

흡수성 차폐막에 배양된 구개관세포의 증식양상의 비교

이창훈 · 이만섭 · 권영혁 · 박준봉 · 허 의

경희대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

다양한 원인으로 인하여 발생한 치은염증은 치주낭 형성에서부터 치아상실에 이르기까지 단계적인 치주조직 파괴의 병리현상을 나타낸다. 그러나 치주조직재생은 치조골과 백악질이라는 두 개의 경조직 사이에 새로운 연조직 형성이라는 구조적 특이성으로 인하여 이상적인 치유형태를 얻기가 어렵다¹⁾. 조직학적 관점에서 치주치료의 목표는 교원질 섬유를 포함한 결체조직의 부착과 백악질, 골조직 재형성을 유도할 수 있는 적절한 세포가 결손부로 이주하여 부착과 증식, 분화를 통해서 조직의 재생을 도모하는 것이어야 한다²⁾.

현재까지 치주과학영역의 조직재생을 위해서 염증성 병소의 단순제거³⁾, 치근면처리를 통한 치유 활성 촉진⁴⁻⁷⁾, 치주관막술의 다양화^{8,9,10)}, 각종 이식재 삽입¹¹⁻¹⁶⁾ 및 골유도 혹은 골형성물질 사용¹⁷⁻²³⁾ 등 다양한 방법이 제시되었으나 단일 시술만으로 이상적인 치주조직재생을 얻을 수 있는 치료법은 없는 실정이다.

창상치유는 해당부에 도착된 세포의 종류에 따라 그 조직형이 결정는 보고^{1,2)}를 근거로 선택적 조직재생을 도모하는 조직재생유도술이 Nyman(1982)²⁴⁾에 의해 처음 보고된 후 다양한 연구들이 보고^{25, 26)}되었

다. 그러나 조직유도재생술은 사용된 차폐막을 제거하기 위해 2차수술이 필수적으로 요구되는 문제점이 남아있다.²⁷⁾ 이러한 단점을 해결하기 위하여 생분해성 차폐막에 대한 연구가 진행되어 Type I collagen^{28,29)}, polyglactin 910²⁶⁾, polylactidepolyglycolide copolymer³⁰⁾, polyurethane³¹⁾, polylactic acid³²⁾ 등이 보고되었다.

골조직재생을 위한 다양한 치료재료의 개발중 최근에 활발한 분야는 재료공학과 세포공학 분야이다. Vacanti 등 (1991)³³⁾은 체내에서 생흡수되는 중합체를 개발하여 이를 담체로하여 연골세포와 골막세포 (Vacanti 등 1993)를 이식하여 조직을 형성하려고 시도³⁴⁾하였다.

Cilento (1994)³⁵⁾가 체외에서 배양된 세포도 생체 내에서 성숙된 세포와 동일한 표현형을 갖는다는 사실을 증명하여 실험실에서 배양한 세포의 생체내 접합에 관한 연구들이 활발히 일어났다. 임상의학분야에서 세포공학은 혈액의 ABO형 수혈학의 보편화를 이루었으며 혈관외과학에서는 내피세포의 세포 접목술^{36,39)}이 임상 적용단계에 왔으며 근육조직의 재생⁴⁰⁾이 추구되기도 하였다. 또한 간 기능의 회복을 위해 간세포의 이식⁴¹⁾연구에도 응용되고 있고 성형외과학이나 피부과 영역에서는 화상 환자에게 배양

된 세포의 도포로 조직 재생률을 극대화하기도 하였고^{42,43)}, 신경외과와 안과 영역 및 정형외과학^{44,45)}에서도 배양세포의 응용에 대한 연구들이 진행되고 있는 실정이다. 특히 피부-성형외과영역에서 진피세포를 배양하여 화상이나 피부궤양등 분야에 응용되어 Contard⁴⁶⁾, O'Connor⁴⁷⁾ (1978)등의 실질적인 활용을 보고하였다.

치의학분야에서도 Boyko등(1981)⁴⁸⁾이 치아전이술(transplantation)에 치주인대세포의 적용을 시도하기도 하였고 Van Dijk(1991)⁴⁹⁾은 치주인대 섬유아세포를 조직재생에 응용한 바 있다. 또한 Simon-Sato 등(1999)⁵⁰⁾은 세포운반 차폐막은 조직유도재생술 치유과정 중 치은조직의 치유속도를 변화시킨다고 하였다.

그러나 세포를 배양하여 생체내로 이식하는데는 기질이 되는 세포와 친화력이 우수한 매개체 즉 담체의 선정이 중요하다. 세포운반 담체에 대해 Cheung과 Haak(1989)⁵¹⁾은 소공성 인산칼슘을 사용한 바 있고, Bagambisa와 Joos (1990)⁵²⁾는 Hydroxyapatite상의 조골세포의 형태관찰을 시도한 바 있으며 Puelo 등(1991)⁵²⁾은 소공성 골대체물과 배양조골세포의 접합성에 대해 Thaller등 (1994)⁵³⁾은 골광물질과 콜라겐을 병용 골결손부 치료 술식 가능성을 확인하기도 하였다.

Langer와 Vacanti(1993)⁵⁴⁾는 polyglycolic acid (PGA)와 polylactic acid (PLA)의 생체접합성을 연구하였고, Mooney등(1994)⁵⁵⁾은 교원질 스폰지와 생분해성 PGA와 PLA⁵⁶⁾를 재료로 이용하여 조직적합성을 검증하였다. Levy등 (1994)⁵⁷⁾은 polylactic acid film의 임상응용 가능성을 주장하였고 국내에서도 생분해성 차폐막이 개발되어 조직재생 효과에 대한 연구보고⁵⁸⁾가 발표된 바 있다.

그외에 콜라겐에 세포를 접목하여 담체로 응용 가능성을 연구한 Pellen-Mussi (1997)⁵⁹⁾과 수종의 콜라겐을 기질로 섬유아세포를 시적한 연구도 (Nsal 1999)⁶⁰⁾에 의해 시도된 바 있다.

그러나 현재까지의 연구들은 조직의 접합성에 관점을 두고 시행된 연구로서 사용된 여러 종류의 차폐막에 대한 배양골세포의 접목에 대한 효과비교는

아직 미미한 상태이다. 이번 연구는 현재 임상에서 사용되는 흡수성차폐막이 조직친화성이 높고 생체 내에서 흡수된다는 점을 근거로 여러 종류의 흡수성 차폐막을 대상으로 골세포를 접목하여 세포부착과 전개가 용이하고 증식이 빠른 매개체를 선정하는 것이 조직재생에 효과적이라는 판단되어 본 실험을 실시하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 백서 두개관세포 배양

단위시간이내 다량의 백서 두개관세포를 배양하기 위해 순종으로 사육된 평균체중 150gm 내외의 Sprague-Dawley계 웅성백서 30마리를 이용하였다. Pentobarbital Sodium (Tokyo Industrial Chem., Japan)을 30mg/kg의 용량으로 복강 마취한 후 75% 알코올로 두피를 세척소독하고 두경부를 탈락하여 희생시켰으며 외과용 가위로 두피를 절개한 후 두피를 박리하였다. 두개관을 분리하고 연조직을 완전히 제거한 후 얇은 골편을 세절하여 200U/ml Penicillin (Gibco, USA)과 200 µg/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 초기 배양액인 20% Fetal Bovine Serum(FBS)와 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco, USA)이 포함된 DMEM을 넣고 37°C, 습도 100%, 5% CO₂ 공기혼합배양기 (Vision, Korea)에서 배양하였다. 완전히 밀생된 것을 확인한 후 1:3의 비율로 계대배양하고 2세대가 경과후 계대 배양액인 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 표준 DMEM 배양액으로 3일간격으로 배양액을 교환하면서 배양하였고 본 실험에는 제 4-7세대의 세포를 사용하였다.

