

백서 두개골에의 이종골 이식 후 치유에 관한 실험적 연구

조용석 · 김경원

충북대학교 의과대학 치과학교실

Abstract

THE EXPERIMENTAL STUDY ON THE HEALING PROCESS OF XENOGRAFT IN THE CRANIUM OF RAT

Yong-Seok Cho, Kyoung-Won Kim

Dept. of Dentistry, College of Medicine, Chungbuk National University

The purpose of this investigation was to evaluate the acceptability of the collagen-based xenograft (Laddec®).

Full thickness bone defects were prepared in the calvaria of the rats. In the experimental groups the bone defects were filled with a kind of collagen based xenograft. And bone defects, which left without filling, were used as control groups. Sequential sacrifice was performed at the 1st, 2nd, 4th, 8th, and 16th weeks of experiment.

1. At the 1st week of experiment, infiltration of chronic inflammatory cell was observed in all groups. In the experimental group, resorption of the xenograft was initiated.
2. At the 2nd week of experiment, infiltration of chronic inflammatory cells was decreased in all groups. In the experimental group, active resorption of xenograft and new bone formation from the periphery of the xenograft was observed.
3. At the 4th and 8th weeks of experiment, more resorption of the xenograft and new bone formation with calcification was observed in the experimental group.
4. At the 16th week of experiment, small bone trabecula was formed partially in the control group but that couldn't fill the whole bone defect. In the experimental group, more advanced resorption of xenograft and more new bone formation was observed. However mid portion of the xenograft was still remained without resorption.
5. From this experiment, we concluded that the collagen-based xenograft had some osteoconductive but no osteoinductive property. So the xenograft would be used for the bone defect filling material where rapid bone remodeling is not required.

Key Words : collagen-based xenograft

I. 서 론

1668년 Van Meek' ren¹⁾이 최초로 골이식을 보고한 이후 골 이식술은 구강악안면외과가 가장 흔하게 접하게 되는 술식 중 하나가 되었다. 종양으로 인한 악골의 절제 후에 요구되는 광범위한 골재건술 뿐 아니라 낭종의 제거 후에 발생하는 작은 골 결손부를 수복하기 위해서도 골 이식술이 요구되

는데 골이식 빈도가 증가함에 따라서 골이식술에 사용되는 골이식재에 대한 관심 또한 높아지게 되었다.

기본적으로 골 이식의 목적은 골의 생역학적 역할을 유지하게 하는 골의 기능적 활동을 복원시키는데 있다. 이를 위한 이상적인 골이식재는 첫째, 주변의 생체조직에 염증반응, 독성이나 다른 부작용을 일으키지 않고 적응하는 생체친화성을 지녀야 한다. 둘째, 골전도능을 가질 것, 즉 이식재는 이

차적으로 소위 “creeping substitution” 과정에 의해 제거되고 그 곳으로 혈관이 자라 들어가 골 형성세포의 작용을 증진시키기 위한 캔버스로 작용하여야한다. 셋째, 국소적 간엽세포들의 골형성세포로의 분화를 유도하는 골유도능을 가져야한다. 부가적으로 골수 이식이나 자가골 이식 시에 살아있는 골형성 세포들에서 일어날 수 있는 골생성 능력을 가진다면 더욱 이상적이라 할 수 있다.

이런 점에서 보면 자가골이 가장 좋은 골이식제라고 할 수 있으나 자가골은 그 양의 제한이 있으며 부가적인 수술로 인하여 수술 시간이 길어지고 감염의 위험성이 증가하며 공여부의 이환율과 치사율이 따르며 술후 공여부의 동통등이 있을 수 있다. 이러한 이유들로 인하여 수많은 골이식 대체물질이 연구되어져 왔는데 초기의 대체물질들은 이종골 또는 동종골 이식이였다. 이종골이나 동종골은 많은 부분이 교원질과 무기질로 구성되어 있기 때문에 이식재로서의 그들의 효능은 이식제로서의 정제된 교원질의 유용성과 관련되어 있었다. 주로 동종골 이식제가 많이 사용되어져 왔으나 동종골 이식제는 무균상태와 반복적인 세균학적 조사를 요하는 고비용의 골은행을 유지해야하는 문제가 따른다. 또한 면역학적 반응과 바이러스 감염(hepatitis와 HIV) 등이 최근의 골은행 감소 추세에 원인이 되고 있다.

이종골 이식제는 자가골이나 동종골에 비하여 몇 가지 장점을 지닐 수 있는 골대체물이다. 지난 수십년 동안 골 대체물로 이종골을 이용하려는 시도들이 있어 왔으나 그 결과는 유망하지 못하였고 몇몇 상업적으로 시판된 제품들도 단종되었는데 이는 생체적합성이 좋지 못한 때문이었다²⁾. 그러나 근래에 골생물학에 대한 이해가 깊어지면서 이종골 이식제에 대한 관심이 새롭게 대두되게 되었는데 이러한 시도들 중 과거 역사적으로 교원질 주성분의 연조직 혹은 경조직 동종 이식제가 인체의 여러 주요 기관 결손부를 수복하기 위한 외과의의 요구에 부응해왔음을 주목하여 교원질을 주성분으로 한 이종골 이식제가 개발되었다. 이는 동종골 이식제의 단점과 자가골 이식제를 얻기 위한 부가적인 수술을 피할 수 있는 대체물로 정제된 이종교원질의 유용성과 높은 생체적합성의 장점을 취하여 연조직과 경조직을 수복할 수 있는 새로운 골이식제라 할 수 있다. 동물과 인체 모델에서 이종 교원질에 대한 면역반응이 나타나기는 하였으나 그 수치들은 본질적으로 면역성이 in vivo 상 심각한 부작용과 관계가 없음을 명확히 보여 주었다. 실제로 대부분의 증례들에서 이종 교원질에 대한 항체의 존재는 이식체의 거부를 일으키는 원인이 아니라 일종의 부수적인 현상이었다³⁾.

저자들은 백서의 두개골에 일종의 교원질 기초성 이종골을 이식하고 그 반응 결과를 육안적, 조직학적으로 관찰하는 동물 실험을 통해 교원질을 기초로한 이종골의 골이식제로서의 유용성을 알아보고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

실험재료로는 일정기간 동일 조건하에 사육한 250g 내외의 웅성백서(Sprague-Dawley) 30 마리를 사용하였으며 실험기간에 따라 (1, 2, 4, 8, 16 주) 각각 6마리씩 사용하였다. 실험 동물들은 희생될 때까지 물과 인공사료로 동일한 조건에서 사육하였다.

2. 실험방법

1) 마취

실험동물의 전신마취를 위하여 Kg당 10mg의 ketamine hydrochloride(Ketalar[®], 유한양행)와 Kg당 0.15ml의 2% xylazine hydrochloride(Rompun[®], 한국바이엘)를 근주하였다.

