

가토 탈회 동종골편 이식시 조직반응에 관한 연구

원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

전영환 · 김영조 · 민승기 · 엄인웅 · 이동근

HISTOLOGICAL TISSUE RESPONSES OF DEMINERALIZED ALLOGENEIC BONE BLOCK GRAFT IN RABBITS

Young-Hwan Jun, Young-Jo Kim, Seung-Ki Min,
In-Woong, Um, Dong-Keun Lee

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Wonkwang University

To repair bony defects with transplanted bone in the body, fresh autogenous bone is undoubtedly, the most effective bone graft for clinical applications. But the demineralized bone has the matrix-induced bone formation which was suggested by Urist in 1965. Many authors assisted that demineralized bone powder induces phenotypic conversion of mesenchymal cells into osteoblasts, with high-density bone formation. The process of inducing differentiated cells becomes osteogenic properties.

The purpose of this study was to evaluate the osteoinductive capacity of allogenic freeze-dried demineralized bone block (FDD, 7×7mm) and to compare FDD with the same size of deep-frozen allogenic bone (DF), fresh autogenous bone (A) after implantation.

The histological and ultrastructural features of tissue responses were examined after 1, 2, 4, 6, 8 weeks implantation of each experimental groups in the operative site of the New Zealand white rabbits.

The results were as follows :

- 1. Inflammatory cell infiltration generally has appeared at 1 week, but reduced at 4 weeks in each group, but most severe in DF group.*
- 2. Osteoblastic activity has increased for 4 weeks, but decreased at 6 weeks in each group and there was no significant difference among experimental groups.*
- 3. New bone formation has begun at 1 week, least activations in A groups, and showed the reversal line of bone formation among each group at 6 to 8 weeks.*
- 4. Bone resorption has appeared at 1 week, but disappeared at 4 weeks in both A and DF groups, but more severe in DF than A groups.*
- 5. In ultrastructural changes, the DF group have showed the most remarkable osteoclastic activities among experimental groups.*
- 6. Osteoid or tangled collagen fibrils near the implanted sites were replaced by more mature, lamellated bony trabeculae during bone remodeling. There was little difference among each experimental groups.*
- 7. During the conversion osteoblasts to osteocytes which embedded within the bone matrix, there was organ-less-poor cytoplasm, increased nuclear chromatin, abundant rough endothelial reticulum (RER) in each groups.*

From the above the findings, the DF group showed more bone resorption and foreign body reaction than FDD and A groups, and FDD group showed more new bone formation or osteoblastic activity than DF and A groups in early stage. There was no significant difference of cellular activities among the FDD, DF, and A groups according to the time.

Keywords : FDD : Freeze-dried demineralized bone, DF : Deep-frozen allogeneic bone,
A : Fresh autogenous bone.

I. 서 론

구강 안악면 영역에서 골 이식은 자가이식, 동종 이식, 혹은 대체골을 이용한 이물질 이식 등의 방법으로 골 결손이나 재건에 사용되고 있다¹⁻³⁾. 순수 자가골 이식은 일반적으로 면역학적 수용, 혈관의 신생, 숙주와의 친화력, 정상 골 조직을 형성하려는 재생의 관점에서 다른 이식 방법보다 우수하여 오래 전부터 임상에서 가장 흔히 이용되어 왔다. 그러나 자가골 이식은 신체 타부위의 부가적인 수술로 다른 정상조직을 희생시켜야 하고 이로 인한 감염 가능성의 증가, 장시간의 수술로 실혈량의 증가 및 마취시간 연장, 수술 후 두근데의 동통이 따르는 단점들과 골 이식에 필요한 이식골의 형태와 충분한 이식골의 확보에 관련된 수술상의 제약 때문에 임상적 응용이 제한되고 있다^{4,5)}. 이러한 신선 자가골 이식의 단점을 보완하기 위한 적절한 대응으로 단순 냉동골, 냉동 건조골, 비탈회골, 완전 또는 불완전 탈회골, 자가 용해성 항원성 추출골 등과 같이 여러 방법으로 보존 처리된 동종 또는 이종골 이식술이 시행되고 있다. 그러나 이러한 이식골들은 인체에 사용시 조직 적합성(Histocompatibility) 등과 관련된 이식체의 이물 반응 및 이식 면역반응과 골 재생에 영향을 끼치는 혈관 재형성 능력, 이식 수술 후 이차 감염의 요소인 완전한 소독방법 등 많은 문제점의 규명이 미흡하여, 아직까지는 단순 조직학적 치유과정에 근거하여 임상적용을 실시하고 있는 실정이다¹⁻⁷⁾.

동종골 이식에 대한 연구는 1867년 Ollier가 골의 보존에 대한 개념을 처음 기술한 이래로 1942년 Inc-lan⁸⁾과 1951년 Wilson⁹⁾이 저장된 골의 선택적 사용과 임상적 유의성에 관하여 보고하였고, 실험적으로는 1950년 미해군 조직은행에 대한 본격적인 관심을

가지기 시작하였다.

동종골의 보존과 처리 방법중 냉동 건조법은 단순 냉동법에 비하여 단백질 변성을 최소화 시키고 장기간 물리적 성질을 일정하게 유지하며, 숙주 조직에 친화력이 좋고, 실온에서 장기간 보존할 수 있고, 이식 수술시 다루기 편리한 장점이 있다. 또한 단순 냉동골은 항원성이 감소 또는 제거되며 신생골을 형성하는 능력을 지속적으로 유지하는 것으로 알려져 있다. 그러나 가장 적합한 냉동 온도 및 냉동 조건에 관하여는 아직 논란의 여지가 많다고 하겠다⁷⁾.

1889년 Senn¹¹⁾이 탈회한 골 이식을 처음으로 소개한 이래 단순 탈회골과 냉동건조 탈회골의 많은 연구가 있어 왔으나 그 성공도와 임상적 유용성에 대한 논란이 계속되어 왔다^{1-3,6)}. Urist¹²⁾는 탈회된 동종골이 강한 골 유도 능력을 가진다고 하였으며 조직내에서 신생골 형성을 촉진한다고 하였고, 이러한 탈회 과정에서는 골형성 단백질(Bone Morphogenetic Protein)이 제거되지 않고 계속 유지되는 것으로 알려져 있으며, 비탈회골은 골 형성 단백질을 함유하고는 있으나 골내의 무기질이 골 형성 단백질의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다. 즉 탈회 과정은 숙주에 대한 골 형성 유도 물질의 작용을 쉽게 하는 것으로 알려져 있다.

이에 저자는 가토의 두개골 피질골을 이용, 자가골 이식골을 대조군으로 하고 단순 자가 냉동군, 동종 냉동 건조 탈회군을 실험군으로 사용하여 가토 두개골에 이식, 각 실험군의 골 전도 및 유도능력을 관찰하여 동종 냉동 건조 탈회골편의 조직학적 치유과정을 살펴보고 또한 이것과 자가골 이식군 및 단순 자가 냉동군과 비교 관찰하여 실제 임상에 도움을 주고자 함을 본 실험의 목적으로 하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 실험을 위하여 생후 3개월된 체중 2.5kg내외의 New Zealand white rabbit 15마리를 사용하였으며, 동일 조건을 유지하기 위하여 사판되는 고품사료로 일정기간 사육하였다. 실험 동물을 신선 자가골 이식군(실험 1군: 대조군), 단순 냉동 보관군(실험 2군), 냉동 건조 탈회군(실험 3군)으로 5마리씩 세 군으로 구분하였다.

2. 연구방법

1) 이식체의 준비

실험 1군을 제외한 10마리의 가토를 전두골 중앙에 약 3cm 크기의 절개를 가한후 피부 박리하여 전두골을 노출시키고 치과용 round bur를 이용하여 두개 봉합선 중심부에서 약 5mm이상 떨어진 부위에서 양측에 약 7×7mm의 골을 너막이 손상되지 않도록 주의하면서 각각 채취하였다.

