

## 동종이식골의 탈회정도가 이소성 골형성유도에 미치는 영향

윤홍식 · 진병로 · 신희인\*

영남대학교 의과대학 치과학교실, 경북대학교 치과대학 구강병리학교실\*

### Abstract

#### EVALUATION OF ECTOPIC BONE FORMATION EFFECT BY DECALCIFIED DEGREE OF ALLOGRAFTS

Hong-Sik Yun, Byung-Rho Chin, Hong-In Shin\*

*Department of Dentistry, College of Medicine, Yeungnam University*

*Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Kyungpook National University\**

This study has been performed to evaluate the relationship between the remained mineral components in a decalcified bone matrix and an ectopic bone formation efficiency. The frozen rat diaphyseal cortical bones measuring 0.5cm in length were demineralized in heated 0.6N HCl at 60°C for 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 minutes, respectively, using a controlled heat ultrasonic cleaner. Each 1cc of decalcifying solution taken during decalcification procedure was used to calculate calcium content using calcium diagnostics kit under 600nm of spectrophotometer. After decalcification, each specimen was also weighed. Then each prepared specimen was implanted into the dorsal pouch of 24 Sprague-Dawley rats divided into 8 groups by time course. The implants were harvested at 1, 2, and 3 weeks and prepared for routine H-E stain specimens to evaluate osteogenic activity. The results are as follows :

1. There was statistical significant difference in change of calcium concentration up to demineralization of 30 minutes and each allogenic bones decalcified up to 20 minutes revealed 99.65% of decalcification in average.
2. There was statistical significant difference in change of weight in demineralized allogenic bone up to 20 minutes treatment but, no significant change was noted after that time.
3. The histologic analysis revealed active ectopic bone formation in the implanted allografts demineralized for 20, 25, 30 minutes, respectively. However, the other groups of allografts showed relatively poor osteoinductive activity.

These findings suggest that complete decalcification with a minimized degeneration of collagen matrix is necessary to induce maximal osteogenesis by decalcified bone allograft.

**Key words :** Ectopic bone formation, Decalcification, Osteoinductive activity

### I 서 론

구강악안면 영역에서의 결손부수복을 위해 다양한 종류의 골 이식이 시행되어지고 있으며 그중 신선 자가골의 골성회복능이 그 무엇보다 탁월하여<sup>12)</sup> 가장 효과적인 골이식재로 인정되고 있으나 부가적인 수술과 이에 따른 합병증 및 골 채취량의 한정에 의해 제한적으로 이용되고있다. 이에 자가골을 대신하기위한 다양한 골대체 물질의 개발과 더불어 다양하게 처리된 동종골의 응용이 이루어지고 있다.

최근 장기이식에 대한 인식변화와 골 은행의 활성화<sup>1)</sup>로 동종골의 확보가 보다 용이해짐에 따라 동종골의 응용이 차츰 보편화되고 있다. 동종골은 이식후에 따르는 감염과 면역거부반응같은 문제점들<sup>2)</sup>을 제거하기 위해 고온처리<sup>3)</sup>, 화학처리<sup>4)</sup>, 동결건조<sup>5,6,7)</sup> 처리 등 다양하게 처리를 하고 있으나, 보다 우선되는 것은

기왕의 질환이 없는 적절한 공급원의 선택이라고 할 수 있다.

초기의 동종골 응용은 동결건조 형태로 이용되었으나, 이는 자가골에서와 같은 일차적 골유도 효과를 기대할 수 없었다. 그러나 1965년 Urist<sup>5)</sup>에 의해 골기질내에 골형성 유도물질(Bone Morphogenic Protein: BMP)이 함유되어 있음이 확인 보고됨에 따라 탈회 동종골의 임상적 응용이 골이식분야에 새로운 장을 개척하게 되었다.

임상적으로 적용되고 있는 탈회골의 일반적인 처리법은 Urist<sup>6)</sup>에 의한 방법과 Reddi<sup>6)</sup>에 의한 골 처리법을 기초로 하고 있다. Urist 방법은 동종골을 chloroform/methanol(1:1)용액에서 탈지(25°C에서 4시간 동안)하고, 0.6N HCl로 탈회(25°C에서 24시간 동안)하여, 효소 억제제가 함유된 인산 완충 용액으로 씻어낸 후, 동결건조하고 있다. 반면 Reddi<sup>6)</sup>방법은 0.5N HCl용액에서 탈회하고(3시간 동안), ethanol(1시간)과 anhydrous diethyl ether(30분)등

의 유기용매로 씻어낸 다음, 37°C에서 24시간 건조시켜 사용한다. 이와 같이 처리된 탈회 동종골은 골기질 내에 존재하는 골 유도 단백질이 활성화되어 미분화 간엽세포의 주화성 증식, 연골과 골의 분화, 그리고 조혈과정을 거치는 단계적인 골 형성 과정을 유도하는 것으로 알려져있다<sup>12,13</sup>). 그러나 탈회된 골 기질로부터 공여부에 노출된 BMP의 생물학적 작용기전에 대해서는 명확하게 이해되지 못하고 있다. 특히 동종 탈회골에 의해 골성회복 시 조골세포들에 의한 이식골 기질의 초기 석회화에 대한 설명은 명확히 이루어지지 않고 있다. 1992년 Yamashita등<sup>7)</sup>은 신생골의 형성 전에 골세포와 무관하게 주위혈관에서 유래하여 골기질의 석회화가 선행되고, 이후 연골의 형성과 함께 일련의 골생성이 이루어짐을 관찰하고 이런 탈회골 기질의 무세포성 초기석회화는 무기질의 저장과 파골세포에 의한 흡수에 동반하여 조골세포의 활성을 유도하는 중요 소견으로 간주하였다. 그리고, 1994년 Horisaka등<sup>8)</sup>도 골세포에 의한 골형성전의 교원질 석회화를 관찰보고 하면서, 연속되는 골 형성 과정과의 밀접한 연관성을 주장하였다. 이러한 무세포성 광물 침착이 뒤이은 골형성에 필수적인 것이라면 완전탈회되지 않고 골기질에 잔존하는 무기물들은 초기석회화에 필요한 공급원이 되거나 그 자체로서 isotropic nucleation이 될 수 있음을 시사한다. 이에 골기질 내 칼슘량이 BMP 활성화에 따른 이소성 골 형성에 어떠한 상관성을 지니는지를 보다 구체적으로 이해하기 위하여 골기질 내 잔존 칼슘치와 이소성 골 형성 정도를 상호 비교하여 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II 재료 및 방법

