

의학 석사학위 논문

생활성물질이 코팅된 치과임플란트의  
골 유착 효과에 관한 실험적 연구

아주대학교 대학원

의학과

양근용

생활성물질이 코팅된 치과임플란트의  
골 유착 효과에 관한 실험적 연구

지도교수 이 정 근

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2009년 8월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

양 근 용

양근용의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 이 정 근 인

심사위원 김 재 호 인

심사위원 송 승 일 인

아주대학교 대학원

2009년 6월 22일

## 생활성물질이 코팅된 치과임플란트의 골 유착 효과에 관한 실험적 연구

치과 임플란트가 추구하는 중요한 목표중의 하나는 골 유착 기간을 단축시키는 것이다. 지금까지 부족한 골량과 골질을 극복하여 골 유착 기간을 단축시키기 위해 다양한 표면처리 등 많은 노력이 있었고, 이에 더 나아가 임플란트와 골의 융합 기간을 더욱 단축시키고 성공률을 높이기 위한 방법으로 생체모방물질을 이용하는 방법이 연구되고 있다. 본 연구에서는 조골세포 증식과 분화를 촉진하는 Bone morphogenic protein(BMP)의 변형 합성펩티드를 코팅한 임플란트를 돼지 악골에 식립하여 2주 및 4주 후 희생시켜 조직계측학적으로 평가하였다. 합성펩티드를 코팅한 실험군은 음성 대조군으로서의 기존 표면군과 비교하여 통계적으로 유의성있는 결과의 차이를 보인 반면 통계적으로 유의성있는 차이를 보이지 않을 정도로 양성 대조군으로서의 BMP군에 필적할 만한 골 형성 능력을 보이고 있었다. 상기의 결과에 근거하여 합성펩티드를 코팅한 치과용 임플란트는 기존의 치과용 임플란트에 비하여 골유착능이 개선되었음을 결론지을 수 있었다.

---

핵심어: 생체모방물질, 치과임플란트, 합성펩티드

## 차 례

국문 요약 .....	i
차례 .....	ii
그림 차례 .....	iii
표 차례 .....	iv
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
A. 실험재료 .....	3
1. 실험군: synthetic peptide(PEP111) .....	3
2. 양성대조군: BMP-2 .....	3
3. 음성대조군: 양극산화법을 이용하여 제작된 dental implant fixture .....	4
B. 실험동물 .....	4
C. 실험방법 .....	4
1. 실험동물의 준비 및 발치 .....	4
2. 식립 .....	5
3. 구강관리 .....	5
4. 평가방법 .....	5
III. 결과 .....	6
IV. 고찰 .....	8
V. 결론 .....	10
참고문헌 .....	11
ABSTRACT .....	14

## 그림 차례

Fig. 1. Histomorphography after 2 weeks .....	6
Fig. 2. Histomorphography after 4 weeks .....	6
Fig. 3. BA ratio after 2 and 4 weeks .....	7

## 표 차례

Table 1. Relative BA activity of pep111 group(experimental group) against CellNest group(negative control group) and BMP-2 (positive control group) .....	7
---	---

## I. 서론

임플란트 시술 시 임플란트 식립 후 보철물을 제작하여 연결하기 전까지의 기간을 줄이려는 환자의 욕구를 만족시키려는 임상가들의 연구 주제의 일환으로 임플란트 표면에 변화를 주어 골과 임플란트의 결합을 향상시키려는 연구가 이어져왔다(Gan 등, 2004).

임플란트 표면의 기계적 변화를 통한 결합의 향상을 도모하는 시도가 꾸준히 이어져 왔다. 주로 기존의 기계가공 표면을 산처리(acid etching)나 blasting을 통하여 거칠기를 증가시켜 골과 임플란트 표면의 접촉면적을 증가시키는 방법이 사용되었으며 그 중 SLA(Sandblasted Large grit Acid etching)표면은 대표적인 표면처리 방법으로 초기의 기계가공 표면에 비하여 우수한 임플란트의 고정력과 함께 성공률의 증가를 보여주었다(Buser 등, 1991; Klokkevold 등, 1997; Baker 등, 1999; Cochran 등, 1996).

