키토산 나노 차폐막의 골조직 재생유도 능력에 관한 조직학적 연구

신승윤[1,4,5] · 박호남[1] · 김경화[1,4,5] · 이승진[3,4,5] · 박윤정[2,4,5]
구 영[1,4,5] · 류인철[1,5] · 한수부[1] · 정종평[1,4,5]

[1] 서울대학교 치과대학 치주과학교실
[2] 서울대학교 치과대학 두개악안면재건과학교실
[3] 이화여자대학교 약학대학 물리약학교실
[4] 지능형 생체계면공학연구센터, KOSEF
[5] ㈜ 나이벡

I. 서론

키토산은 키틴을 해중합(depolymerization)하고, 부분적으로 탈아세틸화(deacetylation)하여 얻어지는 N-acetyl-glucosamine과 N-glucosamine의 혼성중합체(copolymer)이다. 키틴은 게나 새우와 같은 갑각류의 껍질, 메뚜기와 같은 곤충류의 표피나 외각, 버섯이나 효모 같은 균류의 세포벽 등 자연계에 널리 분포하고 있어 키토산은 쉽게 얻을 수 있다. 키토산은 생분해가 가능하고 독성이 없는 중합체로서 생체적합성이 우수한 것으로 알려져 있다. 키틴과 키토산은 주로 리소자임 (lysozyme)에 의해 가수분해되어 단량체 형태로 흡수된다[1,2]. 키토산의 지혈효과[3,4] 및 창상 치유 촉진능력은 이미 잘 알려져 있다[5,6]. 키토산은 분말, 젤, 필름, 스펀지, 용액 등과 같은 다양한 형태로써 이용이 가능하고, 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF) 및 골형성단백질(bone morphogenic protein, BMP) 등과 같은 생체 활성물질의 부착이 용이하다[7-10]. 따라서 골대체물과 차폐막을 비롯한 다양한 용도의 임상 적용이 가능하여 치과 및 정형외과 분야에서 많은 연구가 진행되고 있다[11-14].

최근 나노공학의 발전으로 중합체 (polymer)나 탄소와 같은 다양한 소재를 이용한 나노미터 굵기의 나노섬유를 제작, 이를 이용한 여러 연구들이 진행되고 있다. 나노섬유는 마이크로 미터 굵기의 기존의 섬유에 비하여 단위 무게당 표면적이 매우 커서 생체와 반응할 수 있는 면적이 증가할 뿐 아니라, 높은 다공성을 가지고 있다. 나노섬유의 제작은 전기방사법(electrospinning technique)을 이용하는데[15,16], 이는 중합체의 생성과 침착을 조절하기 위하여 전기장을 이용하는 방법이다. 먼저 중합체를 용매를 이용하여 용해시킨 후 고속으로 분사하고, 분사된 중합체에 고압의 전류를 이용하여 자기장을 발생시켜서, 목표 대상에 불규칙하게 부착되도록 한다. 중합체가 건조되면 섬유가 완성된다. 이 방법은 처리과정이 빠르며, 비용이 적게 드는 효율적인 나노섬유의 제작 방법이다.

이 연구는 전기방사법으로 제작된 키토산 나노차폐막의 조직유도재생능을 알아보기 위하여 가토의

교신 저자 : 정종평, 서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호 : 110-749, 전화번호 : 02-760-2289
팩스번호 : 02-744-0051, E-mail : ccpperio@snu.ac.kr

두개골 골결손부에 이를 적용하여 골유도재생능을 Gore-Tex 차폐막과 비교하는 것이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 키토산 나노차폐막의 제작

키토산 분말(키토라이프, 서울, 한국, 분자량 300,000, 알킬화 98%이상)을 상온에서 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol(HFIP) 와 methylene chloride에 용해시켰다. 전기방사를 위하여 키토산 용액 10mL를 유리 피펫에 넣고, 0.5mL/min의 속도로 주입시켰다. 20kV의 높은 전압을 이용하여 분사되는 키토산 나노 섬유를 피펫 팁 아래의 알루미늄 판에 불규칙하게 유도하여 배열시켰다. 만들어진 나노섬유 차폐막을 100℃에서 48시간 동안 진공상태로 건조 시켰다. 이와 같은 방법으로 제작된 키토산 나노섬유의 굵기는 평균 200㎚이었으며, 이를 이용하여 만들어진 차폐막의 평균 pore 크기는 5㎛, porosity는 80%로 나타났다(Figure 1A). 차폐막표면에 MG63 세포를 부착하였을 때 1일째에 좋은 세포부착소견을 보였다(Figure 1B).

