fig. 11.** MT stain findings of experimental group II, 4 weeks ( $\times 50$ ).



**Fig. 12.** MT stain findings of experimental group II, 8 weeks ( $\times 50$ ).

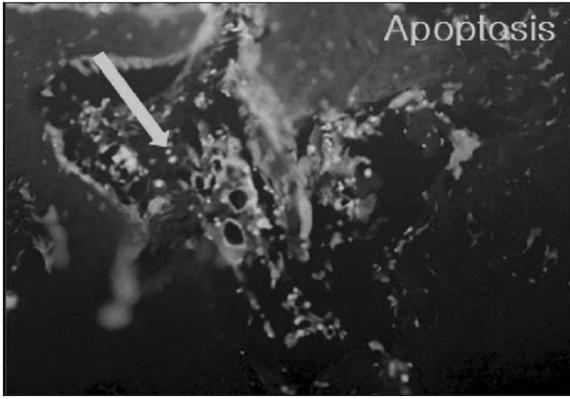


Fig. 13. Apoptosis, findings of control group, 4 weeks (×200).

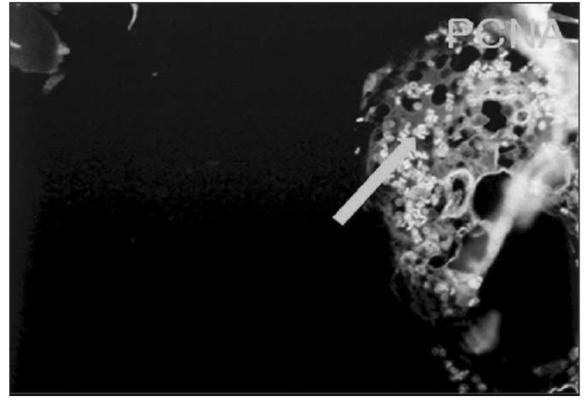


Fig. 14. PCNA, findings of control group, 4 weeks (×200).

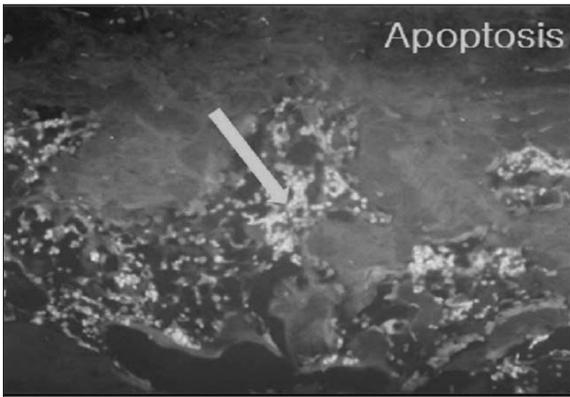


Fig. 15. Apoptosis, findings of control group, 8 weeks (×200).

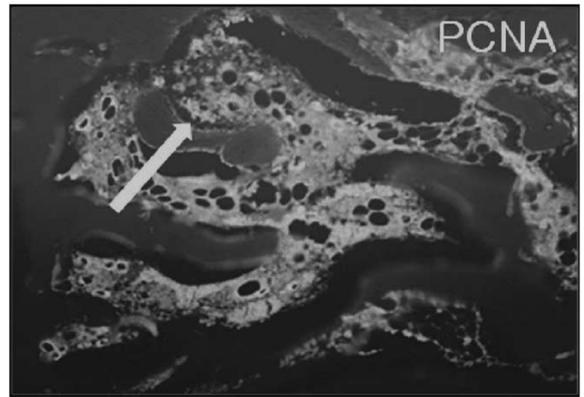


Fig. 16. PCNA, findings of control group, 8 weeks (×200).

찰되었다. 8주째 소견도 4주째와 마찬가지로 주변골에서는 apoptosis와 PCNA에 양성을 보이는 세포가 다수 관찰되었지만 결손부의 결합조직부위에서는 세포사 및 세포의 증식성이 관찰되지 않았다(Fig. 13, 14, 15 & 16).

2) 실험 I군(TERUPLUG® 매식군)

4주째에는 이식재 주변으로 소수의 apoptosis positive cell들이 나타나는 양상이 관찰되었으며, 이식재 주변과 이식재내에서 증식성을 보이는 세포가 다수 관찰되었다. 8주째에서는 4주째 소견과 비교하여 이식재내에 세포사를 보이는 세포가 거의 나타나지 않았으며 세포의 증식성도 거의 관찰되지 않았다(Fig. 17, 18, 19 & 20).

3) 실험 II군(TERUPLUG® with rhBMP-2 매식군)

4주째 시편들을 관찰한 결과, 이식재내에서 apoptosis에 양성을 보이는 세포가 소수 나타났으며 주변골에서도 apoptosis 양성세포가 관찰되었다. 또한 이식재와 주변골에서 PCNA에 양성을 보이는 세포가 관찰되었다. 8주째 소견은 특징적으로 이

식재내에 세포사가 거의 관찰되지 않는 반면, 이식재내에 증식성세포가 상당수 존재하는 것이 관찰되었다 (Fig. 21, 22, 23 & 24).

