

동결 건조한 한국인 상하악골에 대한 실험적 연구

I. 단순냉동 및 냉동 건조된 동종골의 멸균에 관한 실험적 연구

원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

엄 인 웅

AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE FREEZE-DRIED BONE OF MAXILLA AND MANDIBLE IN KOREANS

I. A microbiologic study of the sterility on the fresh-frozen and freeze-dried bone of human

In-Woong Um

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Dentistry, Wonkwang University

To determine the sterility of the prepared allogeneic bone of the human, culture of the allografts prior to implantation was performed on the fresh-frozen and freeze-dried bone.

Before the use of allografts to the patients, it must be confirmed about the sterility, cellular cytotoxicity, immune reaction, and osteoinductive potential as a biomaterials.

Oral and maxillofacial surgeons demand for allograft bone will be increased in the future. Wonkwang Bone Bank attempted to meet this demand, has performed series of experimental study on the allograft bone of the Koreans to evaluate the physical and chemical suitability of the bone since the surgeons applications will have broadened from benign cystic lesions to fracture malunions and non-unions, large segmental defects, and whole-bone allografts after tumor surgery.

The results obtained were as follows :

- 1. Freeze-drying(FD) only showed some bactericidal effects of the normal and osteo bone but in cases of performing EO gas sterilization, the FD effects was not clear.*
- 2. The fact that FD has little effect than the EO gas sterilization on normal bone postulated that the presence of microbiota may be due to an operation and bone processing procedure.*
- 3. FD and EO gas sterilization had a remarkable effect on the osteo bone.*
- 4. The sterilization effect were EO gas, Freeze-drying, Fresh-Frozen with descending order. But all sterilization method were not complete to preserve and implant allograft bone.*

We are now performing further continuous study on the radiation and chemical sterilization procedure to make a more safe and complete allograft bone.

(이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모 과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.)

I. 서 론

지난 수십년간 골이식과 골의 보존에 대한 많은 연구가 진행되어 신선 자가 망상골 이식이 다른 종류의 골이식보다 그 우수성이 입증되었고, 이는 골치유 과정에서 살아있는 골형성세포(osteogenic cells)의 영향인 것으로 알려져 있다.

이에 반해 신선 자가 피질골 이식은 안정성은 높지만 골치유 과정에서 활발한 세포활성도는 보여주지 못하고 있다.

동종골 이식은 (Homologous grafts, Allografts, Allogeneic grafts) 같은 종의 다른 개인에게 골이식을 하는 것으로써, 이 개인은 유전적으로 서로 다르기 때문에, 항원성을 줄이기 위하여 여러가지의 처치를 요하게 된다. 이에 대한 생물학적인 근거는 면역반응과 골형성(치유)기 전의 이해에 있다.

자가골 이식(Autogenous bone grafts) 골형성 세포(osteogenic cell)를 제공하는데 반해서 동종골 이식(Allogeneic bone graft)은 수동적으로 작용하여 골치유시 골유도의 단단한 조직 간질을 제공할 뿐이다. (Hard tissue matrix for the inductive phase of bone healing) 따라서 숙주는 동종골 이식편이 골형성에 참여할 수 있는데에 필요한 요소들을 공급하여야만 하므로 숙주의 건강 상태는 동종골 이식의 성공에 매우 중요한 요소가 된다.

1967년 Ollier가 냉동 처치가 골의 보존에 좋은 효과를 가진다고 보고한 이래로 단순 냉동(Deep-Freezing)과 냉동 건조(Freeze-Drying, Lyophilization)는 동종이식골(non-viable, but biologically useful)의 보존과 장기간 저장에 가장 좋은 방법으로 널리 사용되고 있다¹⁻⁶⁾.

동결건조(Freeze-Drying, Lyophilization)와 단순 동결(Deep-Freezing)은 동물실험 모델에서 골이식의 항원성을 감소시키는 것으로 알려져 있고 최근 동결건조한 동종 피질골 토끼실험 모델에서 면역반응을 거의 나타내지 않는 것으로 판명되었다. 즉, 동종골의 subcellular particle과 세포의 생활력을 파괴시키기 때문에 골의 조직면역 반응을 감소시키지만 골이식에 필요한 세포 간질조직은(Bone matrix) 잘 보존하는 것으로 알려져 있다^{7,8)}.

