

멸균방법에 따른 탈회동종골의 세포독성 여부에 관한 실험적 연구

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학 교실

단국대학교 치과대학 치과약리학 교실*

단국대학교 치과대학 구강조직학 교실**

우기선 · 임창준 · 김세원* · 김종여**

IN VITRO STUDY ON THE CYTOTOXICITY OF THE DIFFERENTLY STERILIZED DEMINERALIZED BONE POWDER

Ki-Sun Woo, Chang-Joon Yim, Se-Won Kim*, Jong-Yeo Kim**

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Dankook University

*Dept. of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Dankook University**

*Dept. of Oral Histology, School of Dentistry, Dankook University***

Procurement, cutting, cleansing, freezing, freeze-drying, and demineralization of the allogeneic bone must be made under the germ-free stable condition without bacterial and/or viral contamination. Even though the bone is procured under the germ free condition, we must have confidence on disinfection of all the solutions that come in contact with tissue during the whole procedure. Lots of antibacterial agents have been introduced for chemical sterilization. Recently ethylene oxide gas sterilization or radiation sterilization is frequently selected as a secondary sterilization procedure. The biological and biochemical response of the graft material differs with the type and concentration of the sterilizing agents, and various toxic reactions have been reported due to the graft material itself and the substance released by the chemicals.

The authors conducted the Millipore filter test to observe the toxic effect on L929 fibroblasts according to the effect on activity of succinate dehydrogenase, during the secondary sterilization of the demineralized allogeneic bone powder with irradiation or ethylene oxide gas.

The results were as follows :

- 1. Around the copper disk, positive control group, 10mm diameter discoloration was observed.*
- 2. As same as the negative control group, the silicone disk showed no discoloration.*
- 3. The demineralized allogeneic bone which was sterilized with ethylene oxide gas or irradiation showed no cytotoxicity.*

4. From this results, it is suggested that treatment with ethylene oxide gas or irradiation should be effective to sterilize the demineralized allogeneic bone.

I. 서 론

외상, 감염, 낭종, 신생물, 선천적 기형에 의해 유발된 악골의 기형이나 결손부의 성공적인 치료는 골이나 골 대체물을 매식체로 사용함으로써 발전되어 왔다. 이들 매식체와 매식재들은 골조직내의 결손부를 충전하고, 골절이나 결손부의 치유를 촉진하고, 심미를 개선시키하고자 하는 목적이 있으며, 이외에도 정상적인 기능과 기계적 강도를 회복시키고, 감염을 감소, 방지시키며, 연조직의 성장을 예방하는데 그 목적이 있다.¹⁾

골 결손부를 회복시키기 위한 재료 중, 자가골 이식은 혈관의 빠른 신생속도, 숙주와의 친화력, 혹은 면역학적인 수용의 우수성, 특히 정상골 재생이 잘되는 장점이 있어 가장 흔히 사용되고 있다. 그러나 신체 다른 부위에 야기되는 외과적 손상으로 인한 감염률, 실혈량, 마취 시간, 술후 통증의 증가 및 이식재 공급여부의 제한, 그리고 결손 부위가 클 경우 채취가능한 골의 양이 한정되어 있는 단점이 있다. 이러한 자가골 이식의 단점을 보완하기 위하여 냉동골(Frozen bone), 동결건조골(Freeze-dried bone), 자가용해성 항원추출 동종골(Autolyzed Antigen-extracted Allogeneic bone : AAA bone) 등과 같이 여러가지로 처리된 동종골 이식과, Kiel bone, Bopplant 등과 같은 이종골 이식, calcium hydroxyapatite, ceramic calcium phosphate, Plaster of Paris, porous carbone, porous polyethylene 같은 이물성형 재료 등 여러가지 생체재료들이 결손부위 재건에 사용되고 있다. 생체재료(biomaterial)란²⁾ 사고나 노화 또는 기타의 원인으로 인하여 정상적으로 기능을 다하지 못하는 신체의 일부분을 수복하기 위하여 만들어진 재료로서 안전하며, 생화학적으로 부작용이 없어야 한다. 18-19세기에 금속재료들이 생체재료로 사용된 이래 여러가지 합금이나 고분자 재료(polymer)

또는 생체요업재료(bioceramic) 등이 많이 사용되어 왔다³⁾. 특히 치과분야에서 많이 사용되는 생체재료로는 순수 titanium과 금속이나 치밀성의 수산화인회석(hydroxyapatite : HA)과 같은 요업재료(ceramic) 등으로 파괴된 치조골의 수복을 위하여 매식하거나 발거된 치아의 대체물로 사용되어 왔다.⁴⁻⁶⁾ 이들 생체재료 중 이종골은 숙주에 대한 적합성이 부족하고 골생성 체계를 공급하는데 비효율적이며, 무기물 등의 이물성형재료는 서서히 흡수되고 장기간의 사용에 대한 정보가 매우 적다. 최근에는 견고성의 부족으로 인하여 연속성이 상실된 부분적인 골 결손 부위나 하중을 받는 부위에서는 오랜 고정이 필요하다는 단점이 있으나 이식편 획득을 위한 부가적인 수술을 요하지 않으며 이로 인한 수술 시간의 단축, 빠른 골전도 과정, 만기 이식편 흡수의 잠재적 가능성 제거, 형태 형성의 용이성 같은 장점이 있는 탈회 동종골이 임상적으로 널리 사용되고 있다.

