

# 자동 영상분석 계기를 이용한 골 유도재생능력의 분석에 관한 조직계측학적 연구

김태일 · 구영 · 류인철 · 정종평 · 한수부 · 최상목 · 손성희

서울대학교 치과대학 치주과학 교실

## I. 서론

치주질환은 진행됨에 따라 부착상실과 치조골 소실이 나타나게 되어 궁극적으로 치아상실에 이르게 된다<sup>1)</sup>. 이같은 치주질환을 치료하기 위해서는 치석제거술, 치근면활택술 등의 비수술적 치료방법과 치주판막술 등의 수술적 치료방법을 시도하여 치주조직과괴를 정지시키고, 부착상실을 회복하며, 상실된 치조골을 재생시키기 위해서는 골이식술 및 인공적인 차폐막 시술, 성장인자들의 복합적인 투여 등이 시행되고 있다<sup>2, 3, 4)</sup>.

치료전 질병에 이환되었던 치주조직과 치료후 개선된 치주조직간의 비교는 치은지수, 치태지수, 치주낭 깊이 등의 측정으로 치주조직의 건강도와 부착증대량을 평가한다. 그런데, 치조골 재생의 경우, 치료전후의 염증세포의 분포정도 및 치조골의 분포 정도를 정성적으로 평가하는 방법이 많이 사용되었는데 이것으로는, 시술방법이나 재료가 구체적으로 치주조직의 치유에 어느 정도의 영향을 주었는가에 대한 정보를 주기에는 미흡한 형편이었다.

골재생량을 정량적으로 분석하는 것은 이전의 정성적인 분석법에 비해 실험자간의 숙련정도 및 피로도에 따라 오류가 발생할 가능성을 줄여주고, 분석 및 진단시 정확도를 증가시켜주며, 일정하게 약속된 범주에 따라 분류하게 되므로 술식 및 재료의 차이에 따른 비교를 하기에 용이한 장점을 지닌다<sup>5)</sup>. 이와 같은 골재생의 정량분석법으로는 조직계측법(Histomorphometry), 방사선 계측법(Radiomorphometry), 생화학분석법(Biochemical analysis), 방사선 탐사 미세분석법(X-ray probe microanalysis), 주사전자현미경 산란법(Scanning electron microscope backscatter) 등이 있다<sup>6)</sup>.

방사선계측법은 방사선사진을 촬영하여 이들의 방사선 흑화도를 측정하는 방법으로, 조직학적 시편을 이용하여 정량분석을 하는 조직계측법의 보조역할을 한다. 생화학분석법은 다양한 생화학적 검사를 실시하여 시편내에 포함된 성분을 검사하여 계량하는 방법으로, 다수의 내재성 숙주요인과 신생골을 기존골로부터 분리하여 계량하는 것이 난해하다. 방사선 탐사 미세분석법은 방사선 조사시 개개

\* 본 논문은 1994년도 서울대학교 병원 지정 공동연구비의 지원에 의하여 이루어 졌음

의 원소마다 산란되는 양상이 특징적인 점에 착안하여 도입된 방법으로 Cameron<sup>12)</sup> 등을 이를 이용해 백서의 대퇴골에서 피질골을 분석하였다고 보고한바 있으나, 아직은 초보적인 단계이다. 주사전자현미경 산란법은 주사전자현미경하에서 산란되는 전자들로 각각의 원소들을 계량하는 방법으로, 원소 수준의 정량에 쓰이고 있다<sup>13)</sup>.

조직계측법은 1847년 Delesse<sup>7)</sup>가 시도한 이후, 현재 3가지 방법으로 나누어 진다. 첫째는, 현미경에 격자판을 얹어서 수작업으로 계산하는 방법으로 수작업으로 계산이 행해지기에 장시간의 작업과 피로로 인한 오류발생 가능성이 있다. 이후 격자를 사용하되 수작업 대신 디지털 평판(digitizing pad)을 사용하여 계산하는 방법이 도입되어 오류발생가능성을 줄였고, 마지막으로 전과정을 컴퓨터와 영상분석 프로그램을 이용하여 처리하는 방법이 있다<sup>5)</sup>.