동종골 이식 면역반응은 체액성(Humoral immunity)과 세포성(cell mediated immunity) 면역반응

이 중요한 역할을 하며 이중 세포 표면 항원(cell surface antigen)을 함유한 세포의 항원성이 중요하나(HLA) 골은 다양한 세포와 간질 조직의 복합체이기 때문에 동결건조 처리 후에는 골기질의 어떤 성분이 면역 반응을 일으키지 않는가 사료된다. 즉 면역 반응이 골이식과 관련된 항원에서 발현되는지, 또 그렇다면 이런 반응의 성질과 발현 순서에 대하여는 밝혀진 바가 거의 없다고 하겠다^{9,11)}.

Friendlaender 등에 의하면 동결건조는 골의 항원성을 감소시키기는 하지만 어떤 항원에 대해서는 작용을 하지 못하는 것으로 알려져 있으나 임상적으로 중요성을 갖지는 못한다고 하였다^{12,26)}.

환자에서 채취한 골은 무균 상태일 수도 있고, 아닐 수도 있으며 이 경우 소독의 검증과 부가적인 소독 과정이 필수적이라 하겠다. 완전한 무균 상태에서 채취한 골이라 하더라도 혈액이나, 골의 표면 또는 골과 접촉하는 모든 용액에 대한 세균 동정을 통한 소독의 검증이 필요하며 무균 상태가 아닌 골의 경우 방사선 조사(1~3.5mrad)나, ethylene oxide등의 소독 방법이 필요하고, 이에 따른 소독의 정성분석과 화학 소독제의 잔여 독성에 대한 정성 분석도 필수적이라 하겠다.

저자들은 현재 국내에 골은행이 없는 실정에서 앞으로 악안면외과 영역의 동종골이식에 대한 수요가 점차로 증가할 것에 대비, 환자에서 추출한 상악악골을 동종 이식골로 사용하기 위하여 원광대학교 구강외과에 내원한 골수염, 골절 및 악교정 수술환자에서 제거한 하악피질골을 단순 냉동, 냉동 건조 및 EO가스 소독을 시행한 것에 대하여 호기성 및 혐기성 배양을 실시, 균주의 분리 및 동정을 시행함으로써 단순 냉동 및 동결 건조의 소독 효과와 수술시 제거한 상·하악골을 동종골 이식편으로의 재사용 가능성에 대한 지침을 마련하고자 하였다.

II: 연구방법 및 재료

1. 연구대상

원광대학교 구강악안면 외과에 내원한 환자중 3명의 골절 및 3명의 악교정 수술환자를 AIDS와 Hpatitis virus Screening을 한 후 수술장에서 제거한 하악피질골을 사용하였고 제거한 골은 구강내와 타액에 노출되지 않은 구외 접근법을 사용한 경우로

국한하였다.

III. 연구 성적

2. 골의 처리

수술장에서 무균 상태로 제거한 골을 3회 이상 식염수로 세척후 근육 및 골막들의 연조직을 제거한 다음, -70°C 의 냉장고에 냉동 보관하고, 각 골을 1mm^3 크기의 20내지 30개의 골편으로 만든 다음 필요한 경우 냉동 건조 및 EO gas 소독을 실시하였다.

각 골편의 평균 무게는 1.5118g 이었다.

3. 냉동건조 방법

-54°C , vacuum하에서 2회에 걸쳐 overnight freeze-drying을 실시하고 drying bottle을 parafilm으로 막아 실온에서 진공상태를 유지하였다.

4. 실험군의 설정

3종류의 정상골과 3종류의 골수염골을 각각 단순 냉동(Dep-Freezing : F)과, 냉동건조(Freeze-Drying : FD)하고 각각 아무런 처치를 안하거나 EO gas 소독을 하여(Ethylene Oxide : EO) 균주의 분리 및 동정을 실시하였다.

