

골절모델 쥐에서 키토산 투여가 골절치유에 미치는 영향

서정욱 · 김은주* · 한상섭

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

Received January 6, 2004 / Accepted April 15, 2004

Effects of Chitosan on Fracture Healing in Fractured Rat Model. Joung-Wook Seo, Eun-Joo Kim and Sang-Seop Han. *Korea Institute of Toxicology, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 123, Yusong, Daejeon 305-600, Republic of Korea* – Chitosan is abundant polysaccharide polymer in nature. Chitosan has been the subject of much research regarding its potential as a nutritional adjunct and pharmaceutical ingredient. In the present study, we examined fracture-healing process with chitosan administration and low calcium diet in rats. Left femur was fractured and fixed with intramedullary pin. The rats were fed normal diet or low calcium diet and administered chitosan with the doses of 0, 50, 100 and 150 mg/kg orally 5 times a week for 10 weeks. Soft X-ray and mechanical testing of all fractured femora was taken. Radiographical finding showed that the callus formation and process of fracture healing was present in all the fractured femora. Mechanical testing indicated that the maximum load and stiffness of femur in rat fed low calcium diet was lower than those of that in rat fed normal diet. No difference in maximum load and stiffness of fractured femora in chitosan treated rat were observed as compared to vehicle treated rat. Chitosan or/and low calcium diet did not affect the ratio of fractured/unfractured femur about maximum load and stiffness. The results suggest that chitosan dose not affect the bone mechanical strength and the process of fracture healing. Low calcium diet does decrease the bone mechanical strength.

Key words – Bone, Fracture, Chitosan, Bone strength, Rat

키토산(chitosan)은 자연에서 셀룰로오스(cellulose)다음으로 많이 존재하는 중합체(polymer)이다. 주로 게 껍질로부터 얻어진 키틴(chitin)을 탈아세틸화과정을 거쳐 만들어지며 (1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucosamine residue들의 사슬로 구성된 다당류이다[4]. 키토산은 소화기관에 자극이 없고 소화효소에 의해 분해되지 않아 체중조절 및 콜레스테롤을 낮추는 기능성 식품으로 많이 연구되었다[5,13,15,17]. 또한 키토산의 약리적인 비활성과 녹은 상태 일 때의 점성, 소화기관에서의 비분해성의 특성을 이용하여 약물의 부형제로 사용되어 왔다[10,16]. 또한 상처난 골조직에서 골조직의 재생을 촉진하여 치과적 소재 등으로 연구되고 있다[11,12].

골절모델은 골절이 치유될 때의 조직학적 구조나 물리적 특성의 변화를 알아보는 데 사용되며 쥐, 토끼, 개 등이 사용된다[6,9,14]. 이러한 동물모델에서는 주로 X-ray촬영에 의한 골절부위의 관찰, 물리적인 힘에 대한 저항, 형태적 변화 및 병리조직학적인 변화를 관찰한다.

본 연구에서는 칼슘의 결핍상태와 그렇지 않은 상태에서 키토산이 골절치유에 미치는 영향을 골의 형태적 및 물리적 관찰을 통해 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 키토산은 수용성키토산으로써 자광(주)으로부터 공급받아 냉장보관 하였으며 투여당일 매일 조제하여 사용하였다.

실험동물

생후 6주령의 Sprague-Dawley계의 암컷 CrjBgi:CD (SD) IGS 쥐를 바이노제노믹스(주)로부터 공급받아 7일간 적응기간을 거쳐 사용하였다. 실험동물은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 조명시간 07:00~19:00 hour/day, 환기 10~12회/h의 SPF 환경에서 사육되었다. 일반사료 급이군에는 마우스쥐용 고형사료(CRF-1; Oriental Yeast Co., Ltd, JAPAN)를 자유섭취시켰으며, 저칼슘사료 급이군에는 생쥐 및 쥐용 저칼슘사료(Low Calcium Diet TD95027, Harlan Teklad, U.S.A)를 자유섭취시켰다(Table 1). 음수는 자외선 유수멸균기(Dynamics, M600, USA)로 멸균하여 자유 급수 하였다.