탈회 동종골의 임상적 사용에 있어서 가장 중요한 요소는 골유도 능력의 보존 여부 및 질병전이에 의한 감염의 방지에 있다. 탈회 동종골의 획득이나 탈회, 세척 등 모든 과정은 박테리아나 바이러스의 접촉이 없는 무균상태에서 실시되어야 한다. 그러나 이 과정을 적용하기는 매우 어려우며, 무균상태에서 골을 채취하여도 혈액이나 조직과 접촉하는 모든 용액들에 대하여 감염여부를 확인하여야 한다. 오염이 되었다고 생각하는 경우에는 merthiolate, formaldehyde, glutaraldehyde, alcohol, formalin, acetone 등의 멸균제를 이용하여 멸균을 시도하였으며, 최근에는 대표적으로 에틸렌 옥사이드 가스나 방사선 멸균법을 많이 이용한다. 멸균제의 종류와 농도 등에 의하여 이식재의 생체역학적, 생물학적 반응에 차이가 있으며, 매식체 자체 및 멸균제에서 유리되는 물질에 의하여 여러가지 독성반응이 관찰되고

있다.

이에 저자들은 방사선 조사 혹은 에틸렌 옥사이드 가스에 의해 멸균된 동종 탈회골 분말의 세포 독성 여부를 확인해 보기 위하여 succinate dehydrogenase 효소의 활성을 검색하는 Millipore filter test⁷⁾를 이용한 시험관내 섬유아세포에 대한 독성실험을 시행하여 의의있는 결과를 얻었기에 보고드리는 바이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) 동종 탈회골 분말 제조

특별한 감염증이 없는 체중 10kg의 정상 성견을 희생시켜 사후 12시간 이내에 채취한 장골(long bone)을 냉동고에 영하 70도 이하를 유지하며 저장하였다. 냉동되었던 성견의 장골들을 동결건조, 분쇄(480-640 micron) 후 90분간 0.5N HCl을 골조직 5g당 250ml를 사용하여 탈회 후 1,500rpm으로 원심분리시키고 상기의 과정을 3번 반복 시행하였다. 탈회시킨 골 분말을 phosphate buffer solution으로 산도를 6.9로 적정하였다. 재원심분리, 동결건조시킨 후 에틸렌옥사이드 가스멸균 혹은 15-25 kGy의 조사량으로 방사선 멸균을 시행하여 동종 탈회골 분말을 제작하였다.

2) 연구대상 세포

본 연구에 사용된 세포는 L929 정상생쥐 조섬유세포(ATCC, U.S.A.)로서 냉동보관된 L929 조섬유세포를 녹인 다음 10% horse serum(Gibco, U.S.A.) 및 penicillin(100unit/ml)과 streptomycin(100unit/ml) 그리고 fungizone(0.3ug/ml)이 들어있는 minimum essential medium(MEM) (Gibco, U.S.A.)으로 10회 계대배양한 후 실험에 사용하였다.

2. 연구 방법(Millipore 여과지 검사)

1) 검사방법

방사선 조사와 에틸렌 옥사이드로 멸균처리한 동결건조 탈회골이 생체조직에 대하여 독성이 있는지의 여부를 검사를 위하여 시편에서 유리되어 나오는 물질이 세포대사에 미치는 영

향을 검색하기 위하여 섬유아세포에 대한 succinate dehydrogenase(SDH)의 활성도에 미치는 영향을 검색하는 세포 독성검사인 Millipore filter test를 시행하였다.

대조군으로는 섬유아세포 세포군(L929)만을 배양하여 관찰하였고, 음성 비교군으로는 실리콘원판(직경 13mm×두께 1mm)을, 양성 비교군으로는 같은 크기의 구리원판을, 실험군으로는 방사선 조사와 에틸렌 옥사이드로 멸균처리한 동결건조 탈회골 분말을 섬유소 접착제를 이용하여 같은 크기의 원판을 만들어 시편 로 사용하였다.

Millipore 여과지 검사에는 검사군당 10개의 시편(직경 7mm×두께 1mm)을 검사하였다. 직경 60mm 세포배양용 플라스틱 배양접시(Nunc, Denmark)에 pore size 0.45um, 직경 47mm의 Millipore 여과지(Millipore, U.S.A.)를 넣은 후, 그 위에 9×10⁵개의 세포를 넣어 24시간 배양하였다. 세포배양에 사용한 배양액은 10% horse serum(Gibco, U.S.A.) 및 penicillin(100 unit/ml)과 streptomycin(10unit/ml) 그리고 fungizone(0.3ug/ml)이 첨가된 minimum essential medium(MEM) (Gibco, U.S.A.)이었다. 배양은 37도, 95% 습도, 5%의 이산화탄소 및 95%의 공기조건을 유지하는 세포배양기(Precision, U.S.A.)에서 세포배양하였다. 24시간 배양후 phosphate buffer 용액(PBS)으로 여과지를 세척하여 검사에 이용하였다. 직경 60mm의 배양접시에 1.5% bacto-agar(Gibco, U.S.A.)가 함유된 MEM의 agar 층을 만든 후 그 위에 세포가 있는 면을 agar 면에 접촉하게 하여 여과지를 깔고 다시 그 위에 시편을 올려 2시간 동안 배양을 하였다. 배양이 끝난 후 여과지를 succinate dehydrogenase 효소에 대한 세포화학적 염색⁸⁾을 시행하였다. 효소 염색처리가 끝난 여과지는 육안 및 광학현미경으로 효소 염색 정도를 관찰하였다.

2) 평가기준

시편하 및 시편 주위의 탈색정도를 육안으로 구별하고, 광학현미경상에서 여과지에 부착되어 있는 세포의 succinate dehydrogenase 효소 활성을 관찰하여 다음과 같은 Wenberg의 평

가기준을⁹⁾ 참고하였다.

