

토끼 실험적 골 결손부에 이식한 이종 이식골편의 처리방법에 따른 신생골 형성능력 비교

송하나 · 이종일^{1*}

진주 서신동물병원, *동경대학교 농학생명과대학원

(게재승인: 2007년 8월 8일)

Comparison of Efficacy of New Bone Formation According to Implant Treatment in Xenograft Transplanted for Experimental Bone Defects of Rabbits

Ha-Na Song and Jong-Il Lee^{1*}

Seosin Animal Hospital, Jeonju 560-821, Korea

*Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

Abstract : Bone graft had been widely investigated for reconstruction of bone defects or acceleration of bone healing in orthopedics, neurosurgery and dental surgery. Autograft is the golden standard of bone graft but it is associated with donor site morbidity and is restricted in quantity. Xenograft has been researched an alternative method for autograft. The purpose of this study was to investigate the efficacy of new bone formation according to three different preparations of implants on rabbit xenograft. Cortical bone xenografts which made from bovine femoral cortical bone were treated by freezing, freeze-drying or defat-freezing implant preparations. They were transplanted into proximal diaphyseal shaft of bifibulae of 15 rabbits which were divided into three groups according to their implant preparation method. The fibulae transplantations were evaluated radiographically and examined osteoblast activity by bone alkaline phosphatase (BALP) biweekly for 16 weeks to observe new bone formation and union of the experimental defected region. New bone formation was observed in 7 cases in freeze-drying and defat-freezing group, respectively. Union of proximal and distal end of defected region, which was considered as success of bone graft, was observed in 4 cases (40%; 4 of 10 cases), respectively. In freezing group, new bone formation was observed in 6 cases but, there is no union observed. BALP value was increased over twice after two weeks of graft procedure in all union cases of freeze-drying and defat-freezing group (two of five animals, respectively) then gradually decreased to 16th week. In non-union cases, there is no significant variation in BALP value. Defat-freezing or freeze-drying preparations of implants are more efficacious in new bone formation than freezing method on rabbit xenograft. While it is difficult to propose which is superior between defat-freezing and freeze-drying, defatting of implants may enhance new bone formation in xenograft.

Key words : xenograft, BALP, defat-freezing, freeze-drying, freezing.

서 론

골 이식은 외상, 감염, 선천적 질환, 노화 등으로 인해 손실된 골조직의 복구와 치료(46,47) 및 지연 유합, 비 유합, 부전 유합 등과 같은 골절 치료 후 예후가 불량한 경우에 이용하는 등, 정형외과학, 신경외과학, 치의학 영역에서 널리 적용되고 있으며 성공률을 높이고 부작용을 줄이기 위한 연구가 진행 되고 있다(9,12,14,17,26).

현재 골이식 중 성공률이 가장 높은 방법은 자가골 이식법이다. 자가골 이식은 면역거부반응을 일으키지 않고 생명

력이 있는 골형성 단백질과 골원성 세포들을 포함하고 있어서 골재생 능력이 뛰어나 가장 이상적인 방법으로 알려져 있다(5,9,18,19,25). 그러나 자가골이식은 이식골 채취를 위한 부가적인 수술의 필요, 공여부위 골의 약화에 따른 속발성 골절과 수술 후 공여부의 만성적인 통증 등과 같은 부작용과 골결손 부위가 광범위 하거나, 이식 수술을 여러 번 시행해야 하는 경우, 노령이거나 어린 개체, 선천적인 질환이나 골대사와 관련된 질환이 있는 경우 등에서는 골채취에 한계가 있으며 또한 수여부의 조건에 따라 적당한 크기 및 해부학적 모양을 충족시키는데도 제한적이어서 그 적용에 한계가 있다(23,44). 특히 생체역학적 하중이 발생하는 부위에서의 광범위한 결손부에 대한 골이식은 자가골이식으로는 거의 불가능한 것이 사실이다. 그렇기 때문에 자가골을 대체할

¹Corresponding author.
E-mail : john9220@naver.com

다른 방법이 필요하며, 동종골 이식이나 이종골 이식 등이 극복 방법의 한가지로 제시되고 있다(37,43). 최근 많은 진전을 보이고 있는 골 대체물에 대한 연구도 자가골이식의 한계를 극복하려는 방법이기도 하나, 동종골이나 이종골 같이 완벽한 골기질의 구조를 가지지 못하는 한계가 있다.(38)

동종골 이식은 Urist(39)가 탈 무기질화한 동종골 이식의 성공을 보고한 후 각종 임상에서 많이 수행되고 있으나, 이식 후의 면역학적 거부반응의 발생, 낮은 골 원성과 골 유도능력의 결핍으로 골 형성 능력이 떨어지고 바이러스성 질병의 전염 위험성, 감염 및 이식골의 취약골절이나 조기흡수 등의 단점이 있다. 또한 동종골 이식은 사체나 다른 개체에서만 얻어지는 한계가 있어 골 결손부가 광범위한 경우 적절히 가공해서 적용할 만큼 충분한 골을 확보하기가 어려운 문제점도 있다(4,5,18,25). 이에 반해 이종골 이식은 어렵지 않게 이식골을 얻을 수 있고 그 재료를 소나 돼지 등과 같은 대동물의 뼈로 할 경우 필요한 만큼의 골량을 무제한 제공받을 수 있으며, 충분한 크기로 가공할 수도 있다. 그러나 골형성 유도효과가 자가골에 비해 현저히 낮고 면역학적 상이성으로 면역 거부 반응을 유발하여 이식골의 골절, 재흡수, 불유합을 일으키는 단점이 극복해야 할 과제이다(25,32, 34,37,42).

