

한우 대퇴골의 연골내골화에 관한 조직화학적 연구

김 수 명 · 양 홍 현* · 백 영 기*
대전대학교 한의과대학 · 전북대학교 수의과대학*
(1991. 2. 5 접수)

Histochemical study on the endochondral ossification of the native Korean cattle femur

Soo-myung Kim, Hong-hyun Yang*, Young-ki Paik*
College of Oriental Medicine, Taejon University
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University*
(Received Feb 5, 1991)

Abstract: The present study was undertaken to provide basic data on fetal endochondral ossification for the native Korean cattle femur. This study was determined to the both earliest stages of chondrification and ossification by histochemical methods.

The forty-five pairs of femur, from a series of embryos and fetuses ranging from 11 to 100mm in crown-rump(C-R) length, were used. These samples were divided into 9 groups. The groupings were based on C-R length, as the first grouping being 11~20mm, the second grouping being 21~30mm and so on.

The results were as follows:

1. Alcianophilia and PAS reaction were markedly increased in the perichondrium and interterritorial matrix in the 3rd group(C-R length 31~40mm). These reactions were decreased in the territorial matrix and in the adjacent area to the cartilage canal in the 5th group(C-R length 51~60mm).
2. Calcium deposits and collagen substances were observed initially in the 3rd group(C-R length 31~40mm). The calcium deposits and calcified cores were observed in the trabeculae of the proximal epiphyseal plate of the femur in the 8th group(C-R length 81~90mm).

Key words: histochemistry, endochondral ossification, femur, Korean cattle.

서 론

동물의 태자(fetus) 골격발생은 배자기의 발생 정도 및 모체와 태자 사이의 환경변화를 나타내주는 유용한 지표가 되므로 정상적인 골격발생의 표준치는 발육과정을 판단하는데 많은 도움을 주는 것으로 알려져 있다.¹ 대퇴골의 발생은 연골내골화(endochondral ossification) 과정에 의하여 진행되며 장차의 골은 초자연골원형(hyaline cartilage model)으로부터 점차적으로

골로 전환되는 것이다.

사람 태자를 비롯한 각종 실험동물에서 연골내골화 과정을 형태학적으로 연구한 업적을 살펴보면, 사람 배자(embryo) 대퇴골의 발생은 간엽세포에서 기원하고 임신기간이 경과함에 따라 점차 연골화 되며 이어 대퇴골이 형성된다고 보고한 이래², 방사선학적 연구, alizarin red S 염색법 및 조직학적 방법을 이용하여 배자 초기의 연골발생과 골발생에 관한 연구가 진행되어 왔다. 많은 연구자들은 사람에서 배자기의 골화 시

기와 연골이 골로 전환되는 일반적인 형태학적 변화를 보고하였고^{3,4,5,6,7,8,9,10}, 가축에 있어서는 태지 태자에 질산은 또는 질산연과 같은 중금속을 침착시킴으로써 방사선학적으로 골화과정을 더욱 명백히 규명하였다.¹¹ 또한 조류에서도 연골과 골의 조직 발생 및 장골에서 골화시기를 연구하였을 뿐만 아니라^{12,13}, 배자의 연골 재흡수 과정을 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하였다.¹⁴ 실험동물인 흰쥐에서도 골화시기, 연골발생과 골 발생에 대한 초기단계의 형태적 관찰과¹⁵, 흰쥐의 대퇴골의 골간단부(metaphysis) 골형성에 관하여 전자현미경적으로 연구 보고한 바 있다.¹⁶ 또한 mouse 배자의 요골에서 연골내골화의 초기단계를 전자현미경으로 관찰하였고¹⁷, 토끼 대퇴골의 원위 골단판(distal epiphyseal plate)을 주사전자현미경을 사용한 연구에서 비대연골대의 세포와 골기질의 퇴행성 변화를 관찰하였다.¹⁸

한편, 연골내골화 과정 중 연골관(cartilage canal)의 형성에 관한 연구도 활발히 진행되어서 연골관의 역할에 대해 병아리의 경골(tibia)¹⁹, 흰쥐의 대퇴골²⁰, 사람의 대퇴골 발생부위²¹에 대해서 연구했으며, 연골관의 형태와 분포에 대하여 사람의 상완골⁸, 개의 상완골²², mouse 대퇴골²³을 대상으로 관찰한 바 있고, 개의 상완골 근위골단연골판 연골관의 침단 인접부에서 골화가 시작됨을 보고한 바 있다.²⁴ 또한 연골의 골화 과정 중 연골기질내에서 주로 볼 수 있는 proteoglycan의 변동에 관해서는 소태자(bovine fetus)의 장골(long bone)에서 보고한 바 있으며^{25,26}, 골단연골판의 골기질공포내의 지질에 대해서도 보고한 바 있다.²⁷

최근에는 체지의 형태발생을 분석하는 것은 발생 과정을 취급하는 생물학 분야에서 중추적인 역할을 하고 있다.²⁸ 그러나 대동물인 소의 체지형태 발생에 관한 실험은 송아지²⁹와 신생 태자³⁰ 사지골의 골화에 대한 보고는 극히 희소하며 한우에서는 대퇴골 골발생에 관한 보고³¹와 대퇴골 골단연골판 형성에 관한 보고가 있을 뿐이다.³² 따라서 저자는 한우 체지의 형태발생 특히 임신 초기의 대퇴골 연골내골화 과정중 일차 골화 중심부, 연골관 출현 부위, 골단연골판의 형성 부위에서 연골세포와 기질의 조직화학적 변화를 다각적으로 비교 관찰하여 동물 발생학의 기초자료를 얻기 위하여 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