본 연구는 골재생량의 정량적 측정을 위해 전과정을 컴퓨터와 영상분석 프로그램을 이용한 조직계측법을 실시하여, 치조골 재생술식 비교평가에 어떠한 유용성이 있을지 알아보고자 시행하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### (1) 실험동물

가. 비글견(Beagle dog)

체중 13kg 내외의 치주적으로 건강한 생후 18개월된 4마리의 비글견(Marshall Farms USA, Inc., New York, USA)을 택하여, 실험 전 2주간의 적응기간을 갖게하고, 고품사료(서현 초이스, 서현축산, 한국)를 먹게 하였다.

나. 백서(Sprague-Dawley rat)

생후 2-3개월된 체중 300-350mg의 건강한 백서 8마리를 사용하였다.

#### (2) 동물실험재료

사용한 생분해성 차폐막은 폴리글라이콜산과 폴리락트산을 주성분으로하여, 약물을 함유하지 않은 생분해성 차폐막과 PDGF-BB가 함유된 생분해성 차폐막을 사용하였다.

#### (3) 조직계측분석기구

광학현미경(Olympus BH-2, Olympus Co., Tokyo, Japan)에 CCD 카메라(ITC-47, Ikegami Tsushinki Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 부착하여 영상저장장치(frame grabber)(DT-55, Data translation Inc., USA)로 컴퓨터와 연결하여 조직의 현미경상을 아날로그에서 디지털로 변환시킨 후 영상분석 프로그램인 Global Lab Image Analysis System(Data translation Inc., Malboro, MA., USA)을 사용하였다.

## 2. 실험방법

#### (1) 동물수술

가. 비글견

상악 좌우 제 2 소구치를 실험대상으로, 2% 염산자일라진액(Rompun, 한국 바이엘, 서울, 한국) 15mg/kg을 정맥주사하여 전신마취후 수술부위에는 에피네프린(1:100,000)이 포함된 2%염산 리도케인(유한양행, 서울, 한국)으로 국소마취하였다.

그 후, 치은열구 절개를 한 후 실험대상치의 협측에 전충판막을 만들고, 연조직을 제거한 다음 다이아몬드 절삭용 바와 치줄을 이용하여 협측치조골에 백악법랑경계부에서 치근방향으로 4mm 길이를 가지는 2급 치근이개부를 형성하여 실리콘 인상재(Provil, Bayer dental, Lever Kusen, Germany)를 결손부에 넣고 봉합하여 만성염증상태를 유지한다.

결손부 형성 1개월 후, 전충판막을 형성하여 실리콘 인상재를 제거하고 치근면활택술을 실시한 후 노출된 결손부의 최하방점을

기준으로 정하기 위해 round bur로 잔존 치조골과 같은 높이에다 기준홈을 형성하였다.

그 후 실험군의 비글견의 대상치아에 PDGF-BB가 함유된 차폐막을 매식고정하고, 대조군의 비글견의 대상치아에는 약물이 함유되지 않은 차폐막을 매식하여, 수직누상부합으로 판막을 피개하였다.

매식 수술 2주, 5주 후에 2% 염산 자일라진 주사액(Rompun, 한국 바이엘, 서울, 한국)을 정맥주사하여, 전신마취시킨 후 경동맥을 통해 10% 중성 포르말린 완충용액을 주입하여 관류고정시킨 후 희생시키고, 3주간 10% 중성 포르말린 완충용액이 담긴 용기속에 보관하였다.

#### 나. 백서

백서를 Entobar(한림약품, 서울, 한국)을 복강주사(30mg/kg)하여 마취한 후, 두부의 털을 깎고 백서의 머리를 두부 고정기(cephalostat)로 고정하였다. 0.5% chlorhexidine으로 수술부위를 소독하고, 소량의 2% lidocaine HCl(1 : 100,000 epinephrine)으로 침윤마취시킨 후, 전두골 전방부에서 후두골 후방부까지 정중부를 따라 절개하고 두개골을 노출시켰다. 편측 측두골에 trephine bur(3i Implant Innovations Inc., West Palm Beach, FL, USA)를 사용하여 뇌막에 손상을 주지 않도록 하면서 직경 5mm의 원형 결손부를 형성하였다.

