

백서두개골 결손부에서 rhBMP-2와
Acellular Dermal Matrix의
골재생 효과

연세대학교 대학원

치 의 학 과

송 대 석

백서두개골 결손부에서 rhBMP-2와
Acellular Dermal Matrix의
골재생 효과

지도교수 김 창 성

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

송 대 석

송대석의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기까지 부족한 저를 이끌어주시고 자상한 지도와 격려를 아끼지 않으신 김창성 지도교수님께 깊은 감사를 드리며, 따뜻한 조언을 해주신 김종관 교수님, 채중규 교수님, 조규성 교수님, 최성호 교수님께 진심으로 감사드립니다.

본 연구 내내 깊은 관심과 애정어린 조언을 해주신 정의원 선생님, 김태균 선생님과 이 논문이 나오기까지 물심양면으로 많은 도움을 주었던 조익현, 정성원 선생을 비롯한 치주과 의국원들에게도 고마움을 전합니다.

항상 저를 믿고 든든한 후원을 해주시는 아버지, 어머니, 장인, 장모님을 비롯한 사랑하는 가족들에게 감사드리며, 늘 곁에서 아낌없는 사랑과 헌신으로 나를 감싸주고 북돋아 준 사랑하는 아내 희경이에게 진심으로 감사와 사랑의 마음을 전합니다.

2005년 12월

송 대 석

목 차

국문 요약	iv
I. 서론	1
II. 연구 재료 및 방법	5
가. 연구 재료	5
1. 실험 동물	5
2. 실험 재료	5
나. 연구 방법	5
1. 실험군 설정	5
2. 백서 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치.....	6
다. 골조직 재생유도 능력 평가	6
1. 조직학적 관찰	6
2. 조직 계측학적 관찰	7
3. 통계학적 분석	8
III. 연구 결과.....	9
가. 육안적 관찰	9
나. 조직학적 관찰	9
1. 음성대조군.....	9
2. 양성대조군 (ADM 군)	10
3. 실험군 (rhBMP-2/ADM 군)	10
다. 조직계측학적 관찰	11
1. 두개골 결손부의 폐쇄량	11
2. 두개골 결손부의 신생골 형성량	13
IV. 총괄 및 고찰	16

V. 결론	21
참고 문헌	22
사진 부도 설명	29
사진 부도 (1)	31
사진 부도 (2)	32
사진 부도 (3)	33
사진 부도 (4)	34
ABSTRACT.....	35

표 목 차

Table 1. Defect closure	12
Table 2. New bone formation	14

사진 부도 목차

Figure 1. Schematic drawing of the calvarial osteotomy defect	7
Figure 2. Histomorphometric analysis of defect closure	13
Figure 3. Histomorphometric analysis of new bone formation	15
Figure 4. 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치.....	31
4-a. 노출된 두개골 상면에 8mm 원형 결손 형성	31
4-b. Acellular dermal matrix	31
Figure 5. Control 2 weeks (HE×10)	32
Figure 6. Control 8 weeks (HE×10)	32
Figure 7. ADM 2 weeks (HE×10)	32
Figure 8. ADM 2 weeks (HE×100)	32
Figure 9. ADM 8 weeks (HE×10)	33
Figure 10. ADM 8 weeks (HE×100)	33
Figure 11. rhBMP-2/ADM 2 weeks (HE×10)	33
Figure 12. rhBMP-2/ADM 2 weeks (HE×100)	33
Figure 13. rhBMP-2/ADM 8 weeks (HE×10)	34
Figure 14. rhBMP-2/ADM 8 weeks (HE×100)	34

국문 요약

백서두개골 결손부에서 rhBMP-2와 Acellular Dermal Matrix의 골재생 효과

BMPs의 골유도능을 효과적으로 전달하기 위해서는 주위조직에 위해하지 않으며 신생골 형성과 더불어 흡수될 수 있고 임상에서 적용하기 간편하고 쉬운 적절한 전달체 (carrier)의 사용이 필수적이다. 본 연구는 음성 백서의 두개골 결손부에 rhBMP-2와 acellular dermal matrix (ADM)를 적용하여 골재생 효과를 평가하고, 더불어 ADM의 전달체로서의 효과, 차단막으로 사용될 수 있는지에 대한 가능성을 평가하기 위한 목적으로 시행하였다.

본 연구에서는 음성 백서 (Sprague Dawley rat) 60마리의 두개골을 이용하였다. 20마리의 백서 두개골 결손부에는 아무 처치도 하지 않았으며 (음성대조군), 20마리의 백서 두개골 결손부에는 ADM만을 이식하였다 (양성대조군). 실험군 20마리의 백서 두개골 결손부에는 acellular dermal matrix (ADM)를 재수화 (Rehydration)시킨 후, rhBMP-2 solution에 10분간 적셔 이식하였다. 각 군은 수술 후 2주, 8주 치유기간을 두고 희생시켜 관찰 (조직학적, 조직계측학적, 통계학적 평가)하였으며, 각 군별로 10마리씩 배정하여 모두 60마리를 사용하였다.

1. ADM을 두개부 결손부에 사용시 염증반응은 육안적으로나 조직학적으로 관찰할 수 없었다. 또한 ADM은 8주 경과시 주위 조직과 연속성을

이루며 혼화되는 것이 관찰되었다.

2. 결손부를 채우고 있던 ADM은 시간이 경과함에 따라 수축되며 주위 섬유아세포와 조골세포들이 ADM내로 이주하면서 신생골 형성이 이루어지는 것이 관찰되었다.

3. 조직계측학적 관찰 결과, 결손부의 폐쇄과 신생골 형성은 ADM군과 rhBMP-2/ADM군 모두 대조군에 비해 유의성있게 증가하였으며, 2주와 8주 사이에도 유의성있는 차이를 보였다. 또한 ADM군과 rhBMP-2/ADM군을 비교하였을 때에도 유의성있는 차이를 나타냈다($P < 0.05$).

이상의 결과들을 통해 ADM은 rhBMPs의 전달체로 사용할 수 있으며, 골재생을 위한 차단막으로 사용될 가능성이 있다고 하겠다.

핵심되는 말 : 골 재생, 골형성 유도 단백질, 차단막, 무세포성 진피 기질 (ADM), 백서 두개골 결손부 모델.

백서두개골 결손부에서 rhBMP-2와 Acellular Dermal Matrix의 골재생 효과

(지도 교수 김 창 성)

연세대학교 대학원 치의학과

송 대 석

I. 서 론

Human Recombinant Bone Morphogenetic proteins (rh-BMPs)는 1965년 Urist³¹에 의해 처음 소개되고 명명된 이래, 1988년 Wozney 등³⁸이 처음으로 cloning에 성공하면서부터 본격적인 연구가 시작되었다. 인간의 신생골 및 신생연골이 형성되는 과정에서 나타나는 단백질을 연구하는 도중, 이 단백질을 발견하였으며, 그동안의 많은 연구들을 통하여 Human Recombinant Bone Morphogenetic proteins (rh-BMPs)는 TGF- β superfamily로서, 이식되었을때 신생골 및 신생연골을 형성한다고 알려져 있으며,^{6,38}이 중 rhBMP-2,-4,-5,-6,-7^{14,17,28,37}등이 골유도성이 있다고 밝혀졌다. 이들 중에서, 포유류 세포 (CHO cell)로부터 재조합 DNA기술로 얻어지는 rh-BMP-2,-7는 골유도능이 가장 우수하다고 보고되어,^{25,35} 이를 이용하여 많은 연구가 이루어졌으며, 현재까지도 주로 이들이 생산되어 연구재료로 사용되고 있다.