전라북도 일원의 도축장에서 1985년 10월부터 수집 보관하고 있는 한우 배자 및 태자 45두를 선천적 기형 여부를 확인한 후 10% 중성 formalin에 고정하여 실험

재료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 실험군 배정

임신기간의 추정은 배자 및 태자의 외부기관 발생상태를 관찰한 후 caliper를 사용하여 두미장(crown-rurap length)을 측정하였다.³³ 두미장이 11~100mm(추정태령 33~69일) 사이의 배자 및 태자를 사용하였으며, 이를 10mm 간격으로 9군으로 구분하여 각 군에 5두씩 배정하였다. 그리고 추정태령 50일 이전인 1군에서 3군까지를 배자로, 그 이후군을 태자로 구분하였다.

2) 조직화학적 관찰

(1) Alcian blue-PAS 복합염색

연골세포내의 산성 점액다당류(acid mucopolysaccharide)와 glycogen 분포상태를 관찰하기 위하여 일반 조직표본 제작 과정과 동일하게 제작된 표본을 사용하여 alcian blue(pH 2.5)-PAS 복합염색³⁴을 시행하였다.

(2) Von Kossa 염색

연골내골화가 진행됨에 따라 연골소주내의 칼슘의 침착과정을 관찰하기 위해 일반조직표본제작과정과 동일하게 제작된 표본을 사용하여 Von Kossa염색³⁵을 시행하였다.

(3) Trichrome 염색

연골 기질과 연골소주내 collagen 성분에 대한 반응을 관찰하기 위해 일반조직표본제작과정과 동일하게 제작된 표본을 사용하여 trichrome 염색³⁶을 하였다.

결 과

1. Alcian blue-PAS 복합 염색

제 1군(두미장 11~20mm) 체지아(limb bud)의 대퇴골 발생부위에서 연골발생 중심부위와 간염세포들이 밀집되어 있는 주변부는 산성 점액다당류에 반응을 보이는 alcian blue 염색 및 glycogen에 반응을 보이는 PAS 염색이 모두 음성을 나타냈다(Fig 1).

제 2군(두미장 21~30mm)의 대퇴골 부위에서는 대퇴골 연골발생 중심의 연골기질부에서 미약한 alcian 호성반응이 나타났고 PAS 염색 반응은 음성으로 나타났다(Fig 2).

제 3군(두미장 31~40mm)의 대퇴골에서는 연골기질 전구역에서 alcian 호성반응이 나타나고, 연골외막과 구역간기질(interterritorial matrix)에서는 PAS 반응에 강한 양성을 나타냈다(Fig 3).

제 4군(두미장 41~50mm) 대퇴골의 구역기질(territorial matrix)은 구역간기질 보다 alcian 호성반응이 강하게 나타났으며, 연골원형의 중심부에 있는 연골세포

포들은 PAS 반응에 양성을 나타냈다(Fig 4).

제 5군(두미장 51~60mm) 대퇴골의 연골외막 내세포층으로부터 연골관이 형성되는 주변부에서 화살표부위의 구역간기질은 성숙연골의 기질에서보다 alcian 호성에 약한 반응을 나타냈다(Fig 5).

제 6군(두미장 61~70mm)의 대퇴골에서는 화살표로 표시된 연골관(cartilage canal) 형성부위, 구역기질 및 구역간기질에서 alcian 호성반응의 감소를 볼 수 있었다(Fig 6).

제 7군(두미장 71~80mm) 대퇴골의 비대연골대(zone of hypertrophic chondrocytes)의 구역간기질은 증식연골대(zone of proliferative chondrocytes)의 구역간기질에 비하여 alcian 호성반응이 감소된 것을 관찰하였다(Fig 7).

제 8군(두미장 81~90mm) 대퇴골 석회화대(zone of calcified chondrocytes)의 골소주 형성부위에서의 alcian 호성과 PAS 반응은 비대연골대 하단보다 현저하게 감소됨을 관찰하였다(Fig 8).

제 9군(두미장 91~100mm) 대퇴골 비대연골대 하단의 구역기질과 석회화대의 골소주에서 alcian 호성은 제 8군과 유사한 반응을 나타냈지만, PAS 반응은 현저히 감소되어 나타났다(Fig 9).

2. Von Kossa 염색

제 1군 체지아의 대퇴골 발생부위에서 칼슘 침착반응은 볼 수 없었다(Fig 10).

제 2군의 대퇴골 발생부위에서도 제 1군과 유사한 음성반응을 나타내었다(Fig 11).

제 3군의 대퇴골에서는 성숙연골이 밀집된 부위의 구역간기질에서 부분적으로 화살표 부위에서 약한 양성반응을 나타내었다(Fig 12).

제 4군의 대퇴골에서는 화살표부위와 같은 양상으로 제 3군에 비하여 양성반응이 약간 광범위하게 관찰되었다(Fig 13).

제 5군의 대퇴골에서는 연골외막 인접부위의 구역간기질에서 강한 양성반응을 나타내었다(Fig 14).