골기질에는 면역원성 거부물질이 다른 연부조직에 비해 적기 때문에 면역반응이 현저히 낮은 것으로 알려져 있으나 실제 임상에서 동종골이식과 이종골이식의 실패의 원인은 대부분이 면역거부반응에 의한 것으로 추정되고 있으며, 이를 최소화 하는 것이 골 형성 유도에 필수적이다(10,15,40,48). 현재 이식골편의 면역성을 감소시키기 위한 여러 가지 처리방법이 꾸준히 연구되고 있고(5,8,25,33,43), 최근에는 동결법과 동결건조처리법이 가장 널리 이용되고 있는데, 단순히 면역반응의 관점에서는 동결건조법이 동결법보다 다소 우수하지만, 동결법 및 동결건조법으로는 이식물의 항원성을 완벽하게 없애지는 못하며, 동결건조 시킨 이식골도 골 내용물이나 성상에 따라 항원성에 차이가 있는 것으로 알려져 있다(4,17,18,42,51,52). 면역원성 물질 중에서도 특히 이식골편내의 지방이 항원 역할을 하여 골유도 능력에 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 동결건조 처리과정 중에는 이를 제거하기 위한 탈지과정을 거치는 것이 일반적이며(49,52), 골기질내의 탈 지방을 위하여 에테르나 순수 알코올 또는 클로로포름 등을 이용하여 이식골을 처리할 경우 골형성 단백질을 파괴 시키지 않고 골기질을 변성시키지 않으면서도 항원성을 감소시킬 수 있다는 보고들이 있다(3,35-37,42,48).

이종 이식골 재료 중에서 현재 임상에서 가장 많이 사용되고 있는 것은 소뼈의 해면골(20,34,42)이지만, 하중을 받는 부위의 골 결손부에 대해서는 불충분한 강도 때문에 단독으로 적용할 수 없다. 치밀골은 해면골에 비해 이식골편으로의 제작시에는 치밀한 구조의 문제로 처리에 어려움이 따르고 신생골 유도능력이 떨어지는 것이 사실이기도 하지만, 골 세포성분이 훨씬 적어 면역반응 유발 가능성이 적고 지지력이 요구되는 골 결손부위에 있어서는 강력한 지지력을 제공할 수 있어 보다 유리하다고 할 수 있다(4,17).

본 연구에서는 동종골이식에 비하여 보다 다양하게 이식골편을 얻을 수 있고 실제 임상에서의 응용력이 높은 이종골 이식에서 면역반응을 억제하고 신생골 형성능력을 높일 수 있는 방법으로 탈지 후 동결법을 제시하였다. 탈지 후 동결법은 동결건조법의 처리과정 중 chloroform-methanol solution을 이용한 탈지과정을 적용하였고, 이 과정을 거쳐 -196°C 액화질소에 동결보존 하였다가 이식에 공여하는 방법이다. 이 방법은 동결 건조과정에서 나타날 수 있는 골형성 물질의 손상과 이식골이 취약해지는 것을 최소화하면서 면역거부반응의 억제를 최대화시키기 위한 것이다.

최근 임상에서 골이식을 추적한 보고들의 경우 조직학적 평가를 할 수 없기 때문에 보통 방사선학적 평가로서 성공 여부를 판가름한다(13,23,27,30,33,41). 계속적인 연구의 최종 목표가 임상에서의 적용이 목적인 본 실험에서도 제시된 각각의 이식골편의 처리 방법에 대한 효용성을 이식부위에 대해 방사선학적으로 추적하였다. 그 조사결과로 이식골편이 유도한 신생골의 형태와 유합 여부를 관찰하였고, 추가적으로 BALP를 이용한 골아세포의 활성도(1,6)를 측정하여 이식골편의 신생골 형성 능력을 평가하였다. 또한, 추후 강도가 요구되는 골 결손부위의 골이식에 대한 기초적인 연구로서 치밀골을 이식골편 재료로 선택하였으며, 치밀골을 가장 많이 얻을 수 있는 대표적인 가축인 소의 대퇴골에서 채취하였다. 또한, 이식부위에 대한 내외부 고정을 따로 필요치 않아 골이식실험에 있어서 적합하다고 알려진 비골을 실험 대상으로 삼았으며, 결손부의 제작은 자가복구가 불가능하다고 판단되는 길이로 하였다(31,51,52).

재료 및 방법

실험 동물

실험 동물은 임상적으로 건강한 것으로 확인된 총 15두의 토끼(New Zealand White)로 연령은 평균 $9.3(\pm 1.3)$ 개월령, 몸무게 $4.7(\pm 0.7)$ kg 내외로 하였다. 동일 조건을 유지하기 위하여 사판되는 고품사료로 2주간 예비사육 한 후 암수 구별 없이 실험에 공여하였다. 실험동물은 이식골의 처리방법에 따라 5두씩 3군으로 구분하였다.

이식골편의 준비 및 처리

이식골편은 도축 후 12시간이 지나지 않은 비육우에서 채취한 대퇴골의 치밀골을 이식에 적합한 길이인 약 20 mm 크기로 절단하여 준비하였다. 채취된 치밀골은 생리식염수로 세정하면서 외과도와 검자를 이용하여 골막과 연부조직 및 골수를 기계적으로 제거한 후 다음 3가지 방법으로 처리하였다.