### 1. 실험동물

일정기간 동일조건에서 사육된 생후 8주령의 Sprague-Dawley 계 백서 24마리를 1, 2, 3주군의 세군으로 구분하고, 각군당 8마리를 할당하여 실험에 이용하였다.

### 2. 동종 이식골편의 채취 및 처리

#### 1) 동종 이식골편의 채취

생후 8주령의 Sprague-Dawley계 백서로부터 대퇴골을 채취하여 부착된 연조직을 제거한 후 바로 동결보관(-20°C)하였다. 그리고 실험직전에 저속엔진에 부착된 diamond disk로 골간부를 0.5mm크기로 절단한 다음, file 등으로 골수를 제거하여 관상의 이식골편을 형성하였다.

#### 2) 동종이식골편의 처리

동일한 크기로 형성된 동종 이식골편을 60°C로 조절된 0.6N HCl 용액 5cc가 담겨있는 각각의 실험관에 넣은 다음, 초음파 세척장치를 이용하여 각 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40분간 탈회시킨 후 이들의 무게를 측정하였다. 그리고, 각각의 실험관으로부터 탈회용액 1cc씩을 취하여 용해된 칼슘량 측정에 이용하였다.

#### 3) 동종이식골편의 이식

Pentobarbital sodium(30mg/kg)을 복강 주사하여 각 동물들을 마취시킨 다음, 배부를 면도날로 삭모하고, 포비돈 및 알코올로 소독하였다. 그후 15번 수술칼로 2cm 간격으로 5mm 크기의 절개를 좌우 양측에 2개씩 형성하고, curette으로 조심스럽게 피하낭을 형성하였다. 형성된 4개의 피하낭에 처치 기준에 준하여 처리 준비된 각각의 동종이식골을 이식하고, 3-0 봉합사로 단순 봉합한 다음, 항균 연고를 발라주었다.

#### 4) 표본제작

시술후 1, 2, 3주째 실험 동물을 pentobarbital sodium으로 심마취시켜 4% paraformaldehyde용액으로 관류 고정된 다음, 이식체 및 주위조직을 절취하여, 동일 고정액에 1일간 추가 고정하였다. 이를 10% EDTA용액으로 2-3주간 충분히 탈회한 후, 통법에 준하여 탈수 투명화 시켜 파라핀에 포매하였다. 그리고 박절기를 이용하여 4-6um두께의 절편을 제작한 다음, H&E 염색을 시행하여 광학현미경하에서 검경하였다.

#### 5) 칼슘치 측정 및 골형성 정도 비교 분석

칼슘측정은 Sigma사의 칼슘 측정용 진단 kit(588-3P)를 이용하였다. 먼저 제조회사의 지시에 따라 표준용액(calcium/phosphorus combined standard 10mg/dl)을 3차 증류수로 5배 희석하여 각각 0, 2.5, 5, 7.5, 10μ를 취한 다음, 측정 시약(Arsenaso III)을 200μ첨가하여 blank로 이용하였다. 각 시험관으로부터 취한 1cc씩을 3차 증류수를 이용하여 10배 희석한 후 그중 20μ를 취하였다. 그리고 측정시약 180μ에 첨가한 뒤 spectrophotometer(Titertek Multiskan<sup>®</sup> Mcc/340)를 이용하여 600nm 파장하에서 탈회 용액 내의 칼슘 농도 값을 구하였다.

#### 6) 통계 처리

본 실험의 자료들은 SPSS/PC+를 사용하여 탈회 동종골의 시간별 무게 변화와 농도 변화를 repeated measures of ANOVA로 통계처리하였다.

## III 성 적

### 1. 육안적 소견

실험 전기간에 걸쳐 특기할 염증 반응 및 거부 반응을 보이지 않았다. 탈회 동종 이식골편들은 시간이 경과할수록 크기가 감소되는 경향을 보였으며, 특히 35분이상 처리된 골편들은 급속한 크기 변화가 있었고, 채취 과정에서 40분 처리군에서의 일부 이식골편은 거의 찾을 수가 없을 정도였다.