반응지수 0 : 세포독성이 없음

여과지 상에서 시편이 있던 부위와 주위의 시편이 없는 부위가 succinate dehydrogenase 염색정도에 있어서 차이가 없는 경우

반응지수 1 : 경미한 세포독성

시편의 직경(7mm)보다 작은 범위에서 succinate dehydrogenase 염색정도가 감소되어 있거나 염색되지 않은 부위가 있는 경우

반응지수 2 : 중등도의 세포독성

succinate dehydrogenase 염색이 되지 않은 부위가 7-11mm 정도 있는 경우

반응지수 3 : 고도의 세포독성

succinate dehydrogenase 염색이 되지 않은 범위가 12mm 이상 있는 경우

III. 연구 성적

배양액과 혼합된 agar층 위에 세포를 부착한

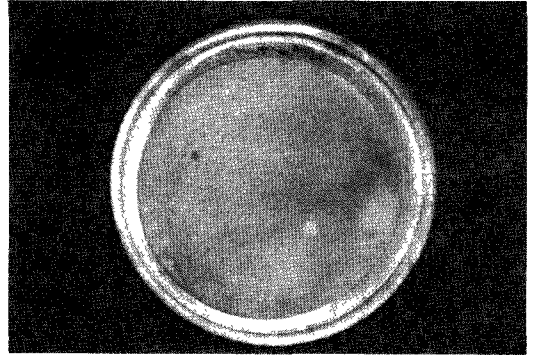


Fig. 3. 방사선 조사된 DBP를 시편으로 사용한 경우로서 시편 주위에 탈색 반응은 관찰되지 않는다.

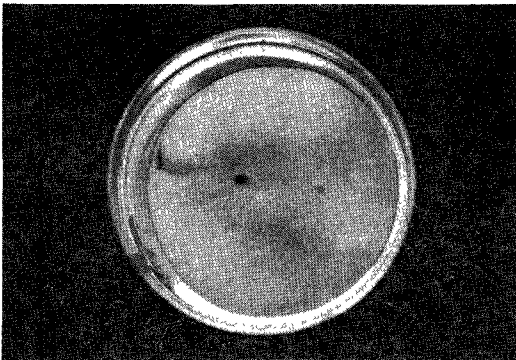


Fig. 1. Cell (control)만을 배양한 균으로 탈색 반응이 관찰되지 않는다.

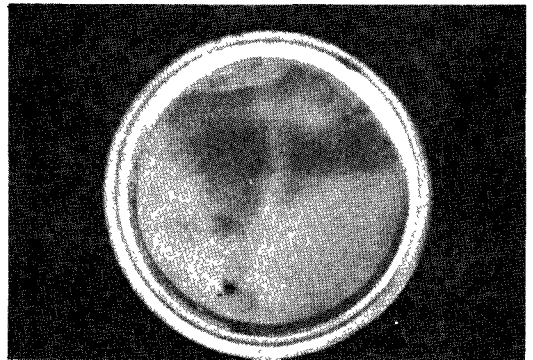


Fig. 4. Ethylene oxide gas로 멸균된 DBP를 시편으로 사용한 경우로 시편 주위에 탈색 반응은 관찰되지 않는다.

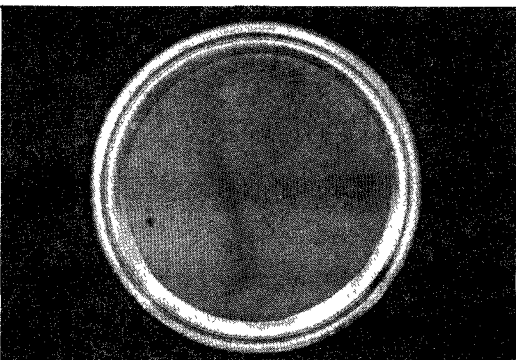


Fig. 2. Silicone(negative control)을 시편으로 사용한 경우 시편 주위에 탈색 반응은 관찰되지 않는다.



Fig. 5. 구리 원판을 시편으로 사용한 경우로 시편 주위로 10mm의 탈색반응이 관찰된다.

Table 1. Results of Millipore filter test

Group/Index	Response Index	Cytotoxicity
Control(Cell only)	0	Non-cytotoxic
Silicone*	0	Non-cytotoxic
radiation sterilized DBP	0	Non-cytotoxic
E.O. gas sterilized DBP	0	Non-cytotoxic
Copper #	2	Moderate-cytotoxic

* : negative control

: positive control

E.O. : ethylene oxide

DBP : demineralized bone powder

0 : succinate dehydrogenase 염색 정도에 있어서 차이가 없는 경우

2 : succinate dehydrogenase 염색이 되지 않은 부위가 7-11mm 정도 있는 경우

Millipore filter를 놓고 그 위에 검사할 시편을 올려놓아 succinate dehydrogenase의 활성을 검색하여 세포대사의 변화를 검사한 결과 방사선 조사 혹은 에틸렌 옥사이드 가스에 의해 멸균된 동종 탈회골 분말의 실험군(Fig. 3, Fig. 4)들은 시편을 올려놓지 않는 대조군(Fig. 1)과 실리콘을 사용한 음성 대조군(Fig. 2)의 염색도와 차이가 없는 결과를 보였으며, 구리를 사용한 양성 대조군(Fig. 5)에서는 직경 10mm의 염색이 안된 부위를 나타내어 중등도의 세포독성을 나타내었다(Table 1.)