2. 가토 두개부 골결손부의 형성

2마리의 웅성가토(New Zealand White rabbit)를 염산 자일리신(Rompun®, 한국바이엘, 한국)과 염산 케타민(Ketalar®, 유한양행, 한국)을 1:4로 혼합하여 근주하여 마취하고, 두부의 정수리 부분의 털을 깎고, potadine으로 소독한 후 2% 리도카인으로 국소마취를 추가로 실시하였다. 소독된 두피를 정중선을 따라서 3cm정도 절개한 후, 골막을 박리하여 두개골을 노출시켰다. 내경 8mm의 trephine bur(3i implant innovation, USA)를 이용하여 좌우의 측두골에 대칭으로 2개의 원형 골결손부를 형성하였다. 이때 두개골의 열손상을 방지하기 위하여 충분한 식염수로 관주하였으며, 두개골 하방의 뇌막에 손상을 주지 않도록 주의하였다. 이렇게 형성된 원형의 골결손부에 키토산 나노섬유를 피개하고, 작은 핀(AutoTac System™, Biohorizon, Birmingham, AL, USA) 으로 고정하여 차폐막이 움직이지 않도록 하였다. 대조군으로는 Gore-Tex®(W.L. Gore & Associates, Inc, Flagstaff, AZ, USA)를 이용하였다. 골막과 두피를 흡수성 봉합사와 수술용 실크를 이용하여 봉합하고, 항생제(Kanamycin, 삼양약화학, 한국)를 근주하였다.

3. 조직표본의 제작 및 관찰

수술 4주 후에 가토를 CO_2 chamber에 넣어서 희생하고, 두개부의 조직을 수거하였다. 수거한 조직

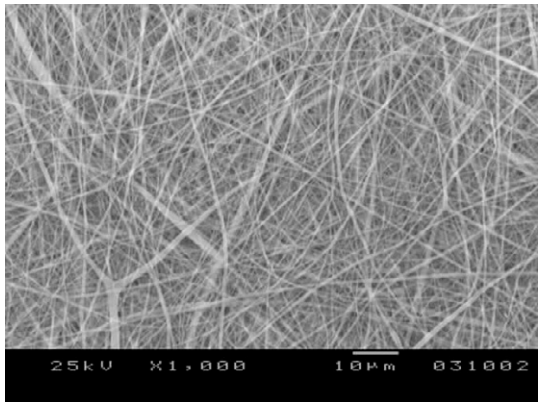

Figure 1A. Scanning electron microscopic image of a chitosan nanofiber membrane surface.

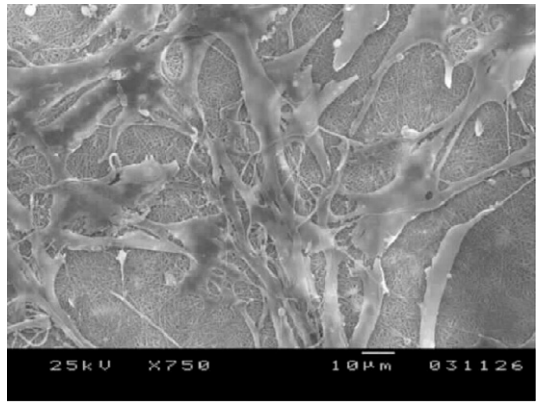

Figure 1B. MG63 cells cultured on a chitosan nanofiber membrane surface.

을 포르말린용액에 넣고 고정시킨 후 통법에 따라 비탈회 표본을 제작하였다. Super low-viscosity Embedding Media(Polysciences Inc., PA)를 사용하여 포매하고, Exakt cutting and grinding system(Exakt-Appratеb, Germany)으로 절단·연마하여 두께 30㎛가량의 조직표본을 제작하였다. 제작된 표본을 multiple 염색을 시행하여 광학현미경(Olympus BH-2 light microscope, Olympus Optical Co., Osaka, Japan)하에서 조직학적 관찰을 실시하였다.

