

2007년 2월
석사학위논문

백서에서 초기 골 형성에 미치는
키토산과 치아회분말의 효과

조선대학교대학원
치의학과
박순식

백서에서 초기 골 형성에 미치는
키토산과 치아회분말의 효과

Effect on the Bone Regeneration of the Mixture
of Chitosan and Tooth-Ash in Rats

2007년 2월 23일

조 선 대 학 교 대 학 원
치 의 학 과
박 순 식

백서에서 초기 골 형성에 미치는 키토산과 치아회분말의 효과

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2006년 10월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

박 순 식

박순식의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 임 성 철 인

위 원 조선대학교 교수 유 훈 인

위 원 조선대학교 교수 김 수 관 인

2006년 11월 일

조선대학교 대학원

Contents

표 목 차
도 목 차

ABSTRACTS

I. 서 론	1
II. 실험 재료 및 실험 방법	3
1. 실험 동물 및 실험 재료	3
2. 실험 방법	4
3. 조직형태계측학적 분석	4
III. 실험 결과	6
IV. 총괄 및 고찰	9
V. 결 론	13
VI. 참고문헌	14
VII. 사진부도 설명	16
VIII. 사 진 부 도	19

표 목 차

Table 1. Experimental design 3

Table 2. Comparing of the new bone formation at 2, 4 and 8 weeks after experimentation 8

Table 3. Statistical significance evaluation of each experimental group 8

Table 4. Statistical significance evaluation of each weeks 8

도 목 차

Fig. 1. Control group at 2 weeks	21
Fig. 2. Control group at 4 weeks	21
Fig. 3. Control group at 8 weeks	22
Fig. 4. Experimental group 1 at 2 weeks	22
Fig. 5. Experimental group 1 at 4 weeks	23
Fig. 6. Experimental group 1 at 8 weeks	23
Fig. 7. Experimental group 2 at 2 weeks	24
Fig. 8. Experimental group 2 at 4 weeks	24
Fig. 9. Experimental group 2 at 8 weeks	25
Fig. 10. Experimental group 3 at 2 weeks	25
Fig. 11. Experimental group 3 at 4 weeks	26
Fig. 12. Experimental group 3 at 8 weeks	26
Fig. 13. Experimental group 4 at 2 weeks	27
Fig. 14. Experimental group 4 at 4 weeks	27
Fig. 15. Experimental group 4 at 8 weeks	28

ABSTRACT

Effect on the Bone Regeneration of the Mixture of Chitosan and Tooth-Ash in Rats

Soon-Sik Park, D.D.S.

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

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Purpose : The purpose of this study was to evaluate the healing effect of grafting materials after implantation of chitosan and tooth-ash mixture.

Material and Method : The critical size defect of rat calvarium, 8mm size in diameter, was used and 75 rats were divided into 5 experimental groups. The control group was performed only artificial bone defect in the frontal area of rat and experimental group was divided 4 parts. The experimental group 1 was grafted with tooth-ash, the experimental group 2 was grafted with pig tooth-ash and plaster of Paris mixture, experimental group 3 was grafted with pig tooth-ash and chitosan combination, experimental group 4 was grafted with chitosan only. The experimental rats were sacrificed at the 2nd , 4th and 8th weeks after operation.

Result : The results were as follows ; More significant new bone forming activity was found in all experimental group than control group. In all groups, there were more significant new bone forming activity was found in 8 weeks group than 4 weeks group. There were slightly more new bone forming activity in group 3.

Conclusion : These results suggested that the mixture of chitosan and tooth-ash might be effective materials for new bone formation in osseous defects.

I. 서론

골 이식은 자가골 이식, 동종골 이식, 이종골 이식, 골 대체물질, 그리고 인공 골 이식으로 나눌 수 있다. Schallorn¹⁾은 골 이식재를 선택하는데 있어서 생체 친화성, 예지성, 임상적 활용 가능성, 수술 시 최소의 위험성, 그리고 합병증 등이 고려되어야 한다고 주장했지만, 이런 조건을 완벽하게 만족시킬 수 있는 이식재를 찾기란 쉽지 않다. 자가골 이식은 초기 재혈관화를 포함하여 감염에 대한 저항력이 우수하고 면역학적 활성을 지닌다는 장점을 지니고 있으며 임상적으로 수 년동안 성공적인 결과를 가져왔다. 그러나 자가골 이식은 부가적인 수술이 필요하며 공여부의 불편감, 이식편의 흡수, 채취량의 제한 등의 단점을 갖고 있다²⁾. 동종골 혹은 이종골 이식은 광범위한 골 결손부의 매식에 적절하며 부가적인 수술이 필요하지 않다. 그러나 감염의 위험성이 있으며 이식골의 거부반응이 일어날 수 있다²⁻⁴⁾.

골 대체재는 골 형성이나 골 유합을 유도하는 방법으로 이식재의 양의 제한이나 공여부의 불편감 같은 단점을 보완해줌으로써 널리 이용되고 있다. 이는 골유도성 물질과 골전도성 물질로 나뉘며 이런 이식재들은 이상적으로 골 유도능력 뿐만 아니라 골 형성능력, 염증 반응의 부재, 빠른 혈관화, 생체 친화성, 경제성, 사용과 구입의 편리성 등을 갖추어야 한다.

calcium phosphate를 기본으로 한 bioceramic 물질들이 골과 유사한 무기질 성분을 갖고 있기 때문에 최근 골 대체 물질로 각광을 받고 있다⁵⁻⁷⁾. 이 재료들의 가장 주목할 만한 특성은 국소적 혹은 전신적인 독성을 나타내지 않으며, 이물반응이나 염증이 없고 조직 친화성이 높다는 것이다⁷⁾.

세라믹 계통 중에서도 황산칼슘계열, 특히 수산화인회석은 많은 연구의 대상이 되어왔고^{8, 9)}, 이것은 생체 적합성, 생 흡수성 혹은 비 흡수성, 높은 압축강도 등에서 이상적인 매식체로 밝혀졌으나 가공상의 어려움, 가공비, 가공능률의 저하 등의 단점을 지니고 있다¹⁰⁾.