IV. 총괄 및 고안

생체재료란 생체조직에 직접 접촉하는 재료들을 총칭할 수 있으며, 생체조직이란 신체내의 모든 장기 및 피부, 구강, 질강 등 외부와 접촉하는 부위 그리고 혈액 등을 포함한 보다 넓은 의미의 조직을 뜻한다⁸⁰⁾. 따라서 정상적으로 기능을 다하지 못하는 신체의 일부분을 수복하기 위한 여러가지 종류의 매식재료들도 생체재료에 속한다²⁾. 성공적인 매식재료의 평가 기준으로는 유해한 면역학적 반응을 유발하지 않아야 하고, 능동적 또는 수동적으로 숙주의 골 재생과정을 도울 수 있어야 하며, 수술부위에

가해지는 기계적 힘에 견딜 수 있고, 궁극적으로 완전히 흡수되면서 숙주의 골조직으로 치환되어야 한다.¹⁰⁾

따라서 매식재료로 환자에게 사용될 생체재료는 임상에 적용되기 전에 물리적, 기계적 성질 뿐만 아니라 생물학적인 적합성이 확립되어야 하며 이를 위해 많은 검사방법이 개발되어 왔다. 생체재료의 적합성 검사는 재료의 생물학적 안정성 평가와 용도에 따른 생물학적 기능검사로 나누어 시행되는데 국제치과연맹(Federation Dentaire International : FDI)¹¹⁾에서는 치과매식 재료의 생체적합성 검사를 위하여 단기 전신 독성검사(short term systemic toxicity test ; oral route), 급성 전신 독성검사(acute systemic toxicity test ; intravenous route), 용혈검사(hemolysis test), Ames의 돌연변이 검사(Ames' mutagenicity test), 시험관내 세포독성 검사(chromium release, Millipore filter, agar overlay test), 피하조직 자극검사(oral mucous membrane irritation test), 골내 매식 응용검사(bone implant usage test) 등을 권장하고 있다. 또한 Stanley(1985)¹²⁾, Mjor(1977)¹³⁾, Freshney(1987)¹⁴⁾, Hensen-Patterson(1988)¹⁵⁾, Tyas(1988)¹⁶⁾등도 치과 생체재료의 생물학적 평가를 위하여 다양한

방법을 보고한 바 있다.

이상과 같이 생체적합성 검사방법은 재료의 용도뿐만 아니라 연구자에 따라서 다양하게 보고되어 있으나 국제치과연맹에서는 생체재료의 생체적합성 검사를 위하여 권장한 상기의 검사방법을 모두 필수적으로 시행해야 하는 것은 아니라고 하였다. 이중 시험관내에서 세포배양에 의한 독성검사는 표준화되어 있어 평가에 객관성을 부여할 수 있으며, 비교적 간단하고 경제적이며 여러가지 실험에 영향을 미치는 조건들의 조절이 손쉽고, 나타난 결과의 산술적 평가가 가능하므로 많이 이용되고 있다^{15-17, 18)}. 치과재료의 세포독성을 파악하기 위한 평가방법으로 치과재료가 치수 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향을 관찰하거나¹⁹⁾ 세포수 산정²⁰⁻²²⁾, DNA 분석²³⁻²⁴⁾, 방사선 동위원소의 방출²⁵⁻²⁶⁾, 염색에 의한 세포막의 투과도 변화 측정법^{27-29, 25)}, 사립체 효소의 세포화학적 염색법^{9, 18, 25)}, 세포질내 효소의 양적 측정법³⁰⁾, 컴퓨터에 의한 측정법³¹⁾ 등이 단독 혹은 복합적으로 사용되고 있다. 세포독성 검사에 있어서 배양세포와 실험재료 사이의 충분한 접촉이 매우 중요한 요소로서 시편과 세포를 집적 접촉시키거나 시편과 세포사이에 투과성의 중간매체를 넣어 간접적으로 접촉시키는 방법이 사용되고 있다. 중간매체로 agar를 사용하거나²⁹⁾ Millipore 여과지로 분리시키거나⁹⁾ 또한 치과충전 재료를 검사하는 방법으로 신체와 유사한 조건을 주기 위하여 상어질편을 사용하는 방법³²⁾ 등이 사용되고 있다. 본 실험에서는 Millipore 여과지를 사용하여 분리시킨 세포의 사립체 효소반응으로 세포의 대사변화를 관찰하였다.

최근 임상에서 많이 사용되고 있는 동종골 이식시 이식편을 통한 질병 전이의 가능성을 없애기 위한 방법으로 이식편에 대해 멸균을 시행한다. 이를 위해 다양한 멸균법이 사용되고 있고, 화학적인 멸균제인 alcohol³³⁾, acetone³⁴⁾, formalin³⁵⁾, beta propiolactone³⁶⁾ 등의 사용이 기술되었다. 그러나 이들은 멸균제로서 두 가지 단점이 있는데, 첫째는 이들 화학물질이 고농도로 체내에 전이된다면 인체에서 독성반응을 유발한다는 것이다. 예로 beta propiolactone은

암유발인자로 보고되었다³⁷⁾. 화학멸균제의 독성은 처리된 이식편이 매식전에 철저히 세척된다면 문제되지 않는다. 둘째는 화학물질의 조직관통력이 적기 때문에 단지 표면소독제로 사용된다는 것이다. 피질골 같은 이식편이 살균제에 노출되도록 여러 표면으로 절단된다면, 이들 화학물질은 대부분의 이식편을 멸균시킬 것이다. 따라서 다수의 표면을 갖는 골이식(cancellous chip)에 유용하다. thiomersal(Merthiolate : 0.01-0.02%)은 진균제이며 생물학적 제재의 보존제인데, 1982년 Russel³⁸⁾은 포자에 대해서는 효과가 없다고 보고하였다. 따라서 완전한 멸균을 제공하지 못하므로 임상적 사용을 추천하지 않는다.

glutaraldehyde와 formaldehyde는 alkylant로서 1973년 Tuli³⁹⁾와 1982년 Russel³⁸⁾은 두 멸균제가 모두 탈회골의 골유도 능력을 파괴한다고 보고하였다. glutaraldehyde로 처리된 골 이식재료는 흡수, 골유도, 칼슘 침착 등의 반응이 나타나지 않고 매식전과 동일한 육안적 양상을 보였다고 하였다.