그 후 실험군 백서의 결손부에는 PDGF-BB가 함유된 차폐막을 위치시키고 대조군 백서의 결손부에는 약물이 함유되지 않은 차폐막을 위치시킨 후, 두피를 덮어 봉합하였다. 차폐막 매식수술 1주, 2주째 실험동물을 희생시키고 두개골을 절제한 후 10% 중성 포르말린 완충용액이 담긴 용기 속에 보관하였다.

#### (2) 조직시편제작

고정된 조직을 Donath와 Breuner가 기술한 방법에 따라 비탈회 표본을 제작하였다<sup>8)</sup>. 먼저 치근의 정중부를 중심으로 협설측 방향으

로 좌우를 Exakt-cutting grinding system(Exakt-Apparateb, Hamburg, Germany)를 이용하여 시편두께가 2-3mm되게 절단하였다. 통법에 따라 탈수시킨 후, 메틸메타아크릴레이트를 이용하여 포매하여 중합시켜 블록을 얻었다. 블록을 적당한 부위까지 연마한 다음 그 반대편도 처음면과 평행하게 연마한 후 플라스틱 슬라이드에 시아노아크릴레이트로 접착시키고 압력을 가한 상태로 24시간 두었다. 이렇게 연마한 블록이 붙은 슬라이드를 Exakt-cutting grinding system(Exakt-Apparateb, Hamburg, Germany)로 연마하여 슬라이드면과 블록의 반대면이 완전히 평행이 되게 하였다. 또 다른 플라스틱 슬라이드를 Exakt-precision adhesive system을 이용하여 블록이 붙은 슬라이드와 평행하게 시아노아크릴레이트로 고정하여 블록을 사이에 두고 고정된 평행한 두 개의 슬라이드를 얻었다. 이렇게 고정된 슬라이드를 Exakt-cutting grinding system(Exakt-Apparateb, Hamburg, Germany)을 사용하여 두께가 약 100 $\mu$ m 되게 절단하여 Exakt-micro grinding system에 800, 1200, 2500, 4000 사포를 차례로 이용하여 연마하고 최종적으로 두께 20 $\mu$ m의 매끈하고 얇은 표본이 얻어지게 하였다. 연마 후 toluidine blue와 multiple 염색법으로 염색 후 광학 현미경(Olympus BH-2, Olympus co, Tokyo, Japan)으로 조직조건을 관찰하였다.

#### (3) 조직계측분석

영상저장장치에서 받아들인 조직표본의 현미경상이 256 gray level을 가지는 640×480화소의 디지털 영상으로 모니터상에 나타나게 되어, 이것을 영상분석프로그램인 Global lab image(Data translation Inc., Malboro, MA, USA)를 사용하여 조직계측을 하게 되는데, 자세한 과정은 다음과 같다.

먼저, 현미경상의 조직계측치의 기본단위를 화소단위에서 밀리미터 단위로 변환하여 표현하기 위하여 1mm 눈금의 모눈종이를 슬라

이드에 얹어서 CCD 카메라(ITC-47, Ikegami Tsushinki Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 통해 컴퓨터 모니터상에 나타나도록 하였다. 그 다음, Global lab image의 메뉴중 Calibration 항목을 택하여 화소상의 모서리 네 곳을 밀리미터로 대응시켰다.

이제, 조직표본의 영상을 모니터상에 나타나도록 한후, capture 하여 화면을 고정시켰다. particle 메뉴를 선택한 다음, 신생골 부위를 ROI(Region of Interest)로 선택하고, gray level threshold range를 적절히 지정하여 원하는 신생골 부위가 선택하도록 한 다음, find particle 명령을 내려서, 자동적으로 선택한 부분의 신생골 면적을 계산해내었다.

### III. 결 과

#### 1. 비글견

2주째, 5주째의 실험군과 대조군의 신생골에 대한 조직계측분석치는 표 1에 나타난 바, 2주째에 실험군은 0.03123mm<sup>2</sup>, 대조군은 0.03012mm<sup>2</sup>을 보였고, 5주째에는 실험군이 0.15324mm<sup>2</sup>, 대조군은 0.09123mm<sup>2</sup>을 보였다.

사진 1은 5주째 PDGF-BB를 함유한 차폐막이 매식된 비글견의 치조골재생량을 계측한 화면이며, 사진 2는 5주째 약물을 함유하지 않은 차폐막이 매식된 비글견의 조직계측을 한 화면이다.