2) 실험재료

세포가 부착될 기질표면의 차이를 비교하기 위해

여 세포배양술에 일반적으로 이용되는 Microcover plate (Matsunami Co, Japan)를 평활형 (Smooth type, SM)이라 하고 이를 대조군으로 하여 30, 60분, 2, 6, 12 및 24시간 배양하였고 이와 비교될 실험군의 흡수성 차폐막 3종류로 분류하고 0.5, 2 및 5일 배양하였다. 즉 1군을 섬유망 크기와 방향이 일정한 규칙을 가지고 있지 않은 형태인 산개형 (Scattered, ST type)으로 흡수성 콜라겐 차폐막 (Biomend, USA)을 선정하였고, 2군으로는 편극형 (Polarized, PL type) 기질로 그 표면형태가 일정한 방향으로 배열된 섬유망이 일정한 형태인 흡수성 콜라겐 차폐막 (Bio-Gide, Osteohealth Co, Switzerland)을 대상으로 결정하고, 3군은 세망형 (Fine net, FN type) 기질로 미세한 섬유사가 거의 일정한 형태로 직조된 흡수성 콜라겐 차폐막 (CollaTape, SULZER medica, USA)을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포접목체 제작

각 종류대로의 흡수성 차폐막을 시료로 하여 1x1 cm의 크기로 절개한 다음 생분해성 차폐막을 산화에 탈렌가스로 소독하여 이를 세포배양접시에 넣고 그 표면에 1x10⁶ cells/ml의 수로 세포부유층에 4시간 이상 적용하여 세포가 부착하도록 한 후 배양액을 교환하고 이를 세포이식체로 하였다. 배양조건은 계대배양과 동일한 방법으로 시행하였다.

2) 주사전자현미경 관찰

세포접목후 12, 48시간 그리고 3일동안 배양한 후 세포이식체를 0.1M 인산 완충 생리식염수로 세척한 후 2.5% Glutaraldehyde (0.1M PBS, pH 7.4, Junsei Chemical Co, Ltd)로 고정한 후 PBS (Dubecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco BRL)로 2-3회 세척하였다. 그리고 1% OsO₄ (Sigma, USA) in 0.1M PBS(pH 7.4)로 2시간동안 후 고정을 한 다음 PBS로 한 시간동안 세척한 후 2% Tannic acid in 0.1M PBS (pH7.4)로 2시간 혹은 24시간 처리하였다. 그후 1% OsO₄로 2시간 동안 처리한 후 일련의 에틸알콜을 이

용하여 탈수하고 3% Uranyl acetate로 1시간 동안 처리한 후 Hemamethyldisilazane (HMDS, Polysciences Inc., USA)을 이용하여 건조시킨 다음 Silver paste로 부착시켜 Ion coater (IB-3 Ion coater, Eiko engineering Co. Ltd, Japan) 기를 이용하여 금박을 피복한 후 주사전자현미경 (S-2300, Hitachi Co., Japan)으로 20 kVp상황에서 관찰 촬영하였다.

III. 실험성적

1. 세포부착 기질이 평활면인 경우 배양 30분후 두 개관세포는 전체적으로 표면에 많은 주름을 가진 구형으로 나타났으며 미약하나마 얇은 판모양의 세포돌기인 박판상돌기 (lamellipodia)가 나타났다(Figure 1-1).
2. 평활면에서 배양 60분 후 역시 전체적인 세포의 형은 구상을 보였으나 박판상돌기는 점차 그 정도가 약화되고 세포는 점차 기질인 바닥에 넓게 확장되어 초기부착의 진행을 관찰할 수 있었다(Figure 1-2).
3. 세포부착 기질이 평활면인 경우 세포배양 2시간 경과후 세포의 전반적인 양상은 섬유아세포의 방추형을 띠기 시작하고, 박판상돌기는 점차 약화되고 세포 가장자리에는 세사상돌기 (filopodia)가 나타나는 부착양상이 관찰되었다 (Figure 1-3).
4. 배양 6시간이 경과후 대부분의 세포는 배양 2시간과 유사한 양상을 보였으나 핵부위는 더욱 얇아지고 세포의 가장자리에는 수많은 미세융모가 관찰되었다(Figure 1-4).
5. 세포부착 기질이 평활면인 경우 배양 12시간이 경과후 세포는 그 외형은 극성이 명확하고 전형적인 섬유아세포상이었고 일부에서는 세포분열상을 관찰할 수 있었다(Figure 1-5).
6. 24시간 배양한 세포는 신장된 외형을 보이면서 더욱 명확한 전개양상을 보였고, 가끔 세포 가장자리에 따라 미세융모도 관찰되었다. 핵은 세포외형과 유사하게 타원형으로 변하였으며 점차 미약해지기 시작하였다(Figure 1-6).

7. 산개형 흡수성 콜라겐 차폐막 표면의 광학대상으로 차폐막은 수많은 소공으로 구성되어 있어 세포돌기의 흡착이 용이하도록 구성되어 있다 (Figure 2-1).
8. 산개형 흡수성 콜라겐 차폐막 표면에 두개관세포를 배양한 경우로 세포는 섬유아세포 고유의 형태를 유지하면서 굵은 세포돌기를 내어 불규칙한 차폐막 표면에 부착된 양상을 관찰할 수 있다(Figure 2-2).
9. 산개형 흡수성 차폐막표면에 세포를 48시간 배양한 소견으로 타원형을 이룬 세포는 불규칙한 차폐막 표면에 견고하게 부착된 형상을 나타내고 있다(Figure 2-3).
10. 산개형 차폐막 표면에 두개관세포배양 5일후로 완전히 차폐막과 결합된 양상을 보이고 있다(Figure 2-4).
11. 편극형 흡수성 차폐막의 주사전자현미경 소견으로 표면은 미세하고 수많은 섬유소들이 한 방향만으로 짜여진 직조형으로 나타났다 (Figure 3-1).
12. 세포부착 12시간후의 양상으로 편극형 흡수성 차폐막 표면에 두개관세포가 섬유망사이로 세포돌기를 내어 견고하게 부착된 양상을 보였다(Figure 3-2).
13. 세포배양 48시간후의 소견으로 편극형 흡수성 차폐막 표면에 둥근 외형의 세포가 견고하게 부착된 양상이 관찰되었다(Figure 3-3).
14. 차폐막 표면의 섬유소사이에 세포가 48시간 배양한 경우와 유사한 양상을 보였다(Figure 3-4).
15. 세망형 흡수성 차폐막의 주사전자현미경 소견으로 미세한 그물모양의 외형을 보였다(Figure 4-1).
16. 세망형 흡수성 차폐막표면에 12시간동안 세포를 배양한 소견으로 둥근형태의 세포가 세망 사이에서 발견되었다(Figure 4-2).
17. 세망형 흡수성 차폐막에 48시간 세포를 배양한 소견으로 방추형 섬유아세포가 세망사이에 세포돌기를 내서 견고히 부착되었고 점차 극

성을 띄기 시작하여 고유한 섬유아세포상을 보였다(Figure 4-3).

18. 세망형 흡수성 차폐막표면에 5일간 세포를 배양한 후의 소견으로 차폐막에 부착된 세포돌기가 더 굵고 길레 나타났다(Figure 4-4).

IV. 총괄 및 고찰

연조직 치유는 상피세포가 혈관을 비계삼아 창상 심부로 이주하고, 세포끼리 접촉하여 접촉저해 현상이 나타나면 세포들은 분화하여 신속한 속도로 증식하여 중층배열로 환원된다. 창상심부의 섬유아세포는 급속히 증식하여 새로운 결합조직구성 물질을 생성하며 점진적으로 혈관이 제거되어 육아조직으로 대체되는 과정을 밟는다.⁶¹⁾ 그러나 치주조직은 치근 표면의 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.⁵⁵⁾

Schallhorn (1977)¹⁵⁾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.²⁴⁾

창상치유부는 이주된 세포형에 따라 좌우된다는 연구보고^{1,48)} 에 따라 Nyman(1982)²⁾은 상피세포의 근침단부로 우선적 이주를 차단하고 결합조직으로부터의 세포증식을 방지하고 치주인대와 치조골로부터 세포의 분화증식을 도모하여 신부착이 형성되는 것을 기대하였다. 이렇게 바람직한 조직을 선택

적으로 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.²⁷⁾

골조직 결손시 회복에 가장 중요하게 영향을 미치는 것은 신생골을 형성할 조골세포가 중퇴조직으로부터 얼마만큼 존재하는가의 여부이다. 즉 3벽성 골결손부가 조골세포가 분화될 수 있는 면적이 넓어 골재생이 용이하다.⁶³⁾ 또한 동일한 골면적과 치근막면적에서도 증식될 골세포수는 다르고 또한 1개의 골세포가 생산되는 골기질량도 차이가 있다고 판단되기 때문에 기질형성능력이 왕성한 조골세포의 수가 가능한 많아야 하므로 결손부위에 있어서 조골세포를 유도, 활성화하는 물질도 양적 및 질적으로도 우수해야 한다는 보고⁶⁴⁾가 있었다.

