

선반가공 임플란트와 골조직의 유착에 관한 전자현미경적 연구

장 병 수

한서대학교 보건학부 피부미용학과

Electron Microscopic Study of Osseointegration between Bone and Smooth Machined Implants

Byung Soo Chang

Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan, Chungnam, 356-706, Korea

(Received December 1, 2004; Accepted December 22, 2004)

ABSTRACT

This paper reports that the ultrastructural nature of the interface process between the implants and surrounding bone has been studied after *in vivo* 1, 4, 8, 12 weeks of implantation of smooth machined implants into rabbit tibias. There was no indication of the fibrous connective tissue formation around the implant that imply intolerance of the bone tissue towards the implant after 1 week of implantation. The regions showing direct bone tissue bonding to the smooth machined implant contained osteoblast activating across the interface in the direction after 4 weeks of implantation. The reaction of a smooth machined implant caused in the first instance formation of an amorphous woven bone, which transformed into a mineralized bone containing collagen fibers. After 8 weeks of implantation, the activities of osteoblast initiated osseointegration forming bone matrix at the interface. During this period, the osteoblast surrounded with a matrix consisting of collagen bundles running in various directions. In the interface area between newly formed bone tissue and implants which has been inserted in rabbit tibias for 12 weeks, the implant and mineralized bone was separated by an amorphous electron dense material layer about 1~1.5 μm in thickness.

Key words : Bone, Implant, Osseointegration, Osteoblast

서 론

임플란트 표면 기술의 발전은 임상에서 보다 나은 효과적인 치료 결과와 예지성이 높은 임플란트 시술 치료를 가능하게 하였다. 임플란트 재료 표면의 특성은 임플란트 주변조직의 치유와 성장에 영향을 미친

다. 따라서, 1960년대 후반에 골조직과 순수 티타늄(titanium)에 관한 연구가 진척되면서 골과 임플란트의 직접 접촉을 의미하는 유착(osseointegration) 관계에 대하여 조직형태학적으로 많은 관심을 갖게 되었다(Albrektsson et al., 1990; Piattelli et al., 2002; De Maeztu et al., 2003). 임플란트와 골 유착을 위한 6가지 요인, 즉, 생체적합성, 표면성상, 디자인, 매입상의

*Correspondence should be addressed to Dr. Byung Soo Chang, Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan, Chungnam, 356-706, Korea. Ph.: (041) 660-1584, E-mail: bschang@hanseo.ac.kr.

상태, 외과적 테크닉, 하중조건 등이 제시되어 왔다 (Albrektsson et al., 1981).

순수티타늄 이외의 다른 금속 모두 골과 접촉되지만 티타늄과 골의 접촉율은 다른 금속보다 높게 나타나는 데, 이것은 다른 금속의 이온누출이 골조직에 수용되지 않는 것으로 보고된 바 있다 (Sennerby et al., 1992; Rocci et al., 2003).

임플란트에 대한 연구는 다양한 종류의 표면처리와 골유착 및 안정성에서 뛰어난 임플란트 표면을 개발하여 임상적인 성공률을 높이려는 시도가 지속되고 있다. 따라서, 임플란트 표면 거칠기와 코팅 및 화학적 처리 등을 통하여 임플란트의 골유착을 안정시키는 연구가 계속되고 있다 (De Leonardis, 1999; Cook et al., 2002; Trisi et al., 2003).

본 연구는 현재 임상에서 시술되고 있는 임플란트 종류 중에 하나인 선반가공(smooth machined) 임플란트를 토끼의 경골에 식립하고 1주, 4주, 8주, 12주 간격으로 조직을 절취하여 골과 임플란트의 유착정도를 미세구조적으로 규명하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 임플란트

암수 구분 없이 몸무게가 3~4kg인 뉴질랜드산 가토를 사용하여 좌우측 경골에 임플란트를 1, 4, 8, 12주 간격으로 식립하고 사육한 다음 희생시켰다. 본 연구에 사용된 선반 가공 임플란트는 직경이 3.0mm, 길이 5.0mm의 티타늄 나사형 임플란트(Neobiotech Co., Ltd, Korea)를 사용하였다(Fig. 1).