(1) 단순 냉동골(실험 2군: 단순 냉동 보관군)

10마리의 가토 두개 봉합선 좌측에서 채취한 7×7mm길이의 전두골 골편을 골막, 근육 등의 연조직 및 혈액을 제거한후 흐르는 증류수에 세척하고 -70℃에서 48시간 이상 보관하였다.

(2) 냉동 건조 탈회골(실험 3군: 냉동 건조 탈회군)

10마리의 가토 두개 봉합선 우측에서 채취한 7×7mm길이의 전두골을 24시간 냉동 건조후 0.5N 염산에서 90분간씩 2회에 걸쳐 탈회하였다. 탈회한 부유액을 버린후 인산염 완충용액(phosphate buffered saline 0.14mol/ml)으로 pH를 6.9로 조정하고 다시 24시간 동안 냉동 건조하였다. 실험전 냉동 건조 완료된 골은 밀봉하여 ethylene oxide가스 소독을 실시하여 보관하였다.

2) 실험 방법

용성 가토를 케타라(Ketamine HCl: 유한양행)로 kg당 5mg으로 근육 주사를 이용하여 전신 마취시켰으며, 수술 부위에 제모 및 소독을 실시하고 지혈을 위하여 2% lidocaine HCl(1: 100,000 epinephrine)을 주사하였다. 전두골 중앙에 수직선으로 약 3cm의 절개를 가한후 박리하여 전두골을 노출시키고 두개

봉합선 양측에서 채취한 7×7mm 길이의 전두골을 골막, 근육 등의 연조직 및 혈액을 제거한후 흐르는 증류수에 세척하고 좌측과 우측의 골편을 서로 맞추어 자가 이식한후 즉시 봉합하였다(실험 1군: 대조군). 단순 냉동 보관군(실험 2군)과 냉동건조 탈회군(실험 3군)은 이미 이식체 준비시 이용한 10마리의 토끼를 5마리씩 나누어 형성된 골 결손 부위에 다른 토끼의 단순 냉동골과 냉동 건조 탈회골편을 이식한후 봉합하였다.

3) 현미경적 관찰

(1) 광학 현미경적 관찰

실험 가토를 이식후 1, 2, 4, 6, 8주에 Diethyl ether 치사량을 흡입, 희생시키고 이식된 골조직을 포함하여 10×10mm 크기의 골편을 떼어내 10% 포르말린에 고정한 후, 통법에 따른 파라핀 포매를 하여 4-5μm 두께의 절편을 만들고 헤마톡실린-에오신(H & E) 염색과 Masson trichrome(MT) 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

(2) 전자 현미경적 관찰

이식후 각 1, 2, 4, 6, 8주에 Ketamine HCl(5 mg/kg)로 전신마취후, 좌, 우측 경동맥에 18게이지 Medicut을 삽입하고, 생리 식염수로 두경부의 혈액을 씻어낸 다음, 25% 글루타르 알데하이드 용액(0.1 M Cacodylic acid buffer, pH 7.2)으로 4시간 동안 관류 고정하였다. 관류 고정을 육안으로 확인한후 통법에 따라 이식 부위를 포함하여 10mm×10mm 크기의 골편을 채취하여 글루타르 알데하이드 용액에 후 고정한 다음 Epon 812에 포매하였다. 포매된 조직은 초박절편기에서 1μm의 두께로 초박 절편을 만들어 Uranylacetate와 Lead citrate로 염색한 다음 JEOL 120 투과 전자 현미경으로 관찰하였다.

III. 연구성적

1. 광학 현미경적 관찰

1) 염증세포 침윤(Table 1, Fig. 1)

신선 자가골 이식군(실험 1군: 대조군) 1주에서는 이식골편 주위에 중등도의 만성 염증세포 침윤 및 출혈 소견이 관찰되었으나(사진부도. 1), 2주에는 1주에 비하여 염증세포 침윤이 현저히 감소되었으며 4주 이후에는 완전히 사라졌다(사진부도. 2). 단순

냉동 보관군(실험 2군) 1주에서는 임파구와 조직구 등의 심한 만성 염증세포 침윤이 비활성의 이식골 주위에 신선 자가골 이식군보다 많이 나타나고 2주에서는 경도의 염증세포 침윤을 보였으나, 대조군보다 많이 나타났고 4주 이후에는 대조군과 마찬가지로 염증조건이 사라졌다. 냉동 건조 탈회군(실험 3군)에서는 1주에 대조군과 유사한 정도로 염증세포 침윤이 관찰되었고(사진부도, 7), 2주에서는 미약한 염증반응이 나타났으며 4주 이후에는 대조군과 마찬가지로 염증이 사라졌다.

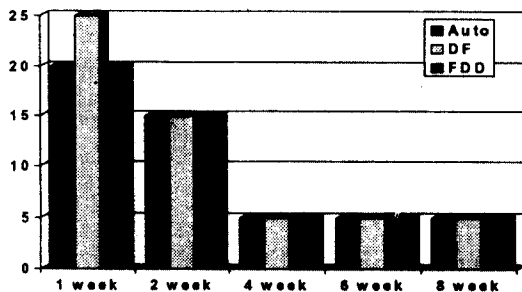
모든 실험군에서 대식세포 및 임파구 등의 염증반응이 1주에 관찰되어 4주경에 소실되는데 동종골 단순 냉동 보관군(실험 2군) 1주에서 가장 심한 염증세포 침윤을 보였다.

Table 1. Inflammatory Cell Infiltration According to Graft Types and Duration

	A	DF	FDD
1 Week	++	+++	++
2 Weeks	+	+	+
4 Weeks	-	-	-
6 Weeks	-	-	-
8 Weeks	-	-	-

(A : Autogenous groups, DF : Allogenic deep-frozen groups, FDD : Allogenic freeze-dried demineralized groups

- : No evidence, ± : Trace, + : Mild, ++ : Moderate, +++ : Severe)



5; No evidence, 10; Trace, 15; Mild, 20; Moderate, 25; Severe
Auto; Fresh autograft, DF; Deep frozen, FDD; Freeze-dried demineralized

Fig. 1. Inflammatory cell infiltration

2) 골 아세포의 활성화(Table 2, Fig. 2)

신선 자가골 이식군의 1주에는 이식골편 주위에 중등도의 섬유 아세포 및 조골세포의 유입성장이 보이며 4주에서는 가장 많은 조골세포 활성이 활발한 결체조직이 분포되었으며 6주부터는 조골세포 활성이 감소되기 시작하여 8주에는 경도로 나타났다(사진부도, 2).

단순 냉동 보관군 1주에는 대조군보다 적은 조골세포 활성이 관찰되어 2주와 4주에는 1주 보다 증가된 중등도의 활성화를 보이기 시작한 골 아세포들이 형성되었으나 6주에서 부터 대조군보다 이식골내의 골 아세포 활성이 감소되기 시작하여 8주에는 대조군보다 적은 경도의 활성을 보였다.

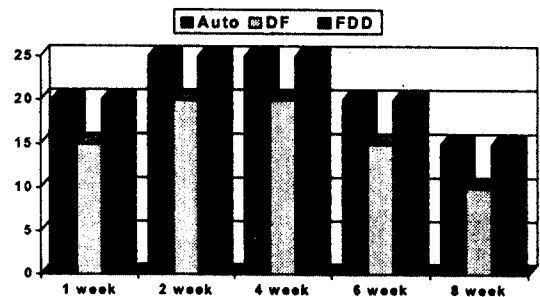
냉동 건조 탈회군 1주에도 이식골의 변연부에서

Table 2. Osteoblastic Activity According to Graft Types and Duration

	A	DF	FDD
1 Week	++	+	++
2 Weeks	+++	++	+++
4 Weeks	+++	++	+++
6 Weeks	++	+	++
8 Weeks	+	±	+

(A : Autogenous groups, DF : Allogenic deep-frozen groups, FDD : Allogenic freeze-dried demineralized groups

- : No evidence, ± : Trace, + : Mild, ++ : Moderate, +++ : Severe)



5; No evidence, 10; Trace, 15; Mild, 20; Moderate, 25; Severe
Auto; Fresh autograft, DF; Deep frozen, FDD; Freeze-dried demineralized

Fig. 2. Osteoblastic activity

대조군과 유사하게 골아세포 활성이 중등도로 나타났고 2주와 4주에는 조골세포 활성이 두드러졌으나 6주에는 골변연부를 따라 세포 활성도가 감소되기 시작하여 대조군과 유사한 정도로 나타났다(사진부도. 7, 8).

