흡수성 차폐막에 접목된 두개관골세포의 골조직 재생에 미치는 영향

유부영 · 이만섭 · 권영혁 · 박준봉 · 허 익

경희대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

소실된 골조직 재생을 위한 치주과학 영역의 시술중 하나는 골이식술이며 재료의 종류에 따라 자가골, 동종골, 이종골 및 골대체골 이식술로 분류되고[1] 재료의 물성과 생물학적 안전도 및 골재생능력증가의 방향으로 연구되었다.

골연하치주낭 치료에 Yuktanandana(1957)[2]가 최초로 골이식술을 시도하였고 그 후 대부분 자가 및 동종골의 활용에 관한 연구들이[3-8] 진행되었으나 Schallhorn(1977)[9]은 다양한 단점을 지적하고 임상적용에 제한성이 있슴을 시인한 후 골대체물의 개발이 활발하였다. 골이식 대체물로는 경석고[10], 공막[11,12], 콜라젠[13]등이 있었고 생도재에 관한 연구도 활발하였다. 1974년 Levin등이 골이식물질로 생도재를 처음 보고한 후 Bump등(1975)[15], Nery와 Lynch (1978)[16], Strub등(1979)[17]에 의해 연구 개발되어 현재 임상에서 통용되는 생도재는 hydroxyapatite(HA)와 β-Tricalcium phosphate(β-TCP)가 있다. 그 결과 현재 치의학 영역에 사용되고 있는 인공골충전재에는 β-TCP[17], 결정형HA[18-20], 소공형 HA[21-23] 등이 있고 최근에 생체활성화 글라스[24-26]등도 소개되었다.

그러나 임상적 골조직재생 확인에도 불구하고 긴 접합상피형성으로 재발의 위험성이 잔존하게 되어 이에 대한 해결책을 모색하기에 이르렀다[27].

창상치유부는 이주된 세포형에 따라 좌우된다는 연구보고[28,29]에 따라 선택적 조직재생을 도모하는 조직재생유도술이 Nyman(1982)[30]에 의해 발표되었다. 그러나 연구초기의 조직유도재생술은 이를 제거하기 위한 부수적인 수술의 필요성등 술식상에서 많은 거부반응등 문제점이 제시되었다.[31] 이러한 단점을 해결하기 위하여 생분해성 차폐막에 대한 연구가 진행되어 Type I collagen[32,33], cargile등[34]의 교원질을 주성분으로 한 재료와 polyglactin 910[35], ploylactide-polyglycolide copolymer[36], polyurethane[37], polylactic acid[38]등이 보고되었다.

골조직재생을 위한 다양한 치료재료의 개발 중 최근에 활발한 분야는 재료공학과 세포공학 분야이다. Vacanti 등(1991)[39]는 체내에서 생흡수되는 중합체를 개발하여 이를 담체로하여 연골세포와 골막세포(Vacanti 등 1993)를 이식하여 생체조직을 형성하려고 시도[40]하였다.

골조직 결손시 회복에 가장 중요하게 영향을

미치는 것은 신생골을 형성할 조골세포가 주위 조직으로부터 얼마만큼 존재하는가의 여부이다. 즉 3벽성 골결손부가 조골세포가 분화될 수 있는 면적이 넓어 골재생이 용이하다.[41] 또한 기질형성능력이 왕성한 조골세포의 수가 가능한 다수 존재하여야 한다는 보고[42]가 있었다[43]. Cilento(1994)가 체외에서 배양된 세포도 생체내에서 성숙된 세포와 동일한 표현형을 갖는다는 사실을 면역세포화학적 방법으로 증명하였다.

세포공학의 발달로 임상의학에서 발달된 혈액의 ABO형 분리방법은 수혈학의 보편화를 이루었으며 혈관외과학에서는 내피세포의 세포접목술[44-47]이 임상 적용단계에 왔으며 근육조직의 재생[48]을 추구하기도 하였다. 또한 간기능의 회복을 위해 간세포의 이식[49]연구에도 응용되고 있고 성형외과학이나 피부과영역에서는 화상환자에게 배양된 세포의 도포로 조직재생률을 극대화하기도 하였고[50,51], 신경외과와 안과영역 및 정형외과학[52,53]에서도 배양세포의 응용에 대한 연구들이 진행되고 있는 실정이다.

피부-성형외과영역에서 진피세포를 배양하여 화상이나 피부궤양등 분야에 응용하게 되었다고 Contard[54,55] O'Connor(1978)등이 보고하였다.

치의학분야에서는 Boyko등(1981)[29]이 치아전이술(Transplantation)에 치주인대세포의 적용을 시도하기도 하였고 Van Dijk(1991)[56]은 치주인대섬유아세포를 조직재생에 응용한 바 있다.

세포와 친화력이 있으며 무해한 합성물질이 개발된다면 합성물을 세포이식의 매개체를 이용하여 조직 재건을 용이하게 할 수 있을 것이라는 예측이 이미 20여년전 발표되었다[57]. 세포운반 매개체에 대해 Cheung 과 Haak(1989)[58]은 소공성 인산칼슘을 사용한 바 있고, Bagambisa와 Joos(1990)[53]는 Hydroxyapatite상의 조골세포의 형태관찰을 시도한 바 있으며 Puelo등(1991)[59]은 소공성 골대체물과 배양조골세포의 접합성에 대해 Thaller등(1994)[60]은 골광물질과 콜라젠을 병용 골결손부치료 술식 가능성을 확인하기도 하였다. Langer와 Vacanti(1993)[61]는 ployglycolic(PGA)와 polylactic acid(PLA)의 생체접합성을 연구하였고, Mooney등(1994)[62]은 교원질 스폰지와 생분해성 polyglycolic(PGA)과 polylactic acid(PLA)[63]를 재료로 이용하여 조직적합성을 검증하였다. Levy등(1994)[64] 은 ploylactic acid film의 임상응용 가능성을 주장한 바 있다. 최근 국내에서도 생분해성 차폐막이 개발되어 조직재생 효과에 대한 연구보고[65]가 발표된 바 있다.

그러나 현재까지의 연구등은 조직의 접합성에 관점을 두고 시행된 연구였고 또한 사용된 차폐막의 골조직형성에 배양골세포의 접목에 대한 효과 검증이 아직 미미한 상태이다. 따라서 조골세포를 차폐막에 미리 접목시켜 부착된 세포를 근간으로 가능한 한 단시일내에 생체내에서 신생골형성이 야기될 수 있을 것이라는 가설 아래 이번 연구를 실시하였다. 즉 동종 개체로부터 추출, 배양한 두개관세포를 생체내에서 분해되는 차폐막에 접목하여 세포복합체를 제작하여 이를 두개관 결손부에 피개하여 시간경과에 따라 결손부에 신생골형성 과정을 관찰하여 그 효과를 검증하여 치의학 분야에 응용하고자 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 실험동물

백서 두개관세포를 배양하기 위해 순종으로 사육된 평균체중 150gm 전후의 Sprague-Dawley계 웅성백서 30마리를 이용하였다. 실험전 2주간의 환경적응 기간을 거쳐 동일한 조

건으로 사육하였으며 전신상태가 임상적으로 건강한 상태였다. 실험 기간동안 고형사료(도그라인, 대한사료공업, 한국)를 사용하였다. 실험 전기간동안 각각의 분리된 실내 사육실에서 동일조건으로 사육하였다.

(2) 백서 두개관세포 배양

Pentobarbital Sodium(Tokyo Industrial Chem., Japan)으로 복강 마취한 후 75% 알코홀로 두피를 세척 소독하고 두경부를 탈락하여 희생하였다. 외과용 가위로 두피를 절개한 후 두피를 박리하였다. 두개관을 분리하고 연조직을 완전히 제거한 후 세절하여 200U/ml penicillin(Gibco, USA)과 200μg/ml streptomycin(Gibco, USA)이 첨가된 Dullbeco's Minimum Essential Medium(DMEM, Gibco, USA)에 5회 세척하였다. 준비된 두개관 골편을 세절한 다음 35mm 세포 배양접시에 고르게 분산시키고 초기배양액인 20% Fetal Bovine Serum(FBS)과 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin(Gibco, USA)이 포함된 DMEM을 넣고 37 ℃, 습도 100%, 5% CO_2 공기혼합 배양기(Vision, Korea)에서 배양하였다. 완전히 밀생된 것을 확인한 후 1:3의 비율로 계대배양하고 2세대가 경과후 계대배양액인 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin이 포함된 표준DMEM 배양액으로 3일 간격으로 배양액을 교환하면서 배양하였고 본 실험에는 제 4-7세대의 세포를 사용하였다.

II. 실험방법

1. 세포접목체 제작

사전 직경 5mm의 원형으로 재단된 생분해성 차폐막(Biomesh, 삼양사, 한국) 을 산화에틸렌 가스로 소독하여 세포배양접시에 넣고 1×10^6 Cells/ml의 세포부유층에 4 시간이상 적용하여 세포가 부착하도록 한 후 3일동안 배양하여 세포이식체로 하였다. 배양조건은 계대배양과 동일한 방법으로 시행하였다.

2. 동물실험

두개부 골결손부를 형성하기 위하여 Pentobarbital Sodium(Tokyo Industrial Chem., Japan)으로 복강 마취한 후 두피를 알코홀로 소독하고 외과용 가위로 두피를 절개한 후 두피를 박리하였다. 두개관을 분리하고 두피와 연조직을 완전히 제거한 후 직경 3mm의 trephine bur를 이용하여 두개관을 적출하였다. 세포접목체의 이동을 방지하기 위하여 4-0 봉합사로 예비봉합하여 느슨하게 풀어 놓은 상태에서 적출된 골결손부에 세포접목체로 미리 준비된 생분해성 차폐막을 상하를 바꾸어 시적하였다. 박리된 두피는 차폐막을 완전히 피개한 후 고유위치에 재접합시킨 후 4-0 Vicryl(Ethicon Ltd., 영국) 봉합사로 봉합하였다.

1군 음성대조군은 실험동물의 두개관에 골결손부를 형성하고 아무런 이식재를 삽입하지 않은 군으로 하였고, 2군 양성대조군은 골결손부를 형성한 후 차폐막을 피개한 군이며, 3군 실험군은 골결손부를 형성한 후 세포접목체인 차폐막을 피개한 군으로 구분하였다. 각군을 3마리씩하여 1, 2, 3주에 희생하고 각군을 1, 2주에 3마리씩 배정하고 3주에는 4마리를 배정하였다.