이에 윤 등¹¹⁾과 Finn 등¹²⁾이 발거한 치아를 회화하면 유기성분은 제거되고 무기성분인 수산화인회석과 beta-whitelockite가 주성분으로 남게 되는데 이것이 매식체로서 사용될 가능성이 있음을 실험적으로 검증한 바 있다. 그 후 발거 후 폐기 처리되는 치아들을 이용하여 구강악안면 경조직 결손 수복을 위한 생체재료 개발을

위한 체계적인 연구들이 시행되어 왔다.

키토산은 탄수화물 생물 고분자물질로써 갑각류(랍스터, 개, 가재 등) 골격의 구조적 성분이나 균사의 세포벽의 구조적 성분인 N-acetylated chitin에서 추출된다¹³⁾. 키틴질과 키토산은 리소자임에 의해 가수분해된 후 monomer의 형태로 흡수된다. 키토산은 생물학적으로 지방과 결합하거나 이를 흡수하여 체중감소를 유발한다. 게다가 콜레스테롤 조절의 역할을 하며, 결합조직의 치유를 증진시키고 지혈을 돕는다¹⁴⁾. 이외에도 키토산은 창상 치유에 관여하며 많은 연구에서 보여진 것처럼 골 형성 유도능력을 가지고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 골 형성에 있어서 키토산은 해면골에 존재하며 골아세포 같은 기질 세포의 유사분열을 돕는 fibroblast growth factor(FGF)와 결합한다¹⁸⁾.

따라서 이 물질은 골 결손부에 이식 후 초기 골 형성을 도모함으로써 창상 치유 기간을 단축시킬 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구의 목적은 hydroxyapatite가 주 성분인 치아회분말과 키토산의 혼합물이 초기 골 결손부에 미치는 영향에 대해 알아보는데 있다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험재료

1) 실험동물

동일한 조건하에서 사육한 12주령의 암컷 Sprague-Dawley 백서 75마리를 대조군과 4개의 실험군으로 나누어 각 군당 15마리씩 배정하였다.

Table 1. Experimental design (unit : number)

Group	Graft materials	Implantation period (weeks)			Total
		2	4	8	
Control	Non-graft	5	5	5	15
Experimental group 1	Tooth-ash	5	5	5	15
Experimental group 2	Tooth-ash and plaster of Paris mixture	5	5	5	15
Experimental group 3	Tooth-ash and chitosan mixture	5	5	5	15
Experimental group 4	Chitosan	5	5	5	15
Case number		25	25	25	75

2) 실험 재료

2-1) 치아회분말

돼지에서 발거된 상태가 양호한 치아들을 생리식염수로 깨끗이 세척한 후 950℃ 용광로에서 회화하여 mortar와 pestle을 이용하여 100mesh (0.149mm)의 입자 크기로 분말을 제작하였다. 모든 재료들은 매식 전 ethylene oxide로 소독하였고, 매식재 혼합은 생리식염수를 이용하였다.

2-2) 치아회분말과 치과용 연석고의 혼합물

제작된 페지의 치아회분말을 치과용 연석고 (plaster of Paris, U.S.A. Gypsum Co., Calcium sulfate hemihydrate)와 무게비 2:1로 혼합하였다.

2-3) 치아회분말과 키토산의 혼합물

Medium molecular weight의 키토산 (Sigma-Aldrich, Yongin, Korea) 3g을 2% 아세트산 용액 100mL에 용해시켜 3% 키토산 용액을 만든다. 3% 키토산 용액 10mL에 3.0g의 치아회분말을 섞은 후 500rpm 교반기로 저어준다. 이 혼합물을 5% tripolyphosphate로 적정한 후 30분 가량 이온 교차 결합을 시킨다. 이온 교차 결합된 키토산과 치아회분말 혼합물을 여과지로 여과하여 mold에 부은 후 60°C 대류식 오븐에 24시간 동안 건조시킨다. 건조된 키토산과 치아회분말 혼합물을 막자사발을 이용하여 분쇄한 후 ethylene oxide gas로 소독한다.

2. 실험 방법

12주령의 암컷 백서를 ketamine hyperchloride (케타라[®], 유한양행) 15mg/100g를 근육 내 주사하여 전신마취를 유도하였다. 통법에 따라 두개부 제모 및 소독을 시행하고 지혈목적으로 2% lidocaine HCl (1:10만 epinephrine 함유)을 주사한 후 두개골 중앙부를 절개하여 골을 노출시켰다. 노출된 두개골 중앙부에 직경 8mm의 원형크기로 1/4 원형 bur를 이용하여 전층으로 두개골을 제거하였다. 대조군을 제외한 실험군에 따라 이식재를 결손부에 매식하고 골막을 흡수성 봉합사로 봉합한 후 상부조직을 봉합하였다. 대조군에서는 두개골을 제거하여 골 결손부를 형성한 후 이식재 매식없이 봉합을 시행하였다. 치아회분말과 치과용 연석고 혼합물을 매식할 때에는 이 매식재를 생리식염수를 이용하여 혼합한 후 매식하였다.

3. 조직형태계측학적 검사

각 실험동물은 ether를 과도하게 흡입시켜 희생한 후 매식부 주위골을 포함하여 표본을 채취하여 10% 중성 포르말린에 24시간동안 고정한 후 12시간 동안 nitric acid로 탈회 시켰다.

표본을 3mm 두께로 절단하여 흐르는 물에 세척 후 자동 조직가공기 (Hypercentre XP, Shandon, UK)를 이용하여 조직 처리를 하였다.

