

2012년 8월

2012년 8월
박사학위논문

박사학위논문

가토 두개관에서 골결손부에
Allomatrix의 공기노출 시간에
따른 골형성 효과 비교

가토 두개관에서 골결손부에 Allomatrix의 공기노출 시간에 따른 골형성 효과 비교

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 성 규

이 성 규

가토 두개관에서 골결손부에
Allomatrix의 공기노출 시간에 따른
골형성 효과 비교

Effect of air exposure of Allomatrix on bone formation
in rabbit's calvarium

2012년 8월 24일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 성 규

가토 두개관에서 골결손부에
Allomatrix의 공기노출 시간에 따른
골형성 효과 비교

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2012년 4월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 성 규

이성규의 박사학위 논문을 인준함

위원장	전남대학교	교수	오 희 균 인
위 원	전남대학교	교수	박 상 원 인
위 원	조선대학교	교수	임 성 철 인
위 원	조선대학교	교수	김 재 성 인
위 원	조선대학교	교수	김 수 관 인

2012년 6월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iv
I. 서 론	1
II. 연구 대상 및 방법	2
III. 결 과	5
IV. 고 찰	6
V. 결 론	9
참고문헌	10
사진 부도 설명	12
사진 부도	14

표 목 차

Table 1. New bone formation area (NBFA) at 4 and 8 weeks after implant placement (Mean±SE)	5
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	---

도 목 차

Fig. 1. Histopathologic findings of the control group, 4 weeks after experiment.	14
Fig. 2. Histopathologic findings of the control group, 8 weeks after experiment.	15
Fig. 3. Histopathologic findings of the experimental group 1, 4 weeks after graft.	16
Fig. 4. Histopathologic findings of the experimental group 1, 8 weeks after graft.	17
Fig. 5. Histopathologic findings of the experimental group 2, 4 weeks after graft.	18
Fig. 6. Histopathologic findings of the experimental group 2, 8 weeks after graft.	19
Fig. 7. Histopathologic findings of the experimental group 3, 4 weeks after graft.	20
Fig. 8. Histopathologic findings of the experimental group 3, 8 weeks after graft.	21

ABSTRACT

Effect of air exposure of Allomatrix on bone formation in rabbit's calvarium

Sung-Kyu Lee

Advisor: Prof. Kim, Su Gwan, Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Purpose: The purpose of this study is to evaluate the degree of the bone formation when Allomatrix, putty type allograft material, is applied at bone defects formed at rabbit's calvarium when varying air exposure time.

Materials and Methods: We divided by 4 sectors about 4cm diameter area at calvarium of 6 rabbits and the bone defect area of 8mm diameter and 2mm depth were formed. nothing was applied at left upper side. each, 3day exposed graft material at right upper side, 1day exposed graft material at right lower side and 1hour exposed graft material at left lower side was applied and set these 8 week group. after 4 weeweeks, another 6 rabbits were experimented by same method and set these 4 week group. and rabbits were sacrificed and we made specimens by resin blocks and after, we made specimen sliced.

Results: Degree of bone formation was evaluated by new bone formation area and there was no statistical significance between each groups by one way ANOVA and p value was 0.75 at 4week group and 0.696 at 8 weeks group.

Conclusions: The degree of bone formation by Putty type allograft material "Allomatrix" exposed to air pollution for various time did show any difference.

Key words: Allograft, Bone graft, Bone regeneration

INTRODUCTION

골 결손부 처치에 사용되는 골유도재생술은 통상적으로 차단막과 더불어 골대체제를 사용하는 술식으로 현재 치과영역에서 임플란트 기술과 더불어 다양하게 적용되고 있다. 골 대체제의 종류는 환자에게서 직접 얻는 자가골에서부터 동종골, 이종골, 그리고 합성골까지 다양하지만 자가골을 제외하고 그 효능에 대해서는 논쟁의 여지가 있다.(1) 또한 골대체제의 적용 후에 적절한 재생 여부를 좌우하는 요인에 있어 술 전 오염의 여부나 보관 환경이 큰 영향을 미치게 되는데 이러한 술 전 오염을 예방하기 위해서는 수술 부위의 청결과 술 후 항생제 적용 그리고 술 전 골대체제를 적용 시 멸균상태를 유지하는 등의 과정이 필요하다. 이번 연구에서 사용된 골대체제는 ALLOMATRIX[®] INJECTABLE PUTTY(Wright Medical Tech, Inc., Arlington, Tenn, USA)로 동종골을 이용한 퍼티 형태의 골 이식재로 제품에 포함된 분말과 용액을 혼합하여 골 결손부에 적용하게 된다. 기존에 자가골의 보관에 관한 연구 중 공기노출을 실험군에 포함하여 그것의 골 형성에 관한 조직학적 분석을 시행하였고 또한 저자들도 임상에서 이식재를 오염시킬 수 있는 다양한 요인 중에서 골이식재의 공기 중 노출가능성을 가장 흔한 요인으로 간주되어 본 실험을 진행하게 되었다.

본 논문의 목적은 ALLOMATRIX[®] INJECTBLE PUTTY를 가토의 두개관에 형성한 골 결손부에 이식재의 공기 노출시간을 달리하여 오염을 시킨 후 적용했을 때 골형성 정도의 차이를 평가하기 위함이다.

MATERIALS AND METHODS

1. 실험 재료

(1) 실험 동물

생후 6~12개월 된 체중 5 kg 내외의 토끼 12마리를 대상으로 하였다. 모두 동일 조건하에서 사육되었고, 건강 상태는 모두 양호하였다.

(2) 골이식 재료

WRIGHT사의 ALLOMATRIX® INJECTABLE PUTTY(Wright Medical Tech, Inc., Arlington, Tenn, USA) 1cc를 각각의 골 결손부에 적용하였다.

2. 실험 방법

(1) 마취

수술전 2% xylazine hydrochloride (3 mg/kg, Rumpun®; Bayer Vetchem-Korea Ltd., Seoul, Korea.)과 Zoletil®(Virbac S.A., Carros, France)를 1:1로 섞은 용액을 0.2 mL/Kg의 용량으로 근주하여 전신 마취를 유도한 후 임플란트 식립 부위의 출혈 방지와 동통 억제를 위해 2% hydrochloride lidocaine (1:100,000 Epinephrine, Yuhan Co. Ltd., Seoul, Korea)으로 침윤마취를 시행하였다.