3. 조직처리

실험동물은 실험개시 1, 2, 3주 후에 2.5% Glutaraldehyde(0.1M cacodylate buffer, pH 7.2)를 이용하여 경동맥에 관류 고정하여 각각 희생(Cho와 Garant 1981 a, b)[66,67] 시키고 두개관을 적출하여 10% neutral buffered formalin 에 1주간 고정시킨 후 추가고정을 위해

Karnovsky's fixative(Karnovsky 1965)[68] 에 3시간 정도 더 고정시켰다. 그 후 2.5% glutaraldehyde를 포함하는 0.1M disodium ethylene diamine tetraacetate(EDTA)에서 3주간 탈회시키고 통법에 따라 paraffin에 포매하여 시편을 횡단면으로 7㎛ 두께의 조직절편을 만들어 Hematoxylin - Eosin 염색을 시행한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. 음성대조군의 1주 소견

백서 두개골에 골결손부만 형성한 음성대조군에서는 전체적으로 기존 골조직과 결체조직의 경계가 명확하게 구별이 되고 결손부 중앙은 물론 가장자리에도 염증세포가 많이 잔존되어 있었고 일부 결체조직 섬유가 형성된 부위도 대부분 소성으로 나타났다. 결손부내 초기 조골과정에 발현되는 신생 모세혈관도 발견되지 않았다(사진 N1, a).

2. 양성대조군의 1주 소견

결손부에 차폐막을 피개한 양성대조군에서는 결손부내에 대부분이 치밀한 섬유성 결체조직으로 채워져 있었고 부위에 따라 모세혈관이 많이 분포되었으나 신생골 형성의 증후나 조골세포는 나타나지 않았다(사진 P1, a).

3. 실험군의 1주 소견

두개관 골세포를 접목한 차폐막을 피개한 실험군에서는 전체적으로 결손부의 내부에 치밀한 결체조직으로 구성되어 있고 많은 섬유가 일정한 주행방향을 보이면서 채워져 있었다. 염증세포의 침윤상은 관찰되지 않고 모세혈관이 결체조직내에 광범위하게 분포되어 있었고 기존골조직과 결체조직사이는 뚜렷하게 구별되었다. 일부 기존골편이 함입된 부위에서는 소수의 조골세포배열상과 신생골형성이 관찰되었다(사진 T1, a).

4. 음성대조군의 2주 소견

음성대조군에서는 결손부내에 염증세포의 침윤상은 관찰되지 않고 전반적으로 치밀한 결체조직으로 채워져 있으며 모세혈관이 결체조직내에 광범위하게 분포되어 있었다. 그리고 극히 일부이기는 하지만 골양조직이 결손부 가장자리에서부터 중앙으로 확장되는 양상이 보였다(사진 N2, a).

5. 양성대조군의 2주 소견

양성대조군의 결손부는 이미 염증세포는 소실되고 상당 부위에서 신생골 형성이 관찰되었다. 기존골과의 경계로부터 점차 확장되어가는 골양조직의 가장자리에는 조골세포가 일정하게 배열된 상이 나타나 신생골조직 형성이 활발하게 진행됨이 확인되었다(사진 P2, a). 또한 형성된 골양조직 가장자리를 따라 조골세포가 연속적으로 배열되어 있었고, 내부로 골기질에 의해 둘러싸이는 골세포가 많이 관찰되었으며 신생골 형성이 왕성한 주변에는 모세혈관이 다수 발견되었다(사진 P2, b).

6. 실험군의 2주 소견

실험군에서는 원형 결손부를 채우고 있던 치밀한 결체조직이 상당부분 신생골로 대치되는 양상이었고 골양조직내부에 광물화정도가 구별되게 농염되어 나타나는 부위가 양성대조군에 비해 다소 넓게 나타났다(사진 T2, a). 결손부 가장자리에는 기존골과 신생골의 경계가 불분명해지고 결손부 중앙의 결체조직내부에 골양조직이 섬처럼 나타나 중앙부위로 확산되는 정도가 왕성함을 알 수 있었으며 광확대 사진

에서 치밀한 결체조직을 헤치며 조골세포의 증식이 활발히 일어나고 일부는 골양조직에 의해 둘러싸여 골세포의 형태를 보였다. 그러나 아직 신생골조직은 골결손부를 완전히 폐쇄하지는 못하였다(사진 T2, b).

7. 음성대조군의 3주 소견

음성대조군에서는 염증세포는 완전히 소실되고 치밀한 결체조직의 교원섬유가 일정한 배열형태를 띄면서 전체적으로 채워져 있었고 결손부 중앙의 상당 부위에서 신생골 형성이 관찰되었고 신생골 형성이 왕성한 주변에는 모세혈관이 많이 산재되어 발견되었다(사진 N3, a). 기존골과의 경계로부터 점차 확장되어가는 골양조직의 가장자리에는 조골세포가 일정하게 배열된 상이 나타나 신생골조직 형성이 활발하게 진행됨이 확인되었다. 또한 형성된 골양조직 내부로 골기질에 의해 둘러싸이는 골세포가 많이 관찰되었으나 양성대조군이나 실험군보다 그 양은 적었다(사진 N3, b).

8. 양성대조군의 3주 소견

백서 두개골에 형성된 골결손부에 차폐막을 삽입한 경우인 양성대조군에서의 조직 소견에서는 기존골과 신생골의 경계가 불분명해질 정도로 골형성이 왕성해지고 골소주의 형성도 많이 관찰되었으나 골양조직내 광물화 농도는 별다른 차이를 관찰할 수 없었다(사진 P3, a). 절단된 방향에 따라 골결손부 내측 일부에서 차폐막이 분리되어 흡수가 진행되는 상이 관찰되었다(사진 P3, b).

9. 실험군의 3주 소견

실험군에서 원형의 골결손 내부는 일부의 치밀결체조직을 제외하고는 대부분 신생골조직으로 채워져 있음이 관찰되었다(사진 T3). 증식이 왕성한 신생골조직 내부에는 많은 모세혈관이 유입되어 있었고 부위에 따라 광물화 정도가 현저히 구별되게 나타났다(사진 T3, a). 절단면의 각도에 따라 일부에서는 소성 결체조직과 모세혈관이 잔존하고 있는 양상도 관찰되었고 잔존골과 신생골의 경계가 불분명하게 되었다. 완전히 결손부가 신생골조직으로 채워지지는 않았으나 타 시편과의 비교에서는 가장 많은 양의 신생골 형성을 관찰할 수 있었다(사진 T3, b).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

생체조직중 연조직 치유는 상피세포가 혈괴를 비계삼아 창상심부로 이주하고, 세포끼리 접촉하여 접촉저해 현상이 나타나면 세포들은 분화하여 신속한 속도로 증식하여 중층배열로 환원된다. 창상심부의 섬유아세포는 급속히 증식하여 새로운 결체조직구성 물질을 생성하며 점진적으로 혈괴가 제거되어 육아조직으로 대치되는 과정을 밟는다[69]. 그러나 치주조직은 치근표면의 백악질과 치아를 지지하는 치조골의 두개의 경조직 사이에 연조직인 치주인대로 연결되고 이들 모두를 피개하는 치은이라는 다른 조직으로 구성되어 있어 그 치유과정이 구조적 특수성 갖고 있어 복잡한 양상을 갖게 된다. 더욱이 교합이라는 외력이 항상 가해지기 때문에 생물학적으로 특수한 형태와 기능을 가지고 있다[70].

치주조직 재생술의 발달과정은 이환된 병소부의 단순제거[71,72], 노출된 치근면을 피개 보호할 목적인 치관변위판막술[73,74], 약물로 치근표면을 변화시키는 치근면처리법[75-78], 치은상피의 근단측 이동방지와 조직재생을 선택적으

로 유도하는 조직유도재생술[79,80] 결손된 조직내 비계역할을 기대하는 불활성 골전도물질의 삽입[81,82] 그리고 골유도 혹은 골형성물질 사용[83]등 다양한 방법이 제시되었다. 그러나 Egelberg[84] 는 단일 시술로서 이상적인 치주재생을 얻을 수 있는 방법은 없다고 주장하였다. 즉 전술한 다양한 치료법에 대한 또 다른 문제점 중 병소부의 단순제거는 시술시 건강조직 역시 함께 절제되어야 하는 단점이 있고, 인접치아의 지지조직 약화와 노출된 치근면에 상아질과민증등의 합병증이 야기될 가능성도 이미 지적된 바 있다.[85] 따라서 조직 제거량이 적으면서 재생을 추구하는 시술형태로 치료법이 발전되어 변형 위드만씨법[86]이 발표되었다.

치조골 재생에 사용되고 있는 합성골 이식재는 경석고[10], 공막[11-12], 콜라젠[13]등이 있었으나 이러한 물질들은 불확실한 골유도능력에의 문제로 임상응용 단계까지 이르지 못하였다. 그외 결정형을 띄고 있는 HA[18-20]와 생체내에서 다른 생도재와는 달리 흡수속도가 다소 빠른 β-TCP[14-17] 이 있으며 소공형 HA[21-23]등이 있고 최근에 생체활성화 글라스[24-26]도 있다. 이중 HA를 가토의 경골에 삽입한 연구[87]에서 β-TCP를 삽입한 경우보다 골조직의 내측성장(Ingrowth)이 우수한 것으로 나타났으나 다른 연구[88]에서는 소공형 이식재의 소공직경에 대한 연구결과 50-100㎛인 경우가 양호한 것으로 발표한 바 있다. 소공형 HA는 Weber 와 White(1973)[21]가 천연해양산호를 열수전환하여 생체 골조직과 유사한 Hydroxyapatite(HA)를 제작하고 생명체의 복제형이란 의미로 Replamineform HA(RHA)이라 명명하였고 Holmes(1979)[22]는 이를 이용하여 생체내에서 비계역할과 신생골조직의 신속한 형성을 관찰 보고한 바 있다. 박과 이(1985)[89]는 실험동물에서 Hydroxyapatite계열의 Replamineform-hydroxyapatite를 이용하여 신생골형성을 관찰하기도 하였다. Kenney등(1985)[90]은 임상연구에서 방사선학적 소견과 임상적 조사를 통하여, West 와 Brunstein(1985)[23]은 RHA와 동결건조골과의 이식후 비교에서 골회복능력에 차이가 없음을 발표한 바 있다. 이들의 구조는 수많은 소공이 상호연결된 양상을 하여 신생 모세혈관의 유입이 용이하고 그 표면적이 넓기 때문에 골조직과 유사한 견고성과 재료자체의 외형으로 비계역할 뿐 아니라 신생골형성이 빠른 것으로 알려져 있다.

그러나 Schallhorn(1977)[9]은 골이식술의 치료기간의 연장, 부가적 시술후 관리, 재생양상의 다양성, 예후판정의 어려움, 높은 치료비용등의 단점을 지적하여 골이식재의 임상적용 제한성을 주장하였다. 따라서 그 후 골조직이 아닌 대체물의 개발이 활발하였다.