제 6군 대퇴골 골외막 인접부의 연골관주위에서 강한 양성반응을 나타내었다(Fig 15).

제 7군 대퇴골 근위 골단연골관 부위의 골소주에서 강한 양성반응을 나타내었다(Fig 16).

제 8군 대퇴골 근위 골단연골관의 석회화대에 중심으로 배열된 골소주에서 특히 강한 양성반응을 나타내었다(Fig 17).

제 9군 대퇴골 근위 골단연골관의 석회화대에서는 좀 더 강한 양성반응을 나타내었다(Fig 18).

3. Trichrome 염색

제 1군에서는 체지아의 대퇴골 발생부위에서 연골발생중심부와 간엽세포들이 밀집되어 있는 주변부는 연골기질내 성분에 대한 collagen 반응은 음성을 나타내었다(Fig 19).

제 2군에서도 대퇴골 발생부위의 연골발생부위와 주변부는 제 1군과 유사한 반응을 나타내었다(Fig 20).

제 3군에서는 대퇴골의 연골외막 내세포층과 연골형성 중심의 주변부의 연골기질내 성분에 대하여 녹색의 collagen 양성반응을 나타내었다(Fig 21).

제 4군에서는 대퇴골의 연골외막에서 연골기질 성분내 collagen에 강한 양성반응을 나타냈지만 구역기질에서는 미약한 양성반응을 보였다(Fig 22).

제 5군에서는 대퇴골의 연골외막에서 연골기질 성분내 collagen에 강한 양성반응을 나타냈지만 연골관 주위의 구역기질과 구역간기질에서는 중등도의 양성반응을 나타내었다(Fig 23).

제 6군에서는 대퇴골 골외막의 내세포층의 연골기질 성분에서 강한 collagen 양성반응을 나타내고 석회화대 상단부 골소주내의 초자양연골대(화살표부위)에서는 약한 양성반응을 나타내었다(Fig 24).

제 7군에서는 제 6군과 비슷한 소견을 나타냈지만, 석회화대 골소주내의 초자양연골 형성이 광범위한 곳에서는 다소 양성반응의 증가(화살표 부위)를 볼 수 있었다(Fig 25).

제 8군에서는 대퇴골석회화대의 골외막 인접부 골소주에서는 화살표 부위와 같이 부분적으로 적색의 반응을 나타낸 석회심(calcified core)이 뚜렷하였다(Fig 26).

제 9군에서는 석회화대 골소주의 발달이 뚜렷하고, 화살표 부위와 같은 적색반응을 보인 석회심도 더욱 확대되어 나타났다(Fig 27).

고 찰

장골(long bone)의 연골내골화 과정에 관한 형태학적 연구는 두미장 9mm인 사람의 배자에서 대퇴골 발생부위에서 응집된 간엽세포들로 구성되고 이 간엽세포들은 점차 체지원위부로 소실되며, 두미장 11mm에서부터 연골화된다²⁾ 보고된 이래 배자 및 태자의 연골발생과 골발생에 대해서는 다각적인 연구가 이루어져 왔다. 그러나 소 태자의 골발생에 관한 연구는 매우 희소한 실경이다.^{29,30,31,32,37}

장골의 연골내골화 과정 중 대퇴골의 골단연골관은 연골관의 중심부에 혈관뢰(vascular bud)가 침윤된 곳에서 형성되며, 골단연골관 형성부위는 골단 침부로부터 예비연골대(zone of reserved chondrocytes), 증식

연골대(zone of proliferative chondrocytes), 비대연골대(zone of hypertrophic chondrocytes) 및 석회화대(zone of calcified cartilages)의 4분화대로 구분되고, 이러한 분화대는 골화의 진행과정에 따라 여러 형태학적인 변화를 일으킨다고 하였다.^{38,39} 성장중인 돼지의 골단연골판에서 조직화학적으로 분화대를 관찰한바 에 비연골대에서는 저질과 응집된 glycogen을 함유하고 있으나, 증식연골대에서는 연골세포의 증식과 더불어 지방과 glycogen은 점차 감소되며 4~8개의 세포들이 난형의 군집을 이룬다고 하였다.³⁹ 본 실험에서도 한우 배자 및 태자 골단연골판의 증식연골대에 있는 연골세포들이 형태가 흡사했으며 이와 같은 4개의 연골세포 분화대의 구별은 제 3군(두미장 31~40mm, 추정태령 48일)에서부터 명확하게 확인되었다.