(2) 대조군 및 실험군의 분류

12마리 토끼의 두개관의 정중앙 부위에 직경 4cm정도의 공간을 4분획으로 나누어서 각각 지름 8 mm, 깊이 2 mm의 결손부를 Trepine bur(3i, Biomet 3i TM, Florida, USA)를 이용하여 full thickness로 형성한 후 토끼를 기준으로 왼쪽 윗부분에는 아무것도 이식하지 않았고 오른쪽 윗부분은 ALLOMATRIX® INJECTABLE PUTTY 1 cc의 파우더를 개봉하여 공기 중에 3일 노출시킨 이

식재를, 오른쪽 아래 부분은 공기 중에 1일 노출시킨 이식재를, 왼쪽 아래 부분에는 공기 중에 1시간 노출시킨 이식재를 이식하였다. 또한 위에서 언급한 순서대로 대조군, 실험1군, 실험2군, 실험3군으로 설정하였고 이들 6 마리를 8주군으로 지정하였다. 다른 토끼 6 마리에도 같은 방법으로 실험군과 대조군을 설정 후 4주군으로 지정하였다.

(3) 골 결손부 형성

앞서 기술한 마취방법으로 전신마취 시행 한 후, 실험동물을 위치시키고 두개관 부위를 제모하고 포타딘으로 수술 부위부터 주변까지 소독한 후 소독된 구멍포로 방포하였다. 두개관 정중앙 부위에 세로 5 cm 가량의 절개를 가하고 조직을 견인하고 골을 노출시킨 후, 골막하 박리를 통해 두개관을 노출시켰다. 노출된 두개관을 앞에서 기술한 방법대로 4cm의 지름을 갖는 가상의 원을 4분획으로 나누어 각각의 부위에 trephine bur를 이용하여 지름 8mm 깊이 2mm로 형성하고 왼쪽 위를 대조군, 오른쪽 위를 실험 1군, 오른쪽 아래를 실험 2군, 왼쪽 아래를 실험 3군의 순서로 골이식을 시행하였다. 시술 후 골막은 4-0 흡수성 봉합사로 봉합을 시행하고, 피부도 4-0 흡수성 봉합사를 이용하여 층별 봉합을 시행하였다. 수술 부위의 감염 예방을 위해 술 후 5일 동안 1 mL gentamicin sulfate(0.1 ml/kg, Deasung Gentamycin inj., Deasung Microbiological Labs. Co., Ltd, Uiwangsi, Korea)를 하루 2 회 각각 2 cc씩 근주하였다. 4주군 실험은 최초의 8주군 실험 후 4주뒤 시행하였다.

(4) 실험 동물의 희생과 임상적 및 방사선학적 검사

실험 후 각각 4 주와 8 주의 치유기간을 허용한 후에 ketamine (Ketalar[®], Yuhan Co. Ltd., Seoul, Korea)의 과량 근주하여 투여로 동물을 희생시키고, 두개관 부위의 골편을 채취하였다.

3. 실험 평가

(1) 조직학적 평가

토끼를 희생시킨 후 주변골을 포함한 두개관 실험부위 블록 형태로 제거하였다.

제거된 시편은 즉시 10% 포르말린 용액에 넣어 고정하였다. 그 후 70%의 alcohol에 6 일간 고정하며, 이후 24 시간 동안 상온의 흐르는 물에서 세척하였다. 알코올 세척을 통해 탈수시킨 후 glycometacylate resin(spurr Low-viscosity Embedding media, Polyscience, PPA, USA)에 포매하였다. 중합시킨 시편을 high-precision diamond disc(Low speed diamond wheel saw 650, SBT, San clemente, CA, USA)를 사용하여 약 200 um 두께로 절단한 후 최종적으로 Lapping & polishing machine(OMNILAP 2000, SBT, San clemente, CA, USA)을 사용하여 30 um 두께로 연마하고, 각 시편당 2 개의 슬라이드를 제작하는데 골의 조직학적 통계계측을 위한 기본적인 염색법인 Villanueva osteochrome bone stain(San clemente, CA, USA)을 시행한 후 광학현미경(Olympus BX51, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

(2) 조직형태계측학적 평가

조직형태계측학적으로 신생골 형성정도(new bone formation area: NBFA)로 평가되었고 방법은 아래와 같다.

$$\text{New bone forming area(\%)} = (\text{New bone forming area/defect}) \times 100$$

(3) 통계학적 분석

통계학적인 분석은 SPSS v.17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용한 One-way ANOVA를 사용하였으며, P value이 0.05보다 작은 경우에 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

RESULTS

조직학적, 조직형태계측학적 결과(Fig. 1-8)

Fig.1~8에서와 같이 골 이식 후 실험1군, 2군, 3군 모두 염증세포 침윤의 특이한 차이 없이 신생골 형성을 보였다. 그러나 실험군의 전반적인 신생골 형성정도를 확인 했을 때 4주군과 8주군과의 유의한 골 형성의 차이는 확인할 수 없었다. (Table 1) 전반적으로 실험군 토끼에서 골 형성율이 낮은 것으로 판단된다. 통계학적 분석결과 p value (<0.05)를 기준으로 했을 때 그룹 간 혹은 4주군 8주군 간의 유의성이 없는 것으로 확인되었다.

Table 1. New bone formation area (NBFA) at 4 and 8 weeks after implant placement (Mean \pm SE)

Time period	Control	Experimental group1	Experimental group2	Experimental group3
4 weeks	19.38 \pm 6.5	14.58 \pm 4.3	24.93 \pm 8.1	18.58 \pm 7.2
8 weeks	16.13 \pm 4.6	13.57 \pm 2.3	15.57 \pm 2.5	21.05 \pm 7.1

There was no statistically significant difference among groups($p > 0.05$).

DISCUSSION

치과 임상에서 골 결손부를 수복하기 위해 사용되는 술식은 골유도재생술, 골신장술, 치조제 확장술 등으로 다양하고, 여기에 사용되는 골 이식재는 자가골, 동종골, 이종골, 합성골로 흔히 분류한다. 자가골은 골 기질 이외에도 골 형성을 유도시키는 세포를 포함하고 있어 골 재생을 기대할 수 있으나 제 2의 수술부위가 필요하고 채취 가능한 양도 제한되어 있어 동종골, 이종골, 합성골 등을 개발하게 되었다.^{1,2} 이중 동종골은 같은 종에서 채취한 골을 이용하는 방법으로 이를 조금 더 효과적으로 이용하기 위해 다양한 보관방법이나 처리방법이 제시되어 왔다.^{3,4} 동종골, 이종골은 임상에 적용하기 전 문제가 되는 부분은 질병전염인데 이에 관하여 논란의 여지는 있지만 WHO 권장내용에 따르면 이종골의 경우는 감염 가능성이 감지되지 않은 조직으로 분류되어 있다.⁵