3) 신생골 형성량(Table 3, Fig. 3)

신선 자가 골이식 1주에는 신생골 형성이 경도로 시작되어(사진부도. 1) 2주에는 1주에 비해 증가되었으며 4주 이후에는 결체조직이 차츰 골성조직으로 대체 되었다(사진부도. 2). 골 흡수와 재형성이 계속 반복된 골 침착선이 6주에 보였고, 8주에는 이식골이 조혈 골수가 포함된 성숙골로 대체되었다.

단순 냉동 보관군 1주에서 신생골 형성량은 대조군보다 적은 미약한 정도로 나타났으며(사진부도.

3) 2주에는 1주보다 증가된 정도의 신생골 형성이 이루어졌고(사진부도. 4) 4주에는 신선 자가골 이식보다 적은 중등도로 나타났으나 6주와 8주에는 총판골로 구성된 치밀골의 형태를 보이고 있어 대조군과 차이가 없었다(사진부도. 5).

냉동 건조 탈회군에서는 단순 냉동 보관군과는 달리 이식골내에 호염기성의 세포질을 갖는 연골 세포들이 이식골의 변연부에서 나타났으며(사진부도. 6) 전반적인 신생골 형성 정도는 경도로 나타나 대조군과 유사하였다. 2주에는 이식골의 혈관 및 조골 조직의 내측 성장을 통해 골 흡수와 형성이 동시에 일어났으며 연골세포가 조골세포로 대체되어 신생골의 형성이 단순 냉동 보관군보다 많이 나타났다(사진부도. 7). 4주 이후에는 신생골 형성이 현저히 증가되어 대조군과는 차이가 없었다.

Table 3. New Bone Formation Quantitiy According to Graft Types and Duration

	A	DF	FDD
1 Week	+	±	+
2 Weeks	++	+	++
4 Weeks	+++	++	+++
6 Weeks	+++	+++	+++
8 Weeks	+++	+++	+++

(A : Autogenous groups, DF : Allogenic deep-frozen groups, FDD : Allogenic freeze-dried demineralized groups

- : No evidence, ± : Trace, + : Mild, ++ : Moderate, +++ : Severe)

4) 골 흡수상(Table 4, Fig. 4)

신선 자가골 이식군 1주에는 미미한 골 흡수가 관찰되었으나 2주에는 이보다 감소된 흡수상을 볼 수 있으며 4주 이후에서는 골 흡수상은 거의 사라졌다. 단순 냉동 보관군 1주에서는 골 흡수상이 대조군보다 증가된 중등도로 나타나서 4주까지 관찰되었으며 6주 이후에는 사라졌고, 냉동 건조 탈회군에서는 대조군과 같은 정도의 골편이 파골 세포에 의해 흡수되는 양상을 보이고 2주와 4주에는 미약하나마 관찰할 수 있으나 6주와 8주에는 사라져 골 흡수는 단순 냉동 보관군에서 가장 많이 나타났다(사진부도. 2, 3).

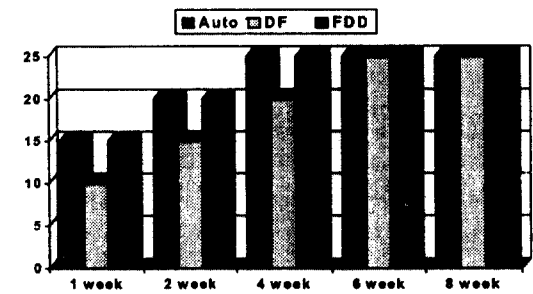


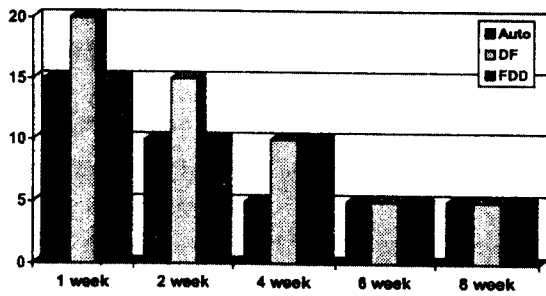
Fig. 3. New bone formation quantity

Table 4. Bone Resorption Degree According to Graft Types and Duration

	A	DF	FDD
1 Week	+	++	+
2 Weeks	±	+	±
4 Weeks	-	±	±
6 Weeks	-	-	-
8 Weeks	-	-	-

(A : Autogenous groups, DF : Allogenic deep-frozen groups, FDD : Allogenic freeze-dried demineralized groups

- : No evidence, ± : Trace, + : Mild, ++ : Moderate, +++ : Severe)



5: No evidence, 10: Trace, 15: Mild, 20: Moderate
Auto; Fresh autograft, DF; Deep frozen, FDD; Freeze-dried demineralized

Fig. 4. Bone resorption degree

2. 전자 현미경적 관찰

신선 자가골 이식군 2주에서는 골 흡수상은 잘 관찰되지 않았으며 명확한 조골세포 등에 의한 신생골 형성이 연속되며 골양조직은 엉클어진 교원섬유로 구성되어있다(사진부도. 9).

단순 냉동 보관군 1주에 이식부에 인접하여 출현하는 골 아세포는 성숙형으로 핵이 세포의 주변에 편재되어 있으며 풍부한 세포질 내에는 Golgi소체 및 조면 내형질망이 잘 발달되었으며 거대세포에 의한 골 흡수도 관찰되었다(사진부도. 10).

이식 2주에는 골 아세포가 더욱 많아지고 골면측에 가늘고 긴 돌기를 내면서 돌기는 골 세관안으로 뻗어서 골원세포의 돌기와 서로 접촉하고 있었다. 세포질내에 미토콘드리아가 풍부하며 소포체는 적은 파골세포가 많이 관찰되어 Ruffled border의 주름 사이에는 파괴된 무기질이 관찰된다(사진부도. 12). 이식 6주의 골양 표면을 덮고 있는 골 아세포에 의해 형성된 골은 층판 골소주로 구성되어 있으며 골 기질내에 매몰된 골원세포의 돌기가 뻗어나 신생골 형성 및 개조양상을 관찰할 수 있었다(사진부도. 15, 16).

냉동 건조 탈회군의 1주에서는 조골세포들에서 Golgi 소체 및 내질 소강(RER : Rough Endoplasmic Reticulum)이 왕성한 세포가 이식된 골 기질 주변에서 불규칙한 교원섬유를 형성하는 것이 관찰되며 신생 골양조직은 엉클어진 교원섬유로 구성되어 있으며, 석회화나 혈관 또는 조혈조직의 침투소견은 없었다(사진부도. 11). 이식 2주에서는 파골세포로

여겨지는 거대세포에 의하여 골이 흡수되는 소견과 이식부 주위에 신경 골양조직이 형성되는 것이 관찰되었으며, 미분화 조골세포와 유사한 미성숙의 골원세포가 관찰되었는데 골원세포는 방추형으로써 세포질이 비교적 빈약하였고 조면 내형질막은 발달하였다(사진부도. 13, 14). 이식 6주에서도 골아세포에 의한 골 형성이 유지됨을 볼 수 있었고 골소주 기질의 성숙을 관찰할 수 있으며 성숙 교원섬유가 다량으로 관찰되었고, 단순 냉동군과 큰 차이가 없는 성숙골은 층판성 골소주로 구성되어있다(사진부도. 17). 골 아세포는 스스로 만들어 낸 유골이 골화됨에 따라 골원세포로 변화되었는데 6주에서 관찰되는 골 아세포는 성숙된 흡수 골세포로 조면 세포체는 감소되어 거의 볼 수 없었으며 성숙된 골 아세포는 골양 표면을 덮고 있었다(사진부도. 18).