연골기질(cartilage matrix)의 구성성분은 동물의 연령과 골의 종류에 따라 다소 차이는 있으나 연골기질의 75%를 차지하는 proteoglycan 물질이 연골의 골화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.^{40,41} Mouse의 경골(tibia) 골단연골판에서 Safranin O 염색법으로 collagen은 선별염색하고, proteoglycan을 소화시키는 papain을 사용하여 proteoglycan의 위치를 추적한 결과 매우 활성적인 연골세포가 있는 증식연골대 기질내에서는 다량의 proteoglycan을 함유하고 있으나, 퇴화되는 연골세포 주위 즉, 비대연골대와 석회화대의 기질내에서는 많은 양을 관찰할 수 없었다고 하였다.⁴² 그리고 신생돼지의 상완골, 대퇴골 그리고 척골에서 생후 1일부터 169일경까지 Alcian blue 염색, Von Kossa염색 등 각종 조직화학적 염색방법으로 관절연골(articular cartilage) 및 골단연골판의 층판형성을 관찰하였던바 구역기질 및 구역간기질에서 생후 15일 이후부터 proteoglycan 물질이 더욱 명확하게 나타난다고 하였다.⁴³ 이러한 형태적인 차이는 아마도 연골세포의 기능적인 변화를 나타낸 것이며, 또한 골단연골판 층판의 형성과 연골세포의 분포는 각 연령에 따라 모든 실험동물에서 유사하게 나타난다고 주장하였다. 본 실험에서도 골성장에 따라 proteoglycan 성분의 일부인 산성 점액 다당류(acid mucopolysaccharide)와 glycogen의 변화를 우태자의 대퇴골에서 조직화학적으로 추구한 바 제 3군(두미장 31~40mm, 추정태령 48일)의 연골내막에서 glycogen의 양성반응을 볼 수 있으며, 전구역의 연골기질내에서 산성 점액다당류의 분포가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 Shepard와 Mitchell (1976)⁴²이 보고한 바와 같이 연골세포의 활성이 활발한 증식연골대 기질내에 다량의 proteoglycan이 함유되어 있음은 이 실험군으로부터 연골세포의 증식이 왕

성한 시기임을 시사하여 주고 있다. Hill 등⁴³이 신생 돼지의 골단연골판을 조직화학적 염색법으로 관찰한바 연골기질과 구역기질에서 염색상의 큰 차이가 없음을 나타낸 것과 같이 본 실험 제 7군(두미장 71~80mm, 추정태령 64일) 이후의 골단연골판에서도 비슷한 염색상을 나타내고 있다. 그러나 alcian blue 염색으로 관찰한 본 실험 성적에 의하면 연골기질내의 proteoglycan 함량이 대퇴골 형성초기에는 임신경과에 따라 큰 차이를 보이고 있었다. Kuhlman과 Marygland⁴⁴는 개의 대퇴골에서 연골이 석회화될 때 비대연골대에서 glycogen 함량이 감소된다고 했는데 본 실험의 제 5군(두미장 51~60mm, 추정태령 58일)에서 연골판 형성 부위와 비대연골대 하단에서 산성 점액다당류와 glycogen 함량이 감소된 것은 상기 의견과 부합되며 골화가 시작되는 초기단계임을 간접적으로 나타내주고 있다.

Peress 등²¹은 연골기질내에 있는 기질소포(matrix vesicle)는 막으로 둘러싸인 입자를 가진 소포이며, 골화연골세포의 기질내에 풍부하여 형태학적으로 칼슘 침착과 관련이 있는 소포이라 하였다. 본 실험에서 골소주(trabeculae)내의 칼슘의 침착과정을 관찰하였던바 연골내골화가 진행됨에 따라 연골내막이 형성된 때부터 칼슘침착반응이 나타나는 것은 연골세포에서 기질소포가 형성된 부위에 반응이 나타난 것으로 생각된다. 제 6군(두미장 61~70mm, 추정태령 61일)부터 비대연골대 하단의 기질내에 칼슘 침착 반응이 더욱 강하게 나타나 골화중심(ossification center)의 형성이 뚜렷해지고, 제 7군(두미장 71~80mm, 추정태령 64일)과 제 8군(두미장 81~90mm, 추정태령 67일)에서는 연골세포 붕괴 부위가 더욱 확장되고 골소주 형성이 명확한 것으로 보아 이 시기가 골화가 왕성하고, 이어서 골단연골판이 형성되는 중요시기임을 확인할 수 있었다.

Collagen은 여러 세포의 분화(differentiation) 및 성숙 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{45,46} Hewitt 등⁴⁷에 의하면 chondronectin은 연골세포와 기질의 상호작용을 촉진시켜 주는 물질이며, chondronectin이 결합인자로서 충분히 작용할 수 있도록 연골의 proteoglycan monomer와 상호 작용한다고 주장하였다. Pal 등²⁵은 임신 100~250일경의 소 태자를 실험 대상으로 한 골단연골판의 연구에서, 전체 전조태자 연골의 collagen 함량은 성숙연골에 비하여 상당히 적게 나타난다고 보고하였다. 즉, collagen 함량이 임신 100일경에 약 14%에서 250일경에는 36%로 증가한다고 연구 보고하였다. 본 실험에서도 trichrome 염색에서 대퇴골의 연골내골화가 진행됨에 따라 colla-

gen 함량이 점차 증가하는 것을 보여주고 있다. 즉, 제 6 군(두미장 61~70mm, 추정태령 61일)에서 대퇴골 비대연골대 하단의 연골기질내에서는 collagen 양성반응이 약하게 나타나기 시작했고, 제 8 군(두미장 81~90mm, 추정태령 69일)에서는 collagen의 반응이 강하게 나타난 뿐만 아니라 석회화대 골막 인접부의 뚜렷한 골소주 석회심(calcified core) 부위에 칼슘 침착 반응도 강하게 나타나므로 이 시기에 골화가 활발하게 진행됨을 간접적으로 알 수 있었다. 이러한 결과는 Pal 등²⁵이 보고한 화학적인 조성의 차이를 나타낸 경향과는 부합되나 추정태령에는 차이가 있으므로 더욱 실험대상을 확대시켜 성분의 변화상과 화학적 조성의 변화를 관련지어 골발생에 따른 여러 현상을 추구하고야 할 것이다.