동종골 채취와 보관하는 과정에서 생길 수 있는 세균 오염 발생을 줄이기 위하여 저장도 감마선, ethylene oxide, microwave 등의 다양한 방법이 적용되었다.⁶⁻⁸ 그러나 모든 멸균 방법은 근본적으로 동종골의 생물학적, 물리적 특성에 영향을 미칠 수 있다.^{6,7,9} 또한 이식재를 보관하는 환경은 이식재가 가지는 세포의 활성화나 보존에 많은 영향을 미친다. 예를 들면 보관 시 무균상태를 유지하기 위해 세팔로스포린과 같은 항생제를 사용하거나 보관기간을 6개월 이상 늘리기 위해 -40도 이하의 온도에서 보관하기도 한다. 6개월 이하의 기간은 -20 ~ -40도 정도의 온도에서 냉동보관이 허용된다.¹⁰ 냉동건조를 시행한 경우 신선 건조조직을 사용하는 경우에 비해서 면역 반응 및 전염성 질환의 이환 가능성을 줄일 수 있다.¹¹ 또한 건조 시의 온도가 높을 경우 골형성단백의 변성을 일으킬 수 있기 때문에 치과영역에서는 대부분 냉동건조법을 사용하고 있다.¹⁰ 이러한 냉동 혹은 건조하는 보관 이외의 동종골의 성격을 나눌 수 있는 요인은 탈회에 있다. 이러한 동종골은 탈회를 함으로써 물리적 강도는 약해지지만 골 치유 과정에서 흡수단계가 생략된 빠른 골 형성이 가능해진다. 반대로 비탈회골은 골이 치유되는 과정은 느릴 수 있지만 물리적 강도가 보장됨으로 더 안정적일 수 있다.¹² 이러한 처리과정도 골 이식재가 역할을 하는데 영향을 줄 수 있지만 골 이식재의 보관 역시 향후 골 재생

에 영향을 줄 수 있다. Rocha 등은 자가골을 저장함에 있어서 하악각 부위, 공기 노출, 생리식염수, 그리고 platelet poor plasma에 나누어 보관하여 골 형성을 조직학적으로 분석한 결과 공기 노출군의 경우 생리식염수와 platelet poor plasma보관군에 비해 낮게 형성된 골이식 부위를 보였다고 보고하였지만 하악각 부위에 보관한 대조군과 유의성이 없음을 보고하였다.¹³

이 등은 동종골의 형태에 있어 칩이나 분말의 형태로 되어있는 것을 동종골의 1세대로 칭했고 이후 수술 시 용이성을 위해 젤이나 분말반죽 형태로 제작되는 것을 2세대라고 하였는데 ALLOMATRIX®는 여기에 해당 된다고 할 수 있다.¹² 일반적으로 탈회된 동종골은 물리적으로 강도가 약해져 있어 형태의 형성이 용이하지 않고 이식재의 손실이 수반될 수 있다.¹⁴ 따라서 차폐막을 사용하는 등의 보수적인 술식을 동반하여 완전성을 더할 수 있다. 그러나 젤이나 퍼티의 형태로 시판된 이식재의 경우 이러한 부분에 있어 조작성이 높아져 차폐막의 이용을 좀 더 용이하게 하며 차폐막을 이용하지 않고 수복 형태를 자유롭게 조작함에 따라 시술 비용도 낮아지는 장점이 있다.¹⁵ 이러한 이식재는 임상에 적용하기 전 다양한 환경에 노출될 수 있으며 특수한 상황에서 이식재가 오염되는 경우가 생길 수 있다. 일반적으로 임상에서 사용되는 골대체재 제품들을 사용할 때 구강 내 적용하기 전 오염되는 경우는 많지 않다. 그러나 제품의 개봉 후 수복부위에 적용하기 전까지 공기에 노출되는 경우는 그 노출 시간에 따라 다양하고 정확한 요인을 알 수 없지만 Rocha 등의 연구에서 언급한 것처럼 저장 환경에 따라 골 형성의 차이가 생기기 때문에 이를 변수로 설정한 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

실제 이번 연구에서 결과로 본 ALLOMATRIX®의 공기노출의 영향은 없다고 판단된다. 그러나 4주, 8주간간의 그룹간 신생골 형성률의 평균값의 차이가 많지 않은 것으로 볼 때 실험 동물군들 자체가 실제로 골 형성 능력 정도가 낮았다고 판단되어 본 연구에서 변수로 설정한 요인을 결과로 확인하기에 어려운 측면이 있었다. 그 외에도 본 연구에서 설정된 공기노출은 앞에서 논의된 내용으로 봤을 때 실온의 보관의 측면으로 볼 수 있다. 공기노출 기간을 보관기간의 차원에서 보게 된다면 2~10도에서 항생제로 처리한 골 이식재의 유효기간이 5일이라고 기술한 이 등의 주장에 따랐을 때 노출시간을 시간단위로 정한 것이 실험 결과에 영향을 미치지 못했을 가능성이 있다. 또한 노출 온도나 조건에 크게 제한을 두지 않은

것도 결과를 정확히 예측 분석하기 어렵게 만든 요인이라고 사료된다. 실험결과를 분석하면서 논의된 내용에 따르면 동종골의 처리 온도와 보관환경이 동종골의 골 형성 능력에 영향을 미칠 수 있다고 사료된다.

CONCLUSION

본 연구에서는 ALLOMATRIX® 분말의 공기노출시간을 달리하여, 토끼 두개 관 골결손부에 이식하여 각 이식재의 골형성율을 분석하고, 골형성능이 공기노출에 의해 영향을 받는지를 규명하고자 하였다. 대조군과 실험 1, 2, 3군의 조직형태측정학적 결과는 실험 후 4주 및 8주 후, NBFA 값은 대조군과 실험군 모두에서 유의성이 있는 차이는 나타나지 않았으며, 모두 일정 수준 이상의 골형성이 관찰되었다.

위의 결과를 토대로 얻어진 결론은 토의 두개에 형성된 골 결손부에 있어 ALLOMATRIX® INJECTABLE PUTTY 분말 공기노출시간의 차이에 따른 골 형성율은 유의한 차이가 없다는 것을 확인했다. 하지만 분석방법을 달리하거나 임플란트 식립을 병행하는 것, 또는 다른 오염방법을 고려하게 될때 좀더 의미 있는 결과를 도출할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Kim KH, UM IW, Lee DK. Banked allogenic bone graft in oral and maxillfacial region: clinical review. *J Korean Oral Maxillofac Surg.* 1993;19:226-234.
2. Friedlaender GE. Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;174:58-68.
3. Wilson PD. Experience with a bone bank. *Ann Surg.* 1947; 126:932-946.
4. Bush LR, Garber CZ: The bone bank. *J Am Med Assn.* 1948; 137:588.
5. Public health issues related to animal and human spongiform encephalopathies: Memorandum from a WHO meeting.1992: Bulletin of the World Health Organization. No.70(2) 1183-190.
6. Jinno T, Miric A, Feighan J, et al. The effects of processing and low dose irradiation on cortical bone grafts. *Clin Orthop Relat Res.* 2000;375:275-285.
7. Thorén K, Aspenberg P. Ethylene oxide sterilization impairs allograft incorporation in a conduction chamber. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;318:259-264.
8. Dunsmuir RA, Gallacher G. Microwave sterilization of femoral head allograft. *Clin Microbiol.* 2003;41:4755-4757.
9. Simonian PT, Conrad EU, Chapman JR, et al. Effect of sterilization and storage treatments on screw pullout strength in human allograft bone. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;302:290-296.
10. Kagan RK. American Association of Tissue Banks Standards for Tissue Banking. 9th ed. Maryland. Printed in the USA.