2. 동물의 희생

임플란트를 각각 이식 후 1주, 4주, 8주, 12주가 경과한 가토에 thiopental sodium을 정맥 내 주사하여 희생시켜서 임플란트와 인접조직을 포함한 경골을 적출한 후 10% 중성 formalin에 담가 3일 이상 고정시켰다.

3. 주사전자현미경 관찰

Formalin에 고정된 각각의 조직을 임플란트 정중부

를 중심으로 약 10mm 두께로 절단한 후 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.4)로 24시간 전고정하고 1% OsO₄ (4°C, phosphate buffer)로 6시간 후고정하였다. 고정이 끝난 조직은 Exakt Cutting & Grinding System (Exakt-Apparatebau, Germany) (Donath, 1990)을 이용하여 임플란트 장축방향에 평행하게 절단하고 알콜 농도 상승 순으로 탈수시킨 다음 아세톤으로 치환하였다. 처리된 재료는 임계점건조기(critical point dryer, Hitachi SCP-II)에서 건조시킨 후, JFC-1100 ion coater를 사용하여 20nm 두께로 백금 도금(platinum coating)한 다음 JSM-840 A형 주사전자현미경으로 20kV에서 관찰하였다.

4. 투과전자현미경 관찰

Formalin 고정이 끝난 각각의 조직을 Exakt Cutting & Grinding System (Exakt-Apparatebau, Germany)을 이용하여 임플란트 장축방향에 평행하게 절단하고 EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid, phosphate buffer, 4°C, pH 7.4)에서 3개월 동안 탈회하였다. 탈회가 끝난 조직에서 각각의 임플란트를 분리한 후 임플란트와 접해 있던 조직을 약 1mm³ 크기로 세절한 다음 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.4)에 1시간 전고정하고, 1% OsO₄ (4°C, phosphate buffer)로 1시간 후고정하였다. 고정이 끝난 재료는 동일 완충용액으로 2회 씩 세척한 후, 알콜농도 상승순으로 탈수하고, propylene oxide로 치환하여 Epon-Araldite 혼합액에 포매한 다음, 60°C vacuum drying oven (Yamato, Japan)에서 36시간 동안 중합반응 시켰다. 포매된 조직은 초박절편기 (ultramicrotome, LKB-2088)로 준초박절편을 제작하였다. 이어서, 초박절편을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEOL 100 CX-II형 투과전자현미경으로 100kV에서 관찰하였다.

결 과

선반가공 임플란트는 직경이 3.0mm, 길이가 5.0mm로 7개의 나삿니(thread)로 구성되어 있다. 나삿니와 나삿니 사이의 거리는 0.7mm이었으며 홈의 깊이는

