

Chitosan과 Poly(vinyl alcohol) 블렌드화물의 제조와 인공피부 성능평가

김 계 용 · 이 선 용 · 민 동 선 · *정 호 삼 · *황 세 진
한양대학교 공과대학 공업화학과 · *한양대학교 의과대학 해부학교실
(1990년 5월 24일 접수)

Preparation and Evaluation of Chitosan-Poly(vinyl alcohol) Blendmer for Artificial Skin

K. Y. Kim, S. Y. Lee, D. S. Min, H. S. Chung,* and S. J. Hwang*

Dept. of Indust. Chem., College of Eng., Hanyang Univ., Seoul 133-791, Korea

**Dept. of Anatomy, College of Med., Hanyang Univ., Seoul 133-791, Korea*

(Received May 24, 1990)

요 약 : 의료용재료로 응용되는 chitosan과 수용성 합성고분자인 poly(vinyl alcohol)을 블렌드하여 동결건조함으로써 항균제가 함유된 다공성 인공피부를 제조하였다. 기계적인 성질은 건조시 인장강도가 2.6~9.4 kg/mm², 신장율은 8.7~170%의 값을 나타내었으며 PVA의 혼합율이 증가함에 따라 인장강도와 신장율은 증가하였다. 함유율은 80%이상의 높은 함유율을 가지고 있었으며 수분투과도는 정상피부의 약 10배의 값을 나타내었다. Morphology 관찰에서 윗부분은 균일막 구조이고 아래는 기공이 연속적으로 존재하는 스폰지 구조를 이루고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 항균제의 방출거동 및 세균억제 실험으로부터 함유하고 있는 항균제의 50% 이상이 초기에 방출되는 것을 관찰할 수 있었다. 쥐를 이용 동물실험결과 상처부위의 흉터를 최소화할 수 있었으며 조직검사를 통해서 정상피부와 유사한 피부조직이 재생되었음을 관찰할 수 있었다.

Abstract : Macroporous artificial skins containing antibiotics were prepared by lyophilization of chitosan/PVA blendmer. The tensile strength and elongation under dry state were ranged 2.6~9.4 Kg/mm² and 8.7~170%, respectively. These values were increased with the increase of PVA content of the blendmer. The water content was over 80% and the water vapor transmittance rate was about ten times as large as that of the normal skin. The morphological structure of this artificial skin was composed of a dense skin layer and a macroporous inner sponge layer. From the behavior of antimicrobial releasing and the investigation of the suppression of bacterial proliferation, it was supposed that the artificial skin containing antibiotics could protect the wound surfaces from bacterial invasion to suppress the bacterial proliferation effectively. Animal test results showed that the formation of scar on the wound surface was markedly minimized and the neoepidermal tissue was regenerated well after 20 days of grafting operation.

서 론

인공피부를 사용하는 목적은 화상부위에서 수분이 나 체액의 손실을 억제하여 심한 탈수증세로 인한 생명의 위협과 세균감염을 방지하여 화상부위를 보호하면서 치료를 촉진시키는데 있다. 따라서 인공피부는 상처부위의 분비액을 잘 흡수하여 체액이 고이지 않도록 흡수성이 있어야 하고 상처부위와 접촉이 잘 되도록 유연성을 가지고 있어야 하며 또한 분비액에 의하여 형태나 강도의 손실이 없을 정도의 기계적 성질이 있어야 한다.

본 연구에서는 상처치료효과가 있는 탈아세틴화 chitin인 chitosan과 생체적합성 재료로서 생의학적인구가 활발히 진행되고 있는 수용성 고분자인 poly(vinyl alcohol)[PVA]을 인공피부 재료로 사용하였다. 이들 두 물질을 블렌드하고 항균제인 silver sulfadiazine을 함유하는 다공성 인공피부를 제조하였다. 제조한 블렌드화물의 함유율, 기계적 성질 및 수분투과도 등 인공피부로서의 기본적인 물성을 검토하였으며 함유하고 있는 항균제의 방출거동도 조사하였다. 또한 항균제로 인한 세균증식억제 효과를 알아보기 위하여 *pseudomonas aeruginosa*를 이용하여 세균증식 억제 실험을 하였으며 동물실험으로는 위의 등부위의 피부전증상처에 대한 상처치료효과, 표피조직의 형성능력을 조직학적으로 검토하였다.