자가 또는 동종골 이식의 문제점은 자가조직은 충분한 양을 얻을 수가 없고 동종골은 일부는 흡수되어 최종적으로 생착된 조직의 양을 예측할 수 없다는 점에서 임상 적용에 한계가 있다. 이러한 약점을 보완하기 위하여 합성골 혹은 골대체물질들이 개발되어 인공보형물로 사용되기 시작하였다. 그러나 이러한 물질들은 시술과정에서 탈락되거나 유출되기도하고 생체내에서 염증을 야기하거나 조직반응을 일으키는 경우가 있어 이상적인 재료로 사용하기에는 문제점이 아직 남아 있다. 이러한 단점을 해결하려는 또하나의 노력은 재료공학과 세포공학의 발달이다. Vacanti 등(1991)³³⁾은 체내에서 생흡수되는 중합체를 개발하여 이를 담체로하여 연골세포와 골막세포를 접목한 바 있다.

Galletti(1992)⁶⁵⁾는 활성인공장기 (Bioartificial organs)를 Bionic organ, hybrid artificial organ, organoids 혹은 Bioimplants라고 불리우는 생명공학

의 일부로서 장기이식과 대체장기의 실질적인 합병술을 의미한다고 하였고, 활성인공장기는 구조적 기구와 내부활성형 기구의 2개의 범주로 구분하였다. 즉 구조적 기구는 이물반응 야기없이 생체일부를 대신가능한 보철물로 대처하는 것이라 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 흡수서 물질로 약제등을 포함시킬 수 있기 때문에 급성중독, 신부전, 몇몇 형태의 일부 급성 간기능부전등의 치료에 응용되고 있고 효소를 내재시킨 인공세포는 선천성 효소결핍증등의 치료를 위한 시도들이 진행되고 있다.⁹²⁾ 1920년대 초기 혈액의 ABO형에 대한 문제들이 밝혀진 이후로 많은 발전을 가져온 세포이식술은 1930년 대에 이르러 동물세포들의 이식이 시도되어 왔으며 지연형 과민반응에 대한 연구가 실시되었고, 피부이식시 면역 거부반응이 규명되었다. 연이어 1950년대에 와서 HLA antigen에 대한 동정과 이해가 진전되었고 신장이식이 성공을 거두었다. 1960년대에서는 6-mercaptapurine이 개발되어 최초로 면역억제법이 개발되었고 1970년대에는 모든 분야에서 장기이식술은 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 장기간동안의 정기검진을 비롯한 의과적 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 생체조직공학의 발전은 의학발전을 가져오는 계기가 되었다. 세포공학의 발달은 체외에서 세포를 대량으로 배양하는 기술발달로 약 1Cm² 크기의 조직으로 8주내 4.202m² 이상의 면적을 덮을 수 있는 수의 세포를 생산하게 되었다.³⁵⁾ Cilento (1994)가 체외 배양증식된 세포가 정상적인 분화과정으로 성숙할 수 있는가를 연구하여 생물학적 기초적 연구자료를 나타내었다. 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 기술이 Gallico 등 (1989)⁴²⁾과 Kumagai(1988)⁶⁶⁾되었으나 Kumagai(1994)⁶⁷⁾는 성형외과 영역에서 9명의 문신환자의 치료를 위해 진피의 심층까지 제거한 후 배양상피세포의 자가이식을 시행하였다. 창상부에는 출혈방지를 위해 에피네프린 처리된 거즈를 5분 압착한 후 지혈되면 fibrin glue를 바르고 petroleum jelly로 도포하고 건조거즈를 피복하여 적당한 치유 결과를 얻은 바 있다. 그외 일반의학에의 응용으로는 혈관외과학에서는 내피세포의 세포접목술이 Herring등(1978)³⁶⁾, Graham등(1980)³⁷⁾, Budd등(1991)³⁸⁾, Mosquera등(1991)³⁹⁾에 의해 임상 적용단계에 왔으며 근육조직의 재생⁴⁰⁾도 추구하기도 하였다. 또한 간기능의 회복을 위해 간세포의 이식이 Jauregui와 Gann(1991)⁴¹⁾에 의해 연구되어 임상응용이 시도되고 있고, 신경외과와 안과영역 및 정형외과^{44,45)}에서도 배양세포의 응용에 대한 연구들이 진행되고 있는 실정이다.

Mazzucotelli⁶⁸⁾는 1993년 심장박동기에 내피세포 접목은 혈구친화력과 혈관이식후 장기간 유지의 개선을 유도하는 좋은 방법이라는 보고를 근거로 적절한 세포수, 환경이 필요하고 적당한 분산을 위해 기구개발로 균일한 세포분산을 도모하는 단계에 이르렀다. 1991년 Cima⁶⁹⁾는 생분해성 중합체를 이용하여 약제와 세포이식을 함유하는 동시에 영양분도 공유할 수 있는 매개체개발을 보고한 바 있다.

피부-성형외과영역에서는 상피 및 진피세포를 증식하여 삼차원적인 피부재생이 가능하다는 점을 응용하여 화상이나 피부궤양등 피부가 결손된 부위에 재생된 피부가 생착되므로 정상피부와 동일한 구조와 기능이 가능하게 되었다고 Contard⁴⁶⁾가 보고하였다. 또한 O'Connor⁴⁷⁾ (1978)에 의해 3도 화상으로 전층피부가 결손된 상처에 배양 자가상피세포층을 이식한 결과 배양된 상피세포가 영구히 생착되어 이식한 상피조직이 살아 가능하다는 사실이 관찰되었다.

치의학분야에서는 Boyko등(1981)⁴⁸⁾이 치아전위술 (transplantation)에 치주인대세포의 적용을 시도하기도 하였다. 즉 비글결의 소구치 발거후 치주인대세포와 치은세포를 in vitro상에서 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 사피스씨 섬유 존재등이 관찰됨을 보고한 바 있다. Van Dijk(1991)⁴⁹⁾는 치주인대 섬유아세포를 조직재생의 한 방법으로 치주인대세포를 시험관에서 배양한 후 조직내에 삽입하여 신부착을 창조할수 있는가를 연구하였다. 즉 비글결로부터 치주인대세포를 배양하고 인공적 치주조직결손을 형성, 배양세포를 치근면에 접촉시키고 전층판막을 원상복귀 후 실험동물을 희생, 조직학적 관찰에서 세포처리 치근면에는 백악아세포로 거의 완전히 피개되었고 대조부에서는 상피세포의 하방 이주가 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 내골막으로부터 유래한 조골세포 셋째로는 치주인대내에 존재하는 미분화간엽세포가 분화한 조골세포등이 관련된다. 이와 같은 조골세포수가 많으면 많을수록 재생골량도 많아진다. 일반적으로는 조골세포수는 잔

존 치조골면수와 치근막면의 면적에 비례되기 때문에 같은 골결손량의 3벽성 골결손과 2벽성 골결손에서는 3벽성 골결손 쪽이 면적도 크고 조골세포수도 많아 골재생이 쉽다.⁶³⁾ 이러한 기전을 근거로 체외에서 다량으로 번식한 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 것으로 예측이 이미 20여전 발표되었다.⁷⁰⁾

세포를 생체내로 운반하는 매개체로서의 이식재 접합은 Ohgushi(1989)⁴⁴⁾와 Nagahara(1994)⁷¹⁾, Matsuda와 Davies(1987)⁷²⁾ 및 Goshima등(1991)⁷³⁾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 치주 인대세포의 배양접시 기저면에 부착되는 양상을 관찰한 박등⁷⁴⁾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 μ m의 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)⁴⁵⁾가 주사전자현미경을 이용하여 Hydroxyapatite표면에 접종된 골아세포는 일반적 배양접시에서의 유사하게 부

착증식하며 특이한 독성은 발견되지 않았다는 결과와 유사한 것으로 이는 소공형 Hydroxyapatite는 배양세포를 생체내에 삽입하는데 매개체로 응용하기에 충분하다고 할 수 있는 근거가 된다고 생각되었다. 또한 이러한 소견은 이식재와 골표면에 세포를 부착한 후 그 양상을 관찰한 Malik(1992)⁷⁵⁾의 결과를 근거로 세포접종 2시간이 경과하면 일반적 섬유아세포의 고유형태를 가지게 되고 수일동안 배양한 경우에 부착후 점진적으로 확장되어 소공내부로 이주하여 초기 신생골조직형성에 영향을 준것으로 생각된다.