본 연구에 사용된 동물은 'Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC International 인증획득, 1998)'의 기준에 따라 유지 관리하였으며, 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소의 동물관리사용위원회에 의해 검토되었다.

*Corresponding author

Tel : +82-42-610-8090, Fax : +82-42-610-8172

E-mail : ejkim@kitox.re.kr

Table 1. Vitamin D₃, phosphorus and calcium content of the experimental diets (per 100 g)

Ingredients	Normal diet ¹⁾	Low calcium diet ²⁾
Vitamin D ₃	503 IU	2200 IU
Vitamin C	14 mg	99 mg
Phosphorus	840 mg	400 mg
Calcium	1270 mg	0.56 mg

¹⁾CRF-1 rodent diet (Oriental Yeast Co. Ltd., Japan).
²⁾TD 95027 low calcium diet for rodent (Harlan Teklad, USA).

골절유발

대퇴골에 골절을 유발하는 방법은 Bonnarens의 방법을 변형하여 실시하였다[2]. 이를 간략히 기술하면, 쥐를 thio-pental sodium (50 mg/kg, ip) 마취하에 왼쪽 뒷다리 측면을 제모하고, 대퇴골의 근위부(proximal end)의 피부를 절개하여 대퇴골두(great trochanter)와 목 사이에 구멍을 만들고, 구멍을 통하여 골수내로 18G의 주사바늘을 삽입하였다. 무릎관절 윗부분의 피부를 절개하고 허벅다리의 straight muscle과 대퇴골의 lateral great muscle 사이를 벌려 대퇴골을 노출시킨 후, 골간(diaphysis)의 뼈를 hand drill cutter(Model; 395, DREMEL, RACINE, WI, USA)로 완전히 절단하였다. 이때 생리식염수를 부어 열을 차단함으로써 세포의 파괴를 막았다. 주사바늘을 대퇴골의 원위부(distal end)까지 밀어 넣는데, 바늘의 끝이 피질하 trabecular bone 부분까지 닿게 하여, 골절 부위의 뼈가 틈새 없이 연결되도록 하였다. 대퇴골 근위부(proximal end) 삽입부의 주사바늘 위쪽을 잘라내고 절개된 근육과 피부는 봉합하였다.

실험군

실험동물은 일반사료(normal diet) 급이군과 저칼슘사료(low calcium diet) 급이군으로 구분하였다. 일반사료 급이군에는 증류수(부형제), 수용성키토산 50, 100 및 150 mg/kg투여군을 두었고, 저칼슘사료 급이군에는 증류수(부형제), 수용성키토산 150 mg/kg투여군을 두었으며 각 군당 8마리씩 사용하였다. 투여는 10주간, 5일/주, 1일 1회 경구투여 하였다. 마지막투여 후 다음날에 동물을 ether흡입마취로 안락사 시킨 후 좌측대퇴골을 적출한 후 골질의 치유를 위해 삽입하였던 주사침을 빼내고 대퇴골을 X-ray 촬영 및 골강도 측정에 사용하였다. 우측대퇴골도 적출하여 골강도 측정에 사용하였다.

대퇴골의 X-ray 촬영 및 판독

적출한 좌측 및 우측 대퇴골은 soft X-ray 장치(MOBIX-1000, LISTEM KOREA, 3 mAsec, 40 kV, 100 cm)로 촬영하여 필름을 분석하였다. 분석은 골절부위의 가골(callus)의 형성, 골화정도, 골절선의 유무 등을 Table 2에 나타낸 평가기준으로 하여 4단계(0-3)로 평가하였다.

