

# 탈회된 인체 이종골 매식체의 조직 반응에 대한 실험적 연구

원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실  
진국범\* · 김수남 · 엄인웅 · 김귀희

## EXPERIMENTAL STUDY ON TISSUE RESPONSE OF DEMINERALIZED XENOGENIC BONE MATRIX IN EXTRASKELETAL SITE

Kuk-Byum Jin\*, Soo-Nam Kim, In-Woong Um, Kue-Hee Kim

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Wonkwang University

### - Abstract -

*To evaluate the tissue response of demineralized and undemineralized xenogeneic bone-matrix graft in extraskelatal site, we prepared human bone as a implant matrix, and outbred mouse as a recipient.*

*Before clinical application of bank bone of human in Wonkwang university, we should confirm the allogeneic bone grafts as a biologically useful bone graft substitutes, obtained from the patients receiving oral and maxillofacial surgery.*

*The clinical evaluation and histologic studies showed that both(demineralized and undemineralized) xenogeneic bone matrix grafts were not rejected and that they seemed to stimulate new bone formation at the transplanation site.*

*Undemineralized xenogeneic bone martrix grafts showed minimal bone induction and gradual demineralization with slow resorption and showed that the differentiation of cells showing fibroblastic activity adjacent to the soft tissue were slowly and less frequently than demineralized bone.*

*Characteristical differences between the demineralized and undemineralized matrix were the appearance of foreign body giant cells (multinucleated giant cells) and the evidence of slow resorption in undemineralized bone matrix.*

### I. 서 론

손상이나 질환으로 인한 악안면 영역의 골 결손부를 수복하는 데에는 장골, 늑골, 두개골 등의 자가골 이식이 성공적으로 사용되어져 왔으나, 부가적인 수술, 동통, 감염, 채취가 가능한 골의 양이 한정되어 있는 단점이 있

으며, 이러한 신선 자가골 이식의 단점을 보완하기 위한 적절한 대용으로 단순 냉동골, 냉동 건조골, 비탈회골, 완전 또는 불완전 탈회골, 자가 용해성 함유 추출 동종골 등과 같이 여러 방법으로 처리 보존된 동종골 이식술이 시행되고 있으나, 이식체의 이물 반응 및 이물 면역 반응, 혈관 재형성 능력, 신생골

형성 능력, 완전한 소독 방법 등의 생체자료로서의 조직적 합성이 불완전하여, 임상적 조직학적인 결과에 근거하여 임상 적용을 실시하고 있는 실정이다<sup>1-5)</sup>.

동종골 이식에 대한 연구는 1867년 Ollier가 골의 보존에 대한 개념을 기술한 이래로 1889년 Senn이 탈회한 골의 이식을 처음으로 소개하였고 1942년과 1951년 Inclin과 William이 처음으로 저장된 골의 선택적 사용과 임상적 유의성에 관하여 보고 하였다<sup>6,7)</sup>.

동종골의 보존, 처리 방법중 냉동건조는, 단순냉동에 비하여 단백질 변성을 최소화시키고 장기간 물리적 성질을 일정하게 유지하며, 숙주조직에의 친화력이 좋고, 실온에서 장기간 보존과 다루기 편리한 장점이 있으며, 항원성을 감소 또는 제거시키고 신생골을 형성하는 능력을 유지하는 것으로 알려져 있다. 그러나 가장 적합한 냉동 온도 및 건조 조건에 관하여는 아직 정확하게 알려진 바가 없다고 하겠다<sup>8)</sup>.

탈회는 골기질의 골 생성 단백질을 제거하지 않으며, 골유도능을 유지하고 있어 숙주 조직의 신생골 형성 능력을 쉽게 하는 것으로 알려져 있다<sup>6,7)</sup>.

이에 저자는 원광대학교 치과대학 구강악안면 외과학 교실 원광 골은행 골을 사용하여 사람의 동종골을 실제 임상적으로 응용하기 위한 전단계로 냉동 건조후 탈회 또는 비탈회 처리한 하악골을 백서 대퇴부 연조직에 이식, 그 조직 반응과 신생골 형성 능력을 관찰하여 다스의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 연구 재료 및 방법

사람에서 채취한 하악골을 골수, 골막, 근육 등의 연조직을 제거한 후 흐르는 중류수에 세척하고, 약 1 mm' 크기의, 20내지 30개의 골편으로 만든다. 골편의 처리는 미해군 조직은행의 방법을 변형한 원광 골은행의 처리 방법을 사용하였다<sup>7)</sup>.