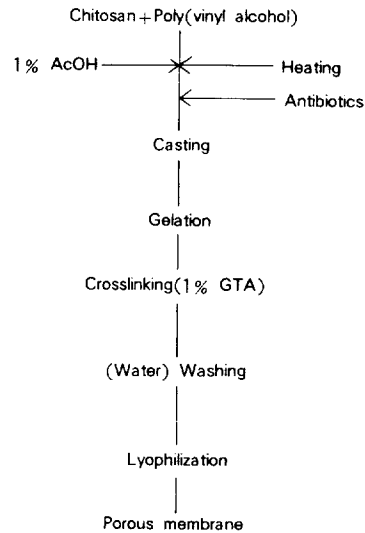
실 험

시약 및 정제

Chitosan은 탈아세틴화도 76%인 일본 Tokyo Kasei 제품을 산과 알칼리로 정제하여 사용하였다. PVA은 중합도가 1,800이며 겹화도가 99%인 미국 Du Pont Co. 제품인 Elvanol 71-30을 그대로 사용하였다.

항균제를 함유하는 다공성 인공피부의 제조

Scheme 1에 항균성 인공피부의 제조과정을 나타내었다. Chitosan과 PVA를 무게비로 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4로 혼합하여 시료를 제조하였으며



Scheme 1. Preparation of artificial skin.

항균제인 silver sulfadiazine을 고분자 총중량에 비해 1% 첨가하였다. Chitosan과 PVA를 일정비로 혼합하여 1% 초산수용액에서 가열하여 녹인 다음 glass filter로 여과한 후에 항균제를 첨가하여 글고부 분산시켰다. 이를 PMMA 판에 도포하여 상온에서 3 시간 동안 방치한 다음 1% glutaraldehyde[GTA] 수용액에 5분 동안 침지시켜 가교시키고¹ 흐르는 물 속에서 세척하여 미반응 GTA와 초산을 제거하였다. 제조된 겔상 필름에 다공성을 부여하기 위하여 동결 건조하여 항균제를 함유하는 다공성 인공피부를 제조하였다.

기계적 성질, 함유율 및 수분투과도의 측정

합성한 인공피부를 유사체액(pseudo-extracellular fluid, PECE²)에 37°C에서 팽윤시킨 다음 습윤 및 건조상태에서의 무게를 측정하여 다음 식으로 함유율을 측정하였다.

$$\text{함유율} = \frac{\text{습윤시 시료무게} - \text{건조시 시료무게}}{\text{습윤시 시료무게}} \times 100$$

각각의 시료를 필름상태로 제조하여 건조상태에서의 인장강도와 신장율을 Instron type의 Universal

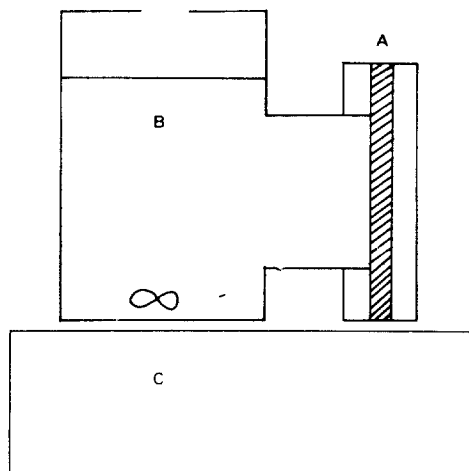


Fig. 1. Apparatus for release of antimicrobial drug : (A) skin substitute, (B) physiological saline, (C) magnetic stirrer.

testing machine (Toyo Baldwin UTM-400)을 사용하여 측정하였다. 수분투과도는 유효막면적 $7.65 \times 10^{-4} \text{m}^2$ 인 투과장치를 이용하여 전보³와 같은 방법으로 측정하였다.

