

## 냉동건조 은행골의 개발 및 이의 실험적 연구

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

정 필 훈

### AN EXPERIMENTAL STUDY OF UNDEMINERALIZED FREEZE-DRIED HUMAN BONE

Pill-Hoon Choung, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

*Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University*

*In order to develop the allogeneic bone implants instead of autogenous bone grafts for maxillofacial reconstruction, undemineralized freeze-dried human bone was processed. The freeze-dried human bone was implanted into the cranial and mandibular defects of the rabbits. The implants were evaluated clinically, roentgenographically and histomorphometrically. And immunohistochemical evaluation of the implants was performed on the rat.*

*The results were as follows :*

1. *When compared with control defects of 0.8×0.8 cm, the implants on the rabbit defects displayed complete osseous bridging clinically and roentgenographically. Histomorphometrically a minimal inflammatory cell infiltrate was present but the defects healed well clinically.*
2. *When compared with control grafts, the freeze-dried implants on the rat muscle displayed decreased antigenicity by immunohistochemical evaluation, due to freeze-drying process.*
3. *Undemineralized freeze-dried human bone in this study can be preserved as a bank bone in this study and seems to be applicable for clinical allogeneic bone grafts.*

#### I. 서 론

구강악안면 영역에서 현재 많은 골이식 수술이 행해지고 있고 앞으로 골이식을 요하는 수술은 더욱 증가할 추세이다. 현재의 골이식은 그 대부분이 자가골 이식이다. 그러나 자가골

이식에는 몇 가지 문제점이 있는 바 이는 골 공여부의 한정, 골 크기의 제한, 추가로 필요로 하는 골 제거수술 등이다. 이러한 자가골 이식에 의한 문제점 해결과 생활 수준의 향상 등으로 자가골 이식을 할 경우 또 다른 부위의 골제거 수술이 필요하고 이에 의한 고통을 원치 않는

\* 본 논문은 1992년도 서울대학교병원 일반 연구비(026)의 보조로 이루어진 것임.

등의 사회적 요인으로 인해 자가골 대체물의 필요성이 절실한 상태이다. 이에 자가골 대체물질로 가장 쉽게 접근할 수 있는 것이 인체의 뼈인데 이는 신선한 인체골을 요함에 따라 기증자가 필요하고 최근 들어 인체 기증의 인식이 사회적으로 높아지고 기증 받을 수 있는 가능성이 높아짐에 따라 기증자의 귀중한 인체 일부가 사장되는 불행한 경우를 방지하고 이를 적극적으로 자가골 대체물로 이용하고자 은행골 개발에 관한 실험적 연구를 하고자 한다.

인체골을 장기간 보존하여 은행골로 만드는 방법에는 많은 연구<sup>1-7)</sup>가 있어 왔지만 대표적인 방법의 하나가 냉동 건조법인 바이 방법을 통해 인체골을 장기간 저장 보관할 수 있는 방법을 개발하고 자가골 대신 이식했을 때 면역 거부 반응을 극소화한 은행골 개발에 관한 실험을 하고자 한다. 골 유도라는 관점에서 주로 demineralized allograft에 관해 많은 보고가 있으나 본 실험은 악안면 영역의 discontinuity defect 재건을 목표로 하여 불때 mechanical strength를 요하므로 이를 손상하지않는 방법의 모색으로서 undemineralized humana bone에 관한 실험을 하고자 한다.

## II. 실험재료 및 방법

### A. 실험재료

#### 1. 냉동건조 은행골의 제작

실험에 사용된 골은 인체의 골을 냉동건조시키는 처리를 하여 시행하였다.

인체의 골은 20세 성인 남자의 교통 사고에 의한 뇌사판정 후 장기 기증된 후 두개골, 하악골, 장골, 늑골, 대퇴골 등을 일부씩 채취하였다. 이때 기증자의 혈청학적 검사는 hepatitis B surface antigen, HCV antibody, HIV antibody, VDRL로 이상이 없었다. 이때 채취한 골은 크게 다음 단계를 거쳐 제작하였다.

- 1) 채취한 골을 깨끗이 수세한다.
- 2) 골을  $-73^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관한다.
- 3) enzyme arrest : HIV에 virocidal하게 cleansing 및 enzyme을 inactivation시킨다.

4) defatting : virocidal 한 용액으로 골을 defatting 시킨다. 2회 이상 defatting 과정을 거친다.

5) defatting용액을 제거한다.

6) freeze : 냉동시킨다. 냉동건조기 Bio-Freezer Model 8425 S/N(Forma scientific Inc. U.S.A)을 이용하여 deep freezing 시킨다.

7) drying : 건조시킨다. Dura-stop(FTS Systems Inc. RT 20p stone ridge, Inc. Corrosion Resistant Freeze-Dryer, stone Ridge, N. Y)를 이용하여 수분함량이 5% 이하가 되게 압력을 조절하여 건조시킨다.

8) 멸균 : Ethylene oxide gas를 이용하여 멸균한 뒤 degasing 과정을 거친다.

9) 포장하여 실온에 보관한다.

10) 재수화 : 항생제를 포함시킨 Ringer 용액에 사용전 2~24시간 동안 재수화 시킨다.