치주조직의 수직형 골결손부의 치료후 방사선학적 검사결과 골조직 회복은 구현되었으나 조직학적 연구에서 치은상피가 치근하방부까지 증식하여 긴 접합상피형태가 발생한 경우가 많아 질환재발의 위험성이 잔존하게 되어 이에 대한 해결책을 모색하기에 이르렀다.[27]

창상치유부는 이주된 세포형에 따라 좌우된다는 연구보고[28,29]에 따라 Nyman(1982)[30]은 상피세포의 근첨단부로 우선적 이주를 차단하고 결체조직으로부터의 세포증식을 방지하고 치주인대와 치조골로부터 세포의 분화증식을 도모하여 신부착이 형성되는 것을 기대하였다. 이렇게 바람직한 조직을 선택적으로 치유에 도모하는 술식을 조직유도재생술이라고 하였다. 그러나 조직유도재생술에 이용된 차폐막은 임상적용에 많은 제한이 있음이 지적되었다. 즉 치은조직은 치밀한 결체조직이 치근면을 피개하고 있으므로 수술후 치유과정에서 차폐막이 구강내로 노출되거나 감염의 우려가 있고, 상피세포의 심부로의 증식 방지에 대한 불확실성 그리고 치주조직의 해부학적 구조상 결손부에 이주된 세포가 표현형을 발현하고 성숙된 조직으로 치환되기까지 장시간이 필요하고, 또한 차폐막 적용시 고도의 세심한 시술이 필요한 점 등이다[31].

골조직 결손시 회복에 가장 중요하게 영향을 미치는 것은 신생골을 형성할 조골세포가 주위 조직으로부터 얼마만큼 존재하는가의 여부이다. 즉 3벽성 골결손부가 조골세포가 분화될 수 있는 면적이 넓어 골재생이 용이하다[41]. 또한 동일한 골면적과 치근막 면적에서도 증식될 골세포수는 다르고 또한 1개의 골세포가 생산하는 골기질량도 차이가 있다고 판단되기 때문에 기질형성능력이 왕성한 조골세포의 수가 가능한 많아야 하므로 결손부위에 있어서 조골세포를 유도, 활성화하는 물질도 양적 및 질적으로도 우수해야 한다는 보고가 있었다[42].

자가 또는 동종골 이식의 문제점은 자가조직은 충분한 양을 얻을 수가 없고 동종골은 일부분이 흡수되어 최종적으로 생착된 조직의 양을 예측할 수 없다는 점에서 임상 적용에 한계가 있다. 이러한 약점을 보완하기 위하여 합성골 혹은 골대체물들이 개발되어 인공보형물로 사용되기 시작하였다. 그러나 이러한 물질들은 시술과정에서 탈락되거나 유출되기도하고 생체내에서 염증을 야기하거나 조직반응을 일으키는 경우가 있어 이상적인 재료로 사용하기에는 문제점이 아직 남아있다. 이러한 단점을 해결하려는 또하나의 노력은 재료공학과 세포공학의 발달이다. Vacanti 등(1991)[39] 은 체내에서 생흡수되는 중합체를 개발하여 이를 담체로 하여 연골세포와 골막세포를 접목한 바 있다.

Galletti(1992)[91]는 생인공장기(Bioartificial organs)를 Bionic organ, hybrid artificial organ, organoids 혹은 Bioimplants라고 불리우는 생명공학의 일부로서 장기이식과 대체장기의 실질적인 합병술을 의미한다고 하였고, 생인공장기는 구조적 기구와 내부활성형 기구의 2개의 범주로 구분하였다. 즉 구조적 기구는 이물반응 야기없이 생체일부를 매식가능한 보철물로 대치하는 것이고, 내부활성형 기구는 Hummoral communication 조절을 유지하는 동안 매식체와 숙주사이에 물리적 불연속을 완성하는데 있다고 하였다. 또한 생인공장기의 목적은 매식체와 숙주사이에 안전하고 오래 지속되는 완전한 기능의 형성이라고 하였다.

세포생물학의 발달은 배양기술의 개선과 아울러 인공세포가 연구되어 배양된 세포를 포함한 인공세포는 당뇨병과 간기능부전등에 현재 시험되고 있으며 인공세포는 흡수성 물질로 약제등을 포함시킬 수 있기 때문에 급성중독, 신부전, 몇몇 형태의 일부 급성 간기능부전등의 치료에 응용되고 있고 효소를 내재시킨 인공세포는 선천성 효소결핍증 등의 치료를 위한 시도들이 진행되고 있다[92]. 1920년대 초기 혈액의 ABO형에 대한 문제들이 밝혀진 이후로 많은 발전을 가져온 세포이식술은 1930년대에 이르러 동물세포들의 이식이 시도되어 왔으며 지연형 과민반응에 대한 연구가 실시되었고, 피부이식시 면역거부반응이 규명되었다. 연이어 1950년대에 와서 HLA antigen에 대한 동정과 이해가 진전되었고 신장이식이 성공을 거두었다. 1960년대에는 6 - mercaptopurine이 개발되어 최초로 면역억제법이 개발되었고 1970년대에는 모든 분야에서 장기이식술이 급속한 발전을 거듭했다. 최초로 비장, 간, 심장이식이 시도되었고 cyclosporine의 동정은 조직이식술에 광범위하게 이용되고 있기도 한다. 이 시기에 의공학의 발달은 조직이식의 변화된 형태로 최초의 인공심장은 의학의 새로운 장을 전개하였다. 그러나 장기이식에는 신선하고 기능이 완전한 장기 수거에 많은 어려움이 있으며 면역억제제의 발달에도 불구하고 장기의 장기간 생존가능성에 대한 문제는 아직 미해결이다. 그리고 장기간 동안의 정기 검진을 비롯한 외과적 시술 비용 또한 커다란 난제로 남아있고 더우기 아직 극소수의 제한된 지역에서만 시술된다는 사실이다. 장기이식이 아직 해결해야 할 문제들이 남아있는 반면 세포이식술은 이제 특수한 질환에서는 보다 광범위하게 응용되고 있다[93].

생체조직의 대용품을 제작하여 체내에 이식하여 신체의 기능유지, 향상 및 복원하는 생체

조직공학의 발전은 의학발전을 가져오는 계기가 되었다. 세포공학의 발달은 체외에서 세포를 대량으로 배양하는 기술발달로 약 1cm^2 크기의 조직으로 8주 내 4,202m^2 이상의 면적을 덮을 수 있는 수의 세포를 생산하게 되었다[43]. Cilento(1994)가 체외 배양 증식된 세포가 정상적인 분화과정으로 성숙할 수 있는가를 연구하여 생물학적 기초적 연구자료를 제시하였다. 즉 체외에서 배양된 세포도 생체내에서 성숙된 세포와 동일한 표현형을 갖는다는 사실을 면역세포화학적 방법으로 증명하였다.

이러한 세포이식술의 발달로 근래에는 임상에서 직접 다양하게 응용되고 있다. 통상은 광범위한 화상환자의 치료를 위해 세포를 이식한 시술이 Gallico등 (1989)[51]과 Kumagai(1988)[94] 에 의해 시도 되었으나 Kumagai(1994)[95]는 성형외과 영역에서 9명의 문신환자의 치료를 위해 진피의 심층까지 제거한 후 배양상피세포의 자가이식을 시행하였다. 창상부에는 출혈방지를 위해 에피네프린 처치된 거즈를 5분 압접한 후 지혈되면 fibrin glue를 바르고 petroletum jelly로 도포하고 건조 거즈를 피복하여 적당한 치유결과를 얻은 바 있다. 그외 일반의학에의 응용으로는 혈관외과학에서는 내피세포의 세포접목술이 Herring등(1978)[44], Graham등(1980)[45], Budd등(1991)[46], Mosquera등(1991)[47]에 의해 임상 적용단계에 왔으며 근육조직의 재생[48]을 추구하기도 하였다. 또한 간기능의 회복을 위해 간세포의 이식이 Jauregui와 Gann(1991)[49]에 의해 연구되어 임상응용이 시도되고 있고, 신경외과와 안과영역 및 정형외과학[52,53]에서도 배양세포의 응용에 대한 연구들이 진행되고 있는 실정이다.

Mazzucotelli[96]는 1993년 심장박동기에 내피세포접목은 혈구친화력과 혈관이식후 장기간 유지의 개선을 유도하는 좋은 방법이라는 보고를 근거로 적절한 세포수, 환경이 필요하고 적당한 분산을 위해 기구개발로 균일한 세포분산을 도모하는 단계에 이르렀다. 1991년 Cima[97]는 생분해성 중합체를 이용하여 약제와 이식세포를 함유하는 동시에 영양분도 공유할 수 있는 매개체 개발을 보고한 바 있다.

피부 - 성형외과영역은 상피 및 진피세포를 증식하여 삼차원적인 피부재생이 가능하다는 점을 응용하여 화상이나 피부궤양등 피부가 결손된 부위에 재생된 피부가 생착되므로 정상피부와 동일한 구조와 기능이 가능하게 되었다고 Contard[54]가 보고하였다. 또한 O'Connor(1978)에 의해 3도 화상으로 전층피부가 결손된 상처에 배양 자가상피세포층을 이식한 결과 배양된 상피세포가 영구히 생착되어 이식한 상피조직이 살아 기능한다는 사실이 관찰되었다.[55]

치의학분야에서는 Boyko등(1081)[29]이 치아전위술(Transplantation)에 치주인대세포의 적용을 시도하기도 하였다. 즉 비글견의 소구치 발거후 치주인대세포와 치은세포를 in vtro상에서 배양하여 측절치 발거후 근관충전하여 배양치은세포와 치주인대세포를 각각 부착시켰다. 이를 실험동물 희생후 세포를 부착하지 않은 치아와 비교 관찰하였다. 모든 치근에서 치근유착과 치근흡수를 보였으나 배양치주인대세포가 처치된 치근에서는 신생 섬유조직형성과 골과 치아내의 샤피스씨 섬유의 존재 등이 관찰됨을 보고한 바 있다. Van Dijk(1991)[56]는 치주인대 섬유아세포를 조직 재생의 한 방법으로 치주인대 세포를 시험관에서 배양한 후 조직내에 삽입하여 신부착을 창조할 수 있는가를 연구하였다. 즉 비글견으로부터 치주인대세포를 배양하고 인공적 치주조직결손을 형성, 배양세포를 치근면에 접종시키고 전층판막을 원상복귀 후 실험동물을 희생, 조직학적 관찰에서 세포처리 치근면에는 백악아세포로 거의 완전히 피개되었고 대조부에서는 상피세포의 하방이주가 관찰되었다. 따라서 결체조직 부착을 관찰하여 미래에 예견이 가능한 시술로 응용가능성을 발표하기도 하였다.

실제로 치주염에 의해 골흡수가 나타난 치조골의 재생에는 첫째 잔존치조골면에 존재하던 조골세포, 둘째는 잔존 치조골 내부 즉 해면골 및 골내막으로부터 유래한 조골세포, 셋째로는 치주인대내에 존재하는 미분화간엽세포가 분화한 조골세포 등이 관련된다. 이와 같은 조골세포수가 많으면 많을수록 재생골량도 많아진다. 일반적으로는 조골세포수는 잔존 치조골면수와 치근막면의 면적에 비례되기 때문에 같은 골결손량의 3벽성 골결손과 2벽성 골결손에서는 3벽성 골결손 쪽이 면적도 크고 조골세포수도 많아 골재생이 쉽다[41]. 이러한 기전을 근거로 체외에서 다량으로 증식한 배양세포를 생체내에서 조직결손부에 응용하는 것은 타당성이 있다고 생각된다.

