대한치주과학회지 : Vol. 30, No. 4, 2000

백서 두개골 결손부에서 키토산의 골조직 재생 유도 효과

정의원 · 서종진 · 최성호 · 조규성 · 채중규 · 김종관

연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직 재생 연구소

I. 서론

치주 치료의 최종 목적은 진행되는 치주 질환의 증상을 제거하는 것 뿐만 아니라 이미 파괴된 지지조직을 기능적으로 재생시키는데 있다. 치주조직의 재생을 위해서는 감염성, 염증성 질환에 이환된 치근면에 신생 백악질의 침착, 신생골의 형성과 함께 새로운 치주인대 섬유의 기능적인 삽입, 배열, 그리고 치은조직의 구조화가 필요하다. 현재 파괴된 치주조직의 재생을 위해 골 이식술과 치주조직유도재생술이 행해지고 있다.

치주조직유도재생술은 1976년 Melcher가 치주조직의 재생과 새로운 부착은 건강한 치주인대로부터의 미분화 간엽세포에 의한다는 개념을 발표한 후[1] 이 개념에 의거하여 여러 종류의 차단막이 사용되어졌다. 이러한 차단막은 치은 상피의 치근단 방향으로의 이주에 대한 방어벽 역할을 하면서 선택적 세포들만 치근면에 모일 수 있도록 함으로써, 이전의 전통적인 치주 치료의 많은 한계를 극복할 수 있는 가능성을 제시해주고 있지만 이는 재생에 필요한 세포 과정을 촉진시키지는 않았다. 또한 이 술식의 성공에는 환자의 전신 건강 상태, 구강 위생 상태, 흡연 여부, 골 결손부의 형태, 차단막의 종류, 판막의 위치, 치은 퇴축, 술자의 기술 및 치유기간 등 여러 요소들이 영향을 미친다[2,3].

한편 골 이식술은 많은 임상적인 시도와 동물실험에서 좋은 결과를 나타내었다. 골 이식의 종류는 자가골 이식, 동종골 이식, 이종골 이식, 골 대체물과 합성골 이식으로 나눌 수 있다. Schallhorn은 이식 재료의 선택에 있어서 몇 가지 조건을 제시하였다[4]. 생물학적 적합성, 예측성, 임상적 실행 가능성, 최소한의 수술 위험성 및 후유증 등의 조건을 내세웠으나 이상의 모든 조건을 만족시키는 이식재를 찾는다는 것은 어렵다고 하였다. 이 중 가장 좋은 결과를 보이는 자가골 이식의 경우 수년간 치조골 결손부위에서 임상적으로 성공적인 결과를 나타내었으나, 부가적인 수술 부위의 필요, 골유착 유발, 치근 흡수, 큰 결손부의 경우 충분한 양을 얻을 수 없다는 제한점이 있다. 동종골 이식이나 이종골 이식의 경우 광범위한 골 결손 부위에 이식하기가 적합하고 환자에게 부가적인 외상을 주지 않는 장점이 있으나, 질환 전염 가능성과 이식 항원에 대한 거부반응이 나타날 우려가 있다. 골 대체 물질 및 합성골 이식재는 골재생

교신저자: 김종관 서울시서대문구신촌동 134번지연세대학교치과대학치주과학교실 우편번호 120 - 752

을 위한 공간 형성을 주목적으로 개발되었다. 이러한 이식재의 이상적인 조건은 골 형성 및 백악질 형성 유도 능력이 있어야 하고 염증 반응이 없으며 빠른 혈관 형성이 이루어지고 숙주 조직에 대한 친화성이 있어야 하며 사용과 구입이 용이하면서도 경제적이어야 한다는 것이다. 그러나 이들은 골 형성, 백악질 형성, 섬유소 형성 능력이 의문시되고 있으며, 이러한 재료 사이로 결합조직이 증식할 수 있는 충진재로서만 주로 작용하기 때문에 이를 극복하기 위한 재료의 개발이 필요하게 되었다.

최근 키틴으로부터 추출된 탄수화물 생중합체인 키토산(poly - N - acetyl glucosamino - glycan)에 대한 관심이 증가하고 있다. 키틴은 생중합체 중 셀룰로스 다음으로 풍부한 물질로서, 갑각류(예; 새우, 게, 가재 등)의 외골격, 진균의 세포벽, 곤충의 큐티클을 이루는 구조 성분이다. 키틴의 화학적 구조를 보면, 매우 안정된 다당류로서 1, 4 - β glucosidic linkage에 연결된 N - acetyl - D - glucosamine 단위의 선형 중합체이다[5]. 키토산은 이런 키틴의 유도체로서, 키틴 분자를 N - acetylation시킴으로써 형성된다. 키틴과 키토산은 효소에 의해 가수분해되어 단량체 형태로 흡수되는데, 주로 라이소자임(lysozyme)에 의해서 분해된다[6 - 8].

키토산의 생물학적 기능을 살펴보면, 지방을 흡수하고 결합하여 체중 감소에 도움이 되며, 콜레스테롤 조절, 결합조직 치유 향상, 항생, 항진균, 항암 효과, 지혈 효과 등이 있다[9 - 15]. 이런 유익한 효과 외에도 최근 여러 연구를 통해 창상 치유 및 골재생 유도 능력이 입증되어 왔다[16 - 20]. 1960년에 Reynold는 창상 치유 증진에 있어서 monomer sugar N - acetylglu - cosamine의 이용에 대한 과학적 기초를 마련하였다[21]. 1978년에 Balassa 등은 여러 동물 실험을 통해 N - acetylglucosamine이 창상 치유 속도를 증진시킨다고 보고하였다[16]. 최근 구강내 창상 치유에 있어서 키토산의 효과에 관한 연구가 보고되었는데, Sapelli 등은 치주낭, 구개 창상과 발치와의 치유를 증진시키기 위해 키토산 분말을 사용한 증례에서 양호한 결과를 보고하였다[22]. Muzzarelli 등은 치주 창상에 키토산을 적용하였을 때 조직화가 증진되면서 섬유화가 감소되는 것을 보고하였다[23]. 뒤이어 골결손부(발치와와 치근단 절제술 부위)에 키토산을 적용하여 정상골 형성을 증진시켰다고 보고하였다[24]. 계 등은 키토산 제재를 이용한 차단막은 치주 질환시 골조직 유도재생을 위한 차단막으로 유용하다고 보고하였다[25]. 이 등은 키토산/tricalcium phosphate sponge를 조직 공학에 응용하여 3차원적 구조로 조골세포가 자랄 수 있는 골격을 제공할 수 있다고 보고하였다[26]. 또한 PDGF - BB의 운반체로서의 유용성을 제시하였다[27].

이에 저자는 외과적으로 형성된 백서 두개골 결손부에서 키토산을 이용하여 골조직 재생 유도 능력을 조직학적, 조직 계측학적 및 방사선 계측학적으로 관찰, 평가하여 다소의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 실험 동물

본 연구에서는 체중 300 - 400g의 수컷 백서(Sprague Dawley rat) 30마리를 사용하였다. 실험 부위는 두개골을 이용하였다. 실험 동물은 연세 임상의학연구센터의 지침에 따랐다.

2) 실험재료

두개골 결손부에 적용할 실험 재료로는 키틴에서 추출된 무미, 무취의 수용성 올리고당 키토산*(poly N - acetyl glucosaminoglycan, 88.3% deacetylation)을 사용하였다(Figure 1).