임플란트와 골간의 결합 시기를 단축시키기 위한 또다른 노력으로 인산칼슘과 같은 생체물질을 임플란트 표면에 코팅시킴으로써 티타늄 표면과 골간의 직접적인 접촉이 아닌 생체친화성 물질을 매개로 한 좀 더 빠르고 안정적인 결합을 유도하기 위한 시도가 있어 왔다. 인산칼슘을 임플란트 표면에 코팅하기 위해서는 여러 방법이 있지만 가장 일반적으로는 plasma-spray를 사용한다. 하지만 plasma-spray는 너무 높은 온도를 사용하므로 균일한 코팅이 이루어지지 않는 단점이 있었고(Clemens 등, 1998), 이러한 생체친화성 물질이 임플란트 표면에서 떨어져 나옴으로써 안정적인 결합을 방해하는 경우도 보고되었다.

최근에는 이를 극복하기 위한 시도로 골모세포(osteoblast)로의 분화를 촉진하고 이 세포들을 임플란트 표면으로 끌어들이기 위한 BMP(bone morphogenetic protein)와 같은 생체물질을 직접 임플란트 표면에 코팅하는 시도가 몇몇의 실험실을 중심으로 기내(in vitro)에서 행하여지고 있다. 기내실험에서 임플란트 표면에 골과 유사한 광화층을 코팅한 경우 임플란트 주변의 기질반응이 의미 있게 향상되었다고 한다.(Munisamy 등, 2008) 또한 임플란트 식립전 형성된 골



구멍에 소량의 멜라토닌을 적용하였을 시 멜라토닌이 생체모방물질로 작용하여 신생골 형성에 도움을 주었다는 결과도 있다(Cutando 등, 2008). Osteogenic growth factor를 함유한 생체모방물질을 코팅한 임플란트를 식립하는 생체실험에서 주변골 형성기간을 크게 단축시켰다고 보고되었으며(Liu 등, 2006) 골의 치유를 향상시키기 위해 BMP-2(bone morphogenic protein-2)를 적용한 실험에서는 임플란트 표면의 칼슘포스페이트 코팅에 BMP-2를 적용 시 가능성 있는 골 유도물질로 보인다는 결과를 발표하였다(Liu 등, 2007). 다른 연구에서는 염소모델에서 BMP-2를 적용시 골과 임플란트 접촉면과의 치유가 향상되었고(Barrere 등, 2003; Barrere 등, 2003; Barrere 등, 2003), 토끼모델에서 결합강도가 향상되었으며(Yan 등, 1997), 개를 이용한 실험에서 조기골융합을 자극하는 것으로 보고되었다(Vasudev 등, 2004).

그러나 BMP와 같은 생체물질은 보관 및 유통기간과 같은 어려운 난제들이 대두되었고 따라서 이러한 문제점을 해결하면서도 생체물질과 비슷한 효과를 내기 위한 시도로써 합성 펩타이드와 같은 생체모방물질을 코팅하는 시도가 일부에서 이루어지고 있다. 본 연구의 목적은 생체모방물질의 하나인 합성 펩타이드를 직접 임플란트 표면에 적용시킴으로써 생체물질에 견줄만한 임플란트-골 결합 강도 및 결합기간의 단축을 도모하고자 함이다.

## II. 재료 및 방법

### A. 실험재료

오스템임플란트(주)의 SSII  $\Phi 3.3 \times 8.5\text{mm}$  cellnest를 음성대조군으로 하고 BMP-2군을 양성대조군으로 하여, synthetic peptide군 치과용 임플란트의 골유착능을 평가하고자 하였다. 실험용 임플란트에 BMP-2와 synthetic peptide의 코팅은 각 1mM의 용액에 12시간동안 SSII  $\Phi 3.3 \times 8.5\text{mm}$  cellnest를 담근 후 꺼내어 필터된 압축공기로 건조하여 실험에 사용하였으며 CellNest 대비 30 %의 골유착 향상 효과를 기대하고 실험 결과에서의 편차를 30 %라고 가정하였을때 각 평가에서 필요한 시편 수는 10개로 계산되어 실험군과 음성대조군, 양성대조군 각 10개씩 총 30개의 임플란트를 준비하여 식립하였다. 중도탈락률은 고려하지 않았다.