세포이식술에는 체외에서 배양증식한 세포를 체내로 운반하는 과정에서 필수적인 매개체의 선택은 생체조직공학을 이용한 조직재건에 중요한 요소중 하나이다. 세포운반 매개체에 대한 연구가 활발하여 Cheung 과 Haak(1989)⁵¹⁾은 소공성 인산칼슘의 생체적합성 연구에서 조골세포가 인산칼슘표면에서 성장이 원활히 일어나는 현상을 확인하였고, Bagambisa와 Joos(1990)⁴⁵⁾는 Hydroxyapatite상의 조골세포의 형태적 관찰을 시도한 바 있으며 Puelo등(1991)⁵²⁾은 정형외과적 이식재료상에서 조골세포의 반응을 관찰한 바 소공성 골대체물이 배양조골세포와 접합성이 좋았다는 보고가 있었다. 또한 Thaller등(1994)⁵³⁾은 골광물질과 콜라겐을 병용하여 가토의 두 개관 결손부에 삽입하고 치유과정을 관찰하여 골결손부치료 술식 가능성을 확인하기도 하였다.

Lauger(1994)⁷⁶⁾는 배양된 상피세포를 화상이나 피부결손부에 이식하는 술식을 시행한 바 임상에서 그 성공율이 높다는 점에 착안하여 배양 치은섬유아세포의 임상적용을 최초 보고하였다. 그는 치은 Keratinocyte을 배양하여 전치부 구강전정부위에 보철전수술을 하는 경우 치은이나 구강점막이 부족한 부위에 이를 해결하기위해 자가이식이 시도되어 성공적인 결과를 보여주었다. 이때 매개체로 바셀린거즈를 사용하여 세포를 부착하였고 기간은 46주동안 관찰하였다.

골 이식재 중 Hydroxyapatite와 Tricalcium Phosphate는 골이식시 골대체재료로 널리 사용되고 있다^{7,78)}. 양자 모두 생체적합성과 골전도능력이 있으며 ceramic과 접합도 양호한 것으로 보고되었다

77,79,80). 이러한 소공은 신생골형성을 위한 모세혈관의 유입이 재료의 심부까지 들어갈 수 있어 생체적합성이 높은 것으로 알려져 있다. Nagahara 등(1992)^{81,71)}은 백서두개관으로부터 조골세포를 배양하여 골유도능력이 있는 것을 확인하였다. 그외에도 조골세포와 이식재와의 생체적합성에 관한 연구들이 많이 보고되었다.^{45,51,71,72,82,83,73)} 국내에서는 박(1992)등⁷⁴⁾이 배양치주인대세포가 HA와 친화성이 높아 표면부착에 많은 영향을 주는 것을 보고한 바 있어 세포접목재료로서의 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 서로 다른 차폐막에 세포를 접종하고 세포의 부착 및 전개등 생물학적 적합능력이 조직 결손부 치유에 미치는 영향이 크다고 사료되어 표면구조가 다른 흡수성 차폐막에 대한 세포의 성상을 구명하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

본 연구에서 사용된 세포접목체는 모두 콜라젠으로만 구성된 흡수성 차폐막이었고 제작과정에 따라 그 표면 구조가 다소 다른 형태를 가지고 있었다.

세포가 부착될 기질표면의 차이를 비교하기 위하여 시도된 본 연구에서는 세포배양술에 일반적으로 이용되는 Microcover plate (Matsunami Co. Japan)를 평활형이라 하여 대조군으로 하였고 섬유망 크기와 방향이 불규칙한 산개형과 표면형태가 일정한 방향으로 배열되어 섬유망이 일정한 형태인 편극형 그리고 미세한 섬유사가 거의 일정한 형태로 직조된 세망형으로 분류하였다. Mooney등(1994)⁵⁵⁾은 연구초기에는 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 4시간동안 생분해성 차폐막에 접종시

켜 제작한 것으로 생분해성차폐막은 국내에서 개발되어 이미 조직접합성 및 조직재생 효과에 대한 연구보고³⁸⁾가 발표된 바 있어 본 연구에 응용하였다.

체외에서 세포배양 기술의 발달로 약 1cm^2 크기의 조직으로 8주내 $4,202 \text{m}^2$ 이상의 면적을 덮을 수 있는 수의 세포를 생산하게 되었다.³⁵⁾ Cilento (1994)가 체외 배양증식된 세포가 정상적인 분화과정으로 성숙할 수 있는가를 연구하여 생물학적 기초적 연구자료를 나타내었다. 즉 체외에서 배양된 세포도 생체내에서 성숙된 세포와 동일한 표현형을 갖는다는 사실을 면역세포화학적 방법으로 증명하였다.

세포접목술은 Puelo(1991)⁵²⁾가 주장한 바대로 골세포를 배양하여 이식재에 접목하여도 세포의 분화증식에는 아무런 저해요소가 없다는 보고를 근거로 이식재에 접목된 세포가 조직내에서도 증식이 가능하다고 생각되는 바이다.

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 Oghushi 등(1989)⁴⁴⁾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.

배양세포의 표면변화를 보기 위하여 주사전자현미경으로 관찰한 본 연구에서 시간이 경과함에 따라 치주인대세포는 일반적인 부착과 전개양상을 보였다. 즉 배양 초기에서는 양 군사이에 별다른 차이가 없이 박관상돌기와 세사상돌기 및 미세유모의 출현이 보였다. 그러나 배양 90 분후부터 대조군에 비해 TCP를 첨가한 경우 전개속도가 다소 빠르고 핵부위가 뚜렷하게 편평해졌으며 세포의 극성화도 다소 빠르게 나타났다. 이러한 양상은 세포전개를 3 단계로 구분한 Taylor⁵⁶⁾의 의견과 4단계로 분류한 Rajaraman 등⁴²⁾의 과정과 일치하였다. 그러나 배양된

모든 세포가 일률적으로 동일한 양상, 동일한 비율로 전개되는 것은 아니므로 연구에서 나타나는 형태학적 결과들은 해당 시간에서 가장 전형적인 세포형태라고 하기에는 어려우며 본 결과를 토대로 세포표면상의 미세용모, 소기포 및 부착돌기등의 세포질 내부 구조를 투과전자현미경으로 관찰하여 치유과정에서 치주인대세포의 부착에 관한 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 흡수성 차폐막에 접목된 두개관골 세포의 주사전자현미경상 형태차이는 사용된 차폐막의 종류에 따른 큰 차이는 나타나지 않았고 특히 그 표면구조 차이와는 무관하게 세포의 부착과 전개에 적합한 것으로 나타났다. 이와 같은 경과는 Pellen-Mussi (1997)의 연구와 동일한 결과를 보였다 즉 차폐막에 접착한 세포는 그 고유형태가 잘 유지되어 콜라겐 차폐막의 사용을 추천하였다.

또한 본 연구에서 나타난 바와 같이 콜라겐을 사용한 흡수성 차폐막표면에 부착된 세포형태는 시간이 경과하여도 일반 배양접시에서의 세포부착과 전개 형태와 유사하였고 세포전개정도 역시 차폐막의 표면구조와는 무관하게 특이한 차이가 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 (Nsal 1999)가 polylactic acid가 주성분인 차폐막보다 콜라겐이 주성분으로 구성된 차폐막이 세포의 초기부착에 더 효과적인 것으로 밝혀졌으며 콜라겐 차폐막 사이에는 뚜렷한 차이를 보이지 않는다는 주장과 일치함을 확인할 수 있었다.

Garant와 Cho등⁴⁴⁾은 치주인대세포의 전방극에서 많은 사상체 형태의 세포질돌기 혹은 lobopodia이 형성되고, 기질과 접촉하여 leading lamella가 수축하여 세포가 전방이동을 한다고 하였다. 세포의 화학 조성은 부착성의 변화에 따라서 일어나며, 이때 핵은 세포의 전방극에 위치한다고 하였다. 그러나 본 실험에서 나타난 핵의 위치는 세포의 중앙부에 위치하므로 주성은 관찰되지 않았고 분열상도 관찰되지 않았다. Follett와 Goldman⁴⁵⁾은 세포의 전개과정에서 미세용모의 발현을 관찰하여 미세용모는 분열중이거나 부분적으로 전개된 세포에서는 관찰되어지나 완전히 전개된 세포에서는 관찰되지 않는다고 하였

다. 본 연구에서도 미세용모는 배양 4시간후에는 발견할 수가 없어 전개과정의 완성됨을 확인하였으나 두 군사이의 차이는 발견할 수 없었다.

