

개의 非癒合 骨折 Model에 있어서 凍結乾燥骨移植의 效果

최인혁 · 김현경 · 김남수 · 佐佐木 伸雄*

전북대학교 수의과대학
동경대학 농학부 수의학과*
(1996년 1월 17일 접수)

Effectiveness of freeze-dried bone grafts on the non-union fracture model of dogs

In-hyuk Choi, Hyeon-gyeong Kim, Nam-soo Kim, Nobuo Sasaki*

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University
*Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University**
(Received Jan 17, 1996)

Abstract : To investigate the effectiveness of the freeze-dried allografts and fibrin glue in bone grafts, the status of new bone formation and union of the grafted bone were observed in three types of grafting bones; autogenic bone(AT), allogenic bone(AL), and allogenic bone particles mixed with fibrin glue(FG). These were transplanted into non-union fracture model of 7 adult dogs with 2cm defect made in the proximal metaphysis of both fibulae. The autogenic and allogenic grafting bones had been treated by a modified freeze-dried method.

The serial radiogram were observed the repair process of grafted bones biweekly until 17 or 21 weeks after transplantation and the observation of histological aspects, tetracycline double labeling and microradiography in the grafted bones were undertaken at 17 or 21 weeks after transplantation.

The incorporation of bone minerals to the non-union fracture models were accomplished in 4 of 5 cases grafted with AL and in 2 of 4 cases grafted with AT. None of 5 cases grafted with FG were incorporated.

The process of new bone formation and resorption in the grafted bones were observed three types; resorption of the grafted bones after newbone formation(type A) in 4 cases, new bone formation after resorption(type B) in 2 cases and complete or incomplete resorption without new bone formation(type C) in 8 cases.

The modified freeze-dried method used in this study contributed to inhibit the rejection in allogenic grafts but the union period of the grafted freeze-dried bone was more prolonged than that of fresh autografts. Fibrin glue did not contribute to induce a new bone formation of bone grafts.

Key words : allogenic bone graft, freeze-dried bone, fibrin glue.

서 론

골이식은 분쇄골절이나 비유합 또는 골종양 등에서 대량의 골손실 혹은 광범위한 골의 절제 등에 의한 결손된 부분을 충전하기 위하여 이용되며 주로 장골이나 경골 등에서 채취된 자가해면골이 충전물로 이용되고 있다. 그러나 자가골 이식은 환측에 대하여 2중 3중으로 이식골 채취를 위한 수술을 해야하는 위험부담과 채취할 수 있는 골의 한계성 때문에, 이식골을 무제한 공급할 수 있고 저장성이 편리한 동종 또는 이종골의 이식에 대한 많은 연구가 수행되고 있다^{1,2}.

동종골 이식에 있어서 가장 큰 문제점은 면역거부반응과 신생골의 형성이다. 따라서 동종골 이식의 연구 대상은 면역거부반응의 억제방법과 신생골형성의 유도방법이 주류를 이루고 있다. 즉, 골형성에 주도적인 역할을 하는 골아세포 등 많은 효소와 인자들의 골형성 능력을 유지하면서 면역거부반응만을 억제할 수 있는 방법을 모색하는데 많은 연구가 수행되어 왔다^{3,4}. 그러나 Urist⁴에 의해서 죽은 골의 기질에 골형성물질(Bone Morphogenic Protein : BMP)이 있음이 밝혀지므로 동종골이식에 대한 새로운 전기를 맞이하게 되었다. 이것은 동종골의 살아있는 모든 세포를 사멸시켜도 골형성능력이 유지될 수 있다는 것을 의미하는 것으로 면역거부반응을 억제할 수 있는 새로운 방법이 제시된 것이라 할 수 있다. 또한 초기에 BMP는 종에 대한 특이성이 없는 것으로 보고되어⁴ 여러 실험동물에 이용되었으나 종에 대한 특이성에는 많은 연구자들에 의해서 논란의 대상이 되고 있다^{5,6}.

동종골 이식에 대한 중요한 문제점에 대하여 Urist⁴는 antigen-extracted, autolyzed, allogenic bone(AAA)이 가장 기초를 이루고 있으며 이러한 목적을 위한 방법은 BMP의 손상없이 골기질을 멸균하고 이식골의 항원성을 억제하는 것이라고 하는⁷ 한편 Burwell⁸은 이식에 있어서 면역성, 맥관과 세포의 침투, 골형성(osteogenesis), 재성형(remodeling) 및 소독이 중요한 문제점

이라고 말하고 있다.

동종골 이식의 이러한 문제점에 대한 동종골의 처리 방법에 대한 연구가 진행되면서 이의 임상적인 응용 또한 지속적으로 이루어져 왔다⁷. 이와같은 연구의 결과로 동종골을 처리하는 방법으로서 동결, 동결건조, 탈회와 방사선조사 등의 방법이 연구되고 임상적으로도 응용되고 있다. 최근 자료에 의하면 현재 임상적으로는 동결골과 동결건조골이 주로 응용되고 있으며⁹ 이것은 동결이나 동결건조 처리방법이 항원성을 억제한다는데 그 근거를 두고 있다¹⁰. 또한 이러한 방법들은 골이식에 있어서 또다른 중요한 문제점의 하나인 저장성을 동시에 해결할 수 있는 방법이기도 하다. 일반적으로 동결건조골이 동결골보다 항원성을 더 억제시킨다고^{7,10-12} 알려져 있음에도 생화학적 차이에 대해서는 아직 밝혀지지 않고 있다¹⁰. 지금까지 알려진 동종 건조골 이식은 연구자에 따라 이식골의 처리과정에서 여러가지 방법들이 선택되고 있으며 이에 대한 결과도 다양하게 나타나고 있다. 즉, 이식골에 있어서 골수의 제거, 탈지⁷⁻⁹, 동결건조 온도^{7,10,11} 이식골의 소독⁸, 이식골의 보존방법⁷⁻⁹ 등이 각각 차이가 있어 동결 건조처리방법에 대한 합리적이고 우수한 방법이 아직도 정착되지 못하고 있는 실정이다. 실험동물의 이식 부위에 있어서도 대퇴골¹², 척골¹³ 경골^{12,14}, 비골^{15,16} 등 여러부위가 선택되고 있으나 골이식실험의 중요한 문제점의 하나는 확실하고 균일한 고정기술상의 문제로 생각된다.

Fibrin glue는 fibrinogen에 thrombin을 가하여 fibrin 응고물로 전환시킨 것으로서 조직의 접착과 수복을 목적으로 개발되었으며 조직과의 접착으로 섬유아세포의 침입이나 혈관신생을 촉진하는 물질로 알려져 있다^{17,18}.

한편 골기질과 결합하고 있는 fibronectin은 collagen이나 fibrin에 친화성을 가지고 있고 주화성과 유사분열 물질을 가지고 있기 때문에 이것이 골유도(osteoinduction)를 촉진하는 것으로 알려져 있다^{17,18}. 또한 골이식에 있어서 초기의 혈관침투는 골이식에서 가장 중

요한 요소로 알려져 있다⁸. 이와같은 연구들의 결과를 근거로 골이식에 있어서 fibrin glue의 유용성에 대한 많은 연구가 수행되었으나 아직도 논란이 되고 있다¹⁹⁻²³.

본 연구는 개를 공시동물로 하여 지금까지 알려진 동결건조골 처리방법 중에서 합리적인 몇가지 방법을 보완하여 동결건조처리에 대한 동종골이식의 효과와 자가골과 동종골 이식에 있어서 거부반응의 차이를 비교하는 한편 Fibrin glue를 동종 동결건조골에 혼합하여 이식하였을 경우 골유도에 기여할 것인가를 검토하기 위하여 3종류의 이식골 즉, 자가동결건조골(AT), 동종동결건조골(AL) 및 동종골을 동결건조한 분쇄골과 fibrin glue(FG)를 혼합한 골을 각각 양측 비골에 이식하고 방사선학적 및 조직학적인 관찰을 하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 일반혈액검사와 임상검사에서 건강상태가 정상이라고 인정되는 체중 10.03 ± 1.24 kg 인 1~2세의 잡종견 7두를 공시동물로 사용하였다.