* 키토산100, Hanwha Co., Seoul, Korea

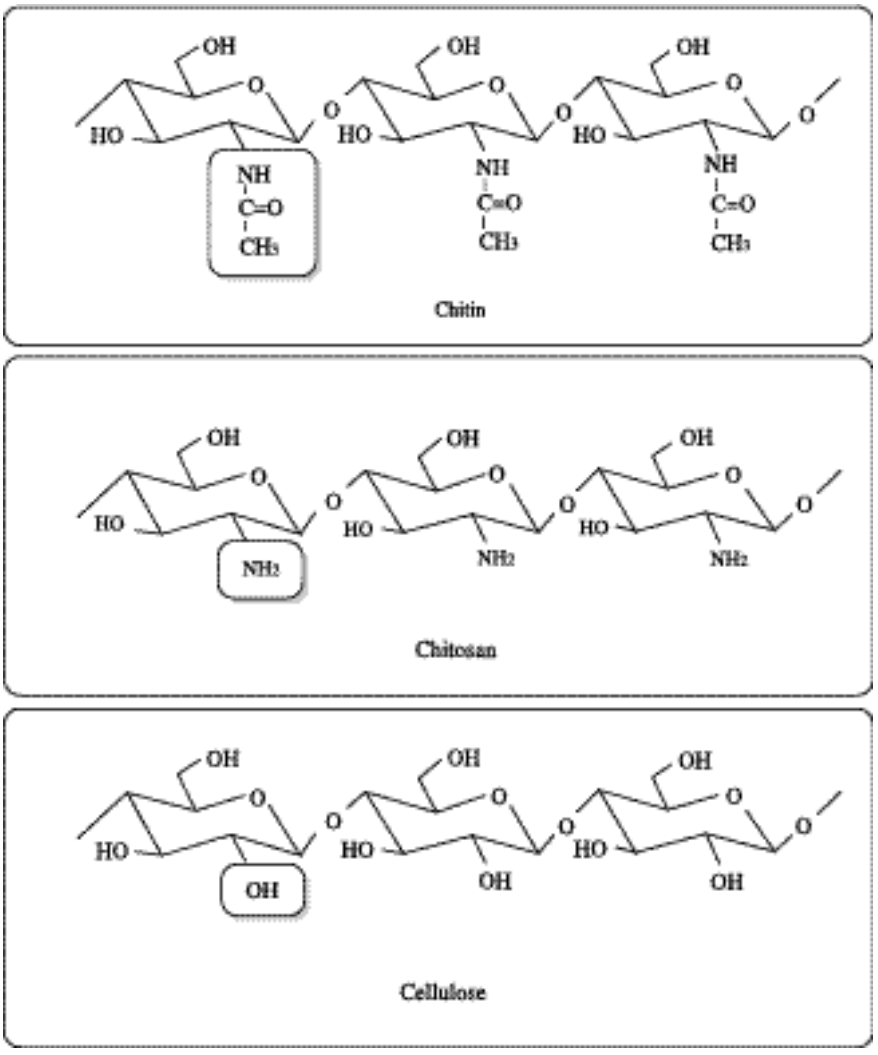

Figure 1. Structure of chitin, chitosan and cellulose

2. 연구 방법

1) 실험군 설정

두개골 결손부에 아무 것도 이식하지 않은 군을 대조군으로, 수용성 키토산을 이식한 군을 실험군으로 설정하였다. 각 군은 수술 후 2주, 4주, 8주의 치유기간을 두고 희생하여 관찰하였는데, 각 주별로 5마리씩 실험하여 총 30마리를 사용하였다.

2) 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치

각 군의 백서를 염산 케타민† (50mg/ml)을 근육주사(70mg/kg)하여 마취하였다.

† 케타민Ketalar, Yuhan Co., Seoul, Korea
‡ 8mm trephine bur, 3i, FL, USA
§ 1:100,000 epi., Yuhan Co., Seoul, Korea
¶ Ethilon®, Ethicon, Edinburgh, Scotland, UK

두부의 털을 깎고 povidone iodine으로 소독한 후 고정하였다. 수술 부위를 소량의 2% lidocaine§으로 침윤마취한 후 전두골 전방부에서 후두골 후방부까지 정중부를 따라 두피를 절개하여 두개골의 상면을 노출시켰다. 8mm 지름의 trephine bur‡를 이용하여 경뇌막(dura mater)에 손상을 주지 않도록 하면서 지름 8mm의 원형 결손부를 형성하였다(Figure 6). 대조군에는 아무것도 이식하지 않고 실험군에는 수용성 키토산 50mg을 생리식염수에 적셔 gel 상태로 위치시킨 후(Figure 7) 두피를 덮어 Ethilon®¶으로 봉합하였다. 1주일 후 발사하였다. 실험 후 2주, 4주, 8주에 각 군 당 5마리씩 실험동물을 희생하고 두개골을 절제하였다.

3) 조직학적 관찰

절제해낸 조직을 10% 포르말린에 고정하고 5% nitric acid에 넣어 탈회시킨 후 파라핀 포매하였다. 이 블럭을 3 ㎛두께로 결손부의 중앙부에서 관상면으로 절단하여 블록 당 4장의 슬라이드를 제작하였다. 이를 Hematoxylin - Eosin(H - E) 염색법으로 염색하고, 광학 현미경으로 관찰하였다.

4) 조직 계측학적 관찰

100배 배율로 확대된 조직 표본 상을 컴퓨터 모니터 상에 재현하고 Image - Pro Plus‡#를 이용하여 두개골 결손부의 신생골 조직의 변연부로부터 말단까지의 길이, 신생골 면적(㎛^{2})을 계측하였다. 이 값을 각 주별로 평균내어 군 간 비교하였다.

5) 방사선 계측학적 관찰

관전압 70kVp, 노출시간 0.1초, 조사관으로부터의 거리를 10cm로 조건을 표준화 하여

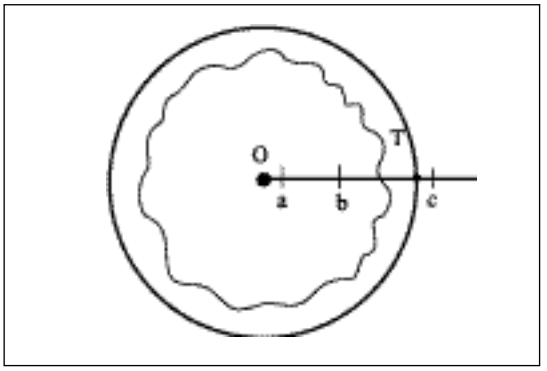

Figure 2. A schematic diagram depicting radiodensitometric analysis using computer assisted image analysis program(O: The center of defect, T: The boundary of critical size defect)

$\overline{Oa}=\overline{OT}/10$: low densitometric reference area
$\overline{Tc}=\overline{OT}=/10$: high densitometric reference area
$\overline{bT}=\overline{OT}=/2$: Region of Interest
Relative bone fill(%) = {mean(bT) - mean(Oa)} / {mean(Tc) - mean(Oa)}×100

Digora®##로 촬영한 후 Brain3dsp®¶를 이용하여 결손부 내 골밀도 평균을 산출하였다. 이 값을 각 주별로 평균내어 군 간 비교하였다.

결손부 내 골밀도는 Figure 2와 같이, 결손부의 중앙부위(Oa)를 0으로, 결손부 변연부(Tc)의 골밀도를 100으로 설정하였다. 이런 설정하에, 결손부 중앙점에서 방사상으로 8 방향의 선을 지정하고 bT의 상대적인 골밀도를 평균 내어 %로 나타내었다.

6) 통계학적 분석

조직학적 계측 결과(길이와 면적)와 방사선학적 계측 결과(골밀도)에 대해, two way ANOVA를 이용하여 군과 시간 두 변수간의 교호 작용이 없음을 확인하였다. t - test를 이용하여 시간별로 군 간 유의한 차이가 존재하는지를 검증하였다.