Table 2. The Criteria of evaluation for parameters of radiographical finding using X-ray films of fractured femur

Grade	Evaluation	
	Callus formation	Healing activation
0	No callus	The cutting surface is clear.
1	Unilaterally and thinner than cortical bone	Unilaterally obscure or foamy
2	Bilaterally and thinner than cortical bone	Bilaterally obscure or foamy
3	Bilaterally and thicker than cortical bone	Marked activation

Grade	Evaluation	
	Mineralization	Continuity
0	No mineralization	No mineralization and continuity
1	Lower density than that of cortical bone	A weak unilateral mineralization and continuity
2	Almost equal density to that of cortical bone	Unilateral continuity
3	More density than to that of cortical bone	Bilateral continuity

골강도측정

좌측 및 우측대퇴골은 골강도측정기(Bone strength tester, Model; EJ-02R, IWO Scientific Corporation, Korea)의 20 mm 간격의 양측 지지대에 대퇴골을 올려놓고 가운데에 bar로 아래방향으로 5 mm/min 속도로 눌러가면서 대퇴골이 부러질 때까지의 최대하중(maximum load)과 골강도(stiffness)를 측정하였다.

통계

얻어진 자료에 대한 통계분석은 다중비교검정법을 실시하였다. 검사항목 중 최대하중과 강도의 경우 평균치에 대하여는 Battlett 검정으로 homogeneity를 검사하여 균질성이 있는 경우에 부형제대조군과 투여군간에 차이가 있는지를 검사하기 위하여 다중비교법인 Dunnett's t-test를 실시하였다. Battlett 검정 결과 균질성이 인정되지 않으면 순위화한 데이터를 이용한 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis's H test를 실시하고, p<0.05인 경우 Dunnett's test를 이용하여 군간의 유의차를 조사하였다. 이러한 분석은 통계프로그램인 Graph-

Pad InStat (version 3.05, GraphPad Software Inc.)를 이용하여 실시하였다. 검정의 위험율은 5% 및 1%로 정하였다.

실험결과

대퇴골의 X-ray 필름 판독

골절을 유발한 모든 동물에서 가골(callus)이 형성되었으며 가골부위와 골절부위의 골화(mineralization)도 관찰되었다(Fig. 1, Table 3). 일반사료를 급이하고 부형제 또는 키토산을 투여한 군 간에는 골절부위의 가골형성, 골화정도, 골절의 치유에 있어서 통계적 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 저칼슘사료를 급이하고 부형제 또는 키토산을 투여한 군간에도 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. 가골의 골화정도가 저칼슘사료를 급이한 군들이 낮은 경향을 나타내었다.

골강도

일반사료를 급이한 군들에서 골절을 유발하지 않은 오른쪽 대퇴골의 최대하중은 88.51~101.92 N이었고 골강도는 123.15~153.32 N/mm이었는데 비해 저칼슘사료를 급이한 군들에서의 최대하중은 49.46~59.22 N이었고 골강도는 69.63~91.99 N/mm으로 낮게 나타났으며, 일반사료를 급이하고

부형제를 투여한 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나타내었다(Table 4). 골절을 유발한 왼쪽 대퇴골에서도 일반사료를 급이하고 부형제를 투여한 군에 비하여 저칼슘사료를 급이한 군들에서 최대하중과 강도가 유의성 있게 감소하였다. 골절을 유발한 좌측대퇴골의 최대하중 및 강도에서 일반사료 또는 저칼슘사료를 급이하고 키토산을 투여한 군들과 부형제를 투여한 대조군과의 통계적 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한 골절을 유발하지 않은 우측대퇴골에서도 부형제 대조군과 키토산투여군 간의 통계적 유의한 차이를 나타내지 않았다. 최대하중과 강도를 골절을 유발하지 않은 오른쪽 대퇴골과 골절을 유발한 왼쪽 대퇴골의 비율로 나타내 계산하였을 때 모든 군간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

고찰 및 결론

일반적으로 쥐의 정상적 성장과 뼈의 충분한 골화에 필요한 사료의 칼슘과 인의 함량은 0.6%와 0.4%로 알려져 있으며, 칼슘과 인의 비율은 2.0~1.2 : 1.0의 비율이 적당한 것으로 알려져 있다[1]. 또한 소장에서의 칼슘과 인의 흡수, 혈중 농도 유지 및 신장에서의 칼슘과 인의 재흡수를 조절하는 vitamin D는 사료에 100 IU/100 g이 필요하다[1]. 본 연구에