동결건조골의 제작 : 예비실험에 공시된 beagle견으로 부터 비골과 경골의 골간부를 채취하여 골수, 골막 및 근조직 등을 제거하고 chloroform + methanol (1:1)액에서 약 48시간 처리하였다. 이 골편은 탈이온수로 세정한 후에 -90°C 의 동결기에 넣어 24시간 동결하였다. 동결된 골편은 즉시 동결건조기(TAITEC FREEZE DRYER VD-80, 大洋科學, Japan)에 넣어 -80°C 에서 72시간동안 동결건조시켰다. 이때의 골편내 수분량은 1% 이하였다. 동결건조된 골은 EO gas(ethylene oxide 10% + nitrous oxide 90%)로 멸균포장하여 상온에 보존하였다.

Fibrin glue와 동종동결건조골(FG)의 혼합골 제작 : 동결건조된 경골의 골편을 분쇄한 후 체(sieve)를 이용하여 $500 \sim 850\mu\text{m}$ 크기의 분쇄골을 분리하고 EO gas로 멸균포장하여 상온에 보존하였다. 혼합골의 이식은 비골의 이식할 부위와 같은 크기의 멸균된 plastic 원통관에 준비된 분쇄골을 넣은 후 여기에 fibrinogen과 thrombin의 혼합액(Tisseel, Immuno AG, Japan)을 주입하여 경결시킨 후 비골의 결손된 골간 사이에 이식하였으며

FG 혼합골은 골이식 직전에 제작하였다.

마취 : 각 공시동물은 시술전 24시간 절식시켰다. 전마취제로는 atropine sulfate를 사용하였으며, thiopental sodium으로 도입마취를 시킨후 halothane의 흡입마취로 마취상태를 유지시켰다.

비유합 골절 model과 시술 : 수술방법은 일반적인 술식에 따랐으며 비골의 접근은 하퇴부의 외측 근위부 중상을 종절개 하였다. 골이식 부위는 각 공시동물의 좌측과 우측에 있는 비골의 근위골간부 약 2cm를 절취하여 비유합 골절model을 만들었다. 절취된 골은 동결건조처리를 하였으며 결손된 부분에는 준비된 3종의 동결건조골을 이식하였다. 한 개체의 좌측과 우측 비골에는 서로 다른 종류의 동결건조골을 이식하였으며 양측의 시술은 1주일의 간격을 두었다 (Table 1).

연부조직은 흡수붕합사로, 피부는 비흡수성 붕합사로 붕합하였고 이식된 골에 대하여 내외고 정법은 취하지 않았다. 시술하는 동안에 50ml/kg의 lactated Ringer's sol.를 정맥주사하였다.

동종 동결건조골(AL) 이식 : 공시동물 5두의 좌측 비골에서 절취된 골편은 자가 동결건조골 이식을 위하여 생리식염수에 침적시킨 후 동결건조처리를 하여 우측 비골에 이식시킬 준비를 하였으며, 좌측비골의 결손부는 예비실험에서 같은 방법으로 처리한 beagle견의 골편을 이식하였다. 이 비골 골편은 동결처리 후 멸균상태로 20일간 상온에서 보관한 것으로 이식부위에서 절취된 골편과 같은 크기로 성형한 후 사용하였다.

FG 혼합골 이식 : 공시동물 5두의 우측 비골에서 절취한 골편은 자가 동결건조골 이식을 하기 위하여 동결건조처리를 하였으며 결손된 우측비골은 준비된 동종 동결건조골의 분쇄골과 fibrin glue를 혼합한 것을 이식하였다.

자가 동결건조골(AT) 이식 : 시술 1주일 전에 동종동결건조골과 FG혼합골이식에 좌·우측 비골에서 절취하여 동결건조 처리한 골을 24~48시간 상온에서 보존한 후 4두의 반대편 비골 골간에 이식하였다.

후처리 : 시술시 부터 3일간 ampicilline 만을 주사하고 포대는 상황에 따라 적절히 교환하였으며 외부고정은 하지 않았다.

이식골의 배치 : 공시동물에 대한 3종의 이식골 배치는 개체의 차이를 줄이기 위하여 Table 1에서와 같이 배정하였다.

방사선학적 검사 : 이식시술 후 2주 간격으로 17~21주까지 비골의 전면과 측면에서 방사선촬영을 하여 골의 흡수상태와 신생골의 형성과정을 조사하였다.

조직학적 검사 : 이식된 골의 조직학적인 관찰을 위하여 이식 후 17~21주에 공시동물을 안락사시켜 이식골 부분을 채취하고 탈회골 조직표본과 비탈회골 조직표본을 제작하여 검정하였다.

탈회골 조직표본 제작 : 채취한 골을 인산완충 formalin액에 3일간 고정하고 Plank, Rychlo 급성 탈회액으로 6시간 탈회시킨 후 5% sodium sulfate로 중화하고 12시간 수세하였다. 상법에 따른 paraffine 포매후 H-E 염색하여 검정하였다.

비탈회골 조직표본 제작 : 이식골에서 골아세포의 활성도와 신생골침착 정도를 관찰하기 위하여 tetracycline double labeling을 실시한 후 비탈회골 표본제작을 하였으며 신생골의 칼슘침착을 관찰하기 위하여 微粒子放射線寫眞(microradiogram)를 촬영하였다.

Tetracycline double labeling²⁴ : 이식시술 후 13-17주에 tetracycline 25mg/kg/day을 2일간 근육주사하고 2주 후에 다시 tetracycline을 같은 용량과 용법으로 투여한 2주 후에 안락사시키고 이식골 부위를 채취하였다.

비탈회골 표본제작 : 각 공시동물에서 채취한 이식골의 연부조직을 제거한 후 5mm정도로 절단하여 70% ethanol에 3시간 고정하고 Villanueva bone stain 액에서 3일간 염색하였다. 염색후 ethanol로 농도상승순으로 탈수하고 100% acetone에 침적한 후 상승 polyester수지와 하강 acetone 혼합액에 침적시키고 진공펌프(MARUDO, MD-200-d, Japan)를 사용하여 일주간 골조직내 가스를 제거(degassing)하고 100% Polyester 수지로 포매하였다.

포매된 표본은 power cutter(MARUDO MC-411-d, Japan)를 사용하여 300 μ m로 절단한 후 자동연마장치(MARUDO ML-521-d, Japan)를 이용하여 50 μ m로 연마하였다. 50 μ m의 표본을 연X선 사진용 초미립자 film(Kodak: 649-0, Japan) 및 연X선 발생장치(Soflon:

SRD-M5, Japan)로 촬영하여 얻은 film과 그 표본을 slide에 balsam으로 각각 봉입하고 필름은 광학현미경으로 표본은 광학 및 형광현미경으로 각각 검정하였다.

Bone alkaline phosphatase(BALP)치의 측정 : 이식후 골아세포의 활성정도를 측정하기 위하여 전 공시전에 2주 간격으로 채취된 혈액을 Leung 등²⁵이 사용한 방법으로 다음과 같이 측정하였다.

①Heparin을 가한 시험관에 혈액을 채취하고 원심분리로 얻은 혈장을 -90 $^{\circ}$ C에 동결하여 사용하였다.

②Kinetic alkaline phosphatase 완충액과 p-nitrophenyl phosphate를 기질로 하여 UV-spectrophotometer(UV-160A, 島津 Co. Japan)로 420nm에서 측정하여 Total alkaline phosphatase(TALP)를 측정하였다.

③Triton X-100 40g/l과 wheatgerm lectin 5g/l(Sigma Chem co. U.S.A.)이 혼합된 용액 100ml와 동량의 혈장을 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하여 15분간 원심분리 하였다.

④상층액을 ②와 같은 방법으로 ALP를 측정하였다.

⑤BALP치는 ②에서 얻은 TALP치에서 ④에서 얻은 ALP치를 제하여 계산하였다.