### B. 실험방법

배양검사와 동물실험을 하였으며 동물은 토끼를 이용하여 인체 은행골 이식후의 육안적, soft X-ray 소견 및 현미경적 조직 관찰을 하였으며 백서를 이용하여 면역조직화학 검사를 시행하였다.

#### 2. 냉동건조 은행골 배양검사

상기 방법에 의해 제작한 인체 은행골을 실온에서 6개월간 보관한 후 이에 대한 멸균 여부를 확인하기 위해 세포배양 배지에 넣어 1주일간 배양하였다. 이때 은행골 덩어리 혹은 5mm 크기의 골수가 노출되는 골편(chip)으로 만들어 배양하였다.

배지는 CIRP(China Institute for Radiation Protection)에서 제시한 Aerobic media와 Anaerobic media<sup>8)</sup>를 이용하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1주일 배양하였다.

#### 3. 냉동건조 은행골의 이식

2.0Kg 내외의 토끼를 동일조건 하에서 고정 사료로 일정기간 사육하였다.

통법에 따라 10mg/ml의 염산 케타민(케타라, 유한양행) 5~10mg/kg을 Rompun(롬퐁,

한국바이엘주식회사) 0.5mg/kg을 근육 주사하여 마취하였다.

제 1 군은 토끼 두개골에 중앙부 절개를 한후 두개골을 노출시켜 0.8×0.8cm 크기의 사각형의 전측 두개의 골 결손부를 midline suture를 중심으로 좌우로 2 개씩 모두 4 개의 골 결손부를 형성하였다. 한쪽은 아무것도 넣지 않은 상태의 대조군을 만들고 그 아래쪽에는 은행 늑골을 이식하여 3-0 실크로 고정하였다. 반대편 위아래쪽은 은행 연골 chip과 덩어리로 고정하여 상대적으로 비교하였다

제 2군은 두피 골막하로 은행골을 onlay하여 두개골 결손부 하방에 삽입하고 고정하지는 않았다 토끼 하악 우각부에 0.6×0.6cm 크기의 사각형의 전측 두개의 골 결손부를 만들어 한쪽은 아무것도 넣지 않은 상태의 대조군을 만들고 그 반대쪽에는 역시 0.8×0.8cm 크기의 은행 늑골을 이식하여 3-0 실크로 고정하였다. 상기 실험 동물을 각군을 이식후 제 2주, 6주, 12주에 각기 2마리씩 희생시키면서 염증소견이나 종창 등 육안적 소견을 관찰하고 이식부위를 10% 포르말린에 고정한 후 파라핀 포매하여 헤파톡실린-에오신 염색을 하여 광학현미경으로 조직소견을 관찰하였다. 이때 포르말린 고정후 Soft x-ray를 촬영하여 이식골의 상태를 파악하였다.

#### 4. 냉동건조 은행골의 면역조직 화학검사

250g 내외의 웅성 백서를 동일 조건하에서 고정사료로 일정기간 사육하였다. 상기 통법에 따른 마취를 시행하고 양측 대퇴부에 절개선을 가한 후 대퇴부 근육을 노출시킨 뒤 근육내에 냉동 건조 은행골을 삽입하여 이식하였고 대조군으로 신선 인체골을 이식하였다.

상기 실험 동물을 각각 제 1일, 1주, 2주, 4주에 희생시켜 면역조직 화학검사를 다음과 같이 시행하였다. 이식 부위의 동결절편을 10분간 건조시킨 후 3.5% 중성 포프말린 용액으로 10분간 고정한 후 이 조직을 10Mol phosphate-buffered saline으로 세척하고 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 5분간 처리하여 조직내의 endogenous peroxidase 활성을 제거한 후 blocking serum이 포함된 완충용액으로 20분 처리하여 항체 시험

시료로 만들었다.

ouse의 anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 단일 클론 항체를 30분간 상온에서 반응시키고 ABC (Abidin Biotin Complex) 방법에 따라 다시 biotin이 결합된 anti-mouse IgG 항체를 2차 처리하고 DBA(diamino benzidine) 방법으로 하여 양성반응을 보이는 T림파구를 200배율에서의 slide에서 임의로 선정하여 평균 양성반응 빈도수를 계산하여(+, ++, #)로 분류하여 냉동건조 은행골 군과 대조군과를 비교하였다.

### III. 실험 결과

#### 1. 냉동건조 은행골의 제작

인체의 두개골, 늑골, 대퇴골, 장골을 채취하여 덩어리 형태, 조각형태, 분말 형태의 냉동 건조 골을 제작할 수 있었다. 이를 멸균하고 실온에 보관하여 실험에 이용할 때까지 부패하거나 변색, 부패에 따른 냄새, 변형 등은 없었다.

#### 2. 냉동건조 은행골 배양검사

냉동건조 은행골을 block이나 bone marrow가 노출된 chip bone 모두에서 aerobic이나 anaerobic 모두에서 어떤 세균도 전혀 배양되지 않아 멸균 상태였다.