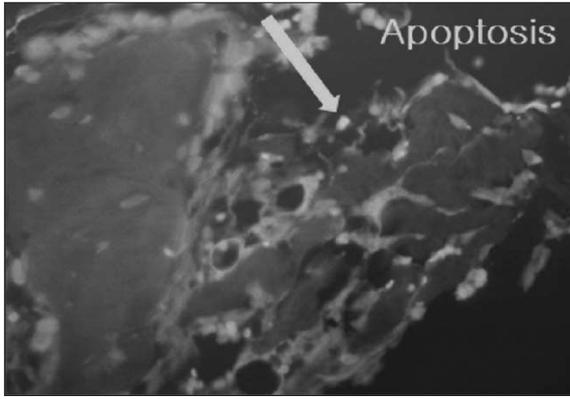
4. 편광현미경 소견

1) 대조군

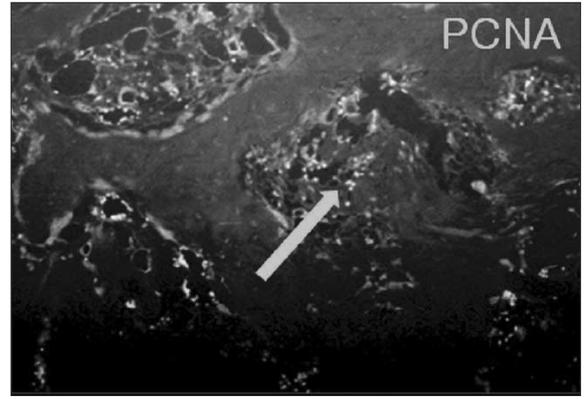
4주째 대조군의 골결손부위 내에서는 어떠한 골형성의 양상도 관찰되지 않았다. 8주째에는 골형성의 초기현상이 나타나지만 아주 미미한 수준에 머물러 있는 소견을 보였다(Fig. 25, 26).

2) 실험 I군(TERUPLUG® 매식군)

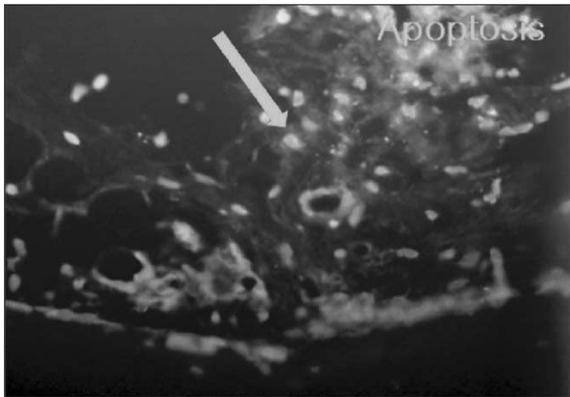
4주에는 결손부위에서 미세하나마 석회화가 진행되는 소견이 관찰되나 아주 미미한 수준이며 8주째에는 4주째 보다 증가된 골형성 양상을 보이며 석회화가 상당히 진행된 부분도 관찰되었다(Fig. 27, 28).



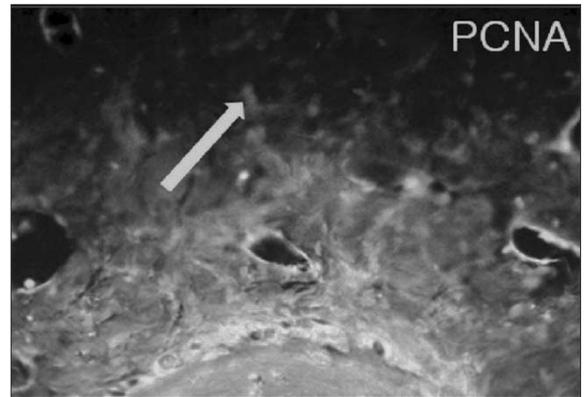
**Fig. 17.** Apoptosis, findings of experimental group I, 4 weeks ( $\times 200$ ).



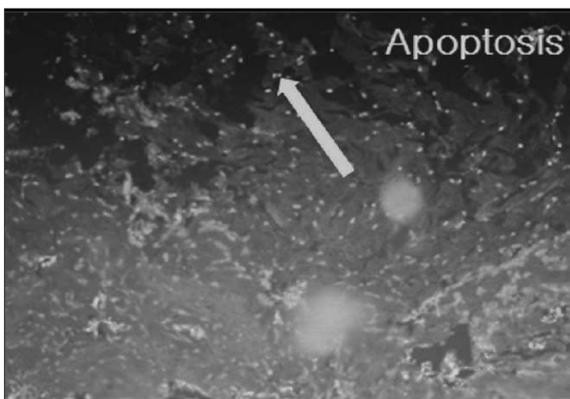
**Fig. 18.** PCNA, findings of experimental group I, 4 weeks ( $\times 200$ ).