1999:46.

11. Leslie HW, Bottenfield S. Donation, Banking, and Transplantation of Allograft Tissues. *Nursing Clinics of North America*. 1989;24: 891-905.
12. Lee EY, Kim KW, Um IW. Review Of Methods For Processing Allografts For Alveolar Bone Reconstruction. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2007;29:366-371.
13. Rocha FS, Batista JD, Zanetta-Barbosa D, [Dechichi P](#): Effect of different storage media on the regenerative potential of autogenous bone grafts: A histomorphometrical analysis in rabbits. *J Oral Implantol*. 2011 Sep 9
14. Jang HS, Kim SG, Moon SY, et al. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2011;33:420-424.
15. Babbush CA. Histologic evaluation of human biopsies after dental augmentation with a demineralized bone matrix putty. *Implant Dent*. 2003;12:325-332.

Figure legends

Fig. 1. Photomicrograph of 4 weeks control group

Histopathologic findings of the control group, 4 weeks after experiment. (A, scanning image, x12.5 ; B, higher magnification, x40. Villanueva osteochrome stain)

Fig. 2. Photomicrograph of 8 weeks control group

Histopathologic findings of the control group, 8 weeks after experiment. (A, scanning image, x12.5 ; B, higher magnification, x40. Villanueva osteochrome stain)

Fig. 3. Photomicrograph of 4 weeks Experimental group 1

Histopathologic findings of the experimental group 1, 4 weeks after graft. (A, scanning image, x12.5 ; B, higher magnification, x40. Villanueva osteochrome stain)

Fig. 4. Photomicrograph of 8 weeks Experimental group 1

Histopathologic findings of the experimental group 1, 8 weeks after graft. (A, scanning image, x12.5 ; B, higher magnification, x40. Villanueva osteochrome stain)

Fig. 5. Photomicrograph of 4 weeks Experimental group 2

Histopathologic findings of the experimental group 2, 4 weeks after graft. (A, scanning image, x12.5 ; B, higher magnification, x40. Villanueva osteochrome stain)

Fig. 6. Photomicrograph of 8 weeks Experimental group 2
Histopathologic findings of the experimental group 2, 8 weeks after graft. (A, scanning image, x12.5 ; B, higher magnification, x40. Villanueva osteochrome stain)

Fig. 7. Photomicrograph of 4 weeks Experimental group 3
Histopathologic findings of the experimental group 3, 4 weeks after graft. (A, scanning image, x12.5 ; B, higher magnification, x40. Villanueva osteochrome stain)

Fig. 8. Photomicrograph of 8 weeks Experimental group 3
Histopathologic findings of the experimental group 3, 8 weeks after graft. (A, scanning image, x12.5 ; B, higher magnification, x40. Villanueva osteochrome stain)