파라핀 포매 후 4~5 μ m로 절단하여 Hematoxylin-eosin과 Goldner's trichrome 염색을 하여 광학 현미경하에서 관찰하였다. 골 결손부위의 재생된 새로운 골양의 측

정을 위해 MagnaFire digital camera system (Optronics, Goleta, USA)를 이용하여 표본의 사진을 촬영한 다음 Visus Image Analysis System (Image & Microscope Technology, 대전, 한국)을 이용하여 측정하였다. 측정된 골 면적은 t-test를 시행하였으며, 유의수준 95%에서 통계적인 유의성을 평가하였다

Ⅲ. 실험 결과

1. 대조군

1) 2주군

극히 소량의 골 형성이 골 결손부 변연에서 관찰되었다 (Fig. 1).

2) 4주군

신생골 형성이 골 결손부 변연에서 관찰되며 골 결손부는 섬유질로 채워졌다 (Fig. 2).

3) 8주군

골 결손부 변연에서만 신생골 형성의 소견이 관찰되었다 (Fig. 3).

2. 실험군 1

1) 2주군

골 결손부 변연에서만 약간의 골 형성 소견이 보이며 결손부는 이식재로 채워졌으며 (Fig. 4), 대조군에 비해 더 많은 골 형성 소견이 관찰되었다 ($p < 0.05$).

2) 4주군

신생골 형성이 골 결손부 변연 뿐만 아니라 이식재 주위에서도 관찰되며 2주군보다 더 증가된 골 형성을 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 5).

3) 8주군

4주군에 비해 더 성숙된 골 융합 소견을 보이며 2주군보다 더 증가된 골 형성 소견이 관찰되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 6).

3. 실험군 2

1) 2주군

결손부 변연에서 약간의 골 형성 소견이 관찰되며 염증소견 또한 보였다 (Fig. 7).

2) 4주군

결손부 변연부와 이식재 주변에서 신생골 형성의 소견이 관찰되었으며 2주군보다 증가된 골 형성 소견을 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 8).

3) 8주군

4주군에 비해 더 많은 신생골 형성이 관찰되었다 (Fig. 9).

4. 실험군 3

1) 2주군

결손부 변연에서 신생골 형성 소견이 관찰되었으며 결손부는 섬유화되어 있었고 실험군 1군에 비해 더 많은 골 형성이 관찰되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 10).

2) 4주군

이식재 주위로 신생골 형성 소견이 관찰되었으며 실험군 2군에 비해 증가된 골 형성을 보였고 2주군에 비해 더욱 성숙된 골 형성을 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 11).

3) 8주군

보다 증가된 골 형성 소견이 관찰되었으며 2주군에 비해 더 증가된 골 형성 소견이 관찰되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 12).

5. 실험군 4

1) 2주군

골 결손부 변연부에서 약간의 골 신생 소견이 보였으며 대조군과 다른 실험군에 비해 보다 증가된 골 형성 소견이 관찰되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 13).

2) 4주군

변연부 뿐 아니라 중심부에서도 신생골 형성 소견이 관찰되었으며 실험군 2군에 비해 보다 증가된 신생골 소견이 관찰되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 14).

3) 8주군

보다 많은 신생골 형성과 골 성숙이 관찰되었으며 실험군 1군에 비해 증가된 골 형성 소견이 관찰되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 15).

Table 2. Comparing of the new bone formation at 2, 4 and 8 weeks after experimentation (unit: mm³)

	<i>2 weeks</i>	<i>4 weeks</i>	<i>8 weeks</i>
<i>Control</i>	0.053±0.014	0.245±0.121	0.380±0.133
<i>Experimental group 1</i>	0.034±0.012	0.177±0.180	0.284±0.235
<i>Experimental group 2</i>	0.047±0.023	0.136±0.048	0.479±0.661
<i>Experimental group 3</i>	0.075±0.029	0.322±0.170	0.436±0.195
<i>Experimental group 4</i>	0.467±0.372	0.445±0.276	0.682±0.500

Table 3. Statistical significance evaluation of each experimental group

	<i>2 weeks</i>	<i>4 weeks</i>	<i>8 weeks</i>
Control vs. Group 1	0.028	0.271	0.108
vs. Group 2	0.340	0.100	0.376
vs. Group 3	0.093	0.236	0.307
vs. Group 4	0.030	0.117	0.115
Group 1 vs. Group 2	0.138	0.429	0.215
vs. Group 3	0.005	0.114	0.075
vs. Group 4	0.009	0.053	0.049
Group 2 vs. Group 3	0.055	0.039	0.446
vs. Group 4	0.017	0.027	0.300
Group 3 vs. Group 4	0.014	0.210	0.168

Table 4. Statistical significance evaluation of each weeks

	<i>Control</i>	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>	<i>Group 4</i>
2 weeks vs. 4 weeks	0.107	0.041	0.001	0.003	0.459
2 weeks vs. 8 weeks	0.103	0.042	0.091	0.001	0.217
4 weeks vs. 8 weeks	0.080	0.382	0.158	0.177	0.191

IV. 총괄 및 고찰

이상적인 골 이식재의 요구조건은 골모세포의 증식과 골전도성에 따른 골 생성이 있어야 하며, 간엽세포를 통한 골유도성이 있어야 한다. 매식된 이식재는 다음과 같은 방법에 의해서 골을 형성한다¹⁹⁻²¹). 첫째, 골재생(osteogenesis)으로서 이는 이식재 안에 살아 남아있는 골모세포와 전구세포가 매식체 주위에서 골화 반응을 일으킬 수 있는 능력을 가짐으로써 신생골의 형성이 이루어진다. 둘째, 골전도(osteoconduction)는 이식부 주위골의 유기질 또는 무기질 성분의 숙주의 미분화간엽세포들이 연골모세포, 골모세포들을 제공하여 이식된 물질을 기질로 하여 골을 형성하는 것을 말한다. 이때 이식재는 매식부위 내측으로의 혈관화를 위한 비계(scaffold)로서의 역할만을 하게 된다. 셋째, 골유도(osteinduction)로서 매식체내의 어떤 화학주성을 가진 물질들이 매식부 주위에 있는 숙주의 미분화 간엽세포들을 연골모세포, 골모세포로 변환하게끔 유도하여 골형성이 이루어지게 하는 것이다.