2) 수술 및 투약

통상적인 방법으로 수술부위를 세척하고 분리시킨 후 두정부 피부절개를 시행하고 두개골을 노출 시켰다. 치과용 엔진과 드릴을 이용하여 정중부시상봉합선을 피하여 좌우측에 원형으로 6mm 크기의 골결손부를 형성하였다. 실험동물에서 골재생재료(Bone Repair Material, BRM)의 골재생 효능을 확인하기 위해서는 그 실험동물에 적당한 Critical size defect(CSD)를 적용해야한다. CSD는 자연적으로는 골결손부 크기의 10% 미만만이 숙주의 자가재생능력에 의해서 골치유가 되는 최소의 골크기를 의미하는데, 본 실험에서 사용한 웅성백서(Sprague-Dawley)의 CSD는 6mm³⁾ 또는 8mm³⁾ 인 것으로 보고되고 있다. 이 실험에서는 실험군과 대조군이 동일한 개체에 포함될 수 있도록 설계를 하였고 백서의 두개골 편측에 형성할 수 있는 최대 크기로 여겨지는 6mm의 골결손부를 적용하였다. 그 다음 한쪽 골결손부에 이종골(Laddec[®], Transphyto)을 이식하였으며 아무런 이식을 하지 않은 반대편의 골결손부를 대조군으로 삼았다.

수술이 끝난 다음 창상을 봉합하고 감염방지를 위하여 Cefazolin sodium(Cefamezine[®], 동아제약)을 Kg당 50mg 씩 근주하였다.

3) 조직학적관찰

술 후 1, 2, 4, 8, 16주째 각 실험군의 동물을 Ether를 복강내 과량 투여하여 6 마리씩 희생시키고 경막 및 골막이 손상되지 않도록 결손부를 채취한 후 4% 포르말린에 고정하였다. 탈회 후 통법에 따라 파라핀 포매과정을 거쳐 Hematoxylin-Eosin으로 이중염색하여 광학현미경으로 이식골의 흡수정도, 신생골의 형성, 염증반응 유무 등의 치유과정을 관찰하고 분석하였다.

III. 실험 결과

1. 육안적 소견

실험 후 육안적으로 수술 부위의 염증 소견과 같은 이식 거부 반응이 나타나지 않았으며 상처는 잘 치유되었다.

2. 광학현미경적 소견

1) 대조군

실험 1주째에는 출혈상과 함께 육아조직과 결체조직이 관찰되었고 만성 염증세포가 나타났다. 2주째에는 골 결손부의 양끝에서 신생골의 형성이 시작되는 소견을 보였으며 신생골 주위에는 미분화간엽세포의 밀집상도 관찰되었다. 염증세포는 거의 소실되었고 신생골이 형성되는 부위에서 조골세포의 왕성한 활동이 관찰되었다. 4주째에는 결손부 양 끝에서 활발한 골생성과 함께 결손부 중앙에서도 작은 골편들이 형성되는 소견을 보였다. 8주째에는 형성된 신생골 주위에서 불규칙하게 석회화가 진행되기 시작했고 다른 부위에서의 신생골 형성이 계속되었다. 또한 얇은 판상의 골주들이 양끝과 중앙에서 관찰되었다. 16주째에는 가장자리와 중앙의 신생골 형성이 더욱 진행된 상태로 부분적인 석회화가 일어났으며 일부 골주가 형성되는 소견도 나타났으나 결손부를 완전히 채우지는 못하였다.

2) 실험군

실험 1주째에는 출혈상과 함께 염증세포의 출현이 관찰되었으며 이식된 이종골의 흡수가 시작되는 소견을 보였다. 2주째에는 이종골의 흡수가 보다 활발해지고 이종골의 가장 자리에서 일부 신생골의 생성이 일어나는 소견을 보였다. 4주 및 8주째에는 보다 많은 이종골이 흡수되고 신생골이 형성되며 석회화되는 소견을 보였다. 16주째에는 보다 많은 신생골의 형성이 관찰되었다. 그러나 중앙부위의 이종골은 여전히 흡수되지 않고 이식한 그대로 남아있는 소견을 보였다.

IV. 총괄 및 고찰

악안면부의 경조직 결손을 재건하기 위한 골 이식제에 대한 연구는 오래 전부터 수없이 많은 이루어져왔다. 골이식이 요구될 때 고려할 수 있는 이식제로는 자가골, 동종골, 이종골, 합성성형이물재료 등이 있다. 골이식을 동반한 재건술의 성공이라는 측면에서보면 생체적합성이 가장 우수하고 골생성, 골전도, 및 골 유도능을 모두 갖춘 자가골이 가장 이상적인 골이식제라는 것이 주지의 사실이다. 그러나 자가골 이식은 부가적인 수술이 요구되어 수술 시간이 길어져서 실험혈량이 증가하고 공여부의 동통과 반흔을 남기는 문제를 일

킬 수 있으며 때로 환자의 전신건강이 자가골 이식에 적당하지 않을 수도 있다. 따라서 이를 대체할 수 있는 이식제에 대한 요구가 지속적으로 있어왔다. 이런 것들에는 동종골, 이종골, 합성이물성형재료(alloplastic material)를 들 수 있다. 자가골을 대신하여 동종골이 골대체물질로 활발하게 이용되어 왔다. 국내에서도 동종골에 대한 연구가 많이 보고되고 있으며⁶⁹⁾ 몇 개의 치과 대학에서는 골은행을 운영하고 있다. 그러나 장기 기증이 활성화되어 있지 않은 국내의 현실 때문에 동종골의 공급량이 절대부족하며 골은행의 운영경비도 만만치 않은 것으로 알려져 있다. 즉 동종골 역시 공여량의 제한, 질병의 전이 가능성, 골은행의 필요성, 장기 매매와 같은 윤리적인 문제 등의 제한점을 지니고 있다.

이종골은 이와 같은 문제점들을 극복할 수 있는 대안으로 여겨지지만 높은 항원성 등으로 인하여 사용이 제한되어왔다.

1889년 초 Senn¹⁰⁾은 탈회시킨 후 작은 조각으로 잘라서 알콜로 멸균한 소의 경골을 이용하여 이종골에 대한 연구를 하였다. 그는 이 활력을 상실한 이종골을 골수염의 처치를 비롯한 여러 적응증에 사용하였다. 최근에는 송아지 또는 돼지 새끼의 뼈에서 유래된 Kiel 골 부목이 이식재료 유럽과 미국에서 제한적으로 사용되어졌다^{11,12)}. 이 골은 자른 후 과산화수소로 탈탄백 시키고 탈지방 과정을 거쳐 증기 멸균하였다. 몇몇 임상연구에 따르면 Kiel 골은 신생골 형성에 효과적인 것으로 받아들여졌다^{13,14)}. 그러나 Schweiberer 등¹⁵⁾은 Kiel 골은 아무런 목적도 제공하지 못하며 오히려 신생골 형성을 저해하는 것으로 보고하였다. 더 최근에 Salma와 Weissman은 Kiel 골과 자가골수를 혼합하여 임상적으로 사용할 수 있을 것으로 보고하였다. Kiel 골은 무기질 상으로 고립시키고자 단백질을 완전히 제거했기에 매우 낮은 항원성을 지닌 것으로 알려져 있다. 그러나 골생성 능력 또한 상대적으로 낮은 것으로 보인다. 우골로 만든 Boplant는 세제로 추출하고 탈지방, 화학멸균, 동결건조하여 포장하였다. 초기의 몇몇 연구들은 Boplant를 매우 효과적인 재료로 추천하였다^{16,17)}. 그러나 그 유용성은 의문시되었다. Kramer 등¹⁸⁾은 매식한 Boplant는 무수한 중성구의 유입을 일으키며 이후 거대세포들이 나타나 매식체의 흡수가 따르는 것을 발견하였다. 불만족스러운 결과들이 개에서의 분절 골결손부 모델에서 보고되었다¹⁹⁾. 이러한 다양한 결과들은 이런 복잡한 재료를 이종골로 제조하는데 있어서의 어려움과 교원질-무기질 재료를 오염시키는 비교원질성 면역성 단백질의 존재에 기인하는 것 같다.