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 골조직재생에 과정에 가장 큰 영향을 미친다는 靑野正男(1991)⁶³⁾의 주장과 동일하다고 판단된다. 이러한 소견을 미루어 기존 골조직으로부터 확장되는 신생골형성이 이식된 세포접목체로부터 확장되는 신생골보다 보다 빠르게 이루어 진다는 사실을 알 수 있다. 그러나 세포접목체를 삽입한 경우 삽입하지 않는 부위보다 골형성 량이 빠르게 증가하기 때문에 골결손부 재생을 위해서 세포접목술을 적용하는 것이 효과적이라 판단된다. 또한 차후의 연구에서는 Arvey (1988)⁶¹⁾가 주장한 바와 같이 실험동물에게 critical defect size를 고려하여 골결손부를 형성하고 신생골형성과정을 검증하는 사항을 추가로 고려하여야 하며 치유기간중 연조직의 힘물이나 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 세포 접목법을 조직재생술에 응용하기 위해서는 세포의 종류, 접목방법, 접목세포수, 세포의 전치치 및 계대 배양 횟수등을 달리한 광범위한 연구가 앞으로 시행되어야 할 것이다.

V. 결론

조직유도재생술에 사용되고 있는 흡수성 차폐막을 대상으로 골세포를 접목한 후 주사전자현미경을 이용하여 기질에 부착과 전개의 형태를 관찰함으로

이들 차폐막의 조직친화성을 확인하고 세포이식술 시행시 세포매개체로서의 가능성을 확인하고 그 종류에 따라 효과를 검증하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

두개관세포를 다량으로 얻기 위하여 순종으로 사육된 Sprague-Dawley계 30마리의 백서를 30mg/kg의 Pentobarbital Sodium (Tokyo Industrial Chem., Japan) 전신마취한 후 두피를 절개하고 두개관을 분리 세척하고 계대배양액인 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 Dullbeco's Minimum Essential Medium 배양액으로 배양하였다. 공기혼합배양기의 표준배양상태하에서 두개관세포를 배양하였으며 전 실험과정에서는 제 4-7세대의 세포만을 제한하여 사용하였다.

세포배양술에 일반적으로 이용되는 Microcover plate (Matsunami Co, Japan)를 대조군으로 하고 이와 비교될 실험군의 흡수성 차폐막 3종류로 분류하였다. 섬유망 크기와 방향이 일정한 규칙을 가지고 있지 않은 형태인 산개형과 표면형태가 일정한 방향으로 배열된 섬유망이 일정한 형태인 단극형, 그리고 미세한 섬유사가 거의 일정한 형태인 세망형으로 분류하였다.

분류된 흡수성 차폐막을 시료로 하여 1x1 cm의 크기로 절개한 다음 표면에 1x10⁶ cells/ml의 수로 세포부유층을 적용하여 세포를 부착하여 이를 세포이식체로 하였다. 배양조건은 계대배양과 동일한 방법으로 시행하였다.

세포접목후 12, 48시간 그리고 5일동안 배양한 세포이식체를 Glutaraldehyde로 고정하고 OsO₄로 후고정한 다음 Tannic acid로 처리하였다. 그후 계열알콜로 탈수하고 Ion coater를 이용하여 금박을 피복하여 주사전자현미경을 이용하여 다음과 같은 소견을 관찰하였다.

1. 평활면상에 배양된 세포는 세포부착과 전개양상이 배양접시에서와 동일한 양상을 보였다
2. 차폐막표면에 부착된 두개관세포의 형태는 시간이 경과하여도 대조군과 유사한 형태를 보였다.
3. 배양된 세포돌기는 차폐막의 섬유망 표면과 내

부로 세포고유형태의 양상으로 확산되었다.

4. 세포전개정도는 차폐막의 표면구조와는 무관하게 특이한 차이가 없었다.
5. 표면조도가 큰 산개형 흡수성 차폐막이 미약하게나마 복층의 세포성장을 보였다.

결론적으로 이번 실험에 사용된 흡수성 차폐막에 접목된 두개관골세포에서 사용된 차폐막간의 차이에 따른 주사전자현미경상의 형태차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과에 의해 흡수성 콜라겐 차폐막은 그 표면구조 차이와는 무관하게 두개관세포의 부착과 전개 및 증식에 적합한 기저부가 될 수 있다고 판단할 수 있다. 또한 차후 표면구조가 다른 흡수성 차폐막과의 세포접목체가 생체내에서 조직재생의 역할이 가능한가를 입증하는 것이 필요하리라 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Melcher A.H.: On the repair of periodontal tissues, J Periodontol 47: 256-269, 1976
2. Nyman S : The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. J Clin. Periodontol 9: 265-277, 1982
3. Prichard, J.: Gingivoplasty, gingivectomy and ossous surgery. J Periodontol 32: 275-282, 1961
4. Garrett, J.S, Crigger, M. and Egelberg J : Effects of citric acid on diseased root surface, J. Periodont. Res., 13: 155-163, 1978.
5. Nilveus, R. and Egelberg, J. : The effect of topical citric acid applicaiton of the healing 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.
6. Renvert, S. and Egelberg, J. : Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. II. Effect of citric acid condition- ing of the root surface, J. Clin. Periodon- tol., 8: 459-473, 1981.

7. Terranova, V.P., Franzetti, L., Hic, S., et al and Genco, R.J. : A biochemical approach to periodontal regeneration: Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth, *J. Periodontol. Res.*, 21: 330-337, 1986.
8. Klinge, B., Nilveus, R. and Egelberg, J. : Effects of crown attached sutures on healing of experimental furcation defects in dogs, *J. Clin. Periodontol.* 12: 369-373, 1985.
9. Ellegaard B, Karring T, Listgarten M and Loe H : New attachment after treatment of interradicular lesions, *J Periodntol* 44: 209-217, 1973
10. Yuktanandana I : Bone graft in the treatment of periodontal pocket in dogs. A histological investigation *J Periodontol* 30: 17-26, 1959
11. Ewen SJ : Bone swaging, *J Periodontol* 36: 57-63, 1965
12. Cushing M : Autogenous red marrow grafts: Their potential for induction of osteogenesis (review of literature). *J Periodontol* 40: 492-497, 1969
13. Dragoo MR and Sullivan HC : 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
14. Mellonig JT, Bowers GM, Bright RW and Lawrence JJ : Clinical evaluation of freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects, *J Periodontol* 47: 125-131, 1976
15. Schallhorn, R.G. : Present status of osseous grafting procedures *J Periodontol* 48: 570-576, 1977
16. Quintero G, Mellonig JT, Gambill VM, and Pelleu GB Jr : A six month clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. *J Periodontol* 53: 726-730, 1982
17. Alderman, N.E. : Sterile plaster of paris as an implant in the infrabony environment : A preliminary study. *J. Periodontol.*, 40:11-13, 1969.
18. Feingold, J.P. and Chasens, A.I. : Preserved scleral allografts in periodontal defects in Man. 1. Preparation, preservation and use. *J. Periodontol.*, 48:1-3, 1977.
19. 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.
20. Levin, M.P., Getter, L., Cutright, D.E. and Bhaskar, S.N. : Biodegradable ceramic in periodontal defects. *Oral Surg.*, 38:344-357, 1974.
21. 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.
22. Nery, E.B. and Lynch, K.L. : Preliminary clinical studies of bioceramic in periodontal osseous defects, *J. Periodontol.*, 49:523-527, 1978.
23. Strub JR, Gaberthuel TW and Firestone AR : Comparison of of tricalcium phosphate and frozen allogenic bone implants in man. *J Periodontol* 50: 624-629, 1979
24. Nyman S, Lindhe J, Karring T and Rylander H : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease *J Clin Periodntol* 9: 290-296, 1982
25. Card Sj, Caffesse RG, Smith B and Nasjleti C : New attachment following the use of a resorbable membrane in treating perionitis in beagle dogs. *Int J Periodont Rest Dent* 9: 59-69, 1989
26. Gager AH and Schultz AJ : Treatment of periodontal defects with an absorbable membrane (Polyglactin 910) with and without osseous grafting : case reports. *J Periodontol* 62: 276-283, 1991
27. Aukhil I, Pettersson E and Suggs C: Guided tis-