Morphology 관찰 및 항균제 방출 실험

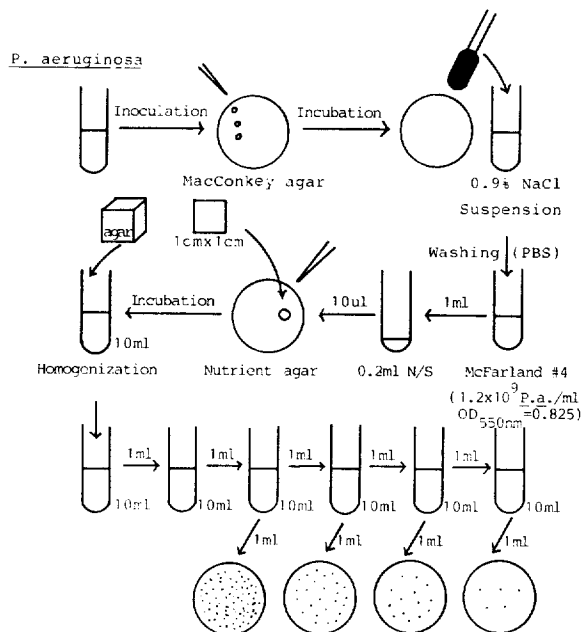
스폰지형태의 인공피부의 단면을 시차주사전자현미경 (JEOL, JSM-35CF)으로 관찰하였다. 제조한 인공피부에 함유되어 있는 항균제의 방출기능을 관찰하기 위하여 Fig. 1에 나타난 것과 같은 장치를 이용하여 전보⁴와 같은 방법으로 항균제 방출실험을 하였다.

세균증식억제실험

일정수의 균을 배양, 접종시키고 그 위에 항균제를 함유한 인공피부를 놓고 살균효과를 검토하는 실험의 개략도를 Scheme 2에 나타내었다. 본 연구에서 사용한 세균은 화상부위에서 가장 많이 존재하며 염증을 유발시키는 원인균인 *pseudomonas aeruginosa*를 사용하였으며 균수는 Mcfarland nephelometer법⁵으로 결정하여 전보⁴와 같은 방법으로 실험하였다.

동물실험

동물실험에서는 150~200g의 체중을 갖는 Wistar



Scheme 2. Method for the count of the number of bacteria on agar surface.

rat 수컷을 사용하였다. 쥐의 등부위를 탈모하고 1cm^2 크기의 피부전층을 제거한 상처(full-thickness skin wound)를 만든 다음 미리 EO gas로 멸균처리를 한 인공피부를 상처부위에 덮고 멸균가아제와 탄성밴드로 감아 고정시켰다. 일정기간이 경과한 후 상처부위의 상태를 육안으로 관찰하였으며 재생부위의 조직을 떼어내어 hematoxylin & eosin으로 염색하여 육아조직의 형태, 거부반응 여부, fibroblast의 증식상태등을 조직학적으로 검토하였다. 비교용 시료로는 현재 화상치료시 많이 사용되고 있는 외과용 가아제를 선택했다.

결과 및 고찰

물리화학적 성질

Table 1에 제조한 블렌드화물 막의 기계적 성질 함수율, 수분투과도를 나타내었다. 인장강도는 $2.6 \sim 9.4 \text{Kg/mm}^2$ 의 값을 가지고 있으며 신장율은 $8.7 \sim 170\%$ 의 값을 나타내는 것을 알 수 있었다.

Table 1. The Physical Properties of Chitosan/PVA Blendmer

Sample	Chitosan/ PVA (ratio)	Tensile Strength (kg/mm ²)	Elonga- tion (%)	WC* (%)	WVTR**
A-41	4.0	2.6	8.7	80.7	4380
A-21	2.0	2.9	13.7	82.2	4430
A-11	1.0	3.1	21.9	83.2	4710
A-12	0.5	4.0	68.2	84.3	4970
A-14	0.25	9.4	170.0	82.5	4690

* water content, ** water vapor transmittance(g/m² · day)

PVA의 혼합율이 증가할 수록 인장강도와 신장율은 증가하는 경향을 나타내었다. 각각의 블렌드화물의 함수율은 80.7~84.3%의 값으로서 모두 80% 이상의 높은 함수율을 가지고 있으며 이로써 환부에서 배출되는 삼출액을 충분히 흡수하여 체액의 고임을 방지할 수 있다고 생각된다. 수분투과량은 4300~4900 g/m² · day의 값으로 2도 화상의 경우인 8000~9000g/m² · day와 비교하여 볼때 본 시료는 어느정도 과량의 수분증발을 억제할 수 있는 능력을 갖고 있다고 생각된다.