그러나 아직까지 배양된 세포를 생체내로 이동하는 확립된 방법이 없다는 문제점이 남아 있는 실정이다. 배양세포와 친화력이 있으며 무해한 합성물질이 개발된다면 합성물을 세포이식의 매개체를 이용하여 조직 재건을 용이하게 할 수 있을 것이라는 예측이 이미 20여년전 발표되었다[57].

세포를 생체내로 운반하는 매개체로서의 이식재 접합은 Ohgushi(1989)[52], Nagahara(1994)[98], Matsuda와 Davies(1987)[99] 및 Goshima등(1991)[100]이 발표한 바와 같이 접합성이 본 연구에서도 좋은 것으로 나타났다. 접합된 세포는 그 자체적으로 생체내에 삽입되었을 때 생체내의 영양공급으로 분화 증식이 계속 진행되어 신생 골조직의 형성이 빠르게 진행되는 것으로 나타났다.

배양세포를 생분해성 β-TCP와 혼화 배양한 치주인대세포의 배양접시 기저면에 부착되는 양상을 관찰한 박등[107]의 주사전자현미경적 연구에서 세포의 부착양상은 골대체물의 혼화여부에 관계없이 유사한 부착양상을 보였다고 보고하였다. 즉 접종 90분 후부터 세포로부터 박판상돌기가 사방으로 확산되어 상호연결되고 핵을 중심으로 달무리형태를 이루고 있고 12시간 후부터는 핵과 세포질의 구별이 어려울 만큼 전체적으로 부착되고 24시간 후에도 세포의 고유한 형태에는 변함이 없었다고 하였다. 본 연구에서 사용된 소공형 HA는 100-200㎛의 소공이 상호연결된 구조를 가지고 있어 골형성에 필수적인 신생혈관의 유입이 용이하여 세포의 부착과 소공내로의 이주가 쉬우리라 생각된다. 주사전자현미경적 관찰에서 접종된 골세포는 이식재표면의 굴곡면과 소공사이로 증식되고 기질에 적절히 부착된 양상을 확인하였다. 이러한 소견은 Bagambisa와 Joos(1990)[53]가 주사전자현미경을 이용하여 Hydroxyapatite 표면상에 접종된 골아세포는 일반적 배양접시에서와 유사하게 부착 증식하며 특이한 독성은 발견되지 않았다는 결과와 유사한 것으로 이는 소공형 Hydroxyapatite가 배양세포를 생체내에 삽입하는데 매개체로 응용되기에 충분하다고 할 수 있는 근거가 된다고 생각되었다. 또한 이러한 소견은 이식재와 골표면에 세포를 부착한 후 그 양상을 관찰한 Malik(1992)[101]의 결과를 근거로 세포접종 후 2 시간이 경과하면 일반적 섬유아세포의 고유형태를 가지게 되고 수일동안 배양한 경우에 부착후 점진적으로 확장되어 소공내부로 이주하여 초기 신생골조직 형성에 영향을 준 것으로 생각된다.

세포이식술에는 체외에서 배양 증식한 세포를 체내로 운반하는 과정에서 필수적인 매개체의 선택은 생체조직공학을 이용한 조직재건에 중요한 요소중 하나이다. 세포운반 매개체에 대한 연구가 활발하여 Cheung 과 Haak(1989)[58]은 소공성 인산칼슘의 생체적 합성 연구에서 조골세포가 인산칼슘 표면에서 성장이 원활히 일어나는 현상을 확인하였고, Bagambisa와 Joos(1990)[53]는 Hydroxyapatite상의 조골세포의 형태적 관찰을 시도한 바 있으며 Puelo등(1991)[59]은 정형외과적 이식재료상에서 조골세포의 반응을 관찰한 바 소공성 골대체물이 배양조골세포와 접합성이 좋았다는 보고가 있었다. 또한 Thaller

등(1994)[60] 은 골광물질과 콜라젠을 병용하여 가토의 두개관 결손부에 삽입하고 치유과정을 관찰하여 골결손부 치료 술식 가능성을 확인하기도 하였다.

Lauger(1994)[102]는 배양된 상피세포를 화상이나 피부결손부에 이식하는 술식을 시행한 바 임상에서 그 성공률이 높다는 점에 착안하여 배양 치은섬유아세포의 임상적용을 최초로 보고하였다. 그는 치은 Keratinocyte를 배양하여 전치부 구강전정부위에 보철전수술을 하는 경우 치은이나 구강점막이 부족한 부위에 이를 해결하기위해 자가이식이 시도되어 성공적인 결과를 보여주었다. 이때 매개체로 바셀린거즈를 사용하여 세포를 부착하였고 기간은 4 - 6주 동안 관찰하였다.

골이식재중 Hydroxyapatite와 Tricalcium Phosphate는 골이식시 골대체재료로 널리 사용되고 있다[82,103]. 양자 모두 생체적합성과 골전도능력이 있으며 ceramic과 접합도 양호한 것으로 보고되었다[82,87,88]. 이러한 소공은 신생골형성을 위한 모세혈관의 유입이 재료의 심부까지 들어갈 수 있어 생체 적합성이 높은 것으로 알려져 있다. Nagahara등(1992)[98,104]은 백서두개관으로부터 조골세포를 배양 골유도능력이 있는 것을 확인하였다. 그외에도 조골세포와 이식재와의 생체 적합성에 관한 연구들이 많이 보고되었다[53,58,99,100,104 - 106]. 국내에서는 박(1992)등[107]이 배양치주인대세포가 HA와 친화성이 높아 표면부착에 많은 영향을 주는 것을 보고한 바 있어 세포접목재로서의 가능성을 입증하였다.

전술한 세포이식술과 차폐막의 기전에 대한 연구들을 근거로 배양골세포를 차폐막에 미리 접목시켜 부착된 세포를 근간으로 생체내 동종세포를 삽입한다면 인접조직으로부터 세포증식과 아울러 이식된 세포가 증식되어 신생골조직 형성에 보조적 역할을 하여 단시일내에 신생 조직형성이 야기될 수 있다는 가설을 세웠다. 따라서 동종 개체로부터 추출, 배양한 두개관세포를 생체내에서 분해되는 차폐막에 접목하여 세포복합체를 제작하여 이를 두개관 결손부에 피개하여 시간경과에 따라 결손부에 신생골형성 과정을 관찰하여 그 효과를 검증하고자 본 연구를 실시하였다.

본 연구에서 사용된 세포접목체는 최근 국내에서 개발된 흡수성 차폐막으로 조직재생 효과에 대한 검증은 이미 발표된 바[65] 있는 polyg - lycolic(PGA)와 polylactic acid(PLA) 중합체이었다. 본 연구 전기간을 통해서 골결손부 주위에 파골세포의 출현은 관찰되지 않고 대조군에 비교하여 인접조직에 염증반응이 심하지 않은 점과 인접 골조직으로부터 신생골형성이 관찰되는 점을 미루어 국내산 흡수성 차폐막이 세포접목체로서 적합하다고 판단된다. 이러한 사실은 Langer 와 Vacanti(1993)[61]가 발표한 보고에서 PGA와 PLA가 장기간 체내에서 특이한 부작용이 없이 생체적합성이 우수하다고 한 보고와 Levy등(1994)[64] 이 가토 대뇌골에 PLA film을 삽입하여 생체적합성이 검증되어 임상응용 가능성을 주장한 바 있다.

그러나 Mooney등(1994)[62]은 초기에는 교원질 스폰지를 재료로 이용하여 튜브를 제작하여 요로세포 이동을 시도한 바 있으나 뇨중 존재하는 염류들이 교원질 기질에 흡착되어 만족스런 결과를 얻지 못한 바 있어 접목체의 선택이 세포이식술에 중요한 요소중 하나임을 보고하였다.

본 연구에 사용된 세포접목체는 1×10^6 Cells/ ml의 세포부유층을 4 시간동안 생분해성 차폐막에 접종시켜 제작한 것으로 생분해성 차폐막은 국내에서 개발되어 이미 조직적합성 및 조직재생 효과에 대한 연구보고[65] 가 발표된 바 있어 본 연구에 응용하였다.

체외 세포배양 기술의 발달로 약 $1cm^2$ 크기의 조직으로 8주내 $4,202m^2$ 이상의 면적을 덮을 수 있는 수의 세포를 생산하게 되었다[43]. Cilento(1994)가 체외 배양증식된 세포가 정상적인 분화과정으로 성숙할 수 있는가를 연구

하여 생물학적 기초적 연구자료를 나타내었다. 즉 체외에서 배양된 세포도 생체내에서 성숙된 세포와 동일한 표현형을 갖는다는 사실을 면역세포화학적 방법으로 증명하였다.

본 연구에서 실험 전과정동안 섬유성 결합조직의 발현은 1주부터 관찰되어 신속한 연조직 치유를 확인하였다. 이러한 사실로 미루어 생체내 이식된 세포접목체는 생체내에서 활성화되어 조직재생속도가 신속히 야기된 것이 아닌가 판단된다. 이러한 세포접목술은 Puelo(1991)[59]가 주장한 바대로 골세포를 배양하여 이식재에 접목하여도 세포의 분화증식에는 아무런 저해요소가 없다는 보고를 근거로 이식재에 접목된 세포가 조직내에서도 증식이 가능하다고 생각되는 바이다. 또한 Langer와 Vacanti(1993)[61]와 Levy등(1994)[64]의 보고에서와 같이 PGA와 PLA는 생체내에서 특이한 부작용이 없이 생체적합성이 우수함을 확인할 수 있었다.

또한 결합조직이 골조직으로 치환되는 속도는 세포접목체를 결손부에 피개한 경우 타군에 비해 상대적으로 빠르게 나타났으며 골재생 치유순서는 세포접목체를 사용한 경우가 가장 빠르고 그다음에는 차폐막을 사용한 경우 그리고 차폐막을 사용하지 않은 경우 순으로 나타났다. 이와같은 소견은 Oghushi등(1989)[52]이 주장한 바와 같이 골수세포가 존재하는 경우에는 이식부위가 골표면이 아니더라도 신생골형성이 가능하다는 결과를 비추어 볼 때 골결손부위에 인접 골조직이 풍부한 경우에는 창상면에 존재하던 골세포의 분화가 촉진되어 더 빠른 골형성이 가능하였을 것으로 생각된다.

실험 전기간을 통해서 골결손부 주위에 파골세포의 출현은 관찰되지 않았고, 신생골 형성은 기존 골조직에서 증식되어 점차 중앙부로 확장되는 양상이었다. 이러한 소견은 신생골증식은 기존 골조직으로부터 조골세포의 분화에 의해 야기되며 이 조골세포의 증식능력이 골조직재생 과정에 가장 큰 영향을 미친다는 青野正男(1991)[41]의 주장과 동일하다고 판단된다. 이러한 소견을 미루어 기존 골조직으로부터 확장되는 신생골형성이 이식된 세포접목체로부터 확장되는 신생골보다 빠르게 이루어 진다는 사실을 알 수 있다. 그러나 세포접목체를 삽입한 경우 삽입하지 않는 부위보다 골형성량이 빠르게 증가하기 때문에 골결손부 재생을 위해서 세포접목술을 적용하는 것이 효과적이라 판단된다.