#Image - Pro Plus®, Media Cybernetics, Silver Spring, M.D., USA
##Digora®, Soredex, Orion Co., Helsinki, Finland

Ⅲ. 결과

1. 조직학적 관찰

1) 대조군

① 2주 소견

창상 부위는 얇고 성긴 섬유성 결합조직에 의해 채워져 있었고 출혈 및 육아조직이 관찰되었다. 신생골은 주로 결손부 변연과 하방 경뇌막 주위에 국한되어 삼각형 형태로 형성되어 있었다. 신생골 상방의 골막은 불연속적이어서 연조직 치유가 아직 진행중인 소견을 관찰할 수 있었다. 신생골은 조골세포에 의해 둘러싸여 있고 주위로 염증세포가 관찰되었다(Figure 10).

② 4주 소견

2주와 비교해서 결합조직이 더 균일한 밀도를 보이고 골막과 경뇌막이 연속적으로 이어져 있는 양상과 함께 혈관이 더 많이 증식해 있는 것을 볼 수 있었다. 잘 정돈된 섬유 다발 사이로 방추형의 섬유모세포가 많이 관찰되었다. 2주와 비교해서 골 생성량은 더 증가된 양상을 보였다. 결손부 변연의 신생골은 신생골 말단부에 비해 더 균일하고 성숙해지는 소견을 관찰할 수 있었다. 신생골 말단에는 골성조직(osteoid)이 관찰되고 그 전방으로 조골세포가 열 지어 있었다. 결손부의 대부분은 성긴 결합조직으로 채워져 있었다(Figure 8, 11).

③ 8주 소견

4주에 비해 더 잘 정돈되고 균일한 섬유성 결합조직에 의해 신생골이 둘러싸여 있고 결손부의 중앙부는 역시 성긴 결합조직에 의해 채워져 있었다. 신생골은 골막부위로는 성숙된 양상을 보이고 경뇌막 쪽은 미성숙한 채로 넓은 골수강을 보였다. 신생골 말단에는 조골세포가 열지어 있지만 골성조직은 관찰되지 않았다(Figure 12, 13).

2) 실험군

① 2주 소견

같은 시기의 대조군에 비해 많은 혈관 증식이 보였고 조골세포의 침윤이 관찰되었다. 대조군에 비해, 더 광범위한 범위의 결손부 변연에서 신생골 형성이 진행되고 있는 것이 관찰되었다(Figure 14, 15).

② 4주 소견

2주에 비해 더 치밀하고 잘 정돈된 결합조직에 의해 둘러싸여 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 2주에 비해 조골세포가 더 멀리까지 이주되어 있었고 더 많은 양의 신생골이 형성된 것을 볼 수 있었다. 대조군은 주로 결손부 변연과 경뇌막에서만 골형성이 이루어지는 반면, 실험군에서는 결손부 변연과 경뇌막뿐만 아니라 상방의 골막까지 3면에서 골형성이 이루어져 골무같은 형태를 보였다. 결손부 변연에서는 골성숙이 관찰되고 말단으로 갈수록 골수강이 큰 신생골과 골성조직이 관찰되었다(Figure 9, 16, 16 - a, 16 - b).

③ 8주 소견

4주와 마찬가지로 결손부 3면에서 골무와 같

Table 1. Histomorphometric analysis of new formed bone length

(mean±standard deviation; n=5, ㎛)

	2weeks	4weeks	8weeks
Control	102.91±25.46	130.95±39.24	181.53±76.35
Experimental	219.46±97.81	212.39±89.22	257.12±51.22

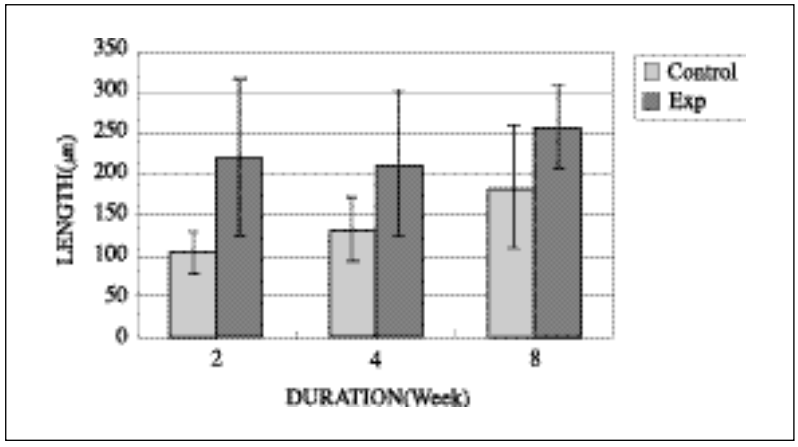

Figure 3. Histomorphometric analysis of newly formed bone length in the control and experimental

Table 2. Histomorphometric analysis of newly formed bone area
(mean±standard deviation; n=5, ㎛²)

	2weeks	4weeks	8weeks
Control	2962.06±1284.48	5103.25±1375.88	8046.02±818.99
Experimental	5194.88±1247.88*	7751.43±2228.20	15578.57±5606.55*

* : Statistically significant difference compared to control group($p<0.05$)

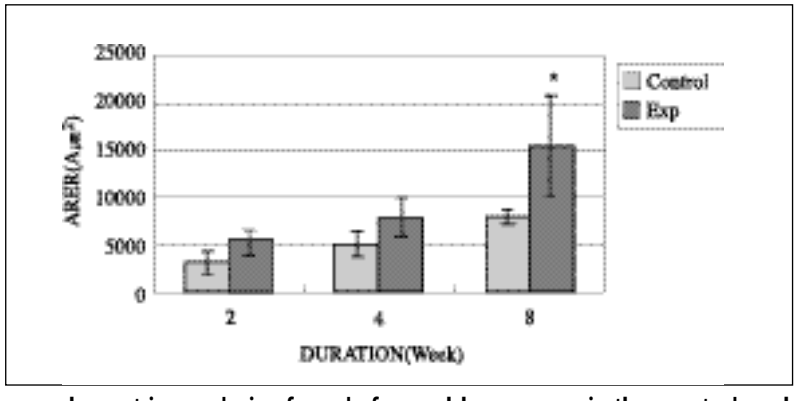

Figure 4. Histomorphometric analysis of newly formed bone area in the control and experimental groups

은 양상으로 신생골 형성이 이루어지고 있었다. 결손부 변연에서는 골 성숙과 골 개조가 이루어지면서 기존골과 혼화되는 양상을 보였고 말단부에는 아직 골성조직 층을 이루며 계속 골형성이 진행되고 있음을 보여주었다(Figure 17, 17 - a, 17 - b).

2. 조직 계측학적 관찰

1) 두개골 결손부 내 신생골 길이

Table 3. Radiodensitometric analysis
(mean±standard deviation; n=5, %)

	2Weeks	4Weeks	8Weeks
Control	14.26±6.33	20.06±9.07	22.99±3.76
Experimental	27.91±6.65*	27.86±8.20	32.17±6.38*

* : Statistically significant difference compared to control group($p<0.05$)

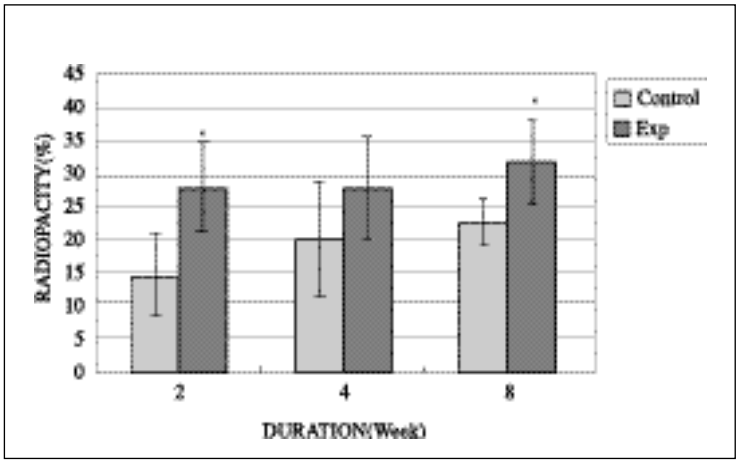

Figure 5. Radiodensitometric analysis of control and experimental groups
* : Statistically significant difference compared to control group($p<0.05$)

백서 두개골 결손부 내 신생골 길이는 대조군, 실험군 각각 2주에 102.91±25.46㎛, 219.46±97.81㎛, 4주에 130.95±39.24㎛, 212.39±89.22㎛, 8주에 181.53±76.35㎛, 257.12±51.22㎛와 같이 나타났다. 2주, 4주, 8주 모두에서 신생골 길이 평균이 대조군에 비해 실험군이 더 높게 나타났지만, 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 1, Figure 3).