동종골 이식에 대한 연구에서 면역반응은 이식제의 세포성 항원에 대하여 합착(mounting)되는 것으로 밝혀졌다^{20,21)} 그러나 동종골 이식제는 수술 후 첫 주 동안에는 자가골과 비슷하게 행동하는 것처럼 보였다. 따라서 동종골에 대한 면역반응이 이식제와 숙주 혈관자리 간의 혈관 문합의 파괴를 일으켰다. 반면에 비세포성 동종골 기질은 상대적으로 미약

한 면역반응을 나타내었다. Langer 등²⁵⁾은 신선냉동 동종골 이식재와 동결건조 동종골 이식재간에 별다른 차이를 발견치 못하였으나 다른 연구들에서는 동결건조 동종골 이식재가 더 좋은 결과를 보였다고 보고하였다^{20,23)}. 골수를 포함하거나 포함하지 않은 신선, 냉동, 그리고 동결건조 동종골 이식재의 항원성을 비교해 본 결과 항원성을 낮추는 양생법은 동결건조 뿐인 것으로 나타났다²⁶⁾. 그러나 동결건조 또한 동종골 이식재의 골형성 능력에는 부정적인 효과를 주는 것으로 나타났다. 동종골 이식재는 면역학적 부작용이 분명함에도 불구하고 여러 임상가들에 의해 다양한 정도의 효과를 보이며 사용되어져 왔다^{25,27)}. 골 이식재로서 동종골을 사용하는 것은 면역성을 감소 시키는 것과 기질 내에서의 골유도 능력을 유지시키는 것 사이의 조화가 이루어 질 때 매우 효과적인 것으로 보여졌다. Urist²⁸⁾은 이러한 조화가 맞아떨어진, 자가분해되며 항원성이 제거된 동종 동결건조골의 사용을 기술하였다. 그러나 멸균에 대한 염려, 바이러스 감염의 가능성, 그리고 동종골의 항원성 때문에 여전히 다른 자가골 이식재 대체 물질이 연구되어 왔다. 이 가운데 교원질 함유 골 이식재의 사용을 생각할 수 있다.

제 1형 교원질은 골에서의 주요 골격 단백질로서 유기 기질의 약 90%를 차지한다²⁹⁾. 따라서 교원질이 많은 연구가들에 의해 골결손부를 연결하는데³⁰⁾, 도제³¹⁾나 금속 임플란트³²⁾의 피막에 사용되어져 온 것은 그리 놀랄 만한 일이 아니다. 이러한 연구들에서 교원질은 조골세포들이 자라 들어올 수 있는 골격을 제공하여 결국 신생골 형성을 일으키는 좋은 전도 기질로서 작용하였다. 또한 교원질 지혈체들은 오랫동안 부작용이 거의 없이 골 부위에 사용되어져 왔다^{33,35)}. Fabinger 등³⁶⁾은 이식재로서 교원질 스폰지를 사용한 결과는 재료의 순수성에 크게 좌우한다 하였는데 이는 비교원질성 오염물이 이식재의 항원성과 염증 잠재성을 현저히 증진시키기 때문이다.

교원질의 생체적합성을 보여주는 여러 연구들에서 보여져 왔다. Mittelmeier 등은 돼지의 피부에서 추출하여, trypsin으로 삭이고 용해시켜서 동결건조 후 방사선조사로 멸균한, 교원질 지혈체와 hydroxylapatite로 구성된 Colipat[®](Oscobal, Swizland)라는 매식재를 사용하였다. 이 매식재로 동물 실험과 임상적용을 하였는데 조직학적으로 염증의 소견을 보이지 않고 활발하게 신생골을 형성하는 생체적합성을 보였다³⁷⁾.

교원질 막의 일종인 Periogen[®](Collagen Corporation)도 개의 치주 실험모델에서 주위의 신생골 형성을 허용하며 생체친화성이 있음을 보여주었다³⁸⁾. 이 연구에서 저자들은 임상적인 부작용 없이 교원질 막 아래에 높은 수준의 골형성이 일어남을 관찰하였다.

교원질에 기초한 골대체물에서 항교원질 항체에 대한 혈청학적 평가도 이루어졌다. Alveoform[®](Collagen Corporation)

이식재는 위축된 상악과 하악 무치악 치조제의 증강술에 사용된 일종의 골이식재이다. 이것은 소의 진피에서 유래된 정제된 섬유성 교원질과 hydroxylapatite로 구성되었다. 임상시험에서 이 재료는 이식 3개월 후 심각한 부작용 없이 모든 환자에서 양호한 경화 상태와 안정성을 나타내었다³⁹⁾. 이 77명의 환자들의 혈청에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 사용하여 소의 교원질 항체에 대한 평가를 시행하였다. 5명의 환자가 술전의 혈청에서 소의 교원질에 대한 기존 항체가 나타났고 술후 추가로 5명의 환자에서 항체가 나타났다. 그러나 소의 교원질에 대한 순환 항체의 존재는 치조제의 증강이나 견고도에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 이것은 소의 교원질에 대한 기존의 또는 유도된 면역학적 반응의 존재가 이 이식재료의 임상적 효과에는 중요하지 않음을 의미하였다.

다른 생체재료인 Collagraft[®](Collagen Corporation and Zimmer, Warsaw, Indiana)는 공이식 대체재료인데 정제된 섬유성 교원질, 펩신 추출성 소의 진피 교원질, 그리고 hydroxylapatite/tricalcium phosphate (HA/TCP)로 구성되었다. 개를 모델로 한 실험에서 Collagraft를 골에 매식하고 4주 간격으로 방사선학적 검사를 시행하고 수술 24개월 후에 조직학적으로, 생역학적인 평가를 시행하였으며 한달 간격으로 혈청검사를 시행하였다⁴⁰⁾. 18마리 중 4마리에서 소의 교원질에 대한 항체가 160 - 320 역가로 나타났다가 24주 경에 낮아졌다. 그러나 Collagraft를 이식한 모든 동물에서 골의 융합이 일어났기에 교원질에 대한 항체의 존재는 이 골 대체물의 임상적 결과에 중요치 않았으며 골재생에도 부정적 영향을 미치지 않는 것으로 보였다.