### 1. 연구 재료

이식 골편의 처리 :

먼저 제작된 골편을 24시간동안 냉동건조 후 절반 분량을 0.5 N 염산에서 90분간 2회에 걸쳐 탈회한다. (250ml of 0.5 N HCl/5g of bone)

탈회한 부유액을 버린 후 인산염 완충용액으로 pH를 6.9로 조정하고 다시 24시간동안 냉동 건조한다. 탈회한 골은 잔여 Ca양을  $KMnO_4$ 로 측정하여 탈회정도를 확인한다. 확인한 결과 탈회골이 0.02238 mg/mg of bone, 비탈회골이 0.0351 mg/mg of bone으로 약 30% 정도의 탈회효과를 보여 주었다.

실험전 준비된 골은 Ethylene oxide 가스 소독을 실시한다.

### 2. 연구 방법

이종골의 이식 :

시판 고형 사료에 의해 사육된 몸무게 300g의 웅성백서 28마리를 사용하였다. 웅성백서의 우측 대퇴 부위를 이식부위로 정하여 제모와 소독후 약 1cm길이의 절개를 가하고, 연조직을 박리하여 피하 소낭을 형성한 다음 탈회군 14마리, 비탈회군 14마리에 탈회된 골편과 비탈회된 골편을 각각 이식한다. 완전

지혈을 시킨 후 4-0 black silk로 봉합하고 술 전 및 술 후 발생한 탈수를 보상키 위해 소독된 식염수를 피하 주사하였으며 술 후 창상 감염을 위해 10mg의 Fosfocin을 근육 주사하였다.

#### 조직 표본 제작 :

실험 백서는 술 후 각 1, 2, 4, 6주에 Diethyl ether 치사량을 흡입, 희생시키고 매식된 골 조직을 주위 결체조직과 함께 채취하였다. 채취된 조직 표본을 10% Formaline에 고정시키고 EDTA로 탈회시켜 파라핀에 매몰시켜 4-7 $\mu$ m 두께의 초박 절편을 제작, 헤마톡실린/에오신으로 염색하고 광학현미경으로 관찰하였다.

### III. 연구 성적

탈회골 군과 비탈회골 군에서 골의 괴사나 부골 형성 및 면역 거부반응 등은 나타나지 않았다. 조직학적 소견으로는 비활성의 이식된 골편과 그 주위의 경미한 염증 세포가 관찰되었고 약 6주 경에는 미약하나마 신생골의 형성이 관찰 되었다.

#### 탈회골 군 :

탈회 1주 소견 : 이식된 비활성의 골편 주위로 대식 세포, 임파구 등의 염증 세포의 침윤이 관찰되었으나 골괴사나 이물반응 등은 없었다(Fig. 1).

탈회 2주 소견 : 염증반응은 감소되었으나 대식 세포, 임파구 등이 관찰되고 치밀한 섬유성 결체 조직막이 비활성의 이식골편을 둘러싸고 있으며 다핵 거대 세포나 신생골은 관

찰할 수 없었고, 이식 골편은 여전히 비활성의 모습이었다(Fig. 3).

탈회 4주 소견 : 대식 세포로 보이는 염증 세포의 침윤의 잔존해 있고, 미량의 신생골 형성이 이식체 주위에서 나타나기 시작한다(Fig. 5).

탈회 6주 소견 : 치밀한 섬유성 결체 조직의 막이 잘 발달되어 있고 모세혈관과 혈관 재형성의 모습이 관찰된다(Fig. 7).

#### 비탈회골 군 :

비탈회 1주 소견 : 대식 세포 등의 염증 세포의 침윤이 관찰되고 국소적으로 이물 거대 세포를 보이는 곳에 골 흡수의 징후를 보인다(Fig. 2).

비탈회 2주 소견 : 치밀한 섬유성 결체 조직막은 보이지 않으며 염증 세포의 침윤이 잔존되어 있고 이물 거대 세포가 관찰된다(Fig. 4).

신생골의 형성은 보이지 않는다.

비탈회 4주 소견 : 대식 세포 및 임파구 등의 염증 세포가 잔존해 있고, 이물 거대 세포가 계속 관찰 된다(Fig. 6).

비탈회 6주 소견 : 흡수되는 골원과 함께 골흡수상과 골침착선이 관찰된다(Fig. 8).