골 결손부에서 골의 형태와 특성을 회복해주기 위해서는 부가적인 골 대체물질이 필요하다. 자가골 이식은 적은 결손부에서 가장 효과적이지만 채취되는 양이 제한된다는 단점이 있다. 게다가, 공여부의 부가적인 수술과 신경손상, 공여부의 불편감, 수술시간의 연장 등의 단점이 있으며 수여부에 따른 크기와 모양 또한 제한적이다²²⁻²⁸). Weiland²⁶)는 큰 골 결손부의 처치에 있어서 동종골이 적절하며 동종골은 자가골 이식의 단점을 보완해줄 수 있다고 하였다. 그러나 동종골은 간염과 HIV 같은 전염성 질환과 기타 여러 면역반응의 원인이 될 위험성을 가지고 있다. Hieple 등²⁷)은 이종골 이식은 높은 항원성을 지니고 있기 때문에 동종골 보다 더 높은 면역반응을 일으킬 수 있다고 하였다. 또한 이종골은 거의 모든 골유도 단백질을 제거하였기 때문에 골 유도능력과 골 형성능력이 저해된다. 이러한 문제점들을 극복하기 위해 여러 가지 골 대체 물질들이 연구 개발되고 있다.

골대체체는 생체 친화성을 가져야 하며 골 재생을 통하여 부분 혹은 전체적으로 생리적이여야 하며^{29, 30}), 세포독성이 없어야 하고 골유도 혹은 골전도의 특성을 가져야 한다. Younger 등³¹)은 자가골 이식에서 5~35%의 비유합 소견이 관찰된다고 보고하였다. 비유합은 인위적인 내부 고정(internal fixation)으로 완전히 해소할 수 없기 때문에 생물학적인 보강이 중요하다^{32, 33}). 따라서 자가골 이식의 합병증을 감

소시키고 골 유합의 성공률을 증가시키기 위해 demineralized bone matrix (DBM)³⁴⁾, bone morphogenic protein (BMP)³³⁾, calcium phosphate ceramic³⁵⁾ 등의 골 대체물질들이 연구 개발되어왔다. 그러나 세라믹 골 대체제는 완전히 흡수되지 않기 때문에 골 형성을 억제하고 신생골의 강도를 약화시키는 문제점을 가지고 있다. 최근에는 tricalcium phosphate, hydroxyapatite, calcium sulfate 등이 골전도성 물질로 소개되고 있다.

치아회분말은 폐기처리되는 적출물인 발거된 치아들을 재활용함으로써 환경오염을 방지하고 제작단가를 감소시킬 수 있다³⁶⁾. 1992년 김 등³⁷⁾은 발치된 치아들을 윤 등¹¹⁾이 시행한 방법으로 950°C 고온의 전기로에서 회화한 후 이를 약제 분말기로 분해하여 일정한 크기의 mesh tray에 걸러 미세한 치아 회분말을 얻어 골 이식에 대한 실험과 임상 연구를 시행하여 양호한 결과를 얻었다고 보고하였다.

치아 회분말과 치과용 연석고의 혼합 매식제는 1992년 개발이 시작되어 다양한 실험과정을 거쳐 안정성과 유효성이 입증되었으며, 임상연구를 통해 양호한 성적을 얻기도 하였다³⁸⁻⁴¹⁾.

치아회분말의 구성 성분은 수산화인회석으로 수산화인회석과립은 경화될 때까지 그 과립을 유지하는 것이 문제점으로 제기되었었다. 보통 초기 안정화 단계까지 이루어지는데 약 3~4주 걸린다. 이에 쉽게 사용이 가능하고 무균처리가 가능하며 경제적이고 완전하고 빠르게 흡수되는 치과용 연석고를 혼합하게 되었으며 이러한 치과용 연석고는 치아회분말의 지지체로 작용하여 효과적인 delivery system을 제공한다.

치아회분말과 치과용 연석고의 혼합 이식제는 다음과 같은 여러 가지 장점들을 갖고 있다. (1) 현저한 이물반응 또는 염증반응이 없고, (2) 골전도 능력을 보유하고 있으며, (3) 흡수성이고, (4) 쉽게 조작이 가능하며, (5) 가격이 저렴하다. 또한 신생골과 직접적인 접촉을 보이며 생리 식염수와 짧은 시간동안 혼합하면 안정적이고 견고한 이식재로서의 역할을 하면서 분말의 유동성을 최소화할 수 있다고 보고되었다⁴²⁾. 또한 치아회분말의 세포독성 및 과민성 검사를 시행한 동물실험 연구에 의하면 세포독성이 없고 특이한 알러지 반응도 없어 생체에 안심하고 사용할 수 있는 것으로 보고되었다³⁶⁾.

Frame 등⁴²⁾은 수산화인회석과 연석고를 동시에 혼합하여 매식한 경우 연석고가 골치유의 방해를 유발하지 않는다고 보고하였다.

Rawlings 등²¹⁾은 두개골 결손부에 석고 단독으로 사용하는 경우에 석고가 너무 빨리 흡수되므로, 수산화인회석과 석고 혼합매식을 고양이에서 시행한 경우 임상적, 조직학적으로 우수한 결과를 보였다고 보고하였다.

Najjar 등⁴¹⁾은 수산화인회석과 치과용 연석고를 혼합매식한 경우가 단독으로 매식한 경우보다 골치유능력이 양호하며 골전도 능력이 향상된다고 하였으며, 수산화인회석 분말과 연석고를 혼합하여 이식한 경우 이식분말의 유지력이 현저히 향상되고, 주변 골로부터 골침투력이 상당히 우수하다고 보고하였다.

김 등³⁸⁾은 치아회분말과 치과용 연석고 혼합제로 악골 결손부를 수복한 10명의 환자에 대한 연구결과 이식재료는 유용하고 쉽게 조작이 용이한 골대체재료라고 하였다.

김 등^{43, 44)}은 이를 이용한 임플란트 주변 골결손부의 재건을 위해 사용된 연구에서도 우수한 골-임플란트간 접촉이 형성됨을 보고하였다.