### 2. 조직학적 소견

이식 1주째 60°C 0.6N HCl용액으로 5분에서 15분까지 탈회한 군을 제외하고는 Haversian관 및 열개부를 따라 조연골세포들의

분화 증식상이 관찰되었다. 연골세포들은 일렬을 지어 4-6개의 세포군을 이루었고, 경우에 따라서는 이식 동종골편의 내면을 따라 판상으로 배열되었다. 모든 경우에서 혈관들은 동종 이식골편을 싸고 있는 섬유성 피개막 주위에 다수 증식 분포하였으나, 동종 이식골편 내부로의 유입 성장은 미약하였다. 이식 2주째 연골의 형성이 보다 현저해졌으며, 15분 미만 탈회한 이식군에서도 미약하지만 연골세포의 분화가 관찰되었다. 20분에서 30분간 탈회한 군에서는 Haversian관 주위의 탐식세포들의 활성이 보다 활발하였고, 혈관을 다수 함유한 결체조직이 증가되면서 동종 이식골 기질 상방으로 신생골의 침가가 이루어졌다. 그러나 35분이상 탈회된 군에서는 골기질의 변성예의해 골성 유도가 미약하였고, 빠른 흡수상을 나타내었다. 새롭게 유도된 신생골은 헤마톡실린에 농염되는 선에 의해 이식골기질과 명확히 구분되었고, 골소와내 골세포의 존재에 의해 쉽게 구분되었다. 부위에 따라서는 비대해진 연골세포를 함유한 석회화 연골과 신생골의 구분이 명확하지 않았다. 연골은 혈관의 유입성장에 동반된 파골세포들에 의해 흡수되고, 골로 대체되는 전형적인 연골내 골

화과정을 보이는 반면, 부위에 따라서는 연골의 개재없이 골형성이 진행되는 양상도 관찰되었다. 이소성 골 형성은 피개막 내부에 한정되어 일어났으며, 피개막 주변에서 보다 활발하여 피개막 하방으로 신생 골주들이 서로 유합되는 양상을 나타내었다. 이식 3주에 있어 5분군 및 35분이상 탈회된 군을 제외하고는 이소성 골 형성이 다양한 정도로 진행되었다. 골 형성 정도가 현저한 20분-30분간 탈회된 군에서는 피개막 하방으로 치밀 골판 형성되면서 신생골주 사이의 섬유성 골수 형성이 보다 현저하였다. 모든 군들 공히 실험 전 기간에 있어 특기할만한 염증 소견 및 면역거부 반응의 소견은 관찰되지 않았다.

### 3. 칼슘 농도 및 시료 무게변화의 측정

무작위로 선택된 12개의 시료를 사용하여 시간별(5분간격)로 8군으로 나누어, 40분까지의 칼슘 농도 및 시료의 무게를 측정 한 후, 각각의 평균값을 구하였다(Table 1, 2). 칼슘 농도 변화 측정에서 시간별로 추출되는 칼슘량은 시료의 크기와 무게에 따

**Table 1. Time-course change in mean value and standard deviation of calcium ion concentration(mg/ml)**

time n=12	5	10	15	20	25	30	35	40mins
1	4.53	8.09	9.76	10.50	10.51	10.51	10.51	10.51
2	9.10	15.62	16.70	16.72	16.72	16.72	16.72	16.72
3	11.08	16.84	18.32	18.96	19.27	19.27	19.27	19.27
4	8.28	13.39	15.36	15.53	15.66	15.66	15.66	15.66
5	9.56	14.50	15.63	16.41	16.51	16.58	16.58	16.68
6	7.91	13.14	14.89	14.98	15.05	15.05	15.05	15.05
7	11.71	15.92	17.83	18.23	18.23	18.23	18.23	18.23
8	10.19	16.60	17.44	17.53	17.53	17.53	17.53	17.53
9	8.09	13.40	14.69	14.76	14.76	14.76	14.76	14.76
10	10.05	16.36	16.59	16.59	16.59	16.59	16.59	16.59
11	10.75	15.04	16.33	16.36	16.39	16.39	16.39	16.39
12	8.12	12.17	13.48	13.53	13.53	13.53	13.53	13.53
M.V±S.D	9.11±1.92	14.26±2.46	15.58±2.30	15.84±2.26	15.90±2.29	15.91±2.29	15.91±2.29	15.91±2.29

**Table 2. Time-course change in mean value and standard deviation of specimen weight(mg)**

time n=12	0	5	10	15	20	25	30	35	40mins
1	43	37	33	30	26	22	22	17	17
2	30	27	18	14	13	13	11	11	11
3	38	34	32	23	21	17	16	16	16
4	35	32	30	29	26	25	17	14	14
5	32	26	24	20	17	13	13	13	13
6	34	28	26	22	18	18	15	14	14
7	41	39	34	32	23	17	17	15	15
8	37	29	26	24	22	18	17	17	17
9	40	39	34	32	21	19	19	19	19
10	35	30	27	26	23	21	21	20	20
11	33	28	25	19	16	16	15	15	15
12	27	17	17	16	15	15	14	14	14
M.V±S.D	35±5	31±6	27±5	24±6	20±4	18±3	17±3	15±2	15±2

라 다르게 나타났지만, 30분 이후에는 평균 15.91mg/ml로 농도 변화가 없었다(Table 1). 그리고 탈회 시작 후 칼슘 변화량의 폭이 시간이 갈수록 점점 줄어들다가 25분에서 30분사이에는 단지 0.01mg/ml의 차이만을 나타내었다. 이에 반해 각 군의 무게 변화량은 35분이상 탈회군에서 평균 15mg으로 더 이상의 변화가 없었으며, 변화폭의 감소 양상이 비교적 불규칙적이었다(Table 2).

