

멍게와 미더덕 피부의 천연 셀룰로오스 각질을 이용한 골재생 효능을 가진 생활성막의 개발 - 예비 연구

김성민 · 이종호* · 조정애 · 이승철** · 이석근***

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, *서울대학교 치의학대학원 구강악안면외과학교실,

경남대학교 식품생명공학부, *강릉대학교 치과대학 구강병리학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2005;31:440-453)

DEVELOPMENT OF A BIOACTIVE CELLULOSE MEMBRANE FROM SEA SQUIRT SKIN FOR BONE REGENERATION - A PRELIMINARY RESEARCH

Soung-Min Kim, Jong-Ho Lee*, Joung-Ae Jo, Seung-Cheol Lee**, Suk-Keun Lee***

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung National University,

**Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dentistry, Seoul National University,*

***Division of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University,*

****Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Kangnung National University*

Objectives : To develop a bioactive membrane for guided bone regeneration (GBR), the biocompatibility and bone regenerating capacity of the cellulose membrane obtained from the Ascidians squirt skin were evaluated.

Materials and methods : After processing the pure cellulose membrane from the squirt skin, the morphological study, amino acid analysis and the immunoreactivity of the cellulose membrane were tested. Total eighteen male Sprague-Dawley rats (12 weeks, weighing 250 to 300g) were divided into two control (n=8) and another two experimental groups (n=10). In the first experimental group (n=5), the cellulose membrane was applied to the 8.0 mm sized calvarial bone defect and the same sized defect was left without cellulose membrane in the first control group (n=4). In the another experimental group (n=5), the cellulose membrane was applied to the same sized calvarial bone defect after femoral bone graft and the same sized defect with bone graft was left without cellulose membrane in the another control group (n=4). Each group was sacrificed after 6 weeks, the histological study with H&E and Masson trichrome stain was done, and immunohistochemical stainings of angiogenin and VEGF were also carried out.

Results : The squirt skin cellulose showed the bio-inductive effect on the bone and mesenchymal tissues in the periosteum of rat calvarial bone. This phenomenon was found only in the inner surface of the cellulose membrane after 6 weeks contrast to the outer surface. Bone defect covered with the bioactive cellulose membrane showed significantly greater bone formation compared with control groups. Mesenchymal cells beneath the inner surface of the bioactive cellulose membrane were positive to the angiogenin and VEGF antibodies.

Conclusion : We suppose that there still remains extremely little amount of peptide fragment derived from the basement membrane matrix proteins of squirt skin, which is a kind of anchoring protein composed of glycocalyx. This composition could prevent the adverse immunological hypersensitivity and also induce bioactive properties of cellulose membrane. These properties induced the effective angiogenesis with rapid osteogenesis beneath the inner surface of cellulose membrane, and so the possibilities of clinical application in dental field as a GBR material will be able to be suggested.

Key words: Ascidians, Bioactive cellulose membrane, Guided bone regeneration (GBR), Immunological hypersensitivity, Mesenchymal cell, Osteoblast

이종호

110-768 서울특별시 중로구 연건동 275-1

서울대학교 치의학대학원 구강악안면외과학교실 및 치학연구소

Jong-Ho Lee

Dept. of OMFS, Graduate School of Dentistry, Seoul National Univ. & Dental

Research Institute, # 28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-768, South Korea

Tel: 82-2-2072-2630 Fax: 82-2-766-4948

E-mail: leejongh@plaza.snu.ac.kr

I. 서 론

셀룰로오스는 세포의 바깥구조를 지지하는 다당류로서 식물계에서는 가장 풍부한 세포외구조 다당류일 뿐 아니라, 동식물계의 모든 생체분자 중에서 가장 풍부한 생체분자로서 구상에 많은 양이 존재하고 식물의 세포벽이나 몇몇 동물 및 박테리아에서 쉽게 얻을 수 있는 물질이다^{1,2}. 멍게 (Ascidian,

※ 이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (과제 고유번호 : KRF-2004-041-E00308).

Halocynthia roretzi) 및 미더덕 (Ascidian, *Styela clava*)은 일반적으로 Sea squirt, Sea grape, Tunicate 등으로도 불리우며 동물이면서 식물의 특성을 지니는 일반적으로 음식물로 친숙한 해양 생물들이다 (Fig. 1). 이들 해양 생물의 피부각질은 단단한 셀룰로오스로 덮혀 있는데, 16,000 여개의 유전자 중에서 사람의 유전자와 80%의 유사성을 지니는 것으로 알려져 있을 만큼 동물성 셀룰로오스의 성분을 지닐 것으로 생각되고 있다³⁵⁾. 또한 이 각질을 강산과 강알칼리 처리를 통하여 유기질을 제거하면 얇은 셀룰로오스 막을 쉽게 구할 수 있다.

기존의 고비용 생체차폐막을 대체할 수 있는 저비용의 생체차폐막을 개발하기 위한 목적으로 멍게와 미더덕의 피부 각질에서 순도가 높은 셀룰로오스를 추출하여 셀룰로오스 막이나 셀룰로오스 분말을 제작하였는데, 이렇게 제작한 셀룰로오스를 이용하여 생체차폐막의 기능 및 생체 적합성과 골재생 능력에 대한 실험 연구를 진행하여 향후 인체의 피부 상처 또는 골절이나 골성형을 위한 골형성 유도막으로 사용 가능성을 알아보고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 셀룰로오스 분말 및 셀룰로오스 막의 제조

멍게와 미더덕 피부 각질을 의료용으로 사용하기 위해서는 순도 높은 셀룰로오스 각질이 필요하므로, 멍게와 미더덕의 피부 각질을 고농도의 산과 알칼리를 고온에서 장기간 처리함으로써 순수한 셀룰로오스 막을 얻을 수 있었으며, 이렇게 얻은 셀룰로오스 막은 멍게나 피부의 각질 구조에 따라 외부와 내부면으로 구분할 수 있다 (Fig. 2).

조직 적합성이 좋은 셀룰로오스 막을 얻기 위하여 셀룰로오스 외면을 연마해서 0.3 mm 이내 두께의 셀룰로오스 막을 제조하였는데, 셀룰로오스 막을 1 N HCl에 넣어 음이온을 제거한 다음 증류수로 세척하고 Ca(OH)₂로 중화시키면서 셀룰로오스 막에 Ca(OH)₂를 부착시켰다. 이렇게 얻은 셀룰로오스 막을 건조시킨 후 EO gas로 멸균 소독하여 진공 밀폐 포장하여 사용하였다 (Fig. 3).



Fig. 1. Various Sea squirt, Ascidian (*Halocynthia roretzi*, *Styela clava*).



Fig. 2. Deep freeze-dried cellulose membrane after purification.



Fig. 3. Vacuum-packing with sterilization in ethylene oxide gas after purification.

2. 셀룰로오스 막의 주사전자현미경 소견

멍게와 미더덕의 셀룰로오스 피부를 순수 분리한 후에 외면과 내면을 구분하여 주사전자현미경 (Scanning electron microscope, Hitachi Co., Japan)으로 관찰하였다.

3. 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 막의 성분 검사

1) 아미노산 분석

순수하게 분리된 셀룰로오스의 순도를 알아보기 위하여 셀룰로오스 분말 각각 1 g씩을 20 ml 물에 넣고 대조군은 50°C에서 30분간 방치하고, 실험군은 10기압, 120°C에서 30분간 끓여서 얻은 각각의 수용액을 원심분리하여 얻은 상청액을 사용하여 아미노산 분석 (High speed amino acid analyzer, L-8800, Hitachi Co., Japan)을 수행하였다.

2) 원소 분석

멍게와 미더덕의 피부각질 셀룰로오스의 순도와 중금속 오염 정도를 관찰하기 위하여 Field Emission Scanning Electron Microscope (S-4200, Hitachi Co., Japan)으로 검사하였다.

4. 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 피부소재의 면역반응

1) 멍게의 셀룰로오스 분말을 생쥐의 복막강에 이식후 비장의 변화 관찰

멍게의 셀룰로오스 분말 (직경 100 μm 이하)을 생쥐의 복부 장간막 부위 (peritoneal space)에 이식한 후 제 3일, 1주일, 2주일 및 3주일 후에 각각 비장을 제거하여 비장의 증식정도를 대조군의 비장과 비교하여 관찰하였다. 또한, Freund's adjuvant (Gibco BRL, USA)를 동일한 부위인 복부 장간막 부위에 주사한 경우와 비교 관찰하였다.