공시동물의 감시 : 골을 이식한 동안에 각 공시동물에 대한 전신상태의 이상유무를 관찰하기 위한 방법으로 이식시술 전부터 안락사시킬 때까지 매 2주간격으로 일반혈액검사와 ALT, BUN, Creatine, Ca, Pi를 자동혈청분석기(FUJI DRY CHEM co. 5000, Japan)를 이용하여 측정하였다.

결 과

신생골의 형성과 융합 : 3종의 동결건조골을 이식하고 17~21주까지 방사선사진으로 관찰한 결과에서 신생골형성이 비골의 근위단과 원위단사이를 정상적인 크기와 같거나 더 큰 상태로 연결된 경우를 융합된 것으로 간주하였을 경우, 전 14예중 6예(42.9%)가 융합을 나타냈으며, 이중 AL을 이식한 5예에서는 4예(80%)가 융합되었고, AT를 이식한 4예중 2예(50%)가 융합되었다. 그러나 FG 혼합골을 이식한 5예에서는 전혀 융합이 이루어지지 않았다(Table 1, 2).

신생골이 형성되는 과정은 3가지의 형태로 구분할 수 있었다. Type A는 이식골이 흡수되지 않고 이식후

Table 1. Radiographic appearance of graft bone at 17-21 weeks after grafting

Case No	1		2		3		4		5		6		7	
Grafted site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Species of graft bone	AL	AT	AL	AT	AT	FG	AT	FG	AL	FG	AL	FG	AL	FG
Incorporation	U	U	U	N	N	N	U*	N	U	N	U	N	N	N
Resorption Type	A	A	B	C2	C2	C2	A	C2	B	C2	A	C1	C1	C1
Weeks of grafting	18	17	21	20	19	20	20	21	21	19	19	18	19	20

U : Union, N:Non-union, U* : Remains of the grafted bone. L : Left, R : Right

A : Resorption after new bone formation, C1 : Incomplete resorption

B : New bone formation after resorption, C2 : Complete resorption

AL : Allogenic freeze-dried bone AT : Autogenic freeze-dried bone

FG : Allogenic freeze-dried bone particles with fibrin glue

Table 2. The type of new bone formation and resorption after grafting

Type	Union		Non-union		Total
	A	B	C1	C2	
AT	2	-	-	2	4
AL	2	2	1	-	5
FG	-	-	2	3	5
Total	4	2	3	5	14

Type A: Resorption after new bone formation

Type B: New bone formation after resorption

Type C1: Incomplete resorption.

Type C2: Complete resorption

AT: Autogenic freeze-dried bone

AL: Allogenic freeze-dried bone.

FG: Allogenic freeze-dried bone particles with fibrin glue.

2~3주부터 신생골이 형성되기 시작하여 이식골의 주변과 측면에 계속 증가되고 이식골을 둘러싸서 유합을 이룬 형태로 전체의 14예중 4예(28.6%)에서 나타나고 있었다.

이와같은 양상은 AL을 이식한 5예중 2예(40%, case No 1, 6)에서 나타났으며 2주에서 11주 사이에 신생골의 완전한 유합을 이루고 13~15주에서 부터는 이식골의 흡수와 신생골의 형성이 일어나 18~20주에는 거의 비골의 원형상태로 복구되어 갔으며 이식골은 흡수되어 있었다(Fig 3).

또한 AT를 이식한 4예중 2예에서 이러한 양상이 나타났으나 이중 1예(25%, case No 1)에서는 4주에 유합을 이루고 6주에는 이식골과 신생골을 구분할 수 없는 상태로 되었으며 8주부터 점차 복구가 시작되어 16주에는 거의 원형에 가까운 형태가 되었고 이식골도 완전히 흡수되어 있었다.

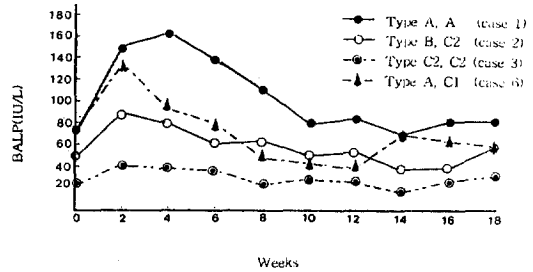


Fig 1. Change of the values of bone alkaline phosphatase(BALP) according to the cases with each of types after bone grafting.

Type A : Resorption after new bone formation.

Type B : New bone formation after resorption.

Type C1 : Incomplete resorption.

Type C2 : Complete resorption.

이와같은 형태는 조직학적인 관찰에서도 이식골은 흡수되어 있었으며 신생골에는 많은 osteoblast, Osteocytes(Ocy)와 Haversian canal(Hc) 및 Volkmann's canal (Vc)이 분포되고 있었다. 골막부분에서는 골아세포 (Osteoblast: Obl)와 파골세포(Osteoclast: Ocl)가 관찰되었다(Fig 10-A, Fig 7. Lt, Rt).

이식후 13~17주에 2주 간격으로 tetracycline을 labeling하여 형광현미경으로 관찰한 결과에서 신생골이 형성되고 있는 부분은 Hc를 중심으로 2중으로된 타원형의 신생골형성층을 관찰할 수 있었으며(Fig 9-2) microradiogram을 이용한 film에서도 칼슘의 침착을 확인할 수 있었다(Fig 8-2).

AT를 이식한 다른 1예(25%, case No 4)에서는 비골의 원위단에서 이식한 골이 흡수되지 않은 채 신생골이 이식골의 측면을 따라 점차 증식되어 16주에는 완전한 유합을 이루고 있었다. 그러나 20주까지도 이식

된 골은 방사선사진에서 신생골에 거의 포위된 채로 흡수되지 않고 있었으며 조직학적인 관찰에서도 흡수되지 않은 이식골의 잔존상태가 확인되었다(Figs 2, 7L, 7Rt, 8-3, 9-3, 10-B).

Type B는 이식골이 거의 흡수된 상태로 이식골 변연에서 신생골이 형성되어 가는 형태로 전 14예중 2예(14.3%)에서 나타났으며 이것은 AL을 이식한 5예중 2예(40%, case No 2, 5)에서만 나타나고 있었다. 신생골이 전혀 형성되지 않은 상태에서 이식골의 흡수는 양측 골절단에서 일어나지 않고 측면에서만 11~13주까지 일어났으며 15주부터는 점차로 이식골의 측면에서 신생골이 형성되어 21주에는 비골의 원형에 가까워지고 있었으나 취약한 형태를 나타내고 있었다(Fig 4).

이들의 조직학적인 관찰에서 이식된 골의 흔적은 나타나지 않았으며 활발한 신생골의 형성이 나타났다. 그러나 이식골과 접하고 있는 숙주의 비골근위측에서는 골막이 있는 변연부에서만 골형성을 인정할 수 있었다(Figs 8-1, 9-1).

Type C는 이식골 주변에서 전혀 신생골이 형성되지 않은 형태이다. 이식골의 흡수는 이식후 18~20주까지도 흡수가 끝나지 않고 섬(island)과 같은 형태로 남아있는 경우(type C1)와 이식후 12주경에 완전히 흡수된 경우(type C2)로 나타나고 있었다(Figs 5, 6). 어느 경우에도 흡수는 이식골의 주로 양측 골절단에서만 일어나고 측면에서는 흡수가 일어나지 않거나 미약했다. Type C는 14예중 8예(57.2%)로서 type C1이 3예, type C2가 5예로 나타나고 있었다. 또한 type C는 숙주의 비골 원위부분과 근위부분에서 이식 후 6~10주부터 골위축(bone atrophy)이 나타나기 시작하여 20주까지 지속되고 있었다.

Type C1은 AL을 이식한 5예중 1예(case No 7)에서, FG 혼합골을 이식한 5예중 2예(case No 6, 7)에서 나타났다. 조직학적인 관찰에서 AL골편 사이의 fibrin glue는 그 형태를 관찰할 수 없었다. 이식골편의 사이에서는 모세혈관과 세포들을 관찰할 수 있었으나(Fig 10-C,D) 신생골의 형성은 관찰할 수 없었다. Type C2는 AT를 이식한 4예중 2예(25%, case No 2, 3), FG 혼합골을 이식한 5예중 3예(case No 3, 4, 5)에서 각각 나타나고 있었다(Table 2).