117명의 자가골 이식 대조군과 134명의 Collagraft 이식 실험군을 통한 임상시험에서 ELISA로 교원질에 대한 항체검사를 시행하였다⁴¹⁾. 대조군에서는 교원질에 대한 항체가 나타나지 않았고 Collagraft를 이식한 실험군에서는 10명(7.5%)에서 소의 진피 교원질에 대한 항체가 나타났는데 최대 항체 역가는 160에서 640 범주였다. 이 중 8명은 12개월 후에 역가가 경계수준으로 떨어졌다. 항체가 나타난 10명 중 3명에서 술후 합병증이 발생하였으나 이것이 교원질 항체와 관련된 것은 아니었으며 자가골을 이식한 대조군에서도 같은 빈도의 합병증이 나타났다. 따라서 이 임상 결과는 교원질 매식체에 대한 면역학적 반응이 대부분의 사람에서 일어나지 않으며 간혹 소의 교원질에 대한 항체가 나타난다 하여도 매식체의 효능과 안정성에는 아무런 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

이종골이나 동종골들에 대한 초기의 연구들은 면역학적 반응이 이식재의 효과에 대한 제한이 될 수 있다는 점을 분명히 보여주었다⁴²⁾. 그러나 전술한 연구들에서 언급한바와 같이 항교원질 항체의 빈도와 역가는 낮았으며 또한 교원질에 대한 항체의 존재는 임상적인 결과에 아무런 영향을 미치

지 않았으며 임상적인 부작용을 일으키지도 않았다. 이러한 제재들에 대한 면역학적 반응은 세포성 혹은 혈장 단백질의 오염에 의한 것이며 정제된 교원질-무기질 기질 때문은 아니었다.

이 실험에서 사용된 이종골(Laddec®, Transphyto)은 교원질을 기반으로 하고 있으며 과거에 사용되었던 이종골과는 몇 가지 다른 특징을 가지고 있다. Laddec은 변성이 없이 송아지 망상골의 무기질-교원질 기질의 분리와 정제를 가능케 하는 방법으로 얻어진다. 장시간의 정제 과정을 거쳐서 Laddec은 단지 2% 정도의 비교원질성 단백질을 함유하고 있으며 어떤 염증 반응도 일으키지 않는 것으로 알려져 있다. 또한 광범위한 탈지방 과정은 이 이식재의 wettability를 높였고 혈관 새순들과 골형성세포들의 접근을 용이하게 하였다.

임상적으로 골 이식재를 제조하는 과정에서 사용하는 탈지방 과정은 매우 중요한 것으로 여겨진다. Thoren⁴²⁾은 최근 은행 동종골에서 chlorform/methanol로써 지방을 추출하였을 때 이식재료의 신생골 침투가 매우 증가함을 발견하였다. 이 현상은 이식재의 피사성 연조직 함량을 줄임으로 혈관 싸과 골형성세포들의 접근이 용이하게 된 것과 연관된 것 같다. 완전한 지방제거에 대한 다른 이유는 이것이 염증특성을 지닌 물질이라는 점이다. 동종골의 저장 중에 지방의 분해가 관찰되었으며 염증이 골형성을 감소시키는 것으로 알려져 있다⁴³⁾. 이식된 생체재료의 wettability는 혈관의 침투에 즉시 노출되도록 하는 가장 중요한 요소로 여겨진다. 또한 이식재의 wettability는 치과 임상에서 낭(pouches)을 밀봉하는데 유용한 것으로 사료되며 이 재료는 숙주 조직과의 밀착성이 높아 조작이 쉽다⁴⁴⁾.

Butler 등⁴⁵⁾은 골내의 지방이 직접적으로 항원 역할을 하여 골유도 능력에 부정적 영향을 미친다고 보고하였으며 탈지방을 위하여는 에테르나 순수 알코올 또는 클로르포름 등을 이용한 방법을 사용하는 것이 골형성 단백질을 파괴하지 않고 골기질을 변성시키지 않으며 항원성을 감소시키는 효과가 있어서 적당하다고 하였다.

이⁴⁶⁾는 동종골의 처리 방법에 따른 골 치유능력에 관한 연구에서 동종 탈회골 내의 지방이 골형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 쥐의 두개골 및 장골에서 채취한 탈지방 동종골과 비탈지방 동종골을 이용하여 세포독성검사를 시행하였다. 그 결과 섬유모세포와 골모세포에서 탈지방 동종골이 비탈지방 동종골에 비하여 세포독성이 적었다고 보고하였다. 또한 SEM 소견에서 탈지방을 시행한 동종골이 지방이 빠져나간 공간으로 사라되는 만큼의 다공성이 증가되어 있는 것을 관찰하였다. 따라서 동종탈회골 제작시 탈지방을 하는 것이 골유도 능력에 유리하다고 하였다.

Laddec은 고도로 정제되고 탈지방 시켜 0.3% 이하의 지방을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이 wettability의 증가는 모든 지방과 골소주간 공간에 있는 지방성 잔존물을 제거하

기 위한 광범위한 탈지방 과정과 관련된다. 숙주세포들은 동종골 내의 모든 부적절한 피사성 지방조직을 제거 해야만 하기 때문에 저장 중의 지방의 화학적 변성은 동종골의 용해를 더욱 지연 시키게 된다.

알려진 Laddec의 제조 공정은 다음과 같다. 승인된 도살장에서 도살한 4 - 6개월 된 송아지의 대퇴과두(femoral condyle)를 육면체의 절편으로 잘라서 -20°C에서 냉동 보관한다. 균등하지 못한 골소주나 피질골부나 연골이 포함된 절편은 제외시켰다. 절편을 서서히 해동시킨 후 연속적인 추출 과정을 거친다. Ethanol/dichloromethane 혼합물로 탈지방 시키며 20°C에서 8M urea로 structural glycoproteins와 proteoglycans를 추출한다. 55°C 온수에서 세척한 후, PH 4인 4M phosphate buffer에 노출시킨 후, ethanol로 헹구고 건조시킨다. 이것의 생화학적 분석에 따른 평균함량은 수분 9%, 지방 0.3% 이하, 무기질 62%, 교원질 27%, 비교원질성 단백질 2%인 것으로 알려져 있다. 즉 Laddec은 고도로 정제된 이종골로서 천연 골 무기질과 교원질이 그대로 보존된 형태이다. Laddec의 정제 과정은 모든 골수 성분이 제거된 망상골 구조를 남기는 것에 맞추어져 있다. 이 정제 과정에는 골의 천연 무기질과 교원질을 변성시키지 않는 순한 용매를 사용하였다. 물리적으로 또한 면역학적으로 장애가 될 수 있는 골수 성분을 제거함으로 골전도 능력이 크게 향상되며, 골의 천연 무기질과 교원질 구조가 그대로 남겨져 있기 때문에 숙주 골 세포들 생리적인 골개조를 위한 천연 기질로서 인식하게 된다는 것이 제조회사측의 주장이다.