5. 호기성세균 배양 및 동정(A)

냉동 보관 및 냉동 건조후 아무런 처치를 하지 않은 골과(F, FD) 냉동 보관 및 냉동 건조후 EO gas 소독한 골(F, EO, FD, EO)을 2ml 의 소독된 pre-reduced Ringer액에 옮긴 후, Vortex mixer(Vision, Seoul, Korea)로 60초간 섞어서, 37°C 세균배양기에서 9ml 의 Ringer액에 10배씩 희석시켰다. 적합한 시료를 100microliter 씩 선택 및 비선택 배지에 깔아 배양하였다. (3일, 7일)

6. 혐기성세균 배양 및 동정(An)

냉동보관 및 냉동건조 후 아무런 처치를 하지 않은 골과(F, FD) 냉동보관 및 냉동 건조후 EO gas 소독한 골(F, EO, FD, EO)을 2ml 의 소독된 pre-reduced Ringer액에 옮긴 후, Vortex mixer(Vision, Seoul, Korea)로 60초간 섞어서, $80\% \text{N}_2$, $10\% \text{H}_2$ 및 $10\% \text{CO}_2$ 를 함유한 37°C 세균 배양기에서 9ml 의 Ringer액에 10배씩 희석시켰다. 적합한 시료를 100microliter 씩 선택 및 비선택 배지에 깔아 배양하였다. (3일, 7일)

1. 정상 환자에서 제거한 골

EO소독을 하지 않은 FD에서 호기성 및 혐기성 세균이 적게 분리 되었다. EO소독을 한 군에서는 FD에서 F보다 많은 호기성 및 혐기성균이 분리되었다(Table I).

3종류의 정상골에서는 EO gas소독이 모두 소독 효과를 나타내었으나 냉동 건조는 별효력이 없는 것으로 나타났다. (Fig. 1, 2, 3)

2. 골수염 환자에서 제거한 골

FA와 F, An에서 배양한 경우가 FD, A와 FD, An에서 배양한 경우 보다 많은 세균이 분리되었다.

F, A, EO와 F, An, EO에서 배양한 경우가 FD, A, EO와 FD, An, EO에서 배양한 경우보다 적은 세균이 분리되었다.

Table I. Number of cultivable Aerobic(A) and anaerobic(An) microbiota in bone from the patients with orthognathic surgery.(CFU)

	Frozen bone(F)	Freeze-dried bone(FD)
Aerobic(A)	16.00 ± 7.84	3.75 ± 2.50
Anaerobic (An)	46.25 ± 26.53	6.25 ± 6.25
A, EO	0.75 ± 0.75	3.25 ± 2.93
An, EO	0.00 ± 0.00	4.50 ± 3.84

EO : Ethylene gas sterilization Mean \pm SD

CFU : Colony forming unit.

Fig. 1. Result of normal bone from sinus wall (F,FD4)

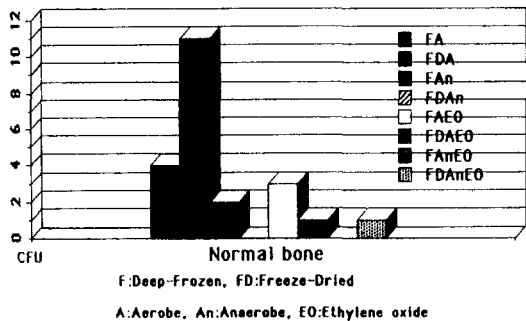


Fig. 2. Result of normal bone from angle (F.FD7)

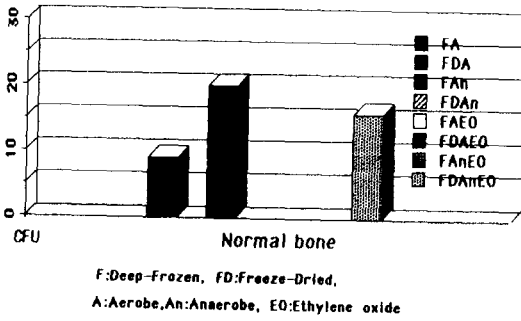


Fig. 4. Result of osteo bone from symphysis (F.FD1)

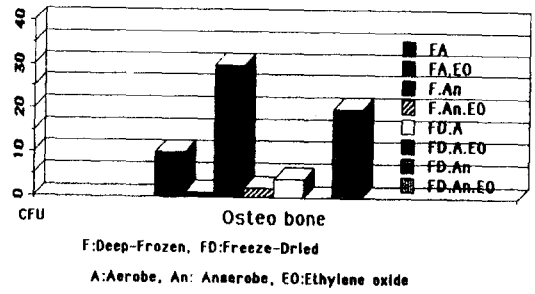


Fig. 3. Result of normal bone from angle (F.FD13)