동결법 (Freezing)

준비된 이식골편을 -196°C 의 액화질소에서 7일간 저장한 후 이식에 공여하였다.

동결 건조법 (Freeze-drying)

준비된 이식골편을 chloroform-methanol(1 : 1) 탈지용액에서 3일간 탈지한 후 액화질소에서 1일간 예비동결 과정을 거

쳐 -80°C 동결건조기(OPR-FDC-8032, Operon Engineering, Korea)에서 3일간 동결 건조 시켰다. 동결 건조된 이식골편은 ethylene oxide gas(ethylene oxide 10%+nitrous oxide 90%)로 멸균 포장하여 상온에서 보존하였다가 이식에 공여하였다.

탈지 후 동결법 (Defat-freezing)

준비된 이식골편을 chloroform-methanol(1 : 1) 탈지용액에서 3일 탈지 후 -196°C의 액화질소에 7일간 저장시켰다가 이식에 공여하였다.

이식골편의 이식

마취는 전 마취제로 atropine sulfate(0.025 mg/kg)를 사용하였으며 xylazine hydrochloride(2 mg/kg)와 ketamine hydrochloride (20 mg/kg)로 합병마취 하였다.

수술은 일반적인 술식에 따라 비골 하퇴부의 외측 근위부로 접근하였고 노출된 비골의 근위 골 간부를 약 20 mm 길이로 절제하여 인위적으로 골결손 모델을 만들었다. 절제시킨 비골 결손 부위에 각 실험 군에 따라 준비된 이식골편을 이식한 뒤 일반적인 방법에 따라 봉합하였다. 골이식부위에 대한 내 외부 고정은 하지 않았다.

수술 후 처치는 시술 시부터 3일간 광범위 항생제인 enrofloxacin(5 mg/kg, IM, bid)만을 투여하였고 포대는 상황에 따라 적절히 교체하였다.

신생골 형성 평가

방사선사진 검사

모든 이식부위를 이식 직후부터 2주 간격으로 16주까지 mediolateral position으로 방사선 촬영을 실시하여 이식골의 상태와 신생골의 형성 및 유합 과정을 조사하였다.

골아세포의 활성도 검사

혈청내 Bone alkaline phosphatase(BALP)를 측정하여 골아세포의 활성도를 평가하였다. 모든 실험동물에서 이식 직후부터 2주 간격으로 16주까지 채취한 혈청을 -80°C의 deep freezer에 보관하였다가 측정하였다.

BALP는 Behr and Barnert의 방법(6)을 이용하여 측정하였으며, 준비된 혈청을 4°C에서 24시간 해동한 후 UV spectrophotometer(UVIKON 922, KONTRON, Italy)를 이용하여 640 nm에서 측정하였다. 매회 측정은 3회 반복 측정하였고, 평균치를 사용하였다.

통계 처리

각 실험군간 측정치의 통계 처리는 Student's *t*-test로 하였으며 *p* < 0.05을 유의한 차이의 한계로 하였다.

결 과

방사선사진 결과

각 실험군에서 신생골형성을 갈습이 침착 되는 시기 즉, 방사선으로 음영이 관찰되는 시기로 평가하였으며 이식의 성공을 비골 결손부의 근위단과 원위단이 연결되어 유합됨으로서 결손부가 복구되는 것으로 판정하였고 그 결과는 Table 1과 같다.

동결골 이식군

총 10예의 이식 중 6예에서 신생골 형성이 관찰되었으나, 결손부가 복구되는 유합이 관찰된 예는 없었다(Table 2). 신생골이 관찰된 6예 중 2예는 이식 후 2주부터 신생골 형성이 관찰되었다(Fig 1). 나머지 4예는 이식 후 4주부터 신생

Table 1. New bone formation in the transplanted grafts

Case	Freezing	Freeze-drying	Defat-freezing
No new bone formation	4	3	3
New bone formation but non-union	6	3	3
New bone formation and union	-	4	4

Table 2. Radiographic appearances of freezing group

case no.		weeks								
		0	2	4	6	8	10	12	14	16
1	L*	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	L	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	R	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3	L	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	R	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4	L	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: no new bone formation; +: new bone formation; L: Left; R: Right; *: a case of implant absorption

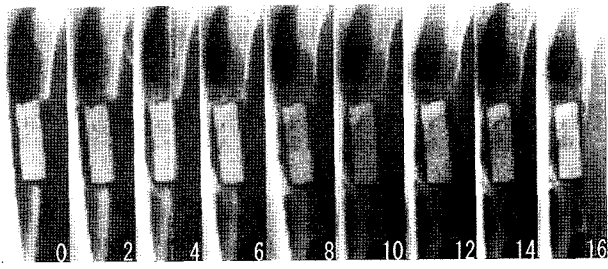


Fig 1. Serial radiograph of non-union case with new bone formation in freezing group (0~16 weeks after graft).

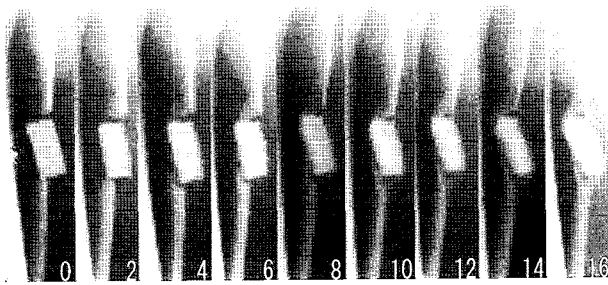


Fig 2. Serial radiograph of non-union case with new bone formation and slight absorption of implant in freezing group (0~16 weeks after graft).