III. 연구결과

1. 조직학적 관찰

키토산 나노차폐막을 이용하여 두개골 결손부에 골유도재생술을 실시한 4주 후의 조직학적 관찰결과 키토산 나노차폐막을 사용한 군에서는 골결손부 전체에서 신생골 형성과 골가교 형성이 이루어져서 원래의 두개골과 골융합이 잘 이루어져 있었다(Figure 2A). 차폐막 하부 신생골 골가교 형성부위를 광확대로 관찰한 결과, 골절단부 주위에는 신생골이 골양형태를 벗어나 신생골화 형태가 뚜렷이 나타나면서 두꺼운 골이 형성되었다(Figure 2B, D). 천공 중앙부의 골형성 양태는 둥근골양 형태로써 서로가 연결되면서 많은 신생골 형성이 일어났다. 4주 후의 조직학적 관찰에서 이식된 차폐막의 변형 없이 이식시와 동일한 원형을 유지하였으며, 차폐막의 흡수는 관찰되지 않았다(Figure 2C).

Gore-tex 차폐막을 이용한 골유도재생술을 실시한 4주 후의 조직학적 관찰결과 일부 골절단부에서 신생골 형성이 활발히 이루어지나 골가교 형성은 많이 진행되지 않고 있으며, 가느다란 띠 형태로 연결된 신생골양 형태의 가교가 골결손부 절반까지 형성되고있음이 관찰되었다(Figure 3A). 강확대관찰에서 골결손부 중앙의 신생골 형태는 둥근골양으로 점차 커지는 양상이나, 골결손부의 1/2정도만이 형성되어 있었다(Figure 3B, D). 그러나 골결손부 중앙부에는

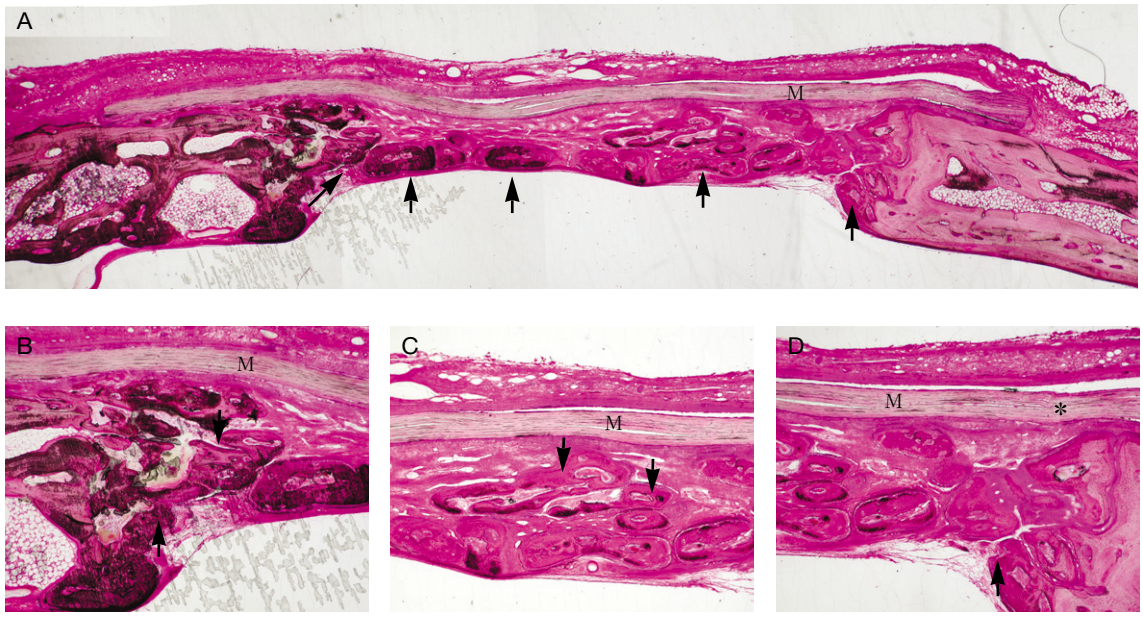

Figure 2. Histologic view of rabbit calvarial defect covered by chitosan nanofiber membrane for 4 weeks.
(A) ×40, (B), (C), (D) ×100
M: chitosan nanofiber membrane, Arrow : new bone, Asterisk (*) : Degradation of membrane