다공성 인공피부의 Morphology

항균제를 함유하고 있는 다공성 인공피부의 단면 구조를 관찰한 시차주사전자현미경 사진을 Fig. 2에 나타내었다. 윗부분은 균일막으로 이루어져 있으며 그 아래에 기공이 연속으로 이어진 스폰지 구조를 형성하고 있는 것을 볼 수 있다. 본 연구에서 동결 건조하여 인공피부를 제조하였을 때 윗부분의 균일 막 구조는 외부로부터 세균이 침입하는 것을 방지하는 배으로서 정상피부에서의 표피와 같은 보호기능을 갖는다는 것을 알 수 있었으며 아랫부분의 다공성 스폰지 구조는 상처면에서 초기의 삼출액을 빠르게 흡수하여 상처부위와의 밀착성을 좋게하며 새로운 조직형성의 통로역할을 함으로써 조직의 재생을 촉진시키는 역할을 한다고 생각된다.

항균제의 방출거동⁶

시간에 따른 항균제의 방출거동을 Fig. 3에 나타

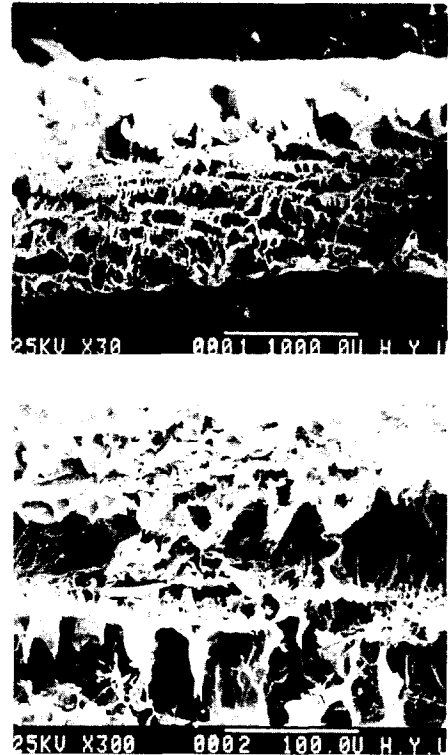


Fig. 2. Scanning electron micrographs of cross sectional view of sponge type artificial skin(A-12).

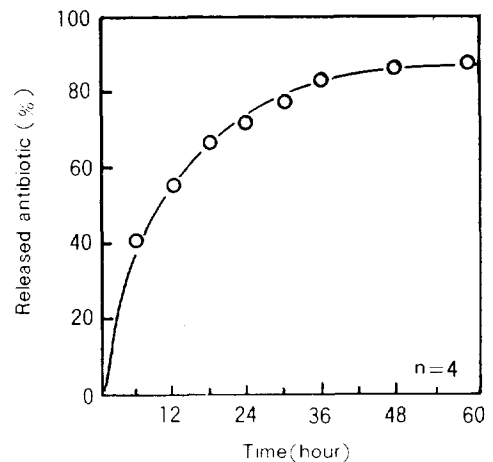


Fig. 3. Release of antibiotic(silver sulfadiazine) from artificial skin(A-12) in physiological saline.

내었다. 항균제는 12 시간 이내에 함유하고 있는 항균제 중의 50% 이상이 방출되는 것을 알 수 있었으며 36시간 이후부터는 서서히 방출되는 경향을 나타내었다. 방출거동의 결과로부터 초기에 많은 양의 항균제가 방출됨으로써 초기에 상처부위에 만연하고 있는 염증유발균의 생장을 억제하고 세균에 감염된 부위를 살균하여 보호할 수 있을 것으로 생각되며 그 이후부터는 서서히 방출되면서 상처부위에서의 재감염의 위험을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

세균증식억제 효과⁷

본 연구에서는 균수를 $10^5/\text{cm}^2$ 으로 하여 증식억제 효과를 조사하였다. Fig.4에 agar 상에 10^5P.a./cm^2

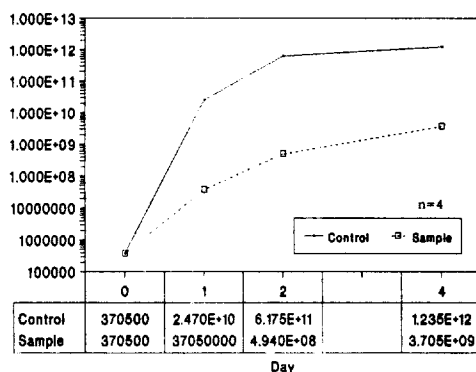


Fig. 4. Bacterial growth inhibition of artificial skin(A-12) containing antibiotic(silver sulfadiazine).