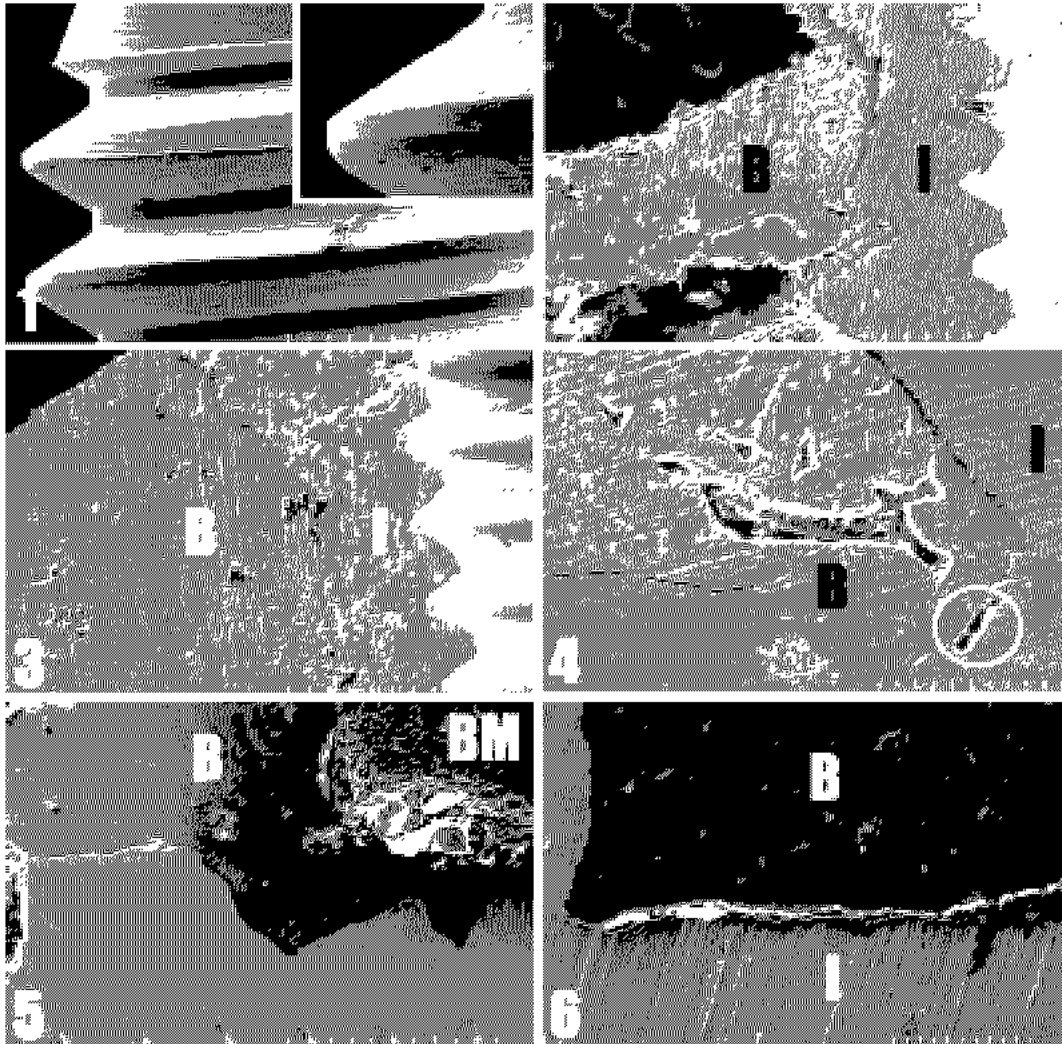


Fig. 1. Scanning electron micrograph (SEM) of a smooth machined implant. Inset: Magnification of figure 1 showing one thread of a smooth machined implant. Typical machining grooves are present on the surface. Bar = 1 mm.

Fig. 2. SEM of ground section of a tibial implant (I) after 1 week insertion. B: bone tissue. Bar = 1 mm.

Fig. 3. SEM of tibial implant (I) after 4 weeks of implantation. The interface zone containing remodelled bone tissue. B: bone tissue. Bar = 1 mm.

Fig. 4. SEM of tibial implant (I) after 8 weeks of implantation. Note the portion of interface (circle) between implant and bone tissue (B) separated. Bar = 500 μ m.

Fig. 5. SEM of after 12 weeks of implantation. Mature bone (B) is present around implant (I). A high bone-implant contact characteristic is present. BM: bone marrow. Bar = 1 mm.

Fig. 6. After 12 weeks, a part of the newly formed bone tissue (B) are separated by small gap from the implant (I) surface. Bar = 100 μ m.