2) 두개골 결손부 내 신생골 형성량

백서 두개골 결손부 내 신생골 형성량은 대조군, 실험군 각각 2주에 2962.06±1284.48㎛^{2}, 5194.88±1247.88㎛^{2}, 4주에 5103.25±1375.88㎛^{2}, 7751.43±2228.20㎛^{2}, 8주에 8046.02±818.99㎛^{2}, 15578.57±5606.55㎛^{2}로 나타났다. 2주, 4주, 8주 모두에서 대조군에 비해 실험군의 신생골 형성량 평균이 더 높게 나타났고, 2주와 8주에서 통계학적으로 유의한 차이($p<0.05$)를 보였다(Table 2, Figure 4).

3. 방사선 계측학적 관찰

1) 두개골 결손부 내 신생골 밀도

두개골 결손부 내 신생골 밀도 계측 결과는 대조군, 실험군 각각 2주에 14.26±6.33%, 27.91±6.65%, 4주에 20.06±9.07%, 27.86±8.20%, 8주에 22.99±3.76%, 32.17±6.38%로 나타났다. 2주, 4주, 8주 모두에서 대조군에 비해 실험군의 신생골 밀도 평균이 더 높게 나타났고, 2주와 8주에서 통계학적으로 유의한 차이($p<0.05$)를 보였다(Table 3, Figure 5, 18).

IV. 총괄 및 고찰

치주 치료의 최종 목적은 진행되는 치주 질환의 증상을 제거하는 것뿐만 아니라 이미 파괴된 지지조직을 기능적으로 재생시키는데 있다. 현재 파괴된 치주조직의 재생을 위해 골 이식술과 치주조직유도재생술이 행해지고 있다.

골 이식의 종류는 자가골 이식, 동종골 이식, 이종골 이식, 골 대체물과 합성골 이식으로 나눌 수 있다. 자가골 이식의 경우 수년간 치조골 결손 부위에서 임상적으로 성공적인 결과를 나타내었으나, 부가적인 수술 부위의 필요, 골유착 유발, 치근 흡수, 큰 결손부의 경우 충분한 양을 얻을 수 없다는 제한점이 있다. 동종골 이식이나 이종골 이식의 경우 광범위한 골 결손 부위에 이식하기가 적합하고 환자에게 부가적인 외상을 주지 않는 장점이 있으나, 질환 전염 가능성과 이식 항원에 대한 거부반응이 나타날 우려가 있다. 골 대체 물질 및 합성골 이식재는 골재생을 위한 공간 형성을 주목적으로 개발되었다. 그러나 이들은 골 형성, 백악질 형성, 섬유소 형성 능력이 의문시되고 있으며, 결합조직이 이러한 재료 사이에서 증식하는 충진재로서만 주로 작용하기 때문에 이를 극복하기 위한 재료의 개발이 필요하게 되었다.

키틴은 식물 섬유소인 셀룰로스와 비슷한 화학구조를 지니지만 분자 내에 아세틸기를 지니고 있어 화학약품에 대한 내성이 강하고 일반적인 유기용매에는 잘 녹지 않으며 맛이 떫다. 키토산은 반투명의 분말 형태로 pH 5.0 이상에서는 소수성을 띄기 때문에 수용액을 만들기 위해서는 산성의 용매를 사용해야 한다. 그러나 이런 산성 용매는 조직에 유해할 수 있어서 이번 실험에서는 용매에 의한 영향을 배제하기 위해 중합체를 올리고당 형태로 가수분해하여 쉽게 물에 녹을 수 있도록 만든 수용성 올리고당 키토산을 사용하였다. 키토산 적용 시, 소량의 생리식염수에 녹이면 갈색의 gel 상태를 이루며, 점착성을 띄어 결손부에서 유지되기 용이하였다.

키토산의 골재생 유도 능력을 평가하기 위해 백서 두개골 결손부 실험 모델을 선택하였다[28,29,30,31]. 암컷의 경우 호르몬 변화나 임신 등에 의해 실험 결과에 영향을 줄 수 있어 수컷만을 실험에 사용하였다. 미성숙한 동물은 성장이 완료된 동물에 비해 치유능이 더 우수하기 때문에 골대체 물질의 고유한 골재생 유도 능력을 평가하기 위해서 완전히 성숙한 동물을 선택하였다. 아무 처치를 하지 않았을 때 10% 이하의 골 재생을 이루는 가장 작은 크기의 결손부를 임계 크기 결손(Critical size defect, CSD)이라고 한다. 이번 연구에 사용한 백서(Sprague Dawley rat)의 두개골 모델에서의 임계 크기 결손은 지름 8mm의 원형 결손이다. 대부분의 동물에서 임계 크기 결손은 연령에 따라 작아지는데, 쥐의 경우에는 상대적으로 일정하다.

8mm 지름의 결손부를 형성하기 위해 8mm 지름의 trephine bur를 이용하였다. 두개골 결손부 골재생에 있어서 경뇌막의 역할이 중요하므로, 결손부 형성 시 손상시키지 않도록 주의하여야 한다. 쥐 이하의 하등 동물에서는 술 후 항생제 처치가 필요 없다.

이번 연구의 분석을 위하여 조직학적 소견 관찰, 조직 계측학적 비교와 방사선 계측학적 비교를 시행하였다.

Schmitz 등[32]은 백서 두개골 결손부 치유 과정을 염증기, 비유합 수립기, 성숙기로 구분하였다. 염증기는 술 후 10일까지로 염증이 존재하고 섬유소와 적혈구가 응집되어 혈종을 형성한다. 초기에는 호중구가 존재하다가 후반기에는 섬유모세포양 세포에 의해 대체된다. 7일째에 섬유모세포양 세포가 주를 이루는데, 말단부에서 초기 골형성이 관찰된다. 이 부위에서는 조골세포가 관찰된다. 기질 소포 안에는 무정형 물질과 결정이 포함되어 있다. 비유합 수립기는 11일부터 20일까지를 지칭하며 혈종의 크기가 줄어든다. 활성화된 섬유모세포는 많은 양의 조면소포체를 포함하며, 불규칙하게 배열된 교원

질 같은 섬유에 의해 둘러싸여 있다. 반도 형태의 신생골 주위로 불활성화된 조골세포가 열지어 있고 치밀한 섬유성 결합조직이 둘러싸고 있다. 결손부 중앙부에는 둥근 과립세포의 응집이 관찰된다. 14일째에는, 비유합 조직은 더 조직화된 섬유다발 속으로 교원질양 섬유가 배열된다. 본 연구에서도 대조군 2주 소견에서 반도 형태의 골조직 주위를 결손부 중앙부에 비해 더 치밀하고 조직화된 섬유다발이 둘러싸고 있는 양상을 관찰할 수 있었다. 성숙기는 21일 이후이며, 21일째에는 말단과 중앙부의 세포외기질이 성숙한 반흔조직의 특징을 보인다. 섬유모세포 사이에서 교원질이 치밀한 섬유다발 속으로 조직화된다. 조골세포로 둘러싸인 고립된 골섬도 관찰된다. 28일째에, 중앙부와 말단부에는 치밀한 섬유성 결합조직이 존재하며 골 주위로 방추형 세포가 둘러싸고 있다. 골수를 포함하는 골이 결손부의 경뇌막 쪽에 존재한다. 42일째에는 두껍고 잘 조직화된 교원질 섬유다발을 포함하는 성숙한 결합조직이 결손부 전역에 존재한다. 본 연구에서도 대조군에서 위와 같은 소견을 확인할 수 있었다.