조직이식에 효과적인 살균제는 ethylene oxide로서 약제의 살균능력은 1949년 Philips와 Kaye⁴⁰⁾, 1974년 Robert 등에 의해 확인되었으며, 세균과 바이러스를 파괴하기 때문에⁴¹⁾ 의료기구의 소독에 수년간 사용하였다³⁷⁾. Cloward⁴²⁾가 1980년 조직이식(비탈회골)의 멸균에 ethylene oxide로 멸균한 연골과 골조직의 성공적인 임상적 사용에 대해 보고하였다. 가장 심도있는 연구는 Prolo에 의해 이루어졌는데 치밀 비탈회 피질골에 대한 효과 및 ethylene oxide를 이용한 멸균방법과 다른 방법을 비교하여 ethylene oxide를 이용한 멸균방법이 가장 적절하며 매식체의 골형성 능력을 변화시킨다고 보고하였다⁴⁴⁾. 1967년 Dubuc와 Urist⁴⁵⁾, 1985년 Sato와 Urist⁴⁶⁾는 탈회골과 골형성 단백질(Bone Morphogenetic Protein : BMP)을 포함한 단백질 추출물에 ethylene oxide gas의 사용을 보고하였다.

ethylene oxide의 사용이 반대되는 이유로 첫째는 멸균 후 ethylene chlorohydrin, ethylene glycol, ethylene oxide의 반응물질이 조

직내에 잔존하여 매식 후 인체내에서 염증이나 알레르기 반응을 유발할 수 있기 때문이다. 멸균 후 충분한 통기(aeration)가 조직내의 부산물의 수준을 감소시킨다. 비록, 이 화학물질에 멸균된 골조직의 매식 후 부작용이 보고되지는 않았으나 Jackson⁴⁷⁾ 등은 anterior cruciate ligament 파열 부위에 에틸렌 옥사이드로 멸균된 동종 건-골 조직(patellar tendon-bone allograft)을 이식한 환자의 5%에서 지속적인 활막 자극의 존재를 관찰하였으며, 에틸렌 옥사이드로 멸균된 연조직 이식편을 제거함으로써 활막자극 반응을 해결하였다고 보고하였다. 두번째는 장기간 혹은 간헐적인 노출에 의한 악성종양 발생 위험성 증가와^{48, 49)} 임신부에서 높은 빈도의 자연유산⁵⁰⁾ 등 심각한 부작용이 보고되고 있다. 셋째는 대퇴골 골체부 같은 광범위한 피질골 동종이식체의 이상적인 멸균제는 못된다는 것이다. Prolo⁴⁴⁾ 등은 ethylene oxide 가스가 두꺼운 피질골을 가로 지르면서 농도경사가 감소함을 관찰한 후 광범위한 골 이식체의 골수강과 골내막면의 멸균제로는 신뢰할 수 없다고 보고하였다. 넷째는 에틸렌 옥사이드가 DNA와 RNA의 purine과 pyrimidine base에 존재하는 nucleophilic N-group의 alkylation에 작용하여 골유도에 관여하는 단백질을 변화시켜 탈회골의 골유도 능력을 파괴시키기 때문이다. 이러한 단점으로 인해 다른 멸균방법으로 대체되고 있다.

방사선 조사법은 1950년대 중반 이후 골과 조직 동종이식의 멸균방법으로 널리 이용되어 왔는데⁵¹⁻⁶¹⁾ 다른 멸균방법과 비교하여 몇 가지 장점이 있다. 첫째는 경제적이며, 사용이 용이하다는 점이다. 둘째는 방사선 멸균법이 높은 조직 투과력을 소유한다는 것이다. 이 특징은 표면소독만을 허용하는 다른 멸균방법과 비교할 때 가장 우수한 장점이 된다. 이식체는 방사선 멸균이 시작되기 전에 불투과성 용기내에 미리 포장, 밀봉되고 방사선 멸균이 종결된 후 재포장할 필요가 없어 조직의 멸균상태를 유지할 수 있다. 그럼에도 불구하고 방사선 조사의 방법은 몇몇 단점들이 존재한다. 이 중 하나는 방사선 조사의 과정 중에서 조직내에 자유기

(free radical)가 생성된다는 것이다. 방사선 조사는 핵 분자의 입자와 직접 충돌하여 세포와 박테리아에 치명적이며, 이온화된 입자가 조직내에 존재하는 결합된 물분자를 분할하여 박테리아와 세포에 치명적인 수소와 hydroxyl free radical을 형성한다(Turner, 1956)⁶¹⁾. 1963년 Cook⁶²⁾은 냉동건조된 조직 멸균시 결합된 물분자를 유리시키기 위하여 많은 조사량이 필요하다고 보고하였다. Slager와 Zucker⁶³⁾, Komender 등⁶⁴⁾, Ostrowski와 동료들⁶⁵⁾은 Cobalt 60의 감마선은 유기질과 교원질의 단계에서 단기간 존재하며, 공기중에 노출시 사라지는 자유기와 상당히 장기간 동안 존재하는 자유기가 발생됨을 확인 보고하였다. 골조직내에서의 자유기의 효과에 대하여 알려진 것은 없다. 석회화조직에서 자유기가 돌연변이의 유발을 암시하는 증거가 없으며, 인체에서 방사선 조사된 골 이식체의 사용에도 불구하고, 매식 후 악성종양이 유발되었다는 보고는 없다.^{51-54, 56, 59, 61)}. 1967년 Buring과 Urist⁶⁶⁾, 1975년 Urist와 Mikulski⁶⁷⁾의 소견과는 반대로 Munting⁶⁸⁾ 등은 2.5Mrad(25kGy)로 방사선 조사된 골기질이 골유도 능력을 보유한다고 하였고, 1981년 Glowacki⁶⁹⁾도 유사한 결과를 보고하였다. 1970년 Buring⁷⁰⁾은 25kGy 이상의 감마 방사선조사는 교원질과 glycosaminoglycan의 용해도를 증가시키고 기질의 섬유성 계통을 파괴시켜 흡수를 촉진하고 적은 양의 골을 형성한다고 보고하였다. 선학들은 방사선 조사가 냉동골 동종이식체의 치유 잠재력에 적게나마 영향을 미치며, 이식체의 매식 후 형성되는 골의 양을 감소시킨다고 보고하였다⁷²⁾. 1974년 Urist와 Hernandez⁷¹⁾는 50kGy 방사선 조사가 골유도 반응을 파괴하고 90-100% 유도능력이 소실된다고 보고하였으며, 25kGy 이하의 방사선 조사량도 골유도 능력을 감소시킨다고 주장하였다. 무기성분 존재하에서 골조직이 방사선 조사되었을 때 유도단백질로서 세포의 기질이 손상되고 20 kGy의 적은 조사량이 골유도 기전에 제거하는데 충분하며, 탈회 후 멸균이 시행되었다면, bone gelatin의 유도능력은 20%까지 감소된다고 보고하였다. 결론적으로 방사선 조사된 조