사진부도

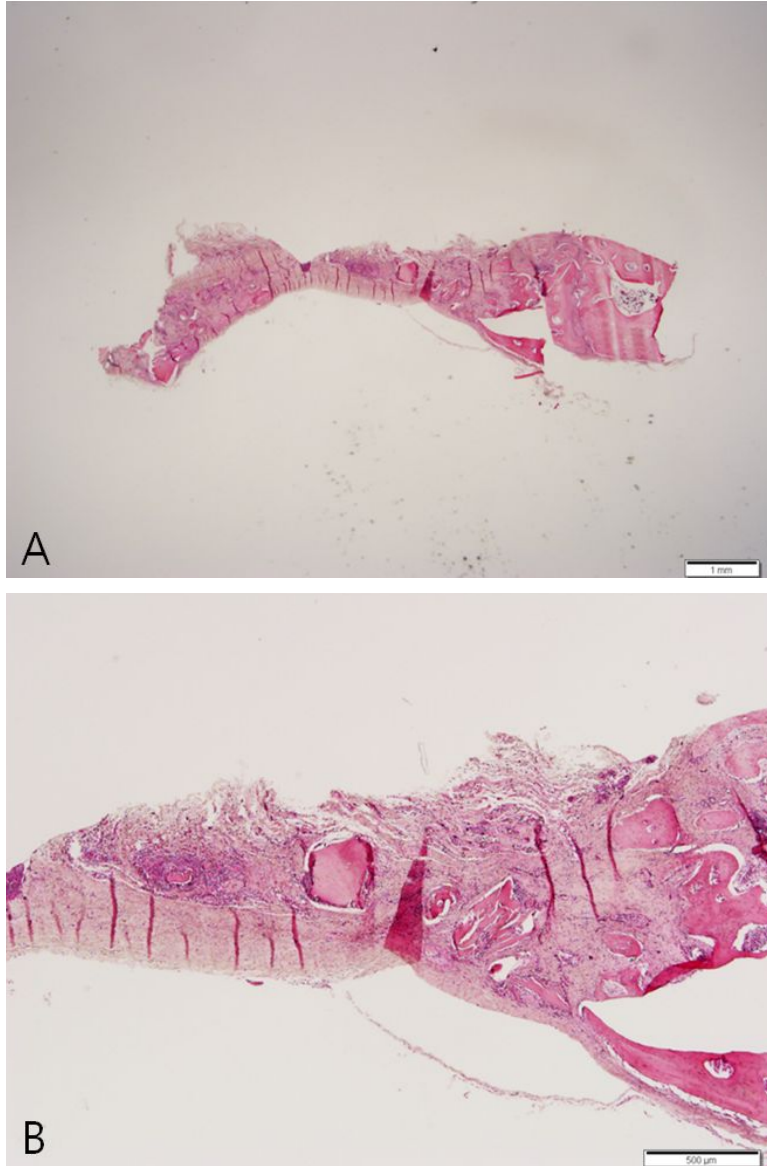


Fig. 1. Photomicrograph of 4 weeks control group

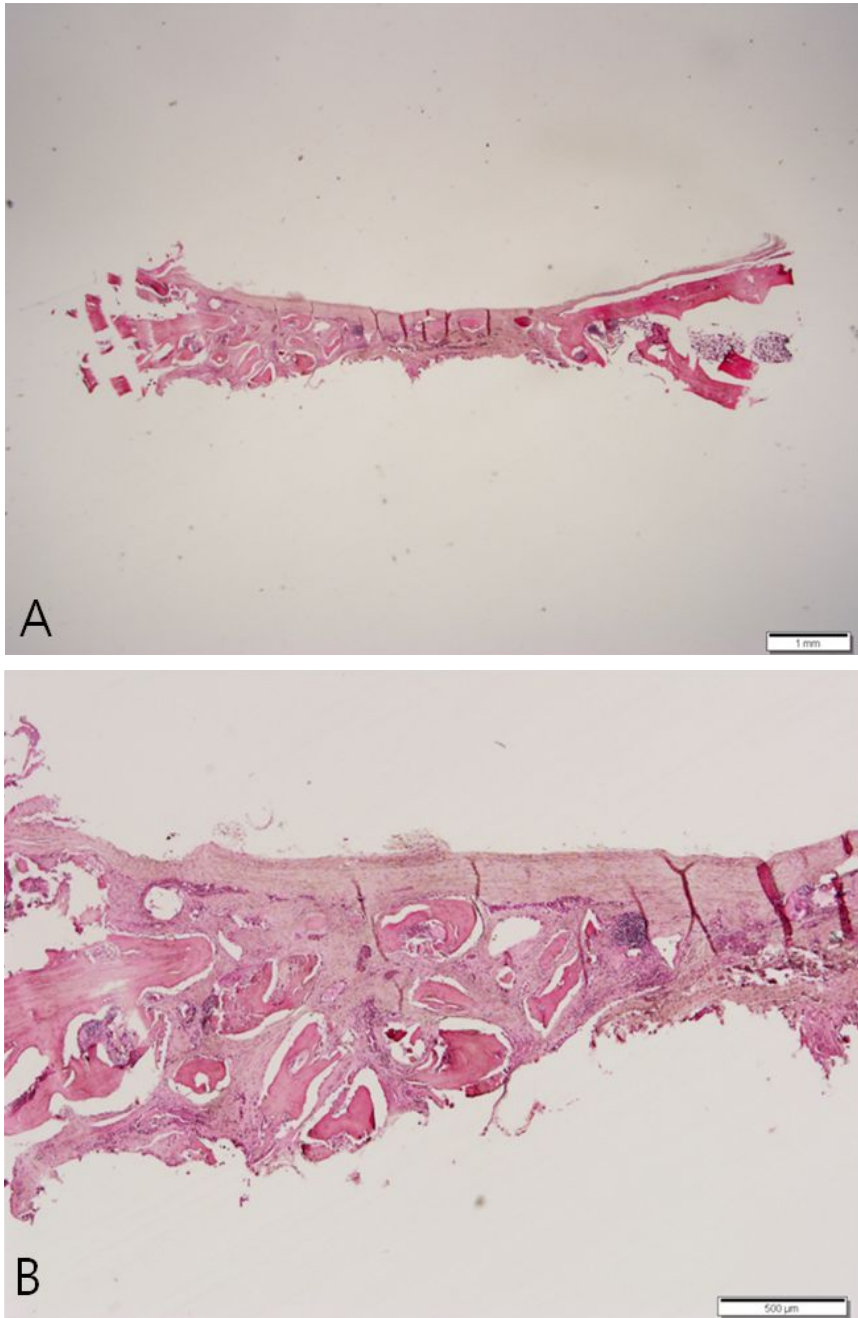


Fig. 2. Photomicrograph of 8 weeks control group