그러나 치과용 연석고는 치아회분말의 이식에 있어서 단순한 delivery system만을 제공할 뿐 골 형성을 하는데 있어서 어떤 역할도 수행하지 않는다. 이에 치과용 연석고 대신 delivery system으로써 본 연구에서는 키토산을 이용하였다.

키토산은 지방을 흡수하거나 지방과 결합하여 체중 감소를 도와주며 콜레스테롤 조절에 효과적이며 결합조직 치유를 증진시켜주고 지혈을 촉진한다. 또한 최근의 연구에서는 키토산이 창상의 치유에도 도움이 된다고 하였다. 키토산은 창상이 치유되는 동안 조직화와 세포화에 효과적이며 신생골 형성을 증가시킨다. 골 형성에 대한 키토산의 효과는 다양한 동물 실험에서 연구되어져 왔다. 일반적으로 키토산은 해면골에 위치하여 다양한 기질 세포의 유사분열을 도와주는 fibroblast growth factor (FGF)와 결합한다⁴⁵⁾. 키토산은 대식세포와 단핵 세포를 활성화 하며 FGF와 platelet-derived growth factor (PDGF)의 생산을 유도한다. Malette 등⁴⁶⁾은 개 실험에서 골 결손부에 주입한 키토산이 골 재생을 증진시킨다고 하였다. 멸균 식염수로 처치한 창상은 가골의 형성과 함께 전형적인 골 파괴와 골 재생과정을 통하여 치유되는데 반해 키토산으로 처치한 창상은 가골의 형성없이 직접 피질골이 형성되어 치유되었다. Muzzarelli 등^{47, 48)}은 키토산을 치주 병변에 적용하였을 때 조직의 유기질화는 가속되며 섬유화는 감소되었고 정상적인 골 형성이 골 결손부에 키토산을 주입함으로써 증진되었다고 하였다. 이 등⁴⁹⁾은 조직 공학을 통해 키토산/tricalcium phosphate sponge를 적용함으로써 조골세포의 분화에 대한 골격의 3차

원적 구조를 만들 수 있다고 하였다. Klokkevoid 등¹⁵⁾ 은 키토산이 osteoprogenitor cell의 분화를 활성화시키며 골 형성을 유도한다고 하였다.

따라서 본 연구에서는 치아 회분말과 키토산 혼합물이 골결손부에 미치는 영향을 알아보려고 백서의 두개골에 골 결손부를 형성하여 여러 가지 다양한 이식재를 이식하여보았다. 본 연구결과 대조군에서 가장 적은 양의 신생골 형성이 관찰되었으며, 키토산을 이식한 실험군 3과 실험군 4에서 가장 많은 양의 신생골 형성이 관찰된 것으로 미루어 보아 초기 골형성과 안정성에 있어 치아회분말과 키토산의 혼합 매식이 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

V. 결론

골 결손부는 주로 발치와, 낭종, 치주질환으로 인해 발생이 된다. 이러한 골 결손부에는 여러 이식재들이 사용되고 있다. 이 중 치아회분말의 골 형성에 미치는 영향은 이미 많은 연구가 진행되어 왔다. 이에 본 연구에서는 치아회분말의 골 형성 능력을 증대시킬 목적으로 창상치유와 골 형성을 증가시키는데 그 효과가 입증된 키토산을 혼합하여 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. 이식재를 사용하지 않은 대조군에 비해 이식재를 사용한 실험군이 유의한 골형성 증가 소견을 보였다.
2. 기존의 치아회분말과 치과용 연석고 혼합물을 이식한 실험2보다 치아회분말과 키토산 혼합물을 이식한 실험군 3군에서 보다 증가된 신생골 형성이 관찰되었으며, 특히 4주째 통계학적 유의성을 가지는 골 형성의 증가를 알 수 있었다.
3. 키토산에 치아회분말을 혼합 이식한 실험군 3군과 키토산만을 이식한 실험군 4군에서 가장 많은 신생골 형성이 관찰되었으며 두 실험군 사이의 차이는 없었다.

VI. 참고문헌

1. Schallhorn RG, Hiatt WH, Boyce W. Iliac tansplants in periodontal therapy. J Periodontol 1970 Oct;41(10):566-580
2. Berrey BH Jr, Lord CF, Gebhardt MC, Mankin HJ. Fractures of allografts. frequency, treatments, and end-results. J Bone Joint Surg Am. 1990 Jul;72(6):825-833
3. Bonfiglio M, Jeter WS. Immunological responses to bone. Clin Orthop Relat Res. 1972 Sep;87:19-27.
4. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. J Appl Biomater. 1991 Fall;2(3):187-208.
5. Felício-Fernandes, Laranjeira MCM. Calcium phosphate biomaterials from marine algae. hydrothermal synthesis and characterization. Quim Nova 2000; 234: 441-446
6. Pereira APV, Vasconcelos WL, Orefice RL. Novos biomateriais: hibridos organico-inorganicos bioativos. Polim: Cienc e Tecnol 1999; 9: 104-109
7. Kawachi EY, Betran CA, cos Reis RR, Alves OL. Bioceramicas: Tendencias e perspectivas de uma area interdisciplinar. Quim Nova 2000; 23: 518-522
8. Boyne, P.J., Fremming, B.D., Welsh, R., and Jaraho, M.. Evaluation of a ceramic hydroxyapatite in femoral defects. J Dent Res 1978; 57:108
9. Douglas K. Ousterhout., Aesthetic contouring of the craniofacial skeleton Little, Brown and company 1991
10. Johnson RB, Gilbert JA, Cooper RC, Dai X. Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. J Periodontol 1997; 68(9):864-971
11. Yun CG, Ho KY. A study of mechanical property and biocompatibility by cell culture of tooth-ash and porcelaine composite mixture implant. Kor Prosthodontol. 1984; 22:51
12. Finn RA, Bell WH, Brammer JA. Interpositional grafting with autogenous bone and coralline hydroxyapatite. J Maxillofac Surg 1980; 8:217