또한 차후의 연구에서는 Arvey(1988)[69]가 주장한 바와 같이 실험동물에게 critical defect size를 고려하여 골결손부를 형성하고 신생골 형성과정을 검증하는 사항을 추가로 고려하여야 하며 치유기간중 연조직의 함몰이나 유입을 차단할 수 있는 이식재의 병용을 시행한 후 그 효과를 검증하는 것이 필요하리라 생각된다. 또한 세포운반 매개체를 사용하더라도 재생될 주위조직과 동일한 세포를 접목하는 것이 조직재생에 바람직할 것으로 사료된다.

종합적으로 흡수성 차폐막에 접목된 배양된 골세포는 인공적으로 형성한 골결손부에서 골조직재생에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 차후 세포접목법을 조직재생술에 응용하기 위해서는 세포의 종류, 접목방법, 접목세포수, 세포의 전처치 및 계대배양 횟수 등을 달리한 광범위한 연구가 시행되어야 할 것이다.

V. 결론

골결손부 재생과정에 배양세포의 영향을 규명하기 위하여 Sprague - Dawley계 백서를 대상으로 다음과 같은 실험을 시행하였다.

백서를 전신마취하고 두피를 절개후 두개관을 분리하여 계대배양액인 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin이 포함된 DMEM 배양액을 사용, 표준상태하의 공기혼합배양기에서 두개관세포를 배양하였다. 배양세포를 원형 생분해성 차폐막 위에 1×10^6cells/ml의 수로 접목하고 세포를 부착시

켜 세포접목체로 하였다. 백서의 두개관을 노출하고 직경 3mm의 두개관 골결손부를 형성한 후 세포접목체를 결손부위에 접촉하도록 위치시켜 봉합하였다.

실험동물을 3군으로 분류하고 골결손부 형성 후 아무런 처치를 하지 않은 군을 음성대조군으로, 골결손부 형성후 차폐막을 피개한 군을 양성대조군으로, 세포접목체를 피개한 군을 실험군으로 하였다.

실험 1, 2, 3주 후에 관류 고정하여 각각 희생시키고 두개관을 적출하여 고정, 추가고정, 탈회 후 통법에 따라 포매, 박편제작, 염색을 시행한 후 검경하였다.

1. 실험 전과정동안 섬유성 결합조직의 발현은 1주부터 관찰되어 신속한 연조직 치유를 확인하였으며, 결합조직이 골조직으로 치환되는 속도는 세포접목체를 결손부에 피개한 경우 타군에 비해 상대적으로 빠르게 나타났다.
2. 골결손부의 골재생 치유순서는 세포접목체를 사용한 실험군, 차폐막을 사용한 양성대조군 그리고 차폐막을 사용하지 않은 음성대조군순으로 나타났다.
3. 실험 전기간을 통해서 골결손부 주위에 파골세포의 출현은 관찰되지 않았고, 신생골 형성은 기존 골조직에서 증식되어 점차 중앙부로 확장되는 양상이었다.
4. 골세포접목군에서는 전체적으로 조직친화성이 양호하였으며 타군에 비해 상대적으로 신생골형성과 골양조직내 광물화 속도가 재생과정 초기부터 빠르게 나타났다.

결론적으로 흡수성 차폐막에 접목된 세포는 인공 두개관 골결손부 골조직 재생에 긍정적 역할을 하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구 결과는 세포접목술이 향후 골결손부 재생술식에 임상응용 가능성이 높음을 제시하고 있다.

VI. 참고문헌

1. Han, T., Carranza, F. A. Jr., and Kenney, E. B.： Calcium phosphate ceramics in dentistry ; A review of the literature. J. West. Soc. Perio. Abstr., 32： 88 - 108, 1984.
2. Yuktanandana, I.：Bone graft in the treatment of periodontal pocket in dogs ; A histological investigation. J. Periodontol., 30：17 - 26, 1959.
3. Cushing, M.：Autogenous red mar - row grafts ; Their potential for induction

of osteogenesis(review of literature). J. Periodontol., 40 : 492 - 497, 1969.
4. Dragoo, M. R., and Sullivan, H. C., : A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in human. Part I. Wound healing 2 to 8 months. J. Periodontol., 44 : 599 - 613, 1973.
5. Ellegaard, B., Karring, T., Listgarten, M., and Loe, H. : New attachment after treatment of inter - radicular lesions. J. Periodontol., 44 : 209 - 217, 1973.
6. Ewen, S. J. : Bone swaging. J. Periodontol., 36 : 57 - 63, 1965.
7. Mellonig, J. T., Bowers, G. M., Bright, R. W., and Lawrence J. J. : Clinical evaluation of freeze - dried bone allografts in periodontal osseous defects. J. Periodontol., 47 : 125 - 131, 1976.
8. Quintero, G., Mellonig, J. T., Gambill, V. M., and Pelleu, G. B. Jr. : A six month clinical evaluation of decalci - fied freeze - dried bone allogafts in peri - odontal osseous defects. J. Periodontol., 53 : 726 - 730, 1982.
9. Schallhorn, R. G. : Present status of osseous grafting procedures. J. Periodontol., 48 : 570 - 576, 1977.
10. Alderman, N. E. : Sterile plaster of paris as an implant in the infrabony environment ; A preliminary study. J. Periodontol., 40 : 11 - 13, 1969.
11. Feingold, J. P., and Chasens, A. I. : Preserved scleral allografts in periodon - tal defects in Man. 1. Preparation, preservation and use. J. Periodontol., 48 : 1 - 3, 1977.
12. Feingold, J. P., Chasens, A. I., Doyle, J., and Alfano, M. C. : Preserved scleral allografts in periodontal defects in Man. 2. Histological evaluation. J. Periodontol., 48 : 4 - 12, 1977.
13. Lery, P., Nevins, A., and Laporta, R. : Healing potential of surgically induced periodontal osseous defects in animals using mineralized collagen gel xenografts. J. Periodontol., 52 : 303 - 306, 1981.
14. Levin, M. P., Getter, L., Cutright, D. E., and Bhaskar, S. N. : Biodegradable ceramic in periodontal defects. Oral Surg., 38 : 344 - 357, 1974.
15. Bump, R. L., Salimeno, T., hooker, S. P., and Wilkinson, E. G. : The use of woven ceramic fabric as a periodontal allograft. J. Periodontol., 46 : 453 - 458, 1975.
16. Nery, E. B., and Lynch, K. L. : Preliminary clinical studies of bioceramic in periodontal osseous defects. J. Periodontol., 49 : 523 - 527, 1978.
17. Strub, J. R., Gaberthuel, T. W., and Firestone, A. R. : Comparision of the tricalcium phosphate and frozen allogenic bone implants in man. J. Periodontol., 50 : 624 - 629, 1979.
18. Rablais, M. L. Jr., Yuna, R. A., and Mayer, E. T. : Evaluation of durapatite ceramic as an alloplastic implant in peri - odontal osseous defects. I. Initial six - month results. J. Periodontol., 52 : 680 - 689, 1981.
19. Yukna, R. A., Mayer, E. T., and Brite, D. V. : Longitudinal evaluation of durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects after 3 years. J. Periodontol., 55 : 633 - 669, 1984.

20. Merffert, R. M., Thomas, J. R., Hamilton, K. M., and Brownstein, C. N. : Hydroxyapatite as an alloplastic in the treatment of human periodontal osseous defects. J. Periodontol., 56 : 63 - 73, 1985.
21. Weber, J. N., and White, E. W. : Carbonate minerals as precursors of new ceramic, metal, and polymer materials for biomedical applications. Minr. Sci. Engng., 5 : 151 - 165, 1973.
22. Holmes, R. E. : Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. Plastic and Reconst. Surg., 63 : 626 - 633, 1979.
23. West, T. L., and Brunstein, D. D. : Freeze - dried bone and coralline implants compared in the dog. J. Periodontol., 56 : 348 - 351, 1985.
24. Weinsein, A. M., Klawitter, J. J., and Cook, J. O. : Implant - bone interface characteristics of bioglass dental implants. J. Biomed. Mater. Res., 14 : 23 - 29, 1980.
25. Wilson, J., and Low, S. B. : Bioactive ceramics for periodontal treatment : comparative studies in the Patus monkey. J. Appl. Biomat., 3 : 123 - 129, 1992.
26. Hench, L. L., Stanley, H. R., Clark, A. E., Hall, M., and Wilson, J. : Dental applications of bioglass implants. Bioceramics, 4 : 231 - 237, 1991.
27. Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T., and Rylander, H. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 9 : 290 - 296, 1982.
28. Melcher, A. H. : On the repair of periodontal tissues. J. Periodontol., 47 : 256 - 269, 1976.
29. Boyko, G. A., Melcher, A. H., and Brunette, D. M. : Formation of new periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. J. Periodont. Res., 16 : 73 - 88, 1981.
30. Nyman, S. : The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. J. Clin. Periodontol., 9 : 265 - 277, 1982.
31. Aukhil, I., Pettersson, E., and Suggs, C. : Guided tissue regeneration. An experimental procedure in beagle dogs. J. Periodontol., 57 : 727 - 734, 1986.
32. Van Swol, R. L., Ellinger, R., Pfeifer, J., Barton, N., and Blumenthal, N. : Collagen membrane barrier therapy to guided regeneration in class II furcation in humans. J. Periodontol., 64 : 622 - 629, 1993.
33. Choi, S. Y., Nilveus, R. E., Minutello, R. D., Zimmerman, G. J., and Wikesjo, U. M. E. : Effect of a collagen matrix on healing in periodontal furcation defects in dogs, J. Periodontol., 64 : 878 - 882, 1993.
34. Card, S. J., Caffesse, R. G., Smith, B., and Nasjleti, C. : New attachment following the use of a resorbable membrane in treating periodontitis in beagle dogs. Int. J. Periodont. Rest. Dent., 9 : 59 - 69, 1989.
35. Gager, A. H., and Schultz, A. J. : Treatment of periodontal defects with an absorbable membrane(Polyglactin 910) with and without osseous grafting : case reports. J. Periodontol., 62 : 276 - 283,