골성장 양상에 있어서 대조군은 골재생이 주로 경뇌막과 절단면에서 일어나 삼각형 형태를 보였다. 반면 실험군은 키토산이 도포된 경뇌막과 절단면 뿐만 아니라 상부 골막 안쪽까지 잔존골 주변으로 골무와 같은 양상으로 골성장이 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다.

골성조직(osteoid)의 존재는 현재 골재생이 활발히 진행되고 있으며 향후에도 계속 진행될 것임을 알려준다. 대조군의 경우 2주와 4주까지는 신생골 전방에 골성조직이 위치해 있으나, 8주가 되면 골성조직이 관찰되지 않는다. 이는 골 성장이 거의 멈추었음을 의미한다. 반면, 키토산을 적용한 실험군의 경우에는 8주 소견에서도 신생골 전방에 골성조직이 두껍게 존재하며 그 주위에 조골세포가 줄지어 늘어선 것을 관찰할 수 있다. 이는 아직 골성장이 진행되고 있으며 앞으로도 길이 성장이 더 이루어질 수 있음을 시사한다.

조직 계측학적 비교에서는 신생골 길이와 면적에 대해 각각 비교해 보았다. 계측은 computer 화면상에 조직 슬라이드 상을 띄우고 Image Pro Plus® program을 이용하여 tracing하였다. 조직 절단은 잔존골 사이가 가장 먼 결손부 관상면 중앙을 선택하였다. 신생골 길이 측정은 조골세포의 이주 정도를 비교하기 위한 것으로, 좀 더 빨리, 그리고 좀 더 멀리 이주할수록 골유합의 가능성을 높일 수 있을 것이다. 길이 성장이 많이 이루어질수록 향후 두께 성장을 감안할 때 더 많은 양의 신생골을 형성할 수 있으리라 예상할 수 있다. 따라서 이식재료의 골유도 재생 능력을 평가하기 위한 좋은 지표라 사료된다. 계측 결과 2주, 4주, 8주 모두에서 대조군에 비해 실험군이 더 높은 평균치를 나타냈지만 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다.

골재생 유도 능력을 평가하기 위해 두 번째로 신생골 단면적을 계측함으로써 양적 비교를 시행하였다. 본 연구에서는 운반 매개체를 배제한 키토산만의 순수한 골재생 유도능력을 평가하려 하였다. 따라서 골재생을 위해 연조직의 개입을 막거나 공간을 제공하진 못하였기 때문에 이전의 연구[25]에 비해 적은 양의 골재생을 보였지만 대조군에 비해 2주, 4주, 8주 모두에서 더 높은 평균치를 보였으며, 2주와 8주에는 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다. 키토산은 glycosaminoglycan과 비슷한 구조적 특성을 지니고 있다. 그 중에서도 많은 조직의 세포외기질에서 발견되는 hyaluronic acid와 비슷하다. 교원질은 세포의 이주를 제한하고 재생을 방해하는 반면 hyaluronic acid는 조직 재생을 위한 전구세포의 이주와 분화를 촉진하는 것으로 생각되어 진다[33]. 이전의 연구에서, 키토산은 특정 전구 세포(예; 조골세포)의 이주와 분화를 증진시키는 기질 역할을 할뿐만 아니라 섬유모세포와 같이 골 형성을 방해하는 세포의 기능을 억제함으로써 직, 간접적으로 골재생을

증진시킨다고 보고되었다[17,34].

방사선 계측학적 비교는 골 성숙도를 평가하기 위한 것으로 신생골 광화 정도를 비교한 것이다. 각 개체의 방사선 상을 표준화하기 위해 같은 조사량과 노출하에, image plate type digital X-ray system의 Digora[2]를 이용하여 현상 조건을 표준화하였다. 방사선 상을 분석하기 위해 Brain3dsp[2]를 이용하였다[35,36,37,38,39]. 결손부 내 골밀도는 Figure 2와 같이, 결손부의 중앙부위()를 0으로, 결손부 변연부()의 골밀도를 100으로 설정하였다. 이런 설정하에, 결손부 중앙점에서 방사상으로 8 방향의 선을 지정하고 의 골밀도를 평균 내어 백분율로 나타내었다. 이는 골형성이 결손부의 변연부에서부터 이루어지고, 결손부의 중앙부위에 골재생이 가장 이루어지지 않는다는 가정 하에 설정한 것이다.

방사선 계측학적 분석 결과, 신생골 길이 및 면적과 마찬가지로 2주, 4주, 8주 모두에서 실험군이 대조군에 비해 더 높은 평균치를 나타내었고 통계학적으로 2주와 8주에서 유의한 차이를 나타내었다.

그러나, 이 분석은 단순히 결손부 내의 방사선 불투과성만을 비교한 것으로 골 이외의 연조직 두께나 잔존 이식재에 의한 오류를 배제할 수 없다. 또한 기존골밀도에 대한 상대적인 백분율를 측정한 것이기 때문에 기존골의 밀도에 따라서도 각 개체의 신생골 밀도에 영향을 받을 수 있을 것이다.

이상의 실험 결과에서, 키토산은 그 자체로 신생골 형성량과 신생골 밀도에 있어서 대조군에 비해 2주와 8주에 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 키토산은 그 자체의 골재생 유도 능력 외에도 여러 형태로 제작할 수 있는 장점이 있어 조직 공학 및 성장인자의 운반체로 이용하기 위한 많은 연구와 개발이 진행되고 있다.

향후 키토산의 골재생 유도 능력에 대한 작용기전과 치주 영역에서의 응용에 관한 심도 깊은 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결론

본 연구는 외과적으로 형성된 백서 두개골 결손부에서 키토산을 이식했을 때 골조직 재생 유도 능력을 조직학적, 조직 계측학적 및 방사선 계측학적으로 관찰, 평가하기 위해 실시하였다. 백서 두개골에 trephine bur를 이용하여 8mm 지름의 원형 결손부를 형성하고 대조군에는 아무것도 이식하지 않고, 실험군에는 수용성 키토산 50mg을 소량의 생리식염수에 녹여 gel 상태로 만든 후 결손부에 이식하였다. 술 후 2주, 4주, 8주에 희생하고 치유 결과를 조직학적, 방사선학적으로 비교 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백서 두개골 결손부 내 신생골 길이는 대조군, 실험군 각각 2주에 102.91±25.46㎛, 219.46±97.81㎛, 4주에 130.95±39.24㎛, 212.39±89.22㎛, 8주에 181.53±76.35㎛, 257.12±51.22㎛로 나타났다. 2주, 4주, 8주 모두에서 실험군의 신생골 길이 평균이 대조군에 비해 더 높게 나타났지만 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다.
2. 백서 두개골 결손부 내 신생골 형성량은 대조군, 실험군 각각 2주에 2962.06±1284.48㎛^{2}, 5194.88±1247.88㎛^{2}, 4주에 5103.25±1375.88㎛^{2}, 7751.43±2228.20㎛^{2}, 8주에 8046.02±818.99㎛^{2}, 15578.57±5606.55㎛^{2}로 나타났다. 2주, 4주, 8주 모두에서 대조군에 비해 실험군의 신생골 형성량 평균이 더 높게 나타났고, 2주와 8주에서 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$).
3. 백서 두개골 결손부 내 신생골 밀도 계측 결과는 대조군, 실험군 각각 2주에 14.26±6.33%, 27.91±6.65%, 4주에 20.06±

9.07%, 27.86±8.20%, 8주에 22.99±3.76%, 32.17±6.38%를 나타났다. 2주, 4주, 8주 모두에서 대조군에 비해 실험군의 신생골 밀도 평균이 더 높게 나타났고, 2주와 8주에서 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$).