#### 3. 냉동건조 은행골의 이식

##### A) 육안적 소견

제1군, 제 2군 모두 토끼의 은행골 이식체 부위는 모두 24군데였으며 이중 감염을 일으킨 곳이 한군데 있었고 발견하지 못한 이식골편이 1 군데였다. 제 1군은 감염이 있는 한곳을 제외하고는 모두 종창이나 발적, 배액 등이 없는 치유과정을 보였다. 그외는 육안적인면에서 약 2주 정도에서는 열이나 발적이 없는 종창을 보이기도 했으나 12주때는 종창이나 발적 등이 관찰되지 않았다. onlay 이식골편은 육안적으로 염증성 소견이 보이지 않는 주위 연조직에 잘 고정된 채 관찰되었다.(사진 1)

B) Soft x-ray 소견

제 1군은 두개골 결손부에 골 이식을 하지 않은 대조군은 12주 때까지 골결손 부위에 골 형성이 되지 않아 radiolucent하게 보이며 군데 군데 약간씩 석회화 소견이 보이나 전반적으로 radiolucent하게 보였다. 반면에 은행골 이식 부위의 결손부는 가장자리 부위부터 골 재생이 됨에 따라 점차 radiolucent area가 감소하다가 12주 때는 완전히 radiopaque하게 보였으며 은행 연골이식 부위보다 빠른 골 재생을 보였다 (사진 2).

제 2군은 두개골 부위에 onlay한 부위가 하방 속주의 골 상태와 겹쳐 은행골 이식 부위는

주위골과 융합된채 radiopaque하게 관찰되었고 silk 등으로 고정하지 않았음에도 처음 삽입했던 곳에서 주위 연조직과 결합하여 이동 없이 관찰되었다. 하악골 우각부의 결손부의 대조군은 역시 치유가 되지 않았고 이식한곳은 하악하연의 변화없이 골 치유가 되었음을 관찰할 수 있었다(사진 1).

C) 광학현미경 소견

2주 소견 : 이식체 주위의 결체조직 내에 주로 염증세포가 친윤되어 있으며 염증 정도는 비교적 심한 상태로 여겨지며 lymphocyte, macrophage, histiocyte, polinuclear giant cell, fibroblast 등의 세포가 관찰되며 골흡수 양상은



사진 1. 토끼 하악골 우각부의 결손부의 냉동건조 은행골 이식소견

좌 : 이식골 모습. 중 : 이식골 방사선소견 우 : 대조군 결손부 방사선소견

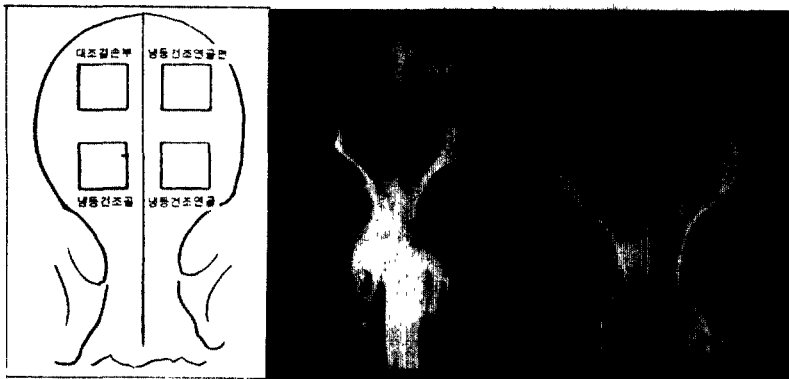


사진 2. 토끼 두개골 결손부의 냉동건조 은행골 이식의 방사선 소견

좌 : 이식골 모식도. 중 : 이식골 제6주째 방사선소견 우 : 이식골 제12주째 방사선소견으로 결손부가 완전치유되고 trabecular pattern이 관찰되며 연골 이식 부위보다 치유가 빠름

보이나 신생골 형성은 관찰되지 않았다.

6주 소견 : 여전히 만성염증세포의 침윤이 보이거나 현저히 감소되어 있고 이들 결체조직에 둘러싸인 층판골의 구조가 보이고 신생골 형성이 관찰되며 osteocyte와 함께 homogenous하게 loose한 non-vital matrix가 관찰되었으며 일부 골 흡수의 양상을 보였다.

12주 소견 : 이식체 주위 결체조직 내로 아주 미약한 염증세포의 침윤이 관찰되고 이식체골 주변에 층판상의 석회화 침착이 보이며 woven bone이 collagen fiber와 함께 관찰되며 capillary formation이 산재되어 있고 focal calcification이 관찰되며 아직도 일부 homogenous loose non-vital matrix가 일부 관찰되었다 그러나 이 matrix 가장자리에서 가운데를 향해 혈관화 및 파골 세포, 섬유화 세포 등이 점차 증가되면서 vital화 되어가는 것을 관찰할 수 있었다(사진 3).

#### 4. 냉동건조 은행골의 면역조직 화학검사

냉동건조 은행골의 면역조직 화학검사에 있어서는 CD3 T 임파구, CD4 T 임파구, CD8 T 임파구 등이 제1일에서(+) 제 7일 제까지 양성 반응이 증가된 중등도의 정도(++)가 관찰되었다가 2 주째는 감소(+)하였다. CD3 T 임파구와 CD8 T 임파구는 2주째부터 현저히 감소(+)하나 4주째까지도 양성반응(+)을 보였다. CD4 임파구도 2주째부터 감소하는 경향(++)이 있으나 현저한 정도는 아니며 역시 4주째까지 양성 반응(+)이 관찰되었다(사진 4). 이는 냉동건조시키지 않은 인체골의 면역조직 반응과 비교했을 때 각기 그 양성반응 감소되어 면역성이 감소될 결과였다.