IV. 총괄 및 고찰

골이식 병리학적 변화에 관한 지식은 신선 자가골 이식의 연구에서 비롯되었다. 1907년 Axhausen¹³⁾의 보고에 의하면 Oliver(1861)가 자가골 이식의 운명에 관한 연구를 처음으로 시작한 사람으로 살아있는 골과 골막만이 새로운 골형성에 기여한다고 보고하였다. 이에 반하여 Barth¹⁴⁾는 이식된 자가골은 죽고 단지 이식물에 인접해 있는 수여부의 세포만이 새로운 골형성에 기여하며 이식된 골은 단지 숙주세포가 새로운 골을 형성할 수 있도록 골격 역할만을 한다고 반박하였다.

Barth는 이행성 골대체(creeping substitution) 용어를 도입했으나, 오늘날 알려진 피사골의 전반적인 흡수와 동시에 살아있는 골로의 대체라는 의미보다는 단지 표면 흡수를 설명하는 데 사용하였다. Axhausen¹³⁾이 1909년 최근 이해되고 있는 개념의 자가골 이식에 관하여 처음으로 보고하여 골막은 살아 있으나, 골은 비어 있는 골 세포강으로 죽어 있다고 설명하였으며 골막과 골내막 표면에 살아 있는 골 활성세포가 새로운 골을 형성하는 근원이 된다고 보고하였다. 또한 노화된 죽은 골의 흡수와 살아 있는 새로운 골의 부착성 성장을 이행성 골대체 과정이라고 설명하였고, 이러한 이행성 골대체 현상은 이식된 골의 광범위한 재형성 방식이라고 하였다. 동종골 이식에서 발생되는 이행성 골대체는

세포가 죽은것 이외에는 자가골 이식과 근본적으로 유사하고, 이식체 자체가 아니라 숙주의 수여부에서 발생한 골형성 세포가 골 형성에 관여한다는 것이다. 그러나 골 세포가 살아있는 혈행 함유성 자가골 이식의 경우는 뚜렷한 피사와 이행성 골대체가 없이 이식골이 재생된다.

동종골 이식시 치유 기전은 초기에 골전도 작용에 의해 숙주로부터 모세혈관과 조직 간엽세포가 성장하여 들어가 신생골을 형성하고 후기에는 골의 유기질 성분이 조직 간엽세포를 조연골 세포와 조골 세포로 표현형 변성을 통하여 신생골 형성을 유도함으로 골 전도와 유도 기능을 함께 가지고 작용한다¹⁶⁻²¹⁾. 신선 자가골 이식에서는 작은 혈관과 혈관 주위의 결체 조직세포가 1주에서 2주사이에 신선 자가골로 증식되어 들어가는데 비하여 동종골 이식에서는 이 과정에 더 많은 시간을 필요로 하고 된다. 즉 동종골 이식시는 자가골 이식보다 느린 이행성 골대체를 보인다고 하였다²²⁻²³⁾. 동종골의 이행성 골대체는 골화 세포로 분화되고 유기질 기질을 생성하는 원시성 간엽세포를 공급하는 혈관의 성장에 의존한다. 망상골과 치밀골은 그들의 공간구조(space architecture)와 혈관분포 차이때문에 이행성 골대체 과정의 진행이 서로 다르며 망상골 이식시에는 살아있는 새로운 골의 축적이 흡수전에 일어나나, 이식된 치밀골은 노화된 피사골의 흡수가 신생골의 침착전에 일어난다. 그러나 치밀골의 하버스관은 골 흡수로 더욱 넓어져 골 다공증이 발생되며, 하버스관은 배열된 골아세포로부터 새로운 골의 부착성 성장이 쉬워져 계속 신생골로 대체되어진다. 이러한 부착성 성장은 흡수 시작 몇주 후에 발생하므로 나이, 이식물의 크기, 이식부위 등에 따른 흡수기간 동안 이식체의 골질을 방지하는 것이 매우 중요하다^{24,25)}. 본 연구에서도 많은 학자들의 연구에서와 같이 자가골 이식보다 동종골 이식에서 늦은 이행성 골대체를 보였다. 즉 자가골 이식시 초기 3주경 이식체의 살아있는 세포가 활동을 하며 후기 4-8주경에 숙주 조직으로부터 유도된 세포들이 활동을 하는데 비하여 동종골 이식시는 자가골 이식시 나타나는 초기 과정이 나타나지 않고 후기 단계가 나타나는데 이것이 동종골 이식편이 골을 형성하는 기본 기전이다.

골 형성 기전에 대하여 Urist와 Strates¹⁸⁾는 복잡한

거대 세포군들이 골 기질로부터 조직 간엽세포들과 작용하여 골 형성세포로 변성되거나, 거대 세포군이 아닌 골 형성세포가 조직 간엽세포들로 확산되어 화학 주성으로 세포분화를 유도하여 골형성을 한다고 하였다. 또한 Burwell²⁶⁾, Reddi 등²⁷⁾과 Friedenstein²⁸⁾는 성인에서 골아세포로 분화되고 골기질을 형성하는 골 형성 전구세포를 2가지로 분류하였다. 첫째는 결정성 골 형성 전구세포(determined osteogenic precursor cell, DOPC)로 자가 복제할 수 있고 분화된 골세포를 형성할 수 있는 골간세포로 이것은 골수 골간과 골의 표면에서만 발견된다. 둘째는 유도성 골 형성 전구 세포(inducible osteogenic precursor cell, IOPC)로 많은 조직의 결체 구조에 나타는 간엽세포로 이것은 유도물질 없이는 골을 형성하지 않는다. 골 이식의 재생 단계과정에서 결정성 골형성 전구세포(DOPC)는 골 전도과정에 유도성 골형성 전구 세포(IOPC)는 골 유도의 과정에 관련된다.

골 전도는 수여부로부터 이식골체 내로 확장되는 모세혈관과 혈관 주위조직 및 결정성 골형성 전구 세포가 성장을 통하여 수여부로부터 신생골 형성이 확장해 들어간다. 이때 골 이식은 수동적인 작용만을 하고, 골 전도는 세라믹이나 플라스틱같은 매식물질의 흡수가 없는 비생체 재료의 골격내에서도 일어난다(Osteophilic effect). 골전도는 숙주와 공여부 사이에 면역 거부로 나타나는 섬유조직 형성에 의해 방해받을 수 있으며, 공여부와 숙주 골구조의 간극 사이에 접촉 압박이나 접촉의 긴밀성으로 인해 증가된다. 골 유도는 유도 물질의 영향으로 유도성 골형성 전구세포(IOPC)가 활성화되어 연골이나 골을 형성하는 과정이다. 골형성 단백질로 알려진 골 유도 인자는 1979년 Urist²⁹⁾가 비용해성 탈회 골 기질 젤라틴으로부터 골 유도성이며 소수성이고 저분자량인 단백질 분리를 보고함으로써 알려졌다. 골 유도의 개념과 골 형성 단백질의 효과는 실험실 연구로 증명되었다. 쥐에서 골세포의 분화는 비활성의 매식된 탈회 골기질 또는 기존의 골과 접촉 불가능한 매식된 골 형성 단백질 부위에서 일어난다. 또한 원숭이에서의 소의 골 형성 단백질을 국소 매식함으로써 골 이식 치유가 촉진된다고 보고 되었다^{18-20,30)}.

탈회한 동종골은 오래전 부터 사용되었으나 신선 자가골 이식 때문에 그 중요성을 인식하지 못하였다.