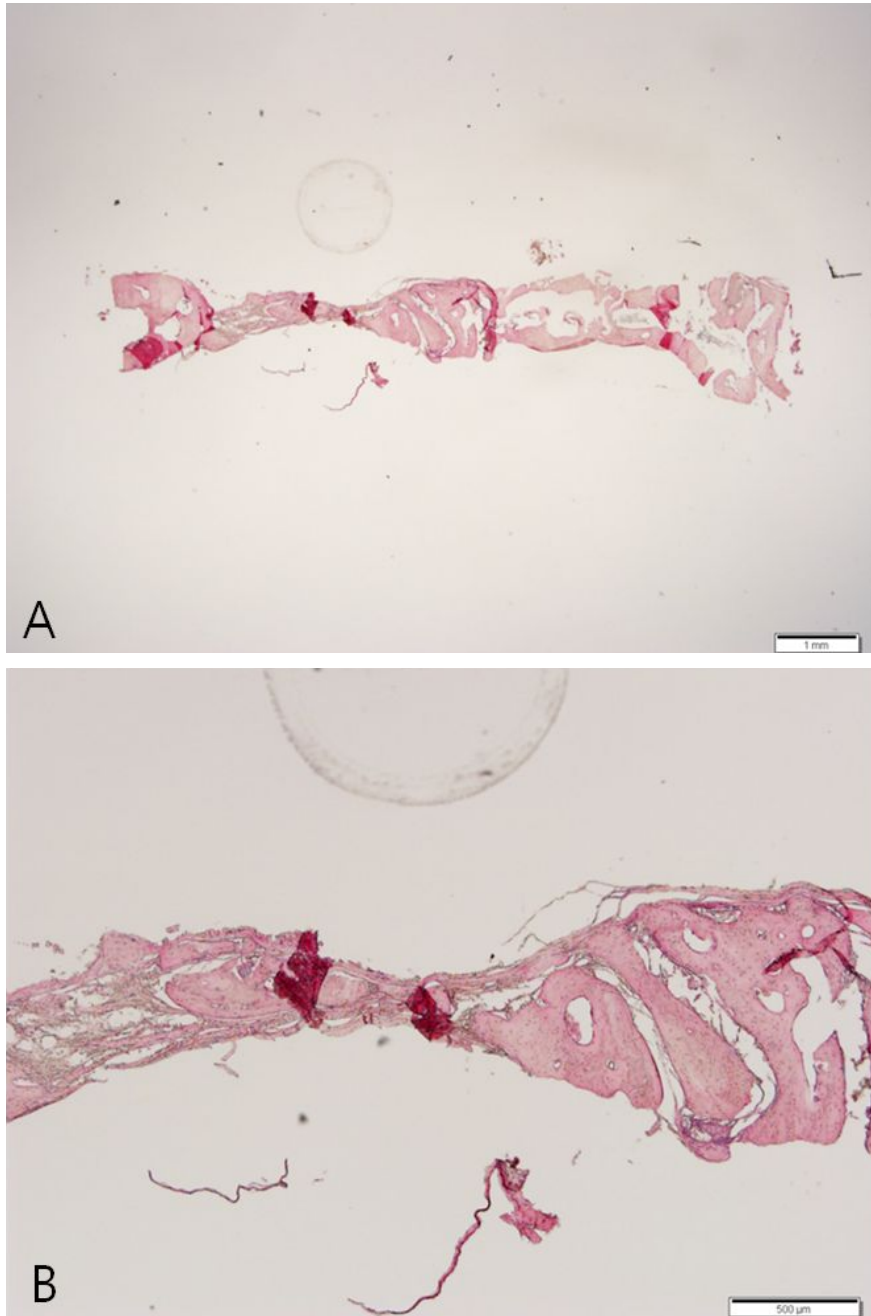


Fig. 3. Photomicrograph of 4 weeks Experimental group 1

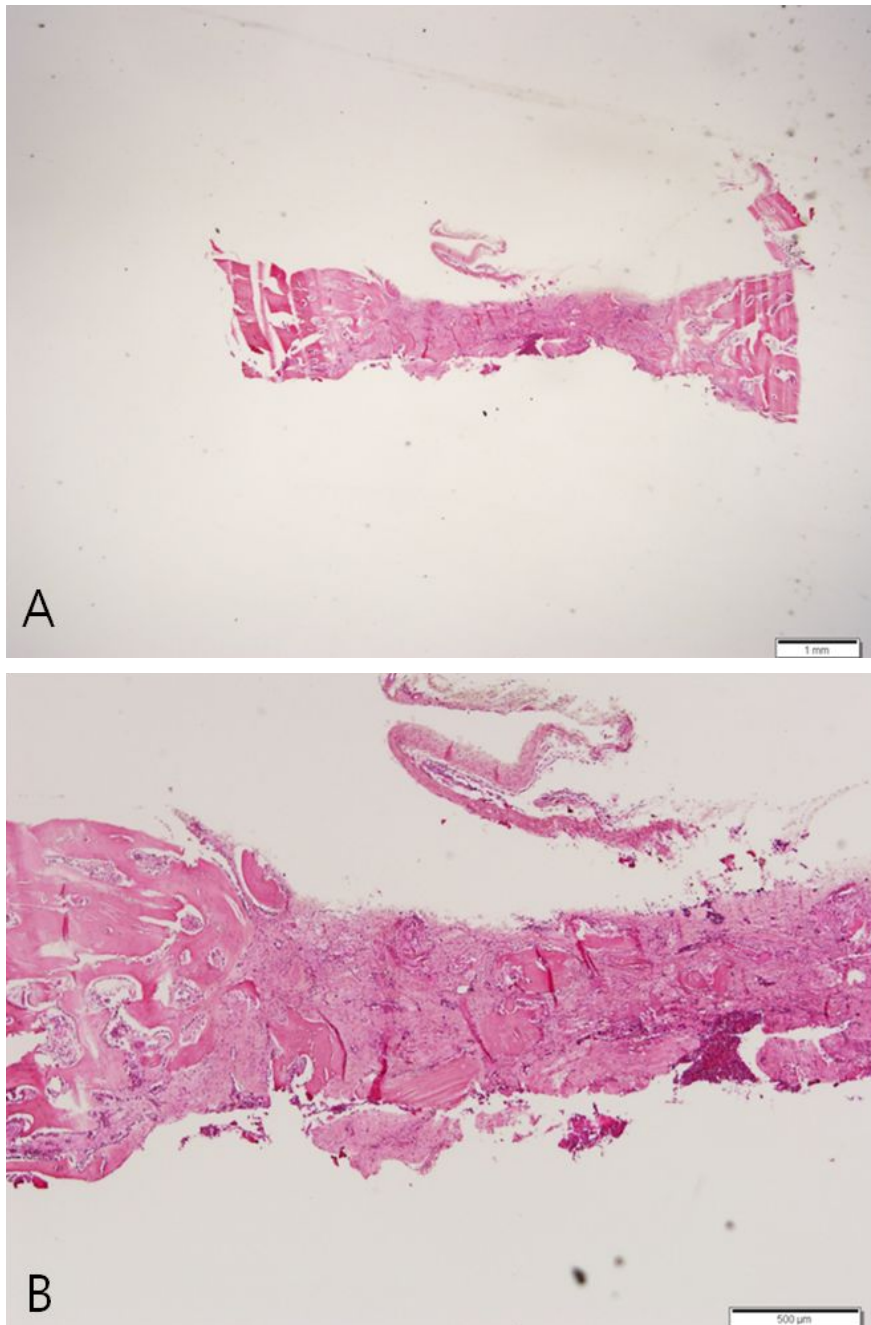


Fig. 4. Photomicrograph of 8 weeks Experimental group 1