적은 매식에 안전하지만 골치이에 있어서 자유기의 효과는 아직 알려져 있지않다.

방사선 조사의 잠재적인 단점은 많은 조사량의 부작용에 관련된 것이다. 방사선의 적절한 사용은 조직 이식체를 오염시키는 미생물의 수와 형태의 정확한 결정에 기초한다. 미생물이 포자형성종 같이 방사선 극히 저항성이 있거나, 이식편에 다량의 오염 미생물이 존재한다면, 미생물을 멸균할 수 있을 정도로 과량의 방사선 조사량이 필요하다. 투여되는 방사선 조사량이 많으면 많을수록, 더 많은 부작용이 조직내에서 발생한다. 30kGy 이상의 방사선 조사시 torsional & bending strength를 포함하는 생체역학적 특성이 영향을 받는다⁷³⁾. 초기에 냉동건조된 골조직이 방사선 조사를 받는다면 효과는 더 악화될 것이다⁷⁴⁾. Buring과 Urist⁶⁶⁾는 과다한 방사선 조사량은 매식 후 신생골 유도를 감소시킨다고 보고하였다.

미생물을 멸균함에 있어서 다량의 방사선 조사는 불필요하다^{75-76, 60)}. 대부분 이식체는 적은 수의 미생물을 소유하고 있으며 미생물의 대부분은 방사선 조사에 민감하기 때문에⁷⁷⁾ 적은 양의 방사선 조사로도 미생물의 멸균 상태를 성취할 수 있어서 20kGy의 방사선을 조사하고 있다. 1988년 Munting⁶⁸⁾ 등은 탈회된 백서 골조직을 5가지 멸균방법을 사용하여 골유도에 대한 효과를 dry weight, 칼슘함량, 유도된 골조직의 Sr-85 함입을 이용하여 평가하였다. glutaraldehyde gas, formaldehyde gas, ethylene oxide gas는 골유도 능력을 파괴하고, 25 kGy Co-60에 의한 방사선 조사는 약 1/2 정도의 유도능력 소실을 초래하고, Merthiolate(0.18%)만이 탈회 매식체의 골유도 능력을 감소시키지 않으나 포자를 멸균하지 못함으로 임상적 사용에는 감마 방사선 조사가 가장 적절하다고 보고하였다.

1993년 임⁷⁸⁻⁷⁹⁾ 등은 한국생체재료 연구소에서 동종탈회골을 제작, 방사선 멸균(15-25kGy)한 후 생체 조직에 대하여 독성이 있는지의 여부를 알아보기 위하여 시편에서 유리되어 나온 물질이 세포막 투과성과 세포용해에 미치는 영향을 조사하는 섬유아세포에 대한 독성검사인

시험관내 agar overlay test를 시행하였다. 실리콘 원판균과 에틸렌 옥사이드균 가스멸균을 시행한 탈회골 원판의 경우는 대조균과 마찬가지로 세포의 탈색 및 용해현상이 관찰되지 않았으며, 구리 원판균의 경우 세포탈색 지수는 3, 세포용해 지수는 5로서 매우 심한 독성이 있는 것을 관찰하였다. 방사선 멸균시킨 탈회골 원판균의 경우 세포의 용해현상은 전혀 관찰되지 않았으나 세포탈색 지수는 1로서 극히 미약한 반응을 관찰한 후 보고하였다.

본 연구에서는 succinate dehydrogenase 효소의 활성을 검색하는 Millipore filter test를 시행하여 에틸렌 옥사이드 가스로 멸균한 균과 방사선 조사를 시행한 실험군에서 시편을 올려놓지 않은 대조균과 실리콘을 사용한 음성 대조균의 염색도와 차이가 없는 것으로 보아 두 균 모두 독성이 없는 것으로 사료되며 구리를 사용한 양성 대조균에서는 직경 10mm의 염색 안된 부위를 나타내어 중등도의 세포독성을 나타내었다.

이상의 연구결과로 미루어 보아 두 멸균방법 모두 임상에 적용이 가능한 것으로 사료된다. 향후 세포독성이 없으며 골유도 능력을 보존하는 최선의 방법을 결정하기 위해서는 생체 재료의 생체적합성 연구에 있어 시험관내 실험에 이어 이차실험으로 권장되는 생체실험을 시행하여 비교 평가함이 필요하다.

V. 결 론

탈회 동종골의 임상적 사용에 있어서 가장 중요한 요소는 골유도 능력의 보존여부 및 질병 전이에 의한 감염의 방지에 있다. 동종골의 채취나 탈회, 세척 등 모든 과정은 박테리아나 바이러스의 접촉이 없는 무균상태에서 실시되어야 한다. 그러나 이 과정을 실행하기는 매우 어려우며, 무균상태에서 골을 채취하여도 혈액이나 조직과 접촉하는 모든 용액들에 대하여 감염여부를 확인하여야 한다. 오염이 되었다고 생각하는 경우 최근에는 대표적으로 에틸렌 옥사이드 가스와 방사선 조사를 많이 사용한다. 멸균제의 종류와 농도 등에 의하여 이식재의

생체역학적, 생물학적 반응에 차이가 있으며, 매식체 자체 및 멸균제에서 유리되는 물질에 의하여 여러가지 독성반응이 관찰되고 있다.