이상의 결과에서 볼 때, 백서 두개골 결손부에 수용성 키토산을 적용한 경우 신생골 형성량과 신생골 밀도에 있어서, 키토산은 골조직 재생 유도 능력이 우수한 재료로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Melcher A.H.: On the repair potential of periodontal tissues, J. Periodontol., 47: 256 - 260, 1976.
2. Machtei E., Cho M., Dunford R., Norderyd J., Zambon J., Genco R.: Clinical, microbiological, and histological factors which influence the success of regenerative periodontal therapy, J. Periodontol., 65: 154 - 161, 1994.
3. Tonetti M., Pini Prato G., Cortellini P.: Factors affecting the healing response of intrabony defects following guided tissue regeneration and access flap surgery, J. Clin. Periodontol., 23: 548 - 556, 1996a.
4. Schallhorn R.G., Hiatt W.H., Boyce W.: Iliac transplants in periodontal therapy, J. Periodontol., 41: 566, 1970.
5. Aspinall G.O.: The polysaccharides. Chitin and chitosan, New York: Academic Press, Inc. 2: 386, 1983.
6. Amano K., Ito E.: The action of lysozyme on partially deacetylated chitin, Eur. J. Biochem., 85: 97 - 104, 1978.
7. Pangburn S.H., Trescony P.V., Heller J.: Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels, Biomaterials, 3: 105 - 108, 1982.
8. Shigemasa Y., Saito K., Sashiwa H., Saimoto H.: Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins, Int. J. Biol. Macromol., 16: 43 - 49, 1994.
9. Brandenberg G., Leibroch L.G., Shuman R., Malette W.G., Qiugley H.: Chitosan: A new topical hemostatic agent for diffuse capillary bleeding in brain tissue, Neurosurg., 15: 9 - 13, 1984.
10. Kind G.M., Bind S.D., Staren E.D., Templeton A.J., Economou S.G.: Chitosan: Evaluation of a new hemostatic agent, Curr. Surg., 47: 37 - 39, 1990.
11. Klokkevold P.R., Fukayama H., Sung E.C., Bertolami C.N.: The effect of chitosan (poly - N - acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits, J. Oral Maxillofac. Surg., 57: 49 - 52, 1999.
12. Klokkevold P.R., Lew D.S., Ellis D.G., Bertolami C.N.: Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits, J. Oral Maxillofac. Surg., 49: 858 - 863, 1991.
13. Muzzarelli R.A., Baldassarre M., Conti F., Ferrara P., Biagini B.: Biological activity of chitosan: Ultrastructural study, Biomaterials, 9: 247 - 252, 1988.
14. Muzzarelli R.A.: In vivo biochemical significance of chitin - based medical items, Polymeric Materials for Biomedical Applications(Eds S. Dumitriu and M. Szycher), Marcel Dekker, New York, USA, 1992.

15. Sandford P.A.: Chitosan: Commercial uses and potential applica - tions, In: Skjak - Braek G., Anthonsen T., Sandford P., eds. Chitin and Chitosan. London: Elsevier Applied Science, 51 - 70, 1989.
16. Balassa L.L., Prudden J.F.: Applications of chitin and chitosan in wound healing acceleration, In: Muzzarelli R.A., Pariser E.R., eds. Proceedings of the 1st International Conference on Chitin and Chitosan. Cambridge, MA: MIT Press, 1978.
17. Klokkevold P.R., Vandemark L., Kenney E.B., Bernard G.W.: Osteogenesis enhanced by chitosan (Poly - N - Acetyl Glucosaminoglycan) in vitro, J. Periodontol., 67: 1170 - 1175, 1996.
18. Muzzarelli R.A., Mattioli - Belmonte M., Tietz C., Biagini R., Ferioli G., Brunelli M.A., Fini M., Giardino R., Ilari P., Biagini G.: Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chi - tosan, Biomaterials, 15: 1075 - 1081, 1994.
19. Muzzarelli R.A., Zucchini C., Ilari P., Pugnaloni A., Mattioli Belmonte M., Biagini G., Castaldini C.: Osteoconductive properties of methyl - pyrrolidine chi - tosan in an animal model, Biomaterials, 14: 925 - 929, 1993.
20. Ueno h., Yamada H., Tanaka I., Kaba N., Matsura M., Okumura M., Kadosawa T., Fujinaga T.: Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs, Biomaterials, 20: 1407 - 1414, 1999.
21. Reynolds B.L.: Wound healing III: Artificial maturation of arrested regen - erate with an acetylated amino sugar, Am. Surgeon, 26: 113 - 117, 1960.
22. Sapelli P.L., Baldassare V., Muzzarelli R.A., Emanuelli M.: Chitosan in dentistry, Chitin in Nature and Technology, 507 - 512, 1986.
23. Muzzarelli R.A., Biagini G., Pugnaloni A., Filippini O., Baldassarre V.: Reconstruction of parodontal tissue with chitosan, Biomaterials, 10: 598 - 603, 1989.
24. Muzzarelli R.A., Biagini G., Bellardini M., Simonelli L., Castaldini C., Fratto G.: Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery, Biomaterials, 14: 39 - 43, 1993.
25. 계승범, 손성희, 최상묵: Chitosan과 chitosan - cellulose를 이용한 차폐막의 골조직 재생유도능력에 관한 연구, 대한치주과학회지, 28: 611 - 630, 1998.
26. Lee Y.M., Park Y.J., Lee S.J., Han S.B., Choi S.M.: Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges, J. Periodontol., 71: 410 - 417, 2000.
27. Lee Y.M., Park Y.J., Lee S.J., Ku Y., Han S.B.: The bone regenerative effect of platelet - derived growth fac -

tor - BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier, J. Periodontol., 71: 418 - 424, 2000.
28. Caton J., Mota L., Gandini L., Laskaris B.: Non - human primate models for testing the efficacy and safety of periodontal regeneration procedures, J. Periodontol., 65: 1143 - 1150, 1994.
29. Kleinschmidt J.C., Hollinger J.O.: Animal models in Bone research, Basic science of bone graft healing, chapter 13: 133 - 146.
30. Schmitz J.P., Hollinger J.O.: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunoins, Clin. Orthop. 205: 299 - 308, 1986.
31. Selvig K.A.: discussion: Animal models in reconstructive therapy, J. Periodontol., 65: 1169 - 1172, 1994.
32. Schmitz J.P., Schwartz Z., Hollinger J.O., Boyan B.D.: Characterization of rat calvarial nonunion defects, Acta Anat., 138: 185 - 192, 1990.
33. Adzick N.S., Longaker M.T.: Characteristics of fetal tissue repair. In: Adzick N.S., Longaker M.T. eds. Fetal wound healing, New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc. 53 - 70, 1992.
34. Mallette W.G., Quigley H.J., Adickes E.D.: Chitin in nature and technology, In: Muzzarelli R.A., Jeuniaux C., Gooday G.W., eds. Chitosan Effect in Nature and Technology. New York: Pleum Press, 435 - 442. 1986.
35. Benn D.K.: Automatic analysis of radiographic images: I. Theoretical considerations, Dentomaxillofac. Radiol., 19: 187 - 192, 1991.
36. Benn D.K.: Automatic analysis of radiographic images: II. Software implementation and testing on bitewing radiographs, Dentomaxillofac. Radiol., 19: 193 - 199, 1991.
37. Br gger D., Pasquali L., Rylander H.: Computer - assisted densitometric image analysis in periodontal radiography. A methodological study, J. Clin. Periodontol., 15: 27 - 37, 1988.
38. Hildebolt C.F., Walkup R.K., Conover G.L.: Histogram - matching and histogram - flattening contrast correction methods: a comparison, Dentomaxillofac. Radiol., 25: 42 - 47, 1996.
39. Versteeg C.H., Sanderink G.C.H., Geraets W.G.M., van der Stelt P.F.: Impact of scale standardization on images of digital radiography systems, Dentomaxillofac. Radiol. 26: 337 - 343, 1997.
40. Brunel G., Piantoni P., Elharar F., Benque E., Marin P., Zahedi S.: Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: Influence of collagen cross - linking, J. Periodontol., 67: 1342 - 1348, 1996.
41. Ito M., Yamagishi T., Sugai T.: Experimental development of a chitosan - bonded hydroxyapatite bone filling paste, J. Jpn. Soc. Dent. Mater. Devi., 9: 608 - 616, 1990.
42. Koyano T., Minoura N., Nagura M., Kobayashi K.: Attachment and growth of cul - tured fibroblast cells on PVA/chitosan - blended hydrogels, J. Biomed. Mater. Res., 39:

사진부도 (I)

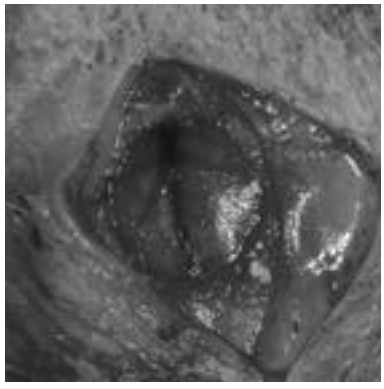

Figure 6. Defect preparation

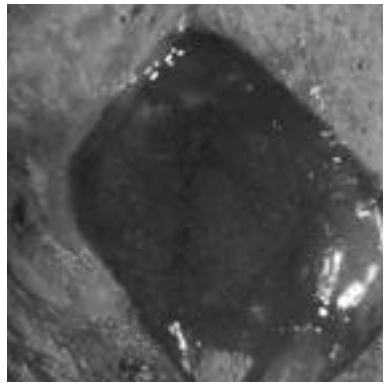

Figure 7. Soluble chitosan application

Figure 8. Control, 4 weeks(HX×10)

Figure 9. Exp., 4 weeks(HX×10)

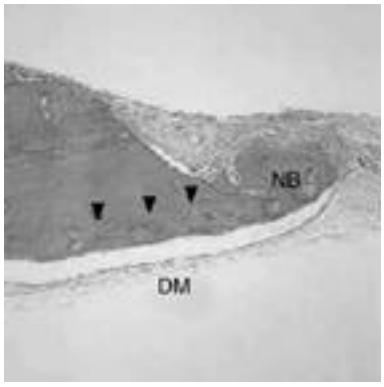

Figure 10. Control, 2 weeks(HX×100)

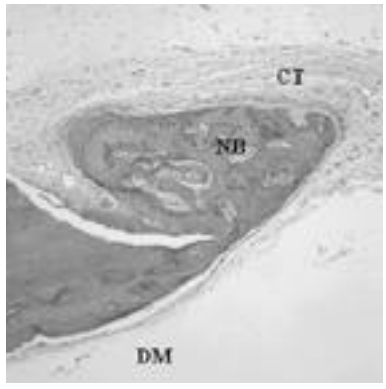

Figure 11. Exp., 4 weeks(HX×100)

사진부도 (Ⅱ)

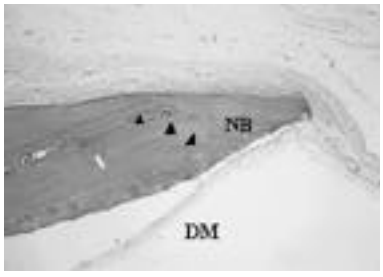

Figure 12. Control, 8 weeks(HX×100)

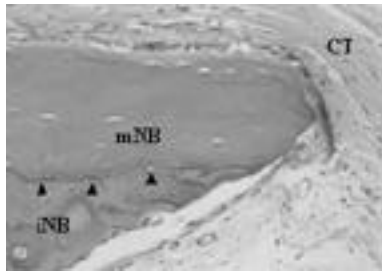

Figure 13. Control, 8 weeks(HX×400)

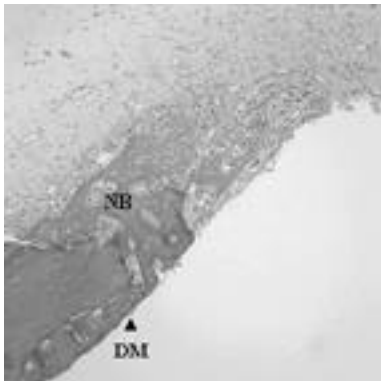

Figure 8. Control, 4 weeks(HX×10)

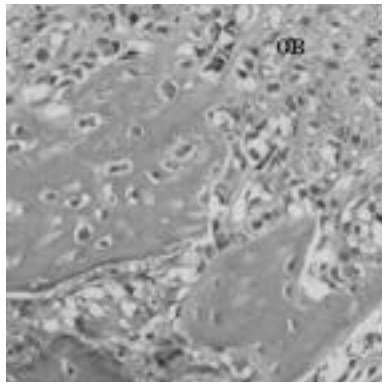

Figure 9. Exp., 4 weeks(HX×10)

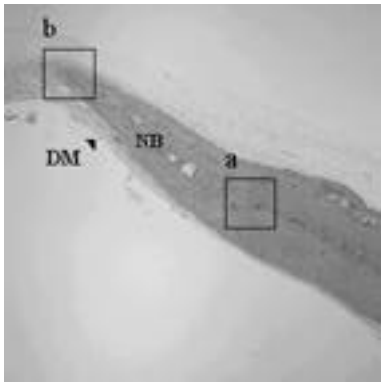

Figure 16. Exp., 4 weeks(HX×40)

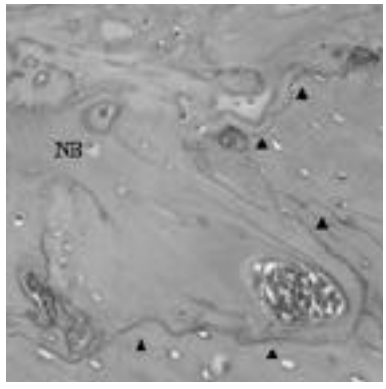

Figure 16 - a. Exp., 4 weeks(HX×400)

사진부도 (Ⅲ)

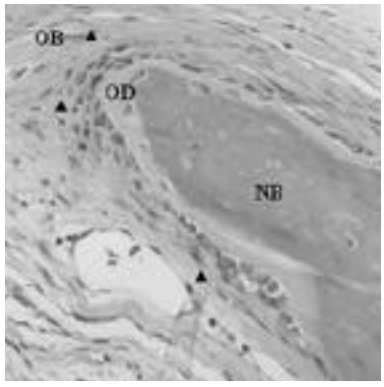

Figure 16 - b. Exp., 4 week(HE×400)

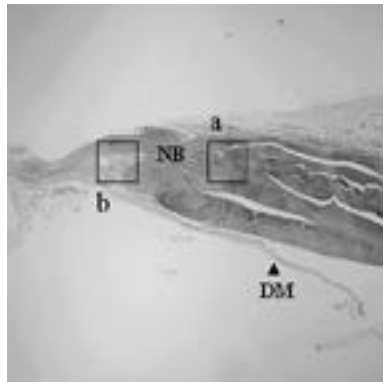

Figure 17. Exp., 4 week(HE×400)

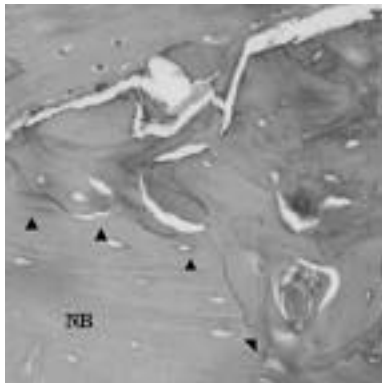

Figure 17 - a. Exp., 8 week(HE×400)