이상의 실험결과를 종합해 보면 본 연구에서와 같은 여러가지 조직화학적 방법으로 한우 배자 및 태자의 대퇴골 발생부위에서 초자양연골이 출현하는 시기(제 1 군, 추정태령 33일)와, 제 1 차 골화점을 형태적으로 명확하게 구분할 수 있는 시기(제 7 군, 추정태령 64일) 등을 알 수 있으므로 본 연구 결과는 한우 배자 및 태자의 초기 태령을 추정하는데 도움을 줄 수 있을 것

로 사료되며, 또한 임신초기의 외적 환경 요인 및 약제 투여 등으로 인한 골격발생에 관련된 기형학적 연구에도 기여할 수 있으리라 생각된다.

결 론

임신 한우로부터 수집된 배자 및 태자의 두미장을 기준으로 임신기간을 추정하고, 두미장 11~100mm(추정태령 33~69일)의 배자 및 태자 대퇴골을 사용하여 임신기간에 따른 연골내골화 과정을 조직화학적으로 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 연골기질에 alcian 호성이 뚜렷해지고 연골외막과 구역간기질에 PAS 반응이 강하게 나타나는 시기는 제 3 군(두미장 31~40mm) 부터이고, 제 5 군(두미장 51~60mm)에서는 연골관 형성부위 구역기질에서 alcian 호성 및 PAS 반응이 감소되었다.

2. 연골기질내 칼슘 침착과 collagen 반응은 연골원형이 형성되기전 제 2 군(두미장 21~30mm)까지 음성이었으나 제 3 군부터는 양성반응을 보였고, 골화가 활발히 진행되는 것은 제 8 군(두미장 81~90mm)부터이며 이때부터 대퇴골 근위 골단연골판의 석회화대 골소주에서 칼슘 침착이 현저해지고 석회심(calcified core)도 확인할 수 있었다.

Legends for figures

- Fig 1.** A negative reaction to the alcian blue stain and PAS reaction were observed at the chondrogenic center and its peripheral region in the 1st group. Alcian blue-PAS combined stain. $\times 100$.
- Fig 2.** A slightly positive reaction to alcianophilicity was observed at the cartilage matrix in chondrogenic center in the 2nd group. Alcian blue-PAS combined stain. $\times 100$.
- Fig 3.** A positive reaction to alcianophilicity was observed at the cartilage matrix. The PAS reaction was intensely positive in the perichondrium and interterritorial matrix in the 3rd group. Alcian blue-PAS combined stain. $\times 100$.
- Fig 4.** Alcianophilicity was observed more positively in the territorial matrix than in the interterritorial matrix. The PAS reaction was positive in the chondrocytes at the center of the cartilage model in the 4th group. Alcian blue-PAS combined stain. $\times 100$.
- Fig 5.** Alcianophilicity was slightly positive in the interterritorial matrix adjacent to the cartilage canal (arrow) in the 5th group. Alcian blue-PAS combined stain. $\times 100$.
- Fig 6.** Alcianophilicity was decreased adjacent to the cartilage canal (arrow) in territorial matrix and interterritorial matrix in the 6th group. Alcian blue-PAS combined stain. $\times 100$.
- Fig 7.** Alcianophilicity was decreased in the interterritorial matrix at the zone of hypertrophic chondrocytes in the 7th group. Alcian blue-PAS combined stain. $\times 100$.
- Fig 8.** Alcianophilicity and PAS reaction were decreased markedly in the zone of calcified cartilage compared with the zone of hypertrophic chondrocytes in the 8th group. Alcian blue-PAS combined stain. $\times 100$.
- Fig 9.** PAS reaction were decreased markedly in the territorial matrix of the zone of calcified cartilage in the 9th group. Alcian blue-PAS combined stain. $\times 100$.
- Fig 10.** A negative reaction to the Von Kossa stain revealed no calcium deposits at the chondrogenic center and its peripheral region in the 1st group. Von Kossa stain. $\times 100$.
- Fig 11.** A negative reaction to the Von Kossa stain revealed no calcium deposits (similar to that in Fig 10) in the 2nd group. Von Kossa stain. $\times 100$.
- Fig 12.** Reaction for calcium deposits (arrow) were observed to be slightly positive in interterritorial matrix of the ossification center in the 3rd group. Von Kossa stain. $\times 100$.
- Fig 13.** Calcium deposits (arrow) were increased slightly in the interterritorial matrix of the ossification center compared with those in Fig 12. in the 4th group. Von Kossa stain. $\times 100$.
- Fig 15.** Calcium deposits were observed in the cartilage canal in the 6th group. Von Kossa stain. $\times 100$.
- Fig 16.** Calcium deposits were observed in the trabeculae in the 7th group. Von Kossa stain. $\times 100$.
- Fig 17.** Large amounts of calcium deposits were observed in the trabeculae in the 8th group. Von Kossa stain. $\times 100$.
- Fig 18.** Large amount of calcium deposits were observed in the trabeculae compared with those in Fig 17. in the 9th group. Von Kossa stain. $\times 100$.
- Fig 19.** Collagenous substances were not observed at the chondrogenic center and its peripheral region in the 1st group. Thichrome stain. $\times 100$.
- Fig 20.** Collagenous substances were not observed (similar to those in Fig 19) in the 2nd group. Trichrome stain. $\times 100$.
- Fig 21.** A slightly positive reaction to the trichrome stain, revealing collagenous substances, was observed in the inner layer of perichondrium and osteogenic cells at the perichondrium in the 3rd group. Trichrome stain. $\times 100$.