0.45 mm로 측정되었다(Fig. 1). 또한, 임플란트 표면은 약간의 굴곡은 있으나 비교적 매끄러운 형태로 관찰

되었다(Fig. 2). 매식 후 1주일 이 경과된 조직표본에서 골은 임플란트의 나사면에 채워져 있으나, 골과 금속

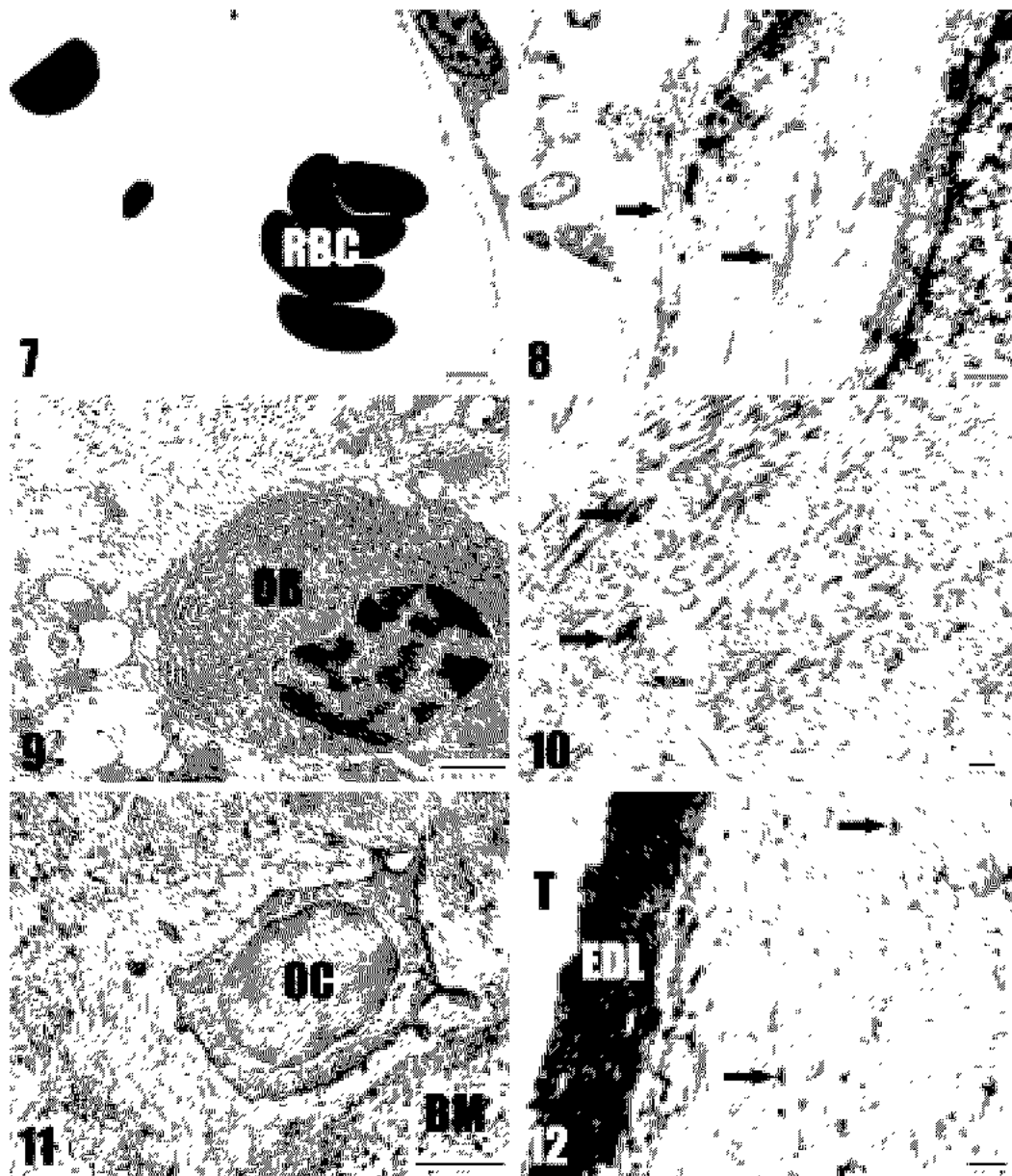


Fig. 7. Transmission electron micrograph (TEM) of interfacial bone tissue after 1 week of implantation showing the red blood cell (RBC).