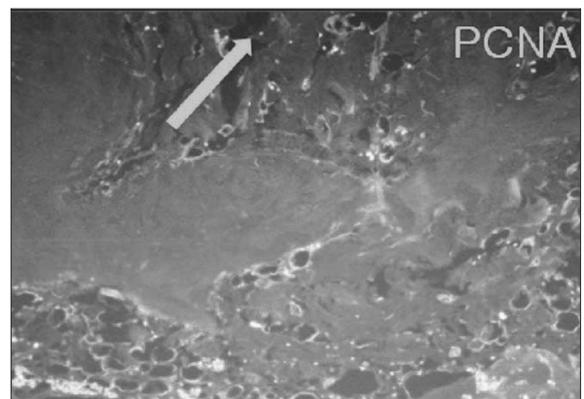
**Fig. 19.** Apoptosis, findings of experimental group I, 8 weeks ( $\times 200$ ).



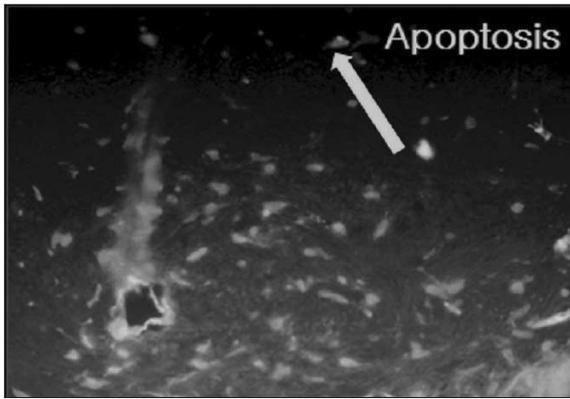
**Fig. 20.** PCNA, findings of experimental group I, 8 weeks ( $\times 200$ ).



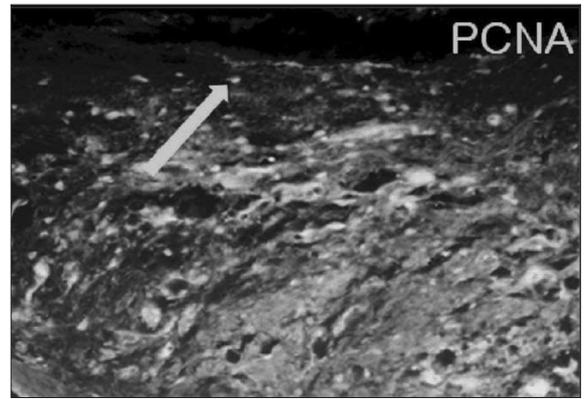
**Fig. 21.** Apoptosis, findings of experimental group II, 4 weeks ( $\times 200$ ).



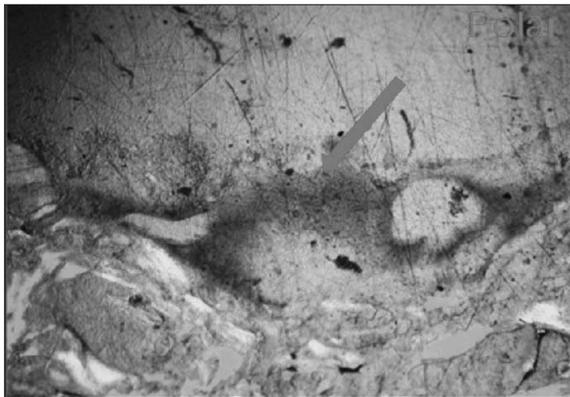
**Fig. 22.** PCNA, findings of experimental group II, 4 weeks ( $\times 200$ ).



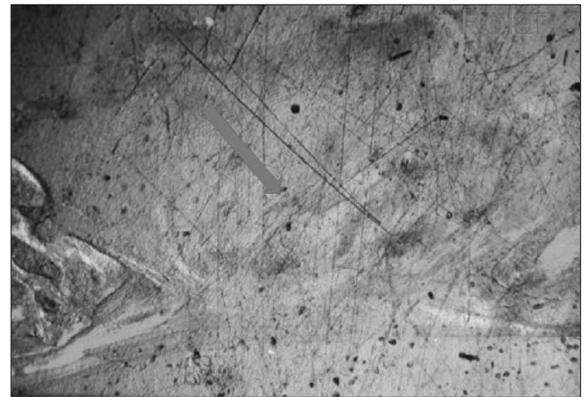
**Fig. 23.** Apoptosis, findings of experimental group II, 8 weeks ( $\times 200$ ).