이러한 BMPs의 골유도능을 효과적으로 전달하기 위해서는 주위조직에

위해하지 않으며 신생골 형성과 더불어 흡수될 수 있고 임상에서 적용하기 간편하고 쉬운 적절한 전달체 (carrier)의 사용이 필수적이다.³ 그동안 이상적인 전달체를 찾기 위해 bone matrix³⁹, absorbable collagen sponge (ACS)^{2,4,7,12,23}, fibrin sealant^{8,11,13}, synthetic polymers (poly(glycolic acid-co-lactic) acid)²¹, β -tricalcium phosphate (β -TCP)^{2,11,15,23,32} 등을 통해 다양한 연구들이 진행되어 왔으나, 현재까지 이상적인 전달체는 명확히 규명된 바 없다. 본 교실이 진행한 이전 연구들^{2,7,8,11,12,15,23}을 살펴보면 ACS는 공간이 유지되는 결손부에서는 매우 효과적인 전달체이나 공간을 유지하는 능력이 부족하여 압력에 의해 골재생을 위한 공간을 와해시키는 결과를 초래하였으며, β -TCP는 압력에 의해 쉽게 와해되지 않는 훌륭한 공간 유지능력을 보였으나, 흡수가 지연되어 신생골 형성을 방해하는 결과를 초래하였다. 따라서, 전달체의 조건을 모두 충족할 수 있는 좀 더 효과적인 전달체의 개발을 위한 연구가 계속되었다. 이러한 노력의 일환으로, 최근에는 Fibrin-Fibronectin Sealing System (FFSS)과 FFSS/ β -TCP를 전달체로 사용하여 효과적인 골재생을 보고하였으며,^{8,11} 새로운 전달체에 대한 관심은 증대되었다.

Acellular dermal matrix (ADM)는 인체의 피부조직 중 세포성 면역반응의 항원 대상인 표피층과 진피내 세포들을 제거한 후 급속 동결 처리하여 진피층의 3차원구조를 그대로 유지시킨 것으로 그 용도는 원래 피부 이식술의 대체용으로 개발되었다. 기저세포막과 교원질 섬유 (collagen fiber), elastin matrix로 이루어진 냉동보관 진피이식을 공여부에 부착하여 bridging phenomenon을 유발함으로써 이식피부가 생존할 수 있게 개발된 것이다. 안전을 위해 일련의 deimmunization process와 B형 간염 항체 (HbsAg), C형

바이러스 항체 (HCV), T 림프 virus 항체 (HIV type 1), 매독 검사 등을 시행하여 인체에 동종이식으로 적용할 수 있게 된 것이다. 현재 성형외과, 비뇨기과, 안과, 신경외과, 이비인후과 등 다양한 분야에서 쓰이고 있으며,^{1,20,24} 광범위한 열상, 화상뿐만 아니라 외상이나 종양절제 후 생긴 피부 및 연조직의 결손, 미용 성형 및 재건의 목적으로 널리 사용되고 있다.

치과 영역에서는 치주성형 분야에서 자가 결합조직을 대체할 수 있는 재료로 주목받기 시작하였다. 과거, 다양한 치주성형 수술시 자가 결합조직이나 유리치은 등이 사용되어 왔으나, 자가 조직이라는 장점은 있지만 부가적인 수술이 필요하며, 채취량이 제한적이고, 시간이 소요되며 무엇보다 환자에게 큰 불편감을 초래하였다. 이와같은 이유로 부족한 각화치은의 증대,^{5,27,36} 노출된 치근의 피개,^{9,30} 치조융선의 재건^{10,19} 등에 ADM이 이용되어 왔으며, 많은 연구에서 성공적인 결과를 보고하였다.

1996년 Shulman²⁷, 1998년 Callan, Silverstein 등⁵은 각화치은의 증대를 위해 ADM을 사용하였을 때, 특별한 면역반응이나 합병증없이 수여부에 잘 생착되었으며 유리치은을 이식한 후 관찰되는 주변 조직과의 색깔 부조화도 거의 나타나지 않는 심미적으로도 우수한 결과를 보고하였다. 2002년 Wei 등³⁶은 ADM이 자가유리치은에 비해 수축량은 크지만, 보다 심미적이고 환자의 불편감을 줄일 수 있는 방법이라 했다. 또한 2002년 Tal³⁰ 이나 2004년 Harris 등⁹에 의하면, ADM을 치근피개의 목적으로 사용하였을 때 자가 결합조직과 유사한 효과와 장기적인 안정성을 갖는다 하였다. 이외에도 ADM은 연조직 결손의 재건이나 임플란트 수술시 필요한 연조직의 처치를 위해서도 사용되고 있으며, 2001년 Novaes 등은 골재생을 위한 차단막으로 사용하여 성공적인 결과를 보고하기도 하였다.²²

이에 본 연구는 ADM이 골재생을 위한 차단막으로 사용될 수 있는지에 대한 가능성과 동시에 ADM을 rhBMP-2의 전달체로 사용하여 백서의 두 개골 결손부에서 골재생 효과를 평가해보자 한다.

II. 연구 재료 및 방법

가. 연구 재료

1. 실험동물

본 연구에서는 체중 250~300g의 웅성 백서 (Sprague Dawley rat) 60마리를 사용하였고, 실험부위로는 두개골을 이용하였다. 실험동물은 연세 임상 의학 연구센터의 동물실험 지침에 따랐다.

2. 실험재료

rhBMP-2^s를 0.1% bovine serum albumin이 포함된 4mM HCl로 희석하여 0.025mg/ml²³의 solution으로 만든다. acellular dermal matrix(ADM)^{ll}를 1x1cm 크기로 준비한 후, 이를 rhBMP-2 solution에 10분간 담귀 개체당 rhBMP-2 solution을 100 μ l씩 적용하였다.

나. 연구 방법

1. 실험군 설정

두개골 결손부에 아무 처치도 하지 않은 군을 음성 대조군으로 설정하고 ADM만을 이식한 군을 양성대조군으로, ADM에 rhBMP-2 solution (0.025mg/ml)을 적셔 이식한 군을 실험군으로 설정한다. 각 군은 수술 후 2주, 8주 치유기간을 두고 희생시켜 관찰하였으며, 각 군별로 10마리씩 배정하여 모두 60마리를 사용하였다.

2. 백서 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치^{2,8,11,12,23,26,29} (Figure 4-a,b)

각 군의 백서에 Ketamine hydrochloride^{**}와 Xylazine^{††}을 4:1로 혼합하고 근육주사 (70mg/kg)하여 전신마취 시켰다. 두부제모를 시행하고 povidone iodine으로 소독한 후 고정하였다. 수술 부위는 2% Lidocaine^{‡‡}으로 침윤 마취한 후 백서의 전두골 전방부에서 후방부까지 정중부를 따라 두피를 절개하여 두개골의 상면을 노출시켰다. 노출된 두개골의 상면에 내경 8mm trephine bur[#]를 이용하여 지름 8mm의 원형 결손을 형성하였다. 실험군에는 각각의 실험재료를 결손부에 위치시키며, 대조군은 아무 처치도 하지 않았다. 두피를 덮고 4-0 coated Vicryl^{§§}로 봉합하고, 1주후 발사하였다. 술 후 2주, 8주에 각 군의 동물을 희생하여 두개골 적출하였다.

다. 골조직 재생유도 능력 평가

1. 조직학적 관찰

절제한 조직을 10% 중성 포르말린 용액으로 24시간 고정한 후 5% nitric acid로 3~7일간 탈회하고 통법에 따라 계열 알코올로 탈수한 다음 파라핀에 포매한다. 7µm 두께로 80µm 간격으로 두고 연속적인 관상면 절단하여 4개의 박편을 제작하였으며, 각 시편의 중앙부위를 절단하였다. Hematoxylin-Eosin (H-E) 염색을 하여 광학 현미경^{##}으로 관찰하였다.