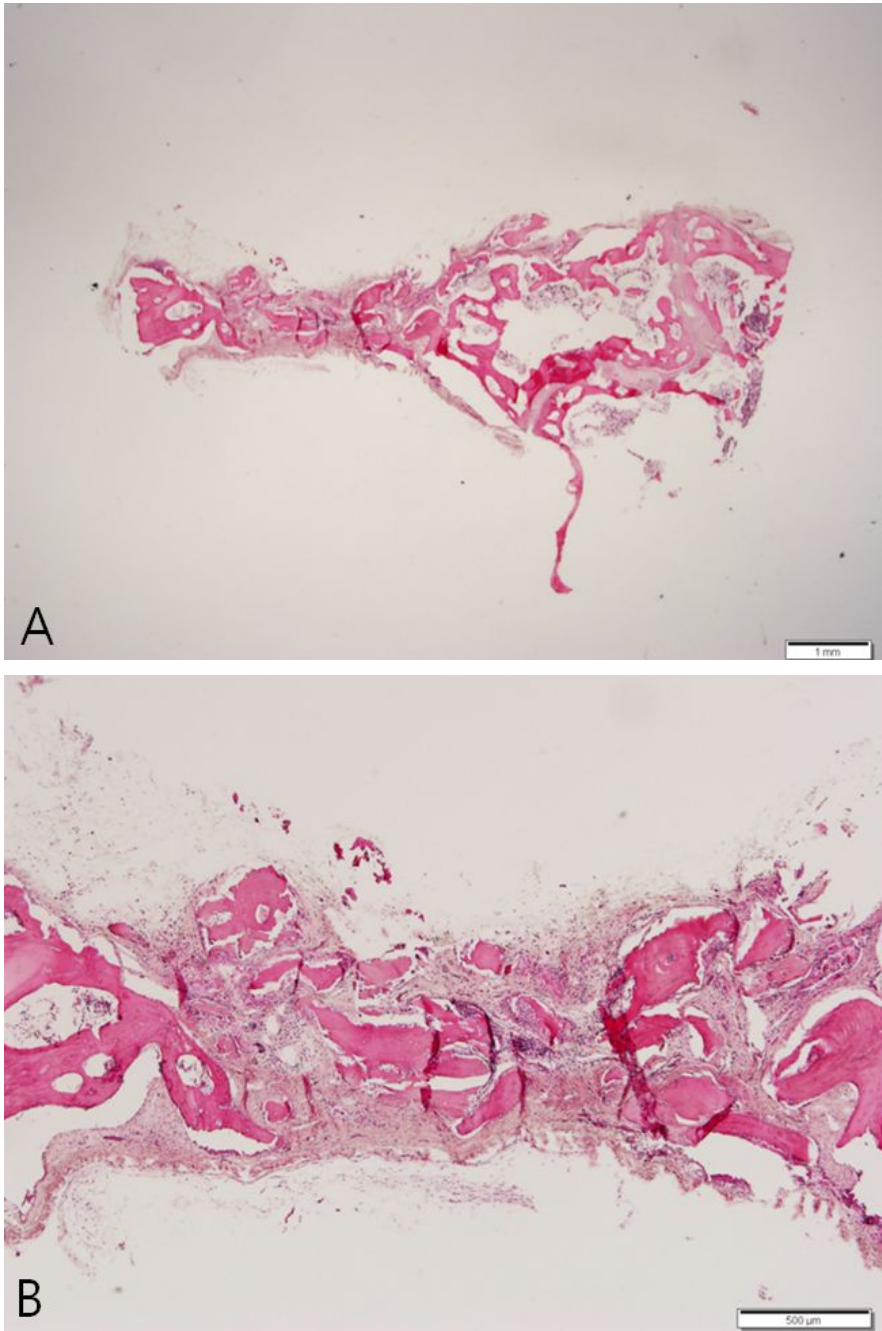


Fig. 5. Photomicrograph of 4 weeks Experimental group 2

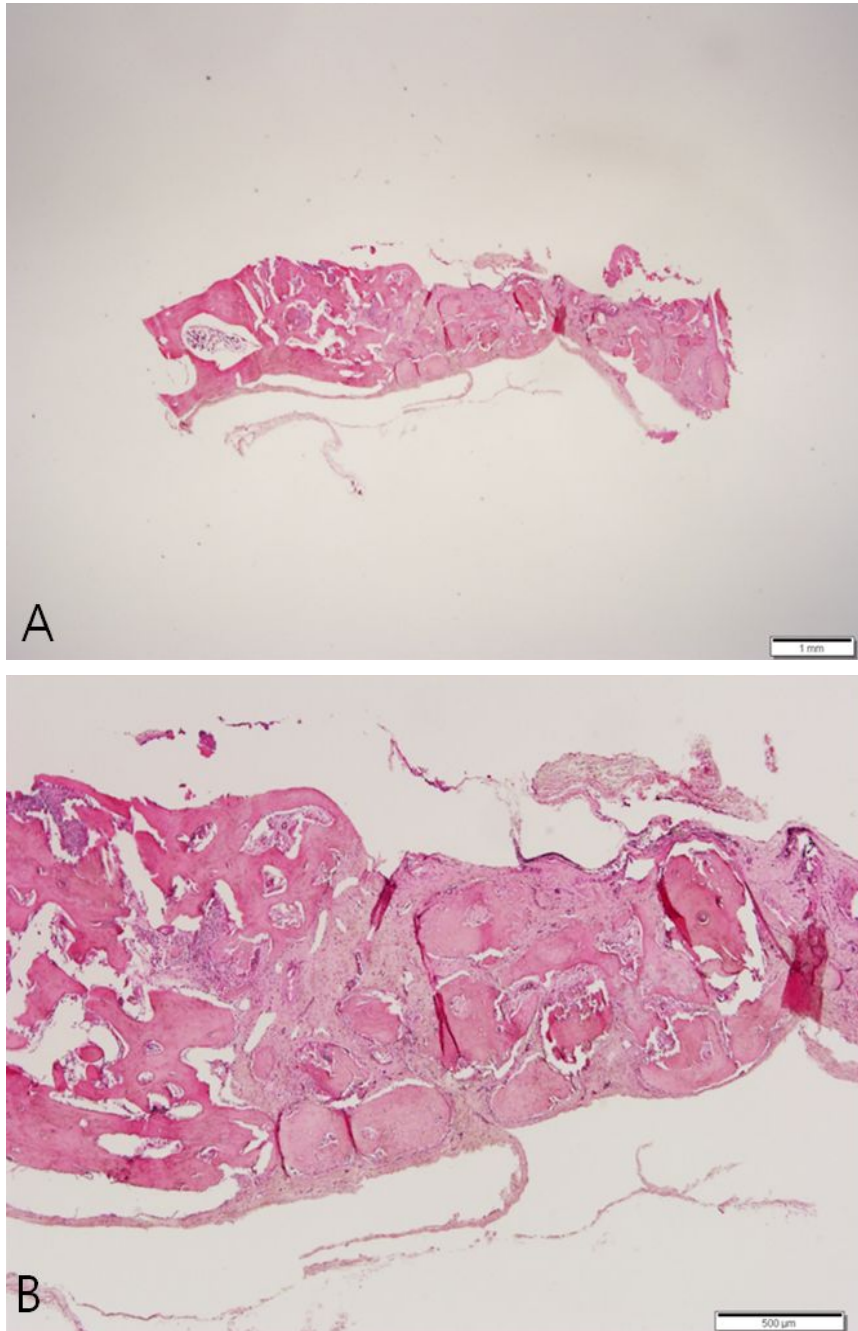


Fig. 6. Photomicrograph of 8 weeks Experimental group 2