- sue regeneration. An experimental procedure in beagle dogs. *J Periodontol* 57: 727-734, 1986
28. Van Swol RL, 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
 29. Choi SY, Nilveus RE, Minutello RD, Zimmerman GJ and Wikesjo UME : Effect of a collagen matrix on healing in periodontal furcation defects in dogs, *J Periodontol* 64: 878-882, 1993
 30. Gottlow J : Guided tissue regeneration using biodegradable and non-resorbable devices : Initial healing and long term results. *J Periodontol* 64: 1157-1165, 1993
 31. Warrer K, Karring T, Nyman S and Gogolewski S : Guided tissue regeneration using biodegradable membrane of poly(lactic acid) or polyurethane. *J Clin Periodontol* 19: 633-640, 1992
 32. 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
 33. Vacanti CA, 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
 34. Vacanti CA, Kim WS, Upton J et al : Tissue engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc* 25: 1019-1021, 1993
 35. Cilento BG, Freeman MR, Schneck FX, Retik AB and Atala A : Phenotype and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro. *J Urol* 152: 665-670, 1994
 36. Herring M, Gardner A and Glover J : A single staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery* 84: 498-504, 1978
 37. Graham LM, Vinter DW, Ford JW, Kahn H, Burkel WE and Stanley JC : Endothelial cell seeding of prosthetic vascular grafts. Early experimental studies with cultured autologous canine endothelium. *Arch Surg* 115: 929-933, 1980
 38. Budd JS, Allen KE and Bell PRF: Effects of 2 methods of endothelial cell seeding on cell retention during blood flow. *Br J Surg* 78(7): 878-882, 1991
 39. Mosquera DA and Goldman M : Endothelial cell seeding. *Br J Surg* 78(6): 656-660, 1991
 40. Yue X, van der Lei B, Schakenraad JM, van Oene GH, Kuit J, Feijen J and Wildevuur CRH : 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
 41. Jauregui HO and Gann KL : Mammalian hepatocytes as a foundation for treatment in human liver failure. *J Cell Biochem*. 45(4): 359-365, 1991
 42. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O and Green H : Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 311: 448-451, 1984
 43. Gallico GG, O'Connor NE and Compton CC : Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. *Plast Reconstr Surg* 84: 1-9, 1989
 44. Ohgushi H, Goldberg VM, and Caplan AI : Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res* 7: 568-578, 1989
 45. Bagambisa FB and Joos U : Preliminary studies on the phenomenological behaviour of osteoblasts cultured on hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials* 11: 50-56, 1990
 46. Contard, P, Bartel, RL, Jacobs L, et al : Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimen-

- sional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone. *J Invest. Dermatol*, 100: 35-39, 1993
47. O'Connor NE, Mulliken JB, BanksSchlegel S, Kehinde O, Green H : Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1: 75-78, 1978
48. Boyko GA, Melcher AH and Brunette DM : 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
49. Van Dijk LJ, Schakenraad JM, Vander-voort HM, Herkströter FM, Busscher HJ : Cell-seeding of periodontal ligament fibroblasts-a novel technique to create new attachment-a pilot study. *J Clin Periodontol*, 18(3) : 196-199, 1991
50. Simon-Sato, F., Lahmouzi, J., Kalykakis, G. K., Heinen, F., Defresne, M. P., De Pauw, M. C., Grisar, T., Legros, J. J., Legrand, R. : Culture of Gingival Fibroblasts on Bioabsorbable Regenerative Materials In Vitro. *J. Periodontol* 70:1234-1239, 1999
51. Cheung HS and Haak MH : Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: an in vitro model for biocompatibility study. *Biomaterials* 10: 63-67, 1989
52. Puelo DA, Holleran LA, Doremus RH and Biozios R : Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro. *J Biomed Mater Res* 25: 711-723, 1991
53. Thaller SR, 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
54. Langer R and Vacanti JP : Tissue engineering. *Science* 260: 920-922, 1993
55. Mooney DJ, Organ G, Vacanti JP, Langer R : Design and fabrication of biodegradable polymer devices to engineer tubular tissues. *Cell Transplant* 3: 438-446, 1994
56. Mooney DJ, Mazzoni CL, Breuser C, McNamara K, Herm D and Langer R : Stabilized polyglycolic acid fibrebased tubes for tissue engineering. *Biomaterials* 17: 115-124, 1996
57. Levy FE, Hollinger JO, Szachowicz EH : Effect of a bioresorbable film on regeneration of cranial bone. *Plast Reconstr Surg* 1994 Feb;93(2):307-311
58. 김원경, 최상묵, 한수부, 권영혁, 정종평, 이승진 : 약물함류 생체분해성 차폐막의 세포활성도 및 골조직 유도재생 효과. *대한치주과학회지* 27: 129-150
59. Pellen-Mussi, P., Fravalo, P., Guigand, M., and Bonnaure-Mallet, M. : Evaluation of cellular proliferation on collagenous membranes. *J. Biomed. Mater. Res.* 36: 331-336, 1997
60. B. Nsal, G. Ozcan, G. Tuter, B. Kurtis and M. Yahm : Evaluation of initial attachment of attachment of human gingival fibroblast cells to biodegradable membranes in vitro by light and scanning electron microscopy. *Journal of oral science*; 41(2) : 57-60, 1999
61. Arvey, J.K. : Oral development and histology, B. C. Decker Inc, Toronto pp 282-293, 1988.
62. 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. Periodontol.*, 63: 515-525, 1992.
63. 青野正男等 : 歯周治療の科學, 醫齒藥出版株式會社, 東京 pp 245-252, 1991
64. 須田立雄等 : 骨の科學, 醫齒藥出版株式會社, 東京 pp69-86, 1988
65. Galletti PM : Bioartificial organs. *Artificial Organs* 16(1): 55-60, 1992
66. Kumagai N, Nishina H, Tanabe H et al : Clinical application of autologous cultured epithelia for the treatment of burn wounds and burn scar,

- Plast Reconstr Surg 82: 99-108, 1988
67. Kumagai N, Matsuzaki K, Fukushi S, Masayoshi T, Hideo O and Ishida H : Grafting of autologous-cultured epithelium after excision of tattos. *Ann Plast Surg.* 33(4): 385-391, 1994
 68. Mazzucotelli JP, Roudière JL, Bernex F, Bertrand P, Léandri J and Loisançe D : A new device for endothelial cell seeding of a small-calber vascular prosthesis. *Artifial organ* 17: 787-790, 1993
 69. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D and Langer R : Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Engineer* 113: 143-151, 1991
 70. Green WT jr : Articular cartilage require behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting . *Clin Orthop* 124: 237, 1997
 71. Nagahara K, Mouri K, Kanematsu N and Meenaghan MA : An In vivo evaluation of an osteoinductive implantable material produced by osteoblastic cells in vitro. *Unt J Oral Maxillofac Impalnts* 9: 41-48, 1994
 72. Matsuda, T. and Davies, J.E. : The in vitro response of osteoblasts to bioactive glass. *Biomaterials* 8: 275-284, 1987
 73. 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. *Bio- materials.* 12: 253-258, 1991
 74. 박준봉, 서조영, 김해동 : Tricalcium phosphate 가 치주인대세포의 성장에 미치는 영향 대한치 주과학회지 22(3): 484-498, 1992
 75. Malik, M.A., Puelo, D.A., Bizios, R and Doremus, R.H. : Osteoblasts on hydroxy-apatite, alumina and bone surfaces in vitro: morphology during the first 2h of attachemnt. *Biomaterials* 13(2): 123-128, 1992
 76. Lauger G : Autografting of feeder-cell free cultured gingival epithelium. *J Cranio Max Fac Surg* 22: 18-22, 1994
 77. Jarcho M : Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 157: 259-278, 1981
 78. de Groot K : Bioceramic consist calcium phosphate salts. *Biomaterials* 1: 47-50, 1980
 79. Shimazaki K and Mooney V : Com- paratives- tudy of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone sub- stitute. *J Orthop Res* 3: 301-310, 1985
 80. Eggli PS, Muller W, and Schenk RK : Porous hydroxyapatite and tricalcium ph- osphate cylinderw with two different pore ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. *Clin Orthop.* 232: 127-138, 1988
 81. Nagahara, H, Goldberg, V.M. and Caplan, A.I. : Cultured-expanded periosteal derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphat ceramics in vivo. *Clin Orthop.* 276: 291-298, 1992
 82. Vrouwenvelder, W.C.A., Groot C.G. and de Groot, K. : Histological and biochemical evaluation of osteoblasts cultured on bio- glass, hydroxyapatite, titanium alloy, and stainless steel. *J Biomed Mat Res* 27: 467-475, 1993
 83. Freed, L. E., Marquis, J.C., Nohria, A., Emmanuel, J., Mikos, A.G. and Langer, R. : Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultures on synthetic bio- gradable polymers. *J Biomed Mat Res* 27: 11-23, 1993
 84. Wilson J and Low SB : Bioactive cer- amics for periodontal treatment: compara- tive studies in the Patu monkey. *J Appl Biomat* 3: 123-129, 1992
 85. Weinsein AM, Klawitter JJ and Cook JO : Implant-bone interface characteristics of bioglass dental implants. *J Biomed Mater Res* 14:23-29, 1980