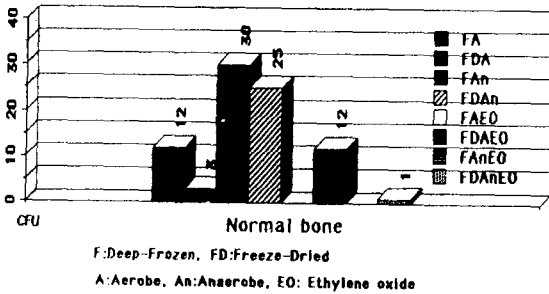
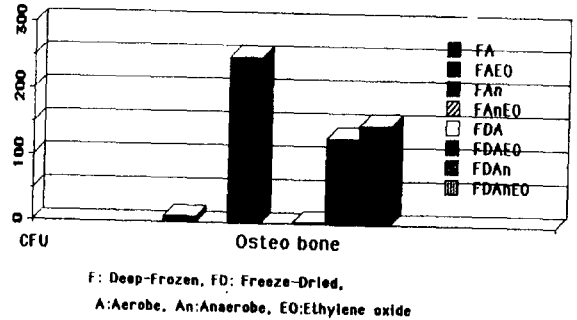


Fig. 5. Result of osteo bone from angle (F.FD12)



EO를 하지 않은 경우에는 F에서 FD보다 더 많은 세균이 분리되었고 EO를 한 경우에는 FD에서 F보다 더 많은 세균이 분리되었다. (Table II)

골수염 골에서는 EO gas 소독과 동결 건조가 모두 소독효과를 나타냈다. (Fig. 4, 5, 6)

Fig. 6. Result of osteo bone from angle (F.FD18)

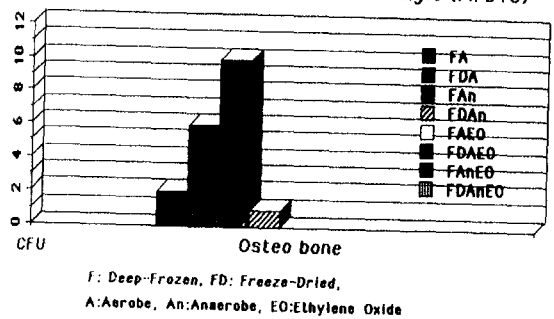


Table II. Number of cultivable Aerobic(A) and anaerobic(An) microbiota in bone from the patients with osteomyelitis(CFU).

	Frozen bone(F)	Freeze-dried bone(FD)
Aerobic(A)	6.67±2.40	4.33±0.88
Anaerobic (An)	833.33±166.67	81.33±69.62
A. EO	0.33±0.33	43.33±0.88
An. EO	0±0.00	0.67±2.40

EO : Ethylene gas sterilization Mean±SD
CFU : Colony forming unit.

3. 정상골과 골수염골의 비교

F에서 EO 유무에 관계없이 정상골에서는 호기성 세균이, 골수염골에서는 혐기성 세균이 많이 분리되었다.

FD에서는 골수염골에서 혐기성 및 호기성세균이 많이 검출되었고, EO군에서는 혐기성 세균이 정상골에서, 호기성 세균이 골수염골에서 많이 분리되었다(Table III).

즉 F와 FD에서는 공통적으로 골수염골에서 혐기성

Table III. Comparison of microbiota between the normal and osteo bone according to freezing and freeze-drying.

	Freezing		Freeze-Drying	
	Normal	Osteo	Normal	Osteo
F. A	≥		FD. A	≤
F. An	≤		FD. An	≤
F. A. EO	≥		FD. A. EO	≤
F. An. EO	≤		FD. An. EO	≥

세균이 많이 분리되었고 다른 균에서는 F와 FD, EO의 소독 여부가 전혀 다른 결과를 보여주어 방법에 따른 서로의 상관관계를 보여주지는 못하였다.

IV. 총괄 및 고찰

동종 이식골의 채취, 보관과 사용에 있어서 생체 재료로서의 완벽한 소독과 세포 독성, 골이식제로서의 이식 면역 반응과 골유도능이 중요한 요소라 하겠다.