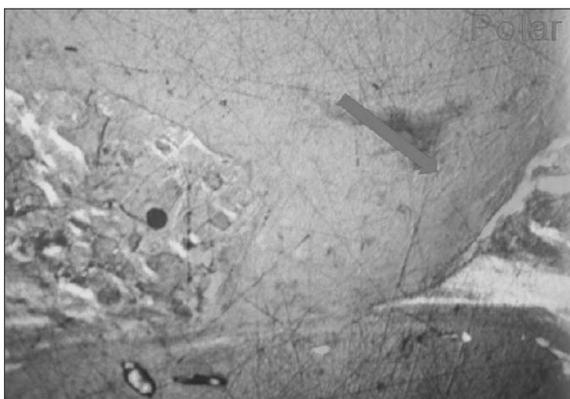
**Fig. 24.** PCNA, findings of experimental group II, 8 weeks ( $\times 200$ ).



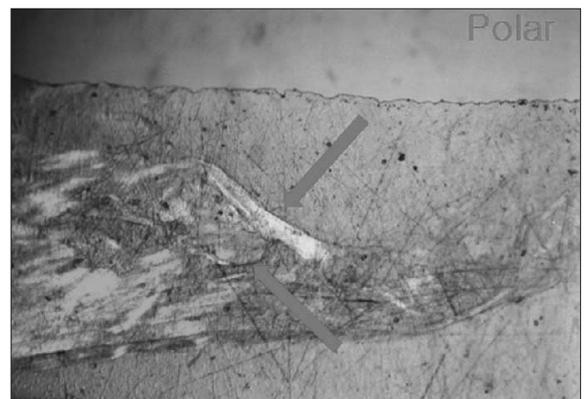
**Fig. 25.** Polarized Microscope, findings of control group, 4 weeks ( $\times 50$ ).



**Fig. 26.** Polarized Microscope, findings of control group, 8 weeks ( $\times 50$ ).



**Fig. 27.** Polarized Microscope, findings of experimental group I, 4 weeks ( $\times 50$ ).



**Fig. 28.** Polarized Microscope, findings of experimental group I, 8 weeks ( $\times 50$ ).

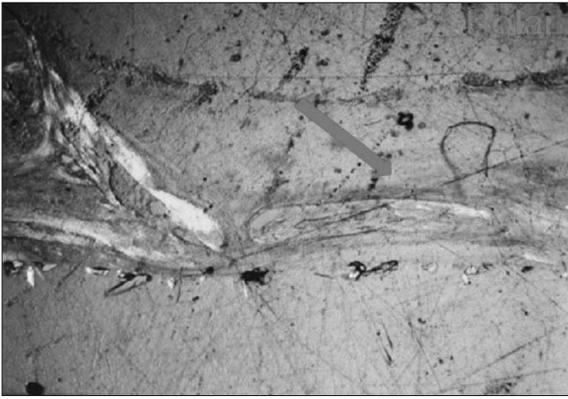


Fig. 29. Polarized Microscope, findings of experimental group II, 4 weeks (×50).

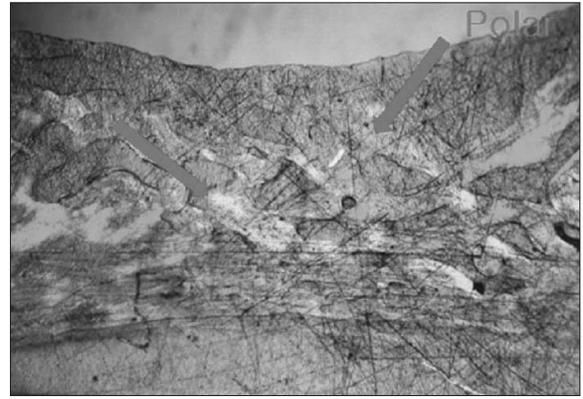


Fig. 30. Polarized Microscope, findings of experimental group II, 8 weeks (×50).

### 3) 실험 II군(TERUPLUG® with rhBMP-2 매식군)

4주 소견은 실험 I군과 비교 시 큰 차이점을 볼 수 없으나, 8주째 소견은 실험 I군에 비해 결손부위에서 더 왕성한 골형성 양상을 보였으며 석회화가 많이 진행된 골조직도 전체적으로 균일하게 관찰되었다(Fig. 29, 30).

## IV. 총괄 및 고찰

골결손부의 심미적, 기능적 회복을 위한 이상적 치료 방법을 찾고자 하는 문제는 오랫동안 구강악안면외과의들을 포함한 많은 학자들의 연구 대상이었으며, 현재까지도 중요한 논의 대상 중 하나임에 틀림없다. 악안면 부위에 발생하는 골결손은 선천적인 기형 또는 외상이나 질환에 의해 생기는 비교적 큰 골결손부도 있지만, 발치 후 생기는 발치와도 어떤 의미로는 악골에 발생하는 골결손의 일종이라 생각할 수 있다. 특히, 최근에는 임플란트 식립 및 심미적 보철물을 위해 적당한 골의 형태가 요구되면서, 발치 후 치조제 보존에 대한 관심이 쏟아지고 있다.