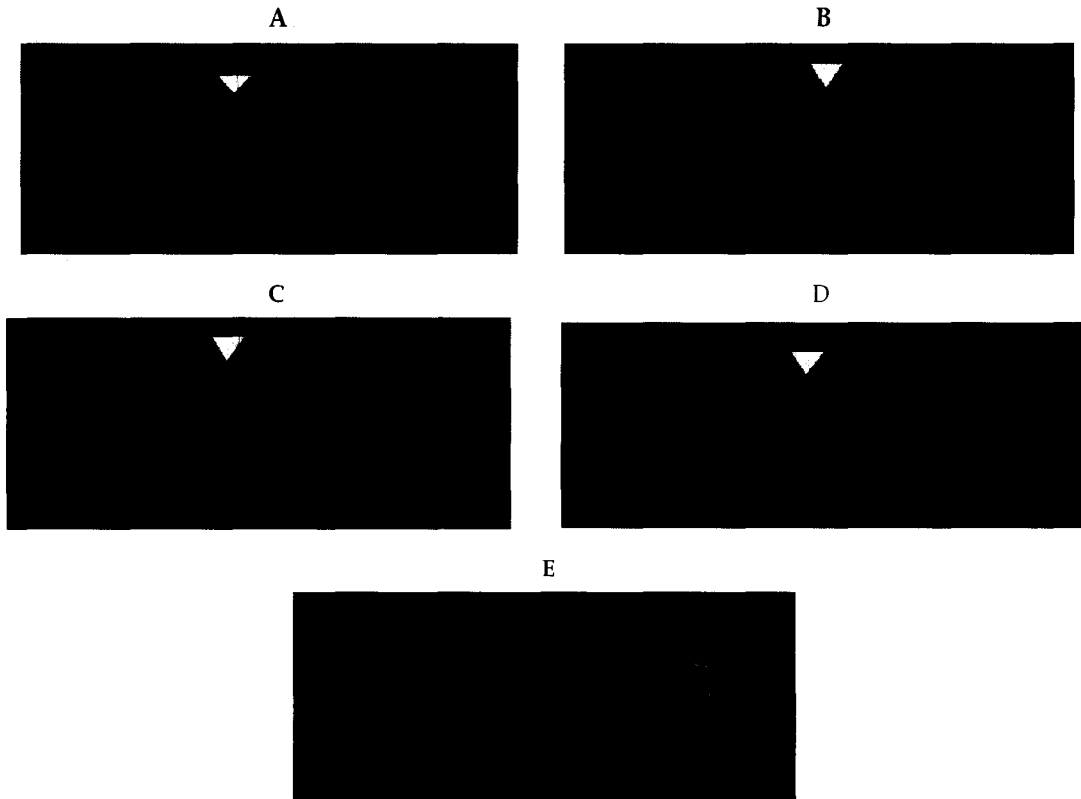


Fig. 1. The representative radiography of fractured left and unfractured right femur on 10 weeks after operation. A; Normal diet control, B; Low calcium diet control, C; Chitosan 150 mg/kg with normal diet, D; Chitosan 150 mg/kg with low calcium diet, E; Normal diet control of unfractured right femur. The representative autoradiograms are shown. All femora were radiographed with a soft X-ray system after dissection of soft tissue. White triangle indicated the fractured site.

Table 3. Soft X-ray findings of fractured-healing left femur in rats

Group	Diet	Callus site											
		Callus formation				Mineralization				Continuity			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Vehicle	Normal	0	2	3	3	0	1	3	4	0	1	2	5
Chitosan 50 mg/kg	Normal	0	4	2	2	0	2	4	2	0	0	3	5
100 mg/kg	Normal	0	3	2	3	0	2	4	2	0	0	5	3
150 mg/kg	Normal	0	3	3	2	0	3	4	1	0	0	3	5
Vehicle	Low calcium	0	5	3	0	2	4	2	0	0	1	4	3
Chitosan 150 mg/kg	Low calcium	1	3	0	4	0	4	2	2	0	1	2	5

Group	Diet	Fracture site											
		Healing activation				Mineralization				Continuity			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Vehicle	Normal	0	3	3	2	0	2	2	4	0	2	1	5
Chitosan 50 mg/kg	Normal	0	1	1	6	0	3	3	2	0	3	1	4
100 mg/kg	Normal	0	0	5	3	0	2	3	3	0	0	3	5
150 mg/kg	Normal	0	1	3	4	0	3	4	1	0	1	2	5
Vehicle	Low calcium	1	0	2	5	2	4	2	0	1	0	2	5
Chitosan 150 mg/kg	Low calcium	0	3	1	4	0	2	2	4	0	4	0	4

Each left femur was evaluated according to the criteria of evaluation (Table 2.) using soft X-ray film. n=8.