#### 1. 실험군: synthetic peptide(PEP111)

BMP-2의 whole amino acid sequence 중에서 골아세포의 증식 및 분화에 핵심적인 역할을 하는 아미노산 서열을 찾아내고 이들 서열의 일부를 변형시켜 합성기를 이용하여 제작한 synthetic peptide(PEP111)를 오스템임플란트(주)에서 제공받아 실험에 사용하였다. 제공받은 synthetic peptide는 분자량은 2288이며 23개의 아미노산으로 구성되어있고 이미 세포실험에서 BMP-2와 비슷한 골형성능을 보고한 바 있다(Kang 등, 2006).

#### 2. 양성대조군: BMP-2

1965년 Urist가 탈회된 골 기질에서 골유도 능력이 있는 BMP를 추출한 후에 (Urist, 1965) 지금까지 최소한 18종류의 BMP가 밝혀졌으며, 유전자 기술의 발달로 다양한 recombinant human BMP(rhBMP)를 생산할 수 있게 되었다. 여러 가지 BMP 중 BMP-2/4군이 다른 BMP군에 비하여 생체 및 시험관에서 낮은 농도에서의 골형성 능력이 뛰어나 BMP의 골형성 유도를 검증하는 동물실험에서

많이 이용되고 있다(Hughes FJ 등, 1995). 본 실험에서는 BMP-2를 양성 대조군으로 synthetic peptide 실험군과 비교하였으며 실험군에 사용된 synthetic peptide 또한 BMP-2의 아미노산 서열을 이용하여 합성되었다.

### 3. 음성대조군: 양극산화법을 이용하여 제작된 dental implant fixture

오스템임플란트(주)의 SSII  $\Phi 3.3 \times 8.5\text{mm}$  Cellnest<sup>®</sup>를 사용하였다.

## B. 실험동물

골의 구조와 재형성률이 인간과 가장 비슷한 micropig를 실험동물로 선택하였는데 한 마리당 8개의 임플란트를 식립하기로 계획하고 총 4마리의, 영구치가 모두 맹출된 24개월령으로 micropig를 선정하였다(Al Pearce, 2007). 실험동물의 사육 및 희생은 피더블유제네틱스코리아(주)에서 수행하였다. 여태까지 치과용 임플란트의 실험에 이용된 개과의 동물에 비해 골개조율이 인간에 가깝다는 장점에 micropig를 이용한 치과용 임플란트 실험이 선호되고 있는 추세이다(Laiblin 와 Jaeschke 1979).

## C. 실험방법

### 1. 실험동물의 준비 및 발치

Micropig를 일정한 환경에서 사육 하며 정기적으로 건강 상태를 확인하였다. Micropig 하악의 좌, 우 제1소구치부터 제2대구치까지 발치를 시행하고 X-ray 촬영을 통해 치근의 완전한 제거를 확인한 다음 2개월 치유기간을 주었다. 식이는 동물실험 메뉴얼에 따라 시행하였으며 발치 이후 2주동안 생리식염수와 2% chlorhexidine(동아제약)으로 매일 발치부위를 세정하였다.

## 2. 식립

Micropig를 흡입마취시킨 다음 2 % chlorhexidine(동아제약)을 적신 거즈를 이용하여 혀와 치아, 식립 부위를 세정하였다. 식립 부위까지 치조정 절개, 골막 박리를 거쳐 1500rpm으로 주수 하에 직경 3.0mm 까지 drilling후 임플란트는 주수를 하지 않으면서 50rpm으로 식립한 다음 Cover screw를 잠그고 4.0 Vicryl로 봉합하였다. 개체별 특이성에 의한 결과의 오차를 줄이기 위해 시험동물마다 최소 2개의 음성대조군, 양성대조군, 실험군 임플란트를 식립하였다.

## 3. 구강관리

Micropig의 구강청결상태를 유지하여 임플란트 주위염으로 인한 임플란트의 실패를 방지하고자 식립 이후 2% chlorhexidine(동아제약)으로 매일 수술부위를 2주일 동안 세정하였다. 2주일 이후에는 주 3회 2% chlorhexidine(동아제약)으로 세정하였다.

## 4. 평가방법

2주 및 4주후 동물을 희생시켜 연조직이 손상되지 않게 조직을 채취한 다음 시편의 제작은 서울대학교 비엠펜랩(주)에 의뢰하여 협설방향으로 박편을 제작하고 H&E 염색 하에 조직을 관찰하였다. BA (Bone area between implant thread)의 측정은 Image Pro Plus (ver.6.1, MediaCybernetics, USA) 를 이용하였으며, 각 실험군과 대조군의 골 형성량을 비교하였다.