BALP치의 변화 : 각 공시동물에서 골아세포의 활성정도의 지표로서 알려진 BALP치를 측정하여

양쪽 모두 type A의 유합을 이룬 case No 1과, 한쪽은 type A, 반대쪽은 type C1의 유합형태를 나타낸 case No 6, 한쪽은 type B, 반대쪽은 type C2을 나타낸 case No 2 그리고 양쪽 모두 유합을 이루지 못한 type C2의 case No 3을 비교한 결과(Fig 1)에서 골아세포의 활성을 인정할 수 있는 즉, 신생골의 형성으로 양쪽에 유합이 일어난 case No 1에서 가장 높은 BALP치를 나타내고 있었으며 신생골의 형성이 없어 양쪽이 모두 유합을 이루지 못한 case No 3에서는 가장 낮은 BALP치를 나타내고 있었다. 신생골 형성이 양호한 case No 1과 신생골 형성이 없는 case No3과의 BALP치에는 유의성 있는 차이($p < 0.001$)가 인정되었다.

검사기간중 공시동물에 대한 임상검사와 일반혈액 검사 및 혈청화학검사에서 일반적인 정상범위를 초과한 경우는 없었다.

고 찰

이식골의 동결건조 처리방법 : 동종골 이식에서 이식골의 처리방법으로 동결법과 동결건조처리가 가장 일반적인 방법으로 알려져 있으며 임상에서도 거의 같은 수준으로 응용되고 있다⁹. AL의 이식은 비록 균열(fissure)과 골절이 일어나기 쉬운 단점이 있으나²⁶ 저장성이 좋고 지금까지 알려진 다른 방법보다 많은 이점을 가지고 있다. 즉, 동결건조골은 낮은 수분(3~5%)으로 장기간(5~20년)의 저장과 실온보존이 가능하며 생화학적인 변화를 최소화시키고 항원성을 감소시킬 뿐만 아니라 이식골의 골유도(osteinduction)에 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있으며 동결건조골은 동결골에 비교하여 골의 항원성 감소 및 보존성 면에서 탁월한 것으로 알려져 있다^{7,10-12}.

그러나 지금까지 AL을 개에 이식한 실험결과나 임상에 적용한 예에서 동결건조골의 처리방법이 다양하였으며, 그 결과 또한 많은 차이를 나타내고 있었다. 즉, Burchart¹⁵는 골막 등 연부조직을 제거하지 않고 chloroform+methanol처리와 동결 처리없이 14%의 성공율을 보고하였고 Sinibaldi¹⁴는 chloroform + methanol 처리없이 -20℃에서 동결 보존하여 96%의 성공율을 보고하였다.

그러나 이러한 처리방법의 차이가 이식의 성패에 어느 정도의 영향을 미치고 있는지는 알 수 없다. 따라서 본 실험에서는 거부반응의 억제와 골형성인자의 보존을 위한 처리방법을 얻기 위하여 chloroform+methanol 처리에 의한 항원물질의 추출과 EO gas의 침투력을 증강하고자 하였다. 또한 동결건조 처리과정에서의 온도를 -80℃로 하여 항원성을 억제하고 단백질 및 효소의 변화를 최소화하는데 역점을 두었다.

이식골의 초기 처리과정에서 골막이나 골수 및 연부 조직을 제거하는 것은 이들이 면역 거부반응의 가장 큰 요인이 되기 때문이며 골의 기질에 BMP물질이 함유되어 순수한 골 기질을 얻기 위한 것으로 알려져 있다⁷. 이식골의 chloroform+methanol 처리는 Urist가 동결건조골이식에서 권장하고 있는 방법의 하나로서⁸ 지방의 제거로 항원성을 추출시키는 한편^{7,8} BMP의 변화 없이 EO gas의 침투를 개선하는 것으로 알려져 있기 때문이었다^{9,26}.

동결건조는 골의 수분을 5%이하로 건조시켜 골내에 함유한 물질의 생화학적 안정과 항원성을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 그 방법에 있어서 동결건조온도를 -30℃에서 -80℃까지로, 기간을 1일에서 3일까지로, 연구자에 따라서 각기 다른 방법을 선택하고 있으며 수분함량도 1% 이하로 낮게 한 예도 적지 않다. 즉 Burchardt¹⁵는 -30℃에서 24시간 처리하여 수분 함량을 5%로 하였고 Navy Tissue Bank에서는 -40℃에서 57시간 처리하여 3%의 수분을, Schena²⁷는 -45℃에서 48시간 처리하여 1%이하의 수분함량으로 처리하여 이식하였으며 그 결과도 다양하였다. 단백질의 변질이나 효소의 파괴없이 장기간 보존할 수 있는 가장 좋은 동결 온도는 -80℃로 알려져 있다^{7,10,28}.

이식골의 무균적인 처리방법에 대한 복잡성 때문에 화학적인 소독방법으로 thimerosal solution, β -propiolactone, ethylene oxide 등과 고열 또는 높은 에너지의 방사선조사법과 같은 물리적인 방법이 알려져 있다⁸. Ethylene oxide gas 멸균법은 이식골의 다공증(porosis)과 골기질의 강도를 저하시키는 등의 단점이 있으나 다른 어떤 소독법 보다는 골형성인자들의 활성을 변화시키지 않는 것으로 알려져 널리 이용되고 있는 방법이며, 특히 탈지된 동결건조골은 EO gas의 침투를 개선하는 것으로 알려져 있다^{9,25,26,29-32}. 혼합골이식에서 골기질을 입자상태로 이식할 경우 250~420 μ m는 다

핵거대세포에 의해서 신속하게 흡수되고 골유도와 연골 형성이 억제된다고 하였다^{8,33}. 또한 Reddi¹⁷는 44~74 μ m는 골을 유도하지 않으며 74~420 μ m에서 골을 형성한다고 하였으며 Shen³⁴ 등은 420~825 μ m 입자와 fibrin glue를 혼합 사용하였다. 따라서 본 실험에서는 입자크기의 안전성을 고려하여 500~850 μ m로 골편의 크기를 선택하였다.

골이식실험을 위한 부위로서 비골이 가장 적합한 것으로 알려진 것은 실험군에 일정한 고정조건을 갖도록 하는 것이나 어떤 내부고정법이나 외부고정법도 균일한 조건으로 고정을 유지하기 어렵기 때문에 고정을 필요로 하지 않는 비골의 이식을 표준방법이라고 까지 말하고 있다¹⁵⁻¹⁷. 또한 비유합 골절 model을 이루기 위해서는 적어도 골절간격이 직경의 2배 이상이 되어야 자연치유의 유합을 방지할 수 있는 것으로 알려져 있다². 따라서 본 실험에서는 비골 골간 근위부의 직경 4~6mm의 2배 이상인 20mm 정도를 절취하여 비유합 골절 model을 만들었다.

골유합: 많은 연구자들은 동종골 이식에 있어서 면역거부반응을 억제하고 골형성인자나 효소등을 유지하는 방법으로 동결건조처리법의 우수성을 주장하고 있으며 임상적으로 많이 응용되고 있는 방법이기도하다^{7,10}. 그러나 개가 실험동물로서 이용되거나 일부 임상적으로 응용되었으나 그 결과에 많은 차이를 나타내고 있다. 즉, Henry⁶는 개와 고양이의 동종 동결골 이식에서 36%와 90%의 성공율을 보고하였고 Burchardt¹⁵는 신선한 동종골을 개의 비골에 이식하여 전혀 유합을 얻지 못했으며 동종골과 자가골을 동결건조하여 이식한 결과에서 각각 14%와 75%의 유합율을 얻어 항원성의 존재와 동결건조 처리방법이 항원성을 억제하지 못하고 있음을 시사하고 있다.