Fig. 8. TEM of interfacial bone tissue after 4 weeks of implantation. The remodeled bone matrix showing collagen fibril (arrows).

Fig. 9. TEM of the bone tissue after 8 weeks of implantation. The newly forming bone tissue showing high osteoblastic activity near the implant. OB: osteoblast.

Fig. 10. TEM of bone tissue after 8 weeks of implantation. The mineralized (arrows) bone matrix containing the bundles of cross striated collagen fibril.

Fig. 11. TEM of bone tissue after 12 weeks of implantation. An osteocyte (OC) is surrounded by bone matrix (BM).

Fig. 12. TEM of the interface zone after 12 weeks of implantation. A layer of amorphous electron dense material (EDL) is located along the interface of removed titanium implant (T). The interfacial bone tissue consisting of collagen fibril is mineralized (arrows).

접촉면에는 많은 간극이 있는 것을 확인하였으며, 응고된 혈액 즉, 혈종(hematoma)과 골조직 부스러기들이 관찰되었다(Fig. 3). 투과전자현미경상에서 임플란트와 인접한 조직부위에는 출혈현상으로 인한 혈액과 세포성분들이 채워져 있으며, 다량의 적혈구가 관찰되었다(Fig. 8).

4주가 경과된 조직의 주사전자현미경상에서 임플란트와 골의 접촉면은 뼈조직의 파괴와 재흡수가 일어나는 과정으로 일부 부서진 조직과 임플란트 접촉면 사이에서 빈 공간이 관찰되었다(Fig. 4). 투과전자현미경상에서 이들 부위는 골모세포에서 분비되는 교원질(collagen)로 채워지기 시작하였다(Fig. 9).

8주가 경과된 조직의 주사전자현미경 표본에서 골기질의 재흡수 및 손상부위의 기질화가 진행되면서 파괴된 골의 재흡수가 진행되었다. 골과 금속 접촉면에서 부서진 골조직은 관찰되지 않았으나 일부에 골의 형성이 지연되어 접촉되지 않은 부위가 관찰되었다(Fig. 5). 투과전자현미경상에서 임플란트와 접촉면에서 활성이 강한 골모세포들이 관찰되는데 이 세포의 핵은 타원형의 형태로 세포질에 편재되어 있다. 조면세포체는 세포질 전체에 걸쳐 산재되어 있으며 조면세포체의 수조에는 전자밀도가 강한 구형의 과립상 물질들이 채워져 있었다. 골모세포는 교원질을 왕성하게 합성하여 세포의 기질로 방출하였으며 기질에는 교원원섬유(collagen fibril)가 산재되어 있었다(Fig. 10). 또한, 이시기에 골기질은 광화되기 시작하였다(Fig. 11).

12주가 경과된 조직의 주사전자현미경상에서 골기질은 임플란트의 나삿니를 따라 채워져 있는 것을 볼 수 있고 생성된 골기질에는 신생된 혈관이 관찰되었다(Fig. 6). 그러나, 고배율의 그림에서 골과 금속 접촉면에는 약 3 μ m 두께의 불연속적인 접촉공간(interface space)이 나삿니를 따라 형성되어 있다(Fig. 7). 투과전자현미경상에서 골모세포는 이미 분비된 기질에 의해서 둘러싸여 있다. 골소강내의 골세포는 핵이 세포의 중앙에 위치해 있으며 세포질은 빈약한 상태로 관찰되었고 세포질 돌기들이 신생되는 골세포 방향으로 뻗어있는 것을 확인하였다(Fig. 12). 한편, 골과 금속 접촉면에는 경계선(lamina limitans)이 형성된 것을 확인할 수 있으며 임플란트와 조직의 경계선 위에 직접

1~1.5 μ m 정도 두께의 전자밀도가 높은 물질층이 연속적으로 형성되어 있었다(Fig. 13).