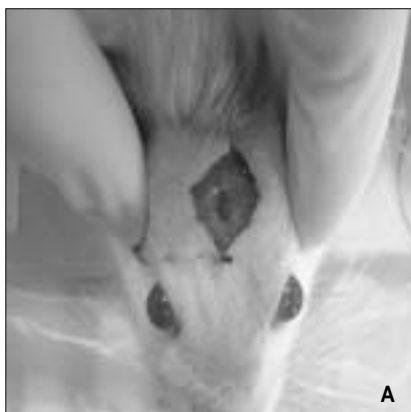
2) 생쥐의 혈청 내에 IgG의 농도 변화

각각 생쥐의 심장에서 혈액을 채취하여 생쥐의 혈청 내에 IgG의 농도 변화를 조사하였다 (mouse IgG detection ELISA kit, OCT Inc., Korea / EL312e Bio-Kinetics Reader, Bio-Tek Co., Korea).

5. 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 피부의 골형성 유도반응

순수하게 분리된 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 피부를 동물 생체 내에 이식한 후에 조직세포들의 반응을 살펴보기 위해 백서의 두피 하방에 존재하는 두개골을 직경 8 mm의 원형으로 결손부를 만들어서 그 위의 골막 부위에 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 막을 도포한 후 6주일 후에 나타나는 현상을 조직학적으로 관찰하였다 (Fig. 4). 이때 실험 모형의 결손부 자체는 골의 매식없이 자발적인 치유가 일어나지 않아야 하는데, 1998년 Bosch 등은 쥐의 두개골에서는 5 mm 결손부가 임계크기 결손부로서의 기준을 만족시킬 수 있다고 하였으므로⁶⁸⁾, 골재생 유도 물질의 효과를 가능하기 위해서는 추가적인 다른 골이식이나 다른 처치 없이 자연적으로 치유가 일어나는 경계인 임계크기 결손부 (CSD: critical size defect)를 최소 5 mm라고 간주하여 본 실험에서는 8 mm 결손부를 인위적으로 형성하였다.

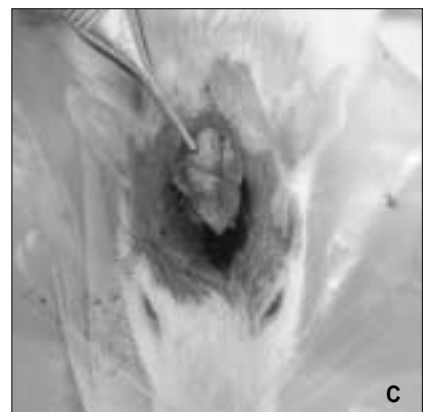
250-300g 정도의 수컷 백서 (Sprague-Dawley rats)들을 최소 실험 7일 전부터 12시간 주기로 자유롭게 물과 사료를 주면서 서울대학교 치과대학 및 강릉대학교의 동물 실험 가이드라인에 따라 사육과 실험을 진행하였다. 전체 18마리의 백서를 대조 1, 2군 및 실험 1, 2군으로 각각 나누었는데, 두개골 결손부에 셀룰로오스 막을 이식한 군 (Experimental 1 Group, n=5)과 셀룰로오스 막을 이식하지 않은 결손부만 형성한 군 (Control 1 group, n=4)을 각각 실험 1군 및 대조 1군으로 하였고, 두개골 결손부에 대퇴골과 셀룰로오스 막을 같이 이식한 군 (Experimental 2 Group, n=5)과 대퇴골만 이식하고 셀룰로오스 막은 이식하지 않은 군 (Control 2 group, n=4)을 각각 실험 2군 및 대조 2군으로



8.0 mm diameter calvarial bone defect in the SD rat



Application of cellulose membrane around the periosteum in the calvarial bone defect



Removal of cellulose membrane with new formed bone after 6 weeks

Fig. 4.

하였다. 케타민 (60mg/kg, ketamine hydrochloride, Yuhan Co., Korea) 과 럽퐁 (3mg/kg, xylazine hydrochloride, Bayer Korea Ltd., Korea)을 4:1 의 비율로 섞어 복강내 주사하여 동물을 마취한 다음 두정부를 제모하고 베타딘으로 소독한 후, 지혈 목적으로 수술부에 1% Lidocaine (1:100,000 epinephrine)을 주사하였다. 두개부 정중앙을 2 cm 수직으로 절개하여 골막을 박리하여 두개골을 노출시킨 다음, 치과용 엔진과 드릴을 사용하여 직경 8 mm 크기의 원형 결손부를 형성하였다. 각 군별로 시행한 후 두정부 골막은 5-0 바이크릴 (Johnson & Johnson Co., USA)을 이용하여 봉합하였는데 이때 이식한 셀룰로오스 막이 움직이지 않는 것을 확인하였으며, 백서의 두부 피부는 4-0 나일론 (Ailee Co., Korea)을 이용하여 봉합하였다. 실험 후, 동물들은 마취제에서 회복될 때까지 각각 케이지 안에서 따뜻하게 유지시켰으며, 깨어난 후에는 충분한 수분과 먹을 것들을 주었다. 술후 동통 감소를 위해 타라신 (Tarasyn, 2mg/kg, ketorolac tromethamine, Yuhan Co., Korea)과 감염 방지를 위해 이세파신 (Isepacin 1.5mg/kg, isepamicin sulfate, Yuhan Co., Korea)을 각각 3일간 근육 주사하였다.

6주뒤 모든 실험동물은 건강하였으며 이식에 따른 특별히 다른 면역 반응은 관찰되지 않았다. 두정부를 다시 열어 이식한 셀룰로오스 막을 모두 포함하여 넓게 두개골을 채취하였으며 (Fig. 4-C), 통상적인 H&E 염색과 Angiogenin, VEGF에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 조직학적 소견을 관찰하였다.

III. 결 과

1. 셀룰로오스 막의 주사전자현미경 상

멍게와 미더덕의 피부 각질에서 얻은 셀룰로오스 막은 외면

과 내면으로 구분되는데 외면은 비교적 거칠고 활택이 없으며 조직 내에서 점차적으로 서서히 흡수되어지는데 반하여 내면은 매우 질기고 활택이 있으며 조직 내에서 쉽게 흡수되지 않아 혈관의 신생이나 골조직 형성을 유도할 수 있으리라 추측하였다.

외면은 거칠고 단단하게 뭉쳐진 셀룰로오스가 돌출과 골 구조를 이루고 있었으며 내면은 미세한 섬유성 구조를 이루고 있었다 (Fig. 5). 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 내면은 외면에 비하여 결체조직과 비슷하였으며 세포들이 쉽게 융합될 수 있는 구조를 보였다.

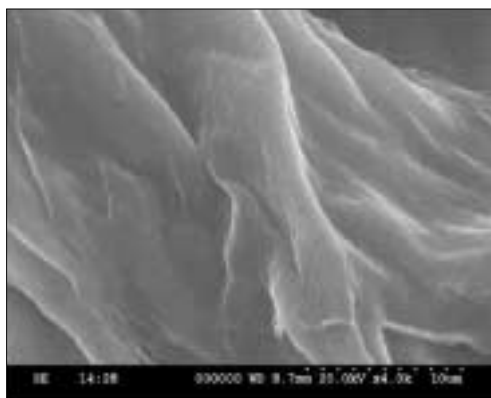
2. 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 막의 성분 검사

1) 아미노산 분석

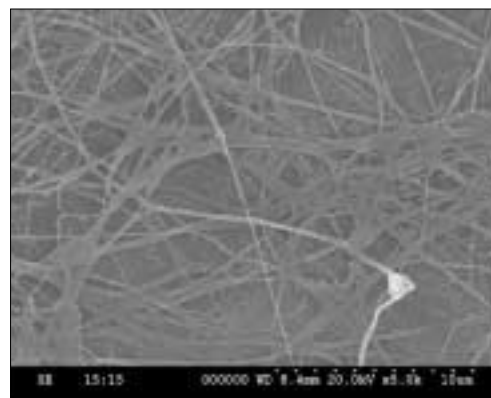
아미노산 분석 결과 대조군에서는 아미노산이 거의 검출되지 않았으나 (Fig. 6-A), 실험군에서는 camosine, hydroxylysine, cystathionine, phosphoserine 등의 아미노산 성분이 소량 검출되었다 (Fig. 6-B).