§ R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA

|| Surederm[®], Hans Biomed Corp., Seoul, Korea

** Ketalar[®], Yuhan Co., Seoul, Korea

†† Rompun[®], Bayer Korea, Seoul, Korea

‡‡ 2% lidocaine, 1:100,000 epinephrine, Kangmyung Pharm., Seoul, Korea

3i, Palm Beach Gardens, FL, USA

§§ Polyglactin 910, braided absorbable suture, Ethicon, Johnson & Johnson Int., Edinburgh, UK

Olympus BX50, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan

2. 조직 계측학적 관찰

조직 표본상을 10배와 100배 배율로 확대하여 컴퓨터 모니터상에 재현하고, Image Pro plus[®]를 이용하여 두개골 결손부에서 채취한 절편의 신생골량 (%)과 결손부 폐쇄 (%)를 측정하였다. 디지털화 장치 (digitizer)를 이용하여 결손면적 대 신생골 면적을 측정한 후 신생골 형성비율을 산출하였고, 결손부 경계에서 신생골 경계까지의 거리 (mm)를 측정하여 총 결손부 길이에 대한 비율을 산출하였다. 이 값을 평균내어 각 기간과 군 간 비교를 하였다.

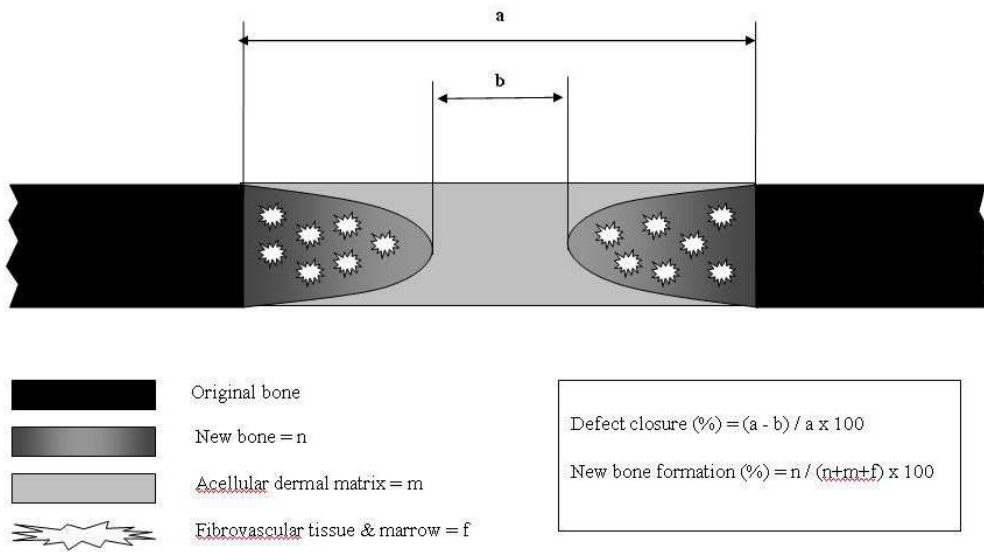


Figure 1. Schematic drawing showing the histomorphometric analysis of the calvarial osteotomy defect.

3. 통계학적 분석

신생골 형성 비율과 결손부 폐쇄에 대해 two-way ANOVA를 사용하여 군과 시간 두 변수간의 교호작용이 없음을 확인하였다. 시기별로 군간 비교를 위해 ANOVA와 post hoc t-test를 시행하였고, 각 군의 시간에 따른 비교를 위해서는 paired t-test를 사용하였다 ($P < 0.05$).

Ⅲ. 연구 결과

가. 육안적 관찰

치유양상은 일반적으로 특이점 없이 각 구간 유사하게 진행되었다. 이식부위의 노출이나 염증소견, 그리고 수술부위의 다른 합병증은 나타나지 않았다.

나. 조직학적 관찰

1. 음성대조군

1) 2주 소견 (Figure 5)

결손부는 얇고 성긴 불규칙한 섬유성 결합조직으로 채워져 있으며, 출혈 및 육아조직이 관찰된다. 신생골은 주로 결손부 변연과 하방 경막 주위에 국한되어 삼각형 형태로 형성되어 있었으며, 조골세포에 의해 둘러싸여 있고 주위로 염증세포가 관찰되었다. 연조직 치유와 신생골의 형성이 계속 진행중임을 알 수 있었다. 결손부의 중앙은 상방조직의 압력에 의해 와해되어 있는 양상을 나타내고 있다.

2) 8주 소견 (Figure 6)

신생골 주위로 비교적 잘 정돈된 균일한 밀도의 결합조직이 관찰되고 있으나, 여전히 결손부 중앙에는 성긴 결합조직이 관찰된다. 신생골은 골막과 인접한 부위는 성숙한 양상을 보이고 있으나 경막과 인접한 부위는 넓은

골수강을 보이는 미성숙한 양상을 나타내고 있다. 신생골 말단에서는 조골 세포들이 줄지어 있으나 골성조직은 관찰되지 않는다.

2. 양성대조군 (ADM 군)

1) 2주 소견 (Figure 7,8)

결손부위는 ADM으로 대부분 채워져 있으며, ADM층은 교원섬유와 탄력섬유로 구성되어 있다. ADM으로부터 세포성분을 제거하며 생긴 공간으로는 주변의 섬유아세포들이 이주하여 그 공간을 차지하고 있으며, 미량의 신생골이 결손 변연부 및 중앙부에서 관찰되며 결손부위에 염증세포의 침윤은 보이지 않았다. 신생골의 주변에서는 조골세포들이 관찰되며, 신생혈관화 과정도 관찰된다.

2) 8주 소견 (Figure 9,10)

결손부위의 ADM내로 주변 섬유아세포들이 이주하면서 주위 결합조직과의 혼재가 상당량 진행된 것으로 보이며, 어느 정도 수축도 이루어진 것으로 보인다. 신생골 형성은 2주에 비해 증가된 양상을 띄고 있으며, 계속해서 골형성이 진행중임을 관찰할 수 있었다. ADM의 하방에서 뿐만 아니라 ADM 내에서도 신생골의 형성이 진행된 것이 관찰된다.

3. 실험군 (rhBMP-2/ADM 군)

1) 2주 소견 (Figure 11,12)

결손부위는 대부분 ADM으로 채워져 있으며, ADM은 다량의 교원섬유

와 탄력섬유로 이루어져 있다. 또한 ADM내 교원섬유는 ADM군과 비교하여 보다 치밀한 양상을 띄고 있다. ADM 군과 마찬가지로 주변의 섬유아 세포들이 이주하여 세포성분을 제거하고 남아있던 공간을 채우고 있으며, ADM 하방을 중심으로 결손부 변연과 중앙에서 신생골 형성이 관찰된다. 그 주위로는 많은 혈관증식과 조골세포들이 관찰된다. 대조군에 비해 신생골의 형성량은 증가된 양상을 띄고 있으며, ADM하방 뿐만 아니라 ADM 상방과 골막 사이에서도 신생골이 관찰된다. 결손부위에서 염증세포의 침윤은 보이지 않는다.

2) 8주 소견 (Figure 13,14)

결손부를 채우고 있던 ADM은 상당량 주위 조직과 혼재되고 수축되어 있으며, ADM 부위에서는 탄력섬유와 매우 치밀한 교원섬유 다발층이 관찰된다. ADM의 하방 및 상방에는 많은양의 신생골이 관찰되며, 대조군과 비교하여 결손부의 변연으로부터 더 먼곳까지 골형성이 이루어져 있다. 결손부 변연에서는 골 성숙과 골 개조가 이루어지면서 기존골과 혼재되는 양상을 보이고 있으며, 변연 말단부에서는 골수강이 큰 신생골과 골성조직이 층을 이루며, 골형성이 계속 진행되는 모습이 관찰된다.