골이식재로서 사용될 수 있기 위해서는 최소한 두 가지의 요건을 갖추어야 한다. 첫째, 면역학적으로 거부반응이 없이 생체적합성을 가져야 하며, 둘째, 골유도 또는 골전도 능력을 가지고 있어서 골의 재생을 도와 주어야 한다.

과거 이종골의 경우 생체적합성이 좋지 않은 것이 가장 큰 문제점으로 여겨졌다. 면역학적 거부반응을 줄이기 위한 방법으로는 끓이기, 단백질 제거, 건열, 포르말린 처리법, 고압 증기 멸균법, 화학약품 사용(merthiolating), 냉동, 동결건조, 방사선 조사 등이 사용되어져 왔다. 이중 동결건조 방법이 매우 효과적으로 항원성을 낮추는 것으로 알려져 있으며 널리 이용되고 있다⁴⁶⁻⁴⁸⁾. 임상적으로는 냉동건조탈회 동종골이 이식 후 면역반응이 무시할 정도로 적어 좋은 결과를 얻었다는 보고도 있지만⁴⁹⁾, 이 또한 완전히 항원성을 제거하지는 못하는 것이 사실이며⁵⁰⁾, 장기간의 추적조사 결과 이식한 골의 약 50% 이상이 흡수되었다는 보고도 있다⁵¹⁾. 이 실험 결과 Laddec은 육안적으로 거부반응의 증거가 나타나지 않았고 광학현미경 상에서도 생체적합함을 보여주었다.

골이식 후의 치유과정은 크게 두 가지 기전으로 이루어진다. 첫째는 골전도(osteoconduction) 과정으로 골결손부의 변연부에서 골아 세포가 자라들어 오고 무기질이 침착되어 신생골을 형성하는 것을 말하며 'creeping substitution' 현상으

로 설명되어진다. 둘째는 골유도(osteinduction) 과정으로 매식체가 주위로부터 미분화간엽세포들을 끌어 모아 골세포로 분화시켜 신생골을 형성하는 것을 말한다. 이 과정에는 골형성유도단백질(bone morphogenic protein, BMP)이 관여하는 것으로 알려져 있는데 이것은 골유기질내에 존재하고 있다가 골의 무기질이 제거되면 방출되어 활성화되며 매식체 쪽으로 미분화간엽세포들이 화학주성(chemotaxis) 현상으로 모이게 하고 골전구세포들로 분화시킨다. 이들이 결국 조연골세포(chondroblast)나 조골세포(osteoblast)로 분화되어 골을 형성하게 된다^{52,53}. 골을 이식하였을 때 이식골 내부에서 연골 또는 골 형성 징후가 있는 경우 골유도 능력이 있다고 간주되며, 이러한 현상이 없이 주위로부터의 조건에 의하여 골형성이 되는 경우는 골전도 능력만을 가진다 볼 수 있다.

골유도는 골전도에 비해 보다 적극적인 골형성 과정으로 여겨지며 매식체에서 골유도 현상이 활발하기 이루어질수록 골의 형성속도가 빠를 것으로 기대되어지는데 그 정도는 골의 처리방법에 따라 달라질 수 있다. 대부분의 골이식재(자가골, 동종골, 이종골, 합성이물성형재료)는 골전도능력을 갖고 있는 것으로 알려져 있고 골유도 능력을 지닌 것으로는 자가골과 동종탈회골을 들 수 있다⁵⁴.

동결건조 동종골은 골형성유도단백질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있는데 이를 탈회시킬 경우 단백질이 노출되어 골형성유도단백질이 주위의 골전구세포들에 작용할 기회가 증가하여 그 발현과 작용이 보다 활발하게 될 수 있음을 기대할 수 있다^{55,56}. 반면 끓이거나 화학약품사용법으로 처리한 경우 골형성유도단백질의 변성을 초래할 수 있고 결과적으로 골유도 능력을 소실하게 된다⁵⁷. 또한 골내 유기성분을 응고시켜 숙주세포가 이들을 제거하기가 어렵게 만들기 때문에 잘 사용하지 않고 있다.

한편 동종골의 골유도 능력은 그 제작 과정에 따라 현저한 차이를 보이는 것으로 알려져 있는데 골을 탈회 시키는 농도는 0.5N이나 0.6N이 적당한 것으로 보고되었고⁵⁸, 골편보다는 골조각이 더 좋은 것으로 보고되었으며^{59,60}, 조각의 크기는 200-700um가 가장 이상적인 것으로 보고되었고⁶¹, 이식상의 혈액 공급이 풍부한 경우에 골유도가 더 활발하게 일어나는 것으로 보고되었다⁶². 그러나 어떤 경우도 자가골 보다는 미약한 골유도 능력을 보였다.

이 실험 결과 교원질을 기초로 한 이종골은 골유도 능력은 가지고 있지 않은 것으로 보이며 골전도 능력을 갖고 있는 것으로 나타났다. 그러나 골전도가 이루어지기 위해서는 이식한 골이 흡수되면서 신생골로 대체되어야 하는데 Laddec은 그 흡수 속도가 느린 것으로 나타났다. 따라서 이 이종골은 신속한 골개조가 요구되지 않는 부위, 즉 하중이 가해지지 않는 동공성 골결손부의 수복에 유용할 것으로 사료된다.