2) 원소 분석

순도와 중금속 오염 정도 관찰에서는 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 막의 내면과 외면에서 모두 유사하게 중금속 성분이 발견되지 않았으며 거의 100% 당류 (β -cellulose)로 이루어진 물질임을 확인하였고 (Fig. 7-A, B), 또한, 아미노산을 이루는 원소인 N와 S 등의 원소도 측정되지 않았다. 따라서 멍게와 미더덕의 피부 각질에 포함되어 있는 아미노산의 함유율이 Field Emission Scanning Electron Microscope로 측정가능 범위를 벗어난 무게비율로 0.01% 이하일 것으로 추정되었다 (Fig. 7-C).



Outer surface of Cellulose membrane



Inner surface of Cellulose membrane

Fig. 5. The outer surface of cellulose membrane showed coarse and hard property, but the inner surface was composed of fine fibrills.

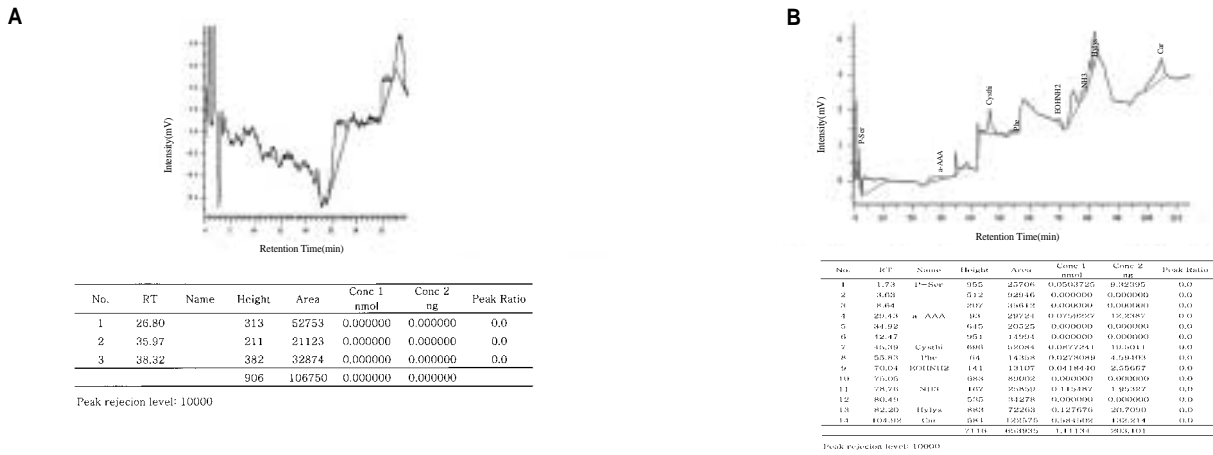


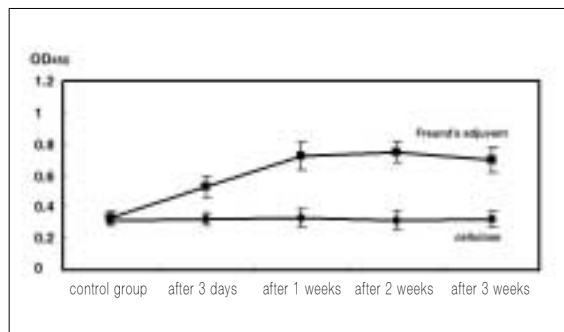
Fig. 6. Amino acid analysis of cellulose membrane, Ascidian (*Halocynthia roretzi*).



Fig. 7. Elementary analysis of β -cellulose membrane, almost composed of carbohydrates.



A. Spleen change after implantation of cellulose powder into the peritoneal space of mouse.



B. IgG concentration change in the mouse seru.

Fig. 8. Immune reaction of cellulose powder and membrane.

3. 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 피부 소재의 면역반응

1) 멍게의 셀룰로오스 분말을 생쥐의 복막강에 이식후 비장의 변화 관찰

멍게의 셀룰로오스 분말 (직경 100 μm 이하)을 생쥐의 복부 장간막 부위 (peritoneal space)에 이식한 후 제 3일, 1주일, 2주일, 및 3주일 후에 각각 비장을 제거하여 비장의 증식정도를 대조군의 비장과 비교하여 관찰하였으나 3주 동안 백서 비장의 비대는 관찰되지 않았다 (Fig. 8-A). 반면에 Freund's adjuvant를 동일한 부위인 복부 장간막 부위에 주사한 경우에는 1주일 이내에 생쥐의 비장이 매우 심하게 비대되었다.

2) 생쥐의 혈청 내에 IgG의 농도 변화

Freund's adjuvant (Gibco BRL, USA)를 투여한 경우에는 생쥐의 혈청 내에 IgG의 농도가 신속하게 증가되어서 1주일 이내에 최대 농도를 보였으나 셀룰로오스를 투여한 경우에는 생쥐의 혈청 내의 IgG의 농도가 3주일 동안 별로 변하지 않았다. 따라서, 멍게 또는 미더덕의 셀룰로오스 피부에 대한 면역반응은 발생되지 않은 것으로 판단되었다 (Fig. 8-B).

4. 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 피부의 조직반응

1) H&E 및 MT 염색 결과

셀룰로오스 외면에서는 활발하게 이물질 거대세포 (foreign

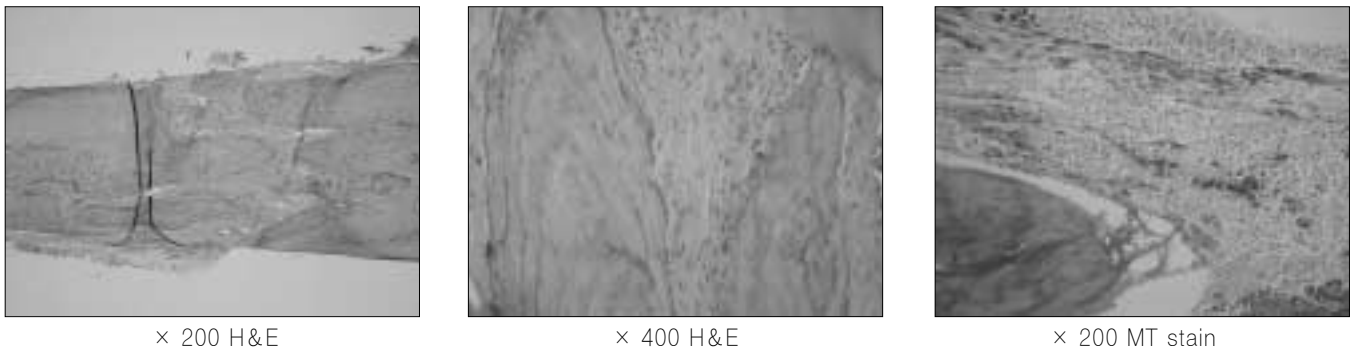


Fig. 9. H & E and MT stainings in the first control group.

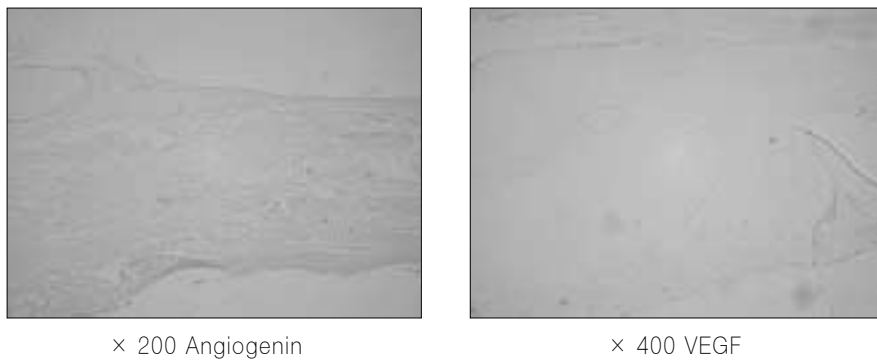


Fig. 10. Immunohistochemical stainings in the first control group.