다. 조직계측학적 관찰

1. 두개골 결손부의 폐쇄량 (Defect Closure, %)

두개골 결손부의 폐쇄량은 각 군에서 2주와 8주에 각각 대조군은 12.0 ±3.9%, 13.5±4.6%, ADM군에서 26.1±7.0%, 42.8±18.0%, rhBMP-2/ADM군에

서 53.7±9.6%, 67.4±15.5%로 나타났다.

2주와 8주를 비교하였을 때 ADM군, rhBMP-2/ADM군 모두에서 통계학적으로 유의한 차이 (P<0.05)를 나타내었다. 대조군과 실험군을 비교하였을 때에도 2주와 8주 ADM군, rhBMP-2/ADM군 모두에서 통계학적으로 유의할 만한 차이 (P<0.05)를 나타내었고, ADM군과 rhBMP-2/ADM군을 비교하였을 때에도 2주, 8주 모두에서 통계학적으로 유의한 차이 (P<0.05)를 나타냈다 (Table 1, Figure 2).

Table 1. Defect closure (group means ± SD; n=10, %)

	2 weeks	8 weeks
control	12.0 ± 3.9	13.5 ± 4.6
ADM	26.1 ± 7.0 ^{II}	42.8 ± 18.0 ^{*II}
rhBMP-2/ADM	53.7 ± 9.6 ^{II†}	67.4 ± 15.5 ^{*II†}

*: Statistically significant difference compared to 2 weeks (P<0.05)

II: Statistically significant difference compared to the control group (P<0.05)

†: Statistically significant difference compared to the ADM group (P<0.05)

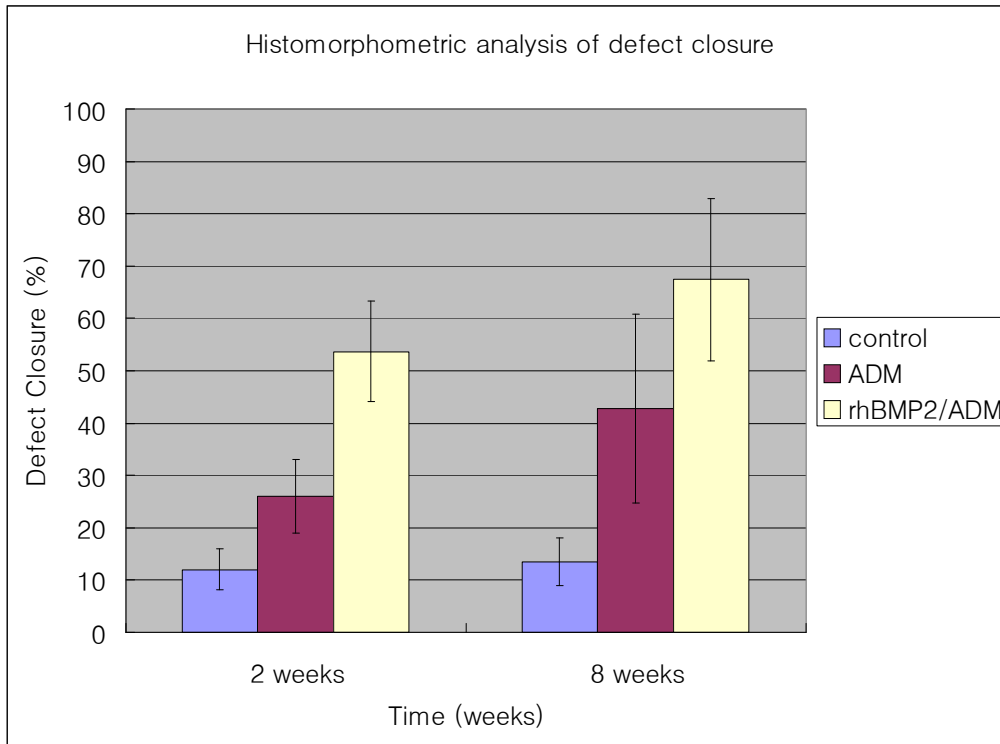


Figure 2. Histomorphometric analysis of defect closure in the control and experimental groups

2. 두개골 결손부의 신생골 형성량 (New bone formation, %)

두개골 결손부의 신생골 형성량은 각 군에서 2주와 8주에 각각 대조군은 $4.8 \pm 0.7\%$, $8.2 \pm 1.4\%$, ADM군에서 $10.5 \pm 4.5\%$, $29.1 \pm 11.4\%$, rhBMP-2/ADM군에서 $16.6 \pm 7.7\%$, $42.5 \pm 14.6\%$ 로 나타났다.

2주와 8주를 비교하였을때, 모든 군에서 통계학적으로 유의한 차이 ($P < 0.05$)를 나타내었다. 대조군과 실험군을 비교하였을 때는 8주에서

ADM군, rhBMP-2/ADM군이 모두 대조군에 비해 통계학적으로 유의할 만한 차이 ($P<0.05$)를 보였으나, 2주에서는 rhBMP-2/ADM군만이 대조군과 유의한 차이 ($P<0.05$)를 나타내었다. ADM군과 rhBMP-2/ADM군을 비교하였을 때는 2주와 8주 모두에서 통계학적으로 유의한 차이 ($P<0.05$)를 나타냈다 (Table 2, Figure 3).

Table 2. New bone formation (group means \pm SD; n=10, %)

	2 weeks	8 weeks
control	4.8 \pm 0.7	8.2 \pm 1.4*
ADM	10.5 \pm 4.5	29.1 \pm 11.4* ^{II}
rhBMP-2/ADM	16.6 \pm 7.7 ^{II†}	42.5 \pm 14.6* ^{II†}

*: Statistically significant difference compared to 2 weeks ($P<0.05$)

^{II}: Statistically significant difference compared to the control group ($P<0.05$)

[†]: Statistically significant difference compared to the ADM group ($P<0.05$)

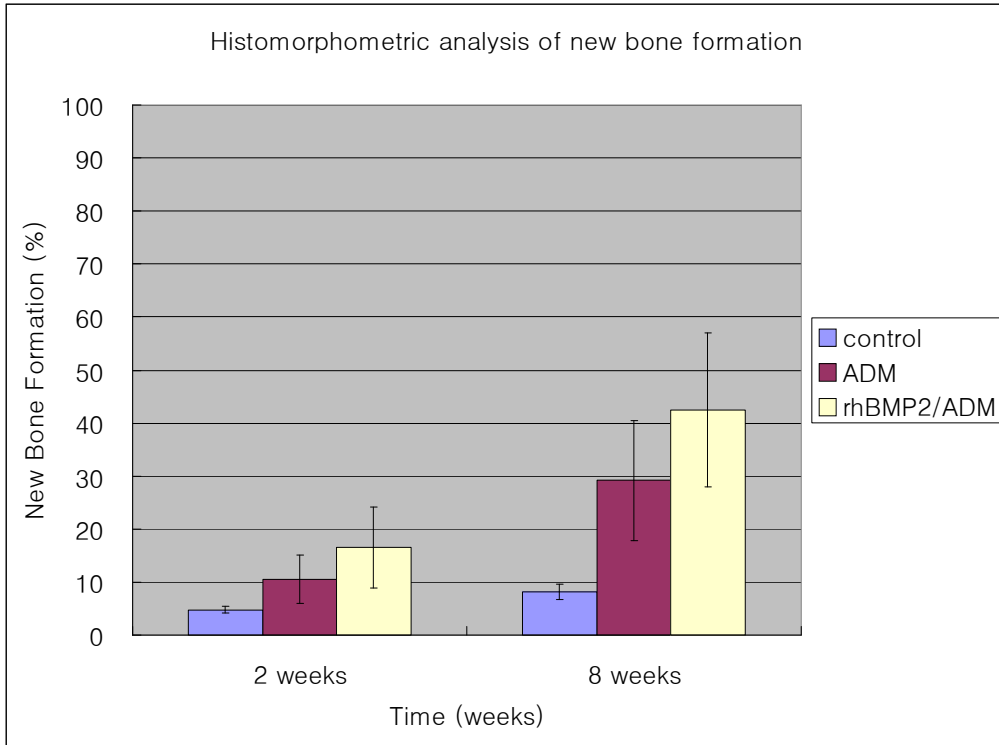


Figure 3. Histomorphometric analysis of new bone formation in the control and experimental groups