V. 결 론

저자들은 교원질을 기초로한 이종골의 골이식재로서의 유용성을 알아보기 위하여 백서의 두개골에 일종의 교원질 기초성 이종골을 이식하고 1, 2, 4, 8, 16 주에 걸쳐서 조직학적으로 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험 1주째에는 대조군과 실험군 공히 염증세포의 출현이 나타났으며 실험군에서는 이식된 이종골의 흡수가 시작되는 소견을 보였다.
2. 2주째에는 대조군과 실험군 공히 염증세포의 침윤이 감소하였고 실험군에서 이종골의 흡수가 보다 활발해지고 이종골의 가장자리에서 신생골의 생성이 일어나는 소견을 보였다.
3. 4주 및 8주째에는 실험군에서 보다 많은 이종골이 흡수되고 신생골이 형성되고 석회화되는 소견을 보였다.
4. 16주째에는 대조군의 경우 일부의 골주가 형성되었으나 완전히 결손부를 회복하지 못하였으며 실험군에서는 이식골의 흡수가 진행되고 보다 많은 신생골의 형성이 관찰되었다. 그러나 중앙부위의 이종골은 여전히 흡수되지 않고 이식한 그대로 남아있는 소견이었다.
5. 이상의 결과가 이 실험에 사용된 교원질 기초성 이종골은 골유도 능력은 없었으나 골전도 능력을 갖고 있는 것으로 보이며 빠른 골개조가 필요치 않은 골결손부의 수복재로 사용할 수 있을 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Lane, J. M., Sandhu, H. S. : Current approach to the experimental bone grafting. Orthop. Clin. North Am. 18 : 213, 1987.
2. Salama, R. : Xenogenetic bone grafting in humans. Clin. Orthop. Rel. Res. 174 : 113, 1983,
3. DeLustro, F., Dasch, J., Keefe, J., Ellingsworth, L. : Immune responses to allogenic and xenogenic implants of collagen and collagen derivatives. Clin. Orthop. Rel. Res. 260 : 263, 1990.
4. 윤도철, 이재훈, 임한옥, 김기환, 김경옥 : 백서 두개골에 형성된 골결손부 크기에 따른 골 치유 과정에 대한 조직학적 연구. 대한구강악안면외과학회지 21 : 36, 1995.
5. Mulliken, J. B., Glawacki, J. : Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. Plast Reconstr Surg 65 : 553, 1980.
6. 정필훈 : 냉동건조 은행골의 개발 및 이의 실험적 연구. 대한악안면성형재건외과학회지. 18 : 164, 1996.
7. 임창준 : 동종 골 이식을 이용한 구강악안면 재건. 대한악안면성형재건외과학회지. 19 : 217, 1997.
8. 이동근 : 동종골의 처리 방법에 따른 골 치유 능력에 관한 실험적 연구. 대한구강악안면외과학회지. 23 : 43, 1997.
9. 김영조, 엄인용, 이동근, 김수남 : 냉동건조 탈회골편의 치유 과정에 관한 조직학적 연구. 대한구강악안면외과학회지. 19 : 432, 1993.
10. Senn, N. : On the healing aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. Am. J. Med. Sci. 98 : 219, 1889.
11. Maatz, R., Lentz, W., and Graf, R. : Die knochenbildungsfahigkeit konservierter spane : Ein beitrag zur knochenbank. Zentralbl. Chir. 77 : 1376, 1952.

12. Maatz, R., Lentz, W., and Graf, R. : Spongiosa test of bone grafts. *J. Bone Joint Surg.* 36A : 721, 1954.
13. Bauermeister, A. : Die behandlung von zysten, tumoren und entzündlichen prozessen des knochens mit dem "kieler Knochen-span". *Bruns. Beitr. Klin. Chir.* 203 : 287, 1961.
14. Maatz, R. : klinische erfahrungen mit dem eiweißarmen tierspan: langensbecks. *Arch. Chir.* 292 : 831, 1959.
15. Schweiberer, L. : Experimentelle untersuchungen von knochen-transplantaten mit unveränderter und mit denaturierter knochengrundsubstanz. *Hfte unfallheilkunde* 103 : 1, 1970.
16. Bassett, C. A. L., and Creighton, D. K., Jr. : A comparison of host response to cortical autografts and processed calf heterografts. *J. Bone Joint Surg.* 44A : 842, 1962.
17. Karges, D. E., and Anderson, K. J., Dingwall, J. A., and Jowsey, J. : Experimental evaluation of processed heterogenous bone transplants. *Clin. Orthop.* 29 : 230, 1963.
18. Kramer, I. R. H., Killey, H. C., and Wright, H. C. : The response of the rabbit to implants or processed calf bone (Boplast). *Arch. Oral Biol.* 13 : 1263, 1968.
19. Heiple, K. G., Kendrick, R. E., Herndon, C. H., and Chase, S. W. : A critical evaluation of processed calf bone. *J. Bone Joint Surg.* 49A : 1119, 1967.
20. Enneking, W. F. : Immunologic aspects of bone transplantation. *South. Med. J.* 55 : 894, 1962.
21. Langer, F., Czitrom, A., Pritzker, K. P., and Gross, A. E. : The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *J. Bone Joint Surg.* 57A : 216, 1975.
22. Chalmers, J. : Transplantation immunity in bone homografting. *J. Bone Joint Surg.* 41B : 160, 1959.
23. Heiple, K. G., Chase, S. W., and Herndon, C. H. : A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *J. Bone Joint Surg.* 45A : 1593, 1963.
24. Elves, M. W. : Cell mediated immunity of allografts of fresh treated bone. *Int. Orthop.* 2 : 171, 1978.
25. Kosinen, E. V. S., Salenius, P., and Alho, A. : Alogeneic transplantation in low-grade malignant bone tumours. *Acta Orthop. Scand.* 50 : 129, 1979.
26. Spenic, K. F., Sell, K. W., and Brown, R. H. : Solitary bone cyst : Treatment with freeze-dried cancellous bone allograft: A study of one hundred seventy-seven cases. *J. Bone Joint Surg.* 51A : 87, 1969.
27. Tomford, W. W., Doppelt, S. H., Mankin, H. J., and Friedlaender, G. E. : 1983 bone bank procedures. *Clin. Orthop.* 174 : 15, 1983.
28. Urist, M. R. : Bone formation by autoinduction. *Science* 150 : 893, 1965.
29. Veis, A. : Bones and teeth. In Piez, K. and Reddy, A. H. (eds.) : *Extracellular matrix biochemistry.* New York, Elsevier, 1984, p.339.
30. Cobb, C. M., Howell, B. E., Cray, R. C., and Weatherford, T. W. : Potential of elastin and collagen as initiators of in vivo calcification. *Oral Surg.* 41 : 24, 1976.
31. Blumenthal, N. M. : Enhancement of osseointegration of tricalcium phosphate coated-titanium endosseous implants with collagen. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 7 : 129, 1987.
32. Todescan, R., Pilliar, R. M., and Melcher, A. H. : A small animal model for investigating endosseous dental implants: Effect of graft material on healing of endosseous, porous-coated surfaced implants placed on fresh extraction socket. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2 : 217, 1987.
33. Benoit, P. W., and Hunt, L. M. : Comparison of a microcrystalline collagen preparation and gelatin foam in extraction sites. *J. Oral Surg.* 34 : 1079, 1976.
34. Laskin, J. L., Lucas, W. J., and Davis, W. M. : The effect of granular gelatin preparation on the healing of experimental bone defects. *Oral Surg.* 52 : 23, 1981.
35. Olson, R. A., Roberts, D. C. and Osborn, D. B. : A comparative study of polylactic acid, Gelform and Surgicel in healing extraction sites. *Oral Surg.* 60 : 235, 1986.
36. Fabinger, A. Krekeler, G., and Vogel, D. : Anwendungsmöglichkeiten von kollagen zur parodontalen knochentasche. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 35 : 9, 1980.
37. Mittelmeier, H., and Kathanghen, B. D. : Klinische erfahrungen mit collagen-apatite-implantation zur lokalen knochenregeneration. *Z. Orthop.* 121 : 115, 1983.
38. Pfeifer, J., von Swol, R. L., and Ellinger, R. : Epithelium exclusion and tissue regeneration using collagen membrane barrier in chronic periodontal defects: A histologic study. *Int. J. Periodont. Restor. Dent.* 9 : 263, 1989.
39. Mehlich, D. R., Taylor, T. D., Leibold, D. G., Hiatt, R., Waite, D. E., Waite, P. D., Laskin, D. M., and Smith, S. T. : Collagen/hydroxyapatite implant for augmenting deficient alveolar ridge. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 44 : 839, 1988.
40. Grundel, R. E. : bone replacement using a collagenhydroxyapatite calcium phosphate composite bone substitute material. Ph.D. Thesis, University of California, Davis, 1989.
41. Elves, M. W., and Salama, R. : A study of development of cytotoxic antibodies produced in recipients of Xenografts (heterografts) of iliac bone. *J. Bone Joint Surg.* 56B : 331, 1974.
42. Aspenberg, P., Thoren, K. : Lipid extraction enhances bank bone incorporation. An experiment in rabbits. *Acta Orthop. Scand.* 61 : 546, 1990.
43. Mularchuk, P., Boskey K. : Lipid in bone. optimal conditions for tissue storage prior to lipid analysis. *Calcif. Tissue Int.* 46 : 57, 1990.
44. Clairet, A., Bussac, G. : Les complements osseux mandibulaires et maxillaires, etude d'un nouveau materiau. *Int. Dent.* 22 : 1775, 1991.
45. Butler, W. T., Mikulski, A., and Urist, M. R. : noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity. *I. Dent. Res.* 56 : 228, 1977.
46. Chalmer, J. : Transplantation immunity in bone homografting. *J. Bone Joint Surg.* 41B : 160, 1959.
47. Turner, T. C., Bassett, C. A. L., Pate, J. W., et al. : An experimental comparison of freeze-dried and frozen cortical bone-graft healing. *J. Bone Joint Surg.* 37A : 1197, 1955.
48. Lee C. W., Yim C. J., and Lee D. K. : An experimental study on tissue response following implantation of the freeze-dried bone and radiation-sterilized allogenic bone in *Retus abdominalicus* of the Rat. *J. Korea Biomaterial Research Institute.* 2 : 134, 1992.
49. Ellis III, E., and Sinn, D. P. : Use of Homologous Bone in Maxillofacial Surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 51 : 1181, 1993.
50. Friedlaender, G. H., Strong, D. M., and Sell, K. W. : Studies on the antigenicity bone. II. Donor-specific anti-HLA antibodies in human recipients of freeze-dried allografts. *J. Bone Joint Surg.* 66A : 107, 1984.
51. Toriumi, D. M., Larrabee, W. F., Walike, J. W., Millay, D. J., and Eisele, D. W. : Demineralized bone implant resorption with long-term follow-up. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.* 116 : 676, 1990.
52. Urist, M. R., and Strates, B. S. : Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* 50(Supplement) : 1392, 1971.
53. Mulliken, J. B., Glowacki, J. : Induced osteogenesis for repair and reconstruction in the craniofacial region. *Plast. Reconstr. Surg.* 6 : 551, 1980.
54. Gendler, E. : Perforated demineralized bone matrix: A new form of osteoinductive material. *J. of Biomaterials Research* 20 : 687, 1986.
55. Urist, M. R. : Isolation and characterization of bone morphogenetic protein. In : *Bone Grafting: Biology and Application.*