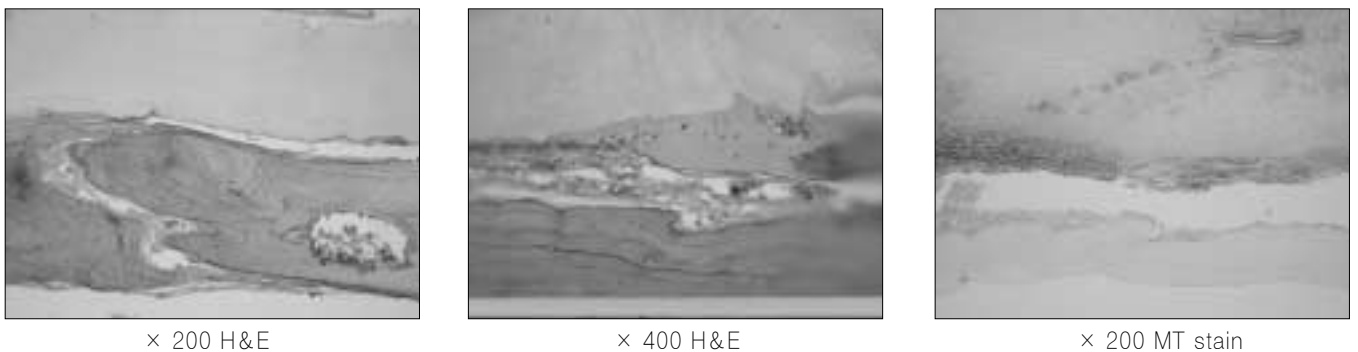


Fig. 11. H&E and MT stainings in the first experimental group.

body giant cell)를 형성하면서 셀룰로오스 기질이 점차로 흡수되어지는 현상이 관찰되는데 세포 괴사 현상이나 세포괴사에 따르는 염증세포의 침윤은 관찰되지 않았다. 셀룰로오스 내면에서는 셀룰로오스 막 주변으로 섬유아세포 등의 중배엽성 세포들이 집중되어 증식하면서 셀룰로오스 내면에 부착되는데 특히 주위 조직에 신생 혈관을 증식시키며 결체조직을 성숙시키면서 조골세포를 만들어 인접하는 골 조직에 뼈돌기 (osteophyte)를 형성시키거나 셀룰로오스 막 주변에 부착되어 신생골 형성을 일으키는 것이 실험 1군 및 2군에서 모두 관찰되었다 (Fig. 11, 15).

한편, 실험군과 마찬가지로 백서의 두개골의 일부를 제거한 후에 셀룰로오스를 삽입하지 않고 봉합하여 6주일 후에 관찰한 대조 1군에서는 6주일이 지나도록 골결손 부위에 골재생이 이루어지지 않고 섬유질로 채워져 있었으며 인접의 골단부위에서도 실험 1군에 비하여 미약한 골형성이 관찰되었다 (Fig. 9). 대퇴골만을 이식하고 셀룰로오스 막을 사용하지 않은 대조 2군에서도 실험 2군에 비하여 미약한 골형성 모습을 보였는데, 무엇보다도 셀룰로오스 막 내면의 골형성 양상이 관찰되지 않았다 (Fig. 13).

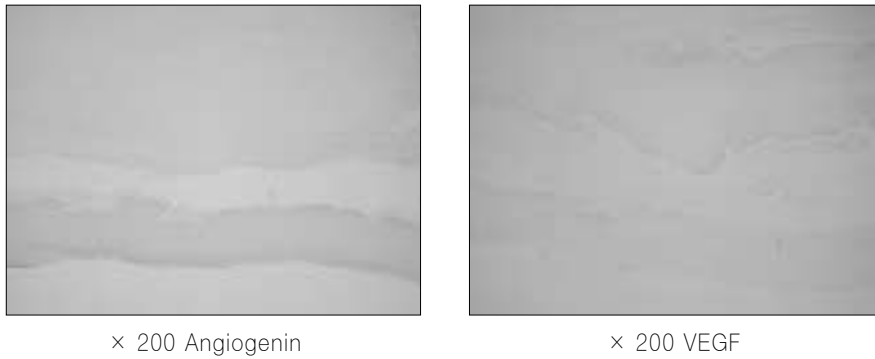


Fig. 12. Immunohistochemical stainings in the first experimental group.

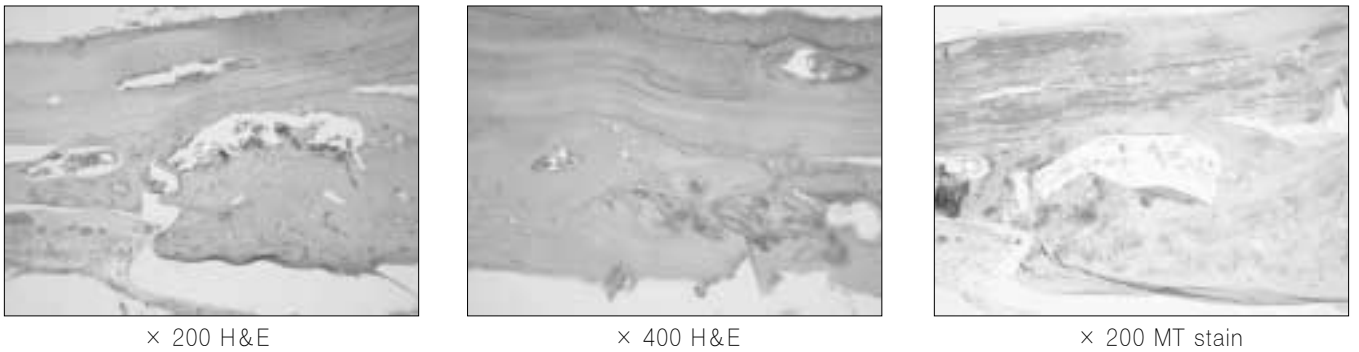


Fig. 13. H&E and MT stainings in the second control group.

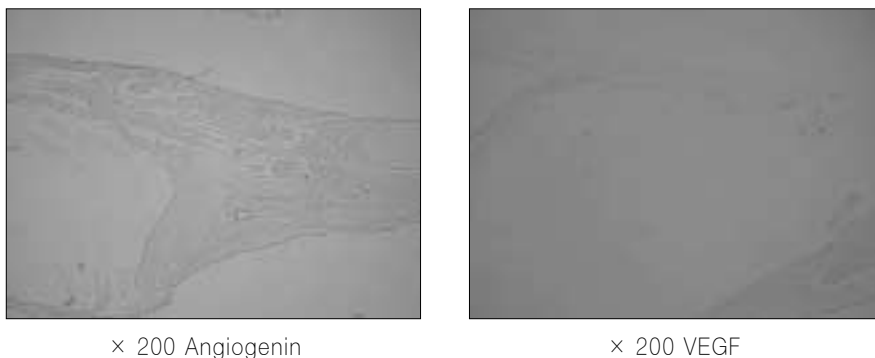


Fig. 14. Immunohistochemical stainings in the second control group.

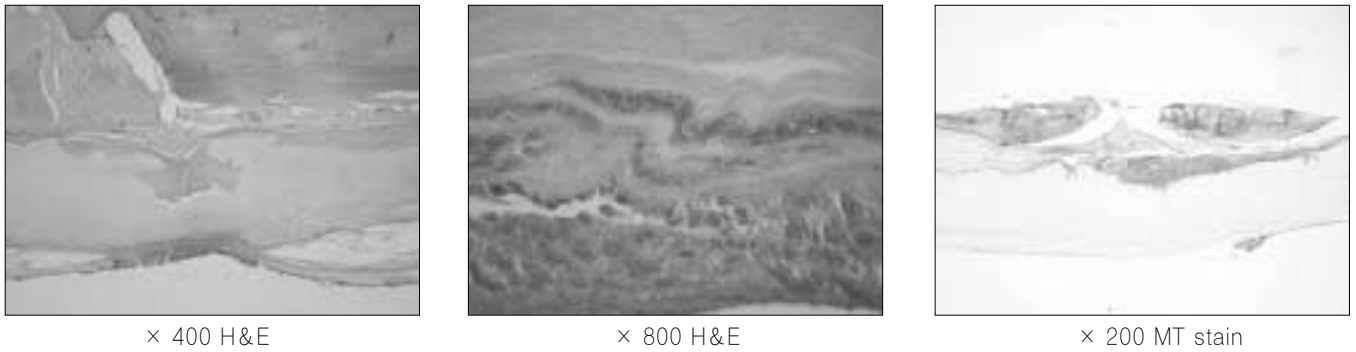


Fig. 15. H&E and MT stainings in the second experimental group.