IV. 총괄 및 고찰

본 연구는 음성 백서의 두개골 결손부에 rhBMP-2와 acellular dermal matrix (ADM)를 적용하여 골재생 효과를 평가하고, 더불어 ADM의 전달체로서의 효과, 차단막으로 사용될 수 있는지에 대한 가능성을 평가하기 위한 목적으로 시행하였다. 백서 두개골에 trephine bur를 이용하여 직경 8mm의 원형 결손부를 형성하고 음성대조군에는 아무것도 이식하지 않고, 양성대조군에는 ADM만을, 실험군에는 rhBMP-2를 ADM에 적서 적용시킨 후 결손부에 이식하였다. 술 후 2주, 8주에 희생하고 치유결과를 조직학적, 조직계측학적으로 비교 관찰 평가하였다.

이번 연구에서는 백서의 두개골 결손부 모델을 사용하였는데, 이는 다른 동물실험 모델과 비교하여 접근성, 재현성이 좋고 간편하므로 골재생 물질을 연구하는데 효과적이며 편리한 모델로 알려져 있다. 미성숙한 개체는 성숙한 개체에 비해 치유능력이 우수하므로 250~300g의 성체를 사용하였으며, 암컷의 경우 호르몬의 변화나 임신 등에 의해 결과에 영향을 끼칠 수 있어 수컷만을 사용하였다.^{2,8,11,12,23,26,29} 이 모델에서 사용한 8mm의 원형 결손은 쥐의 임계크기 결손 (Critical size defect, CSD)으로, 이는 아무런 처치를 하지 않으면 10% 이하의 골재생을 이루는 가장 작은 크기의 결손을 일컫는다.^{26,29} 대부분의 동물은 CSD가 연령에 따라 작아지는데 쥐의 경우는 상대적으로 일정하다. 또한 결손부를 형성하고 골을 제거하면 경뇌막이 노출되는데, 이는 골재생에 중요한 역할을 하므로 실험시 주의해야 한다

rh-BMPs는 1965년 Urist가 발견하였으며³¹, 1988년 Wozney 등이 합성

하는데 성공하였다.³⁸ TGF- β superfamily로서 현재 20여종이 발견되었으며, 이식되었을때 신생골 및 신생연골을 형성한다고 알려져 있으며,^{6,38}이 중 rhBMP-2, -4,-5,-6,-7^{14,17,28,37}등이 골유도성이 있다고 밝혀져 있다. 이들 중에서, 포유류 세포 (Chinese Hamster Ovarian cell - CHO cell)로부터 재조합 DNA기술로 얻어지는 rh-BMP-2,-7 등은 골유도능이 가장 우수하다고 보고되었다.^{25,35} 그러나 rh-BMPs는 수용성 물질이므로 적용부위에 적절히 전달되지 않으면 그 효과가 감소되며,¹¹ rh-BMPs의 효과를 극대화하기 위해서는 적절한 양과 농도, 적용시간 등이 중요하다고 하였다.¹⁶ 그러므로, rh-BMPs를 효과적으로 전달하며 전달되는 동안 유지될 수 있는 적절한 전달체의 사용은 필수적이라고 할 수 있다.^{2,3,11,37} 앞서 기술한 바와 같이 이상적인 전달체를 찾기 위한 다양한 노력들^{2,4,7,8,11-13,15,21,23,32,39}이 계속되고 있으나, 현재까지 이에 대해 명확히 규명된 바는 없다.

Acellular dermal matrix (ADM)는 인체의 피부조직 중 세포성 면역반응의 항원 대상인 표피층과 진피내 세포들을 제거한 후 급속 동결 처리하여 진피층의 3차원구조를 그대로 유지시킨 것으로, 일련의 deimmunization process 과정을 거쳐 제품화되기 때문에 현재 다양한 분야에서 안전하게 사용되고 있다.^{1,20,24} 또한 무세포성 기질이 구조적으로 잘 유지되므로 수여부의 조직에 의한 염증반응이 나타나지 않고, 수여부의 세포가 이식편쪽으로 신생혈관을 형성하며 조직이 결합되는 것이 확인되었다.^{19,33,34} 다양한 연구들을 통해 ADM은 반흔을 남기는 granulation process가 아닌 세포의 repopulation과 revascularization을 통해 치유되는 무세포성의 면역반응이 나타나지 않는 scaffold임이 밝혀졌다.³⁰ 치과영역에서도 여러 치료에 ADM을 사용해왔으며, 심미적으로나 기능적으로 자가 결합조직을 대체할 수 있

는 훌륭한 결과들을 보고하고 있다.^{5,9,10,19,22,27,30,36} 최근 Novaes 등은 흥미로운 보고를 하였는데, Guided Bone Regeneration (GBR)을 위한 차단막으로 ADM을 사용하여 만족할만한 결과를 얻었으며, ADM의 차단막으로서의 가능성을 제시하였다.²² 더불어 2002년 Tal 등³⁰도 ADM은 치근 피개를 위한 이식편으로서의 역할 뿐만 아니라 치주조직 재생을 증진시키는 차단막으로서의 역할도 수행한다는 보고를 하였다.

조직학적 관찰 결과, 대조군은 앞선 연구들^{2,8,11,12,23}과 크게 다르지 않았고 8주가 되어도 신생골의 형성은 극히 제한적이었다. 이에 반해 ADM군은 2주 소견에서 보면, 결손부를 ADM이 채우고 있기 때문에 대조군과 비교하여 이렇다할 차이를 보이지 않으나, 8주가 되면 결손부를 채우고 있던 조직이 수여부의 조직과 혼화를 이루며 수축이 일어나기 때문에 신생골의 형성이 좀 더 활발히 진행되는 것이 관찰된다. 또한 ADM내에서도 신생골 형성이 보다 뚜렷이 관찰되었다. ADM은 2주 소견시 수여부의 결합조직과 혼재되어 나타나나 아직까지는 그 경계를 관찰할 수 있었고, 8주가 되면 수여부의 조직과 혼화가 상당부분 이루어져 경계가 모호해지게 된다. 2주나 8주 소견 모두에서 염증세포의 침윤은 관찰할 수 없었으며, 고배율로 관찰하면 수여부 세포들의 이식편내로의 이주 및 신생혈관화 과정이 관찰된다. ADM에 rhBMP-2를 적용하여 사용한 군에서도 2주 소견에서는 ADM이 결손부를 채우고 있기 때문에 신생골 형성이 제한적으로 이루어졌다. 그러나 대조군이나 ADM군과 비교하여서는 그 양이 유의할만하게 많으며 ($P < 0.05$, Table 2, Figure 3), 좁은 공간에서도 조골세포의 이주는 활발히 이루어져 신생골에 의한 결손부의 폐쇄 (Defect closure)는 상당부분 일어난 것을 알 수 있었다 (Table 1, Figure 2). 또한 ADM내에서도 미량

의 신생골 형성이 관찰된다. 8주 소견에서 보면, ADM군과 마찬가지로 ADM이 수여부의 조직과 혼화를 이루며 수축이 되기 때문에 신생골의 형성이 보다 활발히 이루어짐을 관찰할 수 있었고, ADM내에서도 신생골의 형성이 상당량 관찰되었다.