골 형성이 관찰되었고, 이 중 1예에서 이식골편의 미약한 흡수가 관찰되었다(Fig 2).

동결건조골 이식군

총 10예의 이식 중 7예에서 신생골 형성이 관찰되었으며, 이 중 4예에서 결손부가 복구되는 유합이 관찰되었다(Table 3). 유합이 관찰된 4예는 모두 이식 후 2주부터 신생골 형성이 관찰되었으며 6~14주에 결손부가 복구되는 유합이 이루어졌다(Fig 3). 이들 중 1예에서는 이식 후 10주째부터 이식골편이 서서히 흡수되기 시작하여 16주에 최초의 크기보다 약 1/2 크기로 흡수되었다(Fig 4).

탈지 후 동결골 이식군

총 10예의 이식 중 7예에서 신생골 형성이 관찰되었으며,

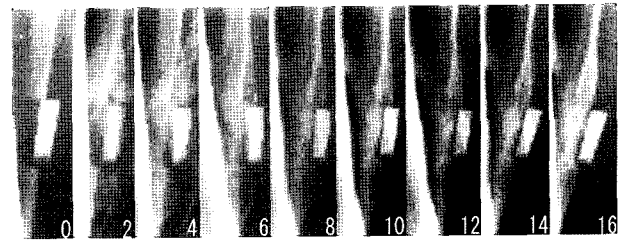


Fig 3. Serial radiograph of union case in freeze-drying group (0~16 weeks after graft).

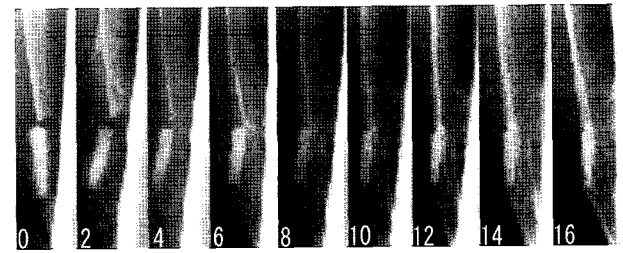


Fig 4. Serial radiograph of union case with half absorption of implant in freeze-drying group (0~16 weeks after graft).

이 중 4예에서 결손부가 복구되는 유합이 관찰되었다(Table 4). 유합이 관찰된 4예는 모두 이식 후 2주에 신생골 형성이 관찰되었고 12주에 유합이 이루어졌으며(Fig 5), 이 중 3예에서 미약한 이식골편의 흡수를 관찰 할 수 있었다(Fig 6).

BALP치 변화

동결골 이식군

동결골을 이식한 실험군에서 이식 후 신생골 형성은 실험 동물 4두의 6예에서 관찰되었으나(Table 2) 유합이 관찰된 예는 없었다. 이식 전 평균 BALP치는 24.65±3.56 IU/L 에서 이식 2주에 26.48±7.19 IU/L 로 7.4%만 상승했다가 이후 점차 감소하여 이식 후 16주에는 14.42±6.26 IU/L 로 이식 전보다 41.5%까지 감소하였다(Fig 8). 동결골 이식군의

Table 3. Radiographic appearances of freeze-drying group

case no.		weeks								
		0	2	4	6	8	10	12	14	16
1	L	-	+	+	U	U	U	U	U	U
	R*	-	+	+	U	U	U	U	U	U
2	L	-	+	+	+	+	+	+	U	U
	R	-	+	+	+	+	+	+	U	U
3	L	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	R	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	+	+	+	+	+	+	+

-: no new bone formation; +: new bone formation; U: union of graft and host bone
L: Left; R: Right; *: a case of implant absorption

Table 4. Radiographic appearances of defat-freezing group

case no.		weeks								
		0	2	4	6	8	10	12	14	16
1	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	+	+	+	+	+	+	+
2	L*	-	+	+	+	+	+	U	U	U
	R*	-	+	+	+	+	+	U	U	U
3	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4	L	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	L*	-	+	+	+	+	+	U	U	U
	R	-	+	+	+	+	+	U	U	U

-: no new bone formation; +: new bone formation; U: union of graft and host bone
L: Left; R: Right; *: cases of implant absorption

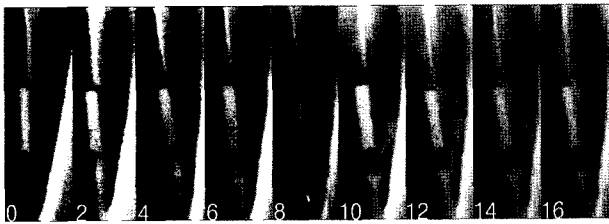


Fig 5. Serial radiograph of union case in defat-freezing group (0~16 weeks after graft).

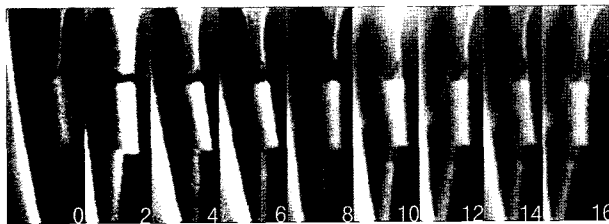


Fig 6. Serial radiograph of union case with slight absorption of implant in defat-freezing group (0~16 weeks after graft).

전체 총 평균 BALP치는 19.55±8.95 IU/L 이었다.