- Fig 22.** An intensely positive reaction to the trichrome stain, revealing collagenous substances, was observed in the perichondrium in the 4th group. Trichrome stain. $\times 100$.
- Fig 23.** An intensely positive reaction to the trichrome stain, revealing collagenous substances, was observed in the inner layer of perichondrium. A slightly positive reaction to the trichrome stain, revealing collagenous substances, were observed in the interterritorial and territorial matrix adjacent to the cartilage canal in the 5th group. Trichrome stain. $\times 100$.
- Fig 24.** A slightly positive reaction to the trichrome stain, revealing collagenous substances, were observed in the inner cellular layer of the periosteum. Hyaline cartilage(arrow) was observed pale blue in trabeculae of the zone of calcified cartilage in the 6th group. Trichrome stain. $\times 100$.
- Fig 25.** Hyaline cartilage(arrow) was observed to have a increased pale bluish tint than those in Fig 24. in the 7th group. Trichrome stain. $\times 100$.
- Fig 26.** Cores of calcified cartilage(arrow) were observed reddish in trabeculae of the zone of calcified cartilage in the 8th group. Trichrome stain. $\times 100$.
- Fig 27.** Cores of calcified cartilage(arrow) were increased in trabeculae in the zone of calcified cartilage in the 9th group. Trichrome stain. $\times 100$.