고 찰

임플란트는 생체조직이 아니기 때문에 생체의 이물질 제거반응을 받는 운명에 직면하게 된다. 지금까지 개발되고 있는 골유합형 임플란트는 비교적 이물반응이 적은 것으로 보고되고 있지만 염증이 일어나게 되면 이물제거반응이 신속하게 일어나게 된다. 본 연구에서 선반가공 임플란트를 매식 후 1주일이 경과된 조직 표본의 투과전자현미경상에서 혈관손상에 의한 출혈현상과 혈병이 관찰되었지만, 호중구와 같은 염증세포들의 출현은 확인되지 않았다.

임플란트 주위에서 염증반응이 진행되면 치유과정 중에 육아조직(granulation tissue)이 형성된다. 육아조직은 섬유성결합조직으로 임플란트를 섬유성분으로 둘러싸게 되고 골모세포의 활성과 골기질의 생성을 억제하게 된다. 임플란트의 표면에 따른 골조직의 조직학적 연구에서 대식세포(macrophage)는 표면이 매끄러운 임플란트보다 표면이 거칠은 임플란트에 많이 출현하고 반대로 섬유모세포(fibroblast)는 표면이 매끄러운 임플란트에서 많이 관찰되었다(Marinho et al., 2003). 본 연구의 투과전자현미경상에서 미성숙한 콜라겐 섬유가 일부 관찰되었으나 임플란트에 대한 골조직의 유착을 방해하는 섬유성 결합조직의 형성은 나타나지 않았다.

De Aza et al. (2000)은 인조규회석(pseudowollastonite) 임플란트를 토끼 경골에 매식한 후 3주일이 경과된 표본의 조직 형태학적 연구에서 미성숙한 골조직이 임플란트를 둘러싸고 있으며 이들 조직은 골세포소강(osteocyte lacunae)이 잘 발달된 미성숙한 가골로 임플란트 표면에 직접 접촉되어 있다고 보고하였다.

본 연구의 4주가 경과된 선반가공 임플란트 조직표본에서 De Aza et al. (2000)이 보고한 바와 같이 활성이 강한 골모세포들이 임플란트의 나삿니에 직접 접촉하고 있었다. 그러나, 인조규회석 임플란트를 매식한 표본보다 골소강이 형성되는 시기가 늦게 나타났으며, 임플란트 접촉면에서 골화가 진행되는 과정도 늦은

것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 사용된 임플란트의 매끄러운 표면 특성에 기인하는 것으로 사료된다. 임플란트 표면 거칠기는 골소강의 형성과 골원(osteon)의 구축 및 신생골의 무기질 침착 과정에 영향을 주는 것으로 보고된바 있다(De Leonardis et al., 1999; Lazzara et al., 1999; Albrektsson et al., 2001; Trisi et al., 2002; Marinho et al., 2003).

De Aza et al. (2001)은 인조규회석을 토기의 경골에 매식한 후 골과 금속 접촉면에서 두 종류의 서로 다른 유형의 골조직이 형성되기 시작하였다고 보고하였는데, 임플란트와 가까운 부위에서는 가골의 형태로 형성되었고, 성숙골은 임플란트 매식 후 초기단계에 변형된 부위에서 발견되었다. 또한, 성숙골은 성숙된 교원섬유를 포함하고 있으며 미성숙골에서는 이런 구조가 관찰되지 않았다고 보고하였다.

본 연구에서 8주가 경과된 임플란트 조직표본은 신생된 골기질에 의해서 완전히 둘러싸여 있었다. 이시기에 광화된 골기질은 임플란트 주변 골조직에서 관찰되었고, 혈관이 신생되어 들어오면서 하버스관(haversian canal)이 생성되었다. 또한, 하버스관을 중심으로 골소강의 층상배열이 이루어지면서 하버스계(haversian system)가 완성되는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 De Aza et al. (2000)의 보고와 같은 결과로서 인조규회석 임플란트 표본에서 임플란트 표면에 접촉한 골조직은 층상배열을 가진 골조직으로 대체되고, 임플란트 접촉부위나 주위 골조직에서 세포기형은 발견되지 않았으며 염증이 관여하는 세포나 급성염증도 일어나지 않았다고 보고하였다.