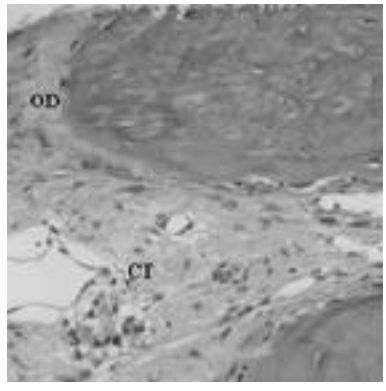

Figure 17 - b. Exp., 8 week(HE×400)

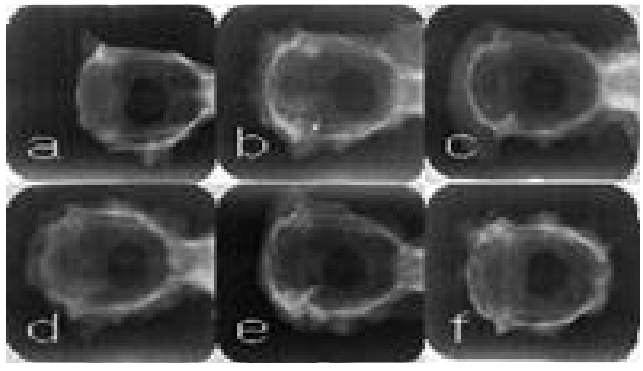

Figure 18. Digital images taken by Digora®

486 - 490, 1998.
43. Mima S., Miya M., Iwamoto R., Yoshikawa S.: Highly deacetylated chitosan and its properties, J. Appl. Polym. Sci., 28: 1909 - 1917, 1983.
44. Minami S., Okamoto A., Matsuhashi A., et al.: Applications of chitin and chitosan in animals, In: Brine C.J., Sanford P.A., zikakis J.P., eds.: Advanced in chitin and chitosan. London: Elsevier Applied Science, 61 - 69,1992.
45. Tokura S., Nishi N., Noguchi J.: Studies on chitin III. Prepatation of chitin fibers, Polymer J., 11: 781 - 786, 1979.
46. Tomihata K., Ikada Y.: In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, Biomaterials, 13: 567 - 575, 1997.
47. Waynforth H.B.: Experimental and surgical technique in the rat, second edition.

사진부도 설명

Figure 6.The calvarial defect was produced to measure 8 mm in diameter with a trephine bur.
Figure 7.Soluble chitosan gel was applied to the calvarial defect.
Figure 8.Untreated control defect, 4 weeks after operation. Arrows indicate the margins of defect. (H - E×10)
Figure 9.Chitosan applied to the experimental defect, 4 weeks after operation. Arrows indicate the margins of defect. (H - E×10)
Figure 10.Control group, 2 weeks after operation. Arrows indicate the interface between the existing bone and the newly formed bone. The new bone formed beside the margin of defect and in the deep layer of the dura mater. The newly formed bone was surrounded with densely packed collagen fiber bundles(NB: new bone, DM: dura mater). (H - E×100)
Figure 11.Control group, 4 weeks after operation. The dura mater and the periosteum was intact and well organized. Surrounding connective tissue was also well organized. Osteoid could be observed in front of woven bone(CT: connective tissue). (H - E×100)
Figure 12.Control group, 8 weeks after operation. Arrows indicate the margin of defect. Bone formation was limited. Osteoblasts were decreased. (H - E×100)
Figure 13.Control group, 8 weeks after operation. Arrows indicate the interface between the mature bone and the immature bone(mNB: mature new bone, iNB: immature new bone). (H - E×400)
Figure 14.Experimental group, 2 weeks after operation. (H - E×100)
Figure 15.Note the diffuse distribution of osteoblasts and blood vessels beside the margin of defect(OB: osteoblast). (H - E×400)
Figure 16.Experimental group, 4 weeks after operation. (H - E×40)

Figure 16 - a. Arrows indicate the margin of defect. It was difficult to distinguish between the matured new bone from the existing bone. (H - E×400)

Figure 16 - b. Active osteogenesis was proceeding(OD: osteoid). (H - E×400)

Figure 17.Experimental group, 8 weeks after operation. (H - E×40)

Figure 17 - a. Arrows indicate the margin of defect. (H - E×400)

Figure 17 - b. Osteogenesis seemed to be still proceeding. Osteoid still existed in front of newly formed bone. (H - E×400)

Figure 18.Digital images taken by Digora^{2} (a: control group, 2 weeks; b: control group, 4 weeks; c: control group, 8 weeks; d: experimental group, 2 weeks; e: experimental group, 4 weeks; f: experimental group, 8 weeks)

Key word : regeneration, chitin, chitosan, calvarial critical size defect

- Abstract -

The Bone Regenerative Effects of Chitosan on the Calvarial Critical Size Defectin Sprague Dawley Rats

Ui Won Jung, Jong - Jin Suh, Seong - Ho Choi, Kyoo - Sung Cho, Jung - Kiu Chai, Chong - Kwan Kim

Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University
Research Institute for Periodontal Regeneration

The major goals of periodontal therapy is the functional regeneration of periodontal supporting structures already destructed by periodontal disease as well as the reduction of signs and symptoms of progressive periodontal disease. There have been many efforts to develop materials and therapeutic methods to promote periodontal wound healing.

There have been increasing interest on the chitosan made by chitin. Chitin is second only to cellulose as the most abundant natural biopolymer. It is a structural component of the exoskeleton of invertebrates(e.g., shrimp, crabs, lobsters), of the cell wall of fungi, and of the cuticle of insects. Chitosan is a derivative of chitin made by deacetylation of side chains. Many experiments using chitosan in various animal models have proven its beneficial effects.

The aim of this study is to evaluate the osteogenesis of chitosan on the calvarial critical size defect in Sprague Dawley rats. An 8 mm surgical defect was produced with a trephine bur in the area of the midsagittal suture. The rats were divided into two groups: Untreated control group versus experimental group with 50mg of soluble chitosan gel. The animals were sacrificed at 2, 4 and 8 weeks after surgical procedure. The specimens were examined by histologic, histomorphometric and radiodensitometric analyses. The results are as follows:

1. The length of newly formed bone in the defects was 102.91±25.46㎛, 219.46±97.81㎛ at the 2 weeks, 130.95±39.24㎛, 212.39±89.22㎛ at the 4 weeks, 181.53±76.35㎛ and 257.12±51.22㎛ at the 8 weeks in the control group and experimental group respectively. At all periods, the means of experimental group was greater than those of control group. But, there was no statistically significant difference between the two groups.
2. The area of newly formed bone in the defects was 2962.06±1284.48 ㎛^{2}, 5194.88±1247.88㎛^{2} at the 2 weeks, 5103.25±1375.88㎛^{2}, 7751.43±2228.20㎛^{2} at the 4 weeks and 8046.02±818.99㎛^{2}, 15578.57±5606.55㎛^{2} at the 8 weeks in the control group and experimental group respectively. At all periods, the

means of experimental group was greater than those of control group. The experimental group showed statistically significant difference to the control group at the 2 and 8 weeks.

3. The density of newly formed bone in the defects was 14.26±6.33%, 27.91 ±6.65% at the 2 weeks, 20.06± 9.07%, 27.86±8.20% at the 4 weeks and 22.99±3.76%, 32.17±6.38% at the 8 weeks in the control group and experimental group respectively. At all periods, the means of experimental group was greater than those of control group. The experimental group showed statistically significant difference to the control group at the 2 and 8 weeks.

These results suggest that the use of chitosan on the calvarial defects in rats has significant effect on the regeneration of bone tissue in itself