그러나 한편으로는 Friedlaender⁵는 종설에서 면역거부반응은 동물에 따라 특이성이 있으며 여러 실험동물 중에서 개에서는 동종골 이식에 대한 *in vitro* 실험에서 체액성과 세포성 면역반응이 없었다고 말하고 있다. 또한 Schena²⁷는 신선한 자가골과 신선한 동종골 그리고 AL의 기질을 각각 대퇴골에 이식하여 4개월에서 1년에 걸쳐 방사선사진으로 관찰한 결과 80~90% 정도의 높은 유합률과 각 이식골간에 유의성 있는 차이가 없음을 보고하여 골기질에서는 항원성 거부반응이 매

우 적응을 시사하였다. 한편 Sinibaldi는 가정용 냉장고에서 동결한 동종골을 대퇴골과 경골, 척골에 임상적으로 적용하여 96%의 유합을 얻었다고 보고하고 있다¹⁴. 이들은 동종골의 동결건조에 대한 보존적 가치만 인정하고 있었으며 동종골 이식시 중요한 점은 고정이며 이식골과 숙주골의 철저한 접합면이라고 하여 ASIF법에 의한 완벽한 고정과 접합의 중요성을 강조하고 있다¹⁴.

그러나 비골에서의 골이식 실험에서는 고정과 접합을 일정하게 하기 위하여 특별한 내외부 고정을 하지 않고 있으며 고정을 하지 않은 상태에서도 접합이 이루어져 많은 연구자들은 골이식 실험에서의 모델로 비골을 표준으로 사용하고 있는 실정이다^{15,16}. 본 실험에서 택한 비골에서의 방사선 사진촬영시 후지의 자세에 따라서 이식골과 숙주골간에 다소의 유동성이 있음을 인정할 수 있었으나 이러한 유동성이 골유합을 방해하는 것으로 인정하기는 어려웠다. 이것은 AT와 AL을 이식한 9예중 유합이 이루어진 6예에서는 이식골의 측면에서 흡수가 이루어지거나 이식골이 신생골로 매몰된 후 서서히 흡수되는 반면 유합을 이루지 못한 3예에서는 이식골의 양측 골절단에서 흡수가 이루어지고 또한 숙주골의 양측 골절단에서 위축이 일어나고 있어 이러한 차이가 이식골의 유동성 때문인 것으로 단정하기 어려운 점이 있었다.

본 실험에서는 지금까지 알려진 동결건조 처리방법 중에서 항원성의 억제와 골형성물질의 유지에 관련된 방법중에서 항원성과 거부반응이 있음을 주장한 개의 비골을 이식골로 선택하였다¹⁵. 동종이식골의 면역성 거부반응의 억제 효과를 검토하기 위하여 AT와 AL을 같은 개체에 이식한 결과에서 AL이식은 5예 중 4예에서 유합을 이루었고 AT이식은 4예 중 2예에서 유합을 이루어 본 연구에서의 동결건조처리법이 자가골과 동종골사이에 거부반응의 차이를 인정하기 어려웠다.

AL를 이식한 type B의 2예에서는 이식후 12주까지 흡수가 일어난 후에 서서히 신생골이 형성되어 20주에서도 골이 형성되고 있었으나 remodeling이 이루어지는 것 같지는 않았다. 이러한 형태는 AL이식이나 AT이식의 이식에서 type A가 나타난 4예에서 이식후 2주부터 신생골이 형성되고 있는 것과는 전혀 다른 양상을 나타내고 있었다. 많은 연구자들은 이러한 현상이 동종골의 동결건조처리골에서 나타나는 취약성^{27,35}이

라고 말하고 있으나 이와같은 현상이 비록 AT이식에서는 나타나지 않았다고 하더라도 이러한 원인이 항원성에 기인한 것이라기 보다는 동결건조처리로 인한 골형성 과정의 지연으로 생각되었다.

이식골의 흡수형태는 파골세포가 골기질을 분해하고 흡수한 후 이곳을 골아세포가 신생골로 치환(replacement)하거나 또는 한쪽에서 파골세포가 골기질을 흡수하고 이미 골흡수가 일어난 다른쪽에서 신생골이 형성되는 것으로 알려져 있으며 신생골의 형성은 흡수가 선행되어야 하는 것으로 알려져 있다^{27,36}.

그러나 본 실험에서 나타난 이식골의 흡수와 신생골 형성에서는 전혀 다른 상태를 나타내고 있었다. 즉 type A에서는 이식골의 흡수없이 이식골 주위에서 신생골이 형성되고 이 신생골이 이식골을 포위한 후 서서히 이식골이 흡수되고 치환되는 양상을 나타냈으며 type B에서는 신생골의 형성없이 이식후 약 12주간 이식골의 측면에서 흡수가 계속된 후에 신생골이 형성증가되는 양상을 나타내고 있었으나 숙주골과 이식골의 접합면에서는 골흡수가 일어나지 않고 있어 Johnson이 보고한 바와 같은 접합면에서의 흡수와 신생골형성이 이루어지지 않고 있었다^{32,37}.

그러나 FG혼합골을 이식한 5예에서는(type C) 숙주골과 이식골의 접합면으로부터 이식골의 양측 골절단에서만 골형성 없이 흡수가 일어나 골이식에서 숙주골의 치환없는 이식골의 흡수는 거부반응의 지표라고³⁷ 한 것과 같은 양상을 나타내고 있었다. 이러한 점은 fibrin glue에 거부반응이 있음을 시사하고 있으나 이러한 양상이 AT를 이식한 2예에서도 일어나 이것이 거부반응의 상태로 보기는 어려웠다.

본 실험에서 나타난 type C의 8예는 숙주골과 이식골의 접합면에서 흡수가 일어나고 있었으나 이 경우는 예외없이 신생골이 형성되지 않았으며 FG혼합골을 이식한 5예에서 이식골의 흡수후에 숙주골의 양측 골절단에서 일어난 침예한 신생골의 형성은 이식골까지 침투하여 이식골이 완전히 소실된 후까지도 유합을 이루지 못하고 있었으며 신생골의 형성에 어떤 영향을 미치지 않고 있는 것으로 나타났다.

한편 fibrin glue는 맥관 투과성과 골유도를 촉진시키는 것으로 알려져 있어 Nakamura³⁸는 쥐의 위관절형요추분리증에 이식한 실험에서, Itoh³⁹은 건(tendon)과 골에서, Hatton⁴⁰은 골과 연골의 유도능 실험에서 각각

fibrin glue의 유용성을 시사하였으며 이 외에도 많은 연구자들은 fibrin glue의 골유도(osteinduction)로 신생골 형성에 대한 유용성을 주장하였다⁴¹.

그러나 Albrektsson²⁰, Lucht⁴², Osborn⁴³ 등은 f-fibrin glue는 골형성에 변화를 주지 않거나 오히려 감소시킨다고 주장하고 있다. 본실험에서는 동종 동결건조골 입자와 fibrin glue의 혼합골 이식에서는 동종 동결 건조골 입자사이의 fibrin glue에 맥관의 침투는 인정되었으나 신생골의 형성은 전혀 이루어지지 않았으며 숙주의 골단에서 일어난 신생골이 혼합골사이에 있을 경우에도 혼합골 만이 흡수되어 fibrin glue가 신생골의 형성에 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

사람에서 골아세포의 활성지표로 소개된²⁵ BALP치의 검사에서 신생골의 형성정도와 BALP치 수준에는 밀접한 관계가(p<0.001) 있는 것으로 나타나 개에 있어서도 BALP치의 측정은 골형성정도를 파악하는데 중요한 지표가 될 것으로 생각된다.

결 론

동종 동결건조골의 이식효과를 검토하기 위하여 이식골의 동결 건조처리법을 보완하여 거부반응과 신생

골의 형성 및 fibrin glue의 골이식에 있어서의 유용성을 검토하였다. 7주의 개에서 양측 후지의 비골 근위부 골간 약 2cm를 절취하여 비유합 골절 model을 만들고 여기에 동종 동결건조골과 자가 동결건조골 및 동종 동결처리한 골을 500~850 μ m으로 분쇄하여 분리한 골편에 fibrin glue를 혼합한 3종의 골을 각각 이식하고 이식후 17~21주간 방사선학 및 조직학적인 관찰을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 동종 동결건조골을 이식한 5예에서 4예가, 자가 동결건조골을 이식한 4예에서는 2예가 각각 유합을 이루었으나 동종 동결건조골과 fibrin glue를 첨가한 혼합골을 이식한 5예에서는 전혀 유합이 이루어지지 않았다.