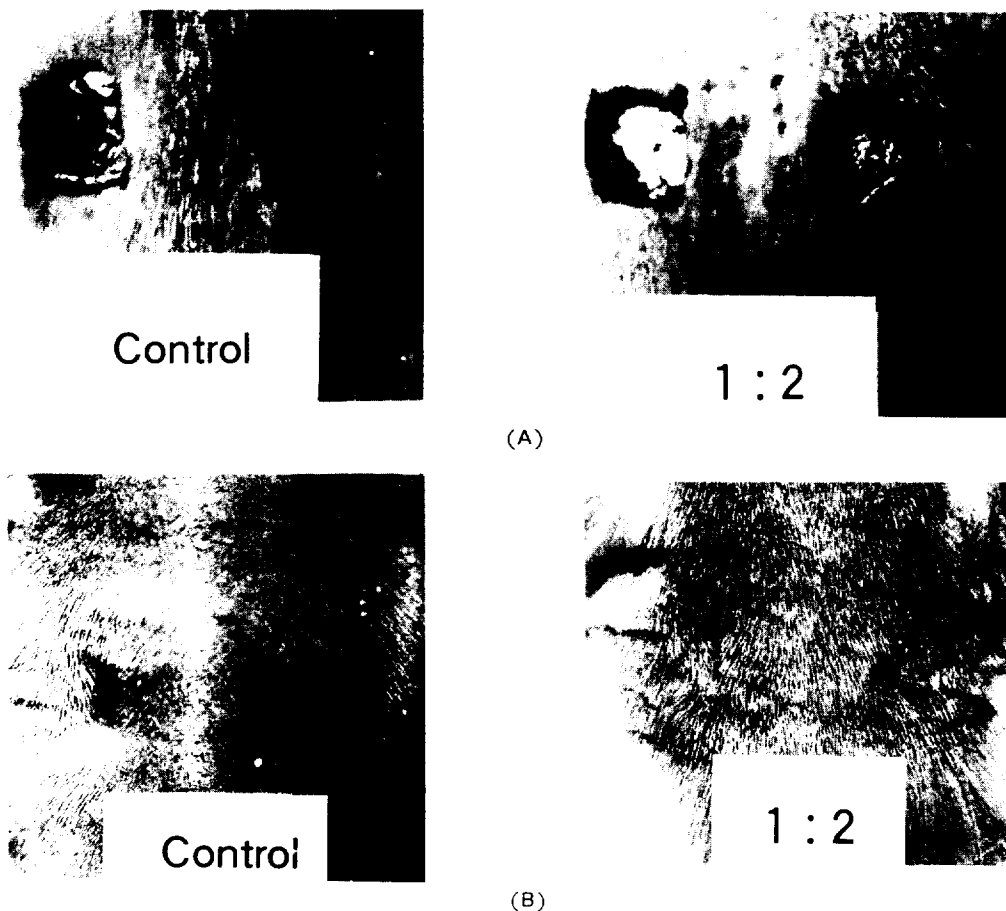


Fig. 5. Comparative pictures of wound surface appeared by open and wound covering on full-thickness skin wound : (A) after grafting operation, (B) after 20 days.

의 균을 배양시켰을 경우와 항균제를 함유한 인공피부를 균액위에 놓았을 때의 균수의 변화를 나타내었다. Agar 상에서 10^5 농도로 균을 배양하였을 경우에 48시간 경과한 후의 농도는 10^{12} 으로 증가하였다. 반면에 항균제를 함유한 인공피부를 균액위에 덮었을 경우에는 균의 농도가 10^9 정도밖에 증가하지 않았다. 따라서 항균제의 방출거동과 세균실험으로 보아 상처부위에서 세균증식억제 효과를 가질 것으로

보이며 이러한 항균효과는 첨가하는 항균제의 양으로 조절가능할 것으로 생각된다.