PDGF-BB를 함유한 차폐막이 더 우수한 치조골 재생량을 보이고 있다.

table 1 비글견 대상치아의 신생골 형성량(mm<sup>2</sup>)

	2 주	5 주
실험군	0.03123	0.15324
대조군	0.03012	0.09123



Fig 1 D : 상아질 , NB : 신생골, OB : 기존골

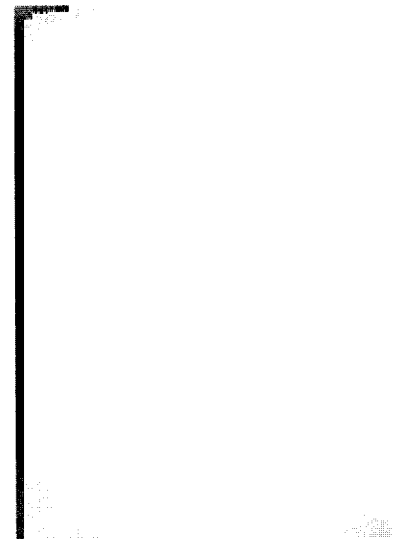


Fig 2 D : 상아질 , NB : 신생골, OB : 기존골

#### 2. 백 서

1주, 2주째의 실험군과 대조군의 신생골의 조직계측분석치는 table 2에 나타나 있는 바, 1주째에 실험군은 0.20448mm<sup>2</sup>, 대조군은 0.03604mm<sup>2</sup>을 보였고, 2주째에는 실험군, 대조군이 각각 0.46349mm<sup>2</sup>, 0.17741mm<sup>2</sup>을 보였다.

table 2 백서 두개골의 신생골 형성량(mm<sup>2</sup>)

	1 주	2 주
실험군	0.20448	0.46349
대조군	0.03604	0.17741

Fig 3 NB : 신생골, OB : 기존골

Fig 4 NB : 신생골, OB : 기존골

Fig 3은 PDGF-BB 가 함유된 차폐막을 사용한 2주 뒤, 백서 두개골 재생량을 자동 영상분석 계기로 분석한 모습이며, Fig 4는 약물이 함유되지 않은 차폐막을 사용한 2주 뒤, 백서 두개골 재생량을 자동영상분석계기로 분석한 모습이다. 약물이 함유되지 않은 차폐막에 비해 PDGF-BB를 함유한 차폐막이 더 많은 양의 골재생을 보이고 있다.

## IV. 총괄 및 고안

조직계측법에는 크게 나누어 3가지 방법이 있다고 서론에서 밝힌 바, 그 중 본 연구에 적용한 전과정을 컴퓨터와 영상분석 프로그램을 이용하여 처리하는 방법은 실험자에 기인하는 오류의 발생이 없이, 조직학적인 시편 내의 광학현미경상의 해상도가 허락하는 범위 내에서 관찰되는 모든 물체에 대해 수량, 길이와 면적 등의 정량화된 정보를 주는 장점을 가지고 있다<sup>6)</sup>.

특히, 골에 대한 조직계측법에서 중요한 부분은 조직의 유지고정과 적절한 시편의 두께이다. 조직의 유지와 고정을 위해서는 사용되는 고정액의 pH와 삼투압 및 고정시간을 일정하게 유지하도록 주의하면서 비탈회표본을 제작하여야 한다. 시편의 두께도 일정하게 얇아야 Holmes effect를 줄이면서 정확한 조직계측이 가능하게 된다. 권장되는 시편의 두께는 4.5-5 $\mu$ m이다<sup>6)</sup>. 본 실험에서는 조직의 유지고정시 유의할 점을 충분히 숙지하고 시편을 다루어서 유지고정시 별다른 문제가 발생하지는 않았으나, 시편의 두께를 20 $\mu$ m이하로 균일하게 만들기가 용이하지 않아서, 20 $\mu$ m 선을 유지하였다.

일반적으로 치조골의 재생량을 비교하는 방법에는 시기적으로 차이를 두어 현상한 두장의 방사선 사진을 이용한 계수공제영상 방사선 측정법<sup>9, 10, 11)</sup>도 쓰이고 있다. 특히, Vos 등은 알루미늄 블록을 사용한 계수공제영상 방사선 측정법을 사용하여 골의 부피변화를 확인하려고 시도하였고,<sup>14)</sup> Braegger 등은 CADIA (computer-assisted densitometric image analysis) 수치를 골의 칼슘함유량에 대응시켜 분석하였다고 보고하였다<sup>15-17)</sup>.