1991.
36. Gottlow, J.：Guided tissue regeneration using biodegradable and non-resorbable devices：Initial healing and long term results. J. Periodontol., 64：1157-165, 1993.
37. Warrer, K., Karring, T., Nyman, S., and Gogolewski, S.：Guided tissue regeneration using biodegradable membrane of polylactic acid or polyurethane. J. Clin. Periodontol., 19：633-640, 1992.
38. Lundgren, D., Laurell, L., Gottlow, J., Rylander, H., Mathisen, T., Nyman, S., and Rask, M.：The influence of the design of two different bioresorbable barriers on the results of guided tissue regeneration therapy. An intra-individual comparative study in the monkey. J. Periodontol., 66：605-612, 1995.
39. Vacanti, C. A., Langer, R., Schloo, B. et al.：Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. Plast. Reconstr. Surg., 87：753-759, 1991.
40. Vacanti, C. A., Kim, W. S., Upton, J. et al.：Tissue engineered growth of bone and cartilage. Transplat. Proc., 25：1019-1021, 1993.
41. 青野正男等：歯周治療の科學, 醫歯藥出版株式會社, 東京 pp 245-252, 1991.
42. 須田立雄等：骨の科學, 醫歯藥出版株式會社, 東京 pp 69-86, 1988.
43. Cilento, B. G., Freeman, M. R., Schneck, F. X., Retik, A. B., and Atala, A.：Phenotype and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro, J. Urol., 152：665-670, 1994.
44. Herring, M., Gardner, A., and Glover, J.：A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. Surgery, 84：498-504, 1978.
45. Graham, L. M., Vinter, D. W., Ford, J. W., Kahn, H., Burkel, W. E., and Stanley, J. C.：Endothelial cell-seeding of prosthetic vascular grafts. Early experimental studies with cultured autologous canine endothelium. Arch. Surg., 115：929-933, 1980.
46. Budd, J. S., Allen, K. E., and Bell, P. R. F.：Effects of 2 methods of endothelial cell seeding on cell retention during blood flow. Br. J. Surg., 78(7)：878-882, 1991.
47. Mosquera, D. A., and Goldman, M.：Endothelial cell seeding. Br. J. Surg., 78(6)：656-660, 1991.
48. Yue, X., van der Lei, B., Schakenraad, J. M., van Oene, G. H., Kuit, J., Feijen, J., and Wildevuur, C. R. H.：Smooth muscle cell seeding in biodegradable grafts in rats：a new method to enhance the process of arterial wall regeneration. Surg., 103：206-212, 1988.
49. Jauregui, H. O., and Gann, K. L.：Mammalian hepatocytes as a foundation for treatment in human liver failure. J. Cell. Biochem., 45(4)： 359-365, 1991.
50. Gallico, G. G., O'Connor, N. E., Compton, C. C., Kehinde, O., and Green, H.：Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. N. Engl. J. Med., 311：448-451, 1984.
51. Gallico, G. G., O'Connor, N. E., and

Compton, C. C. : Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. Plast. Reconstr. Surg., 84 : 1 - 9, 1989.
52. Ohgushi, H., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. : Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. J. Orthop. Res., 7 : 568 - 578, 1989.
53. Bagambisa, F. B. and Joos, U. : Preliminary studies on the phenomeno - logical behaviour of osteoblasts cultured on hydroxyapatite ceramics. Biomaterials, 11 : 50 - 56, 1990.
54. Contard, P., Bartel, R. L., Jacobs, L. et al. : Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three - dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina - anchoring a one. J. Invest. Dermatol., 100 : 35 - 39, 1993.
55. O 'Connor, N. E., Mulliken, J. B., Banks - Schlegel, S., Kehinde, O., Green, H. : Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. Lancet., 1 : 75 - 78, 1978.
56. Van Dijk, L. J., Schakenraad, J. M., Vandervoort, H. M., Herkstr ter, F. M., Busscher, H. J. : Cell - seeding of peri - odontal ligament fibroblasts, a novel technique to create new attachment ; a pilot study. J. Clin. Periodontol., 18(3) : 196 - 199, 1991.
57. Green, W. T. jr. : Articular cartilage require behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. Clin. Orthop., 124 : 137, 1997.
58. Cheung, H. S., and Haak, M. H. : Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic : an in vitro model for biocompatibility study. Biomaterials, 10 : 63 - 67, 1989.
59. Puelo, D. A., Holleran, L. A., Doremus, R. H., and Biozios, R. : Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro. J. Biomed. Mater. Res., 25 : 711 - 723, 1991.
60. Thaller, S. R., Hoyt, J., Dart, A., Borjeson, K., Tesluk, H. : Repair of experimental calvarial defects with Bio - Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. J. Craniofac. Surg., 1994, Sep ; 5(4) : 242 - 246.
61. Langer, R., and Vacanti, J. P. : Tissue engineering. Science, 260 : 920 - 922, 1993.
62. Mooney, D. J., Organ, G., Vacanti, J. P., Langer, R. : Design and fabrication of biodegradable polymer devices to engi - neer tubular tissues. Cell, Transplant., 3 : 438 - 446, 1994.
63. Mooney, D. J., Mazzoni, C. L., Breuser, C., McNamara, K., Hern, D., and Langer, R. : Stabilized polyglicolic acid fiberbased tubes for tissue engineering. Biomaterials, 17 : 115 - 124, 1996.
64. Levy, F. E., Hollinger, J. O., Szachowicz, E. H. : Effect of a biore - sorbable film on regeneration of cranial

bone. Plast. Reconstr. Surg., 1994, Feb. ; 93(2) : 307 - 311.
65. 김원경, 최상묵, 한수부, 권영혁, 정종평, 이승진 : 약물함유 생체분해성 차폐막의 세포활성도 및 골조직 유도재생 효과. 대한치주과학회지 27 : 129 - 150.
66. Cho, M. I., and Garant, P. R. : Sequential events in the formation of collagen secretion granules with special reference to the development of segment - long - spacing - like aggregates. Anat. Rec., 199 : 309 - 322, 1981.
67. Cho, M. I., and Garant, P. R. : An electron microscopic radioautographic study of collagen secretion in periodontal ligament fibroblasts of the mouse : I. normal fibroblasts. Anat. Rec., 201 : 577 - 586, 1981.
68. Karnovsky, M. J. : A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol., 27 : 137a, 1965.
69. Arvey, J. K. : Oral development and histology, B. C. Decker Inc. Toronto, pp 282 - 293, 1988.
70. Matsuda, N., Lin, W. L., Kumar, N. M., Cho, M. I., and Genco, R. J. : Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. J. Peiodontol., 63 : 515 - 525, 1992.
71. Ochsenbein, C. : Osseous resection in periodontal surgery. J. Periodontol., 29 : 15 - 26, 1958.
72. Prichard, J. : Gingivoplasty, gingivectomy and osseous surgery. J. Periodontol., 32 : 275 - 282. 1961.
73. 치주과학교수협의회 : 치주과학, 2판, 지영문화사, 서울(1992), pp. 650 - 713.
74. Klinge, B., Nilveus, R., and Egelberg, J. : Effects of crown attached sutures on heal - ing of experimental furcation defects in dogs. J. Clin. Periodontol., 12 : 369 - 373, 1985.
75. Garrett, J. S., Crigger, M., and Egelberg, J. : Effects of citric acid on diseased root surface. J. Periodont. Res., 13 : 155 - 163, 1978.
76. Terranova, V. P., Franzetti, L., Hic, S. et al., and Genco, R. J. : A biochemical approach to periodontal regeneration, Tetracycline treatment of dentin promotes fibrob - last adhesion and growth. J. Periodontal. Res., 21 : 330 - 337, 1986.
77. Renvert, S., and Egelberg, J. : Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. II. Effect of citric acid conditioning of the root surface. J. Clin. Periodontol., 8 : 459 - 473, 1981.
78. Nilveus, R., and Egelberg, J. : The effect of topical citric acid applicaiton of the heal - ing of experimental furcation defects in dogs. III., The relative importance of coagulum support, flap design and systemic antibiotics. J. Periodont. Res., 15 : 551 - 560, 1980.
79. Caffesse, R. G., Nasjleti, C. E., Anderson, G. B., Lopatin, D. E., Smith, B. A., and Morrison, E. C. : Periodontal healing following guided tissue regeneration with citric acid and fibronectin application. J. Periodontol., 62 : 21 - 29, 1991.
80. Pontariero, R., Nyman, S., Ericsson, I., and Lindhe, J. : Guided tissue regeneration in surgically - produced furcation defects. An experimental study in the beagle dog. J. Clin.

Periodontol., 19 : 159 - 163, 1992.
81. Shetty, V., and Han, T. J. : Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. DCNA, 35 : 521 - 530, 1991.
82. Jarcho, M. : Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin. Orthop., 157 : 259 - 278, 1981.
83. Terranova, V. P., Goldman, H. M., and Listgarten, M. A. : The periodontal attach - ment apparatus ; structure, function, and chemistry, cite in Genco, R. J., Goldman, H. M., and Cohen, D. W. : Contemporary periodontics. The C. V. Mosby Co., Toronto, pp 51 - 54, 1990.
84. Egelberg, J. : Regeneration and repair of periodontal tissues. J. Periodont. Res., 22 : 233 - 242, 1987.
85. Schallhorn, R. G. : Postoperative problems associated with iliac transplants. J. Periodontol., 43 : 3 - 6, 1972.
86. Ramfjord, S. P. : Present status of the modified widman flap procedure. J. Periodontol., 48 : 558 - 561, 1977.
87. Shimazaki, K., and Mooney, V. : Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. J. Orthop. Res., 3 : 301 - 310, 1985.
88. Eggli, P. S., Muller, W., and Schenk, R. K. : Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. Clin. Orthop., 232 : 127 - 138, 1988.
89. 박준봉, 이만섭 : Bioceramic 재제가 성견 치조골 결손부재생에 관한 실험적 연구. 대한치주학회지 15(1) : 45 - 63, 1985.
90. Kenney, E. B., Lekovic, V., Han, T., Carranza, F. A. Jr., and Dimitrijevic, B. : The use of a porous hydroxyapatite implant in periodontal defects. I. ; Clinical results after six months. J. Periodontol., 56 : 419 - 421, 1985.
91. Galletti, P. M. : Bioartificial organs. Artificial Organs, 16(1) : 55 - 60, 1992.
92. Chang, T. M. S. : Artificial cells ; 35 years. Artificial Organs, 16(1) : 8 - 12, 1992.
93. Monahan, J. J. : Past progress and future trends in cell transplantation. J. Cell. Biochem., 45 : 317 - 318, 1991.
94. Kumagai. N., Nishina, H., Tanabe, H. et al. : Clinical application of autologous cul - tured epithelia for the treatment of burn wounds and burn scar. Plast. Reconstr. Surg., 82 : 99 - 108, 1988.
95. Kumagai, N., Matsuzaki, K., Fukushi, S., Masayoshi, T., Hideo, O., and Ishida, H. : Grafting of autologous - cultured epithelium after excision of tattos. Ann. PlastSurg., 33(4) : 385 - 391, 1994.
96. Mazzucotelli, J. P., Roudi re, J. L., Bernex. F., Bertrand, P., L andri, J., and Loisance, D. : A new device for endothelial cell seeding of a small - calber vascular prosthesis. Artificial organ, 17 : 787 - 790, 1993.
97. Cima, L. G., Vacanti, J. P., Vacanti, C., Ingber, D., Mooney, D., and Langer, R. :

사진부도(Ⅰ)