2. 동종 동결건조골 이식에 있어서 신생골의 형성과 이식골의 흡수과정은 이식골의 흡수에 선행되어 신생골이 형성되는 형태와 이식골이 거의 흡수된후 신생골이 형성되는 형태 그리고 신생골 형성없이 흡수만 일어나는 경우 등 3가지의 형태를 관찰할 수 있었다

3. 본 실험에서 선택한 이식골의 동결건조방법이 면역거부반응을 억제하고 있음을 인정할 수 있었으나 신생골형성은 신선한 자가골 이식에 비하여 지연되고 있었으며 fibrin glue는 이식골의 신생골형성에 기여하지 못하고 있음을 인정할 수 있었다.

Legends for figures

Fig 2. Serial radiograms of type A represent resorption after new bone formation in autogenic freeze-dried bone grafting.

Fig 3. Serial radiograms of types A represent resorption after new bone formation in allogenic freeze-dried bone grafting.

Fig 4. Serial radiograms of types B represent new bone formation after resorption in allogenic freeze-dried bone grafting.

Fig 5. Serial radiograms of type C1 represent incomplete resorption of grafted bone in allogenic freeze-dried bone grafting and allogenic bone freeze-dried bone particles mixed with fibrin glue.

Fig 6. Serial radiograms of type C2 represent complete resorption of grafted bone in autogenic freeze-dried bone grafting and allogenic bone freeze-dried bone particles mixed with fibrin glue.

Fig 7. Photomicrographs of a 50 μ m thick cross section of non-decalcified grafted bone(Villanueva bone stain. \times 40). Left: New bone formation region. Right: Host region of host-graft interfaces.

Fig 8. Microradiographs of a 50 μ m thick cross section in non-decalcified grafted bone.(8 KVP, 3 mA, 10 minutes, Konica contact film CS 100E) \times 40. White region represent the precipitated calcium.

8-1. The black holes of border are Haversian canals that osteoblasts are forming bone in fibular of host.

8-2. The many black holes are Haversian canals that osteoblasts are forming new bone in grafted bone.

8-3. The upper left part is grafted bone, the right is new formation bone.

Fig 9. Fluorographs of a 50 μ m thick cross section of non-decalcified grafted bone(Tetracycline double labeling). $\times 125$.

The yellow parts represent new bone formation.

9-1. The double yellow ring and line in border represent bone formation part in fibular of host.

9-2 The double ring represents new bone formation in type A(AL)

9-3. The non-absorbent part of grafted bone in type A(AT) did not represent the yellow part.

Fig 10. Cross section of the grafted bones in the non-union fracture model(H-E stain)

10-A. New bone forming region in type A(AL, case No 2). $\times 40$.

10-B. Left region is the grafted bone(GB) and right is the new bone(NB) forming region in type A(AT, case No 4) $\times 40$.

10-C, D. Blood vessels and cells had replaced the fibrin glue among AL particles. $\times 40$ (C), $\times 100$ (D).

Abbreviation in figures

GB: grafted bone

NB: new formation bone

Ocl: osteoclast

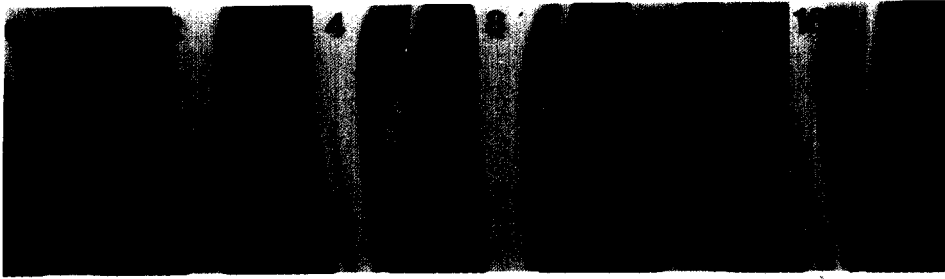
PF : particles of AL

Hc : Haversian canal

Obl: osteoblast

Ocy: osteocyte

FDAT-A

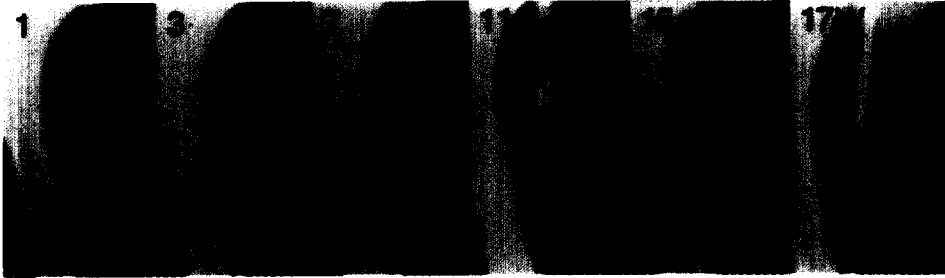


FDAT-D



Fig. 2

FDAL-A

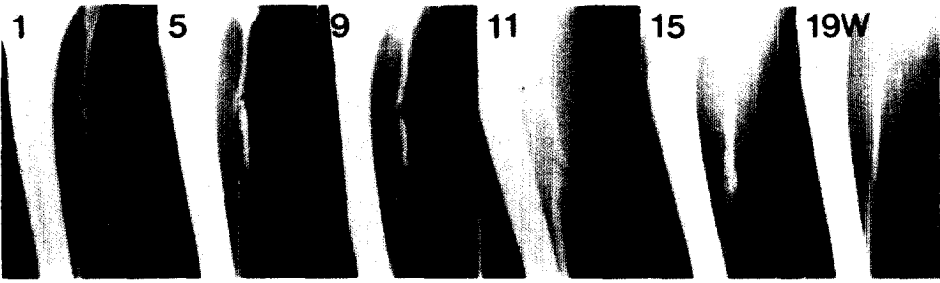


FDAL-F



Fig. 3

FDAL-B



FDAL-E

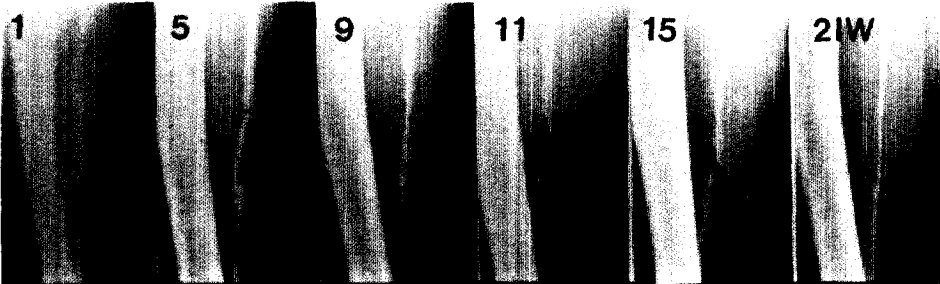


Fig. 4

FDAL-G



FDFG-F

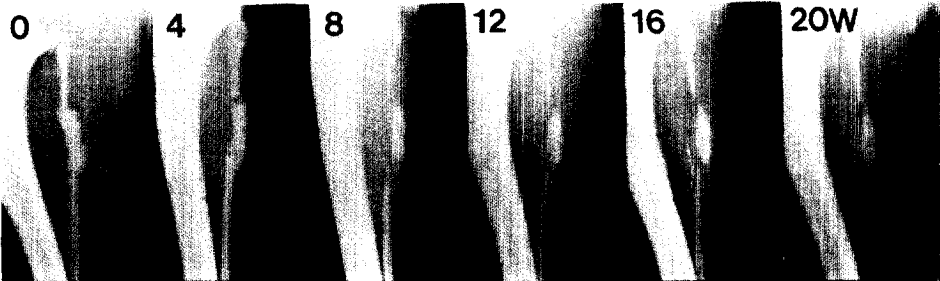
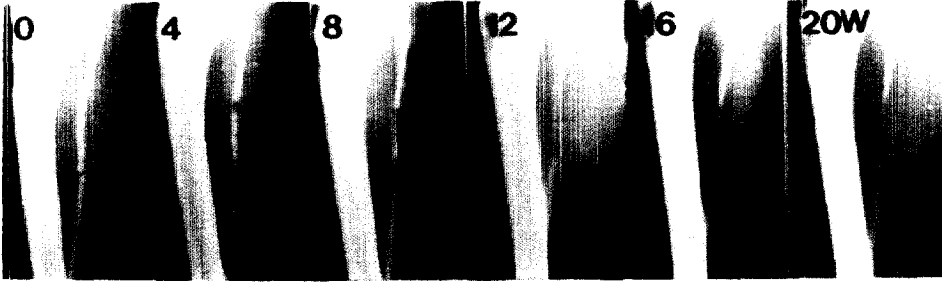