동결건조골 이식군

동결건조골을 이식한 실험군에서 이식 후 신생골 형성이 관찰된 예는 총 4두 7예이었으며(Table 3), 이 중 유합이 관찰된 예는 2두 4예이었다. 유합이 관찰된 2두의 평균 BALP치는 이식 전 28.58±8.96 IU/L 에서 이식 2주에 73.42±10.80 IU/L 로 이식 전에 비하여 156.9% 증가하였다가 4주에 56.56±5.10 IU/L(97.9%), 6주에 36.63±10.93 IU/L (28.1%)로 급격히 감소하였고 이후 점차 감소하였다(Fig 7). 유합이 관찰되지 않은 나머지 3두의 평균 BALP치는 이식 전 24.68±13.12 IU/L 에서 이식 2주에 28.22±8.66 IU/L 로 14.3% 증가하였고, 이 후 계속 감소하여 16주째에는 15.53±8.10 IU/L 로 이식 전보다 37.1%까지 감소하였다(Fig 8). 동결건조골 이식군의 전체의 총 평균 BALP치는 31.23±14.20 IU/L 이었다.

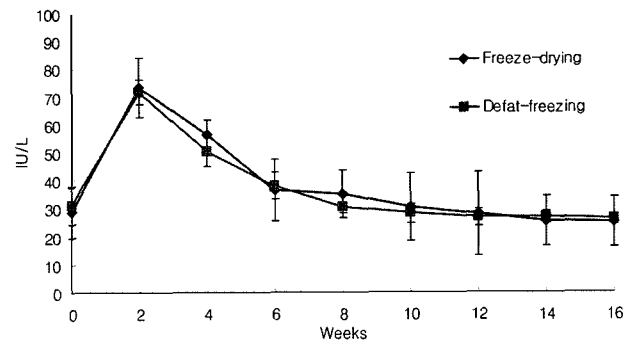


Fig 7. Changes of BALP values in union cases.

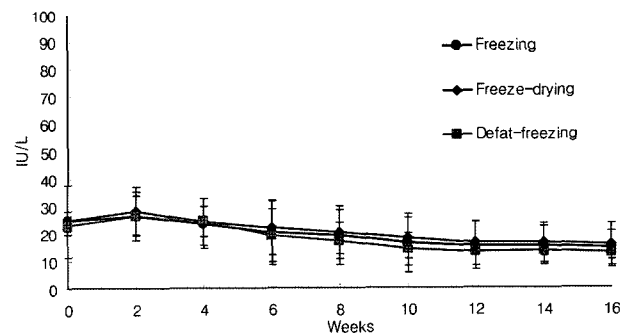


Fig 8. Changes of BALP values in non-union cases.

탈지 후 동결골 이식군

탈지후 동결골을 이식한 실험군에서 이식 후 신생골 형성이 관찰된 예는 총 5두 7예이었으며(Table 4), 이 중 유합이 관찰된 예는 2두 4예이었다. 유합이 관찰된 2두의 평균 BALP치는 이식 전 31.19±6.84 IU/L 에서 이식 2주에 71.75±4.38 IU/L 로 이식 전에 비하여 130.0% 증가하였다가 4주에 50.31±5.16 IU/L(61.3%), 6주에 38.09±4.69 IU/L (22.1%)로 급격히 감소하였고 이 후 계속 감소하였으며(Fig 7), 동결건조골 이식군의 유합예들과의 유의성 있는 차이(p<0.05)가 없었다. 유합이 관찰되지 않은 나머지 3두의 평균

BALP치는 이식 전 22.93 ± 3.29 IU/L 에서 이식 2주에 26.39 ± 8.78 IU/L 로 15.1% 증가하는데 그쳤다가, 이 후 계속 감소하여 16주째에는 12.84 ± 2.61 IU/L 로 이식 전보다 44.0%까지 감소하였다(Fig 8). 탈지 후 동결골 이식군의 전체의 총 평균 BALP치는 25.60 ± 14.16 IU/L 이었다.

고 찰

골 조직은 수혈 다음으로 가장 흔하게 이식되고 있는 장기이며(17,28,30), 신선한 자가 해면골의 이식이 가장 효과적이고 기본적인 방법이지만 여러 가지 단점이 있고 이를 보완하기 위해서 동종 또는 이종골 이식술이 시행되고 있으며, 상용화된 이종골 유래 이식재료로는 주로 소뼈가 많이 사용되고 있다(34,42,47).

처리되지 않은 이종골의 이식 시에는 면역 거부반응으로 인한 신생골 형성 저해뿐만 아니라 이식골에 내재되어 있을지도 모르는 바이러스성 질병 등의 전염과 비 멸균적인 이식재료의 사용 등에 의한 수술 후 세균감염의 문제들이 제기되며, 이러한 문제들을 해결하기 위해서 이식될 이식골을 적절히 처리하여야만 하고 이에 대한 여러 가지 연구들이 이루어지고 있다(4,5,9,19,25). 숙주골과 이식골 사이의 면역반응은 주로 세포 매개성 반응으로 이식골의 표면에 존재하는 항원과 반응하여 일어나는 것으로 알려져 있으며(15,40), 이러한 면역거부반응을 최소화 하는 것이 골형성 유도에 필수적이고 이식의 성공률과도 깊은 관계가 있다(5,22,43). 면역거부반응을 최소화하기 위한 이식골의 처리방법은 여러 가지가 있으나 최근에는 동결법(2,29)과 탈지과정을 포함한 동결건조법(4,17,48,51)이 가장 일반적인 것으로 알려져 있다. 동결법은 이식골에 대해 특별한 화학적 처리 없이 단순히 동결만 시키기 때문에 골형성 단백질의 보존이 우수하다(2,7,29). 또한, 동결과정에서 면역원성 물질이 억제된다고 알려져 있으나(2,7,16,21,25,29,48) 면역억제능력이 다른 처리법에 비해서는 상대적으로 미약한 것이 사실이다(15,25,45,48). 이는 동결법이 다른 이식골 처리방법에 비해 이종골이식에 있어서 낮은 신생골 형성력을 보이는 원인으로 생각되며 이식골편에 대한 숙주의 면역거부반응이 이식골내에 함유된 골형성 단백질의 작용을 방해하기 때문으로 생각된다.