1995년 Wainwright³³와 Livesey 등¹⁹은 화상환자에게 ADM을 이식하였을 때 특별한 거부반응 없이 수여부에 생착되었으며, 조직학적으로 관찰하였을 때 주위 섬유아세포들이 ADM내로 침윤하고 신생혈관화 과정이 동반되어 수여부의 조직과 혼화를 이룬다고 보고하였다. 또한 이식하기 전 ADM을 전자현미경 상으로 관찰하였을 때, 기저막이 완전히 유지되고 교원섬유 다발이 정상적으로 보이며 세포성분을 제거하고 남은 공간이 관찰됨을 보고 하였다. 따라서 ADM은 수여부의 세포들이 이주하여 조직 재생을 도모할 수 있게 하는 scaffold 역할을 수행한다는 결론을 내렸다. 2002년 Wei 등³⁶은 각화치은 증대를 목적으로 자가조직과 ADM을 사용한 후 조직학적으로 치유양상을 비교 관찰한 결과, ADM은 자가조직과 달리 무세포성 섬유 결합조직 구조로, 주위 세포들이 이주하는 scaffold임을 보고 하였다.

이번 연구 결과, ADM을 적용한 군에서는 ADM내에서도 신생골 형성을 관찰할 수 있었는데, 2주에서 신생골이 생기기 시작하여 8주에서는 보다 많은 신생골 형성을 보였다. 또한 형성된 신생골 주위로는 조골세포들이 관찰되었으며, 신생골 형성은 rhBMP-2를 함께 적용한 군에서 보다 두드러지게 나타났다. 이와 더불어 ADM내에는 이주한 섬유아세포들과 치밀한 교원섬유 다발층이 관찰되었는데, 8주가 되면 보다 치밀한 교원섬유 다발층이 나타난다. 이러한 결과들로 미루어볼 때 ADM은 주위 조골세포와 섬유

유아세포들이 이주하는 scaffold이며, 이를 통해 ADM내에서도 골재생이 일어날 수 있었던 것으로 보인다. 또한 rhBMP-2가 동반 적용될 경우, 이에 영향을 받은 수여부의 세포들이 ADM내로 이주하기 때문에 골재생 효과는 보다 두드러지게 나타났으며, ADM 자체가 rhBMP-2를 함유할 수 있는 공간도 갖고 있기 때문에 전달체로서의 가능성도 지니고 있음을 보여 준다. 그러나, 이를 좀 더 명확히 이해하고 설명할 수 있는 연구가 필요할 것으로 보인다.

이상의 결과들을 통해 ADM은 차단막으로서 활용될 만한 충분한 가능성이 있으며, 전달체로서의 가능성 또한 지니고 있음을 알 수 있었다. 노출에 대한 염려가 필요없고 염증반응이 없으며, 주위 조직과 잘 혼화되어 생착되기 때문에 생체 친화적이라 할 수 있고 부작용의 가능성 또한 적다 하겠다. 또한 본 연구에서 밝혀진 바와 같이 전달체로서의 기능까지 고려한다면 다양한 영역에서 여러 용도로 활용할 수 있는 가능성을 지닌 재료로 판단된다. 기존의 치주성형영역에서 뿐만 아니라 발치 후 즉시 임플란트와 GBR이 병행되는 경우나 광범위한 골이식과 수직적 골결손 회복시 필요한 연조직과 차단막으로서의 역할, 그리고 머지 않아 치과영역에서도 사용될 rhBMPs의 전달체로서의 역할 등 앞으로 ADM의 충분한 역할이 기대되는 바이다.

V. 결론

이번 연구의 결과, 다음과 같은 결론을 도출해낼 수 있었다.

1. ADM을 두개부 결손부에 사용시 염증반응은 육안적으로나 조직학적으로 관찰할 수 없었다. 또한 ADM은 8주 경과시 주위 조직과 연속성을 이루며 혼화되는 것이 관찰되었다.

2. 결손부를 채우고 있던 ADM은 시간이 경과함에 따라 수축되며 주위 섬유아세포와 조골세포들이 ADM내로 이주하면서 신생골 형성이 이루어지는 것이 관찰되었다.

3. 조직계측학적 관찰 결과, 결손부의 폐쇄과 신생골 형성은 ADM군과 rhBMP-2/ADM군 모두 대조군에 비해 유의성있게 증가하였으며, 2주와 8주 사이에도 유의성있는 차이를 보였다. 또한 ADM군과 rhBMP-2/ADM군을 비교하였을 때에도 유의성있는 차이를 나타냈다. ($P < 0.05$)

이상의 결과들을 통해 ADM은 rhBMPs의 전달체로 사용할 수 있으며, 골 재생을 위한 차단막으로 사용될 가능성이 있다고 하겠다.

참고 문헌

1. Achauer BM, VanderKam VM, Celikoz B, Jacobson DG: Augmentation of facial soft tissue defects with Alloderm dermal graft. *Ann Plast Surg* 1998;41: 503-507.
2. Ahn SH, Kim CS, Suk HJ, et al: Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein- 4 with Carriers in Rat Calvarial Defects. *J Periodontol* 2003;74:787-797.
3. Aldinger G, Herr G, Kusserwetter W, Reis HJ, Thielemann FW, Holz U: Bone morphogenetic protein- a review. *Int Orthop* 1991;15:169-177.
4. Barboza EP, Duarte ME, Geolas L, Sorensen RG, Riedel GE, Wikesjo UM: Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. *J Periodontol* 2000;71:488-496.
5. Callan DP, Silverstein LH: Use of acellular dermal matrix for increasing keratinized tissue around teeth and implants. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1998;10:731-734.
6. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al: Identification of transforming growth factor-family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:9843-7.

7. Choi SH, Kim CK, Cho KS, et al: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs. J Periodontol 2002;73:63-72.
8. Han DK, Kim CS, Cho KS: Effect of a Fibrin-fibronectin sealing system as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-4 on bone formation in rat calvarial defects. J Periodontol 2005 accepted for publication.
9. Harris RJ: A short-term and long-term comparison of root coverage with an acellular dermal matrix and a subepithelial graft. J Periodontol 2004 May;75(5):734-43.
10. Harris RJ: Soft tissue ridge augmentation with an acellular dermal matrix. Int J Periodontics Restorative Dent 2003 Feb;23(1):87-92.
11. Hong SJ, Kim CS, Jung UW, Choi SH, Kim CK, Cho KS: Fibrin-Fibronectin Sealing System in Combination with-Tricalcium Phosphate as a Carrier for Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: Effects on Bone Formation in Rat Calvarial Defects. Biomaterials 2005 accepted for publication.
12. Hyun SJ, Choi SH, Chai JK, Cho KS, Kim CK, Kim CS: The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, 4 and 7 on bone formation in rat calvarial defects. J Periodontol 2005;76:1-8.

13. Kawamura M and Urist MR: Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Rel Res* 1988;235:302-310.
14. Kim CS, Choi SH, Choi BK, et al: The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 on the osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells affected by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2002;73:1126-1132.
15. Kim CS, Kim JI, Kim J, Choi SH, Chai JK, Kim CK, Cho KS: Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. *Biomaterials* 2004;19:1-7.
16. King GN, Cochran DL: Factors that modulate the effect of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration; a critical review. *J Periodontol* 2002;73:925-936.
17. Kingsley DM, Bland AE, Grubber JM, et al: The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF superfamily. *Cell* 1992;71:399-410.
18. Livesey S, Herndon D, Hollyoak M, Atkinson Y, Nag A: Transplanted acellular allograft dermal matrix. *Transplantation* 1995;60:1-9.