13. Shigemasa Y, Saito K, Sashiwa H. Enzymatic degeneration of chitins and partially deacetylated chitins. *Int J Biol Macromol* 1994; 16: 43-49
14. Klokkevold PR, Fukauama H, Sung EC. The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 1999; 57:49-52
15. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB. Osteogenesis enhanced by chitosan(poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J Periodontol* 1996; 67:1170-1175
16. Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials* 1994; 15:1075-1081
17. Muxxarelli RA, Zucchini C, Ilari P. Osteoconductive properties of methylpyrrolidine chitosan in an animal model. *Biomaterials* 1993; 14:925-929
18. Ueno H, Tanaka I, Kaba N. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials* 1999; 20:1407-1414
19. Bursten AH, Einhorn TA, Kopman CR, Lane JM, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. *J Bone Joint Surg* 1984; 66:274
20. Glowacki J, Mulloken JB. Demineralized bone implnats. *Clin Plast Surg* 1985; 12:233,
21. Rawlings CE, Wilkins RH, Hanker JS, Georgiade NG, Harrelson JM. Evaluation in cats of new material for cranioplasty : a composite of plaster of paris and hydroxyapatite. *J Neurosurg* 1988; 69:269-275
22. Hagino T, Hamada YJ. Acceleration bone formation and earlier healing after using demineralized bone matrix for limb lengthening in rabbits. *J Orthop Res* 1999; 17:232-237
23. Muschler GF, Huber B, Ullman T. Evaluation of bone grafting materials in a new canine segmental spinal fusion model. *J Orthop Res* 1993; 11:514-524
24. Richards M, Huibregtse BA, Caplan Al. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res* 1999;

17:900-908

25. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rat. *J Bone Joint Surg* 1992; 74:659-670
26. Weiland AJ. Current concepts review : vascularized free bone transplants. *J Bone Joint Surg* 1981; 63:166-169
27. Heiple KG, Kendrick RE, Herndon CH. A critical evaluation of processed calf bone. *J Bone Joint Surg* 1967; 49:1119-1127
28. Hamanishi C, Yoshii T, Totani Y. Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells. An experimental study using dual x-ray absorptiometry. *Clin Orthop* 1994; 303:250-255
29. Cameron HU, MacNab I, Pilliar RM. Evaluation of a biodegradable ceramic. *J Biomed Mater Res* 1977; 11:179-186
30. Klien CPAT, Drissen AA, De Groot K. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res* 1984; 17:769-784
31. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; 3:192-195
32. Boden SD, Martin GJ, Morone M. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine* 1999; 24:320-327
33. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. Lumbar intertransverse-process spinal arthrodesis with use of a bovine bone-derived osteoinductive protein: a preliminary report. *J Bone Joint Surg* 1995; 77:1404-1417
34. Frenkel SR, Moskovich R, Spivak J. Demineralized bone matrix: enhancement of spinal fusion. *Spine* 1993; 18:1634-1639
35. Bucholz RW, Carlton A, Holmes RZ. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate graft substitute. *Orthop Clin North Am* 1987; 18:323-334

36. Thilander B, Stenstorm S. Bone healing after implantation of some hetero- and alloplastic materials. : An experimental study of the guinea pig. *J Cleft Palate* 1970; 7:540
37. Kim YK, Yeo HH. Implantation of tooth-ash and plaster of Paris mixture : a clinical application. *Korean Academy Maxillofac Plast Reconstr Surg* 1994; 16:130-136,
38. Kim SG, Yeo HH, Kim YK. Grafting of Large defects of the jaws with a particulate dentin-plaster of Paris combination. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88:22-25
39. Li M, Shen Y, Wornski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 1997; 20:55-61
40. Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurstram K, Sundin Y. Osteopromotion ; A soft tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol* 1993; 64:1116-1128
41. Najjar TA, Lerdrit W, Parsons JR. Enhanced osseointegration of hydroxyapatite implant material. *Oral Surg* 1991; 71:9-15
42. Frame JW, Brady CL. The versatility of hydroxyapatite blocks in maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1987; 25:452-464
43. Kim SG, Chung CH, Kim YK. Grafting defects using a particulate dentin-plaster of Paris combination for implant placement : A case report *Hosp Dent(Tokyo)* 2001; 13(2):127
44. Kim YK, Kim SG, Lee MH. An experimental study on the healing process after implantation of a various bone substitutes in the rats. *Korean Academy Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2001; 27:15
45. Hauschks PV. Growth factor effect in bone. In: Hall BK, ed. *Bone*. London: CRC Press, 1990; 103-113
46. Malette WG, Quigley HJ, Adickes ED. Chitosan effect in nature and technology. New York: Plenum Press, 1986; 435-457
47. Muzzarelli RA, Biagini G, Pugnali A. Reconstruction of paradontal tissue with chitosan. *Biomaterials* 1989; 10:598-603

48. Muzzareli RA, Biagini G, Bellardini M. Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery. *Biomaterials* 1993; 14:39-43
49. Lee YM, Park YJ, Lee SJ. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol* 2000; 71:410-417

VI. 사진설명

Fig. 1. Control group at 2 weeks (H-E stain, ×40)

A tiny new-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisk) was identified. Almost all of the defect area was filled with fibrosis (open arrows).

Fig. 2. Control group at 4 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisks) was identified. The defect area except periphery was filled with fibrosis (open arrows).

Fig. 3. Control group at 8 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisk) was identified. The defect area except periphery was filled with fibrosis (open arrows).

Fig. 4. Experimental group 1 at 2 weeks (H-E stain, ×40)

A tiny new-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisks) was identified. The defect area was filled with graft material hydroxy-apatite (open stars) and chronic inflammation with fibrosis.

Fig. 5. Experimental group 1 at 4 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisks) was identified. The defect area was filled with new-bone formation around the graft material hydroxy-apatite (open stars) at the periphery and chronic inflammation with fibrosis.