본 실험에서도 동결법으로 이식골편을 처리한 실험군은 60%의 신생골 형성을 관찰할 수 있었으나 미약한 수준에 머무르고 있음을 관찰할 수 있었다. 단지 신생골 형성 유무만 비교하였을 경우에는 동결건조법 및 탈지 후 동결법 실험군의 70%의 신생골 형성과 견줄 수 있어 보이나 동결법 실험군은 유합까지 이른 경우가 전혀 없을 정도로 신생골의 증가 및 발달이 다른 실험군에 비해 미약해서 유합이 지연되고 있었다. 대부분의 골이식 실패의 원인이 면역거부반응으로 지목되고 있듯이(5,7,22,36,40,43), 이러한 결과도 동결법의 낮은 면역력 억제에 기인한 높은 항원성과 신생골 형성 억제 때문으로 추측되며, 동결법 실험군에서의 골아세포가 비활성 되었음을 의미하는 전체적으로 낮은 BALP치와 평탄

한 변화도 이를 뒷받침하고 있다고 생각된다.

한편, 이식골을 동결 건조법으로 처리할 경우 chloroform-methanol solution에서 탈지과정을 거치는 동안 면역원성 물질이 억제 되고 동결 건조과정에서 골내 수분함유율이 떨어지면서 골 기질내 효소 활성화 및 골형성 물질 등이 정지상태로 보존된다고 알려져 있으며(49), 처리 후 이식골을 특별한 장비 없이도 상온에서 쉽게 보관할 수 있는 매우 편리한 장점을 가지고 있으나, 건조과정을 거치면서 골형성 단백질에 손상을 주어 골유도 능력이 현저하게 떨어지고, 골의 강도의 감소로 지지력이 약해져 골이 쉽게 부러지는 단점이 있는 것으로 알려져 있다(4,17,27,50). 이런 연구결과들과 주장들은 면역억제능력을 향상시키는 처리방법과 골형성 능력을 향상시키는 처리방법은 서로 상반되는 작용을 하기 때문에 두 가지 모두 충족시키기는 매우 어렵다는 것을 나타내며, 다양한 방면에서 이를 극복하고자 하는 노력이 진행 중에 있다(4,11,51,52). 본 실험에서도 이식골편을 탈지만 시키고 논란이 야기되고 있는 건조과정을 생략하고 대신 -196 액화질소에서 급속동결 보존하는 방법인 탈지 후 동결법을 이종골 이식에 적용하였고 그 신생골 형성능력을 검토하였다.

이식골을 동결처리하거나 동결 건조하여 이식한 여러 연구자들의 결과는 실험동물이나 이식부위에 따라 다양한 연구결과를 보고하고 있다(24,27,41,45,48,51,52). 골 이식 실패의 큰 이유 중 하나는 골 내부의 지방자체가 항원 역할에 직접 관여하여 골 유도 능력에 영향을 미치기 때문으로 알려져 있으나(3,22,37), 이식골 기질로부터 지방을 제거해도 골 유도 능력에는 변화가 없으며, 골 기질내의 탈 지방을 위하여 에테르나 순수 알코올 또는 클로로포름 등을 이용한 방법으로 골형성단백질과 골기질을 파괴 및 변성시키지 않으면서도 항원성을 감소시킬 수 있다는 보고도 있다(3,35-37,48).

본 실험의 방사선학적 결과에서 탈지 후 동결골 이식군과 동결건조골 이식군의 경우 두 실험군이 동일하게 총 10예 중 각 7예에서 이식 후 2주에서 4주 사이에 신생골이 형성되는 것을 관찰 할 수 있었고 그 중 각각 4예에서 결손부의 복구가 관찰되었다. 또한 방사선학적 결과뿐만 아니라 BALP 측정치에서도 동결건조법과 탈지 후 동결법은 매우 비슷한 결과를 보이고 있었다. 이 결과로 보아 이식골에 대한 단순 동결처리보다 동결건조법과 탈지 후 동결법이 신생골 형성을 더 촉진시켰음을 알 수 있었으며, 이는 골형성을 방해하는 면역원성 물질을 제거 또는 억제했기 때문으로 추정할 수 있다. 또한, 이종 이식골편에 대해서는 동결건조처리 과정 중 건조과정을 거치지 않고 탈지과정만 거치더라도 같은 수준의 신생골 형성력을 갖는다는 것을 보여주며, 이식골 내부의 지방, 세포막 등을 제거하는 탈지과정이 골형성물질은 보존하면서 면역반응물질을 선택적으로 제거할 수 있다는 주장들과(3,36,37,42,48) 일치한다고 생각되며, chloroform-methanol solution을 탈지과정에 사용하여 BMP를 손상 없이 추출해냈다고 보고하였던 Urist(39)의 실험과 마찬가지로, 본 실험의 결과들도 탈지과정만으로도 골형성 물질이 변성되지 않고 있음을 반영한다고 할 수 있다.