19. Luczyszyn SM, Papalexiou V, Novaes AB Jr, Grisi MF, Souza SL, Taba M Jr.: Acellular dermal matrix and hydroxyapatite in prevention of ridge deformities after tooth extraction. *Implant Dent* 2005 Jun;14(2):176-84.
20. McFeely WJ, Bojrab DI, Kartush JM: Tympanic membrane perforation using Alloderm. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;123:17-21.
21. Miki T, Imai Y: Osteoinductive potential of freeze-derived, biodegradable, poly(glycolic acid-co-lactic acid) disks incorporated with bone morphogenetic protein in skull defects in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;25:402-426.
22. Novaes AB Jr, Souza SL: Acellular dermal matrix graft as a membrane for guided bone regeneration: a case report. *Implant Dent* 2001;10(3):192-6.
23. Pang EK, Im SU, Kim CS, et al: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2004;75:1364-1370.
24. Rubin PA, Fay AM, Remulla HD, Maus M: Ophthalmic plastic applications of acellular dermal allografts. *Ophthalmology* 1999;160:2091-2097.
25. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, et al: Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a

specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 1992;267(20):352-62.

26. Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunion. *Clin Orthop* 1986;205: 299-308.

27. Shulman J: Clinical evaluation of an acellular dermal allograft for increasing the zone of attached gingiva. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1996 Mar;8(2):201-8.

28. Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, et al: Mice lacking BMP-6 function. *Dev Genet* 1998;22:321-3.

29. Takagi K, Urist MR: The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defect. *Ann Surg* 1982;196:100-109.

30. Tal H, Moses O, Zohar R, Meir H, Nemcovsky C: Root coverage of advanced gingival recession: a comparative study between acellular dermal matrix allograft and subepithelial connective tissue grafts. *J Periodontol* 2002 Dec;73(12):1405-11.

31. Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.

32. Urist MR, Lietze A, Dawson E: Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1984;187:277-280.
33. Wainwright DJ: Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of fullthickness burns. *Burns* 1995 Jun;21(4):243-8.
34. Wainwright D, Madden M, Luteman A, et al: Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full thickness burns. *J Burn Care Rehabil* 1996;17:124-126.
35. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(2) 220-4.
36. Wei PC, Laurell L, Lingen MW, Geivelis M: Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 2. A histological comparative study. *J Periodontol* 2002 Mar;73(3):257-65.
37. Wikesjo UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, Jin L and Wozney JM: Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol* 1999;26: 392-40.

38. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al: Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-1534.

39. Yasco AW, Lane JM, Fellingner EJ: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg* 1992;74-A:659-671.

사진 부도 설명

Figure 1. Schematic drawing showing the histomorphometric analysis of the calvarial osteotomy defect.

Figure 2. Histomorphometric analysis of defect closure in the control and experimental groups

Figure 3. Histomorphometric analysis of new bone formation in the control and experimental groups

Figure 4-a. 노출된 두개골 결손부에 trephine bur로 형성한 8mm 원형 결손
b. 두개골 결손부에 적용될 Acellular Dermal Matrix (ADM)
(상품명 : Surederm[®], Hans Biomed Corp., Seoul, Korea)

Figure 5. 대조군 2주의 저배율 소견으로 화살표가 가르키는 곳이 결손부의 변연임. 성기고 불규칙한 섬유성 결합조직으로 결손부가 채워져 있음.

Figure 6. 대조군 8주의 저배율 소견으로 신생골 말단에서 미량의 신생골 관찰되나, 골형성은 극히 제한적임.

Figure 7. ADM군 2주의 저배율 소견으로 ADM이 결손부의 상당부분을 채우고 있음.

Figure 8. ADM군 2주의 고배율 소견으로 ADM은 교원섬유와 탄력섬유로 이루어져 있으며, ADM내 공간으로 주변 섬유아세포들이 이주되어 있고, 결손부의 변연 및 중앙에서 신생골의 형성이 관찰됨.

Figure 9. ADM군 8주의 저배율 소견으로 ADM은 수축되어 보이며, ADM 하방으로 신생골의 형성과 결손부의 폐쇄가 2주에 비해 진전된 양상임.

Figure 10. ADM군 8주의 고배율 소견으로 변연부에 형성된 신생골은 기존골과 혼화되고 있으며, ADM하방에서 뿐만 아니라 ADM내에서도 신생골 형성이 관찰됨. ADM이 수여부 조직과 잘 혼화되어 나타남.

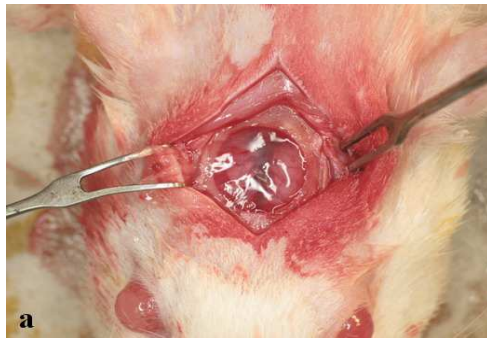
Figure 11. rhBMP-2/ADM군 2주의 저배율 소견으로 결손부의 대부분은 ADM으로 채워짐.

Figure 12. rhBMP-2/ADM 2주의 고배율 소견으로 결손부의 변연과 중앙에서 신생골의 형성이 관찰되며, 그 주위로는 혈관증식과 조골세포들이 관찰됨. ADM은 치밀한 교원섬유와 탄력섬유로 구성되어 있음. 신생골 형성은 대조군에 비해 증가되어 있으며, ADM의 공간은 주변에서 이주한 섬유아세포들이 채우고 있음.

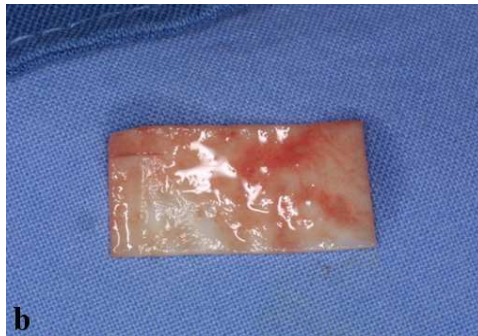
Figure 13. rhBMP-2/ADM 8주의 저배율 소견으로 결손부의 ADM은 상당량 수축되었으며 ADM의 주위와 ADM내에서 신생골 형성이 관찰됨.

Figure 14. rhBMP-2/ADM 8주의 고배율 소견으로 ADM은 주위 조직과 잘 혼화되어 있으며, 매우 치밀한 교원섬유 다발층이 관찰됨. ADM의 주위와 ADM내에서는 많은 양의 신생골 형성이 관찰되며, 신생골은 기존골과 혼재되어 성숙해지고 있음. 변연 말단부에서 골수강이 큰 신생골과 골성조직이 층을 이루며, 골형성이 계속 진행되는 모습이 관찰됨.