### IV. 총괄 및 고찰

탈회된 동종 또는 이종 골기질에 의해 연조직에서 연골과 골을 형성하는 것은 골결손 부위에 이식된 신선 자가골의 치유 과정과는 다른 생물학적 과정이라 하겠다. 즉 이식된 비활성의 골원은 혈관 재생 과정에 의하여 침입을 받으나, 신선 자가골에서는 작은 혈

관과 혈관 주위의 결체 조직 세포가 1 내지 2주면 신선 자가골로 증식되어 들어 가고 동종골 이식에서는 더 많은 시간을 필요로 하게 된다.

이식편이 숙주로 부터 혈관 공급을 받으면 파골 세포와 염증 세포가 출현하고 비활성의 골기질은 좁은 관으로 부터 천천히 흡수 되기 시작한다. 골을 형성하는 결체 조직 세포는 이식편의 소주 표면에 신생골을 형성하기 시작하고 이식편의 다른쪽에서는 숙주골이 천천히 흡수 된다. 방사선 상으로는 신생골이 골흡수를 대치하고 새로운 기능을 하는 골원을 형성 한다. 이러한 골흡수와 골형성의 역동적인 과정은 동종골 이식편이 완전히 대치될 때까지 계속 되는데 이를 보상 대체라고 하며 (creeping substitution) 동종골편이 자가골 이식편 보다 훨씬 천천히 일어난다<sup>9,10</sup>).

탈회된 골기질은 신생골을 잘 유도하지만 그 기전은 명확히 규명되어 있지 않다. Urist는 유도원리에 근거한 두 가지 가설을 발표하였는데 첫째는 골기질에서 나온 거대 분자 군들이 조직 간엽세포를 골형성 세포로 변환시켜 골형성을 유도한다는 것이고, 둘째는 거대 분자군이 아닌 전자의 분산에 의하여 조직간엽세포를 분화시켜 신생골을 형성한다는 것이다.

연조직내에서 이종골 이식체는 혈관이 왕성한 섬유성 결체조직막으로 싸이고 이 막은 골이나 연골을 포함하고 있지 않으나 골 유도 화학성분에 의해 탈회된 이식골체에 부착되는 골유도 전구세포를 포함함으로써 연골이나 골생성에 중요한 역할을 하게 된다. 그러나 골형성 단백질이 (Bone Morphogenesis protein) 골유도 초기 단계에서 작용하여 유전

자가 활성화 되면, 바로 연골이나 골을 형성하게 되며, 이러한 세포의 미분화는 섬유성 결체조직막의 혈관분포가 왕성하므로 저산소 분압과는 관련이 없어 보인다<sup>11,12</sup>).

따라서 섬유성 결체조직막의 세포들은 연조직의 억제 분자로부터 탈회한 이식골을 차단시켜 신생골 형성을 위한 적절한 물리, 화학적 환경을 조성, 미분화된 조직 간엽세포가 섬유아세포, 조연골세포, 조골세포로 분화되도록 돕지 않는가 생각된다<sup>13</sup>). 만약 이러한 억제분자에 세포가 노출되면 세포의 분화는 일어나지 않으며 이는 탈회된 골편이 섬유성 결체조직막과 새로 형성된 소골 사이에 존재하는 것으로 확인할 수 있다.

부분적으로 탈회된 골 기질은 미량이지만 신생골 형성을 자극하거나 또는 이식 거부 반응을 보이는데 이는 면역 반응에 의한 것으로 생각된다.

강산에 의한 골기질의 변성과 동종골의 탈회과정은 면역반응의 자극을 감소시키는 것으로 알려졌고, 강산 처리 또는 탈회 기간이 짧을수록 이식 거부반응은 커지는 것으로 보고되고 있다<sup>14</sup>).

Narang 등은 탈회한 동종골과 신선 동종골, 신선 자가골을 이식하여 서로 비교하였는데 비탈회골은 이식 초기에 숙주 조직 내에서 탈회 과정을 거친다고 하였으며 이는 칼슘양의 감소로 확인되었다. 따라서 탈회한 동종골 이식이 숙주 조직의 이식편을 탈회하는 과정을 생략할 수 있다는 가정하에 탈회한 동종골의 이식을 권장하였다<sup>14</sup>).

결론적으로 탈회된 골기질은 살아있는 정상세포가 없고 정상적으로 피하조직에서는 골을 형성되지 않으므로 탈회 골기질이 숙주의

미분화 간엽세포를 분화시켜 신생골을 형성한다고 추정할 수 있다. 즉 이식 후 어느 중요한 시점에서 탈회된 골기질과 융합된 숙주세포는 조연골 세포나 조골 세포로 분화되어 연골이나 골을 생성한다는 것이다<sup>15)</sup>.