치조골과 주위 연조직의 양과 형태를 모두 보존하기 위한 발치 후 즉시 치조제 보존 술식은 그 과정이 성공적이라면, 임플란트 식립 또는 보철물의 제작을 위해 부가적인 경조직 또는 연조직 이식의 필요성을 줄이거나 없앨 수 있다. 일반적인 발치 후 발치와에 아무런 처치 없이 일어나는 자연적 치유 양상은 발치와 내로 골 성장이 일어남과 동시에 치조제의 폭과 높이에서 흡수가 일어난다. 이런 흡수는 임플란트 식립을 위해 필요한 골량을 부족하게 하며 심미적인 문제를 만들어낼 수 있다<sup>8,10).</sup>

발치 후의 치조제 위축은 발치시의 외상뿐만 아니라 발치와 내에서 일어나는 치유 환경과도 연관되어 있다. 즉, 발치와 내에서의 이른 혈병 수축과 구강내 잔사의 축적은 치조골이 완전히 재생하는 것을 제한할 수 있다. 발치와를 덮는 상피는 발치와 내에 있는 구강내 잔사의 근단층에 새로이 형성된 결합조직 위로 증식하며 그 결과, 구강내 환경에서의 자연적인 치

유 과정으로는 원래의 치조제 높이에 미치지 못하는 발치와의 치유가 일어나게 된다. 또한 이차적인 골개조(Bone remodeling)에 의한 골흡수로 인해 치조제의 높이와 폭은 더욱 감소할 수 있다<sup>3,7).</sup>

따라서 치조제를 가능한 보존하기 위해서는 발치 후 발치와의 빈 공간에서 골형성 전도 환경 또는 공간을 유지하기 위한 scaffold로서의 역할을 대체할 이식재 또는 충전물이 필요하며, 이들 재료는 구강 환경으로부터의 나쁜 영향을 차단하면서 골전구 세포 등과 같은 세포들의 이주 및 부착에 유리해야 한다.

골결손부 및 치조제 보존을 위한 다양한 골이식재, 골충진재 및 골형성 촉진 인자들이 현재 임상과 실험에서 사용되고 있다. 그런 재료들은 크게 골형성(osteogenesis), 골유도(osteoinduction), 골전도(osteconduction)의 세 가지 과정을 거쳐 골을 형성하게 되며 자가골을 제외한 대부분의 이식재는 주로 골유도와 골전도 과정을 거쳐 골치유를 하게 된다<sup>23,27).</sup> 골 이식재 및 골충진재들은 즉시 사용이 가능하고, 면역반응을 일으키지 말아야 하며, 빠른 골생성 및 재혈관화를 촉진하여야 하며, 또한 골의 지지와 연속성을 유지하는 등의 기본적인 조건을 만족시킬 수 있어야 한다<sup>1).</sup>

TERUPLUG®는 골결손부 또는 발치와에 적용시켜 granulation tissue 형성을 촉진, 골형성을 향상시키는 골충진재로써 이용된다. 또한 TERUPLUG®에 사용되는 absorbable atelo-collagen은 화상이나 외상 및 수술창으로 인한 피부, 점막 손상 치료를 위한 창상 피복제로도 널리 사용되고 있다.

콜라겐은 동물의 피부나 건, 뼈에 다량으로 존재하는 단백질로 천연 상태로는 비용해성의 tropocollagen 구조를 나타낸다. 콜라겐은 항원성이 낮은 대표적인 물질로써 자연 상태인 tropocollagen 상태로도 지혈제 등 다양한 재료로 사용되고 있지만, tropocollagen에 있는 telopeptide라는 성분은 이종간에 항원 물질로 작용할 수 있다. 그래서 생체 적합성을 높이기 위해 어린소의 피부에서 추출한 tropocollagen에 protease(pepsin, pH 3) 처리를 하여 telopeptide 성분을 분리시켜 용해성의 atelocollagen으로 가공시킨다. 이렇게 가공된 atelocollagen을 중화시키면 자연

상태 collagen과 유사한 구조의 fibrillar atelocollagen이 되고 다시 37°C 이상에서 열처리를 하면 생체 적합성이 우수한 heat-denatured atelo-collagen이 만들어진다. TERUPLUG®는 heat-denatured atelo-collagen과 fibrillar atelocollagen을 1:9의 비율로 혼합하여 제작한다.

Koide 등<sup>28)</sup>은 collagen material의 연구에서 순수 atelocollagen에 비해 heat-denatured atelo-collagen이 기계적 특성에서는 더 약하지만, 세포의 부착 및 세포의 활성화 측면에서 더 좋은 환경을 제공한다고 하였으며, fibrillar atelocollagen은 천연 상태의 collagen 구조와 유사하여 atelocollagen과 비교하여 아주 강한 기계적 저항력을 가지고 있어서 scaffold로 공간 유지 및 세포들의 지지 역할에서 더 많은 장점을 가지고 있다고 하였다.