#### 4. 통계 처리 및 분석

시간에 따른 변화값의 통계적 유의성을 검증하기 위해서 repeated measures of ANOVA를 사용하였고, p값이 0.01미만일 때 통계적 의의를 부여하였다. 칼슘 농도 변화에서는 5분-10분, 10분-15분, 15분-20분, 20분-25분, 25분-30분사이의 값들이 통계적 유의성을 나타내었다. 이는 5분에서 30분까지의 저온 열탕 탈회 처리 동안에 유리되는 칼슘의 양이 의미있는 변화를 보였으나, 30분 이상에서는 탈회되는 칼슘량의 변화가 미미함을 의미한다(Fig. 1). 그러나 유리되는 칼슘 농도의 실질적인 값은 20분까지 급속히 증가하다가 이후에는 거의 변화를 보이지 않고있다. 그리고 칼슘 농도 변화량의 결과에서 30분이상 완전 탈회된 값들에 대

한 이전의 수치를 백분율로 환산한 경우 20분까지의 탈회율이 평균 99.65%에 이르러, 이 때 탈회가 대부분 이루어졌음을 알 수 있었다(Table 3). 무게 변화에서는 탈회시작 후 5분, 5분-10분사이의 무게값 차이에서 통계적 유의성을 보였다( $p < 0.01$ ). 그렇지만 그래프의 양상은 Fig. 1과 유사하게 20분까지는 급격한 무게의 감소를 보였고, 25분 및 30분군에서는 소폭의 감소를 보이다가 35분 군부터는 변화를 나타내지 않았다(Fig. 2). Fig. 1과 Fig. 2에서 탈회시작 20분 부터 변화량이 적다는 공통점을 보이지만, 무게 변화와 농도 변화사이에는 통계적으로 의미있는 비례적인 상관성을 부여할 수 없었다.

#### IV. 고 찰

구강악안면 영역에서의 골재건술에 사용되는 골 이식 방법으로 자가골 이식이 가장 빈번히 사용되고 있으며, 이식골편은 환자 자신의 골격으로부터 다양한 형태로 얻을 수 있다. 신선 자가골의 장점은 면역반응을 일으키지 않으며 골형성 초기 단계에서 골화세포를 공급받을 수 있다는 것이고, 단점으로는 골이식을 위한 또 다른 수술이 필요하다는 점이다. 이에 반해 같은 종내의 다른 개체로부터 골을 이식하는 동종골 이식은 큰 골결

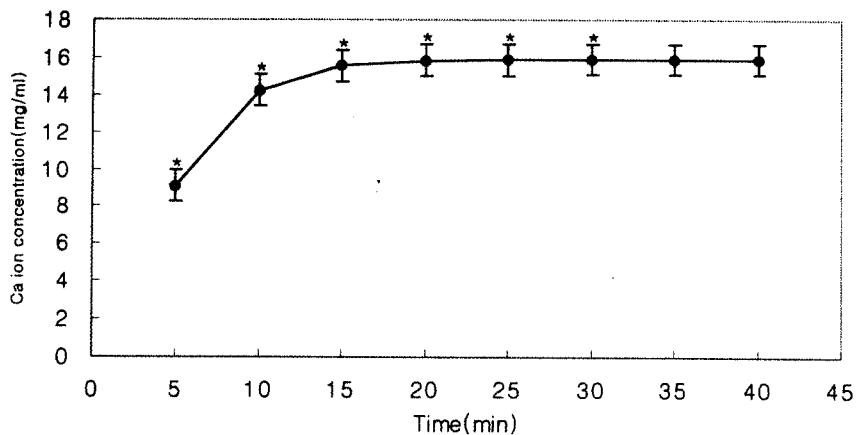


Fig. 1. Mean value, maximum, minimum & standard deviation of calcium concentration. \*p value < 0.01

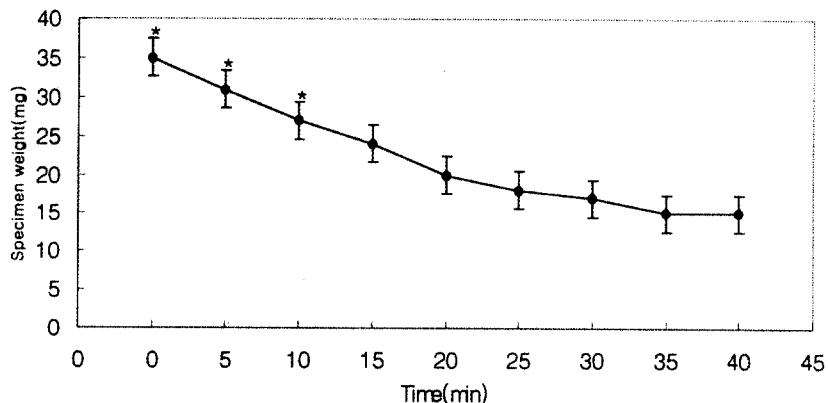


Fig. 2. Mean value, maximum, minimum & standard deviation of specimen weight. \*p value < 0.01

**Table 3. Time-course change in percentage(%) of calcium concentration**

n=12	time 5	10	15	20	25	30	35	40mins
1	43.09	76.90	92.80	99.85	100	100	100	100
2	54.43	93.42	99.88	100	100	100	100	100
3	57.47	87.37	95.06	98.54	100	100	100	100
4	52.84	85.50	98.04	99.11	100	100	100	100
5	57.67	87.47	94.29	98.95	99.57	100	100	100
6	52.54	87.31	98.92	99.53	100	100	100	100
7	64.23	87.33	97.82	100	100	100	100	100
8	58.12	94.71	99.52	100	100	100	100	100
9	54.87	90.84	99.57	100	100	100	100	100
10	60.55	98.59	99.98	100	100	100	100	100
11	65.58	91.80	99.65	99.86	100	100	100	100
12	59.98	89.96	99.63	100	100	100	100	100
Mean Value	56.78	89.26	97.93	99.65	99.96	100	100	100