#### IV. 총괄 및 고찰

1867 년 Ollier가 골 저장에 관한 개념을 기술한 이래 골 저장 방법으로는 이식골의 항원



사진 3. 냉동건조 은행골 이식의 광학현미경소견.

좌 : 이식체 주위의 결체조직 내에 주로 염증세포가 침윤되어 있으며 염증 정도는 비교적 심한 상태로 여겨지며 lymphocyte, macrophage, histiocyte, polinuclear giant cell, fibroblast 등의 세포가 관찰되며 골흡수 양상은 보이거나 신생골 형성은 관찰되지 않는 2주 소견

중 : 여전히 만성염증세포의 침윤이 보이거나 현저히 감소되어 있고 이들 결체조직에 둘러싸인 층판골의 구조가 보이고 신생골 형성이 관찰되며 osteocyte와 함께 일부 골 흡수의 양상을 보이는 6주 소견.

우 : 이식체 주위 결체조직 내로 염증세포의 침윤은 아주 미약하게 관찰되고 이식체골 주변에 층판상의 석회화 침착이 보이며 woven bone이 collagen fiber와 함께 관찰되는 12주 소견.

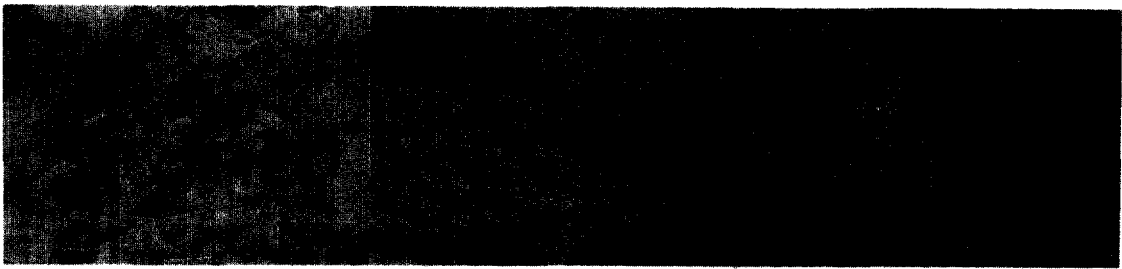


사진 4. 냉동건조 은행골의 면역반응이 감소된 면역 조직 화학검사상 : 인체골 이식 대조군  
 상좌 : CD3 임파구 반응 제1일째, 상중 : CD4 임파구 반응 제 1주째, 상우 : CD8 임파구 반응 제4주째  
 하 : 냉동건조 인체골 이식군.  
 하좌 : CD3 임파구 반응 제1일째, 하중 : CD4 임파구 반응 제 1주째, 하우 : CD8 임파구 반응 제4  
 주째

성을 제거하는 것을 목적으로 하여 냉동, 건열, 냉동건조, 머티올레이트 처리법<sup>1)</sup>, 포르말린 처리법, 고압증기멸균법, 끓이는 방법, 방사선 조사 등의 여러방법이 보고 되었다. 그러나 끓이거나 화학적 처리 방법은 골형성 단백질에 손상을 입히거나 자체내 단백질을 변성 시켜 이물질로서의 작용을 야기할 수도 있고 방사선 조사법 역시 소독을 겸할 정도의 조사량은 골형성에 방해하는 단점을 지니고 있어 냉동건조법이 추천되는 한 방법으로 여겨지고 있다.

냉동건조란 말은 freeze-drying 혹은 lyophilization이란 말로써 이는 단순히 조직을 얼려서 보관하는 것과는 달리 high vacuum 상태에서 조직으로부터 수분을 제거하여 보존하는 상태이기 때문에 단순히 냉동(frozen) 시킨 상태에서는 질병 전이가 가능한 단점을 해결할 수 있는 조직 보관 방법의 하나이다. 이 방법은 의료분야에서는 Altmann (1890)<sup>2)</sup>이란 자가 처음

조직 표본 고정 목적으로 이용한 이래 Gersh (1932)<sup>3)</sup>, Neumann (1952)<sup>4)</sup>, Zurbuchen (1959)<sup>5)</sup> 등에 이르면서 오늘날의 이용법에 이르게 되었다. 첫 임상적 목적으로 사용하기는 1933년에 Flosdorf가 정상 혈장과 혈청을 냉동건조시켜 사용하였고 1950년대에 들어 경조직도 냉동건조를 하며 미국 National Navel Medical Center in Bethesda, Maryland 에서 tissue bank에 이용하였다. 냉동 건조 골 처리는 처음으로 Flosdorf and Hyatt (1952)<sup>6)</sup>에 의해 시도되었고 Kreuz 등(1951)<sup>7)</sup>에 의해 정형외과영역에서 이용되었다.