Fig. 5

FDAT C



FDFG-C

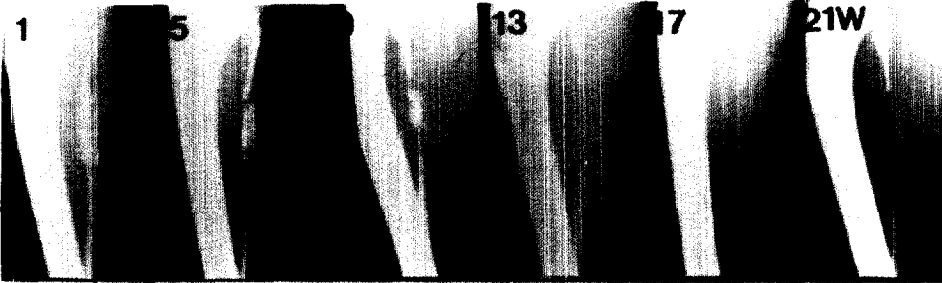


Fig. 6

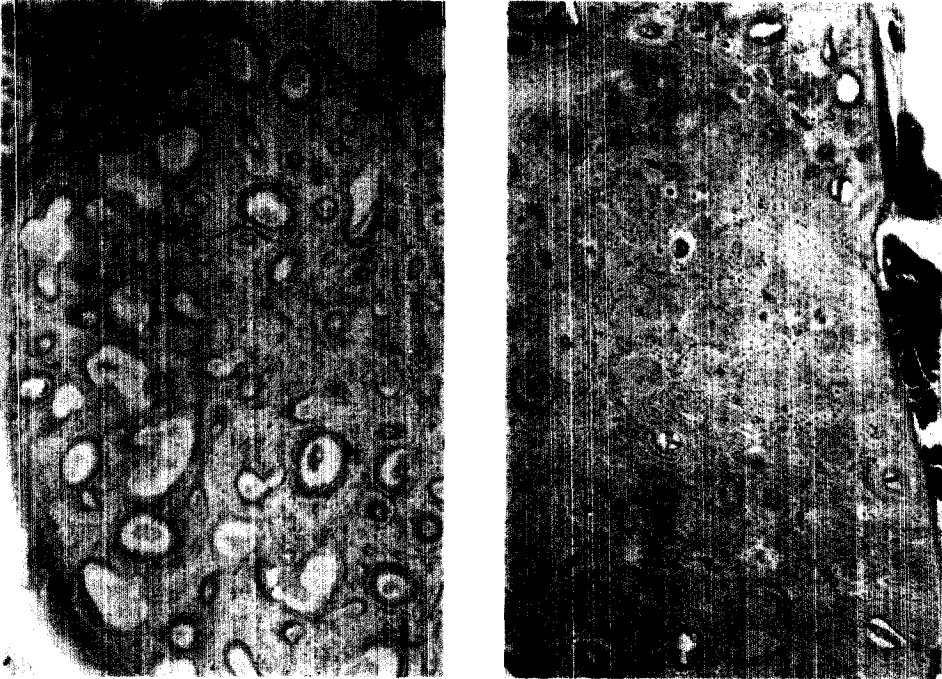


Fig. 7

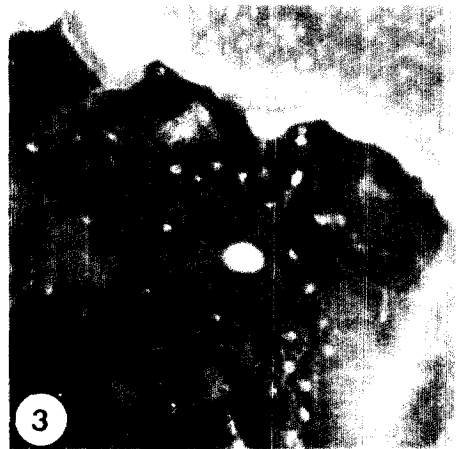
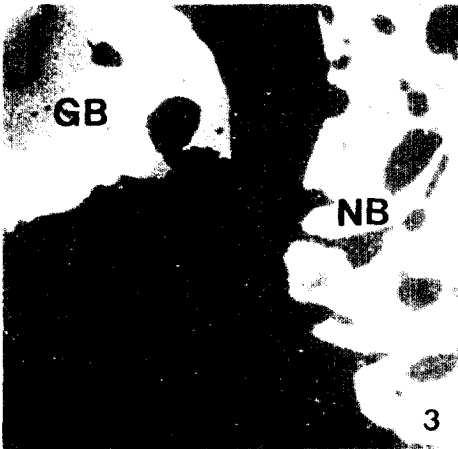
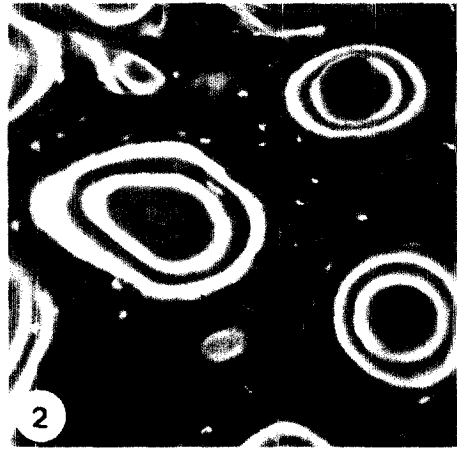
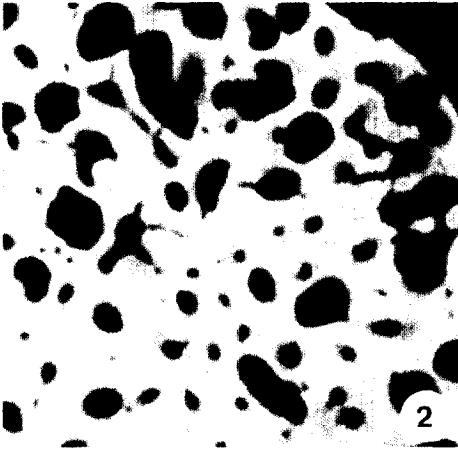
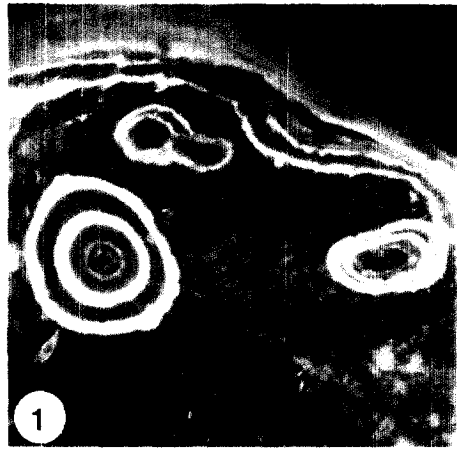
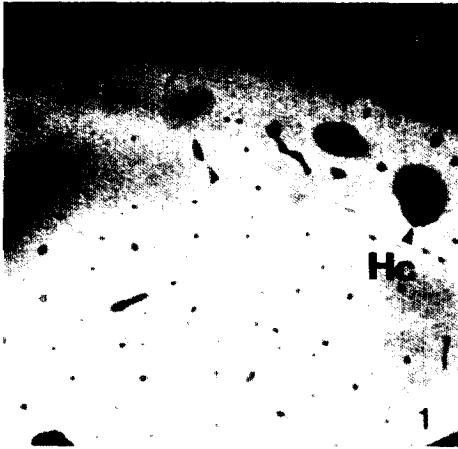