Konishi 등<sup>29)</sup>은 collagen material의 조성에 대한 연구를 통해 순수 atelocollagen 또는 fibrillar atelocollagen, heat-denatured atelo-collagen을 단독으로 사용하기 보다는 fibrillar atelocollagen과 heat-denatured atelo-collagen을 혼합할 경우, 기계적 강도뿐만 아니라 세포의 부착 및 활성화에서 더 좋은 결과를 나타낸다고 하였으며 그 혼합 비율에 따라 각각 특성이 조금씩 차이가 난다고 하였다.

Hiroshi 등<sup>30)</sup>은 발치 후 발치와에 collagen material을 적용시킨 후 시간 경과에 따른 컴퓨터 단층 사진 촬영 분석에서 atelo-collagen이 골치유 및 보존에 기여할 뿐만 아니라 부가적으로 임상적인 발치 창상의 보호와 지혈 작용에 기여한다고 보고하였다. Kaihara 등<sup>31)</sup>은 골결손부에 collagen material의 단독 적용 보다 bone inducing factor와 함께 적용 시 골유도 작용을 일으킬 수 있는 collagen material의 carrier로써 역할을 보고하였다<sup>32)</sup>.

1965년 Urist<sup>33)</sup>가 산 처리로 탈회시킨 골기질을 근육과 피하에 이식 후 이소성 연골이나 골의 분화가 일어난다는 사실을 밝히고 비교원성 단백질인 골형성 유도인자에 대한 연구가 시작되었다. 이후 이러한 이소성 골형성 유도는 태생성 분화가 끝난 태생기 이후에도 미분화 골형성 전구세포(osteoprogenitor mesenchymal cell)를 분화시키는 물질이 존재한다는 것을 의미하며 이들을BMP(bone morphogenic protein, 골형성 단백질)라고 부르게 되었다<sup>34)</sup>.

BMP-2는 여러 가지 골형성단백질 중 하나로, 치배, 상아모세포층, 구개궁 및 두개안면부조직의 발생에 기여하며 다른 골형성단백질과 성장인자 등과 비교하여 유전자 서열이 가장 유사하고 생체 및 시험관에서 낮은 농도에서의 골형성 능력이 뛰어나 골형성단백질의 골형성 유도를 검증하는 동물실험에서 많이 이용되고 있다<sup>35,36)</sup>.

인간의 분자 클로닝(molecular cloning)과 유전 공학을 이용한 재조합 DNA 기술을 통해 Chinese hamster ovary cell 또는 Escherichia coli로부터 인간의 재조합 골형성 단백질을 개발하게 되었으며 이를 rhBMP(recombinant human BMP)라 명명하며 많은 실험과 연구에서 골형성 유도 시 사용하고 있다<sup>37,41)</sup>.

본 연구에서 골 결손부에 TERUPLUG® 적용 시, 대조군과 비교하여 초기에는 다량의 콜라겐을 생성시키며 주변 세포들 및 이주 세포들의 활발한 증식성을 유도하는 것을 관찰 할 수 있

었으며, 8주째에는 골전도 과정에 의한 주변 골로부터 형성되는 골소주를 관찰 할 수 있었다. 반면, rhBMP-2를 함께 이식한 실험군에서 초기에 소량의 collagen만이 관찰되는 이유는 골형성단백질에 의해서 섬유모세포(fibroblast)의 분화가 억제된 것으로 사료되었으며, 8주째 소견에서는 골전도에 의한 골형성 뿐만 아니라, 이식재 내에 유도 분화된 골모세포에 의한 골형성이 진행되는 것을 관찰할 수 있었다.

본 연구에서는 TERUPLUG® 단독 또는 골형성 단백질과 함께 적용 시, 기본적인 골치유 과정을 알아보기 위해 여러 가지 영향 요인이 많은 발치와에서 보다는 안정적인 가토의 두개골 결손부에 적용하였는데, 향후 발치와 적용 실험을 통해 구강 내 환경 하에서 골치유 양상을 비교하는 것이 필요하리라 사료되었다.

## V. 결 론

Collagen bone filler(TERUPLUG®)는 뼈 보충용 확장물질(Bone Void Filler)로써 미국 FDA 승인된(FDA승인번호 : #K040783) 재료이다. 주로 발치 후 발치와의 보존적 골 치유를 위해 발치와에 삽입하여 사용되는 콜라겐 성분의 Bone filling augmentation material(뼈 보충용 확장 물질)로 이용된다. 재료는 소(bovine)의 피부에서 추출하였으며 생체 적합성을 향상시키고 항원성을 최소화 하기위해 열처리된 흡수성 atelo-collagen으로 만들어졌다. 주요성분은 콜라겐 type I(85-95%)과 콜라겐 type III(5-15%)로 구성되며 sponge block의 형태로 디자인되었다.

이에 본 연구는 가토 두개골 결손부에 TERUPLUG®를 이식하여 그 조직학적 골치유능력을 평가하고 또한 TERUPLUG®와 recombinant human BMP-2(rhBMP-2)의 cytokine을 함께 이식한 실험군과 비교 평가하고자 하였다.