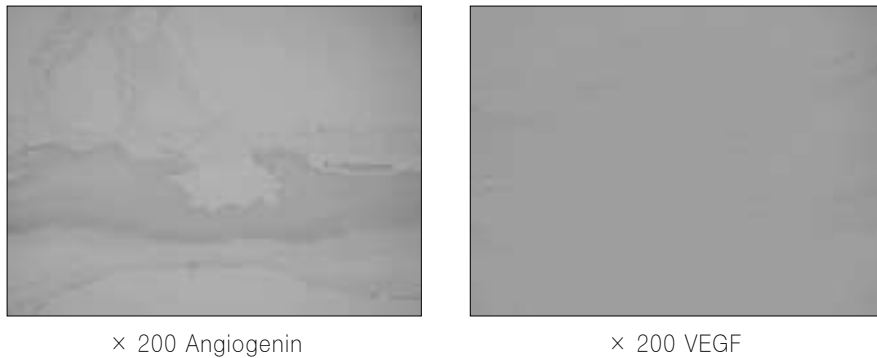


Fig. 16. Immunohistochemical stainings in the second experimental group.

2) 면역조직화학적 염색

셀룰로오스 내면에서 angiogenin과 VEGF (vascular endothelial growth factor) 등의 항체에 대하여 미약한 양성반응이 관찰되고, 인접하는 중배엽성 세포들에서 강한 angiogenin과 VEGF 양성반응이 관찰되었는데, 이는 대조군들에 비해 실험 1, 2군 모두에서 강하게 반응하였다 (Fig. 10, 12, 14, 16).

IV. 고 찰

멍게는 우렁쉥이라고도 하는데 넓게는 원색동물문 해초강에 속하는 해산동물을 총칭하며 2목 4아목 14과 약 170속으로 분류된다. 멍게류는 극지를 포함한 전세계의 조간대나 얕은 바다에 흔하며 8,430m에 이르는 깊은 바다에서도 서식하고, 몸은 피낭(被囊)이라는 단단한 주머니로 덮여서 근막체의 표피 세포에 의해 분비 형성되어 식물의 셀룰로오스와 유사한 투코신이라는 다당류를 함유하는데, 불투명한 피혁 모양에서 투명한 한천 모양까지 여러 종류가 있어서 표면에 흑이나 가시가 나온 것도 있으며, 섬유 모양의 미세한 돌기로서 모래알을 휘감을 수 있는 것도 있다. 피낭의 표면에 입수공과 출수공이 하나씩 열리는데 입수공은 몸 앞끝 부근에 열리고, 출수공은 그 부근의 등인 정중선(正中線) 위에 열리는 것이 보통이다. 피낭에 자극을 주면 몸이 수축하여 굳어짐과 동시에 입수공과 출수공으로부터 물을 배출하는데, 근막체의 벽인 근막은 평활근

이 나와 있어 내장을 에워싸게 되며 내장중 가장 넓은 부분을 차지하는 것이 새낭으로 위새강이라는 장소(腔所)로 둘러싸여 있는데, 이 위새강의 외벽이 근막에 해당하고, 새낭은 인두낭(咽頭囊)에 해당하며 무수한 새열이 정연하게 늘어서 있는 구조를 지닌다 (Fig. 17).

생체내에 적용시키기 위해서는 멍게의 알려진 유전자 분석 등이 필요한데 멍게는 진화과정을 살펴보면 파리와 선충과 같은 무척추 동물과 사람과 같은 척추 동물 사이에 위치하며 게놈 해독을 마친 동물로서는 쥐에 이어 7번째로 해독을 마쳤으며, 해석 결과에 의하면 게놈의 크기는 인간의 약 20분의 1로 파리에서의 게놈 크기와 거의 같은 것으로 알려져 있다. 특히, 이 유전자 중 60%는 파리와 멍게, 인간까지 공통되었는데, 17%의 유전자는 파리에는 없고 인간과 멍게는 공통된 유전자로 진화 과정에서 획득되었다고 알려져 있다. 또한, 멍게에는 남성 호르몬과 여성 호르몬에 관계하는 유전자가 없었을 뿐만 아니라 면역에 관계하는 유전자도 없는 것으로 알려져 있다. 아리스토텔레스는 멍게를 연체동물로 분류했으나 1870년대 러시아의 한 생물학자가 멍게의 배아가 머리, 꼬리, 중추신경 다발이 있는 올챙이와 유사하다는 점을 발견한 이후, 멍게는 척색(脊索)동물로 분류되었는데, 척색동물이란 척추동물과 원색동물을 아우르는 개념으로 생물 분류상 인간도 같은 문(門)에 속하여서 레빈 박사는 “멍게는 인간과 관계가 있다. 찰스 다윈은 멍게를 우리의 먼 조상으로 불렀다. 아마 오래된 사



Fig. 17. Hermaphroditic invertebrates of Ascidians.

촌핍으로 볼 수 있다”고 언급하기도 했다 한다³⁵⁾.

이 밖에 멍게는 조미료용으로도 제조되는데 가공멍게의 조미료 제조 공정은 멍게 → 수세 → 각질 제거 → 육질부 수세 및 3% 식염수 → 마쇄 → 마쇄물 → 효소분해와 알코올 처리 → 여과 → 농축 → 혼합 → 부재료 혼합 → 제품 멍게 등의 과정을 밟게 되며 대체적인 제조 공정은 비슷하여 본 연구에서 시도한 피부 각질을 얻는 제조 공정도 위와 같은 과정을 참고하였다⁹⁾.

미더덕 (*Styela clava*)은 원색동물문-멍게강-촉성멍게목-강새아목-미더덕과에 속하며 척색동물문 미색동물아문에 속하고 영어로는 Warty sea squirt, 일본어로는 Eboya라고 알려져 있다. 향이 독특하고 씹히는 소리와 함께 입안으로 번지는 맛이 일품인 미더덕은 바다에서 나는 더덕과 같이 생겼다고 해서 ‘미더덕’이라 이름지어졌으며 1999년부터 양식품종으로 지정되어 일부 해역에 미더덕 양식면허를 인가해 줌으로써 계속 양식 생산량이 증가하는 추세에 있고, 특허명 미더덕 (특허 번호, 40-2002-0052285)으로도 등록되어 있다. 전체 길이 5-10cm이고, 외피는 섬유질과 같은 물질로 되어 있으며 딱딱한 구조를 지닌다. 한국과 일본을 비롯해 세계에 분포하고, 한국의 전연안에서 서식하고 있는데 특히 패류 양식장과 배 밑에 많이 붙어 있으며, 양식으로는 국내에서 경남 마산시를 중심으로 전국 양식량의 70% 이상이 생산되고 있다^{34,10,11)} (Fig. 18).

우리가 흔히 미더덕으로 알고 있는 오만둥이는 *Styela plicata*라는 학명으로 다른 이름으로는 오만디, 오만동, 오만둥이, 만득이 및 만디기이라고도 한다. 형태가 미더덕과 비슷하나 입수공(入水孔) 및 출수공(出水孔)이 미더덕처럼 밖으로 나와 있지 않아 향은 미더덕보다 조금 못한 것으로 알려져 있다. 그러나, 본 연구의 관심인 껍질에 있어서는 미더덕보다 두꺼우면서 부드럽고 쫄깃하여 식용으로 사용시 씹히는 맛은 오히려 미더덕보다 좋은 것으로 되어있다¹¹⁾ (Fig. 19).