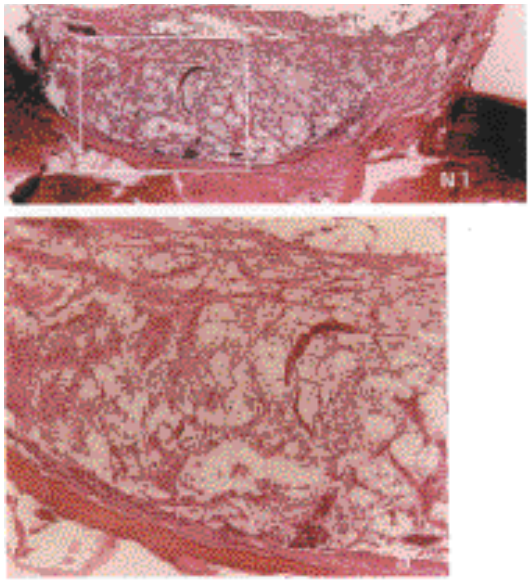

Figure 1

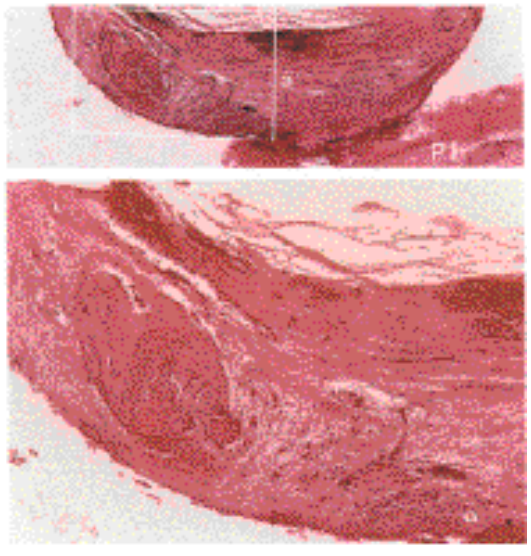

Figure 2

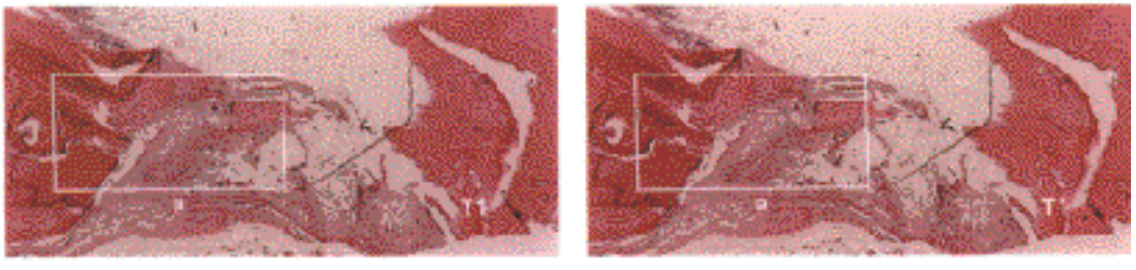

Figure 3

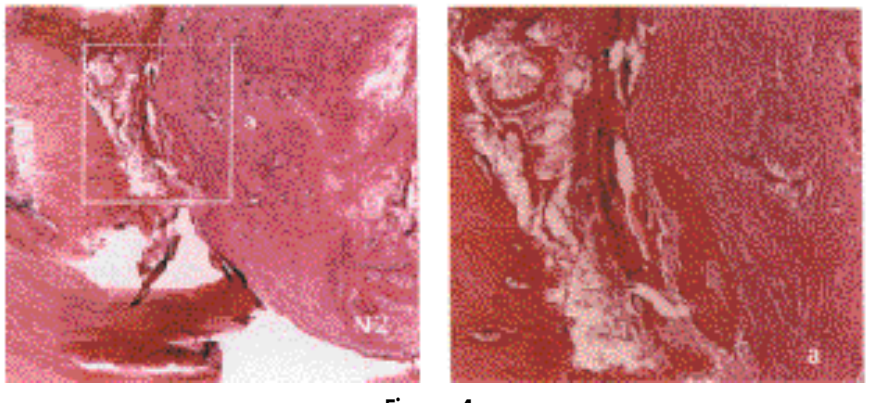

Figure 4

사진부도(Ⅱ)

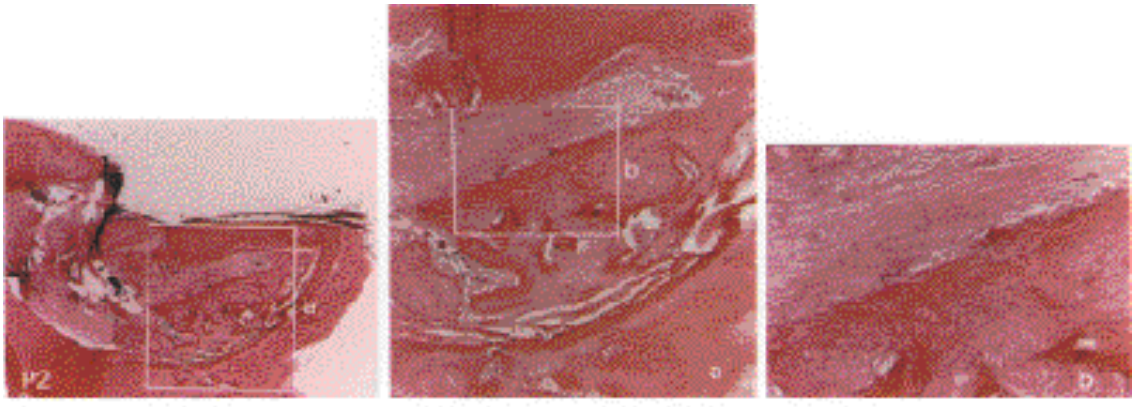

Figure 5

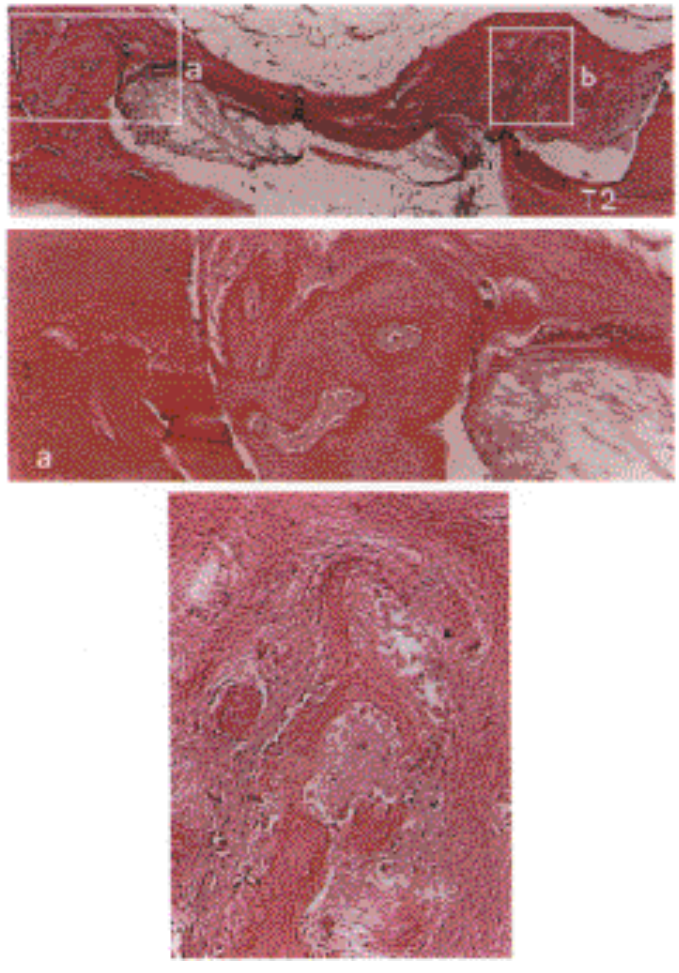

Figure 6

사진부도(Ⅲ)

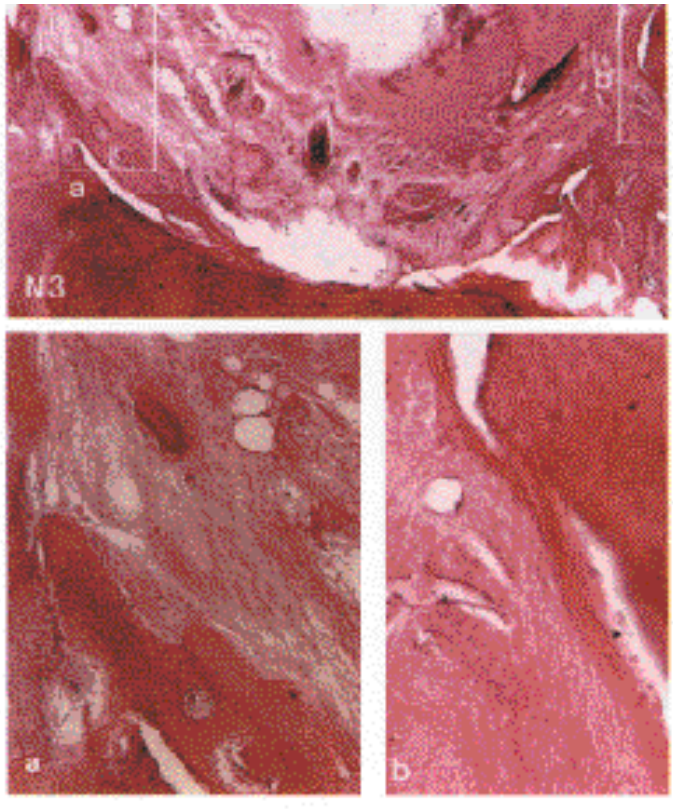

Figure 7

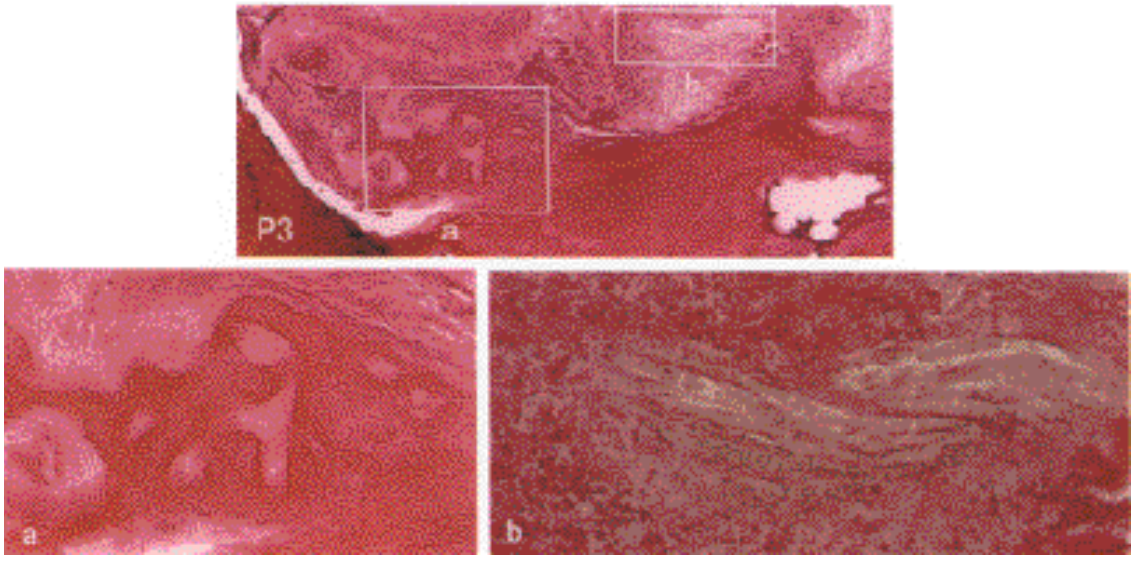

Figure 8

사진부도(Ⅳ)