손부의 회복에 신선 자가골 이식보다 효과적이지는 못하나<sup>9</sup>, 골 채취량의 한계(특히 유아나 어린이) 및 공여부의 부작용을 극복하기 위해 자가골 이식의 대체 수단으로 널리 사용되고 있다. 일반적으로, 동종골 채취는 무균상태에서 이루어지나 환자의 상태에 따라 감염원이 될 수도 있다. 현재 전염이 가능한 질환으로 HIV(human immuno-deficiency virus)에 의한 AIDS와<sup>28)</sup>우리나라에서 특히 많이 발병하고 있는 간염을 들수있으며<sup>10</sup>, 실제로 1984년 골이식후 HIV감염이 보고된 바 있다<sup>11</sup>. 동종골 이식에 의한 이러한 감염성을 해결하기 위해 채취된 골의 화학처리<sup>6</sup>, 고압 멸균소독<sup>5</sup>, 방사선 조사<sup>22</sup>, EO gas(ethylene oxide)<sup>13</sup> 등이 이용되고 있지만 동결 보관 탈회 처리법이 골재생 능력에 영향을 미치지 않으면서 감염을 최소화 한다고 알려져 있다<sup>14</sup>. 동종골이식에서 또하나의 문제점은 숙주의 면역 거부 반응이라 할 수 있다. 이식체의 항원성은 주로 세포성분에 의한 것이므로 다른 장기 이식에 비해 면역 반응이 미약하지만<sup>15</sup> 항원성 약화를 위해 방사선 조사, 화학 처리, 동결 건조, 탈회 등의 다양한 방법이 사용되고 있다<sup>16</sup>. 그러나, 그 중에서 동결 건조법이 가장 양호한 방법임이 확인된 바 있다<sup>17</sup>. 본실험에 이용된 이식골편 역시 채취한 즉시 -20°C에서 보관한후 0.6N HCl에 산처리한 동결 건조 탈회골의 형태로 이식시, 육안적 소견 및 조직학적 소견상 실험 전 기간에 걸쳐서 염증 반응 및 면역 거부 반응의 소견을 보이지않아 동종 이식골로서의 요구 조건을 충족하였다. 탈회골에 대한 연구는 1965년 Urist<sup>10</sup>가 탈회골에 의한 이소성 골형성을 성공적으로 유도한 이래로 본격적인 임상적, 실험적 연구가 시작되었으며, 대표적인 탈회 방법으로는 Urist등<sup>9</sup>에 의한 방법과 Reddi와 Huggins<sup>11</sup>에 의한 방법을 들 수 있다. 두 방법은 처리과정에 약간의 차이가 있지만 골기질에 함유된 BMP(Bone Morphog- enic Protein)를 노출시켜 골형성을 유도하고 있다. 이러한 과정은 미분화간엽세포의 주화성 증식, 연골 및 골성 분화, 그리고 조혈의 단계로 골형성을 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>12,13</sup>. 최근에는 골기질로부터 골유도 인자가 정제되고, 골유도 인자의 유전자가 클론닝 되고있지만<sup>18,19</sup> BMP에 의한 골유도 기전

은 충분히 규명되어 있지 않다. 1975년 Linden<sup>18</sup>이 탈회된 골과 상아질의 칼슘화는 골형성의 중요한 전제조건이라고 보고하였지만, 신생골 형성전의 이소성 칼슘화 기전에 대한 관심은 거의 기울여지지 않았다. 1977년 Urist등<sup>19</sup>은 골기질로부터 CIP(calcification initiator protein)를 추출하여 이에 대한 관심이 높아졌으나, CIP에 의한 골기질의 재칼슘화를 관찰하지 못함에 따라 초기 칼슘화의 골형성 유도 과정에서의 역할은 미제로 남게되었다. 그러나 1991년에 Yamashita등<sup>20</sup>이 신생골 형성 전 골기질의 칼슘화를 보고하고, 1992년<sup>14</sup>에 탈회된 골기질을 이용한 이소성 골형성 과정에서 골세포에 의한 연골 및 골형성 이전의 특이한 칼슘화 양상을 관찰하고 이를 "acellular mineral deposition"이라 명명하면서 초기 석회화에 대한 생물학적 역할이 재조명되었다. 그들은 이러한 무세포성 광물침착은 세포성 골형성과 관련된 alkaline phosphatase 활성과 무관하게, 변성된 탈회골 기질을 중심으로 heterotopic nucleation이 발생한다고 하였다. 그리고 이때 생성된 광물 침착물들은 파골세포와 유사한 다핵세포에 의해 흡수되고, 이후에는 골유도 단백질의 효과에 의한 조골세포나 연골세포의 세포성 골형성 과정이 유도된다고 하였다. 즉 골유도 단백을 함유한 탈회된 골기질이 골형성에 필수적인 무세포성 초기광물침착의 환경을 제공하며, 초기 석회화는 침착된 광물을 흡수하기 위한 파골세포의 주화성 이주를 야기한다고 보고하였다. 그리고 초기 광물 침착에는 이식골 주위로 신생 혈관의 증식이 필수적이란 사실에서 초기 석회화에 이용된 칼슘과 인은 주위의 혈관으로부터 공급되는 것으로 설명하였다. 또한 1993년 Beertsen등<sup>20</sup>은 alkaline phosphatase를 함유한 dentinal collagen demineralized sheet를 매식한 실험에서 매식체의 석회화가 조골세포를 유도함으로 일련의 골형성이 이루어진다고 보고한 바 있다. 그리고 1994년 Horisaka등<sup>15</sup>은 골형성 단백을 함유한 교원질 이식 후 7일째에 매식체 가장자리로부터 미성숙골에 의한 대체를 관찰, 보고하면서 정확한 기전을 알 수 없지만 골유도 동안에 선행되는 이식된 교원질의 칼슘화가 뒤이은 골형성 및 골개조 과정과 밀접한 연관성을 지니고 있다고 결론지었다. 이러한 사실