실험동물로는 일정기간동안 동일 조건에서 사육된 가토 12마리를 이용하여 두개부에 직경 10mm의 골결손부 3개를 형성한 후 각각의 결손부를 차례대로 대조군, TERUPLUG® 매식 실험군(실험군 I) 및 TERUPLUG® adding rhBMP-2 매식 실험군(실험군 II)으로 배정하였다. 실험 4주, 8주에 실험 동물을 희생하여 각 이식편을 채취 후, H&E 염색 및 MT염색, 면역조직화학적 염색(apoptosis, pcna), 편광현미경으로 그 조직학적 양상을 관찰한 후 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. H&E 염색 및 MT염색; 4주째 대조군은 결합조직 내에 소량의 신생 콜라겐섬유만 관찰되며 실험군 I에서는 다량의 신생 콜라겐섬유가 형성되어 있으나 골의 형성은 관찰되지 않았다. 실험군 II에서는 소량의 신생콜라겐만이 관찰 되었다.

8주째에서 대조군은 4주째와 비교하여 대동소이한 소견을 보이며 결손부위에 골형성의 활동성이 보이지 않았다. 8주째 실험군 I은 이식재 하부 결합조직이 형성된 내부로 기존의 골로부터 골소주가 자라나는 양상을 보여 주었다. 실험군 II에서는 기존의 골조직에서부터 골소주가 형성되었을 뿐만 아니라 이식재 직하방에 새로이 골소주가 형성되는

양상을 나타내었다.

- 면역조직화학적 염색(Apoptosis, PCNA); 4주째 대조군에서 세포의 증식성은 defect부위에서는 나타나지 않으며 주변골에서만 왕성한 증식성이 관찰된다. 그러나 실험군 I, II에서는 이식재 주변과 이식재에서 모두 증식성을 보이는 세포가 다수 나타났다.

8주째 대조군은 주변골에서 아포토시스에 양성을 보이는 세포가 다수 관찰되지만 결합조직부위에서는 세포사(死)가 관찰되지 않았다. 실험군 I에서는 이식재내에 세포사를 보이는 세포가 거의 나타나지 않았고 세포의 증식성도 4주에 비해 거의 나타나지 않았다. 실험군 II에서 또한 이식재내에 세포사가 거의 관찰되지 않았으나 증식성 세포가 상당수 존재하는 것이 관찰되었다.

- 평판현미경 소견; 4주째 대조군에서 결손부위 내에 어떠한 골형성의 양상도 나타나지 않았다. 실험군 I에서는 결손부위에서 미세하나마 석회화가 진행되는 소견이 있으나 아주 미미한 수준으로 관찰되었으며 실험군 II도 실험군 I과 큰 차이가 없었다.

8주째, 대조군의 결손부에서 골형성의 초기현상이 나타나지만 미미한 수준으로 나타났으나, 실험군 I의 결손부위 내에서는 4주보다 증가된 골형성 양상을 보이며 석회화가 상당히 진행된 부분도 관찰되었다. 실험군 II에서는 결손부위의 왕성한 골형성 양상을 보이며 석회화가 많이 진행된 골조직도 전체적으로 균일하게 관찰되었다.

이상의 결과에서 골 결손부에 골 보충 물질로 사용되는 TERUPLUG®를 이식한 경우, 이식하지 않았을 때 보다 더 활발한 골 치유 능력을 보여준다는 것을 알았으며 TERUPLUG®에 골형성 촉진인자인 rhBMP-2를 추가하여 이식하였을 경우 가장 좋은 골 치유 양상을 보여준다는 것을 알 수 있었다. 실험 결과를 토대로 향후 발치와의 치조제 보존 및 임프란트 매식술 등 임상 시술 시 유용하게 사용 될 수 있으리라 기대해 본다.

### 참고문헌

- Boyne PJ: Induction of bone repair by various bone grafting materials, hard tissue growth, repair and remineralization. *Ciba Found Symp* 1973;11:121.
- Papay FA, Morales L, Ahmed OF, et al.: Comparison of ossification of demineralized bone, hydroxyapatite, Gelfoam, and bone wax in cranial defect repair. *J Craniofac Surg* 1996;7:347.
- Anthony G. Sclar: *Soft tissue and Esthetic Considerations in Implant Dentistry*. Quintessence Publishing Co. Inc 2003;76-77.
- Mark E. K. Wong: *The Biology of Alveolar Healing Following the removal of Impacted Teeth*. WB SAUNDERS 25-45, 1993.
- Hunt TK, Knighton DR, Thakral KK, et al.: *Cellular control of repair; Soft and Hard tissue Repair*. Praeger, New York, 1984.
- Orgill D, Demling RH: Current concepts and approaches to wound healing. *Crit care Med* 1988;16:899.
- Gustafson GT: Ecology of wound healing in the oral cavity. *Scand J Haematol Suppl* 1984;40:393.
- Lekovic V, Kenney EB, Weinlaender M, et al.: A bone regeneration approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. *J Periodontol* 1997;68:563-570.
- Lang N, Becker W, Karring T: Alveolar bone formation.