- Plastic Surgery Research Foundation of San Diego and the Bone and Joint Disease Foundation Course. Dec. 4 : 6, 1981.
56. Urist, M. R., and Strates, B. S. : Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Clin. Orthop. 71 : 271, 1970.
 57. Urist, M. R. : Surface-decalcified allogeneic bone implants. Clin. Orthop. 56 : 37, 1968.
 58. 엄인웅, 이동근, 김현진 : 동종골의 탈회에 사용되는 HC1의 S-mutans에 대한 항균효과. 대한구강악안면외과학회지 18(2) : 61, 1992.
 59. 김영조, 엄인웅, 이동근, 김수남 : 냉동 건조 탈회골편의 치유과정에 관한 조직학적 연구. 대한구강악안면외과학회지 19(1) : 79, 1993.
 60. 전영환, 김영조, 엄인웅, 민승기, 이동근 : 가토탈회 동종 골편 이식시 조직반응에 관한 연구. 대한악안면성형재건외과학회지 15 : 63, 1993.
 61. 방만혁, 엄인웅, 이동근, 민승기 : 동종 탈회골의 크기가 유도골 형성에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한악안면성형재건외과학회지 17 : 350, 1995.
 62. 권혁도, 이동근, 엄인웅, 민승기 : 냉동 건조탈회 동종골 이식 후 골막이 골 형성 과정에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한악안면성형재건외과학회지 17 : 337, 1995.

저자연락처

우편번호 361-763
충북 청주시 흥덕구 개신동 62번지
충북대학교 의과대학 치과학교실
조용석

원고 접수일 1998년 12월 2일
게재 확정일 1999년 1월 26일

Reprint requests

Yong-Seok Cho
Dept. of OMFS, School of Medicine, Chungbuk National Univ.
62, Gaeshin-Dong, Heunhdeok-Gu, Cheongju, Chungbuk, 361-763, KOREA
Tel. (0431)269-6294 Fax. (0431)269-6387

Paper received 2 December 1998
Paper accepted 26 January 1999

사진부도설명 ①

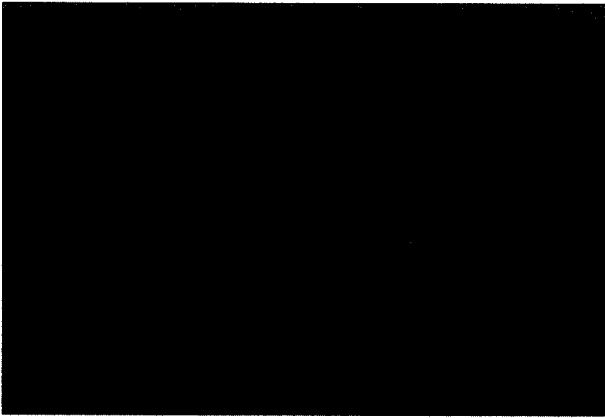


Fig. 1. Control 1 week (H & E, ×50) RBCs and inflammatory cells infiltration are seen.

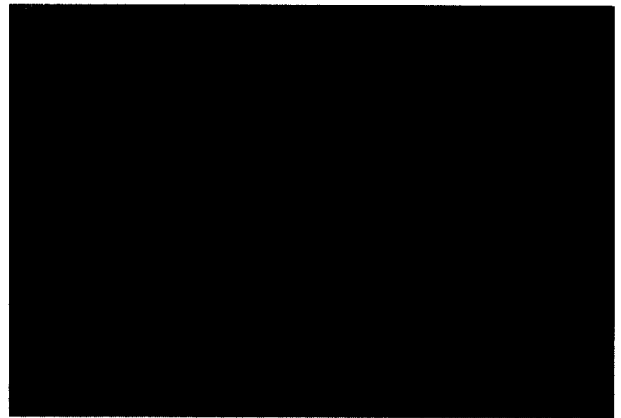


Fig. 2. Control 2 weeks (H & E, ×50) Inflammatory cells are reduced and weak new bone formation is seen.