냉동건조 방법은 freezing 과정후 이어서 건조시키는 과정을 거치는데 건조시킨후 물질은 진공 상태를 유지하여 보관하다가 사용 전에 다시 이를 재수화시켜 이용하는 것이다. 이 때 냉동 시키는 과정에 있어서 급속 냉동 즉 액체 질소에서 -183 도로 급속 냉동시키는 것이

나온지 아니면 1도 C/min 로 천천히 하는 것이 나은지에 대해서는 목적에 따라 다를 수 있다. 급속 냉동의 장점은 천천히 냉동 시켰을 때 주위 환경에서 물을 추출하여 얼음 알갱이 형태로 되어 결과적으로 조직액 내에서 녹을 수 있는 모든 물질의 농도를 증가시킬 수 있는 단점이 되고 또 이로 인해 freezing point를 감소시키는 단점을 배제할 수 있는 장점이 있다. 그러나 Billingham과 Medawar<sup>9)</sup>는 피부의 항원 등을 감소 시키는 데는 천천히 냉동 시키는 것도 좋은 결과를 준다고 보고하고 있다. 또한 세포의 vitality 를 유지하는 데는 상기 속도로 천천히 하는 것이 좋다고 Meryman 등<sup>10)</sup>은 보고하고 있다. 그렇지만 이 경우는 조직 보존액을 사용하고 나중에 철저히 제거 해줄 필요가 있겠다. 본 실험에서는 급속 냉동의 일환으로 시행하였다.

건조하는 데에 있어서는 수분이 고체에서 액체를 거치지 않고 곧 바로 기체로 제거할 수 있는<sup>11)</sup> 조건 즉 섭씨 0도 아래, 4.6 Torr 이하에서 잔여 수분이 건조 무게의 2-4% 이하가 되게 할 필요가 있다. 이는 건조과정 중의 산화작용이 잔여 세포막을 파괴하여 항원성을 줄여 주기 때문이다. 가능하면 실온에서 보존하는 데는 1% 이하의 잔여 수분을 유지토록 하기 위해서는 반복 건조를 시키며 이를 2차 건조라 하는 데 freezing point 상방의 온도에서 이를 시행하는 것이 좋으나 본 교실의 기계에 의해서는 5% 이하의 잔여 수분인 건조를 시행하였다.

멸균은 방사선 조사와 가스 소독을 생각할 수 있는데 방사선 조사는 2-2.5 million Rads를 조사하면 세균은 죽일 수 있으나 바이러스는 해결되지 않고 이 이상의 조사량에서는 collagen과 골 강도에 영향을 미치게 되는 문제점이 있어 본 실험에서는 EO 가스가 세균은 물론 바이러스 멸균도 되기 때문에 EO 가스 멸균을 시행하였다. 그러나 방사선 조사는 냉동건조 시키는 과정에 있어서 세포내 속에 잔여할 수 있는 얼음 알갱이를 제거하는 장점을 지니고도 있어 경우에 맞는 멸균 방법을 택하는 것이 좋으리라 생각된다. 가스 멸균은 충분히 dega-

sing 시키고 재수화 과정을 통해 그 잔여물이 제거되는 효과를 얻고 사용직전 항생제를 흡수토록 함으로써 약물 운반체의 구실을 하도록 하여 자체 및 이식체 주위의 멸균효과를 돕도록 하였다. Bumann 등<sup>12)</sup>에 의하면 비록 연골에 관한 것이지만 멸균 방법에 따른 재수화 속도 등에 관해 실험이 보고되고 있으며 이중골이 자가골보다 감염이 높을 수 있는 점을 고려하면 감염을 줄이기 위해서는 항생제를 섞어 이용하는 것이 좋으리라 생각된다. 재수화 용액은 생리식염수나 Ringer 액을 이용하여 여기에 1000 cc에 1 mill. IU penicillin과 2g의 streptomycin을 추가하거나 nebacetine solution (2500 IU bacitracine, 50 mg neomycine base)을 이용하거나 Ringer-Locke solution을 이용할 수도 있다. 본 실험에서는 Ringer 액에 gentamycin을 섞어 실험하였다.

이때 골의 calcium이나 mineral을 제거하기 위한 공정을 가미하면 탈회골(demineralized bone)을 얻을 수 있다. 이는 Urist<sup>13)</sup>, Reddi와 Huggins<sup>14)</sup>, Glowacki<sup>15)</sup>, Kaban<sup>16)</sup> 등의 소개처럼 다양한 탈회 정도 및 공정에 따라 골 유도 정도도 달라지는 바 단점은 골 강도 유지가 소실되기 때문에 본 실험에서는 탈회하지 않은 은행골 개발에 대한 실험을 하였고 따라서 골 유도라기 보다는 골 전도에 의한 골 재생 효과를 관찰하였다.

일반적으로 조직을 냉동시켰다고 해서 거부반응이 완전히 없어지는 것은 아니나 골을 frozen 시킬 경우 cell wall의 antigen 때문에 1.5%의 거부반응이 있으나 냉동건조시키면 더 줄일 수 있다<sup>17,18)</sup>. Xenografts는 거의 거부반응이 있는데 이는 matrix와 cell wall antigen 때문이다. 본 실험은 인체의 골을 토끼에 실험하였기 때문에 xenografts이나 이는 인체의 골을 냉동건조시켰을 때의 가장 심한 거부 반응을 대비한 실험 모델로서 시행하였다.