상처치료에 대한 조직학적 평가

쥐의 등부위의 두 곳에 피부전층상처(full-thickness skin wound)를 만들고 항균제를 함유하고 있는 다공성 인공피부를 덮은 것을 Fig. 5(a)에 나타내었다. 인공 피부는 다공성 구조때문에 초기의 높은 흡수율로 상처부위에 잘 밀착되는 것을 볼 수 있다. 20일 경과한 후의 외과용 가아제를 사용한 경우와 인공피부를 사용한 경우의 상처부위의 사진을 Fig. 5(b)에 나타내었다. 20일 경과한 후의 외과용 가아제를 사용한 경우에는 흉터가 여전히 남아있고 상처부위가 깊이 패어있는 것을 볼 수 있으나 인공피부를 사용한 경우에는 흉터는 거의 형성되지 않았고 주위의 발모상태도 양호한 것을 볼 수 있었다. Fig. 6에 20일 경과한 후의 외과용 가아제를 사용한 경우와 인공피부를 가용한 경우의 조직사진을 나타내었다. 외과용 가아제를 사용한 경우 조직학적으로 별다른 상처치료효과를 발견할 수 없었으나 인공피부를 사용한 경우에는 상피조직이 잘 형성되어 있었으며 교원섬유가 치밀하게 형성되어 정상피부와 유사한 피부조직을 관찰할 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 chitosan과 PVA를 블렌드하고 동결건조함으로써 비교적 용이한 방법으로 항균제를 함유하는 인공피부를 합성하였으며, 인공피부로서의 기본적인 물리화학적 성질을 조사하고 항균제의 방출거동과 살균효과, 동물실험으로부터의 조직학적 평가 등을 통하여 인공피부로서의 이용가능성을 검토하였다.

건조시 인장강도와 신장율은 PVA의 혼합율이 증가함에 따라 기계적 성질은 증가하는 것을 알 수 있었다. 습윤시에는 비교적 낮은 기계적 강도를 나타내었으며 이러한 강도저하는 가교도등을 조절하여 보완할 수 있으리라고 생각된다. 수분투과도는 정상피부의 10배 정도의 값을 나타내었고 흡수율은 80%



Fig. 6. Hystologic view after 20 days : (A) control, (B) artificial skin(A-12). *neoepidermal tissue, = collagen fibril.

이상의 높은 함수율을 가지고 있었다. 이로써 상처 부위에서의 과량의 체액손실과 삼출액의 고임을 방지할 수 있을 것으로 보인다. 제조한 인공피부의 구조는 동결건조법으로 윗부분은 균일막으로 되어있고 아래는 기공이 연속으로 이루어진 스폰지 구조를 형성하고 있는 인공피부를 제조할 수 있었으며 이러한 다공성 구조를 가짐으로써 상처부위에서 배출되는 삼출액을 신속히 흡수할 수 있을 것으로 기대된다. 항균제의 방출거동과 세균증식억제실험을 통해서 세균에 감염된 상처부위에서 항균효과를 가질 수 있으며 잔유항균제의 서방성으로 인하여 외부로부터 세균의 침입과 재감염을 방지할 수 있다고 생각되며 또한 이러한 항균효과는 첨가하는 항균제의 양으로 조절이 가능하리라 생각된다. 동물 실험 결과, 인공피부를 사용함으로써 상처치료가 잘 이루어졌으며 20일 경과 후의 조직검사에서 신생표피조직의 형성과 fibroblast에 의한 교원섬유의 형성등 정상피부와 유사한 피부조직을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 제조한 항균제를 함유하고 있는 다공성 인

공피부는 좋은 상처치료효과를 갖는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. H. H. Weetall, A. A. Filbert, "Method in Enzymology", Vol. 44, p. 59, Academic Press 1976.
2. C. A. Homsy, *J. Biomed. Mater. Res.*, 4, 341 (1970).
3. D. S. Min, K. Y. Kim, et al., Research Reports, Vol. 28, 1989.
4. Y. S. Chung, D. S. Min and K. Y. Kim, *Polymer (Korea)*, 12, (1988).
5. E. H. Lennete, A. Balows, W. J. Hausler Jr. and H. J. Shadomy, "Manual of Clinical Microbiology", 4th Ed., P 1095 (1985).
6. 東京大學生産技術研究所 研究問題 番號 60850152 P 25
7. M. C. Robson and J. P. Heggers, *Milit. Med.*, 134, 19 (1969).