미더덕은 유생기에는 전형적인 동물체로 뚜렷한 뼈대 구조

를 지니고 유영하여 이동하지만 열악한 해양환경에서는 적절한 부위에 한번 부착하면 마치 육상의 식물처럼 피부 각질에 셀룰로오스를 만들고 몸체의 뼈대는 퇴화하여 무척추 동물의 형태로 일생을 지내게 된다. 특이하게 미더덕은 다른 해양동물과 다르게 피부 각질에 치밀한 구조의 beta-셀룰로오스 섬유질로 이루어져 있는데 다른 식물성 셀룰로오스와 유사하게 beta-1,4 linkage로 되어있다 (Fig. 20). 이와 같이 미더덕의 피부 각질에서 얻은 셀룰로오스 막은 외면과 내면으로 구분되는데 외면은 비교적 거칠고 활택이 없으며 조직 내에서 점차적으로 서서히 흡수되어지는데 비하여 셀룰로오스의 내면은 매우 질기고 활택이 있으며 조직 내에서 쉽게 흡수되지 않고 혈관의 신생이나 골조직 형성을 일으키는 현상이 발견되었다. 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 피부를 순수 분리한 후에 외면과 내면을 구분하여 주사전자현미경 (SEM, Hitachi Co., Japan)으로 관찰한 결과, 외면은 거칠고 단단하게 뭉쳐진 셀룰로오스의 돌출과 골 구조가 관찰되었고 내면은 미세한 섬유성 구조를 이루고 있었다 (Fig. 21). 따라서 멍게 및 미더덕의 셀룰로오스 내면은 외면에 비하여 결체조직과 비슷하며 세포들이 쉽게 융합될 수 있는 구조를 보이고 있다고 생각된다^{10,11)}.

미더덕은 84%의 수분과 2.6% 내외의 조지방 및 조회분을 함유하며 계절과 해역에 따른 성분 변화는 없는 것으로 알려져 있다. 글리코겐 성분은 산란기인 7월에 최소이며 8월에 증가하고 단백질은 역상관관계를 보인다고 알려져 있으며, 비극성 및 극성 지질 조성은 비극성 53.3 - 69.2%, 극성 지질이 30.8 - 46.6%이고, 총지질에 대한 지방산 조성은 폴리엔산(polyenes)이 절반 이상이며 포화산 (saturates) 및 모노엔산 (monoenes)의 순이다. 주요 구성지방산으로는 EPA와 DHA와 같은 불포화 지방산이 45% 내외로 다량 함유되어 있으며, 유리 아미노산 함량은 3월이 6월보다 1.8 - 2.2배 높고, 맛 성분인 주요 유리아미노산은 타우린 (taurine), 글루탐산 (glutamic acid), 프롤린 (proline) 및 글리신 (glycine) 등인 것으로 알려져 있다. 본 실험에서도 이런



Fig. 18. Appearance of various Asidians, *Styela clava*.



Fig. 19. Appearance of various Asidians, *Styela plicata*.

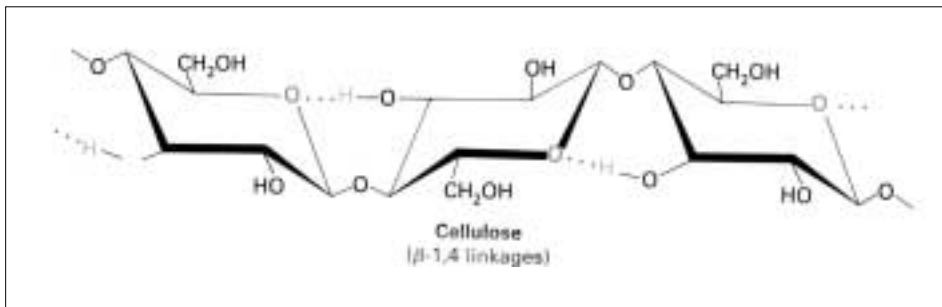
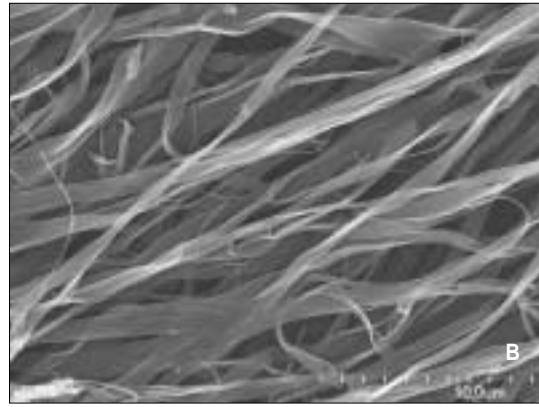
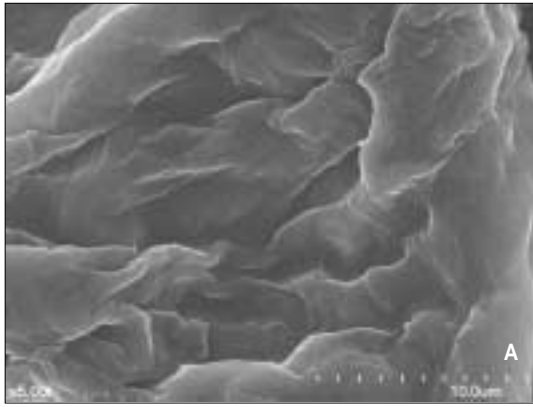


Fig. 20. β -1,4 linkage structure of Ascidiens cellulose.

아미노산 성분이 셀룰로오스 막 성분에서 관찰된 결과를 보면 이는 멍게와 미더덕의 피부조직에서 기저층에 존재하는 여러 종류의 세포외기질의 당단백질들이 강산과 강알카리 처리에 의하여 잘려져서 제거되지만 기저층 셀룰로오스에 단단히 결합되어 있는 단백질 조각들이 남아 있어서 조직생체 반응을 일으킴으로써 육아조직과 골막조직을 활성화시켰다고 이해할 수 있겠다.

그리고 멍게와 미더덕의 셀룰로오스를 고압과 고온에서 처리한 경우 소량의 아미노산이 용해되어짐을 관찰하였으며, SEM 관찰과 조직내 생체 반응에 대한 조직학적 및 면역조직

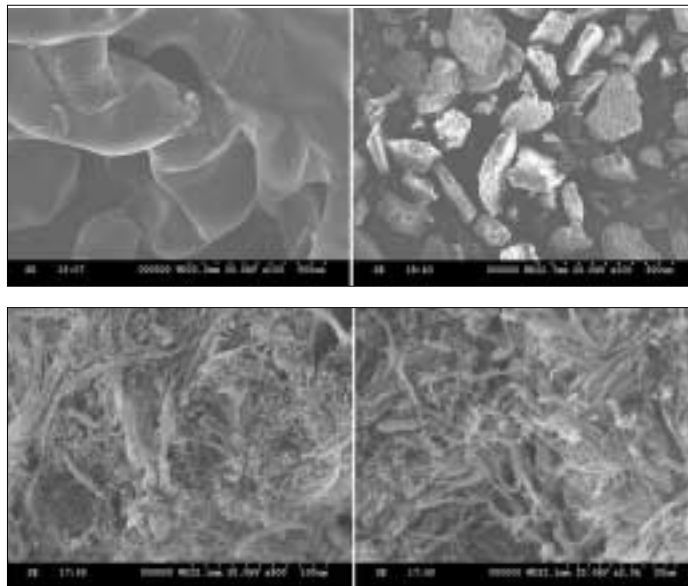
화학적 현미경 관찰에서 멍게와 미더덕의 내면에서 생활성화 (bioactive)가 증가되어짐이 뚜렷하였다. 따라서, 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 피부에서는 외면보다는 내면에 생활성화 물질이 잔존되어 있는데 그 잔존량의 정도는 Field Emission Scanning Electron Microscope로 측정되어지지 않는 0.01% 이하의 극소량이며, 이 생활성화 물질은 길이가 짧은 펩타이드 종류로서 생쥐에서 일체의 면역반응을 일으키지 않은 것이라 생각된다. 또한, 본 연구 결과에서 보이는 멍게와 미더덕의 셀룰로오스 피부가 모두 조직내에서 염증반응을 일으키지 않으며 3주 이상의 장기간 이식에서도 항체 생산이 증가하지 않은 것도 같



SEM view of the outer surface of *Styela clava*

SEM view of the inner surface of *Styela clava*

Fig. 21.



The cellulose surface of polyethylene fiber and Vegetable pulp (upper figures).

The cellulose fibrils of Sea squirt, 100 nm thickness (lower figures).

Fig. 22.

은 맥락에서 이해할 수 있다. 셀룰로오스 막을 사용한 실험 1, 2 군에서 모두 대조 1, 2군에 비해 조직면역화학 검사에서 angiogenin과 VEGF에 상대적 양성 반응을 보인 것은 셀룰로오스 막의 내면에 혈관형성에 관련된 극소량의 짧은 펩타이드 물질이 많다는 것을 의미하며 중간엽세포 (mesenchymal cells)들이 증식하면서 신생혈관을 형성하고 조골세포를 만들어서 셀룰로오스 막 내면에 부착되어 신생골 형성을 일으키는 것으로 생각된다.