저자들은 방사선 조사 혹은 에틸렌 옥사이드 가스에 의해 멸균된 탈회동종골 분말의 세포 독성 여부를 확인해 보기 위하여 섬유아세포에 대한 succinate dehydrogenase 효소의 활성도에 미치는 영향을 검색하는 세포 독성실험인 Millipore filter test를 시행하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 양성 대조군인 구리원판 주위에서는 직경 10mm의 탈색상태가 관찰되었다.
2. 에틸렌 옥사이드 가스 멸균 및 20kGy의 방사선 조사 멸균을 시행한 탈회골 원판 주위에서의 탈색상태는 음성대조군과 마찬가지로 관찰되지 않았다.
3. 에틸렌 옥사이드 가스 멸균 및 방사선 조사 멸균을 시행한 동종탈회골 분말은 세포 독성이 나타나지 않았다.
4. 이상의 결론으로 미루어 에틸렌 옥사이드 멸균법과 방사선 멸균법은 동종탈회골의 멸균시 효과적인 방법으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Narang R., Laskin D.M. : Experimental osteogenesis at fracture sites and gaps. *J Oral Surgery* Vol 34, 3, 1976.
2. Hench L.L. : *Biomaterials*. Science. 208 : 826-831, 1980.
3. Hench L.L. : *Bomaterials* : From concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.*, 74(7) : 1487-1510, 1991.
4. Beirne O.R., Greenspan J.S. : Histologic evaluation of tissue response to hydroxyapatite implanted on human mandibles. *J. Dent. Res.*, 64 : 1152-1154, 1985.
5. Lake D. : Clinical applicatios of biomaterials in maxillofacial, plstic and reconstructive surgery. In "Biomaterial and Clinical Applications" Elsevier Science Publica-

- tion, 35-42, 1987.
6. Morimoto K., Kihara A., Takeshita E., et al. : An experimental study on the tissue compatibility of the titanium blade-vent implant coated with HAP-Alumina in the semifunctional state. *J Oral Implant.*, 3 : 387-401, 1987.
7. 김종여, 고재승, 황성명 : 세포배양 및 피하조직 매식에 의한 수산화인회석과 생체활성 유리의 생체 적합성에 관한 연구. *서울치대논문집*, 16(1) 통권 25, 1992.
8. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T.H. : In "Enzyme histochemistry. A laboratory manual", 258-260, Springer-Verlage, 1979.
9. Wenberg A. : In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials the Millipore filter method., *Int. Endo. J.*, 21 : 67-71, 1988.
10. Kruger G.O. : Tissue transplantation in *Textbook of oral and maxillofacial surgery*, 6th edi., The Mosby Company, St.Louis, PP.296-332, 1984.
11. Federation Dentaire International : Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int. Dent. J.*, 30 : 140-188, 1980.
12. Stanley H.R. : Toxicity testing of dental materials, CRC Press, 1-155, 1985.
13. Mjor I., Hensten-Patterson A., Skogedal O. : Biologic evaluation of filling materials. A Comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulp studies. *Int. Dent. J.*, 27 : 125-129, 1977.
14. Freshney R.L. : *Culture of animal cells*. Alan R. Liss, Inc. 99-215, 1987.
15. Hensten-Patterson a. : Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int. Endo. J.*, 21 : 89-99, 1988.
16. Tyas M.J. : Quantitative enzyme cytochemistry in the in vitro biocompatibility testing of dental materials. *Int. Endo. J.*, 21 :

- 106–112, 1988.
17. Brown R.M. : The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials-does it have a role ? *Int. Endo. J.*, 21 : 50–58, 1988.
 18. Murphy W.M. : The testing of endodontic materials in vitro. *Int. Endo. J.*, 21 : 171–177, 1988.
 19. Das S. : Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral Surg.*, 52 : 76–84, 1981.
 20. Nakamura H., Sasakibara F., Mastsumoto Y., et al. : Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. *J Endodont*, 12 : 156–160, 1988.
 21. Kawahara H., Nakamara M. : Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int. Dent. J.*, 18 : 443–467, 1968.
 22. Kawahara H., Nakamura M., Yamagami A., et al. : Cellular responses to dental amalgam in vitro. *J Dent Res* 54 : 394–401, 1975.
 23. Kettring J.D., Torabinejad M. : Cytotoxicity of root canal sealers : A study using HeLa cells and fibroblasts. *Int Endo J*, 17 : 60–66, 1984.
 24. Leirskar J., Helgeland K. : A methodologic study of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. *Scand. J. Dent. Res.*, 80 : 120–133, 1972.
 25. Hensten-Patterson A., Helgeland K. : Evaluation of biologic effects dental materials using four different cell culture techniques. *Scand J Dent Res*, 85 : 291–296, 1977.
 26. Spangberg L.S.W., Al-Nazahn S.A. : The radiochromium release method for evaluation of cytotoxicity in vitro. *Int. Endo. J.*, 21 : 72–78, 1988.
 27. Autian J. : The use of rabbit implants and tissue culture tests for the evaluation of dental materials. *Int Dent J*, 20 : 481–490, 1970.
 28. Schmalz G. : Agar overlay method. *Int Endo J*, 21 : 59–66, 1988.
 29. Mohammad A.R., Mincer H.H., Younis O., et al. : Cytotoxicity evaluation of root canal sealers by the tissue culture-agar overlay technique. *Oral Surg.*, 45(5) : 768–773, 1978.
 30. Meryon S.D. : Quantitative enzyme spectroscopy in the assessment of cell damage in vitro. *Int Endo J* 21 : 113–119, 1988.
 31. Kawahara H., Imai K., Kawahara D. : Photo-pattern analysis and computation in the evaluation of the cytotoxicity of dental materials in vitro. *Int Endo J* 21 : 100–105, 1988.
 32. Hume W.r. : Methods of assessment in vitro of restorative material cytotoxicity using an intact human dentine diffusion step. *Int Endo J*, 21 : 85–89, 1988.
 33. Senn N. : On healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci* 98 : 219–243, 1989.
 34. Sabanas A.O. : Comparison of homologous bone grafts preserved by acetone and by freezing : Experimental and bacteriologic studies. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 30 : 422–430.
 35. Lavrishcheva G.I. : Transplantation of tissues preserved in formaldehyde solutions. *Acta Chir Plast* 23 : 1–7, 1981.
 36. Logrippo G.A., Burgess B., Rosario T., et al : Procedure for bone sterilization with beta-propiolactone. *J Bone Joint Surg [Am]* 39A : 1356–1364, 1957.
 37. Philips C.R. : Gaseous sterilization. In : *Disinfection, sterilization and preservation (Second. Edition)*, SS Block, ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 592–610, 1977.