1889년 Senn¹¹⁾이 단순 탈회 동종골을 골 이식에 성공한 후 탈회 동종골을 장골 결손부위에 많이 사용되어져 왔으며, 탈회한 동종골이 신선 자가골보다 우수하다고 보고하는 학자들도 있다. 동종골 이식편은 준비과정에 따라 다른 치료 결과를 보이는데 탈회한 골의 신생골 형성 능력이 비탈회골보다 훨씬 뛰어나다. 탈회한 골은 연골내 골화과정과 유사하여 연골이 형성된 다음에 골 기질이 석회화 된다. 일반적으로 탈회과정은 골 생성 단백질을 제거하지 않는 것으로 알려져 있고 탈회되지 않은 골은 골 생성 단백질을 보유하고는 있으나 골내 무기질이 골 생성 단백질의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. Narang 등³¹⁾은 탈회 골 이식 후에는 칼슘량의 점차적인 증가를 나타내어 8주후에는 정상수준에 도달하였으나 비탈회 신선 자가골과 동종골 이식시에는 초기 3주간 칼슘량의 감소가 나타나고 점차적으로 증가하여 8주후에 정상 수준으로 돌아왔음을 보고하였고 이 실험 결과로 비탈회골의 이식시에는 이식초기에 탈회과정을 거친다고 보아 탈회골의 사용이 골이식시 탈회과정을 생략하므로 융합(incorporation)과정을 촉진시킨다고 하였다.

Reddi와 Huggins¹⁷⁾와 Huggins 등³²⁾은 쥐의 연조직에서 탈회한 골 분말의 이소골 유도 현상을 관찰하고 국소 간엽세포들이 조연골 세포로 변하는 것을 관찰하였다. 수일내에 연조직에 생성된 연골은 점차로 골과 조혈성 골수로 대체된다. 이 과정은 신선 또는 저장된 피질골 이식에서 골의 흡수와 주변 골로부터 혈관과 골 형성 조직을 공급 받아 골 형성이 동시에 일어나는 이행성 골대체 과정과는 다른 기전이라 하겠다. 이때 이식체는 혈관이 풍부한 섬유성 결체 조직막으로 싸이게 되는데 이막은 골이나 연골을 포함하지 않으나, 어떤 화학 유도 작용에 의해 탈회된 동종골에 친화성을 갖는 골 전구 세포를 공급함으로써 연골이나, 골을 형성하는 중요한 역할을 하게 된다. 그러나, 골 형성 단백질의 작용에 의해 골 유도 초기에 연골과 골을 형성하는 유전자가 작용하면 이 섬유성 결체 조직막이 바로 골을 형성할 수 있다. 이러한 미분화는 결체 조직막이 혈관 공급이 풍부하므로 저산소 분압과는 연관이 없는 것으로 보인다. 결체 조직만이 주위 연조직에서 유입되는 억제 분자로 부터 탈회한 동종 이식편을 보호함으로써, 결체 조직막 안에서 골 유도에 의한 적절한

환경을 제공하지 않는가 생각되며, 이러한 억제 분자에 노출될 경우 세포들은 분화하지 않는 것으로 사료된다. 또는 이 결체 조직막이 세포 분화 억제력을 차단시킴으로써 이식체의 각각 다른 부위에서, 물리, 화학적 환경을 통하여 유전적으로 미분화된 간엽세포가 섬유아 세포, 조연골 세포, 또는 조골 세포로 분화되도록 돕지 않는가 사료된다^{31, 32)}.

본 실험의 냉동 건조 탈회골 1주에서 단순 냉동 보관골과는 달리 혈관성 결합조직으로 둘러싸인 연골세포를 관찰할 수 있었고 일부에서는 섬유성 결합조직막으로 둘러싸인 신생골을 나타내어 비탈회골과 대조적인 초기반응을 보였고 신생골 유도능력이 우수함을 알 수 있었다. 그러나 본 실험에서 사용된 골편에서는 분말골에서와는 달리 일부에서 골편들이 파골세포에 의해 흡수되는 양상을 보였으며 인접골로부터 이식골로의 혈관 및 조골조직의 내측성장을 통해 골 흡수와 형성이 동시에 일어나는 소견을 나타내었다. 이는 잔여 칼슘에 의한 면역반응 때문이 아닌가 사료되었다. 따라서 탈회골편의 치유과정은 탈회 분말골과는 다르게 이식초기에 골유도에 의한 신생골 침착이 바로 나타나는 것이 아니라 골 전도에 의한 골 흡수와 골 생성이 동시에 나타나는 이행성 골대체 과정을 보인다고 하겠다. 또한 탈회골편군이 비탈회 골편군에 비하여 초기 신생골 형성이 우수함을 나타내었으며 자가골과 유사한 치유반응을 보였다.

골 형성 단백질은 소수성 당단백질이고 다종간(cross-species)에 골 형성 반응을 일으킨다. 종간 특이성의 결여는 서로 다른 동물로부터 얻은 골 형성 단백질의 분자량이 거의 모두 약 20,000으로 유사한 중량을 가진 것과 관련되는데 이런 소단위가 모든 종에 공통적으로 골 유도체로 작용하는 것으로 생각된다. 사람의 골 육종으로부터 골 형성 단백질을 만드는 세포를 배양하는데 성공을 거두었고, 소의 골형성 단백질에 대한 단일 클론성 항체(monoclonal antibody)에 사용된 면역 조직학적 염색은 골 형성 단백질이 골 기질의 교원섬유, 골막 세포와 골수 간질의 간엽세포에 존재함을 보여 주었다. 또한 골 발생이 계속되는 동안 조골세포는 많은 골 형성 단백질을 합성하고 분비하여 골 유도를 증가시키기도 한다³³⁻³⁵⁾.

골 형성 단백질의 골 형성 능력은 항상 정제 과정의

증가와 비례하여 반드시 증가되지 않으며, 오히려 정체되지 않은 골 형성 단백질의 이식과 비례한다는 점은 흥미로운 점이다. 이는 매식된 용해성 골 형성 단백질의 빠른 흡수로 일부분 설명될 수도 있으나, 골 형성 단백질이 아닌 단백질이 다른 성장 인자를 동반하는 지는 아직 논란중이다. 골 형성 단백질은 많은 영향 인자에 의해 쉽게 비활성화되는 불안정 물질로, 골 형성 단백질의 보존은 동종골 처리 과정에 매우 중요한 단계이다. 예를 들어, 쥐의 탈회된 골 이식체를 4°C에서 72시간 또는 실온에서 36시간동안 보관할 경우 골 유도의 효과를 크게 억제시킨다. 따라서 골 이식체의 채취는 8시간 이내가 적절하며, 단백질 분해는 골 형성 단백질의 활성도를 감소시킨다³⁶⁾.

골 형성 단백질의 매식은 비유합된 골의 임상적 치료에 성공적으로 사용되어져 왔다. 골수-골형성 단백질 혼합체는 비유합된 골 치료를 위해 발달되었고, 골수 간질이 결정성 골 형성 전구세포(DOPC)를 제공하고 골 형성 단백질에 간엽세포가 반응하여 유도성 골 형성 전구세포(IOPC)로부터 조골세포를 분화시킴으로 골유합은 자가골 이식보다 더 빨리 일어난다^{19,35)}. 골 형성 단백질 복합체(beta tricalciumphosphate, TCP)의 이식은 또다른 성공적인 예로 조직내 용해가 가능한 이식제로서 사용된다³⁷⁾.

골 형성 단백질은 증기 멸균법이나 방사선 조사 및 ethylene oxide gas 같은 소독과정에서도 파괴될 수 있다. 탈회된 쥐의 골로 소독 방법들에 따른 골 유도 효과를 비교한 결과 0.18%의 merthiolate(MT)를 제외한 Cobalt-60을 이용한 25KGY의 방사선 조사, 2% glutaraldehyde 처리, formaldehyde gas 및 6시간 동안의 ethylene oxide gas 등 여러방법들이 있으나 모두 골 형성에 장애를 주는 것으로 나타났다. 그러나 merthiolate는 미생물의 포자를 멸균시키는 데는 비효과적이며, 25KGY의 방사선은 골 유도 능력의 반이상을 감소시키지만 glutaraldehyde와 formaldehyde, ethylene oxide gas 보다 골 손상은 적어 방사선 멸균법이 현재 가장 적당한 소독 방법으로 알려져 있다³⁸⁾. 본 연구에서는 방사선 소독의 장비상의 문제로 인하여 방사선 멸균법 다음으로 가장 많이 이용되고 있는 ethylene oxide gas 소독법을 통하여 실험을 시행하였다.