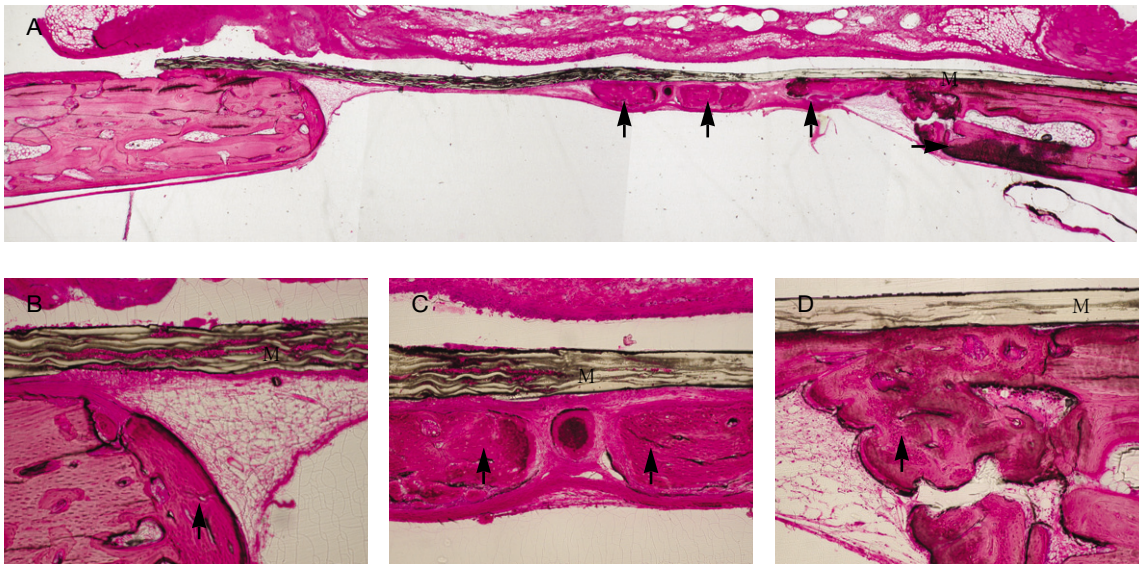

Figure 3. Histologic view of rabbit calvarial defect covered by Gore-Tex membrane for 4 weeks.
(A) x40, (B), (C), (D) x100
M : Gore-Tex membrane Arrow : new bone

두꺼운 골양형태의 신생골이 두껍게 형성되었으나, 중앙부 전체를 채우지 못하고 있었다(Figure 3C). 4주 이식한 Gore-Tex 차폐막은 이식 원형 그대로 완전한 형태로 존재하는 것이 관찰되었다(Figure 3C).

IV. 총괄 및 고찰

골유도재생술식(Guided tissue regeneration)에서 차폐막은 골세포 및 치주인대세포가 골 결손부로 이동하여 골을 생성할 수 있도록 주변의 상피세포와 결체조직 세포로부터 차단하는 역할을 한다. 골유도재생술식이 소개된 이후에 ePTFE, PLA, PGA, PLLA, collagen 등 다양한 재료가 차폐막으로 이용이 되었다. 이러한 차폐막은 생체내에서 분해가 가능한지에 따라서 크게 흡수성 차폐막과 비흡수성 차폐막으로 나뉜다. Gore-Tex로 대표되는 비흡수성 차폐막은 우수한 골재생 능력과 생체내에서의 안정성 및 생체적합성이 다수의 연구결과로써 확인이 되었지만, 2차 수술이 필요하여 환자의 불편함과 경제적인 부담이 단점으로 지적되고 있다. 이에 PLLA, PLA, collagen 등의 흡수성 재료를 이용한 비흡수성 차폐막의 개발이 이루어져 시판되고 있다. 하지만 이러한 PLA, PLLA, PGA를 이용한 흡수성 차폐막은 합성 고분자 중합체로써 분해시에 다량의 염증세포를 집결시키고, 콜라겐은 흡수기간이 빨라서 충분히 차폐막으로써의 기능을 하지 못하거나, 동물의 콜라겐을 이용한 것으로써 면역반응을 일으킬 수 있다.