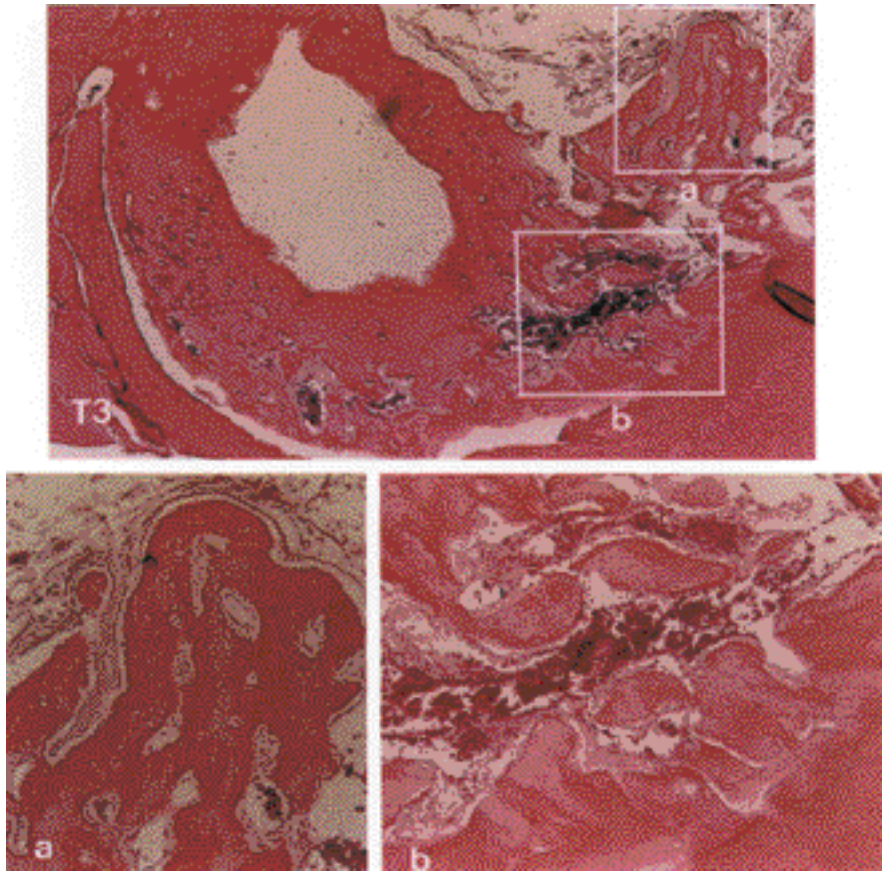

Figure 9

Tissue engineering by cell transplantations using degradable polymer substrates. J. Biomech. Engineer., 113 : 143 - 151, 1991.
98. Nagahara, K., Mouri, K., Kanematsu, N., and Meenaghan, M. A. : An In vivo evaluation of an osteoinductive implantable material produced by osteoblastic cells in vitro. Unt. J. Oral. Maxillofac. Impalnts, 9 : 41 - 48, 1994.
99. Matsuda, T., and Davies, J. E. : The in vitro response of osteoblasts to bioactive glass. Biomaterials, 8 : 275 - 284, 1987.
100. Goshima, J., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. : Osteogenic potential of culture - expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. Biomaterials, 12 : 253 - 258, 1991.
101. Malik, M. A., Puelo, D. A., Bizios, R., and Doremus, R. H. : Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro : morphology during the first 2h of attachment. Biomaterials, 13(2) : 123 - 128, 1992.
102. Lauger, G. : Autografting of feeder - cell free cultured gingival epithelium. J. Cranio. Max. Fac. Surg., 22 : 18 - 22, 1994.
103. De Groot, K. : Bioceramic consist calcium phosphate salts. Biomaterials, 1 : 47 - 50, 1980.
104. Nagahara, H., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. : Cultured - expanded periosteal - derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo. Clin. Orthop., 276 : 291 - 298, 1992.
105. Vrouwenvelder, W. C. A., Groot, C. G., and de Groot, K. : Histological and biochemical evaluation of osteoblasts cultured on bioglass, hydroxyapatite, titanium alloy, and stainless steel. J. Biomed. Mat. Res., 27 : 467 - 475, 1993.
106. Freed, L. E., Marquis, J. C., Nohria, A., Emmanual, J., Mikos, A. G., and Langer, R. : Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultures on synthetic biogradable polymers. J. Biomed. Mat. Res., 27 : 11 - 23, 1993.
107. 박준봉, 서조영, 김해동 : Tricalcium phosphate가 치주인대세포의 성장에 미치는 영향. 대한치주과학회지 22(3) : 484 - 498, 1992.

사진부도 설명

Figure 1. Negative control group (1wk)

Photomicrographs showed distinguished line between pre-existed bone and connective tissue, and numerous inflammatory cell were infiltrated not only in the center but in the margin of defected area (Figure N1).

On high magnificated photo, there were no newly formed capillary in the defected area except loose connective tissue (Figure N1, a).

Figure 2. Positive control group (1wk)

Most of defected area was occupied with dense connective tissue. Many capillary were distributed in some area of defected area but there were no sign of osteoblast and new bone formation(Figure P1, a).

Figure 3. Experimental group (1wk)

In control site, dense connective tissue were observed in the whole defected area with abundant fiber which had regular polarization to same direction (Figure T1).

There were no inflammatory cell invasion, but many newly formed capillary distributed broadly in the defected area. Osteoblast were arranged along the curvated portion of remaining bone and there was distinguished line clearly between connective tissue and pre-existing bone (Figure T1, a).

Figure 4. Negative control group (2wks)

Photomicrographs revealed abundant capillary were extended into dense connective tissue which were filled in defected area without inflammatory cell.

It was observed small amount of osteoid proliferated from the edge toward center of the bone defected area (Fig N2, a).

Figure 5. Positive control group (2wks)

New bone formation was observed on the large part of defected area, and many osteoblast were arranged along the osteoid tissue extended from the margin of pre-existing bone (Fig P2, a). In the center of osteoid tissue, many osteocytes were surrounded by extracellular matrix, and there were numerous capillary around high degree of bone forming activity (Fig P2, b).

Figure 6. Experimental group (2wks)

Dense connective tissue occupied in the dome shape defected area was almost replaced by new formed bone tissue, and highly stained mineralized zone in the osteoid tissue showed more remarkable than positive control group (Figure T2, a). The boundary line between old and new bone became more unclear, and in the magnified photograph osteocytes were circumscribed by the highly mineralized osteoid tissue. But new formed bone tissue could not completely cover the whole defected area (Figure T2, b).

Figure 7. Negative control group (3Wks)

Inflammatory cell invasion was not observed any more. Defected area was filled with dense collagenous fiber which showed regular polarity, and new bone surrounded by capillary was occupied in some part of center portion (Figure N3, a).

Expansion of new bone formation was observed from the edge of remaining bone, and osteocytes were circumscribed by the highly mineralized osteoid tissue, but the amount of osteoid tissue was smaller than other groups (Figure N3, b).

Figure 8. Positive control group (3wks)

Photomicrograph showed unclear boundary line between old and new bone. Even though large amount of bone trabeculae were observed, the density of mineralization in the osteoid were not remarkable (Figure P3, a). Some part of disperse and resorption of barrier membrane were seen due to the direction of dissection of specimen (Figure P3, b).

Figure 9. Experimental group (3wks)

Most of the dome shaped defected area was replaced by newly formed bone tissue except some part of dense connective tissue (Figure T3). Remarkable differences of mineralization of newly formed bone tissue was observed (Figure T3, a). The proportion of new bone filled in defected area showed more prominent than other groups (Figure T3, b).

- Abstract -

Effect of Calvarial Cell Inoculated Onto the Biodegradable Barrier Membrane on the Bone Regeneration

Bu - Young Yu, Man - Sup Lee, Young - Hyuk Kwon, Joon - Bong Park, Yeek Herr
Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung Hee University

Biodegradable barrier membrane has been demonstrated to have guided bone regeneration capacity on the animal study. The purpose of this study is to evaluate the effects of cultured calvarial cell inoculated on the biodegradable barrier membrane for the regeneration of the artificial bone defect. In this experiment 35 Sprague - Dawley male rats(mean BW 150gm) were used.

30 rats were divided into 3 groups. In group I, defects were covered periosteum without membrane. In group II, defects were repaired using biodegradable barrier membrane. In group III, the defects were repaired using biodegradable barrier membrane seeded with cultured calvarial cell.

Every surgical procedure were performed under the general anesthesia by using with intravenous injection of Pentobarbital sodium(30mg/Kg). After anesthesia, 5 rats were sacrificed by decapitation to obtain the calvaria for bone cell culture. Calvarial cells were cultured with Dulbecco's Modified Essential Medium contained with 10% Fetal Bovine Serum under the conventional conditions.

The number of cell inoculated on the membrane were $1x10^6$ Cells/ml. The membrane were inserted on the artificial bone defect after 3 days of culture.

A single 3 - mm diameter full - thickness artificial calvarial defect was made in each animal by using with bone trephine drill.

After the every surgical intervention of animal, all of the animals were sacrificed at 1, 2, 3 weeks after surgery by using of perfusion technique. For obtaining histological section, tissues were fixed in 2.5% Glutaraldehyde (0.1M cacodylate buffer, pH 7.2) and Karnovsky's fixative solution, and decalcified with 0.1M disodium ethylene diaminetetraacetate for 3 weeks. Tissue embeding was performed in paraffin and cut parallel to the surface of calvaria. Section in 7㎛ thickness of tissue was done and stained with Hematoxylin - Eosin. All the specimens were observed under the light microscopy.

The following results were obtained.

1. During the whole period of experiment, fibrous connective tissue was revealed at 1week after surgery which meant rapid soft tissue recovery. The healing rate of defected area into new bone formation of the test group was observed more rapid tendency than other two groups.
2. The sequence of healing rate of bone defected area was as follows ;

test group, positive control, negative control group.

3. During the experiment, an osteoclastic cell around preexisted bone was not found. New bone formation was originated from the periphery of the remaing bone wall, and gradually extended into central portion of the bone defect.
4. The biodegradable barrier membrane was observed favorable biocompatibility during this experimental period without any other noticeable foreign body reaction.
   And mineralization in the newly formed osteoid tissue revealed relatively more rapid than other group since early stage of the healing process.

Conclusively, the cultured bone cell inoculated onto the biodegradable barrier membrane may have an important role of regeneration of artificial bone defects of alveolar bone. This study thus demonstrates a tissue-engineering the approach to the repair of bone defects, which may have clinical applications in clinical fields of the dentistry including periodontics.