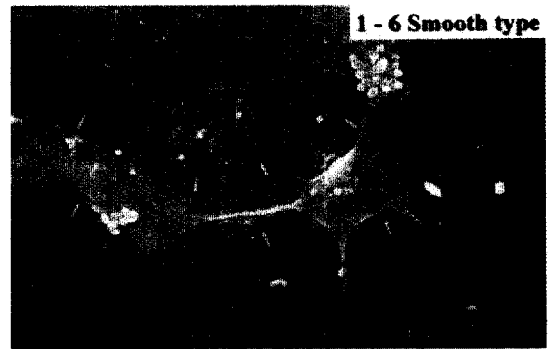
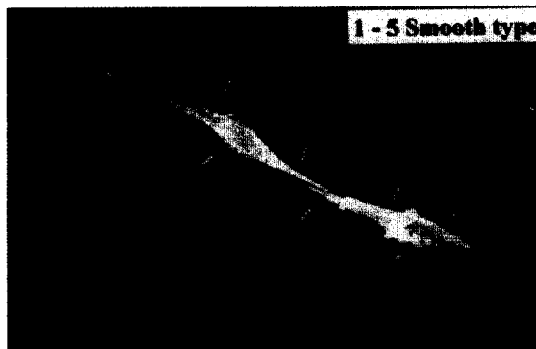
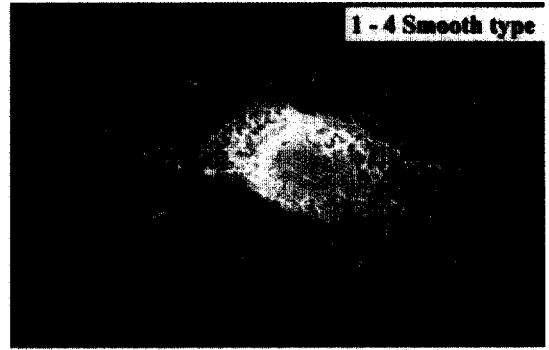
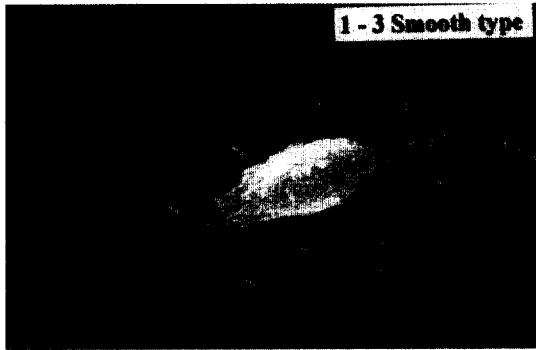
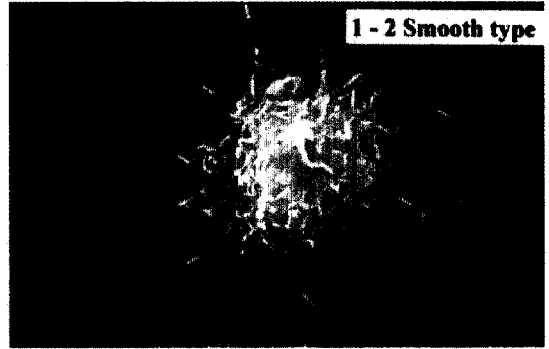
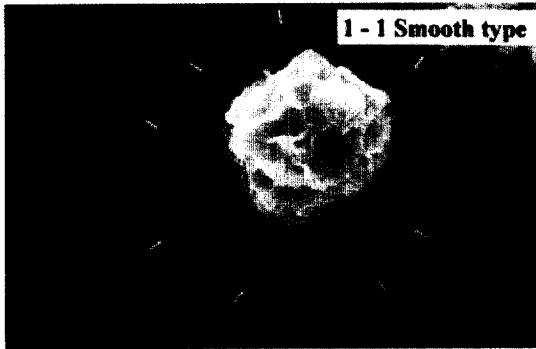
사진부도 설명

- Figure 1-1. Scanning Electron Microscopic (SEM) photomicrographs of Rat calvaria cell (RCV cell) 30 minute after inoculation on smooth surfaced culture plate : RCV cell revealed rounded shape made by several lobes with slight lamellipodia of cytoplasm, There are many fold and irregular rugae appearance on the surface of both cells.
- Figure 1-2. SEM photomicrographs of RCV cell after 60 minute after inoculation on smooth surfaced culture plate : RCV cell showed the slight lamellipodia of cytoplasm were seen at edge of some of cell margin.
- Figure 1-3. SEM photomicrographs of RCV cell after 2hrs, culture on smooth surfaced culture plate : The total shape of cell revealed spindle shape such as fibroblast, and cytoplasm extent to radial direction, Many microvilli were formed at the edge of cell.
- Figure 1-4. SEM photomicrographs of RCV cell after 6 hrs, culture smooth surfaced culture plate : The shape of cell and the nucleus appears more flattened shape, The nucleus were located at the center of cell and the shape of cell changed into spindle form.
- Figure 1-5. SEM photomicrographs of RCV cell after 12 hrs, culture smooth surfaced culture plate : The surface of cell looked smooth and typical fibroblastic cell and appeared cell division.
- Figure 1-6. SEM photomicrographs of RCV cell after 24 hrs, culture smooth surfaced culture plate : Overall view of the cell appears more ovoidal shape, The nucleus become more faint ovoidal pattern too.
- Figure 2-1. SEM photomicrographs of scattered type resorbable membrane without cell : The membrane showed many different size of pore and interpore substrate which could be favorable surface for invasion of cytoplasmic process.
- Figure 2-2. SEM photomicrographs of RCV cell after 12 hrs, culture on scattered type resorbable membrane : The surface relationship of cells were connected to each other with lamellopods through multiple extensions.
- Figure 2-3. SEM photomicrographs of RCV cell after 48 hrs, culture on scattered type resorbable membrane : Some of the cells were observed as avoidal shape and well connected to irregular surface of membrane.
- Figure 2-4. SEM photomicrographs of RCV cell after 5 days in culture on scattered type resorbable membrane : The cell were attached onto the membrane more firmly to compare with other stage.
- Figure 3-1. SEM photomicrographs of polarizing resorbable barrier membrane without cell : The fabric like resorbable membrane looks well polarized fine net.
- Figure 3-2. SEM photomicrographs of RCV cell after 12 hrs, in culture on polarizing resorbable barrier membrane : The cells were well attached on the surface of substrate as ovoidal shape.
- Figure 3-3. SEM photomicrographs of RCV cell after 48 hrs, in culture on polarizing resorbable barrier membrane : The shape of attached cell looks more round.
- Figure 3-4. SEM photomicrographs of RCV cell after 5 days in culture on polarizing resorbable barrier mem-