즉 인체골을 냉동건조 시키고 그 냉동건조 시키는 과정의 공정에 따라<sup>19)</sup> 거부반응 정도가 다를 수 있는데<sup>20,21)</sup> 본 실험은 그 공정의 하나가 거부반응을 최대 줄일 수 있는 방법의 하나로서 xenograft를 하였다. 골 내에서의 면역

체계는 세포성 면역의 T 임파구와 관련이 있으며<sup>22)</sup> 골수내의 세포가 주로 면역 반응을 일으키지만 matrix와 collagen도 면역반응을 일으킨다. T 임파구는 항원의 발현에 따라 CD4와 CD8 임파구로 구분하는데 이들은 더 세분하여 헬퍼 T 임파구와 지연성 과민 반응 T 임파구가 표면에 CD4를, 세포독성 T 임파구와 면역억제 T 임파구가 세포 표면에 CD8을 발현하며 CD4 T 임파구는 외부항원을 인식하며, 외부항원 내에서 분해된 epitope peptide와 class-II MHC (major histocompatibility complex)의 복합체를 인식하여 면역 반응을 한다<sup>23)</sup>. CD8 T 임파구는 항원 발현 세포<sup>11)</sup> 내에서 항원이 분해된 epitope peptide와 class-II MHC의 복합체를 인식하여 면역 반응을 한다<sup>24)</sup>. 따라서 면역 거부 반응은 CD4와 CD8 임파구에 의한 항원 인식이 중요하다.

이식골에 대한 숙주의 면역 반응은 골내의 이종세포가 발현하는 class-1 MHC 복합체에 의한 alloreactive CD8 T 임파구에 대한 면역 반응과, 이식골의 항원에서 유래되어 자신의 class-II MHC에 결합된 peptide에 특이적인 alloreactive CD4 임파구의 면역 반응을 야기하게 된다. 냉동 건조 시킨 골에서는 이식골내의 항원성이 줄어들어 숙주의 항원발현세포에 의해 CD4 임파구 반응을 야기시키는 것이 주가 되는 면역반응이 일어나는 것 같고, 이들 이식골들이 냉동건조라는 과정을 거치며 T 임파구 자극에 필요한 상황, 즉 이식된 주위조직에 활성화된 B 임파구나 대식세포 등의 존재, 항원 발현 세포 표면의 B7 물질 발현 등을 가능한 억제시키며 면역억제 T 임파구수를 상대적으로 증가시키는 상황의 변화를 야기시켜 전체적인 면역 거부 반응을 줄이는 효과를 보여 이식골의 생착을 돕는 결과를 야기하는 것으로 사료된다.

일반적으로 모든 골 조직은 그 보존 방법이 어떠하든, allograft<sup>20, 25)</sup> 이건 xenograft<sup>26-28)</sup> 이건 골전도 (osteoconduction)에 의해 치유의 과정을 거치게 되며 이는 『creeping substitution』이란 현상으로 설명되고 있다. 골전도(osteoconduction)는 골유도(osteoinduction) 현상과 함께 골 재생을 하게 된다. 골 유도는 이미 골

유도인자(bone morphogenetic protein : BMP)의 적극적인 골 형성 인자가 골 교원질 속에 있어서 골로부터 mineral이 제거되면 활성화되어 mesenchymal cell을 탈회된 graft 쪽으로 chemotaxis 하여 osteoprogenitor cell로 분화되면서 골을 형성하게 된다.<sup>13, 15, 19-33)</sup> 고 알려져 있고 골 생성의 조절은 전신적인 요소와 국소적인 요소<sup>34)</sup>에 의해 조절되는데 최근에는 IGF-I, IGF-II, TGF-B<sub>1</sub>, TGF-B<sub>2</sub>, Basic FGF, Acidic FGF, PDGF, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 같은 국소적인 요소에 의해 적극적으로 영향을 받음이 밝혀지고 있다. 이들 골속의 성장요소들은 BMP는 주로 mesenchymal cell에 주로 작용하고 성장인자들은 그후에 작용하는 등이 알려지며 BMP는 BMP-1에서 BMP-7까지 밝혀지며 그 동안 여러가지 이름으로 불리며 여러 동물에서 그리고 각 조직 별로 다양하게 추출하여 왔던 바<sup>35, 37)</sup> 최근에는 BMP-2, BMP-7이 유전자 재조합<sup>38)</sup>에 의해 인공적으로 만들어지고 있다.

즉 골 재생을 위한 두가지, 골전도와 골유도에 있어서 골유도가 적극적 요소를 띄고 있고 BMP나 탈회골은 골유도 요소로 여겨지고 있으며<sup>39)</sup> 냉동 건조골은 주로 골 전도에 의한 골 재생이 되고 있다. 냉동 건조한 탈회골 역시 탈회 정도에 따라 골 유도 요소가 달라지는데 이때 탈회 정도에 따라 골 역시 mechanical form이 영향을 받으므로 본 실험에서는 탈회를 하지 않은 상태로 mechanical strength에 영향이 없는 상태의 실험을 하였다. 비 탈회골로서의 본 실험의 냉동건조 골은 토끼 실험에서 면역 반응이 심하면 나타날 수 있는 조직 반응 즉, lymphocyte, macrophage, polinuclear giant cell 등을 초기에 관찰할 수 있었지만 면역 반응의 일환으로 보이는 육안적인 극심한 흡수 현상은 onlay 이식 골편에서는 보이지 않았다. Critical size defect<sup>40)</sup>가 가장자리로부터 10% 이내의 골 재성을 일으킨다고 한것 처럼 본 실험에서도 은행골을 이식하지 않은 곳은 soft x-ray에서 치유가 되지 않았고 fibrous tissue로 골 결손부가 싸여 있으며 간혹 섬처럼 군데군데 석회화가 되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.