셀룰로오스는 우리 주변에서 흔히 볼 수 있는 고분자 물질로서 많은 양의 셀룰로오스가 해마다 산림을 비롯한 식물계 및 재배 작물에 의해 만들어진다. 하루 약 50kg 이상의 셀룰로오스가 자연적으로나 또는 인위적으로 합성되는데 나무, 면화, 종이, 목재, 판지 등이 모두 셀룰로오스로 구성되고 인조견, 절

연 타일, 포장재 및 건축재료 등의 여러 제품의 원료가 되기도 한다.^{1,12,13)} 일반적으로 흔히 알고 있는 Polyethylene fiber 및 Vegetable pulp에 비해 본 연구에서 사용하는 Sea squirt의 셀룰로오스 막에서는 두께가 100 nm 정도의 미세한 섬유질이 치밀하게 얽혀있는 구조를 지녀서 골재생 및 기타 다른 조직재생 유도막의 기능을 할 수 있으리라 착안하였다.¹⁴⁾ (Fig. 22). 이런 대부분의 기질은 섬유질 셀룰로오스로 만들어지고, 포도당이 단량체로 대사 작용을 하므로 셀룰로오스 형태로 흡수되기보다는 단량체 단위로 흡수하게 된다. 자연계의 셀룰로오스 분해 박테리아는 $10^6 - 10^8$ colony / g 퇴비의 수준으로 존재하며, 항상 고온균이 중온균보다 많이 검출되므로 셀룰로오스는 주로 고온균에 의해 분해되는 것으로 여겨지고 있다. 퇴비화 과정에는 다양한 수의 셀룰로오스 분해 미생물이 존재하고 pH, 암모니

아의 양, 온도 등의 환경 인자에 의해 우세한 종이 결정되는 것으로 생각되는데, 여러 종류의 고온성 셀룰로오스 분해균은 주로 *Bacillus* 종으로 동정되는 것으로 알려져 있다. 셀룰로오스 분해 곰팡이류는 10^3 - 10^6 colony/g 퇴비의 범위에서 고온 기간중 짧은 기간동안 검출되어 곰팡이에 의한 셀룰로오스 분해는 매우 제한적으로 알려져 있다¹⁵⁻¹⁷. 이상과 같이 셀룰로오스 분해효소의 활성도는 고온중에 급격히 증가하여 온도 감소 단계에서 최대값을 보이며, 셀룰로오스 함량 또한 셀룰로오스 분해효소의 활성도가 증가하는 기간 동안 급격히 감소하나 최대 활성도를 보인 시기에는 변화가 적어서, 이러한 결과는 셀룰로오스 분해효소의 셀룰로오스에 대한 흡착효과 때문인 것으로 판단된다. 암모니아의 손실은 셀룰로오스 분해와 상호 관련성이 있어서 셀룰로오스 분해와 무기화가 동일한 시기에 일어나는 경우 배기가스중으로의 암모니아 손실이 감소할 뿐만 아니라 유기성 질소의 함량이 증가하기 때문에 이러한 결과는 부식화 초기 단계에서 암모니아 셀룰로오스 분해 산물의 화학적 결합 반응 때문으로 알려져 있다. 따라서, 장차 순도가 높은 고품질의 셀룰로오스 막을 만들기 위해서는 이러한 암모니아 성분을 줄이기 위한 특수처리과정이 고안되어야 할 것으로 사료된다^{12,18}.

새우, 게, 기타 많은 곤충이나 갑각류의 딱딱한 불용성의 껍질 또는 외골격은 주로 N-acetyl-D-glucosamine이 β 결합으로 연결된 선상의 중합체인 키틴(chitin) 다당류로 이루어져 있고 탄산칼슘으로 채워져 굳어진 모습을 지니게 됨에 비해, 셀룰로오스는 10,000개 이상의 D-글루코오스 단위가 1-4 글리코시드 결합으로 연결된 곁가지 사슬이 없는 선상의 동질다당류로 구성된다. 아밀로오스나 글리코겐의 주사슬과 유사하게 보일 수 있으나, 셀룰로오스에서는 1-4 결합이 β 결합 배치인데 비해 아밀로오스, 아밀로펙틴, 글리코겐에서는 1-4 결합이 α -배치인 것이 차이점이라 할 수 있다. 따라서, 셀룰로오스와 아밀로오스는 화학 구조상 비슷해 보이나 이러한 차이로 완전히 다른 성질을 갖는 중합체 구조를 지니게 되는데, 셀룰로오스의 β 결합에 의해 연결되어 있는 D-글루코오스 사슬은 서로 줄지어서 α -아밀로오스 가수분해효소에 의해 가수분해되지 않는 불용성의 섬유가 된다^{14,19,20}. 이처럼 셀룰로오스를 가수분해하는 효소는 척추동물에서 분비되지 않으므로 셀룰로오스는 소화될 수 없으며 에너지원으로서도 이용되지 않고 있다. 참고로 흰개미는 셀룰로오스를 쉽게 가수분해하는 효소인 셀룰라제(cellulase)를 분비하는데 이런 셀룰라제는 *Trichonympha*라는 미생물에서 분비하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 흰개미들은 목재를 소화해낼 수 있으며 목재를 부패시키는 진균이나 박테리아도 셀룰로오스 가수분해효소를 만들어내는 것으로 알려져 있다. 질산염 셀룰로오스(Cellulose nitrate)는 셀룰로오스를 질산과 화학적으로 반응시켜 제조한 것으로 최초의 합성 셀룰로오스 유도체인데 권총 먼(gun cotton)으로 불리웠던 질산염 셀룰로오스는 성능이 우수한 폭약으로도 사용되어 라이플이나 대포의 화약으로 제조되기도 했으며, 복합재료, 안전 유리 등을

제조하는 재료로 이전에 많이 사용되거나 열가소성 플라스틱으로서 코끼리의 상아를 대신하여 사용되기도 했으며 당구에 사용되는 공을 만드는 재료로도 사용되어 왔다. 셀룰로오스를 초산과 반응시키면 초산염 셀룰로오스(cellulose acetate)가 되는데, 이는 열가소성으로서 사진 현상용 필름이나 줄업식 때 입는 가운을 제작하는데 사용된다. 레이온(Rayon)이라고 부르는 고분자 물질은 크산틴산염(xanthate) 셀룰로오스를 말하는데 특히 인조견인 레이온 옷을 만들기 위한 특수 섬유로 사용된다. 다른 종류의 셀룰로오스 유도체로 hydroxyethylcellulose를 들 수 있는데, 이것은 일반적인 구조의 셀룰로오스의 포도당 반복 단위에 있는 수산기의 일부나 전부가 hydroxyethyl ether기로 치환된 형태로서 이 hydroxyethyl기는 고분자가 결정화될 때 중요한 역할을 한다^{12,13,21,22}.

Melcher²³ 등에 의해 고안되고 Karing²⁴ 등에 의해 확립된 조직유도재생술은 치과영역에서 치조골능을 높이거나 임플란트를 비롯한 여러 결손부에 골이식술을 위한 치료법으로 많이 사용되고 있다. 이런 유도재생술을 위해 PTFE(polytetrafluoroethylene), 콜라겐(collagen), polylactic acid, polydioxanon, chitosan 등과 같은 여러 흡수성 및 비흡수성 차폐막이 개발되고 사용되고 있는데, 실제로 여러 실험적 시도에서 효과는 검증되고 있지만 고가의 비용과 인체내 이물일 수 있다는 점과 같이 여러 면에서 환자들에게 부담을 주고 있는 것이 현실이다. Jensen 등은 결손부 이식에서 자가골과 차단막을 같이 사용하면 차단막만 단독 사용했을 때보다 골재생이 활발히 일어난다고 보고하였고, Wachtel 등은 장골 이식과 같은 자가골 이식에서 골흡수가 빨리 일어나서 Hydroxyapatite를 혼합사용한 경우 보다 효과적일 수 있다고 하였다²⁵. Melcher 등은 치주조직 내에는 치은 결합조직, 치주인대, 상피 및 치조골의 4종의 조직이 있으며 이들에 대한 치료후 치근면에 이주하는 세포의 종류에 따라 치주조직의 재생 형태가 결정된다고 하여 치주 조직 유도재생술의 이론적 근거를 확립하였으며²⁶, Nyman 등은 치주 병소에서 milipore 차단막을 사용하여 상피세포의 이동을 차단하여 신생 백악질 형성을 보고하였고²⁷, Gottlow 등은 차단막을 이용하여 상피와 치은 결합조직에서 유래되는 육아조직이 치근면에 접촉되는 것을 막고 치근막에서 유래된 세포의 증식을 유도하여 새로운 결합조직이 재생되는 것을 최초로 보고하여 이를 신부착이라 해서 조직유도 재생술(GTR, Guided Tissue Regeneration)이라는 개념을 주장하였다²⁴. 또한, Dahlin 등은 GTR 및 차단막을 이용하여 다른 세포를 배제하고 골세포만 증식시킨다면 골의 재생도 가능하다고 보고하여 골결손부에서 골유도 재생(GBR, Guided Bone Regeneration)이라는 개념을 정립한 바 있다^{28,33}.