골이식 후 주변 간엽세포의 화학주성에 따른 이주, 분화, 증식 등이 순차적으로 진행되어 파골세포의 작용에 의한 이식골편의 흡수와 골아세포의 분화 및 증식에 따라 골이 형성되는 일련의 과정을 통해 골결손부가 복구되고, 최종 단계로 골수의 형성 등 골재형성과정(bone remodeling)이 이루어진다고 알려져 있다(5,31). 골형성이 완료된 이후 골재형성과정에서 이식골편에 대한 완전흡수가 뒤따르는 것이 일반적이며(27,51), 골편의 흡수가 지연되는 이유 중 하나로 이식골편에 대한 숙주의 면역반응의 결과 맥관화가 늦어지거나 방해되는 경우에 나타난다고 알려져 있다(5,7). 본 실험의 이식골편에 대한 동결건조법과 탈지 후 동결법의 비교에서 신생골 형성력과 골아세포 활성도 측면에서는 특별한 유의차가 나타나지 않았으나, 이식골편의 흡수가 탈지 후 동결법에서는 3예에서 관찰되었지만 동결건조법에서는 1예만 관찰되었다. 이 결과는 탈지 처리만 했을 경우가 실질적인 골이식 성공을 의미하고 골이식과정의 최종단계인 골재형성과정까지 유도하는 예가 많았음을 나타낸다. 뿐만 아니라, Fig 3과 같이 동결건조처리한 이식골의 경우 결손부를 복구한 예라도 이식초기에는 신생골형성을 촉진시키지만 골재형성과정에서는 숙주골로 흡수, 치환되지 못하는 모습도 관찰되었다. 이는 동결건조법의 경우 건조과정을 거치면서 골형성 물질의 손상이 있었을 것으로 추정되며, 본 실험에서 나타난 이식골편 흡수의 결과는 이종골이식에 있어서는 이식골편의 처리과정 중 탈지 후 단순 동결방법이 동결건조과정보다 이식골편에의 맥관화를 막는 면역반응의 억제력을 더 높인다는 것을 간접적으로 보여준다고 생각된다.

이상의 결과는 토끼의 이종골 이식에서는 탈지 후 동결법과 동결건조법이 동결법보다 더 우수한 신생골 형성능력을 갖고 있음을 반영하였고, 탈지 후 동결법은 동결건조법과 비슷한 신생골 형성능력을 보였으나 골재형성에 이른 예가 더 많아 근소하게나마 우수하다고 말할 수 있으며, 이는 동결건조과정까지 거치지 않고 탈지만으로도 유효하거나 더 우수한 효과를 나타낼 수 있음을 보인다. 다만, 탈지 후 동결법은 보관과 이동에 제약이 따르는 단점이 있어 차후 이 문제를 해결하기 위한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Allen LC, Allen MJ, Breur GJ, Hoffmann WE, Richardson DC. A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. *Res Vet Sci* 2000; 68: 231-235.
- Amillo S, Gonzalez F, Illescas JA. Incorporation of cortical intercalary bone allografts. Experimental study on rabbits (article is Spanish). *An Sist Sanit Navar* 2003; 26: 357-363.
- Aspenberg P, Thoren K. Lipid extraction enhances bank bone incorporation. An experiment in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1990; 61: 546-548.
- Barrack RL. Bone graft extenders, substitutes, and osteogenic proteins. *J Arthroplasty* 2005; 20: 94-97.
- Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 371: 10-27.
- Behr W, Barnert J. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. *Clin Chem* 1986; 32: 1960-1966.
- Bolano L, Kopta JA. The immunology of bone and cartilage transplantation. *Orthopedics* 1991; 14: 987-996.
- Bos GD, Goldberg VM, Zika JM, Heiple KG, Powell AE. Immune responses of rats to frozen bone allografts. *J Bone Joint Surg Am* 1983; 65: 239-246.
- Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 1987; 18: 187-196.
- Cohen RE, Mullarky RH, Noble B, Comeau RL, Neiders ME. Phenotypic characterization of mononuclear cells following anorganic bovine bone implantation in rats. *J Periodontol* 1994; 65: 1008-1015.
- Conrad EU, Erickson DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop Relat Res* 1993: 279-284.
- DePaula CA, Truncala KG, Gertzman AA, Sunwoo MH, Dunn MG. Effects of hydrogen peroxide cleaning procedures on bone graft osteoinductivity and mechanical properties. *Cell Tissue Bank* 2005; 6: 287-298.
- Ehrler DM, Vaccaro AR. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res* 2000: 38-45.
- Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84-A: 454-464.
- Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 1976; 58: 854-858.
- Fukunaga T, Masumi S, Yano H, Ikebe S, Shimizu K. Osteogenesis in xenogeneic bone transplantation, using an immunosuppressant. Rabbit-rat experiments. *Acta Orthop Scand* 1995; 66: 557-560.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36 Suppl 3: S20-27.
- Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A Suppl 2 Pt 2: 98-103.
- Habal MB. Different forms of bone grafts. In: *Bone Graft & Bone Substitutes* ed. Saunders, Philadelphia: Habal Mutaz. B., Reddi A. Hari. 1992: 6-8.
- Hatano N, Shimizu Y, Ooya K. A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2 : 1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15: 339-345.
- Heliotis M, Tsiridis EE. Fresh frozen bone in femoral impaction grafting: can developments in bone regeneration improve on this? *Med Hypotheses* 2001; 57: 675-678.
- Heyligers IC, Klein-Nulend J. Detection of living cells in non-processed but deep-frozen bone allografts. *Cell Tissue Bank* 2005; 6: 25-31.
- Hierholzer C, Sama D, Toro JB, Peterson M, Helfet DL. Plate fixation of ununited humeral shaft fractures: effect of type of bone graft on healing. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88: 1442-1447.
- Hornicek FJ, Zych GA, Hutson JJ, Malinin TI. Salvage of humeral nonunions with onlay bone plate allograft augmentation.