은행골을 이식 한곳은 12주때는 완전 치유가 되었으며 trabecular pattern 이 보였으며 상대적인 비교에 있어서도 은행 연골을 이식한 곳보다 골 치유가 빨랐다. 그러나 후기에도 염증 현상은 완전히 없어지지는 않았지만 이식 골편 자체에 감염을 일으키지 않은 점으로 보아 현미경적 조직 소견에서의 세포성 면역 반응은 존재하나 이러한 세포성 면역 반응에 의한 과민반응이 비특이성 염증 반응과 감별하기 힘들다는 보고<sup>26)</sup>를 감안하고, 2 주 때 보다 12 주 때 현저히 염증 현상이 감소하고 그것도 아주 미약한 점을 고려 하면 냉동 건조 이식골은 자가골의 골 대체물로 이용할 수 있으리라 사료된다. 이들 냉동 건조 은행골은 인체의 골로 이용할 경우 동종골 이식인바 이를 가능한 unmodified form으로 이용하고자 한 실험으로 이는 allograft의 개념으로 이를 demineralize 처리 등을 한 alloimplant 개념에 선행하여 실험을 한것이다. 탈회할 경우 즉시 재건시의 견고성, 경조직 재건에 따른 구조의 유지 가능성 등이 단점으로 지적되어 탈회란 과정을 통해 골 유도를 노출시키지 않고도 골의 mechanical strength에 영향이 없는 상태로의 이용 가능성에 대해 실험해 본 바, 임상적으로는 동종골 이식이 되기 때문에 xenograft인 본 실험보다 더 좋은 결과를 보이리라 생각된다.

## V. 결 론

은행골 제작을 위해 냉동건조법에 따른 일련의 처리방법을 시도하여 탈회 하지 않은 은행골을 제작, 이에 대한 미생물 배양, 동물 실험에 따른 조직소견 및 면역조직화학 실험을 한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 냉동건조 은행골을 제작하여 6개월 이상 보존한후 이를 배양결과 멸균상태로서 상온에서 부패되지 않고 저장가능하였다.
2. 냉동건조 은행골은 토끼 실험에 의하면 이종골 이식임에도 초기에는 염증 반응을 보이나 골 결손부의 골 재생을 위한 이식골로 이용할 수 있는 치유과정을 보였다.

3. 냉동건조 은행골은 백서의 면역조직화학적 실험에 의하면 이종골 이식임에도 냉동 건조에 의해 면역 항원성이 감소하였으며 2주 이후 현저한 면역반응이 감소가 관찰 되었고 냉동건조 처리하지 않은 골에 비해 면역반응이 감소되었다.
4. 본 실험에서 시행한 일련의 인체골 냉동 건조 저장 방법은 은행골로 이용하여 동종골 이식이 가능하리라 사료된다.

## REFERENCES

1. Reynolds, F.C., Oliver, D.R., Ramsey, R. : Clinical evaluation of the merthiolate bone bank and homogenous bone grafts. J. Bone Joint Surg. 33A : 873, 1951.
2. Altmann, R. : Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Veit, Leipzig, 1890.
3. Gersh, I. : The Altmann technique for fixation by drying while freezing. Anat. Rec. 53 : 309, 1932.
4. Neumann, K.H. : Demonstration einer verbesserten Gefriertrocknungsanlage. Verh. anat. Ges., Jena 50 ; 262, 1952.
5. Zurbuchen, P., Held, A. J., Spirgi, M. : Les homogreffons de cartilage lyophilises et leur application en chirurgie stomatologique. Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 69 ; 703, 1959.
6. Flosdorf, E.W., Hyatt, G.W. : Preservation of bone grafts by freeze-drying. Surgery 31 : 716, 1952.
7. Kreuz, F.P., Hyatt, G.W., Turner, T.C., Bassett, C.A.L. : The preservation and clinical use of freeze-dried bone. J. Bone Joint Surg. 33A : 863, 1951.
8. Qi Zhirong, et al. : Study on D value of ionizing radiation sterilization of indicator bacillus. Disinf. and steril. 4 : 65, 1987.
9. Billingham, R. E., Medawar, P.B. : The viability of mammalian skin after freezing,