나노섬유의 제작기법인 전기방사법(electrospinning technique)은 최근에 개발된 방법으로 전기자기장을 이용하여 나노 섬유를 방사하여 직물형태가 아닌 불규칙한 배열의 막을 제조하는 방법이다. 불규칙한 배열을 갖는 나노섬유로 만든 차폐막의 구조는 extracellular matrix(ECM) 단백질에 존재하는 콜라겐의 3차원적 구조와 유사하다. 나노미터 크기의 콜라겐 다발은 proteoglycan 과 함께 3차원적인 네트워크를 이루고 존재하고 있다[17]. 기존의 마이크로미터 단위의 섬유와 비교하여 더 가느다란 나노섬유는 단위 무게당 표면적이 매우 커서 생체와 반응할 수 있는 면적이 높고, 또한 3차원적으로 다공성이 높다고 알려져 있다. 이러한 성질은 고밀도로

세포와 조직을 배양하는데 유용하여 나노섬유로 제작한 물질은 조직공학을 위한 우수한 재료로 여겨지고 있다.

키토산은 생분해가 가능하고, 독성이 없는 중합체로써 생체적합성이 우수하여, 지혈효과 및 창상치유를 촉진시킨다고 알려져 있다. 분말, 젤, 필름, 스펀지, 용액 등의 다양한 형태로 변형이 가능하며 다양한 물질과 혼합하여 용도에 맞게 여러 가지 형태로 연구되고 있으며, PDGF, BMP등의 생체 활성물질의 부착으로 부가적인 효과를 얻고자 많은 연구자들이 노력 중이며, 골대체물질, 차폐막 등의 임상적용을 위하여 치과 및 정형외과 분야에서 많은 연구가 진행되고 있다[11-14].

2001년 백 등[18]은 치주인대 섬유아세포에 대하여 독성을 나타내지 않는 최고의 키토산 농도를 0.1mg/ml라고 하였으며, 이 농도의 키토산이 함유된 배지에서 치주인대 섬유아세포를 배양한 후 RNA를 분리하여 제 1형 교원질의 발현정도를 비교한 결과 대조군에 비하여 mRNA의 발현이 증가하였으며, ALP 활성도 대조군에 비하여 증가하였다고 하였다. 2001년 계 등[19]의 연구에 의하면 키토산 차폐막과 키토산-셀룰로오즈 차폐막은 치주인대 세포의 활성에 유해한 영향을 미치지 않았으며, 백서의 골결손부에 대한 골조직 재생유도능력을 평가한 결과 신생골의 생성을 증가시킨다고 하였다.

가토의 두개골 결손부에 시행한 골유도재생술을 통하여 키토산 나노 차폐막의 골유도재생능력을 조직학적으로 평가한 결과 골결손부 전체에서 신생골 형성과 골가교 형성이 이루어져 있으며, 원래의 두개골과 골융합이 잘 이루어져 있음을 관찰 할 수 있었다. Gore-tex 차폐막을 이용한 골유도재생술의 경우에도 4주 후의 조직학적 관찰 결과 신생골의 형성 및 골 가교의 형성이 일어났다. 이러한 결과는 가토를 이용한 실험에서 키토산 나노차폐막이 Gore-tex 차폐막과 동등한 골유도재생능력을 갖고 있음을 보여주고 있다. 하지만, 키토산 나노 차폐막은 흡수성 차폐막으로써 실제 임상에 적용할 경우, Gore-tex 차폐막보다 더 유용하게 사용할 수도 있으리라 생각된다.

V. 결론

가토의 두개골 결손부에 대한 골유도재생술식을 통하여 키토산 나노 차폐막의 골유도재생 능력을 조직학적으로 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 키토산 나노 차폐막은 가토의 두개골 결손부 전체에서 신생골 및 골가교를 형성하였다.
2. 키토산 나노 차폐막을 이용한 골재생은 Gore-tex 차폐막을 이용한 경우와 유사하게 나타났다.

VI. 참고문헌

1. Pangburn SH, Trescony PV, Heller J. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. Biomaterials. 1982 Apr;3(2):105-8.
2. Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. Biomaterials. 1999 Jan;20(2):175-82.
3. Klokkevold PR, Subar P, Fukayama H, Bertolami CN. Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits with platelet dysfunction induced by epoprostenol. J Oral Maxillofac Surg. 1992 Jan;50(1):41-5.
4. Kind GM, Bines SD, Staren ED, Templeton AJ, Economou SG. Chitosan: evaluation of a new hemostatic agent. Curr Surg. 1990 Jan-Feb;47(1):37-9.
5. Muzzarelli R, Baldassarre V, Conti F, Ferrara P, Biagini G, Gazzanelli G, Vasi V. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. Biomaterials. 1988 May;9(3):247-52.
6. Azad AK, Sermsintham N, Chandrkrachang S, Stevens WF. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. J Biomed Mater Res. 2004 May