골 이식에서는 숙주 조직의 면역 반응을 자극하지

않도록 이식체의 면역성을 감소시키는 여러가지 방법을 택하고 있으며 이 중에는 끓이는 법, 탈 단백질, 단순 냉동, 냉동 건조, 방사선 조사 등의 방법이 있다. 끓이거나 화학제로 처리한 골은 항원성을 감소시키지만 골내의 골 형성 단백질을 파괴하여 골 유도 능력을 감소시키고 골내 유기성분을 응고시켜 숙주 세포가 이들을 제거하기 어렵게 만들어 잘 사용하지 않고 있으며 최근에는 단순 냉동법이나 냉동 건조법을 사용하는데, 면역 반응 문제에 있어서 냉동 건조법이 다소 우수하고, 단백질 변성도 줄일 수 있으며 상온 보존이 가능하여 널리 이용되고 있다^{6,12,39,40)}.

냉동법에 대한 연구로 Bradly⁴¹⁾는 쥐와 돼지에 냉동시킨 악골이 천천히 흡수되며 동시에 신생골에 대체되는 것을 관찰하였고, Marciani⁴²⁾은 악골을 체내 에서 체외로 적출하여 액체 질소에서 급냉 실험시킨후 재이식하여 좋은 결과를 보고한 바 있다. 조직 냉동에 따른 세포의 손상 기전은 세포내의 결빙과 탈수, 또한 그에 따른 세포내 물질들의 농축에 의하여 세포의 구조적, 화학적 변화와 함께 구성성분의 변화가 발생한다. 이러한 사실로 세포막의 파열과 갑작스런 온도변화에 의한 충격으로 세포는 호흡 기능을 상실하며 그와 함께 혈행의 정지와 혈전의 형성으로 해빙 후에도 혈액의 공급이 중단되어 조직의 괴사가 일어나게 된다. Fred⁴³⁾는 냉동 상태에서 이식체의 항원성에 대하여 신선골과 냉동골간의 유도된 세포성 면역 정도는 확실한 차이가 없었다고 보고한 바 있다.

냉동 건조는 높은 진공 상태에서 냉동 물질로부터 수분을 제거하는 과정으로 조직의 냉동 과정과 동시에 증발이 됨으로써 냉동결절이 제거되는 것이다. 냉동 건조시킨 혈장같은 유기물들을 냉동건조시켜도 냉동 건조 직후나 수년간 보관한 이후에도 화학적, 항원적, 생물학적, 전기영동적으로 안정되어 있다는 것이 밝혀졌다^{39,40,43-47)}. 그러나 동일방법으로 냉동 건조시킨 동종골 간에도 골 내용물이나 성상에 따라 항원성에 차이가 있어 피질골은 비항원성이지만 해면질골은 미약하나 계속 항원성이 존재한다고 한다. 냉동 건조 동종골의 이식후 운명에 관하여는 확실하게 알려진 바는 없지만, 여러 연구 결과에 의하면 비활성의 골 조직 이식과 동일하며, 단단한 자가 피질 골 이식과 유사한 경로를 갖는다고

하였다. 즉 우선적으로 혈관 재생 과정이 비활성의 골원을 침투하고, 골원의 가늘고, 등근, 좁은 관으로부터 골의 비활성 기질이 흡수됨에 따라 파골 세포 및 염증 세포가 출현한다. 입체적으로는 새로운 골이 축적되어, 이행성 골대체과정이 일어나고, 새로운 기능적인 소술을 형성하게 된다. 이렇게 골이 흡수되고, 새로 형성되는 역동적인 과정은 동종골이 완전히 대체될때까지 계속된다. 이는 비활성의 골도 면역학적으로 수용이 가능하면 천천히 혈관 재형성이 된다는 개념을 뒷바침 한다⁴³⁻⁴⁷⁾.

Friedlaender와 Strong⁴⁸⁾은 신선한 동종골의 이식 시 강력한 면역원을 증명할 수 있으나 냉동 건조된 동종골을 이식한 경우에는 상대적으로 미약한 면역성을 보이거나 심지어는 면역학적 반응을 관찰조차 할 수 없었다고 보고하였고, 다른 학자들에 의하여 이러한 냉동 건조가 동종골 이식의 감각 기능을 약화시키는 기전은 아직 불확실하지만 냉동 및 건조의 두 과정에서 면역성이 약화되고 조직내의 생존세포가 감소하는 것이 중요한 기전일 것이라고 추정된 바 있다^{44, 45)}. 그러나 냉동 건조가 이식물의 항원성을 완벽하게 없애지는 못하고 있고, 골 이식의 최근 연구는 이식물의 표면에 다른 잠재적인 항원으로서의 원인이 존재함을 밝혀내고 있다. 따라서 최근에는 냉동 건조된 조직 이식체의 면역 기전을 변화시키기 위하여 숙주에 방사선 조사를 하거나 면역 억제제를 사용하기도 하며, 탈회를 하기도 한다^{47, 49)}.

따라서 이러한 면역 거부반응의 저하를 위한다는 관점에서 냉동 건조 탈회골을 본 실험에서 실험 대상으로 하였다. 그러나 면역 반응에 관한 냉동 건조 탈회골의 역할에 대하여는 많은 임상 연구 및 기초 연구가 되어야 하며, 이러한 사실을 토대로 하여 광범위한 냉동 건조 탈회골의 임상 적용이 있어야 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

저자는 가토 두정골을 채취하여 신선 자가 이식군, 단순 냉동군 및 냉동 건조 탈회군으로 나누어 가토 두정골에 골 이식한 후 각군의 골 전도 및 골 유도 능력과 골화 과정 및 치유 과정을 광학현미경 및 전자현미경적인 관찰을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 모든 실험군에서 대식세포 및 임파구 등의 염증 세포 반응이 1주에 관찰되었다가 4주경에 소실되었는데 초기에 동종골 단순 냉동군에서 가장 심한 염증세포 침윤을 보였다.
2. 조골세포의 활성은 4주까지 모든군에서 증가하다가 6주부터는 감소하였으며 냉동 건조 탈회군과 신선 자가 이식군에서 유사한 소견이 나타났으며 단순 냉동군에서는 이식 4주까지 가장 적게 나타났다.
3. 신생골은 골양 조직 또는 교원 섬유성 골 기질로 구성되었고 성숙됨에 따라 층판성 골수주로 대체되었다. 신생골 형성은 각군 모두 1주에서부터 시작되었으며 동종골 단순 냉동군이 다른 실험군보다 그 양이 적었고 6주와 8주에서는 모두 실험군에서 골침착선이 잘 보이는 층판골의 형성이 보여 각 실험군간 차이가 거의 없었다.
4. 이식골편 주위의 골 흡수상은 모든 실험군의 1주에서 시작되어 4주에는 소실되었는데 동종골 단순 냉동군에서 가장 심한 흡수상을 보였고 전자현미경적 관찰에서 파골세포의 활동상이 뚜렷하였다.
5. 미분화 조골세포에서 골원세포로 변화되는 과정에는 골원세포는 방추형으로 세포질이 비교적 빈약하고 핵인이 뚜렷하며 초면질내 형성망이 증가되었고 실험군간에 뚜렷한 차이는 없었다.

이상과 같은 소견으로 초기 1, 2주에서 불규칙한 섬유소원을 형성하는 세포의 활성도는 단순 냉동군보다 냉동 건조 탈회군에서 우수하였으나 6주 이후에는 골 세포가 신생골에 매복되고 골 재형성을 하는 과정에는 두 군간 차이가 없었다. 따라서 골 이식시 신속한 초기 골 형성을 필요로 하는 경우에는 냉동 건조 탈회골이 유용한 재료라고 사료된다.