이러한 신생골 형성은 특징적인 골침착선의 존재, 염색 표본에서의 골원의 확인, 골표면의 조골세포의 존재, 새로 형성된 골원내 골에 의해 둘러 싸인 골아세포 등의 발견으로 확인이 가능하다. 본 실험에서도 미량의 골형성을 골침착선과 조골 세포의 존재 및 골아세포 등의 관찰로 알 수 있었다.

다양하게 처리된 이종골 이식의 조직학적 소견은 이들 이식체 주위에 형성되는 세포 집단이 서로 상이함을 보여주는데 그 특징적인 소견은

- 1) 비탈회 이식골은 다핵 거대세포 및 이물 반응을 유도하고,
- 2) 염산으로 탈회한 이식골은 섬유성 결체 조직막으로 둘러 쌓이고 다핵 거대 세포의 형성 없이 혈관과 결체조직 세포가 침윤된다.

본 실험에서도 탈회되지 않은 이식골은 이물반응과 다핵 거대 세포를 보이며, 이들은 파골세포의 일부로 추정되나 탈회된 이식골체 주위에서는 관찰할 수 없었다<sup>16)</sup>.

이 세포들은 단단한 이식골에 대한 이물 반응 세포로 추정되며, 탈회된 이식골 주위에서는 거의 존재치 않는 것으로 보아 비탈회된 골의 잔존 칼슘이 이물 반응의 주원인이 아닌가 사료된다.

광학현미경적 소견 결과 탈회골은 이식 후 2주 내지 4주경에는 신생골을 형성하지 않지만 6주째에는 소량의 신생골을 형성한다. 이는

Urist, Silverman, Burning, Rosenberg 등의 관찰보다 더 늦게 소량으로 출어진 양상의 신생골 형성을 보여 주는데, 이와같이 본 실험과 다른 연구와의 신생골 형성양과 속도의 차이는 골처리 방법중, 3시간에서 4일 까지의 탈회시간, 염화수소의 농도와 같은 동종골 제작 및 보존 방법의 광범위한 차이 때문인 것으로 사료되며 동일한 방법으로 제작된 이식골의 반응은 거의 유사한 것으로 보고되고 있고 Urist는 그외의 차이는 골기질양의 차이라고 하였다<sup>10,13,17-20)</sup>.

## V. 결 론

원광골은행 골을 실제 임상에 응용하기 위한 전단계로 냉동 건조 및 탈회 처리한 사람의 골을 백서에 이식 그 조직 반응을 관찰하여 이종골 이식체로서의 사용가능성을 확인하고 동종골 이식체로서의 골 생성 능력과 골 보존 방법의 적합성을 관찰하여 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 탈회골근과 비탈회골근 이식시 면역 거부 반응은 없었다.
2. 탈회골 이식편은 초기 반응으로 대식 세포 및 임파구 등의 염증 세포를 보이거나 다핵 거대 세포의 출현은 없었고 이물 반응도 없었다. 비활성의 이식된 골편 주위로 치밀한 섬유성 결체 조직막이 둘러싸 간엽 조직에 의한 세포의 공극을 가능하게 하였다. 말기에는 이 결체 조직막이 모세혈관 및 신생 혈관을 공급하고, 부분적인 신생골 형성의 모습이 이식체 주위에서 나타나나 현저 하지는 않았다.

3. 비탈회골 이식편은 대식 세포 등의 초기 염증 반응을 보이고 치밀한 결체 조직은 보이지 않으며 국소적으로 다핵 거대 세포의 출현을 보이는 곳에 골흡수의 징후를 보였으며 말기에는 잔존해 있는 염증 세포 및 흡수되는 골원과 함께 reversal line이 관찰되었다.