- Clin Orthop Relat Res 2001; 203-209.
25. Hubble MJW. Bone transplantation. *Current Orthopaedics* 2001; 15: 199-205.
 26. Johnson AL. Principles of bone grafting. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1991; 6: 90-99.
 27. Jones KC, Andrish J, Kuivila T, Gurd A. Radiographic outcomes using freeze-dried cancellous allograft bone for posterior spinal fusion in pediatric idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop* 2002; 22: 285-289.
 28. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg* 2006; 35: 232-242.
 29. Myerson MS, Neufeld SK, Uribe J. Fresh-frozen structural allografts in the foot and ankle. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 113-120.
 30. Perlyn CA, Schmelzer R, Govier D, Marsh JL. Congenital scalp and calvarial deficiencies: principles for classification and surgical management. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115: 1129-1141.
 31. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 1987; 18: 207-212.
 32. Sammarco VJ, Chang L. Modern issues in bone graft substitutes and advances in bone tissue technology. *Foot Ankle Clin* 2002; 7: 19-41.
 33. Schena CJ, Mitten RW, Hoefle WD. Segmental freeze-dried and fresh cortical allografts in the canine femur I A sequential radiographic comparison over a one-year time interval. *J Am Anim Hosp Assoc* 1984; 20: 911-925.
 34. Sculean A, Chiantella GC, Windisch P, Arweiler NB, Brex M, Gera I. Healing of intra-bony defects following treatment with a composite bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide PERIO). *J Clin Periodontol* 2005; 32: 720-724.
 35. Thoren K, Aspenberg P, Thorngren KG. Lipid extracted bank bone. Bone conductive and mechanical properties. *Clin Orthop Relat Res* 1995; 232-246.
 36. Thoren K, Aspenberg P, Thorngren KG. Lipid extraction decreases the specific immunologic response to bone allografts in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1993; 64: 44-46.
 37. Trentz OA, Hoerstrup SP, Sun LK, Bestmann L, Platz A, Trentz OL. Osteoblasts response to allogenic and xenogenic solvent dehydrated cancellous bone in vitro. *Biomaterials* 2003; 24: 3417-3426.
 38. Turner CH. Bone strength: current concepts. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 429-446.
 39. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res* 2002: 4-10.
 40. VandeVord PJ, Nasser S, Wooley PH. Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *J Orthop Res* 2005; 23: 1059-1064.
 41. Wang JM, Oh JK, Kim DJ. Effect of the pedicle screw fixation on the anterior lumbar interbody fusion using the freeze-dried structural allograft. *J Kor Orthop Assoc* 1998; 33: 1569-1576.
 42. Worth A, Mucalo M, Home G, Bruce W, Burbidge H. The evaluation of processed cancellous bovine bone as a bone graft substitute. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 379-386.
 43. Zunino JH, Bengochea M, Johnston J, Deneo H, Hernandez S, Servetto C, Taranto L, Ordoqui G. Immunologic and osteogenic properties of xenogeneic and allogeneic demineralized bone transplants. *Cell Tissue Bank* 2004; 5: 141-148.
 44. 강지연, 김경원, 이은영, 최희원. 골이식 공여부에 발생한 장골골절의 해부학적 고찰. *대한약안면성형재건외과학회지* 2004; 26: 75-80.
 45. 김영조, 엄인웅, 이동근, 김수남. 냉동건조 탈회골편의 치유과정에 관한 조직학적 연구. *대한구강악안면외과학회지* 1993; 19: 79-87.
 46. 문명상, 우영균, 선두훈. 토끼의 장관골 결손부에 삽입된 탈회한 동종골 및 이종골의 골생성능. *대한정형외과학회지* 1991; 26: 1281-1288.
 47. 박상원, 강오용, 정대철, 위대근. 이종골 이식이 가토 장관골 결손부의 치유과정에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *대한정형외과학회지* 1997; 32: 449-456.
 48. 이동근. 동종골의 처리방법에 따른 골 치유 능력에 관한 실험적 연구. *대한구강악안면외과학회지* 1997; 23: 43-62.
 49. 장익열. 동결건조골에 대한 소고. *대한정형외과학회지* 1988; 23: 929-935.
 50. 조용석, 김경원. 백서 두개골에의 이종골 이식 후 치유에 관한 실험적 연구. *대한약안면성형재건외과학회지* 1999; 21: 13-22.
 51. 최인혁, 이종일. 동결건조한 산양뼈의 개이식 효과. *한국임상수의학회지* 1998; 15: 442-449.
 52. 최인혁, 김현경, 김남수, 佐木伸雄. 개의 비유합 골절 Model에 있어서 동결건조골이식의 효과. *대한수의학회지* 1996; 36: 495-512.