환자에서 채취한 골은 비록 무균 상태로 처치한다 해도 환자의 상태에 따라 균이 존재할 수 있으며 이 경우 부가적인 소독과정이 필수적이라 하겠고, 완전한 무균 상태에서 채취한 골이라 하더라도 혈액이나 골의 표면 또는 골과 접촉하는 모든 용액에 대한 세균 동정을 통한 소독의 검증이 필요하며 무균 상태가 아닌 골의 경우 방사선 조사나 Ethylene oxide 등의 소독방법이 필요하고, 이에 따른 소독의 정성 분석과 화학 소독제의 잔여 독성에 대한 정성 분석도 필수적이라 하겠다¹³⁾.

Tomford는 술후 창상 감염과 관련하여 동종골 이식 직전에 균의 동정을 권유하였고 미해균 조직 은행에서도 동결건조와 진공포장을 하기전에 균의 동정을 실시하고 소독에 관한 마지막 검사로 골이식 직전에 세균동정을 실시하도록 권고하고 있다¹³⁾.

일반적으로 조직 은행에서의 동종골은 소독된 상태에서 채취하여 근육, 골막등의 연조직을 모두 제거한다. 이 조직들은 호기성 및 혐기성 세균 배양 및 동정의 결과가 나올때까지 -70°C 냉장고에서 냉동 보관한다.

배양결과가 음성으로 나오면 냉동 건조를 실시하고

실온에서 진공용기에 보관한다.

골의 장기간의 보존 방법에 대한 많은 연구들이 진행되어, 가장 뛰어난 방법은 탈 무기질과 화학적 멸균을 동반하거나, 또는 동반치 않는 냉동 또는 냉동 건조하여 사용하는 것이 조직에 가장 적합하고, 골의 유도를 잘 시키는 것으로 보고 되어 있다¹³⁻¹⁵⁾.

골에 대한 면역 반응의 특징과 정도는 과거 10여년 동안 수많은 동물모형의 여러가지 항원성을 통하여 평가되었고 골의 외인자형 이식의 항원자형에 대한 연구는 이식물 주위로 침윤되는 세포의 단순한 조직학적 연구 및 생화학적 연구에 기초하고 있다.

이에 근거한 조사에 의하면 신선 이인자형 이식물이 대단히 면역성이 강하고, 냉동된 이종 이식물이 비교적 감작력이 약하여, 냉동 건조의 방법을 사용함으로써 예상되는 이식물의 면역 반응을 없앨 수 있다고 보고 하였다^{13, 16, 17)}.

그러나 냉동 건조가 이식물의 항원성을 완벽하게 없애지는 못하고 있고, 골이식의 최근 연구는 이식물의 표면에 다른 잠재적인 항원성의 원인이 존재함을 밝혀 내고 있다^{14, 15, 18, 26)}.

최근에는 냉동 건조된 조직 이식체의 Quality control을 위하여 탈회 및 항생제 추가외에 일반적인 Ethylene oxide소독 및 방사선조사등 다른 방법의 멸균법이 필요할 것으로 사료된다.

동종골을 보존하기 위한 소독 방법으로는 Boiling, Autoclaving, Chemicals등 여러가지 방법이 시도되었으나, 동종골 이식편으로서의 성질과 골유도성에 적합하지 못한 것으로 판명되었고, 현재는 항생제와 Ionizing radiation을 추천하고 있으며, 이에따른 골유도성에 대한 연구가 다각적으로 진행되고 있다^{20, 21)}.

끓이거나 화학제 소독을 사용하면 세포를 죽이거나 면역 능력을 감소시키고 Bone Morphogenic Protein을 변성시켜 골유도능을 파괴 시킨다. Boiling, Drying, Chemically treating은 유기성분을 응집시켜 숙주세포에 의한 제거과정을 어렵게 만든다.

수술장에서의 실제적인 오염의 방지와 오염된 동종골에 대한 처리로 화학처리를 하는데, 이는 오염된 동종골을 0.6NHCL용액에 60분간 담근후, 생리 식염수로 세척하고 70% 알콜로 10분간 소독한다.

이 소독 방법은 동종골의 골유도능력을 유지하는 것으로 알려져 있다.

Ionizing radiation은 고에너지 전자파나 γ 선을 이용하여 골을 소독하며 최소 2mrad 정도의 용량이면 bactericidal effect가, 4mrad 정도의 용량이면 virus를 inactivation 시킬 수 있다고 보고되고 있다¹⁷⁾. 그러나 Banking method에서는 약 2000내지 3000 mrad의 용량이 allografted bone의 antigenicity를 감소시킨다고 보고하고 있다¹⁾.