그러나, 방사선 사진촬영시 정확한 각도를 유지하는 장치제작의 어려움과 현상시 필름 개개의 조건이 다른 점, X선 산란선에 의한 오류발생<sup>18)</sup> 및 비디오카메라와 디지털 변환기

에서 발생하는 노이즈(noise)<sup>19)</sup>로 인해 정량화한 데이터를 산출하기에 어려울 수도 있는 단점이 있다.

컴퓨터로 자동화시킨 방사선 계측법은 본 연구에서 사용한 자동화된 조직계측법과 원리는 같으나, 받아들이는 화상이 조직의 현미경상이 아닌, 사물의 방사선 사진상이라는 것이 다르다. 따라서, 조직표본을 제작하는데 필수적인 희생작업을 생략할 수 있는 장점이 있다. 그렇지만, 현미경만큼 미세한 구조와 측정단위를 나타내지는 못한다. 따라서, 조직계측법의 시행전에 대략적인 골재생량을 살펴보고자 할 때나, 실험동물을 희생시키기 전에 골재생량을 보고자 할 때에 조직계측법을 보조하는 수단으로 사용될 수 있다고 하겠다.<sup>6)</sup>

이전에 보고된 치조골의 조직계측법은 부피와 밀도로 보고하였는데, 본 연구에서 굳이 면적을 택한 이유는 부피계산을 위해서 조직시편의 두께를 4.5-5 $\mu$ m로 균일하게 유지해야 Holmes effect를 줄일 수 있는데, 20 $\mu$ m 이하를 얻기가 곤란하였기 때문이다.

본 연구에서 나타났듯이, 골재생량을 면적으로 계산하여 나타낸 결과, 정량화된 데이터의 산출로 말미암아 치료술식의 효과를 구체적인 단위로 평가할 수 있었다. 따라서, 실험대상의 수를 증가시켜 표본수를 늘리고, 여러 종류의 치료술식을 시행한다면 통계적인 분석까지 가능해져서, 향후 치조골 재생술식 및 재료간의 효과분석에 유용할 것으로 기대한다.

## V. 결론

컴퓨터와 영상분석 프로그램을 이용한 조직계측법이 치조골재생술식의 결과평가시에 유용성이 있을지 알아본 결과, 신생골의 면적이 절대단위(mm<sup>2</sup>)로 표기가 되어 객관적이고 구체적인 골재생량을 파악하는데 효과적인 방법이라는 결론을 얻었다.

## 참고문헌

1. Carranza, F.A. Jr., and Newman, M.G. : "Clinical Periodontology", 8th ed., W.B. Saunders, 1996.
2. Gara, G.G., and Adams, D.F. : "Implant therapy in human intrabony pockets : A reivew of the literature", J. West. Soc. Periodontol. 28 : 32, 1981.
3. Ellegarrd, B., Karring, T., and Loe, H. : "New periodontal attachment procedure based on retardation of epithelial migration", J. Clin. Periodontol. 1 : 75, 1974.
4. Polson, A.M., Heijl, L.C. : "Osseous repair in intrabony periodontal defects", J Peiodontol. 5 : 13, 1978.
5. Hollinger, J.O., Buck, D., and Schmitz, J.P. : "Quantitative light microscopy : A powerful tool to assess bone", Clin. Plast. Surg. 21 : 463-475, 1994.
6. Habel, M.B., and Reddi, A.H. : "Bone graft & bone substitutes", W. B. Saunders, 1992.
7. Delesse, A. : "Procedure mecanique pour determiner la composition des roches", Ann Mines 13 : 379-388, 1848.
8. Donath, K., and Breuner, G.A. : "A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue" J. Oral Pathol. 11 : 318-326, 1982.
9. Braegger, U. : "Digital imaging in periodontal radiography : A review" J. Clin. Periodotol. 15 : 558-564, 1988.
10. Braegger, U., and Pasquali, L. : "Color conversion of alveolar bone density changes in digital subtraction images" J. Clin. Periodontol. 16 : 209-214, 1989.
11. Douglas, K.B. : "A review of the