Table 4. Effects of chitosan on bone mechanical strength (three-point bending test) of untreated right femur and fractured left femur in rats

Right femur (Unfractured)

Group and Dose (mg/kg)		Diet	Maximum load (N)	Stiffness (N/mm)
Vehicle	0	Normal	99.03 ± 21.26 ¹⁾	153.32 ± 43.13
Chitosan	50	Normal	88.51 ± 13.31	123.15 ± 26.81
	100	Normal	90.79 ± 13.91	123.54 ± 24.00
	150	Normal	101.92 ± 24.40	133.99 ± 46.67
Vehicle	0	Low calcium	49.46 ± 11.77 ^{**2)}	69.63 ± 11.62 ^{**}
Chitosan	150	Low calcium	59.22 ± 13.22 ^{**}	91.99 ± 28.05 ^{**}

Left femur (Fractured and healing)

Group and Dose (mg/kg)		Diet	Maximum load (N)	Stiffness (N/mm)
Vehicle	0	Normal	84.62 ± 27.14	168.50 ± 62.98
Chitosan	50	Normal	61.51 ± 14.39	100.24 ± 12.29
	100	Normal	68.57 ± 16.90	121.63 ± 26.31
	150	Normal	78.22 ± 26.00	119.08 ± 25.80
Vehicle	0	Low calcium	47.36 ± 14.78 ^{**}	63.63 ± 30.01 ^{**}
Chitosan	150	Low calcium	49.49 ± 26.41 [*]	60.49 ± 48.71 ^{**}

Ratio of Left/Right (Fractured/unfractured femur)

Group and Dose (mg/kg)		Diet	Maximum load (%)	Stiffness (%)
Vehicle	0	Normal	87.04 ± 24.12	111.25 ± 31.92
Chitosan	50	Normal	70.43 ± 18.07	86.03 ± 27.68
	100	Normal	76.60 ± 20.18	103.30 ± 38.24
	150	Normal	76.10 ± 16.16	97.52 ± 40.35
Vehicle	0	Low calcium	98.09 ± 31.29	90.29 ± 42.34
Chitosan	150	Low calcium	81.23 ± 27.22	65.78 ± 35.49

¹⁾Data were expressed as the mean ± SD.

²⁾Significantly difference from normal diet vehicle group at p<0.05(*) and p<0.01(**). n=8.

사용된 일반사료는 칼슘과 인이 1.2%와 0.8%이고 비율은 1.5 : 1이며 vitamin D도 충분한 량이다. 반면 저칼슘사료는 인이 0.4%이고 vitamin D도 충분한 량이지만 칼슘은 미미한 량으로 칼슘이 결핍인으로 작용할 것이다.

골절을 유발하지 않은 우측 대퇴골의 골강도 및 최대하중은 저칼슘사료 급이군들에서 일반사료급이군의 부형제투여군 보다 저하된 것은 칼슘결핍으로 골절되어 치유된 좌측 대퇴골뿐만 아니라 정상적인 우측 대퇴골도 골의 물리적 힘에 대한 저항이 약화되었음을 의미한다.

가골은 골절부위를 보강하기 위해 형성되며 치료의 진행에 따라 골화가 진행된 후 점점 작아지고 얇아져 완쾌되면 사라지는 변화를 나타낸다[7,8,19]. X-ray 필름 판독에서 가골의 골화정도는 저칼슘사료 급이군에서 낮은 경향을 나타냈는데 이는 칼슘결핍의 영향으로 사료된다. 가골의 형성과 가골 및 골절 부위의 결합은 골절치유 과정에 대한 중요한 판정기준이 된다. 또한 골절부위의 절단면에서는 치료가 활성화 되면 파골세포가 활성화되고 이어 골아세포의 활성화가 일어나며 이러한 현상은 X-ray 필름상에 절단면이 불분명해지거나 발포된 형상으로 나타난다[7,8,19]. 본 연구에서는 저칼슘사료 급이나 키토산 투여에 의해 이러한 가골형성, 결합 및 치료활성화에는 영향이 없는 것으로 사료된다.