### III. 결 과

조직시편의 조직계측학적 분석 결과 synthetic peptide(pep111)를 코팅한 실험군에서 기존 Cellnest<sup>®</sup>표면의 음성대조군에 비해 2주 희생군에서는 47.3%, 4주 희생군에서는 69.1% 이상의 BA 증가를 나타내었다(Table 1). BMP-2를 코팅한 양성대조군과의 비교에서는 2주 희생군에서는 80.6%의 BA를 보인 반면 4주 희생군에서는 110.2%의 BA 증가를 보였다(Table 1). 이는 BMP-2에 필적하는 골 형성능력을 보여주는 결과로 synthetic peptide(pep111)를 코팅한 실험군은 음성대조군으로서의 기존표면에 비하여 통계적으로 유의성 있는 향상된 골 형성능력을 보여주었으며 BMP-2를 코팅한 양성 대조군과 거의 동등한 골 형성 능력을 보여주었다.

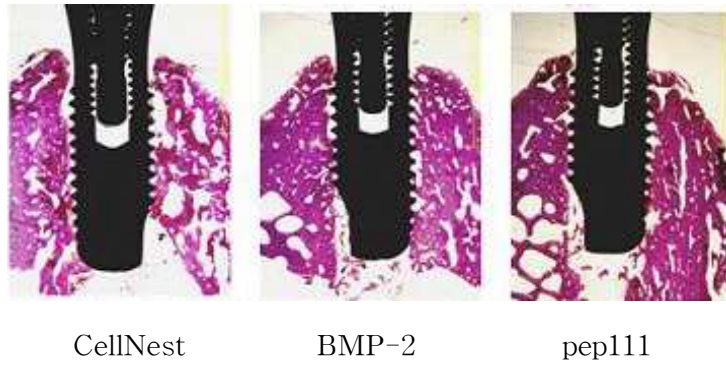


Fig. 1. Histomorphography after 2 weeks.



Fig. 2. Histomorphography after 4 weeks.

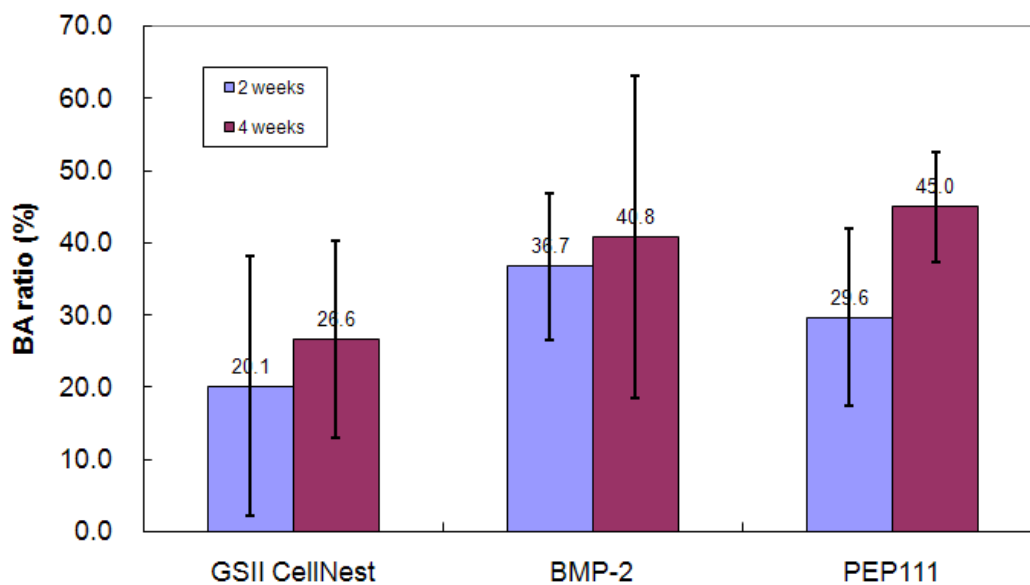


Fig. 3. BA ratio(%) after 2 and 4 weeks.