Donath & Breuner(1982)는 광학현미경과 투과전자현미경을 이용하여 토기 경골에 식립된 임플란트에서 골과 티타늄의 접촉면을 관찰한 결과 접촉양태가 다양하다고 보고하였다. 골과 임플란트가 결합된 부위에서 임플란트 표면과 광화된 골은 약 100~400 nm 두께의 비콜라겐성 무정형층에 의해서 분리되어 있었고 골모세포 배양을 통한 연구에서 Davides et al. (1990)은 무정형층의 형성은 식립후 2~3주 내에 형성되기 시작한다고 언급하였다.

임플란트와 골 접촉면의 유착에 관하여 Albrektsson (1990)은 골과 임플란트가 직접 접촉하는 것으로 나타나지만 투과전자현미경 관찰에서 임플란트와 석

회화 골 사이에는 하나의 층이 존재하는 것을 확인하였으며 이런 무구조물질은 약 20~40 μm 두께로 관찰하였다. 한편, 골과 임플란트 표면은 직접 부착하지 않는데 이 사이에는 0.5~2 μm 두께의 비광물화된 무정형층이 존재하고 있으며 이층은 골의 유기질에서 기원한 것으로 보고하였다(Snnerby et al., 1992). 이런 전자밀도가 높은 암화된 구조물은 연구자와 연구재료에 따라 50 nm에서 2 μm 로 다양하게 측정되었다. 본 연구에서 임플란트와 접촉한 골 사이에는 무정형의 전자밀도가 강한 무정형물질층을 존재하고 있었다. 이런 암화된 층은 두께가 약 1~1.5 μm 로 관찰되었고 전자밀도가 강한 무구조물로 나타났다.

경계선(lamina limitans)은 광화 정도가 다른 골과 골소강 및 골세관 주위에서 관찰되는 골의 반전선과 같은 밀도와 두께를 가진다. Snnerby et al. (1992)은 토기의 골과 임플란트 경계면 부위에 약 100~200 nm의 무정형 물질층이 광화된 골조직 변연부에서 관찰되었는데 이들 골과 무정형층 사이에 전자밀도가 높은 선상의 경계선이 골소강과 골세관 주변이나 골의 광화 정도가 다른 골조직 사이에서 관찰되는 것과 같은 특성을 나타냈다. 또한, 무정형층으로부터 광화된 골을 분리하는 경계선은 골소강과 골세관에 연속되어 있는데 이것은 반전선(reversal line)과 유사하다고 보고하였다.

본 연구에서 임플란트 매식 후 12주가 경과된 조직표본에서 임플란트와 접촉면의 조직부위에 경계선이 존재하고 인접한 골조직에도 골세포가 잘 나타났다. 이와 같은 결과는 Snnerby et al. (1992)이 보고한 바와 같이 암화된 무정형물질을 아래의 신생골 조직과 분리시키는 막의 형태로 관찰되었다.

참 고 문 헌

- Albrektsson T, Branema PI, Hansson HA, Lindstrom J: Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long lasting, direct bone to implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 55: 155-170, 1981.
- Albrektsson T, Snnerby L: Direct bone anchorage of rat implants: Clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. *Parodontol* 1: 307-320, 1990.