Buring은 Co source를 사용한 0.5mrad에서부터 10mrad까지의 고에너지 방사선 조사연구에서 2 mrad까지의 방사선 조사에서는 collagen과 glycosaminoglycans의 용해도가 급격히 증가하는 것을 관찰하였고, 2mrad 이상에서는 bone matrix의 fibrillar network이 파괴되는 양상을 관찰하였다. 또한 쥐와 토끼의 decalcified freeze-dried bone 이식체의 골유도능은 2mrad의 방사선 조사로 완전히 파괴되어 이식체가 이물 반응을 보이거나 완전히 흡수된다고 보고하였다²⁴⁾. 즉 방사선 조사는 소독처리과정이기도 하지만 골내의 항원을 파괴시키는 작용도 하므로 소독에 필요한 방사선 조사량은 동종골의 골유도능을 유지시킬 수 없을 정도로 골기질을 파괴한다.

Cruse는 bone biopsy나 병소 부위 절단후 372명의 환자에서 2.7%의 감염율을 보이는데 이 중 90%는 *Corynebacterium acne* 또는 *Staphylococcus epidermis*이며 약 10%는 non-hemolytic *Streptococcus*이거나 *Staphylococcus aureus*로 보고되고 있다¹³⁾.

Tomford는 악안면 영역에 동종골이식을 시행한 경우 약 6.9%의 감염율을 보여 자가골이식보다 약 두배의 감염율을 보고하였으나 이에 erythema, delayed epithelialization, drainage등이 포함되어 bacterial contamination없이 devitalized tissue만으로도 발생가능하므로 모든 경우에서 동종골이 감염의 원인이라고 보기는 어렵다고 보고하였고 동종골의 대부분의 환자에서 창상 감염의 주된 원인이 아니라고 보고하였고, 그의 연구에서 조직 은행의 동종골은 자가골 이식보다 감염율에서 훨씬 우수하다고 보고하였다¹³⁾. 즉 세균 배양결과가 양성이라 하더라도 반드시 감염되는 것은 아니며 동종골 이식외의 감염조건 즉 광범위한 수술과 수술시간, 오염된 기구 및 오염된 수술부위가 감염을 유발시킬 수 있다는 것이다. 따라서 감염이 발생한 모든 경우에서 순수한 bacterial contamination인지 동종골이 감염의 원인 인지는 반드시 분류되어야 된다고 사료된다.

이와 같이 Banked Allogeneic Bone의 소독 여부가 완전하지 못함에도 불구하고 조직 은행의 동종골은 수술시간을 단축하고, 부가적인 수술부위의 감염과 창상출혈등과 같은 부작용과 술후 통증을 감소시킬 수 있는 장점이 있어 임상적으로 계속 연구할 가치가 있다고 하겠다.

V. 결 론

환자에서 제거한 하악골을 단순 동결 및 동결건조 처리하여 그 소독 효과를 EO gas와 함께 관찰해 본 결과 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 정상골과 골수염 골에서는 동결 건조가 소독 효과를 보이거나 EO gas 소독시에는 동결 건조가 별 효과를 보이지 못했다.
2. 정상골에서 동결 건조 자체는 EO gas보다 소독 효과가 감소되는 것으로 나타나 수술장에서의 감염 또는 Processing 과정중의 감염이 아닌가 사료된다.
3. 골수염골에서는 동결 건조 자체와 EO gas 소독이 거의 동일한 소독 효과를 보여 감염된 경우 동결 건조는 상당한 소독 효과가 있는 것으로 사료된다.
4. 정상골이나 골수염골 전체에서 단순 동결, 동결 건조, EO gas 소독의 순서로 효과가 나타났다. 그러나 동종골 이식편으로써의 조건은 완전한 무균 상태이므로 동결 건조와 EO gas 소독만으로는 골의 저장 및 보존에 문제가 있으므로 화학적 소독이나 방사선 조사등의 부가적인 소독 방법이 필수적이라 하겠고 이에 대한 지속적인 연구와 실험의 진행이 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. R. W. Bright. GE. Friedlander. KW. Sell : Tissue Banking : The United States Navy Tissue Banking. Military Medicine. 142.7 : 503-510, July, 1977.
2. Flosdort. EW. and Hyatt. GW. : Preservation of bone grafts by freeze-drying Surgery, 31 : 716-719, 1952.
3. Hyatt. GW. : Fundamentals in use and preser-