- Textbook of Clinical Periodontology and Implant Dentistry, ed 3. Munksgaard, 906-932, 1998.
- Clokje C: Material presented at the scientific sessions of the Canadian Association of Oral and Maxillofacial Surgery, Vancouver, 16 July 1998.
- Olson RAJ, Roberts DL, Osbon DB: A comparative study of polylactic acid, gelfoam, and surgicel in healing extraction sites. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1982;53:441.
- Bhaskar SN, Cutright DE, Knapp MJ, et al.: Tissue reaction to intrabony ceramic implants. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1971;31:282.
- Prokic B, Carranza FA, Kenny EB, et al.: Comparative clinical study of porous hydroxyapatite and decalcified freeze-dried bone in human periodontal defects. *J Periodontol* 1990;61:399.
- Moller JF, Peterson JK: Efficacy of a fibrin sealant on healing of extraction wounds. *Int J Oral Maxillofacial Surgery* 1988;17:142.
- Boyes-Varley JG, Cleaton-Jones PE, Lownie JF: Effect of a topical drug combination on the early healing of extraction sockets in the vervet monkey. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988;17:138.
- Lekovic V, Camargo PM, Klokkevold PR, et al.: Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J periodontol* 1998;69:1044-1049.
- Warner K, Gotfredsen K, Karring T, et al.: Guided tissue regeneration ensures osseointegration of dental placed in extraction sockets. An experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res* 1991;2:166-171.
- Becker W, Becker B, Handelsman M, et al.: Guided tissue regeneration for implants placed in extraction sockets. An experimental study in dogs. *J Periodontol* 1991;62:703-709.
- Roberts BW: Bone induction in healing tooth sockets using piezo-electric foil. *J Dent* 1982;10:243.
- Black J: Electrical stimulation of hard and soft tissues in animal models. *Clin Plas Surg* 1985;12:243.
- Battistone GC, Posey WR, Barone JJ, et al.: Zinc and bone healing; The effect of zinc cysteamine-N-acetic acid on the healing of extraction wounds in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1972;34:704.
- Konishi J: Animal Study of Tooth Extraction Wound Healing Using Collagen Sponge Matrix. *SEITAZAIRYOU*, 1998;16:266-275.
- Glowacki J, Mulliken JB: Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast Reconstr Surg* 1980;65:553.
- Glowacki J, Kaban LB, Mulliken JB: Treatment of jaws defects with demineralized bone implants. *J Oral Maxillfac Surg* 1982;40:623.
- Glowacki J, Mulliken JB: Demineralized bone implants. *Clin Plast Surg* 1985;12:233.
- Burstein AH, Einhorn TA, Kopman CR, et al.: The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. *J Bone Joint Surg* 1984;66:274.
- Masters DH: Implants. Bone and bone substitutes. *Calif Dent Assoc J* 1988;16:56.
- Koide M: Characterization of collagen spongy materials. *J Biomed Mater Res* 1993;27:79-87.
- Konishi J: Composition of collagen materials. *Jpn J Artif Organs* 1989;18:155-158.
- Hiroshi N, Hitoshi U, Hiroshi K, et al.: Computed Tomographic Examination fo Bone Healing after Placement of Collagen Sponge Matrix in the Extraction Site. *J Osaka Odontol Society* 2001;64:369-374.
- Kaihara S, Sonobe J, Iizuka T, et al.: Experimental study of bone inducing ability of rH BMP-2 with atelo-collagen sponge as a carrier. *Jpn. J Oral Maxillofac Surg* 2003;49:241-245.
- Fujimura K, Bessho K, Kusumoto K, et al.: Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelo-peptide type I collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;208:316-322.

33. Urist MR: Bone Formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
34. Urist MR, Strates BS: Bone morphogenic protein. *J Dent Res* 1971;1392-1406.
35. Reddi AH: Initiation and promotion by bone morphogenic proteins. *J Bone Min Res* 1993;8:449-502.
36. Hammonds RG, Schwall R, Dudley A, et al.: Bone inducing activity of mature BMP-2B produced from a hybrid BMP-2A/2B precursor. *Mol Endocrinol* 1991;5:149-155.
37. K. Bessho, Y. Konishi, S. Kaihara, et al.: Bone induction by Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2000;38:645-649.
38. Wang EA, Rosen V, Cordes P, et al.: Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9484-9488.
39. Bessho K: Ectopic osteoinductive difference between purified bovine and recombinant human bone morphogenetic protein. In: Lindholm TS, ed. *Bone Morphogenetic Proteins: Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery*. Austin: RG Landes, 105-111, 1996.
40. Wang EA, Rosen V, D' Alessandro JS, et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2220-2224.
41. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* 1991;113:68-687.