Reference

1. Kaban LB, Mulliken JB, and Glowacki J : Treatment of jaw defects with demineralized bone implants, J Oral Maxillofac. Surg. 40 : 623, 1982.
2. Hosney M, Sharawy M : Osteoinduction in young and old rats using demineralized bone

- poder allografts. *J Oral Maxillofac Surg.* 43 : 925, 1985.
3. Gepstein R, Weiss RE, et al. : Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder. *J. Bone Joint Surg.* 69A : 984, 1187.
 4. Ray RD : Vascularization of bone grafts and implants. *Clin. Ortho.* pp.87 : 43, 1972.
 5. Enneking WF, Morris JL : Human autologous cortical bone transplants. *Clin. Orthop.* 87 : 28, 1972.
 6. Friedlander GE, Strong DM : Studies on the antigenicity of bone. *J. Bone Joint Surg.* 58A : 85A, 1976.
 7. Kreuz FP, Hyatt GW, Turner TC and Bassett CAL : The preservation and clinical use of freeze-dried bone. *J. Bone Joint Surg.* 33A : 863, 1951.
 8. Inclan A : The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg.* 24 : 81, 1942.
 9. Wilson PD : Experience with the use of refrigerated homogenous bone. *J. Bone Joint Surg.* 33B : 301, 1951.
 10. Hyatt GW, Butler MC : Bone grafting. The procurement, storage, and clinical use of bone homograft. In : *Instructional Course Lecture, The American Academy of Orthopaedic Surgeons, Vol. 14, pp343, Ann Arbor, JW Edward, 1957.*
 11. Senn N : On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am. J. Med. Sci.* 98 : 219, 1889.
 12. Urist MR, Iwata H : A chemically sterilized antigen extracted autodigested alloimplants for bone banks. *Arch Surg.* 110 : 46, 1975.
 13. Axhausen G : Histologische untersuchungen über knochentransplantation am menschen. *Deutsche Ztschr Chir, Leipz,* 91 : 388, 1907.
 14. Barth A : Über histologische befunde nach knochen implantationen. *Arch Klin Chir* 46 : 409, 1893.
 15. Axhausen W : Die knochenregeneration : ein zweiphasisches geschehen. *Z Chir* 11 : 435, 1952.
 16. Freiberg RA, Ray RD : Studies of devitalized bone implants. *Arch. Surg.* 89 : 417, 1964.
 17. Reddi AH, Huggins CB : Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 69 : 1601, 1972.
 18. Urist MR, Strates BS : Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* 50(suppl) : 1392, 1971.
 19. Chalmer J : Transplantation immunity in bone homograft. *J. Bone Joint Surg.* 41B : 160, 1959.
 20. Elves MW, Pratt LM : The pattern of new bone formation in isograft of bone. *Acta. Ortho. Scand.* 46 : 549, 1975.
 21. Puranen J : Reorganization of fresh and preserved bone transplants. *Acta. Ortho. Scand. Suppl.* 92 : 1, 1966.
 22. Burwell RG : The fate of bone grafts. In *recent advances in orthopaedics, pp.115. Baltimore, Williams and Wilkins, 1969.*
 23. Turner TC, Bassett CAL, Pate JW, and et al. : An experimental comparison of freeze-dried and frozen cortical bone graft healing. *J. Bone Joint Surg,* 33A : 1197, 1955.
 24. Burchardt H : Biology of cortical bone graft incorporation. In "Bone Transplantation", ed. by M Aebi, and P Regazzoni. Springer-Verlag pp. 23, 1989.
 25. Glimcher MJ, et al. : The biology of bone healing and the repair of autograft, allograft, and xenograft metatarsal-phalangeal joint transplants in rabbits. In "Osteochondral Allografts-Biology, Banjking and Clinical Applications", ed. by GE Friedlaender et al., Little Brown Company, Boston pp. 9. 1983.
 26. Burwell RG : The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clin Orthop* 200 : 125, 1985.
 27. Reddi AH et al. : Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18 : 207,

- 1987.
28. Friedenstein A : Precursor cells of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol.* 47 : 327, 1976.
 29. Urist MR : Surface-decalcified allogenic bone implants. *Clin Orthop.* 140 : 208, 1979.
 30. Urist MR : Bone transplants and implants. In "Fundamentals and clinical bone physiology" ed. by Urist MR, Lippincott, Philadelphia, pp. 331, 1987.
 31. Narang R, Wells H, and Lloyd WS : Demineralization of bone transplants in vivo. *Oral Surg.* 36 : 291, 1973.
 32. Huggins C, et al. : Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. *J. Exp. Med.* 132 : 1250, 1970.
 33. Wu A and Hu X : Separation and purification of porcine bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 230 : 229, 1989.
 34. Takoka K, et al. : Establishment of cell line producing bone morphogenetic protein from a human osteosarcoma. *Clin. Orthop.* 244 : 258, 1989.
 35. Urist MR, et al. : Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 : 1828, 1979.
 36. Lan Ko, et al. : Purification and chemical modification of porcine bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop* 256 : 229, 1990.
 37. Urist MR, et al. : Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein beta tricalcium phosphate (TCP) composites in skull trephine defects in dogs. *Clin. Orthop.* 214 : 295, 1987.
 38. Urist MR and Hernandez A : Excitation transfer in bone-deleterious effects of cobalt 60 radiation sterilization of bank bone. *Arch. Surg.* 109 : 486, 1974.
 39. Jergesen HE, et al. : Age effect on bone induction by demineralized bone powder. *Clin. Orthop.* 268 : 253, 1991.
 40. Willams G : Experience with bolid cadaveric cancellous bone for fracture of long bones. *J. Bone Joint Surg.* 46B : 398, 1954.
 41. Bradly PF : Modern trend in cryosurgery of bone in the maxillofacial regions. *Int. J. Oral. Surg.* 7 : 405, 1978.
 42. Marciani RD, Roth GI and White DK : Healing of reimplanted freeze-treated maxillary bone. *J. Oral Maxillo. Surg.* 40 : 401, 1982.
 43. Fred L : The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *J. Bone Joint Surg.* 57 A : 216, 1975.
 44. Enneking WF and Morris JL : Human autologous cortical bone transplant. *Clin. Ortho.* 87 : 28, 1972.
 45. Friedlaender GE : The antigenicity of preserved allografts. *Transp Proc.* 8 : 195, 1976.
 46. Hyatt GW and Butler MC : Bone grafting : The procurement, storage, and clinical use of bone homografts. In *Instructional case lectures, The american academy of orthopaedic surgeons.* Vol. 14, pp. 343, Ann Arbor, JW Edwards, 1957.
 47. Narang R, Ruben MP, Harris MH and Wells H : Improved healing of experimental defects in the canine mandible by grafts of decalcified allogenic bone, *Oral Surg.* 30 : 142, 1970.
 48. Friedlaender GE, and Strong DM : Studies on the antigenicities of bone. *J. Bone Joint Surg.* 58A : 854, 1976.
 49. Narang R, Wells H. : Bone induction in experimental periodontal bony defects in dogs with decalcified allogeneic bone matrix graft : A Preliminary study. *Oral Surg.* 33 : 306, 1972.