### 참 고 문 헌

1. Adekeye EO : Reconstruction of mandibular defects by autogenous bone grafts a review of 37cases. J Oral Surg 36 : 125, 1978.
2. Danielson PA, Nemerich AN : Subcortical bone grafting for ridge augmentation. J Oral Surg 34 : 887, 1976.
3. Guranlick WC, Schwarz HC : Myxoma of the mandible, resection, and immediate reconstruction. BR J Oral 11 : 217, 1974.
4. Reitman MJ, Brekke JH, Bresner M : Augmentation of deficient mandible by bone grafting to the inferior border. J Oral Surg 34 : 916, 1976.
5. Stoelinga PJW, Tideman H, Berger JS, et al : Interpositional bone graft augmentation of the atrophic mandible. J Oral Surg 36 : 30, 1978.
6. Sydney N, Burwell RG : Decalcified bone as a substrate for osteogenesis. J Bone Joint Surgery 59-B : 189-196, 1977.
7. Bright RW, Fridlander GE, Sell KW : Tissue Bank. Milit Med 147 : 503, 1977.
8. Langer F, Czitrom A, Pritzker KP, et al : The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. J Bone Joint Surgery (Am) 57 : 216, 1975
9. Mulliken JB, Glowacki J, Kabon LB, et al : Use of demineralized allogeneic bone implants for the correction of maxillofacial deformities. Ann Surg.194, 3 : 366-371, Sep 1981.
10. Glowacki J, Kaban LB, Murray JE, et al : Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. The Lancet : 959-962, May 2, 1981.
11. Reddi A : Regulation of local differentiation of cartilage and bone by extracellular matrix. Lim Develop Reg B : 261, 1983.
12. Urist MR, Delange RJ, Finemann GA, et al : Bone cell differentiation and growth factors. Science 220 : 680, 1983.
13. Reddi A : Local and systemic mechanisms regulating bone formation and remodeling Current Advances in Skeletogenesis, p77, 1982
14. Narang R, Well H, Laskin DM : Experimental osteogenesis with demineralized allogeneic bone matrix in extraskeletal sites. J Oral Maxillofac Surg 35 : 133-141, 1981.
15. Ham A : History, 7th ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1974, pp 433-445.
16. Dubic FL, Urist MR : The accessibility of bone induction principle in surface de-

- calcified bone implants. Clin Orthop 55 : 217, 1967
17. Petrii WH : Evaluation of antibiotic-supplemented bone allograft in a rabbit model. J Oral Maxillofac Surg 49 : 392-396, 1967
  18. Gepstein R, Weiss RE, et al : Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of powder. J Bone Joint Surg 69A, 7 : 984-992, 1987.
  19. Hosny M, Sharaway M : Osteoinduction in young and old rats using demineralized bone powder allografts. J Oral Maxillofac Surg 43 : 925-931, 1985.
  20. Petrii WH : Osteogenic activity of antibiotic-supplemented bone allografts in the guinea pig. J Oral Maxillofac Surg 42 : 631-636, 1984

## 사진부도 및 설명

- Fig.1. One week after implantation of the demineralized, freeze-dried bone. (H&E, X200) Implanted bone was resorbed, devoid of intact cells, surrounded by inflammatory cell infiltration, consist of macrophage, lymphocytes. there was no evidence of necrosis, but be of foreign body reaction.
- Fig.2. One week after implantation of the undemineralized, freeze-dried bone. (H&E, X200) There was evidence of resorption with foreign body reaction and mild inflammatory cell infiltration with foreign body giant cell and histiocyte.
- Fig.3. Two week after implantation of the demineralized, freeze-dried bone. (H&E, X200) Histologic evidence of decreased inflammatory cell infiltration showing histiocytes with small lymphocytes.
- Fig.4. Two week after implantation of the undemineralized, freeze-dried bone. (H&E, X200) Histologic evidence of the remained inflammatory cell infiltration around the implanted bone chip.
- Fig.5. Four week after implantation of the demineralized, freeze-dried bone. (H&E, X200) Implanted bone was completely surrounded histiocytes envelope.
- Fig.6. Two week after implantation of the undemineralized, freeze-dried bone. (H&E, X200) Implanted bone was surrounded by inflammatoy cell infiltrated band, showing histiocytes and foreign body giant cells.
- Fig.7. Two week after implantation of the demineralized, freeze-dried bone. (H&E, X200) Implanted bone was surrounded by connective tissue band with inflammatory cell infiltrations. There was evidence of capillary formation and vascular ingrowth in relatively non-viable, acellular bone chips with empty lacunae .
- Fig.8. Two week after implantation of the undemineralized, freeze-dried bone. (H&E, X200) There was some part of resorption with resorption lacunae but no osteoclast. Occasional reversal line was observed.