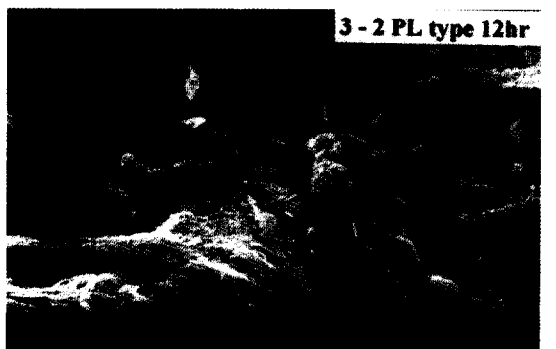
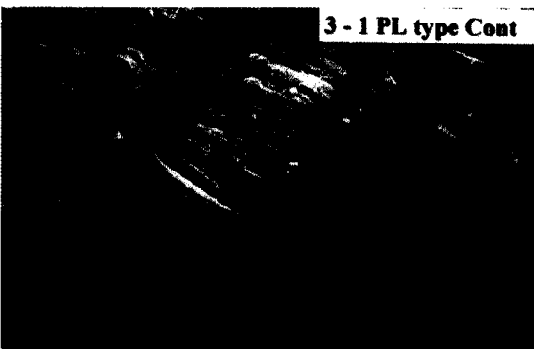
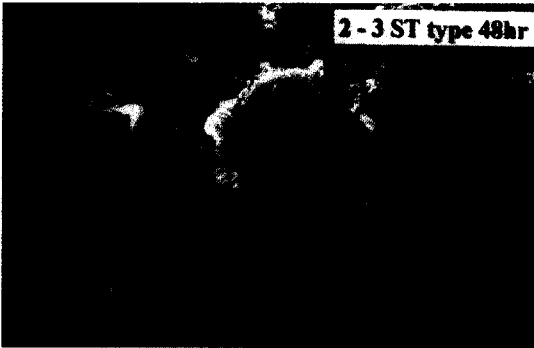
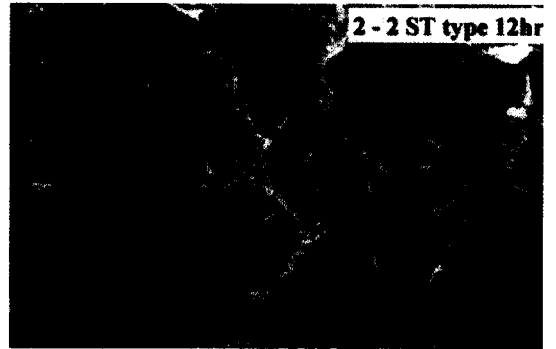
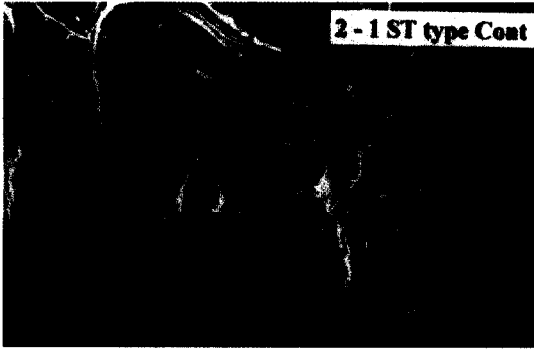
brane : The shape of attached cell showed almost similar form with other group.

- Figure 4-1. SEM photomicrographs of fine-net type resorbable barrier membrane without cell : The fine mesh-like barrier membrane showed irregular fine network which could be favorable surface for cytoplasmic process of cell.
- Figure 4-2. SEM photomicrographs of RCV cell after 12 hrs. culture on fine-net type resorbable barrier membrane : The cell revealed round shape on the fine-network.
- Figure 4-3. SEM photomicrographs of RCV cell after 48 hrs. culture on fine-net type resorbable barrier membrane : The spindle-like fibroblastic cell was attached on fine-network barrier membrane. The cell looks more polarized like original fibroblastic shape.
- Figure 4-4. SEM photomicrographs of RCV cell after 5 days culture on fine-net type resorbable barrier membrane : The cytoplasmic process extent with polarizing pattern. Cytoplasmic process were looked more thick and long than other group.

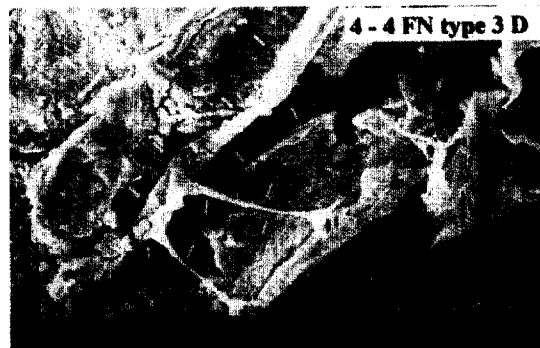
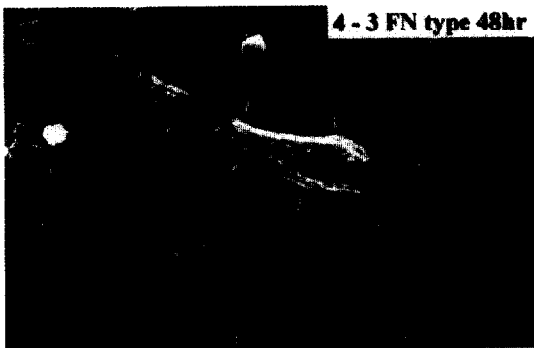
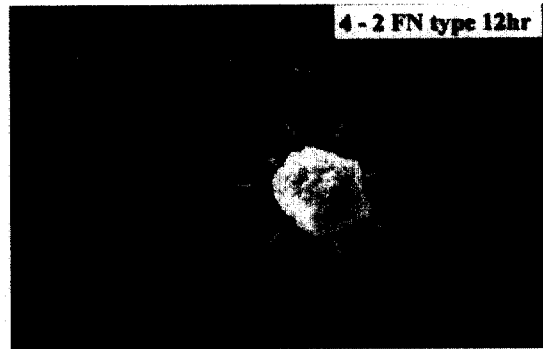
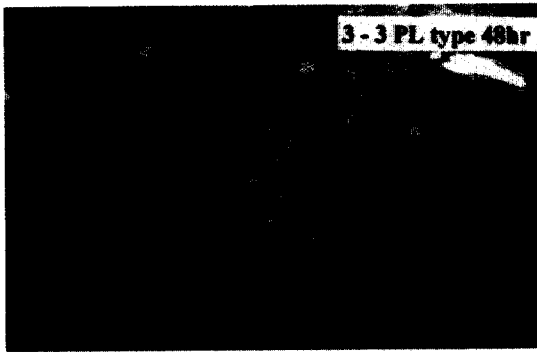
사진부도 (1)



사진부도 (II)



사진부도 (III)



Comparison of the Proliferation pattern of Cultured Rat Calvaria Cell on the Resorbable Barrier Membrane

Chang-Hoon Lee, Man-Sup Lee, Young-Hyuk Kwon, Joon-Bong Park, Yeek Herr

Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung Hee University

The purpose of this study is to evaluate the phenomenon of attachment and spreading of the cultured rat calvarial cell inoculated on their surface of different kinds of biodegradable membrane which had been used on tissue regeneration on periodontal defects by using scanning electron microscope.

In this experiment 30 Sprague-Dawley male rats (mean BW 150gm) were used to harvest abundant number of cell in the short period. The 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.

Biodegradable barrier membrane were collected with collagen type, and were divided into 3 different kind of surface such as scattered, polarized and fine-net type as their surface texture. Microcover plate which usually used for cell culture was used as control for smooth surface. All the membrane were seeded with cultured calvarial cell on their surface.

The number of cell inoculated on the membrane were 1×10^6 Cells/ml. After the culture as designed time, all the membrane were washed with 0.1 M Phosphate Buffered saline and fixed with 2.5% Glutaraldehyde. And all specimen were treated with OsO_4 , and Tannic acid before drying the cell for coating the cell with gold. Scanning Electron Microscope was used to observation.

The following results were obtained.

1. During the whole period of experiment, the phenomenon of cell attachment and spreading were revealed similar pattern to compare with smooth surface culture plate and ordinary culture dish.
2. The shape of cell attachment and spreading on the surface of barrier membrane were observed no remarkable difference pattern between smooth surface culture plate and ordinary culture dish.
3. The cytoplasmic process of cultured calvaria cell extent to the deep portion of barrier membrane like as their own proper shape.
4. There were no remarkable relationships between the degree of cultured cell spreading and surface structure of barrier membrane.
5. Slight stratified layer of cultured calvaria cell were observed on the scattered type of resorbable membrane.

Conclusively, this study thus suggest that cultured bone cell inoculated onto the biodegradable barrier membrane may have an important role of carrier for many cell which could be used as new tissue regeneration, and those tissue engeering technique may become an new method in the approach to the repair of bone defects,

Key words : Cultured bone cell, biodegradable barrier membrane, SEM, Tissue regeneration,