15;69B(2):216-22.
7. Yeom HR, Park YJ, Lee SJ, Rhyu IC, Chung CP, Nisengard RJ. Clinical and microbiological effects of minocycline-loaded microcapsules in adult periodontitis. J Periodontol. 1997 Nov;68(11):1102-9.
8. Park YJ, Lee YM, Park SN, Sheen SY, Chung CP, Lee SJ. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. Biomaterials. 2000 Jan;21(2):153-9.
9. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Klokkevold PR, Chung CP. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. J Periodontol. 2000 Mar;71(3):418-24.
10. Kim IS, Park JW, Kwon IC, Baik BS, Cho BC. Role of BMP, betaig-h3, and chitosan in early bony consolidation in distraction osteogenesis in a dog model. Plast Reconstr Surg. 2002 May;109(6):1966-77.
11. Ito M. In vitro properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite bone-filling paste. Biomaterials. 1991 Jan;12(1):41-5.
12. Ito M, Hidaka Y, Nakajima M, Yagasaki H, Kafrawy AH. Effect of hydroxyapatite content on physical properties and connective tissue reactions to a chitosan-hydroxyapatite composite membrane. J Biomed Mater Res. 1999 Jun 5;45(3):204-8.
13. Wang X, Ma J, Wang Y, He B. Biomaterials. 2002 Nov;23(21):4167-76. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements.
14. Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. Biomaterials. 2003 Jun;24(13):2339-49.
15. Huang L, Nagapudi K, Apkarian RP, Chaikof EL. Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics. J Biomater Sci Polym Ed. 2001;12(9):979-93.
16. Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of collagen nanofibers. Biomacromolecules. 2002 Mar-Apr;3(2):232-8.
17. Nishida T, Yasumoto K, Otori T, Desaki J. The network structure of corneal fibroblasts in the rat as revealed by scanning electron microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1988 Dec;29 (12):1887-90.
18. 백정원, 이현정, 유윤정, 조규성, 김종관, 최성호. 키토산이 치주인대 섬유아세포에 미치는 영향 대한치주과학회지 2001, 31(4):823-32.
19. 계승범, 손성희, 최상묵 Chitosan과 chitosan-cellulose를 이용한 차폐막의 골조직 재생유도능력에 관한 연구. 대한치주과학회지 1998. 28(4): 611-32

-Abstract-

A study on the biodegradable novel chitosan nanofiber membrane as a possible tool for guided bone regeneration

Seung-Yun Shin[1,4,5], Ho-Nam Park[1], Kyoung-Hwa Kim[1,4,5], Seung-Jin Lee[3,4,5], Yoon-Jeong Park[2,4,5], Young Ku[1,4,5], In-Chul Rhyu[1,5], Soo-Boo Han[1], Chong-Pyoung Chung[1,4,5]

[1] Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University
[2] Craniomaxillofacial Reconstructive Science Major, College of Dentistry, Seoul National University
[3] Department of Industrial Pharmacy, College of Pharmacy, Ewha Womans University
[4] Intellectual Biointerface Engineering Center, KOSEF
[5] NIBEC Inc.

Chitosan has been widely researched as bone substitution materials and membranes in orthopedic/periodontal applications. Chitosan nanofiber membrane was fabricated by chitosan nanofiber using electrospinning technique. The structure of the membrane is nonwoven, three-dimensional, porous, and nanoscale fiber-based matrix. The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of chitosan nanofiber membrane and to evaluate its capacity of bone regeneration in rabbit calvarial defect.

Ten mm diameter round cranial defects were made and covered by 2 kinds of membranes (Gore-Tex membrane, chitosan nanofiber membrane) in rabbits. Animals were sacrificed at 4 weeks after surgery. Decalcified specimens were prepared and observed by microscope. Chitosan nanofiber membrane maintained its shape and space at 4 weeks. No inflammatory cells were seen on the surface of the membrane. In calvarial defects, new bone bridges were formed at all defect areas and fused to original old bone. No distortion and resorption was observed in the grafted chitosan nanofiber membrane. However bone bridge formation and new bone formation at the center of the defect could not be seen in Gore-Tex membranes.

It is concluded that the novel membrane made of chitosan nanofiber by electrospinning technique may be used as a possible tool for guided bone regeneration.

Keywords: chitosan, nanofiber, calvarial defect, bone regeneration. membrane, Gore-Tex