Fig. 1

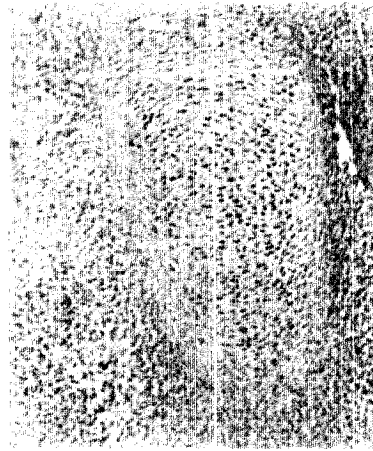


Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7

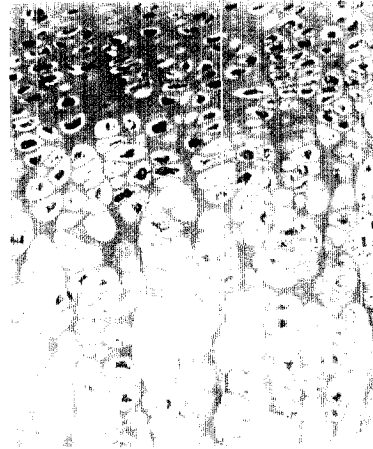


Fig. 8



Fig. 9

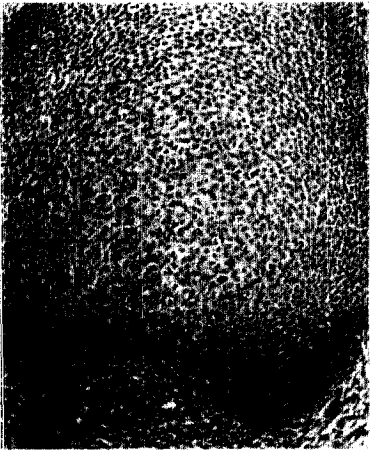


Fig. 10



Fig. 11

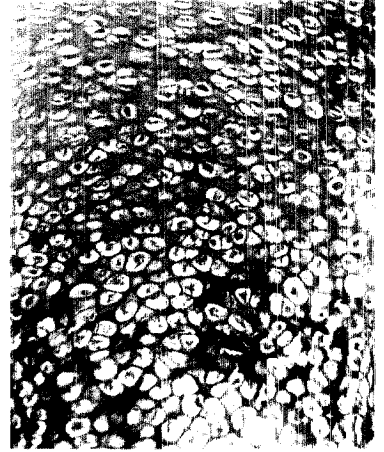


Fig. 12



Fig. 13

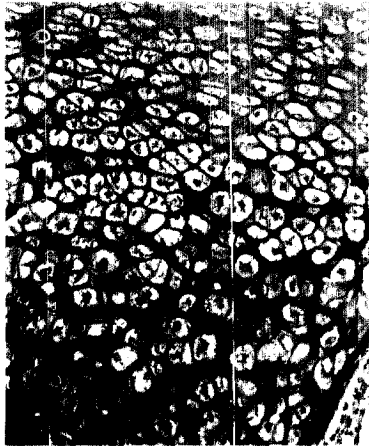


Fig. 14

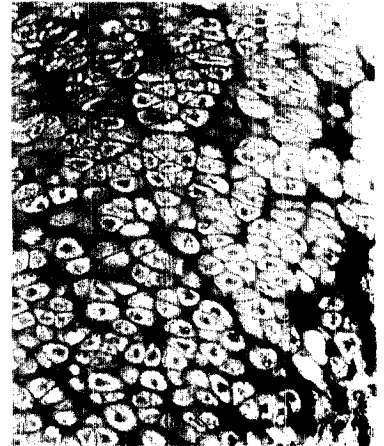


Fig. 15

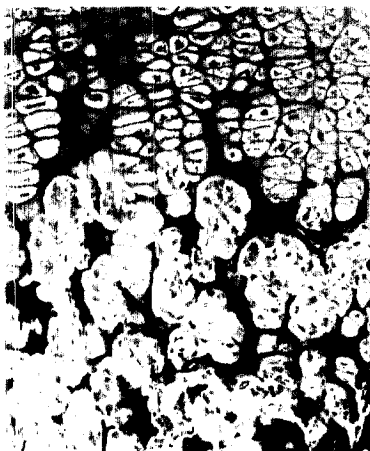


Fig. 16

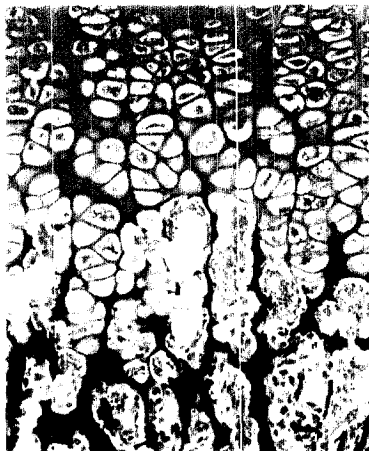


Fig. 17



Fig. 18

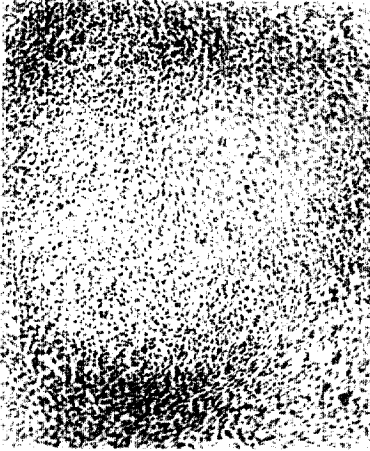


Fig. 19

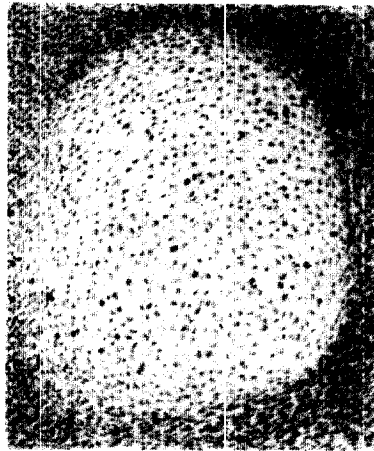


Fig. 20

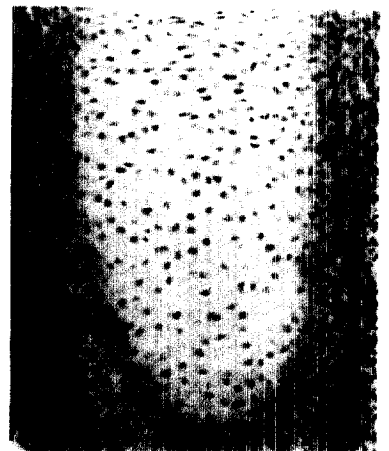


Fig. 21

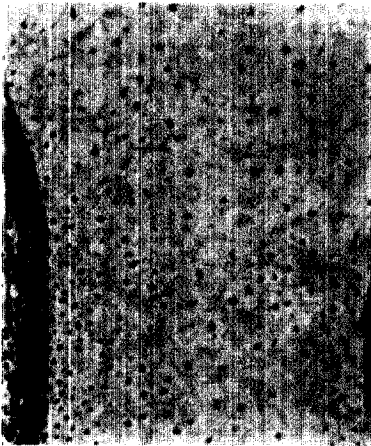


Fig. 22



Fig. 23



Fig. 24



Fig. 25



Fig. 26



Fig. 27

참 고 문 헌

1. Wright HV, Asling CW, Dougherty HL. et al. Prenatal development of the skeleton in Long-Evans rats. *Anat Rec* 1958;130:659~672.
2. Bardeen CR, Lewis WH. The development of the limbs, body-wall and back. *Am J Anat* 1901;1:1~37.
3. Noback CR, Robertson GG. Sequences of appearance of ossification centers in the human skeleton during the first five prenatal months. *Am J Anat* 1951;89:1~28.
4. Felts WJL. The prenatal development of the human femur. *Am J Anat* 1954;94:1~44.
5. Gray DJ, Gardner E, O'Rahilly R. The prenatal development of the skeleton and joint of the human hand. *Am J Anat*. 1957;101:169~224.
6. Meyer DB, O'Rahilly R. Multiple techniques in the study of the onset of prenatal ossification. *Anat Rec* 1958;132:181~193.
7. Laurenson RD. The primary ossification of the human ilium. *Anat Rec* 1964;148:209~217.
8. Gray DJ, Gardner E. The prenatal development of the human humerus. *Am J Anat* 1969;124:431~446.
9. Gardner E, Gray DJ. The prenatal development of the human femur. *Am J Anat* 1970;129:121~140.
10. O'Rahilly R, Gardner E. The timing and sequence of events in the development of the limbs in the human embryo. *Anat Embryol* 1975;148:1~23.
11. Hodges PC Jr. Ossification in the fetal pig. *Anat Rec* 1953;116:315~325.
12. Fell HB. The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *J Morphol Physiol* 1925;40:417~459.
13. Holder N. The onset of osteogenesis in the developing chick limb. *J Embryol Exp Morph* 1978;44:15~29.
14. Sorrel JM, Weiss L. A light and electron microscopic study of the region of cartilage resorption in the embryonic chick femur. *Anat Rec*. 1980;198:513~530.
15. Strong RM. The order, time, and rate of ossification of the albino rat (*Mus norvegicus albinus*) skeleton. *Am J Anat* 1925;36:313~355.
16. 윤재룡, 강치중, 구석일. 흰쥐 골간단부 골형성에 관한 전자현미경적 연구. 대한해부학회지 1987; 20(1):99~116.
17. Scherft JP. Beginning endochondral ossification in embryonic mouse radii. *J Ultra Res* 1973; 42:342~353.
18. Bozdech Z, Horn V. The Morphology of growth cartilage using the scanning electron microscope. *Acta Orthop Scand* 1975;46:561~568.
19. Lutfi AM. Mode of growth, fate and functions of cartilage canals. *J Anat* 1970;106:135~145.
20. Kugler JH, Tomlinson A, Wagastaff A, et al. The role of cartilage canals in the formation of secondary centers of ossification. *J Anat* 1979; 129:493~506.
21. Chappard D, Alexandre C, Riflat G. Uncalcified cartilage resorption in human fetal cartilage canals. *Tissue & Cell* 1986;18(5):701~707.