- Albrektsson T, Johansson C, Lundgren AK, Sul Y, Gottlow J: Experimental studies on oxidized implants. A histomorphometrical and biomechanical analysis. *Appl Osseointegration Res* 1: 21-24, 2001.
- Cook SD, Salkeld SL, Patron LP, Sargent MC, Rueger DC: Healing course of primate ulna segmental defects treated with osteogenic protein 1. *J Investigative Sur* 15: 69-79, 2002.
- Davides JE, Lowenberg B, Shiga, A: The bone titanium interface in vitro. *J Biomed Mat Res* 24: 1289-1306, 1990.
- De Aza PN, Luklinska ZB, Martinez A, Anseau MR, Guitian F, De Aza S: Morphological and structural study of pseudowollastonite implants in bone. *J Microsc* 197: 60-67, 2000.
- De Aza PN, Luklinska ZB, Anseau MR, Guitian F, De Aza S: Transmission electron microscopy of the interface between bone and pseudowollastonite implant. *J Microsc* 201: 33-43, 2001.
- De Leonardi D, Garg AK, Pecora GE: Osseointegration of rough acid etched titanium implants: 5 year follow up of 100 minimatic implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 14: 384-391, 1999.
- De Maeztu MA, Alava J, Gay Escoda C: Ion implantation: surface treatment for improving the bone integration of titanium and Ti6Al4V dental implants. *Clin Oral Impl Res* 14: 57-62, 2003.
- Donath K, Breuner GAA: Method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. *J Oral Pathol* 11: 318-325, 1982.
- Donath K: Preparation of histological sections by cutting grinding technique for hard tissue and other material not suitable to be sectioned by routine methods. Equipment and methodical performance. EXAKT Kulzer Publication, Norderstedt. 1-16, 1990.
- Lazzara RJ, Testori T, Trisi P, Porter SS, Weinstein RL: A human histological analysis of osseotite and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces. *Int J periodontics Restorative Dent* 19: 117-129, 1999.
- Marinho VC, Celletti R, Bracchetti G, Petrone G, Minkin C and Piattelli A: Sandblasted and acid etched dental implants: a histologic study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18: 75-81, 2003.
- Piattelli M, Scarano A, Paolantonio M, Iezzi G, Petrone G, Piattelli A: Bone response to machined and resorbable blast material titanium implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Impl* 28: 2-8, 2002.
- Rocci A, Martignoni M, Burgos PM, Gottlow J, Sennerby L: Histology of retrieved immediately and early loaded oxidized implants: light microscopic observations after 5 to 9 months of loading in the posterior mandible. *Clin Implant Dent Relat Res* 5: 88-98, 2003.
- Sennerby L, Thomsen P, Ericsson L: A morphometric and biomechanic comparison of titanium Implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7: 62-71, 1992.
- Trisi P, Lazzara R, Rao W, Rebaudi A: Bone implant contact and bone quality: evaluation of expected and actual bone contact on machined and osseotite implant surfaces. *Int J Periodontics Restorative Dent* 22: 535-545, 2002.
- Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS: Bone implant contact on machined and dual acid etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol* 74: 945-956, 2003.

< 국문초록 >

본 연구는 토끼의 경골에 선반가공 임플란트를 식립한 후 1, 4, 8, 12주가 경과한 다음 적출하여 골조직이 임플란트에 접촉되는 과정의 미세구조적 특성을 연구하였다. 임플란트 매식 후 임플란트에 대한 골조직의 유착을 방해하는 섬유성 결합조직의 형성은 일어나지 않았다. 4주가 경과된 조직표본의 골과 임플란트가 직접 접촉하는 부위에서 골모세포가 활성화되어 골조직과 임플란트의 직접적인 유착이 일어나기 시작하였다. 임플란트와 접하는 부위의 조직에는 가골이 형성되었고 이어서 교원섬유와 무기질이 침착되면서 광화가 진행되었다. 8주 경과된 조직에서 활성화된 골모세포는 임플란트의 접촉면에 골기질을 합성하여 골과 임플란트의 유착이 진행되었다. 이 시기에 골모세포는 골기질에 둘러싸였고, 골기질은 여러 방향으로 증주하는 교원섬유를 가지고 있었다. 12주가 경과된 조직표본에서 새롭게 형성되어 광화된 골조직과 임플란트는 두께가 약 1~1.5 µm인 무정형의 전자밀도가 높은 물질층에 의해서 분리되어 있었다.