Fig. 6. Experimental group 1 at 8 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisk) was noted. The defect area was filled with new-bone formation around the graft material hydroxy-apatite (open stars) at the central as well as peripheral portions.

Fig. 7. Experimental group 2 at 2 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisks) was demonstrated. The defect area was filled with graft material hydroxy-apatite (open stars) and chronic inflammation with fibrosis. The graft material hydroxy-apatite (open stars) intermixed with chronic inflammation with fibrosis was found in the defect area.

Fig. 8. Experimental group 2 at 4 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisk) was noted. The defect area was filled with new-bone formation at the central as well as peripheral portions. The graft material hydroxy-apatite (open stars) was observed in the central region of the defect.

Fig. 9. Experimental group 2 at 8 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisk) was noted. The defect area was filled with new-bone formation around the graft material hydroxy-apatite (open stars) mainly at the peripheral portion

Fig. 10. Experimental group 3 at 2 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisk) was noted. The defect area except periphery was filled with extensive fibrosis (open arrows) and some graft material hydroxy-apatite (open stars).

Fig. 11. Experimental group 3 at 4 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisk) was found. The defect area was filled with centripetal new-bone formation.

Fig. 12. Experimental group 3 at 8 weeks (H-E stain, ×40)

Thick new-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisk) was demonstrated.

Fig. 13. Experimental group 4 at 2 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin (asterisks) was identified. The defect area except periphery was filled with graft material chitosan (open stars) and fibrosis (open arrows).

Fig. 14. Experimental group 4 at 4 weeks (H-E stain, ×40)

New-bone formation (arrows) around the defect margin was noted. The defect area was filled with new-bone formation at the central as well as peripheral portions. Graft material chitosan (open stars) and fibrosis (open arrows) were demonstrable in the defect area.

Fig. 15. Experimental group 4 at 8 weeks (H-E stain, ×40)

Centripetal new-bone formation (arrows) with fibrosis of the defect area was identified.