Fig. 8

Fig. 9

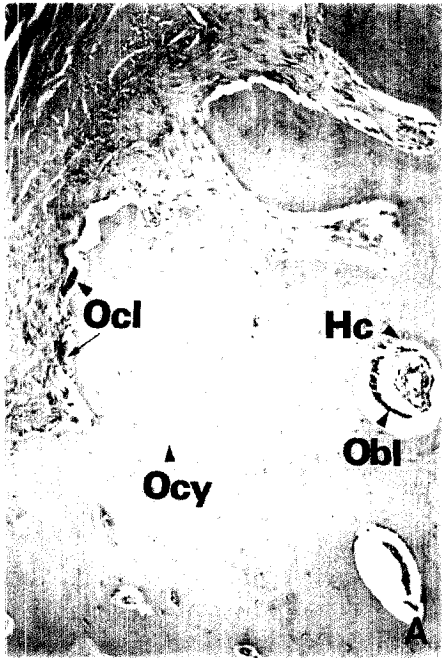


Fig. 10

참 고 문 헌

1. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am*, 18 : 187~196, 1987.
2. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*, 18: 213~225, 1987.
3. Salama R, Weissman SL. The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. *J Bone & Joint Surg*, 60-B: 111~115, 1978.
4. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science*, 150: 893~899, 1965.
5. Friedlaender GE. Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future direction. *Clin Orthop*, 174 : 58~68, 1983.
6. Henry WB, Wadsworth PL. Diaphyseal allografts in the repair of long bone fractures *J Am Anim Hosp Assoc*, 17 : 525~534, 1982.
7. Cutting CB, McCarthy JG, Knize DM. Repair and grafting of bone. In: Plastic surgery I, General principle. *WB Saunders Co*, 1 : 583~629, 1990.
8. Burwell RG. The fate of freeze-dried bone allograft. *Transplan Proc*, 8 : 95~111, 1976.
9. 垣内 雅明. 同種保存骨. その意義と新しい應用. 日整會誌, 68 : 26~25, 1994.
10. Tomford WW, Mankin HJ, Friedlaender GE, et al. Methods of banking bone and cartilage for allograft transplantation. *Orthop Clin North Am*, 18 : 241~247, 1987.
11. Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-Dried and Deep frozen Allografts in Rabbit. *J Bone & Joint Surg*, 58 : 854~858, 1976.
12. Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, et al. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop & Related Res*, 290 : 279~284, 1993.
13. Schwarz N, Schlag G, Thurnher M, et al. Fresh autogenic, frozen allogenic and decalcified allogenic bone graft. *J Bone & Joint Surg*, 73 : 787~790, 1991.
14. Sinibaldi KR. Evaluation of full cortical allografts in 25 dogs. *JAVMA*, 194 : 1570~1577, 1989.
15. Burchardt H, Jones H, Glowcsewski F, et al. Freeze-dried allogenic segmental corti-calbone grafts in dogs. *J Bone & Joint Surg*, 60 : 1082~1090, 1978.
16. Ennecking WP, Burchardt H, Puhl JJ, et al. Physical and biological aspects of repair in dog cortical bone transplants. *J Bone & Joint Surg*, 57-A : 237~252, 1975.
17. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin NorthAm*, 18 : 207~212, 1987.
18. Weiss RE, Reddi AH. Role of fibronectin in collagenous matrix induced mesenchymal cell proliferation and differentiation *in vivo*. *Exp Cell Res*, 133 : 247~254, 1981.
19. 양규현, 김남현. 자가 fibrin으로 고정하여 이식한 자가골수세포가 골결손치유에 미치는 영향. 대한정형외과학지, 26 : 1289~1304, 1991.
20. Albrektsson T, Bach A, Edshage S, et al. Fibrin adhesive system(FAS) influence on bone healing rate. *Acta Orthop Scand*, 53 : 757~763, 1982.
21. Arbes H, Bosch P, Lintner F, et al. First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting combined with the fibrin adhesive system(F.A.S.). *Arch Orthop Traumat Surg*, 98 : 183~188, 1981.
22. Schwarz N, Redl H, Zeng L, Schlag G, et al. Early osteoinduction on rats is not altered by fibrin sealant. *Clin Orthop & Related Res*, 293 : 353~359, 1993.
23. Lucht U, Bunger C, Moller JT, et al. Fibrin sealant in bone transplantation. No effects on blood flow and bone formation in dogs. *Acta Orthop Scand*, 57 : 19~24, 1986.
24. Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calc Tiss Res*, 3 : 211~237, 1969.
25. Leung KS, Fung KP, Sher AH, et al. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone & Joint Surg*, 75 : 288~291, 1993.
26. Hanson PD, Markel MD. Bone and cartilage transplantation. *VCOT*, 5 : 163~169, 1992.

27. Schena CJ, Mitten RW, Hoefle WD. Segmental freeze-dried and freshcortical allografts in the canine femur. I. A sequential radiographic comparison over a one year time interval. *J Am Anim Hosp Assoc*, 20 : 911~925, 1984.
28. 장익열. 凍結乾燥骨에 對한 小考. 대한정형외과학회지, 23 : 929~928, 1988.
29. Jonson AL, Shokry MM, Stein LE. Preliminary study of ethylene oxide sterilization of full-thickness cortical allografts used in segmental femoral fracture repair. *Am J Vet Res*, 46 : 1050~1056, 1985.
30. Johnson AL, Roe SC, Harari JE. Ethylene oxide sterilization of cortical bone for bone banking. *Vet Sur*, 15 : 49~54, 1986.
31. Johnson AL, Moutray M, Hoffmann WE. Effect of ethylene oxide sterilization and storage condition on canine cortical bone harvested for banking. *Vet Sur*, 16 : 418~422, 1987.
32. Jonson AL, Stein LE. Morphogenetic comparison of healing pattern in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res*, 49 : 101~105, 1988.
33. Urist MR, Dowell TA, Hay PH, et al. Inductive substrates for bone formation. *Clin Orthop*, 59 : 59~95, 1968.
34. Shen WJ, Chung KC, Wang GJ, et al. Demineralized bone matrix in the stabilization of porouscoated implants in bone defects in rabbits. *Clin Orthop & Related Res*, 293 : 346-352, 1993.
35. Stevenson S. Bone Grafting. In: Slatter DH, ed. Textbook of small animal Surgery II. *WB Saunders Co*, 2035~2048, 1985.
36. 乘松尋道. 骨の 定量的分析法 骨形態計測. 西村書店, 6 : 2~33, 1983.
37. Jonson AL. Principle of bone grafting. *Semi Vet Med & Sur(Small Animal)*, 6 : 90~99, 1991.
38. Nakamura T. Experimental study on repair of the defect of the pars interarticularis in rat with bone morphogenetic protein and fibrin glue. *J Jpn Orthop Assoc*, 66 : 753~762, 1992.
39. 伊藤晴. 臍の骨内移植に對する骨形成因子(BMP)とフィブリン糊の作用に關する實驗的研究. 日整會誌, 65 : 580~590, 1991.
40. 服部 壽門. 骨形成因子(BMP)とフィブリン糊混合劑の骨・軟骨誘導能に關する研究. 日整會誌, 64 : 824~834, 1990.
41. Schlag G, Redl H. Fibrin sealant in orthopedic surgery. *Clin Orthop & Related Res*, 227 : 269~285, 1988.
42. Lucht U, Bunger C, Moller JT, et al. Fibrin sealant in bone transplantation. No effects on blood flow and bone formation in dogs. *Acta Orthop Scand*, 57 : 19~24, 1986.
43. Osborn JF, Donath K. Fibrinklebesystem und reparative osteogeneserstergebnisse tierexperimenteller. Untersuchungen. *Dtsch Zahnarzt Z*, 38: 499~501, 1983.