- vation of homogenous bone. *Armed Forces Med. J.*, 1 : 841-852, 1950.
4. _____ : The tissue bank : Present and future. *Milit., Med.*, 125 : 523-531, 1960.
 5. Kreuz, FP., Hyatt, GW., Turner, TC., and Basseti, CAL. : Preservation and clinical use of freeze-dried bone. *J. Bone Joint Surg.*, 33A : 863-872, 1951.
 6. Meryman, HT. : Principles of freeze-drying *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 85 : 630-640, 1960.
 7. Friedlander, GE. : Antigenicity of preserved bone allografts. *Transplant. Proc.*, 8(suppl. 1) : 175-202, 1976.
 8. Friedlander, GE., Strong DM., and Sell, KW. : The antigenicity of preserved preserved bone allografts in rabbits and man In *Proc. Orthop. Res. Soc.*, p.120, 1976.
 9. Friedlander, GE., Landenbauer-Bellis IM., Chrisman, OD : Cartilage matrix components as antigenic agents in an osteoarthritis model. *Trans Orthop Res Soc* 5 : p.170, 1980.
 10. Poole AR, Reiner a, Choi H, et al : Immunological studies of proteoglycan subunit from bovine and human cartilage. *Trans Orthop Res Soc* 4 : 55, 1979.
 11. Yabion IG, Brandt KD, DeLellis RA : The antigenic determinations of articular cartilage : Their role in the homograft rejection *Trans Orthop Res Soc* 2 : 90, 1977.
 12. Friedlander, GE, Strong DM, Sell KW. : Studies on the antigenicity of the bone. II. Donor-specific anti-HLA antibodies in human recipients of freeze-dried allografts. *J Bone Joint Surg*, 66A : p.107, 1984.
 13. Huggins C, Wiseman S, Reddi AH. : Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. *J Exp Med* 132 : 1250-1258, 1970.
 14. Narang R, Ruben MP, Harris MH, Wells H : Improved healing of experimental defects in the canine mandible by grafts of decalcified allogeneic bone. *Oral Surg*, 30(1) : 142-150, 1970.
 15. Narang R, Wells H. : Bone induction in experimental periodontal bony defects in dogs with decalcified allogeneic bone matrix grafts-A preliminary study. *Oral Surg*, 33(2) : 306-313, 1972.
 16. Bernick S., Paul W., et al : Cellular events associated with the induction of bone by demineralized bone. *J Orthop Res* 7 : 1-11, 1989.
 17. Burwell RG : The fate of freeze-dried bone allografts. *Transplant proc.* 8(2)(suppl. 1) : 95-111, 1975.
 18. Kaban LB, Mulliken JB, Glowacki J. : Treatment of jaw defects with demineralized bone implants. *J Oral Maxillofac. Surg*, 40 : 623-626, 1982.
 19. Pegg DE. : Cytology of human bone marrow subjected to prolonged storage at -79°C *J Appl Physiol* 19(2) : 301-309, 1964.
 20. Petri WH, Schaberg SJ. : The effect of antibiotic-supplemented bone allografts on contaminated, partially avulsive fractures of the canine ulna. *J Oral Maxillofac. Surg*, 42 : 699-704, 1984.
 21. Petri WH. : Osteogenic activity of antibiotic-supplemented bone allografts in the guinea pig. *J Oral Maxillofac. Surg*, 42 : 631-636, 1984.
 22. Strom TB, Tilney NL, et al : Cellular components of allograft rejection : identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely allografts. *J Immunol*, 118 : p.2020, 1977.
 23. Sautin EN : *Radiobiologia* 3 : p.191, 1963.
 24. Buring K. : Instertilization and preservation of biological tissues by ionizing radiation. Vienna. IAEA : p.71, 1970.
 25. Cruse PJE. : Incidence of wound infection on the surgical services. *Surg. Clin. North America*, 55 : 1269-1276, 1975.
 26. Friedlander GE, Strong DM., and Sell KW. : Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg.*, 58-A. : 854-858, Sep. 1976.