들은 무세포성 광물침착이 파골세포 유도의 첫단계이며, 유도된 파골세포들이 침착된 광물질을 흡수함에 따라 조골세포의 활성화가 촉진됨으로써 골형성이 시작된다는 이론을 지지하는 것이다. 본 연구에서는 동종 이식골의 탈회된 정도에 따른 골형성능을 비교함으로써 골기질에 남아있는 칼슘이 조골세포에 의한 신생골 형성전의 무세포성 광물침착과 어떠한 연관이 있는지 살펴보고 잔존칼슘이 BMP의 골형성 유도에 미치는 생물학적 중요성을 밝히고자 0.5cm 크기의 골편을 60°C 0.6N HCl용액에서 5분에서 40분까지 5분간격으로 탈회정도를 달리한 후 백서 모델을 이용하여 이소성 골형성능을 조직학적으로 평가하였다. 골분말에 의한 이소성 골형성 유도 과정에서와 달리 본 실험에서와 같이 관상 골편을 이용한 경우는 혈관이 존재하였던 공간을 따라 혈관의 유입 성장과 탐식세포 등의 이동중식이 이루어지고, 열개부로 분화증식된 조연골세포이 일렬 또는 판상으로 채워지며 탐식세포에 의해 haversian관 주위의 골기질이 제거되면서 연골내 골화과정에 의해 골형성이 진행된다. 본 실험 결과 역시 일반적으로 보고된 관상 이식골편의 경우와 같은 골성 대체 과정을 나타냈으나, 탈회된 정도에 따라 다양한 정도의 이소성 골형성 양상을 보였다. 정도의 차이는 있지만 20분, 25분, 30분간 탈회된 군에서 이식후 1주째 연골세포의 분화 증식이 분명하였고, 2주째부터 이식 골편내의 haversian관 내부와 열개부를 중심으로, 그리고 이식골 내외면을 따라 형성된 연골조직의 골성 대체가 활발히 진행되었으며, 3주째에는 골형성이 완성되었다. 반면, 35분과 40분군에서는 골기질의 변성으로 골성 유도없이 이식시 신속히 흡수되어 조직채취시 거의 찾을수 없는 경우도 있었다. 결과에서 보여주듯이 60°C 0.6N HCL용액에서 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40분간 시간별로 탈회한 동종 이식골중에서 20, 25, 30간 탈회한 군들이 가장 효과적인 골형성능을 보였고, 이때의 탈회 이식골편의 탈회정도는 각각 99.65%, 99.96%, 100%였다. 이러한 사실에서 이식골내의 칼슘이 완전히 제거되어야 BMP에 의한 효과적인 골유도가 야기됨을 알수있고, 잔존 칼슘이 탈회 골기질에 의한 이소성 골형성전에 이루어지는 "acellular mineral deposition"에 역할을 하지않음을 보여주고 있다. 이는 BMP와 cofactor가 공여부로 확산하도록 골기질의 완전한 탈회가 보다 효과적인 이소성골형성을 유도한다는 Oikarinen<sup>21)</sup>과 Narang 등<sup>22)</sup>의 주장을 뒷받침하고 있다. 한편, 본 실험에서 완전 탈회된 35분, 40분군은 과도한 산처리과정에서 이식골편이 변성되어 효과적인 골생성을 보이지 않았다. 그러므로, 이식 동종골의 최적의 처리조건은 골기질의 변성을 최소화 하면서 완전 탈회되어야 함을 알 수 있다. 그리고 탈회 시간에 따른 이식골편의 무게 변화 결과에서 탈회 15분 이후의 값들은 통계적 유의성을 보이지 않았다. 이와같이 무게변화와 용출된 칼슘의 농도 변화가 비례적으로 이루어지지 않았음은 저온열탕 탈회동안에 골편에서 녹아나오는 성분이 칼슘으로만 국한되지 않기때문으로 사료된다. 이상의 결과에서 탈회 동종골의 골유도능을 극대화 하기 위해서는 이식골편의 완전한 탈회와 더불어 골기질 변성이 최소화되어야 한다. 그리고 이와같은 이식골의 탈회 처리법이 임상적으로 적용하기위한 이식골의 크기와 성상에 따른 적절한 탈

회 시간 및 온도의 기준치가 마련된다면 신속한 골성유도에 따른 기능적 회복 및 심미성 증진에 도움이 될 것으로 사료된다.

## V. 요 약

동종 이식골 내의 탈회 정도에 따른 잔존 칼슘치가 이소성 골형성능에 미치는 영향을 파악하고자 Sprague-dowley계 백서에서 채취한 경골 및 대퇴골의 골간부를 0.5cm 크기로 절단하여 부착 연조직은 제거한 다음, 초음파 세척장치를 이용하여 60°C 0.6N HCl용액으로 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분간 각각 처리하여 탈회 동종 이식골을 준비하였다. 이때 탈회시간에 따른 시편의 무게를 측정하였고, 각 탈회용액으로부터 1cc를 취한 다음 Sigma사의 진단용 칼슘측정키트를 이용하여 spectrophotometer로 600nm 파장하에서 칼슘치를 측정하였다. 그리고 탈회 정도에 따른 이식골편의 골형성 유도능을 확인하기 위하여 24마리의 Sprague-dowley계 백서를 탈회시간별로 8군으로 나누어 배부에 0.5cm 크기로 4군데의 파하낭을 형성한후 각각의 처리된 탈회 이식골편을 이식하였다. 매식된 동종 이식골편들을 술후 1, 2, 3주째 채취하여 통법에 따라 H&E염색 표본을 제작하여 광학현미경으로 관찰하였다. 이상의 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 탈회 30분까지의 용출되는 칼슘 농도 변화는 평균 15.91mg/ml로, 탈회 20분 이후에 평균 99.65%의 탈회정도를 보였다.
2. 동종골 무게 변화량은 탈회시작 25분까지 뚜렷한 무게변화를 보였으나, 그 이후에는 변화의 정도가 미약하였다.
3. 탈회된 이식 동종골에의한 이소성 골형성 유도능 비교에서 20분에서 30분간 탈회된 군에서 가장 양호하였고 그 외의 군에서는 그 정도가 열등하였다.