- thawing and freeze-drying ; in Freezing and drying. Report of a symposium. p55, The institute of biology, London, 1951.
10. Meryman, H.T. : The mechanisms of freezing in biological systems ; in Parkes, Smith, Recent research in freezing and drying. Blackwell, Oxford, 1960.
  11. Czitrom, A.A., Axelord, T., Fernandes, B. : Antigen presenting cells and bone allotransplantation. Clin. Orthop. 197 : 27, 1985.
  12. Bumann, A., Kopp, S., Eickbohm, J.-E., Ewers, R. : Rehydration of lyophilized cartilage grafts sterilized by different methods. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 18 : 370, 1989.
  13. Urist, M.R., Dowell, T.A., Hay, P.H., Strates, B.S. : Inductive substrates for bone formation. Clin. Orthop. 59 : 59, 1968.
  14. Reddi, A.H., Huggins, C.B. : Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. Pro. Natl. Acad. Sci. USA 69 : 1601, 1972.
  15. Glowacki, J., Kaban, L.B., Murray, J.E., et al : Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. Lancet. 1 : 959, 1981.
  16. Kaban, L.B., Mulliken, J.B., Glowacki, J. : Treatment of jaw defects with demineralized bone implants. J. Oral Maxillofacial Surg. 40 : 623, 1982.
  17. Burwell, R.G., Gowland, G.I. : Studies in the transplantation of bone. III. The immune response of lymph nodes draining components of fresh homologous cancellous bone and homologous bone treated by different methods. J. Bone Joint Surg. 44B : 131, 1962.
  18. Burwell, R.G., Gowland, G.I., Dexter, F. : Studies in the transplantation of bone. VI. Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. J. Bone Joint Surg. 45B : 597, 1963.
  19. Urist, M.R., Mikulski, A.J., Boyd, S.D. : A chemosterilized antigen extracted bone morphogenic alloimplant. Arch. Surg. 110 : 416, 1975.
  20. Ripamonti, U : Calvarial regeneration in primates with autolyzed antigen-extracted allogeneic bone. Clin. Orthop. 282 : 293, 1992.
  21. Burchardt, H., Glowczewski, F., Miller, G. : Freeze-dried segmental fibular allografts in azathioprine-treated dogs. Clin. Orthop. 218 : 259, 1987.
  22. Dorf, M.E., Benacerraf, B. : Suppressor T cells and Immunoregulation. Ann. Rev. Immunol. 2 : 127, 1984.
  23. Yewdell, J.W., Bennink, J.R. : The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. Cell 62 : 203, 1990.
  24. Peters, P. J., Neefjes, J.J., Oorschot, V. et al. : Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartment. Nature 349 : 669, 1991.
  25. Friedlaender, G.E., Strong, D.M., Sell, K. W. : Studies on the antigenicity of bone. II. Donor-specific anti-HLA antibodies in human recipients of freeze-dried allografts. J. Bone Joint Surg. 66A : 107, 1984.
  26. Hughes, C.L., Gibson, D.H. : Heterogeneous bone graft of nonunion of mandibular fracture. Report of case, J. Oral Surg. 26 : 749, 1968.
  27. Anderson, K.J., Dingwall, J.A., Schmidt, J. et al : The effect of particle size of the heterogeneous bone transplantation on the host tissue. II. Histological study. J. Bone Joint Surg. 43A : 996, 1961.
  28. Anderson KJ, LeCocq JF, Akeson WH, et

- al. : Endpoint results of processed heterogeneous, autogenous and homogenous bone transplants in the human. : A histological study. *Clin. Orthop.* 33 : 220, 1964.
29. Urist. M.R. : Bone formation by autoinduction. *Science* 150 : 893- 899, 1965.
  30. Urist, M.R. and Strates, B.S. : Bone morphogenic protein. *J. Dent. Res.* 50(Supplement) : 1392-1406, 1971.
  31. Urist.M.R., Mikulski, A. and Lietze, A. : A solubilized and insolubilized bone morphogenic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 1 828-1832, 1979.
  32. Urist. R.R., Huo,Y.K., Brownell, A.G., Hohl, W.M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P. Hunkapiller, M., DeLange, R.G. : Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 371, 1984.
  33. Mulliken, J.B., Glowacki, J. : Induced osteogenesis for repair and reconstruction in the craniofacial region. *Plast. Reconstr. Surg.* 6 : : 551, 1980.
  34. Fonseca, R.J., Nelson, J.F., Clark, P.J., Frost, D.E., Olson, R.A.J. : Revascularization and healing of onlay particulate allogeneic bone grafts in primate. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 41 : 153, 1983.
  35. Ozkaynak, E., Rueger, D.C., Drier, EA., Corbett, C., Ridge, R.J., Sampath, T.K and Oppermann, H. : OP-I cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO. J.* 9 : 2085, 1990.
  36. Sailer, H.F. and Kolb, E. : Application of purified bone morphogenetic protein (BMP) in cranio-maxillo-facial surgery. BMP in compromised surgical reconstruction using titanium implants. *J. Cranio-Maxillo-Facial Surg.* 22 : 2, 1994.
  37. Sailer, H.F. and Kolb, E. : Application of purified bone morphogenetic protein (BMP)preparations in cranio-maxillo-facial surgery. Reconstruction in craniofacial malformations and post-traumatic or operative defects of the skull with lyophilized cartilage and BMP. *J. Cranio-Maxillo-Facial Surg.* 22 : 191, 1994.
  38. Wozney, J. M., Rosen,V., Celeste,A.J., Mitsosock, L.M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., Wang, E. A. : Novel regulators of bone formation : molecular clones and activities. *Science*, 242 : 1528, 1988.
  39. Chai. Y. and Slavkin, H.C. : Biology of bone induction and its clinical applications. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* 6 : 739, 1994.
  40. Schmitz J.P., Hollinger, J.O. : The critical size defect as an experimental model for crniomandibulofacial nonunions. *Clin. Orthop.* 205 : 299, 1986.