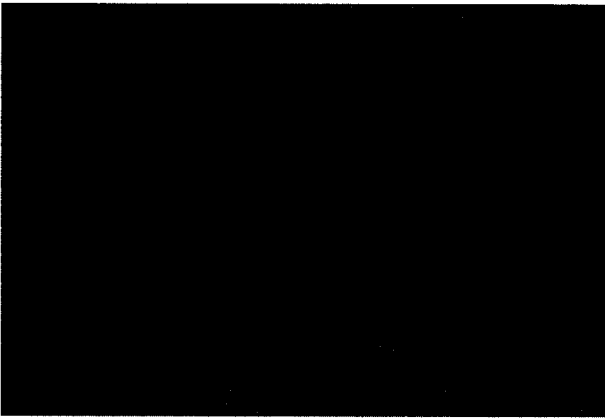


Fig. 3. Control 4 weeks (H & E, ×50) Relatively active new bone formation is seen at the margin and the center of the bone defect.

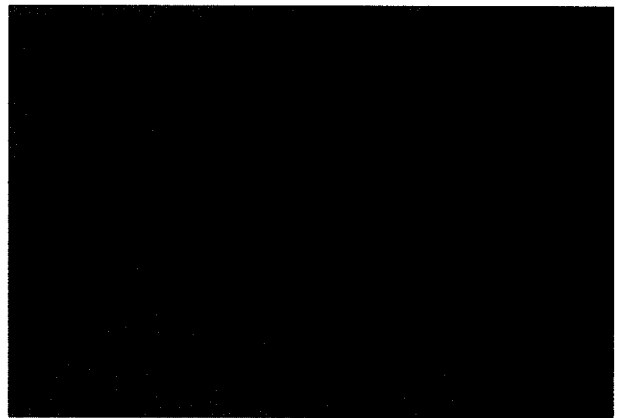


Fig. 4. Control 8 weeks (H & E, ×50) Continuous new bone formation with calcification is seen.

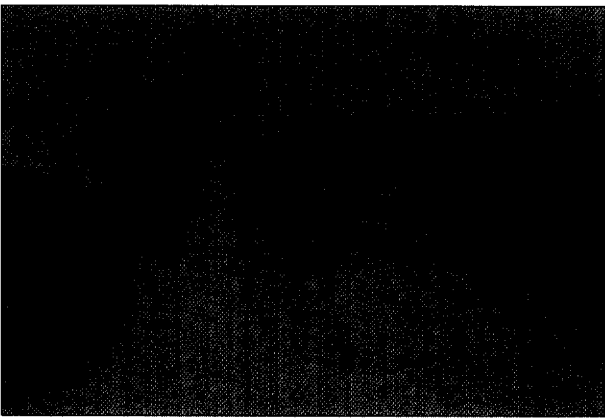


Fig. 5. Control 16 weeks (H & E, ×50) More new bone is formed but incomplete to fill the whole defect.



Fig. 6. Experimental 1 week (H & E, ×50) Many RBCs and inflammatory cells infiltration are seen and resorption of the xenograft was initiated.

사진부도설명 ②

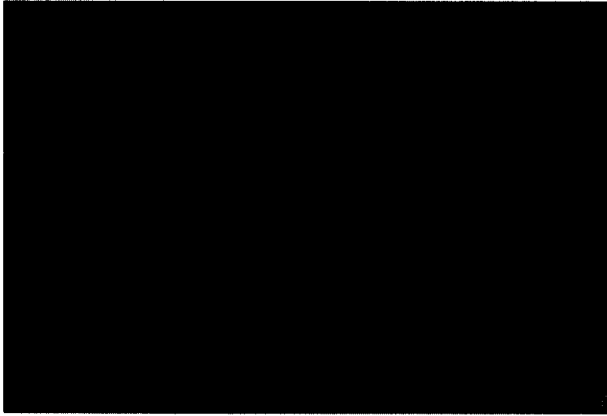


Fig. 7. Experimental 2 weeks (H & E, ×50) Inflammatory cells infiltration are reduced and resorption of the xenograft continued.

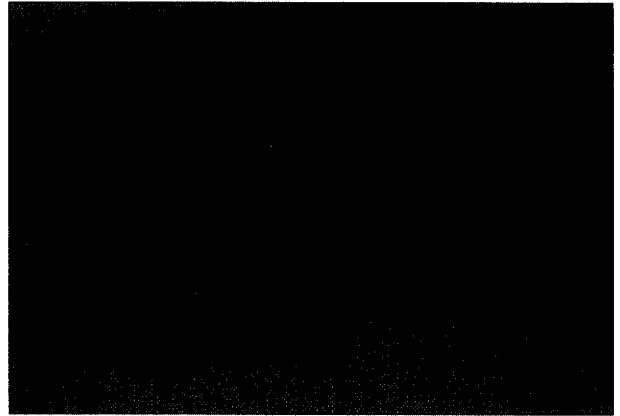


Fig. 8. Experimental 4 weeks (H & E, ×50) More resorption and new bone formation is seen from the periphery of the xenograft.

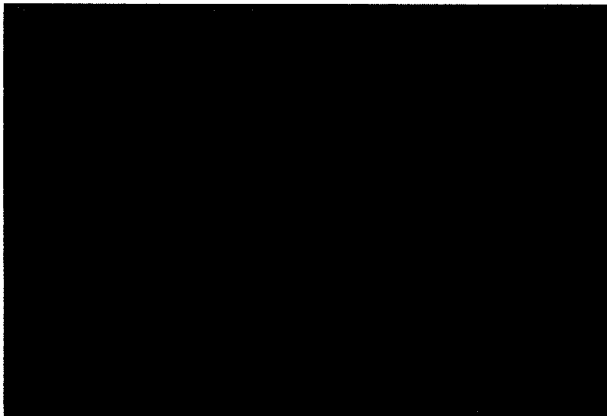


Fig. 9. Experimental 8 weeks (H & E, ×50) More resorption and new bone formation is seen from the periphery of the xenograft.

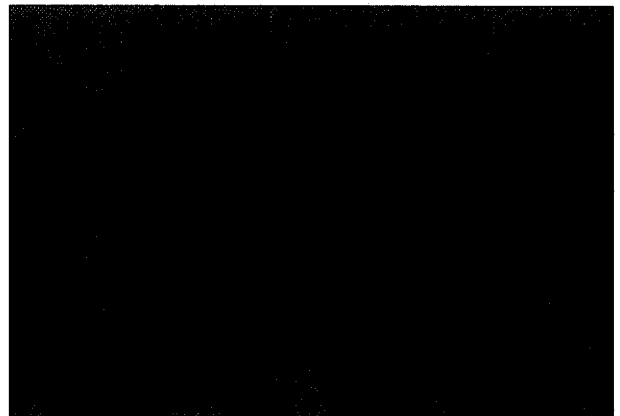


Fig. 10. Experimental 16 weeks (H & E, ×50) Much more but incomplete resorption of the xenograft and new bone formation is seen.