Explanation of Figures

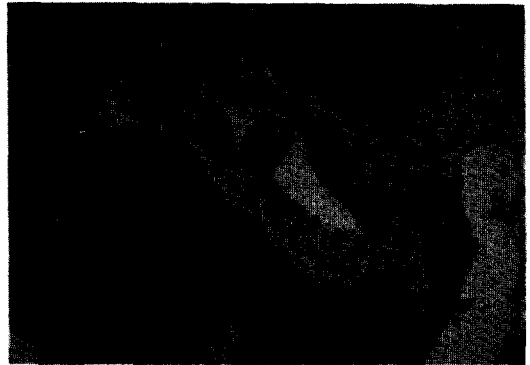
- Fig. 1. Photomicrography of autograft, 2 weeks. Viable graft bone surrounded by proliferating fibroblasts with inflammatory infiltrate and new osteoid tissue formation was noted(H & E, $\times 100$).
- Fig. 2. Photomicrography of autograft, 4 weeks. New bone formation was noted(H & E, $\times 40$).
- Fig. 3. Photomicrography of allograft deep frozen group, 1 weeks. Non-viable grafted bone surrounded by active granulation tissue(H & E, $\times 100$).
- Fig. 4. Photomicrography of allograft deep-frozen group, 2 weeks. Reversal line were noted(H & E, $\times 40$).
- Fig. 5. Photomicrography of allograft deep-frozen group, 6weeks. Lamellated bone surround fibous connective tissue and less active osteoblast than freeze-dried and demineralized group(H & E, $\times 40$).
- Fig. 6. Photomicrography of allograft freeze-dried and demineralized group 1 week. Streaming of active fibroblasts and basophili chondrocyte were embedded around the grafted bone(H & E, $\times 100$).
- Fig. 7. Photomicrography of allograft freeze-dried and demineralized group, 2 weeks. Acontinuous layer of osteoblasts lines newly formed viable-bone(H & E, $\times 40$).
- Fig. 8. Photomicrography of allograft freeze-dried and demineralized group, 4 weeks. Active osteoblasts rimming and red stained osteoid was evident(M. T., $\times 100$).
- Fig. 9. Photomicrography of autograft, 2 weeks. A region of mineralized matrix between edge of implanted bone and new bone interface. Cemental line was noted(E. M., $\times 3000$).
- Fig. 10. Photomicrography of allograft deep-frozen group, 1week. At the lower left is a portion of an osteoblast containing Golgizone and abundant granular reticulum. Subjacent to it are the collagen fibrils of newly synthesized around the dense demineralized bone matrix(E. M., $\times 4000$).
- Fig. 11. Photomicrography of allograft freeze-dried and demineralized group, 1 week. Osteoid, newly synthesized. not yet calcified matrix near the osteoblasts noted(E. M., $\times 4000$).
- Fig. 12. Photomicrography of allograft deep-frozen group, 2 weeks. Inactive flat osteoblast was observed(E. M., $\times 5000$).
- Fig. 13. Photomicrography of allograft freeze-dried and demineralized group, 2 weeks. An osteocyte embedded within bone matrix has organless-poor cytoplasm, cytoplasmic process in the canaliculi increased unclear chromatin(E. M., $\times 7000$).
- Fig. 14. Photomicrography of allograft freeze-dried and demineralized group, 2 weeks. Direct deposition fo woven bone around the implanted bone matrix are seen(Touidine Blue, $\times 200$).
- Fig. 15. Photomicrography of allograft deep-frozen group, 6 weeks. Active bone formation by osteoblastic cells were noted.(E. M., $\times 2000$).
- Fig. 16. Photomicrography of allograft deep-frozen group, 6 weeks. The clear space around the osteocyte is occupied by an demineralized matrix in which collage fibers are partially visible. A cell process, osteocytic, is seeing entering into a canaliculus(E. M., $\times 5000$).

- Fig. 17. Photomicrography of allograft freeze-dried and demineralized FD group, 6 weeks. Mature collagen fibril formation than F group (E. M., $\times 3000$).
- Fig. 18. Photomicrography of allograft freeze-dried and demineralized group, 6 weeks. The osteoblasts lining a lamellated bony trabeculae has abundant RER but dilatation of the cisterna is not prominent. More inactive flat osteoblast lined by the bone matrix noted (E. M., $\times 4000$).

논문 사진부도(I)



논문 사진부도1



논문 사진부도2



논문 사진부도3



논문 사진부도4

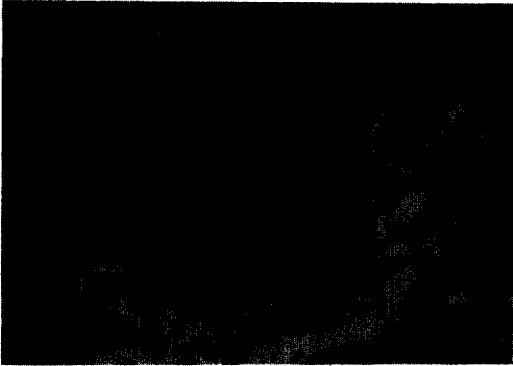


논문 사진부도5

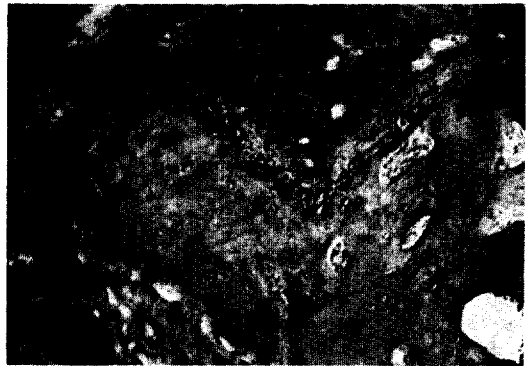


논문 사진부도6

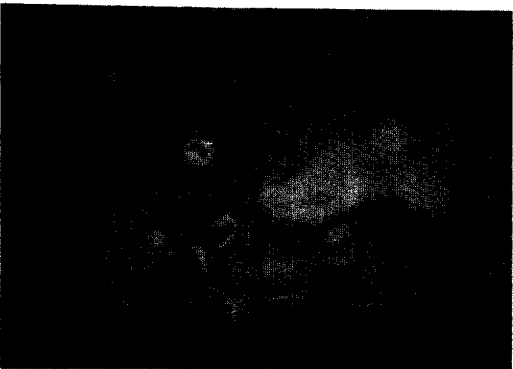
논문 사진부도(II)



논문 사진부도7



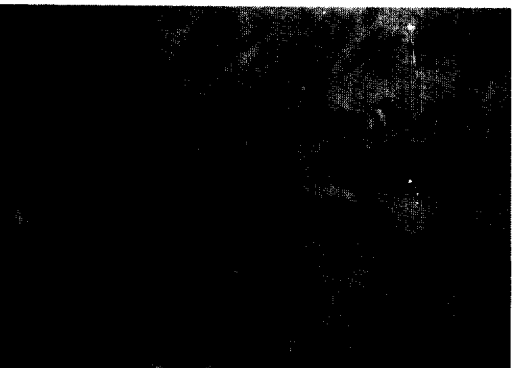
논문 사진부도8



논문 사진부도9



논문 사진부도10



논문 사진부도11

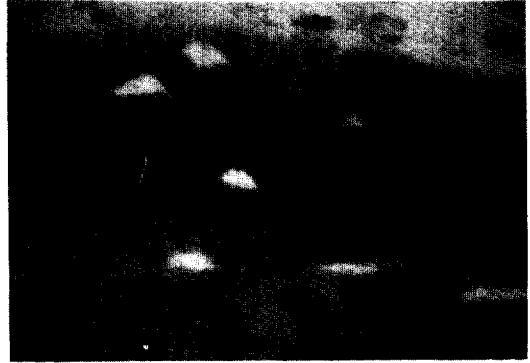


논문 사진부도12

논문 사진부도(Ⅲ)



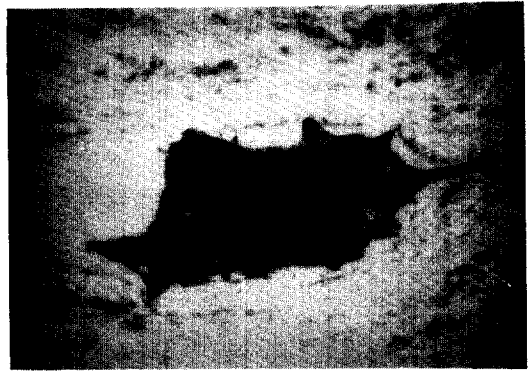
논문 사진부도13



논문 사진부도14



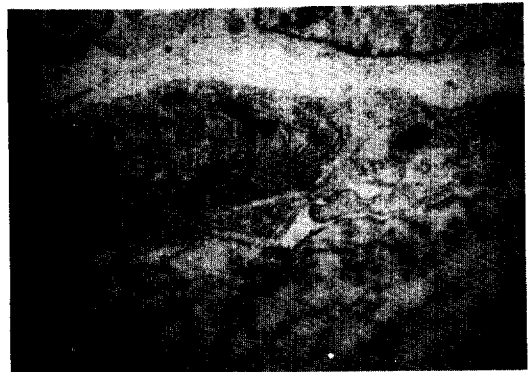
논문 사진부도15



논문 사진부도6



논문 사진부도17



논문 사진부도18