VIII. 사진 부도

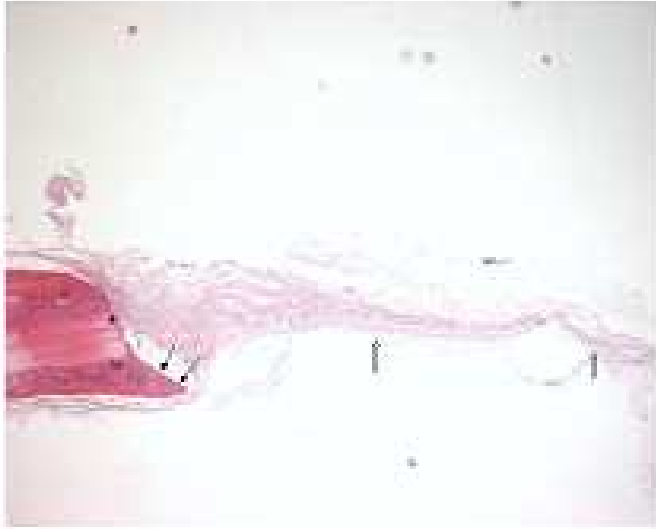


Fig. 1



Fig. 2

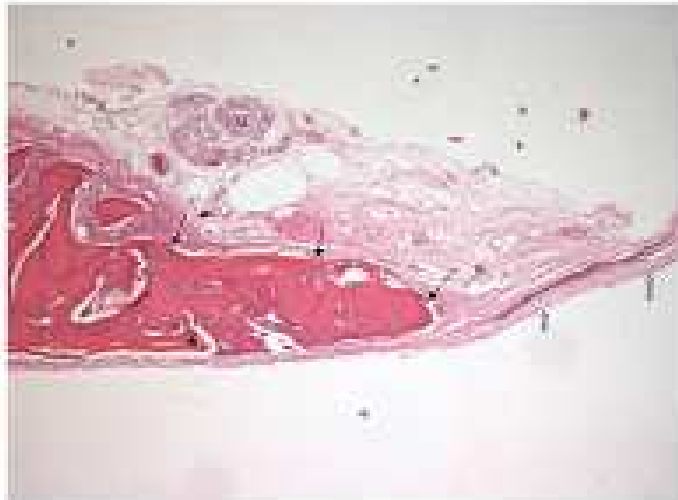


Fig. 3

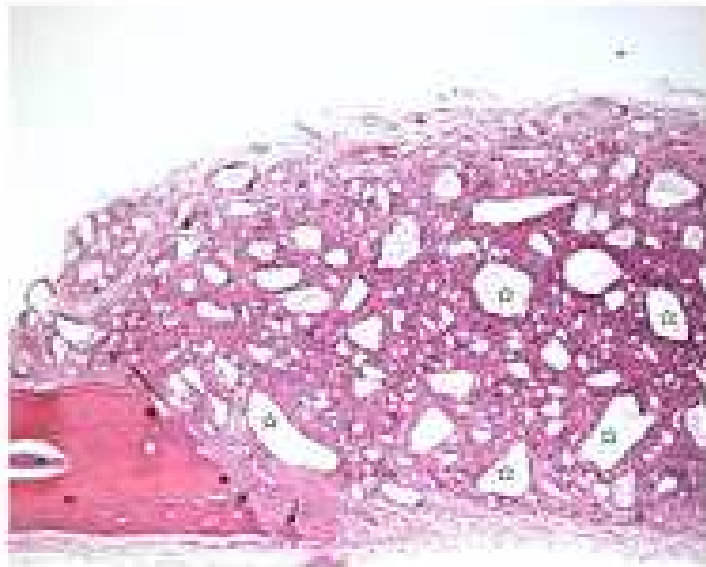


Fig. 4

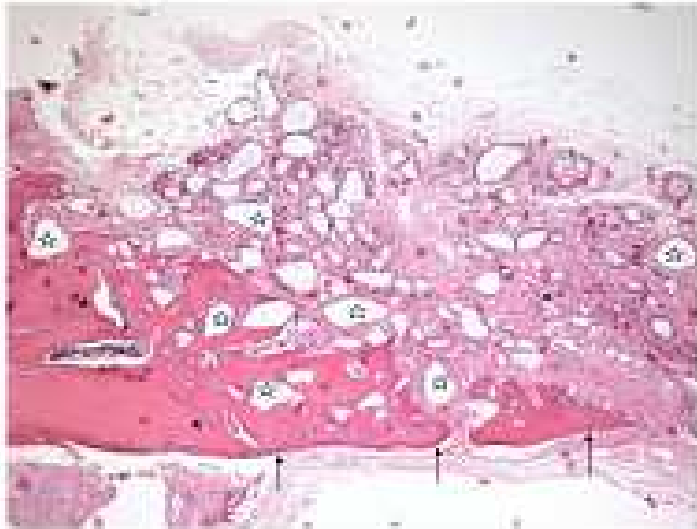


Fig. 5



Fig. 6

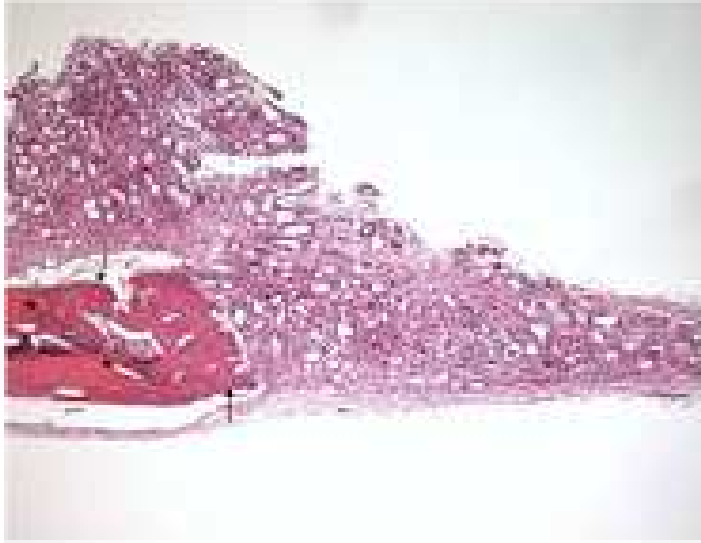


Fig. 7



Fig. 8

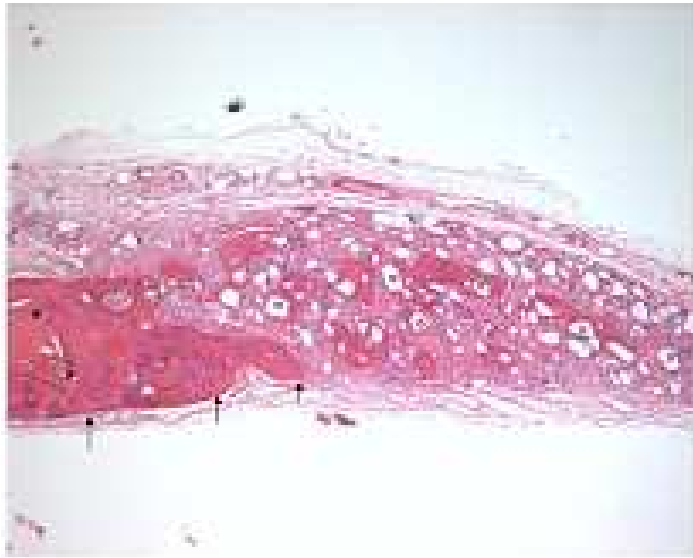


Fig. 9

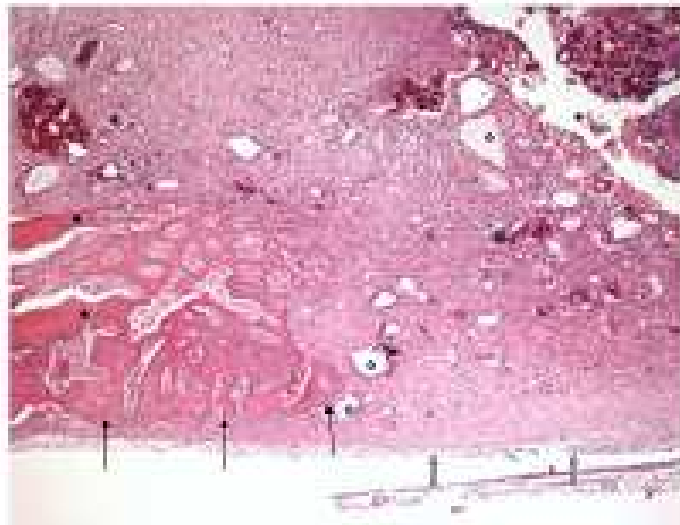


Fig. 10

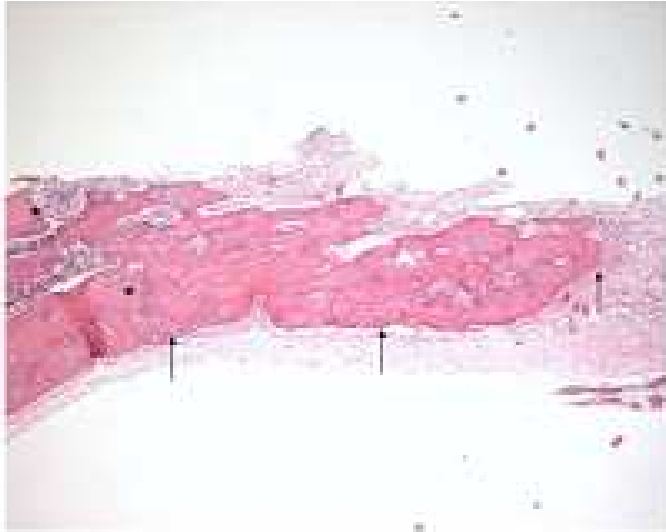


Fig. 11



Fig. 12



Fig. 13



Fig. 14



Fig. 15