키토산은 홍화자씨 추출물과 함께 처리하였을 때에 치주인대세포의 증식과 이에 의한 석회화 결정형성을 촉진 시키며, 키토산 유도체는 토끼와 양을 사용한 동물실험에서 골형성 촉진작용을 나타낸다[3,11,12]. 한편 키토산은 쥐에 단독으로 장기간 투여되었을 때에 신장에서의 칼슘 배설이 증가되고 대퇴골의 골밀도와 골강도를 감소시키지만 vitamin C와 함께 투여되었을 때에는 그렇지 않았다[18]. 본 연구에서 일반사료 급이군들에서 키토산을 50, 100, 150 mg/kg 투여한 군들의 좌측 및 우측 대퇴골의 최대하중 및 강도는 부형제대조군과 통계적 유의한 차이는 없었지만 부형제대조군 보다는 낮은 최대하중 및 강도를 나타내었는데, 이는 일반사료에 함유된 vitamin C가 키토산에 의한 신장에서의 칼슘 배설 증가를 억제하기에는 부족했었을 가능성이 있다. 이 같은 가능성은 사료중 vitamin C함량이 일반사료보다 약 6배 많은 저칼슘사료를 급이한 군들에서 키토산을 150 mg/kg 투여한 군들의 좌측 및 우측 대퇴골의 최대하중이 부형제대조군과 통계적 유의한 차이는 없었으나 부형제대조군 보다 높은 수준인 것에서도 나타난다.

최대하중과 강도에 대한 좌우측대퇴골의 비율은 골절치유하지 않은 정상 대퇴골에 비해 골절치유하고 치유된 대퇴골의 물리적 특성이 어느 정도 인지를 수치적으로 나타내며 물리적 측면에서 골절의 치유정도를 알아볼 수 있는 수치라 할 수 있다. 본 연구에서 저칼슘사료 급이군들과 일반사료 급이군들에서 최대하중 및 강도의 좌우 대퇴골의 비율간에는 유의한 차이가 없었으므로 저칼슘사료 급이에 따른 골절치유에 대한 영향은 없는 것으로 여겨진다. 또한 부형제투여군과

키토산투여군간에도 통계적 유의한 차이가 없으므로 키토산 투여가 골절치유에는 아무런 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

이같은 결과로 볼 때 저칼슘사료 급이는 대퇴골의 최대하중과 강도를 저하시키며 골절부위의 가골의 골화에 영향을 주는 것으로 여겨진다. 키토산 투여는 대퇴골의 최대하중 및 강도 및 골절치유에 영향이 없는 것으로 사료된다.