사진부도



Fig.1

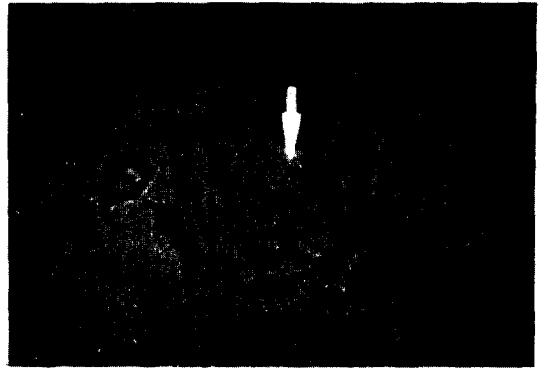


Fig.2

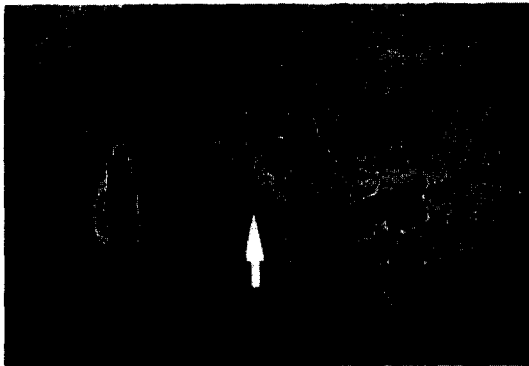


Fig.3

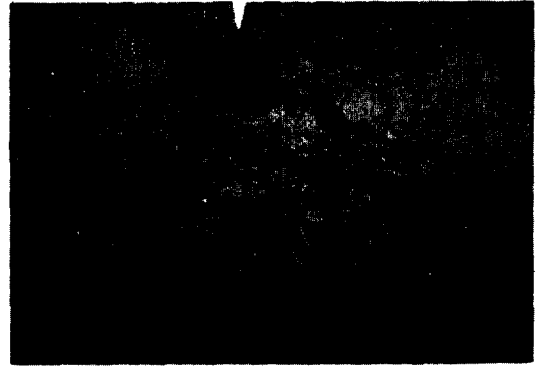


Fig.4

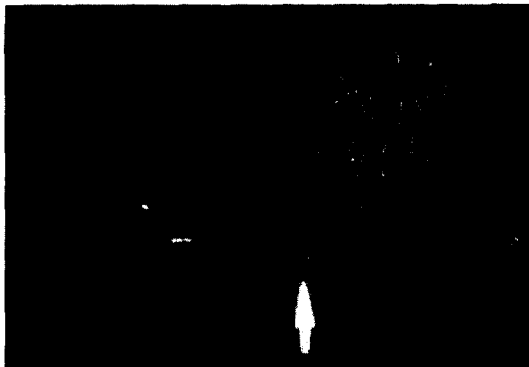


Fig.5

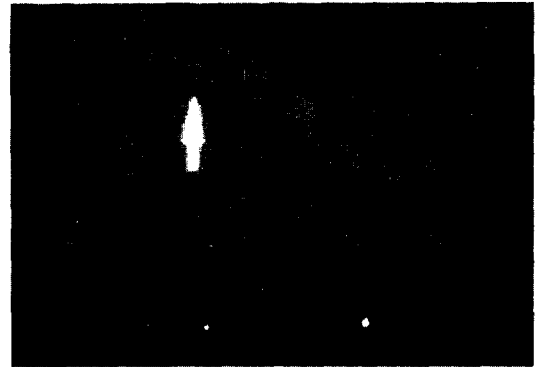


Fig.6

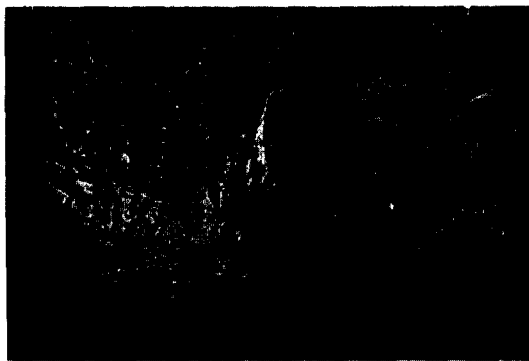


Fig.7

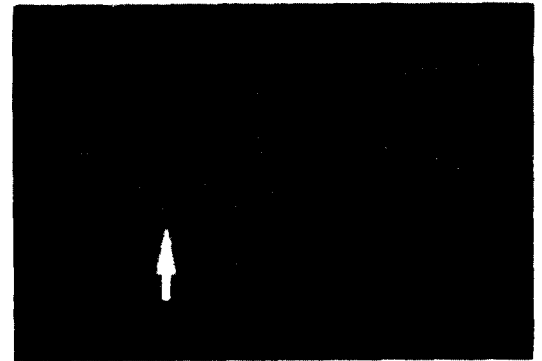


Fig.8