이상의 결과는 탈회된 동종골에 있어 골형성 유도능을 극대화하기 위해서는 골기질내 무기성분의 완전한 탈회가 선행되어야 하며, 탈회골 기질의 변성이 최소화되어야 함을 시사한다.

## 참고 문헌

1. 김귀희, 엄인웅, 이동근 : 악안면영역의 동종골 이식-임상적고찰. 대한구강악안면외과학회지 1993;19(2):226-230.
2. riedlaender GE. : Immune responses to osteochondral allograft Clin. Orthop 1983;174:58-68.
3. Williams G : Experiences with boiled cadaveric cancellous bone for fractures of long bones. J. Bone Joint Surg 1964;46B: 398.
4. Urist MR, Mikulski AJ, and Boyd SD. : A chemosterilized antigen extracted bone morphogenetic alloimplant for bone banks. Arch Surg 1975;110:416-428.
5. Urist MR : Bone formation by autodinduction, Science 1965;150:893-899.
6. Reddi AH, and Huggins CB : Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats, Proc. Natl. A. Sci. USA 1972;69:1601-1605.
7. Yamashita K, Takagi T : Calcification preceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. Arch Histol Cytol 1992;Vol. 55 No. 1 31-43.
8. Horisaka Y, Okamoto Y, Matsumoto N, et al.:Histological changes of implanted collagen material during bone induction. J. of Biomedical Mat Research 19 :28, 97-103.

9. Urist MR : Surface-decalcified allogeneic bone implants, Clin Orthop 1968;56:37
10. Shutkin NM : Homologous-serum hepatitis following the use of refrigerated bone bank bone, J Bone Joint Surg 1954;36A:160.
11. Centers for Disease Control : Transmission of HIV through bone transplantation : Case report and public health recommendations, MMWR 1988;37:597-599.
12. Glovaxki J, Kaban LB, Murray JE, et al. : Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects, Lancet 1981;1:959-962.
13. Simonian PT, Conrad, EU, Chapman JR, Harrington RM, and Chansky HA : Effect of sterilization and storage treatments on screw pull-out strength in human allograft bone Clin Orthop 1994;302:290-296.
14. Mellonig JM, Prewett AB, and Moyer AP : HIV inactivation in a bone allograft, J Perodontol 1992;63:979-983.
15. Burwell RG : Studies in the transplantation of bone : V II The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone, J Bone Joint Surg 1964;46B:110,
16. Ellis E and Sinn D : Use of homologous bone in maxillofacial surgery, J. Oral Maxillofacial Surg 1993;51:1181-1193.
17. Heiple KG, Chase SW, and Herndon CH : A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation, J bone Joint Surg 1963;45:1593.
18. Linden GJ : Bone induction in implants of decalcified bone and dentine J Anat. 1975;119:359-367.
19. Urist MR, AJ Mikulski, M Nakagawa and K Yen : A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein, Amer. J Physiol. 1977;232(3):C115-127.
20. W Beerstsen T, van den Bos and J Niehof : Mineralization of dental collagen sheets complexed with alkaline phosphatase and intertration with newly formed bone following subperiosteal implantation over osseous defects in rat calvaria, Bone and Mineral. 1993;20:41-55
21. Oikarinen J : Experimental spinal fusion with decalcified bone in rabbits, Clin Orthop 1982;162:210-218.
22. Narang R, Wells H, and Laskin DM : Experimental osteogenesis with demineralized allogeneic bone matrix in extrasketal sites, J Oral Maxillofac Surg 1982;40:133-141.

**저자연락처**

우편번호 700-422  
 대구광역시 중구 동인2가 101번지  
 경북대학교 치과대학 구강병리학교실  
 신 흥 인

**Reprint requests**

Hong-In Shin  
 Dept. of Oral Pathology, School of Dentistry, Kyungpook National Univ.  
 101, DongIn-Dong, Joong-Gu, Taegu, 700-422, Korea  
 Tel. (053)420-6813 Fax. 053-427-4918

### Legend of Figure

- Fig. 3. Photomicrograph of an implanted bone allograft, demineralized for 5 minutes in 60°C 0.6N HCl using a controlled-heat ultrasonic cleaner, in dorsal pouches of rats. The partially demineralized bone matrix reveals no osteoinductive reaction, (H&E x40)
- Fig. 4. Photomicrograph of an implanted bone allograft, demineralized for 10 minutes in 60°C 0.6N HCl using a controlled-heat ultrasonic cleaner, in dorsal pouches of rats. The bone matrix is also not completely demineralized but mild osteoinductive activity is noted, (H&E x40)
- Fig. 5. Photomicrograph of an implanted bone allograft, demineralized for 15 minutes in 60°C 0.6N HCl using a controlled-heat ultrasonic cleaner, in dorsal pouches of rats. The relatively completely demineralized bone matrix shows partial replacement by newly formed bone from the margin, (H&E x40)
- Fig. 6. Photomicrograph of an implanted bone allograft, demineralized for 20 minutes in 60°C 0.6N HCl using a controlled-heat ultrasonic cleaner, in dorsal pouches of rats. The demineralized bone matrix shows active osteoinduction with marked trabecular bone formation, (H&E x40)
- Fig. 7. Photomicrograph of an implanted bone allograft, demineralized for 25 minutes in 60°C 0.6N HCl using a controlled-heat ultrasonic cleaner, in dorsal pouches of rats. The implanted bone matrix is completely replaced new bone containing fibrovascular marrow tissue, (H&E x40)
- Fig. 8. Photomicrograph of an implanted bone allograft, demineralized for 30 minutes in 60°C 0.6N HCl using a controlled-heat ultrasonic cleaner, in dorsal pouches of rats. The bone matrix induced well formed ossicle showing reformation of trabecular bone and interstitial bone marrow, (H&E x40)
- Fig. 9. Photomicrograph of an implanted bone allograft, demineralized for 35 minutes in 60°C 0.6N HCl using a controlled-heat ultrasonic cleaner, in dorsal pouches of rats. The osteoinduction is relatively well but the contraction of matrix is more marked than the other implanted bone matrix, (H&E x40)
- Fig. 10. Photomicrograph of an implanted bone allograft, demineralized for 40 minutes in 60°C 0.6N HCl using a controlled-heat ultrasonic cleaner, in dorsal pouches of rats. The bone matrix is invaded by cells but osteoinductivity is not noted, (H&E x40)