요 약

키토산은 자연에 풍부하게 존재하는 다당의 중합체로 식품이나 약제의 성분으로 활용성이 있어 많은 연구가 이루어져 왔다. 본 연구에서는 키토산 투여와 저칼슘사료 급이가 랫드에서 골절의 치유과정에 미치는 영향을 실험하였다. 좌측 대퇴골을 골절시킨 후 편을 골내에 삽입하여 고정하였다. 이후 랫드에 일반사료 또는 저칼슘사료를 급이하고 키토산을 0, 50, 100, 150 mg/kg 용량으로 10주간 주 5회 경구투여하였다. 실험종료 시에 골절시킨 대퇴골의 X-ray 촬영과 물리적 측정을 실시 하였다. X-ray 필름 관찰에서는 골절을 유발한 모든 대퇴골에서 골절치유의 과정과 가골이 형성되었다. 물리적인 골강도 측정에서는 저칼슘사료를 급이한 랫드에서 일반사료를 급이한 랫드에 비해 최대하중과 강도의 감소를 나타내었다. 키토산을 투여한 랫드와 부형제를 투여한 랫드에서의 대퇴골의 최대하중과 강도의 차이는 없었다. 또한 키토산 투여 및 저칼슘사료 급이는 최대하중과 강도에 대한 골절유발 대퇴골/비유발 대퇴골의 비율에는 영향을 미치지 않았다. 이 같은 결과로 보아 키토산은 골절의 치유과정과 뼈의 물리적 강도에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 또한 저칼슘사료 급이는 뼈의 물리적 강도를 감소시키는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Baker, H.J., Lindsey, J.R. and Weisbroth, S.H. 1979. *The laboratory rat*. pp.134-167, 1st eds., Academic Press, New York.
2. Bonnarens, F. and Einhorn, T.A. 1984. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J. Orthop. Res.* 2, 97-101.
3. Choung, S.Y., Park, J.B., Park, K.K., Kwon, Y.H. and Kim, S.J. 2001. Therapeutic effects of safflower seed extract and chitosan on hard tissue regeneration. *J. Appl. Pharmacol.* 9, 244-248.
4. Felt, O., Buri, P. and Gurny, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. 1998. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24, 979-993.
5. Fukada, Y., Kimura, K. and Ayaki, Y. 1991. Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats. *Lipids* 26, 395-399.

6. Lenehan, T.M., Balligand, M., Nunamaker, D.M. and Wood, F.E.Jr. 1985. Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J. Orthop. Res.* **3**, 499-507.
7. Li, C., Mori, S., Li, J., Kaji, Y., Akiyama, T., Kawanishi, J. and Norimatsu, H.J. 2001. Long-term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 429-436.
8. Li, J., Mori, S., Kaji, Y., Mashiba, T., Kawanishi, J. and Norimatsu, H. 1999. Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 969-979.
9. McKibbin, B. 1978. The biology of fracture healing in long bones. *J. Bone Joint Surg.* **60B**, 150-162.
10. Munjeri, O., Collett, J.H. and Fell, J.T. 1997. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release. *J. Controlled Release* **46**, 273-278.
11. Muzzarelli, R.A.A., Ramos, V., Stanic, V., Dubini, B., Mattioli-Belmonte, M., Tosi, G. and Giardino, R. 1998. Osteogenesis promoted by calcium phosphate N,N-diarb-oxyethyl chitosan. *Carbohydr. Polym.* **36**, 267-276.
12. Muzzarelli, R.A.A., Zucchini, C., Ilari, P., Pugnali, A., Mattioli-Belmonte, M., Biagini, G. and Castaldini, C. 1993. Osteoconductive properties of methylpyrrolidinone chit-osan in an animal model. *Biomaterials* **14**, 925-929.
13. Ormord, D.J., Holmes, C.C. and Miller, T.E. 1998. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of athero-sclerosis. *Atherosclerosis* **138**, 329-334.
14. Park, S.H. and Silva, M. Effect of intermittent pneumatic soft-tissue compression on fracture-healing in an animal model. 2003. *J. Bone Joint Surg. Am.* **85A**, 1146-1153.
15. Sugano, M., Watanabe, S., Kishi, A., Izume, M. and Oh-takara, A. 1988. Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. *Lipids* **23**, 187-191.
16. Thanou, M., Verhoef, J.C. and Junginger, H.E. 2001. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its deri-vatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* **52**, 117-126.
17. Wuolijoki, E., Hirvela, T. and Ylitalo, P. 1999. Decrease in serum LDL cholesterol with microcrystalline chitosan. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* **21**, 357-361.
18. Yang, C.Y., Oh, T.W., Nakajima, D., Maeda, A., Nka, T., Kim, C.S., Igawa, S. and Ohta, F. 2002. Effects of habitual chitosan intake on bone mass, bone-related metabo-lic markers and duodenum CaBP D9K mRNA in ovari-ectomized SHRSF rats. *J. Nuri. Sci. Vitaminol.* **48**, 371-378.
19. Yoshiaki, A., Masaya, I., Yoshifumi, H., Hideko, T., Tomohiro, O. and Seiya, J. 2001. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 671-680.