- reliability of radiographic measurement in estimating alveolar bone changes" *J. Clin. Periodontol.* 17 : 14-21, 1990.
12. Cameron, R.H., Colflesh, D.E., and Dewey, M.M. : "Electron probe x-ray microanalysis of cortical bone from adult mice" *J. Histotechnol.* 12 : 23-27, 1989.
  13. Holmes, R.E., Hagler, H.K., and Coletta, C.A. : "Thick section histometry of porous hydroxy apatite implants using backscattered electrons imaging" *J. Biomed. Mater. Res.* 21 : 731-739, 1987.
  14. Vos, M.H., Janssen, P.T.M., Van Aken J., and Heethaar, R.M. : "Quantitative measurement of periodontal bone changes by digital subtraction" *J. Periodont. Res.* 21 : 583-591, 1986.
  15. Braegger, U., Pasquai, L., Rylander, H., Carnes, D. and Kornman, K.S. : "Computer assisted densitometric image analysis in periodontal radiography. A methodological study" *J. Clin. Periodontol.* 15 : 27-37, 1988.
  16. Braegger, U., Pasquai, L., Weber, H. and Kornman, K.S. : "CADIA for the assessment of alveolar bone density changes in furcation" *J. Clin. Periodontol.* 16 : 46-52, 1989.
  17. Braegger, U., Litch, J., Pasquai, L. and Kornman, K.S. : "Computer assisted densitometric image analysis for quantification of radiographic alveolar bone changes" *J. Periodont. Res.* 22 : 227-229, 1987.
  18. Zubery, Y. : "Computerized image analysis in dentistry : Present status and future applications" *Compend. Contin. Educ. Dent.* Vol XIII, 11 : 964-973.
  19. Wenzel, A., Sewerin, I. : "Source of noise in digital subtraction radiography" *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 71 : 503-508, 1991.

## **Study on the histomorphometry of guided bone regeneration using automated image analysis system**

T.I.-Kim, Y.-Ku, I.C.-Rhyu, C.P.-Chung, S.B.-Han, S.M. Choi, S.H.-Son  
Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

The assessment of alveolar bone changes on dental radiographs to indicate progression of periodontal diseases or healing response to therapy is routine procedure. However, the diagnostic accuracy in detecting small alveolar bone changes is very limited. Recently, guided bone regeneration therapy is popular, but the quantification of new bone is somewhat difficult with conventional evaluation method. To quantificate the amount of new bone, various evaluating methods have been introduced including histomorphometry, radiomorphometry, biochemical analysis, X-ray probe microanalysis, scanning electron microscope backscatter method. In this study, guided bone regeneration using resorbable membrane with & without PDGF-BB is quantified through histomorphometry to evaluate the efficacy of histomorphometric analysis.

4 beagle dogs and 8 Sprague-Dawley rats were selected as experimental animals. In beagle dog experiment, 4×4mm Class II defects were created in maxillary both second premolars, and biodegradable membrane containing PDGF-BB(experimental group) were covered over one defect, and same membrane without PDGF-BB(control group) were covered over the other defect. At 2 weeks, 5 weeks after surgery, each beagle dogs were sacrificed, and the tissues were treated by undecalcified fixation. In Sprague-Dawley rat experiment, 5mm round defect were created in temporal bone, the same membranes were covered on the defects. At 1 week, 2 weeks after surgery, each rats were sacrificed, and undecalcified fixation were taken. After grinding tissue specimen, we analyse them histomorphometrically using image analysis system.

In beagle dog 2 weeks specimens, new bone formation area were 0.03123mm<sup>2</sup> in experimental group, and 0.03012mm<sup>2</sup> in control group. At 5 weeks specimens, 0.15324mm<sup>2</sup> in experimental group, and 0.09123mm<sup>2</sup> in control group. In Sprague-Dawley rat specimens, new bone formation area were 0.20448mm<sup>2</sup> in 1 week experimental group, 0.03604mm<sup>2</sup> in 1 week control group. At 2 weeks specimens, 0.46349mm<sup>2</sup> in experimental group, 0.17741mm<sup>2</sup> in control group.

The results indicated that histomorphometric analysis of new bone formation using image analysis system is very effective quantification method to evaluate the efficacy of treatment modalities.

Key words : PDGF-BB, Image analysis, Histomorphometry