Table 1. Relative BA activity of synthetic peptide group(experimental group) against CellNest group(negative control group) and BMP-2 (positive control group)

	Relative activity (%)	
	2 weeks	4 weeks
GSII CellNest	100	100
BMP-2	182.7 (100)	153.4 (100)
PEP111	147.3 (80.6)*	169.1 (110.2)*

\* means relative BA activity of synthetic peptide against BMP-2

## IV. 고찰

구강내 임플란트 식립 시 골의 반응은 임플란트가 식립된 부위의 골이 치밀 골인지 해면골인지 등의 골의 상태에 크게 좌우된다. 또한 임플란트 표면에서 연조직의 개입이 없이 골과의 직접접촉은 높은 성공을 보인다는 결과가 확인되었다(Sennerby 등, 1992). 그리고 Hydroxyapatite(HA)를 이용할 경우 초기 골 결합과 골 증식에 도움이 된다는 실험결과에 따라 많은 HA표면처리가 시도되어 부분적으로 성과가 있었으나 차후 임플란트와의 결합이 약해지며 여러 문제점을 발생시켰다.

최근까지 치주조직이나 악안면골 결손에 BMP를 이용한 수복 방법이 적극적으로 연구되고 있다(Taba 등 2005; Bessa 등 2008). 개과의 동물모델을 이용한 rhBMP-2 코팅 임플란트 연구에서 좋은 결과가 보고되고 있는 바(Becker 등, 2006), 유전자기법을 이용한 BMP의 대량생산과 관련지어 밝은 전망을 기대하기도 한다. 그러나 유전자기법을 이용한 방법은 회수율이 낮고 안전성이 확보되지 않는 단점이 있다. 펩티드합성기를 이용한 유기적 합성법이 이런 단점을 극복할 수 있는 대안으로 각광받고 있다.

돼지는 일반적으로 성체로의 성장 속도가 느리고 성체로 자라면 다루기 어렵다는 점 때문에 치과 연구에서 실험동물로 잘 선호되지 않는다. 그러나 미니돼지의 개발은 이러한 문제를 일시에 해결하여 현재 개과의 실험동물을 대치하는 실험동물 모델로서 그 위치를 확고히 해 나가고 있다. 여태까지 치과용 임플란트의 실험에 이용된 개과의 동물에 비해 골개조율이 인간에 가깝다는 장점 때문에(Laiblin 와 Jaeschke 1979) 최근에는 minipig를 이용한 치과용 임플란트 실험이 선호되고 있는 추세이다.

치과용 임플란트의 골유착능을 증가시킬 목적으로 생체모방물질을 코팅할 경우 임플란트 표면에 이를 효과적으로 고정시키기가 쉽지 않으며 신체내의 효소에 쉽게 분해되어 작용기간이 짧은 점이 앞으로 해결해야할 과제이다. 또한 치과용 임플란트의 성공률을 높이기 위해서는 식립 시 골과의 긴밀한 초기접촉 및

초고정이 매우 중요한데 골과 밀접하게 식립하기 위해서는 통상적으로 식립할 임플란트보다 약간 작은 직경의 드릴로 골천공을 시행한 후 임플란트를 식립하게 된다. 이 경우 골과 임플란트 표면간에 큰 마찰력이 생기게 되며 이런 마찰력에 의해 표면에 도포된 생체모방물질들이 쉽게 소실된다는 점 역시 생체모방물질을 도포한 임플란트의 문제점중 하나이다. 이를 극복하기 위해서 생체모방물질을 임플란트 표면에 견고하고 균일하게 부착시키는 방법에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.



## V. 결 론

기존의 Cellnest<sup>®</sup>표면에 BMP-2의 변형 synthetic peptide를 코팅 후 식립한 동물 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

- A. 기존 Cellnest<sup>®</sup>표면에 비해 생체모방물질인 synthetic peptide를 코팅한 실험군에서 유의할만한 초기 골 형성능력을 보여주었다.
- B. Synthetic peptide는 골 형성능력을 가지는 물질로 그 활성이 BMP-2와 비교하여 동물 유효성 평가에서도 동등 이상의 활성을 가지는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Al Pearce, *European Cells and materials* Vol. 13. 2007(pp1-10) Laiblin et. Al., “.. Clinical-chemical investigations..”92: 124, 1979
2. Baker D, London RM, O’Neal R. Rate of pull-out strength gain of dual-etched titanium implants: a comparative study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 14:722 - 728, 1999
3. Barrere F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K etal. Osteogenecity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. *J Biomed Mater Res A.* 66:779 - 778, 2003
4. Barrere F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. In vitro and in vivo degradation of biomimetic octacalcium phosphate and carbonate apatite coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res A.* 64:378 - 387, 2003
5. Barrere F, van der Valk CM, Meijer G, Dalmeijer RA, de Groot K, Layrolle P. Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 67:655 - 665, 2003
6. Becker J, Kirsch A, Schwar, F, Chatzinikolaidou M, Rothamel D, Lekovic V, Laub M & Jennissen HP. Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhbmp-2). A pilot study in dogs. *Clin Oral Investig* 10: 217-224, 2006
7. Bessa PC, Casal M & Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: The road from laboratory to clinic, part ii (bmp delivery). *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2: 81-96, 2008

8. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 25:889 - 902, 1991
  
9. Clemens JA, Klein CP, Vriesde RC, Rozing PM, de Groot K. Healing of large (2mm) gaps around calcium phosphate-coated bone implants: a study in goats with a follow-up of 6months. *J Biomed Mater Res.* 40:341 - 349, 1998
  
10. Cochran DL, Nummikoski PV, Higginbottom FL, Hermann JS, Makins SR, Buser D. Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid-etched surface in the canine mandible: radiographic results. *Clin Oral Implants Res.* 7:240 - 252, 1996
  
11. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, Lopez-Peña M, Stephenson J, Reiter RJ. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *J Pineal Res.* 2008 Feb 19
  
12. Gan L, Wang J, Tache A, Valiquette N, Deporter D, Pilliar R. Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. PartII: Short-term in vivo studies. *Biomaterials.* 25:5313 - 5321, 2004
  
13. Hughes FJ, Clooyer J, Stanfield S, Goodman S : The effects of bonemorphogenic protein-2,4, and 6 on differentiation of rat osteoblastic cells in vitro. *Endo.* 136:2671-2677, 1995
  
14. Kang EJ, An YB, Eom TG, Choi SW, Kim JH, Effects of synthetic peptides on osteoblasts. The Academy of EAO no.226, 2006
  
15. Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 8:442-447, 1997

16. Laiblin C & Jaeschke G. Clinical chemistry examinations of bone and muscle metabolism under stress in the gottingen miniature pig--an experimental study. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 92: 124-8, 1979
  
17. Liu Y, Li JP, Hunziker EB, de Groot K. Incorporation of growth factors into medical devices via biomimetic coatings. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* Jan 15;364(1838):233-48, 2006
  
18. Liu Y, Huse RO, de Groot K, Buser D, Hunziker EB. Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants. *J Dent Res.* Jan; 86(1):84-9, 2007
  
19. Munisamy S, Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. A bone-like precoating strategy for implants: collagen immobilization and mineralization on pure titanium implant surface. *J Oral Implantol.* 34(2):67-75, 2008
  
20. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofacial Implants* 7:62-71, 1992
  
21. Taba M Jr, Jin Q, Sugai JV & Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res* 8: 292-302, 2005
  
22. Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 150:893-899, 1965
  
23. Vasudev DV, Ricci JL, Sabatino C, Li P, Parsons JR. In vivo evaluation of a biomimetic apatite coating grown on titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 69:629 - 636, 2004
  
24. Yan WQ, Nakamura T, Kawanabe K, Nishigochi S, Oka M, Kokubo T. Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants. *Biomaterials.* 18:1185 - 1190, 1997

-ABSTRACT-

## Experimental study on osseointegration of dental implants with bioactive coating

Geun Yong Yang

Department of Medical Sciences

The Graduated School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Jeong Keun Lee)

The more short of osseointegration period of a dental implant, the more desirable it is for patients, for there can be possible reduction of treatment time. There has been various methods of implant surface treatment for reducing osseointegration time in case of qualitative and quantitative problems of alveolar bone. Furthermore, there are studies on biomimetic agents for reducing period of ossointegraion and improve success rate of dental implants nowadays. We evaluated histomorphometrically the BIC and BA of the synthetic peptide-coated implants after 2 and 4weeks after installation in the minipig jaw. Negative and positive controls were Cellnest<sup>®</sup> group and BMP-coated group, respectively. Implants with synthetic peptide showed statistically significant increase in osseointegration compared to those with Cellnest<sup>®</sup> group as a negative control, with comparable results to BMP group as a positive control.

---

**Key Words:** biomimetic, dental implant, synthetic peptide