22. Wilsman NJ, Van Sickle DC. Cartilage canals, their morphology and distribution. *Anat Rec* 1972;173:79~94.
23. Cole AA, Wezwmann FH. Morphometric analysis of cartilage canals in the developing mouse epiphysis. *Acta Anat* 1987;128:93~97.
24. Wilsman NJ, Van Sickle DC. The relationship of cartilage canals to the initial osteogenesis of secondary centers of ossification. *Anat Rec* 1970; 158:381~391.
25. Pal S, Tang LH, Choi H, Habermann E, et al. Structural changes during development in bovine fetal epiphyseal cartilage. *Coll Res* 1981;1:151~176.
26. Buckwalter JA, Rosenberg L. Structural changes during development in bovine fetal epiphyseal cartilage. *Coll Relat Res* 1983;3:489~504.
27. Peress NS, Anderson HC, Sajdera SW. The lipids of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. *Calc Tissue Res* 1974;14: 275-281.
28. Hinchliffe JR, Johnson DR. The development of the vertebrate limb. Clarendon press Oxford 1980:IX.
29. Burt JK, Myers VS, Hillmann DJ, et al. The

- radiographic locations of epiphyseal lines in bovine limbs. *J Am Vet Med Assoc* 1968;152(2): 168~174.
30. Lindsay EF. Observations on the loci of ossification in the prenatal and neonatal bovine skeleton. I. Appendicular skeleton. *Br Vet J* 1969;125(3): 101~110.
 31. 김수명. 한우 대퇴골 골발생에 관한 연구. 대전대학 논문집 1986;5(2):235~243.
 32. 백영기, 양홍현, 김수명. 한우대자의 대퇴골 골단 연골판 형성에 관한 조직화학적 연구. 전북대학교 논문집 자연과학편 1987;29:263~269.
 33. Evans HE, Sack WO. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: Growth curves, external features and selected references. *Anat Histol Embryol*. 1973;2:11~45.
 34. Mowry RW. Alcian blue and alcian blue-periodic acid Schiff's stains for carbohydrates. Dept of path Univ of Alabama Medical Center, Birmingham, Mimeo 1956;3.
 35. Von Kossa J. Staining for calcium deposits(cited from Humason GL. Animal tissue techniques. 3rd ed WH. Freedman Co, San Francisco, 1972; 280~281).
 36. Pollak OJ. Pollak rapid method(cited from Humason GL. Animal tissue techniques. 3rd ed WH. Freedman Co, San Francisco, 1972;182-183).
 37. 이한경, 양홍현, 백영기. 한우의 흉골 발생에 관한 형태학적 연구. 대한수의학회지 1989;29(2): 91~98.
 38. Banks WJ. Applied veterinary histology. Williams & Wilkins Co 1981;138~161.
 39. Carlson CS, Hilley HD, Henrikson CK. Ultrastructure of normal epiphyseal cartilage of the articular-epiphyseal cartilage complex in growing swine. *Am J Vet. Res.* 1985;46:306~313.
 40. Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology. 4th ed. Lange medical publication, Los Altos, 1983; 128~131.
 41. Weiss L. Histology. 5th ed. McGraw-Hill New York, 1983;203.
 42. Shepard N, Mitchell N. The localization of proteoglycan and electron microscopy using Safranin O. *J Ultrastruct Res* 1976;54:451~460.
 43. Hill MA, Ruth GR, Van Sickle DC, et al. Histochemical morphologic features of growth cartilages in long bones of pigs of various ages. *Am J Vet Res* 1987;48(10):1477~1484.
 44. Kuhlman RE, Marygland B. A microchemical study of the developing epiphyseal plate. *J Bone Joint Surg* 1960;42(A):457~466.
 45. Hay ED. Extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1981;91(2):205.
 46. Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol.* 1981;88:473.
 47. Hewitt AT, Varner HH, Silver MH. Limb development and regeneration. Part B, AR. Liss Inc, New York 1982;25-33.