사진부도



Fig. 3.



Fig. 4.

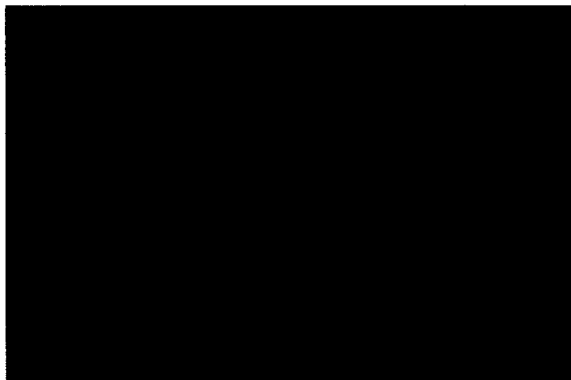


Fig. 5.

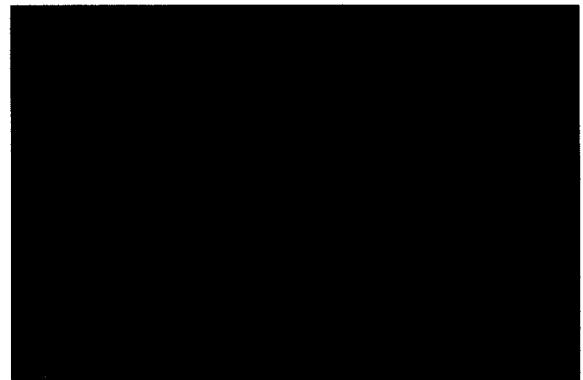


Fig. 6.

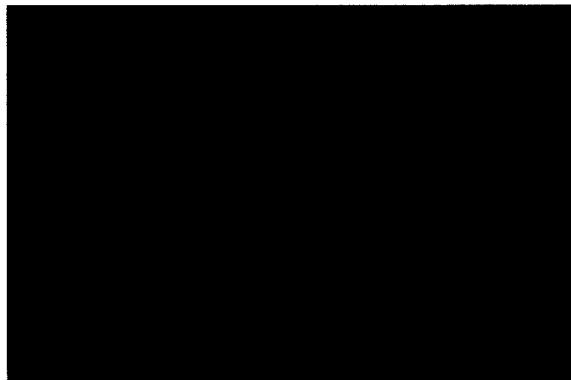


Fig. 7.

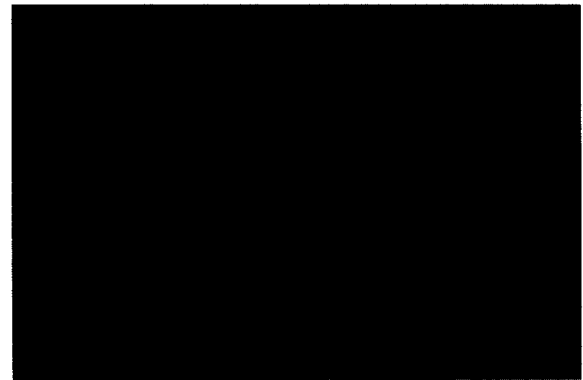


Fig. 8.

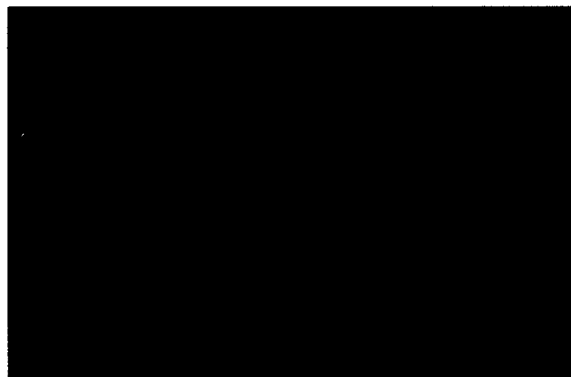


Fig. 9.

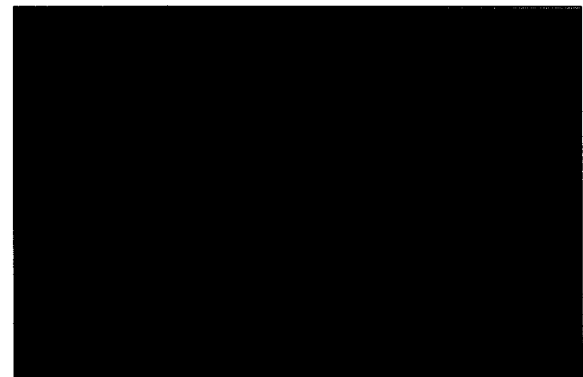


Fig. 10.