사진 부도 (1)



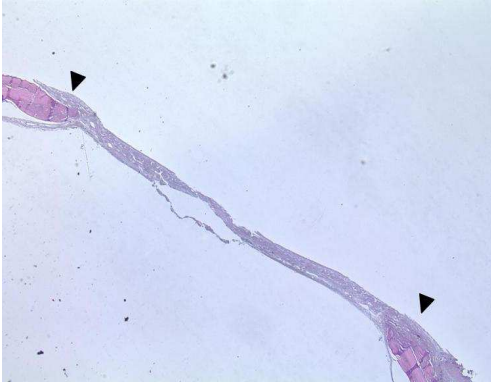
4-a. 노출된 두개골 상면에 8mm 원형 결손 형성



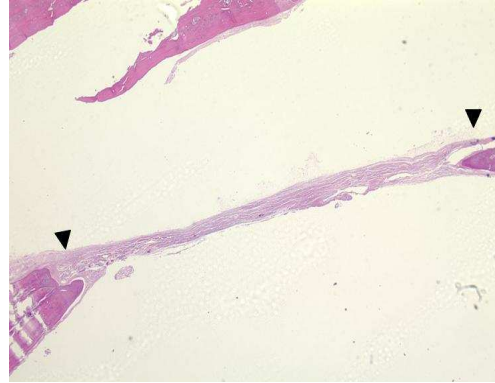
4-b. Acellular dermal matrix
(Surederm[®], Hans Biomed Corp., Seoul, Korea)

Figure 4. 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치

사진 부도 (2)



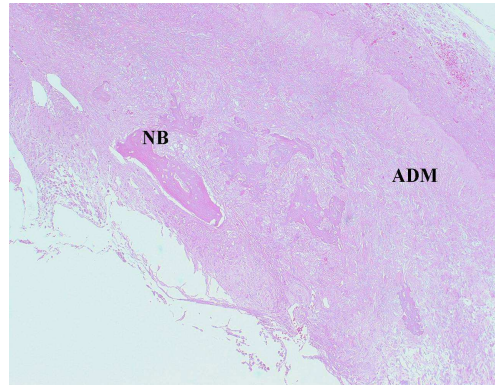
**Figure 5. Control 2 weeks
(HE×10)**



**Figure 6. Control 8 weeks
(HE×10)**



**Figure 7. ADM 2 weeks
(HE×10)**



**Figure 8. ADM 2 weeks
(HE×100)**

사진 부도 (3)

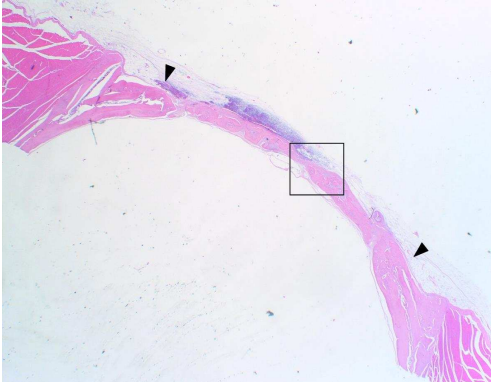


Figure 9. ADM 8 weeks (HE×10)

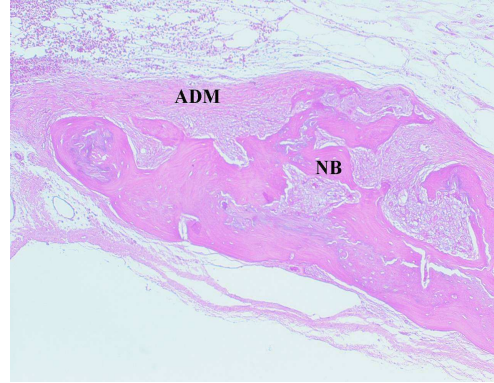


Figure 10. ADM 8 weeks (HE×100)

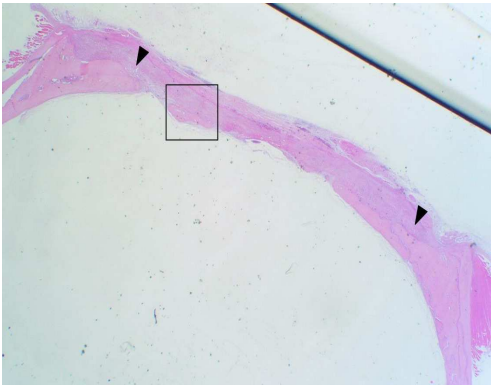


Figure 11. rhBMP-2/ADM 2 weeks (HE×10)

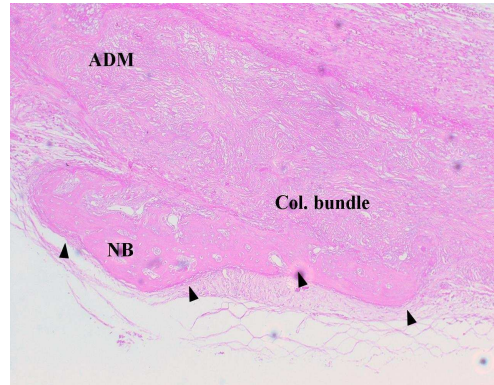


Figure 12. rhBMP-2/ADM 2 weeks (HE×100)

사진 부도 (4)

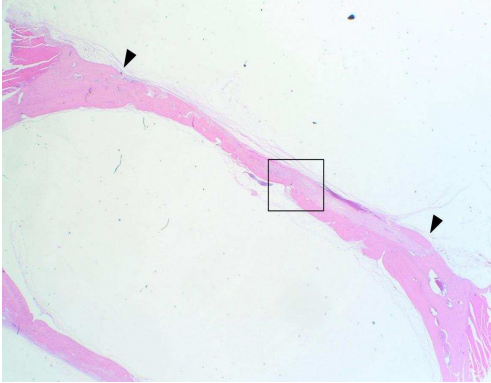


Figure 13. rhBMP-2/ADM 8 weeks
(HE×10)

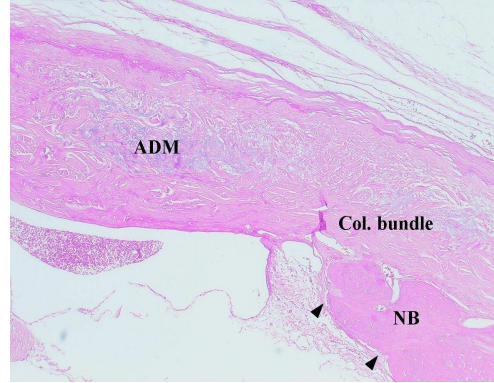


Figure 14. rhBMP-2/ADM 8 weeks
(HE×100)

ABSTRACT

Effects of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Acellular Dermal Matrix on Bone Formation in Rat Calvarial Defects

Dae Seok Song, D.D.S.

Department of Dental Science, Graduate School, Yonsei University

(Directed by Prof. Chang Sung Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

To achieve the osteoinductive effect of BMPs, carrier systems are essential. Carrier systems for delivering BMPs should be biocompatible and biodegradable to minimize local tissue response and to allow replacement by newly formed bone. And it has to be easy to apply and be easy to manufacture. The purpose of this study was to evaluate the possibility of the acellular dermal matrix (ADM) as a barrier membrane for bone regeneration, and to evaluate the osteogenic effect of ADM as a carrier system for rhBMP-2 in the rat calvarial defect model.

An 8-mm, calvarial, critical-size osteotomy defect was created in each of 60 male Sprague-Dawley rats (weight 250~300g). Three groups of 20 animals, each received either rhBMP-2 (0.025mg/ml) in an ADM carrier, ADM only, or negative surgical control. And each group was divided into 2- and 8-weeks healing intervals. The groups were

evaluated by histologic and histomorphometric parameters (10 animals/group/healing intervals)

Data were expressed as means±standard deviations (m±SD). Comparisons between experimental and control groups were made using two-way ANOVA and post hoc t-test. Comparisons between 2 weeks and 8 weeks were made using paired t-test. The level of statistical difference was defined as $P < 0.05$

The ADM group and rhBMP-2/ADM group results in enhanced local bone formation in the rat calvarial defect at both 2 and 8 weeks. The amount of defect closure, new bone formation were significantly greater in the rhBMP-2/ADM group relative to ADM group ($P < 0.05$). At 8 weeks, the majority of ADM in the defect was contracted, and integrated with surrounding host tissues. In addition, host cell infiltration and neovascularization of the ADM in the absence of an inflammatory response were observed, and the newly formed bone around ADM showed a continuous remodeling and consolidation.

In conclusion, the results of the present study indicated that ADM may be used as a barrier membrane for bone regeneration and that may be employed as a delivery system for BMPs

Key word : Bone Regeneration; recombinant human bone morphogenetic protein-2; a barrier membrane; Acellular dermal matrix; rat calvarial defect model.