이에 멍게와 미더덕 피부의 셀룰로오스 각질이 창상의 치유를 촉진하며 골절이나 골결손 부위에 골생성을 활발하게 하고 반대로 과다한 골의 생성을 억제하는 역할을 이용하여 창상이나 화상 등의 피부 상처의 치유 촉진을 위한 보호막의 소재로 사용하고 골절 치료나 골 성형을 위한 골형성 촉진 유도막의 소재로 사용할 수 있다는 점에 착안하여^{34,36}, 치과 및 구강악안

면외과 영역의 골형성유도 차폐막으로의 사용이 가능하다고 판단되었다.

V. 결 론

해양 생명체 중에서 가격이 저렴하고 쉽게 구할 수 있는 멧게와 미더덕의 피부 각질을 고농도의 염산으로 고온에서 장기간 처리하여서 0.2mm 이내의 연마된 얇은 셀룰로오스 막을 얻었다.

그리고 막에 칼슘이온을 얇게 도포시킨 후, 셀룰로오스 분말이나 셀룰로오스 막의 양이온 도포막 성질이 변성되지 않도록 건조시켜 생활성막을 제조한 후 면역 및 골재생성을 파악하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 순도와 중금속 오염 정도 관찰에서는 멧게와 미더덕의 셀룰로오스 막의 내면과 외면에서 모두 유사하게 중금속 성분이 발견되지 않았으며 거의 100% 당류 (β -cellulose)로 이루어진 물질임을 확인하였다.
2. 멧게와 미더덕의 피부 각질에 포함되어 있는 아미노산의 함유율이 Field Emission Scanning Electron Microscope로 측정 가능 범위를 벗어난 무게비율로 0.01% 이하일 것으로 추정되었으며 따라서, 아미노산을 이루는 원소인 N와 S 등의 원소도 측정되지 않았다.
3. 멧게와 미더덕의 셀룰로오스 피부에서는 외면보다는 내면에 생활성화 물질이 잔존되어 있는데 그 잔존량의 정도는 0.01% 이하의 극소량이며 짧은 펩타이드 물질로 예측된다. 이 생활성화 물질은 여러 예비실험에서 일체의 면역반응을 일으키지 않았다.
4. 셀룰로오스 막 주변에는 일체의 염증반응을 관찰할 수 없었는데 외면에서는 이물거대세포 (foreign body giant cell)를 형성하면서 셀룰로오스 기질이 흡수되는 현상을 관찰하였으며, 내면에서는 셀룰로오스 막 아래로 주변의 육아세포 (mesenchymal cells)들이 증식하면서 신생혈관을 형성하며 조골세포를 만들어서 셀룰로오스 막 내면에 부착되어 신생골 형성을 일으켰다.

이상의 본 결과에서 셀룰로오스 막의 우수한 결체조직 재생과 혈관형성 그리고 골형성능을 확인하였으며, 향후 임상적용 가능성을 파악하였다.

참고문헌

1. Brett CT: Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *International Review of Cytology* 2000;199:161-199.
2. Kroon-Batenburg LM, Kroon J: The crystal and molecular structures of cellulose I and II. *Glycoconjugate Journal* 1997;14:677-690.
3. www.naver.com 및 대백과 사전 참조
4. Empas 과학기술검색; 미더덕 순수과학>동물학>무척추동물
5. 일본 교토대학: 멧게의 게놈 해석, 닛케이산업신문; 2002년 12월 13일
6. Bosch C, Melsen B, Vargervik K: Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*

- 1998;9:310.
7. Alberius P, Dahlin C, Linde A: Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:829.
8. Nikolaos D, Lang NP: Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:101-111.
9. 조길석: Study on the Development of Seasoning Product from Ascidian, Cynthia roretzi, 1995, 한국식품개발연구원
10. 교습어장 사업보고서: 미더덕 자연 채묘 및 양성, 2002, 마산지방 해양수산청
11. 박정홍: Studies on the development of Aquaculture technology for Ascidians, Styela clava Herdman, 1997, 국립수산물원
12. Williamson RE, Burn JE, Hocart CH: Towards the mechanism of cellulose synthesis. *Trends Plant Sci.* 2002;7:461-467.
13. Lee JG, Brown RM, Kuga S, Shoda SI, Kobayashi S: Assembly of synthetic cellulose I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994;91:7425-7429.
14. Levy I, Shoseyov O: Cellulose-binding domains biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 2002;20:191-213.
15. 정연구: Efficient solid waste composting by improved degradation of cellulose, 한국과학기술원 토목공학과, 1995.
16. Nobles DR, Romanovicz DK, Brown RM: Cellulose in Cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant Physiol* 2001;127:529-542.
17. Novaes AB, Gutierrez FG, Francischetto IF, Novaes AB: Bacterial colonization of the external and internal sulci and of cellulose membranes at time of retrieval. *J Periodontol.* 1995;66:864-869.
18. Kimura S, Kondo T: Recent progress in cellulose biosynthesis. *J Plant Res.*2002;115:297-302.
19. Lai-Kee-Him J, Chanzy H, Muller M, Putaux JL, Imai T, Bulone V: In vitro versus in vivo cellulose microfibrils from plant primary wall synthases: structural differences. *J of biological chemistry* 2002; 277:36931-36939.
20. Madhally SV, Matthew HWT: Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999;20:1133-1142.
21. Kim NH, Herth W, Vuong R, Chanzy H: The cellulose system in the cell wall of Micrasterias. *Journal of Structural Biology* 1996;117:195-203.
22. Ann GM, Karine D: A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ;101:986-991.
23. Melcher AH: On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976;47:256-260.
24. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J: The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 1982;9:257-265.
25. Wachtel HC, Noppe C, Zimmermann B, Bernimoulin JP: Implantation of porous hydroxyapatite into periodontal bony defects. *Dtsch Zahnarztl Z* 1989;44(4):277-282.
26. Melcher. In *Biology of the Periodontium*. Academic Press 1969.
27. Nyman S, Karring T, et al: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982;9:290-296.
28. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S: Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:672-676.
29. Lundgren D, Sennerby L, Falk H, Friberg B, Nyman S: The use of a new bioresorbable barrier for guided bone regeneration in connection with implant installation. *Clin Oral Impl Res* 1994;5:177-184.
30. Friedmann A, Strietzel FP, Maretzki B, Pitaru S, Bernimoulin JP: Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. A randomized clinical trial. *Clin Oral Impl Res* 2002;13:587-594.
31. Piattelli A, Scarano A, Russo P, Matarasso S: Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. *Biomaterials* 1996;17:791-796.
32. Hürzeler MB, Quiñones CR, Hutmacher D, Schüpbach P: Guided bone regeneration around dental implants in the atrophic alveolar ridge using a bioresorbable barrier. An experimental study in the

- monkey. Clin Oral Impl Res 1997;8:323-331.
33. Takata T, Wang HL, Miyauchi M: Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. Clin Oral Impl Res 2001;12:332-338.
 34. Madkour M, Mayer F: Structural organization of the intact bacterial cellulosome as revealed by electron microscopy. Cell Biology International 2003;27:831-836.
 35. Markman C, Fracalanza SE, Novaes AB Jr, Novaes AB: Slow release of tetracycline hydrochloride from a cellulose membrane used in guided tissue regeneration. J Periodontol. 1995;66:978-983.
 36. dos Anjos B, Novaes AB, Meffert R, Barboza EP: Clinical comparison of cellulose and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of class II furcations in mandibular molars with 6-month re-entry. J Periodontol 1998;69:454-459.