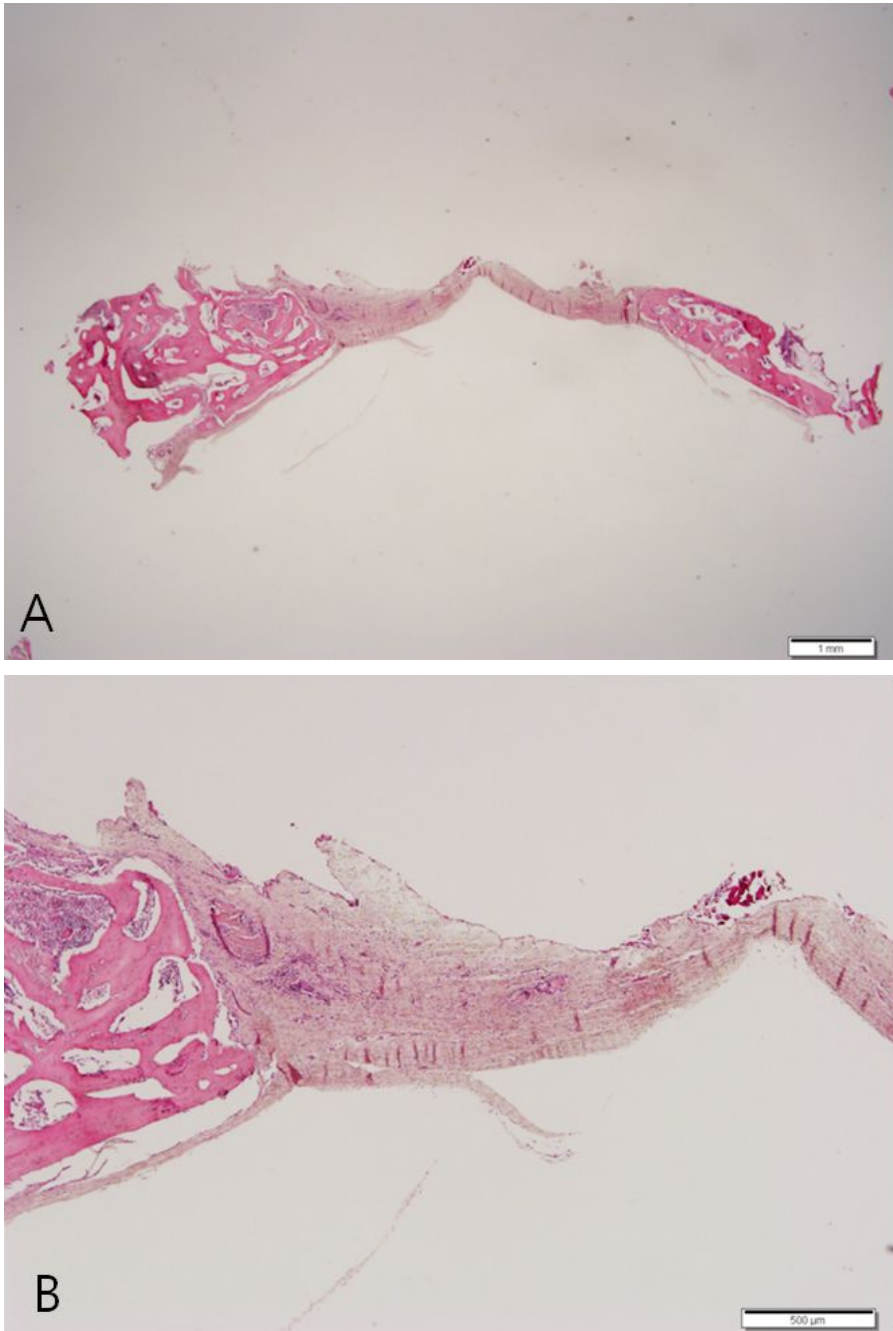


Fig. 7. Photomicrograph of 4 weeks Experimental group 3

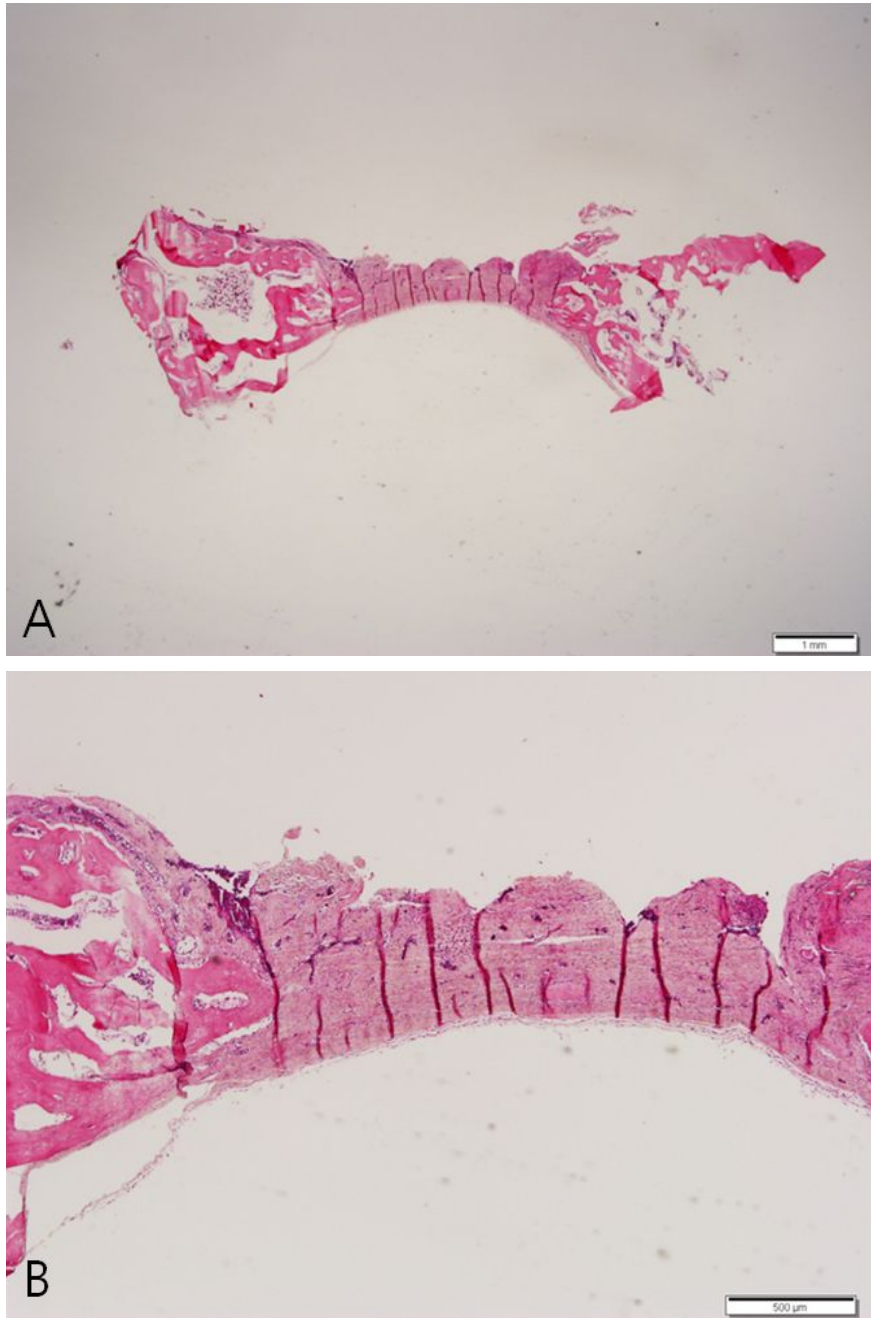


Fig. 8. Photomicrograph of 8 weeks Experimental group 3