38. Russel A.D. : Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Blackwell Sc. Oxford, 653, 1982.
39. Tuli J.J. : Formaldehyde gas as a sterilizant. In : Industrial sterilization (Eds. Phillips, G.B. Miller, W.S.). Duke, Durham, 209–238, 1973.
40. Philips C.R., Kaye S. : The sterilizing action of gaseous ethylene oxide. *Am. J. Hyg.* 50 : 270, 1949.
41. Rusel A.D. : Resistance of bacterial spores to heat disinfectants, gases and radiation. *Mfg Chemist Aerosol News* 36 : 38–45, 1965.
42. Cloward R.B. : Gas-sterilized cadaver bone grafts for spinal fusion operations. *Spine* 5 : 4–10, 1980.
43. Snyder C.C., Warlaw E., Kelly N. : Gas sterilization of cartilage and bone implants. *Plast Reconstr Surg* 28 : 568–572, 1961.
44. Prolo D.J., Pedrotti P.W., White D.h. : Ethylene oxide sterilization of bone, duramater and fascia lata for human transplantation. *Neurosurgery* 6 : 529–539, 1980.
45. Dubuc F.L., Urist M.R. : The accessibility of the bone induction principle in surface decalcified bone implants. *Clin orthop*, 55 : 217–223, 1967.
46. Sato K., Urist M.R. : Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin Orthop* 197 : 301–311, 1985.
47. Jackson D.W., Windler G.E., Simon T.E. : Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene oxide-sterilized bone-patellar tendon bone allografts in the reconstruction of the anterior cruuciate ligament. *Am J Sports Med* 18 : 1–11, 1990.
48. Hogstedt C., Aringer L., Gustavsson A. : Epidemiologic support for ethylene oxide as a cancer-causing agent. *JAMA* 255 : 1575–1578, 1986.
49. Kolman A., Naslund M., Calleman C.J. : Genotoxic effects of ehtylene oxide and their relevance to human cancer. *Carcinogenesis* 7 : 1245–1250, 1986.
50. Hemminki K., Mutanen P., Niemi M.L. : Spontaneous abortions in hospital sterilizing staff. *Br Med J* 286 : 1976–1977, 1983.
51. Bassett C.A.L., Hudgins T.F. Jr., Trump J.G., et al : The clinical use of cathode ray sterilized grafts of cadaver bones. *Surg Forum* 6 : 549–553, 1956.
52. Bassett C.A.L., Packard A.G. Jr. : A clincal assay of cathode ray sterilized cadaver bone grafts. *Acta Orthop Scand* 28 : 198–211, 1959.
53. Cohen J. : Cathode ray sterilization of hone grafts. *Arch Surg* 72 : 784–789, 1955.
54. Devries P.H., Badgley C.E., Hartman T. : Radiation sterilization of homogenous-bone transplants utilizing radiocative cobalt. *J Bone Joint Surg [Am]* 40A : 187–202, 1958.
55. Devries P.H., Brinker W.O., Kempe L. : Utilization of radiozctive cobalt in the sterilization of homgenous bone transplants. *Surg Forum* 6 : 546–549, 1956.
56. Marmor L. : Irradiated bone grafts. *Am J Surg* 107 : 833–836, 1964.
57. Meeker I.A. Jr., Gross R.E. : Low temperature sterilization of organic tissue by high-voltage cathode ray irradiation. *Science* 114 : 28–287, 1951.
58. Meeker I.A. Jr., Gross R.E. : Sterilization of frozen arterial grafts by high-voltage cathode ray irradiation. *Surgery* 30 : 19–28, 1951.
59. Swanson A.B., Glessner J.R., Burkduck H. W., et al : Seven years experience with

- irradiated bone graft material. *Surg Gynecol Obstet* 106 : 573-577, 1963.
60. Trump J.G., Van de Graaff R.J. : Irradiation of biological materials by high energy roentgen and cathode rays. *J Appl Phys* 19 : 599-604.
 61. Turner T.C., Bassett C.A.L., Pate J.W., et al : Sterilization of preserved bone grafts by high voltage cathode irradiation. *J Bone Joint Surg [Am]* 38A : 862-884, 1956.
 62. Cook A.M., Roberts T.A., Widdowson J.P. : Freeze drying and radiation protection. *Nature* 199 : 194-195, 1963.
 63. Slager U.T., Zucker M.J. : The occurrence of electron spin resonance signals in bone grafts sterilized with high voltage electron beams, *Transplant Bull* 30 : 146-147, 1962.
 64. Komender J., Komender A., Dziedzic-Goclawska A., et al : Radiation sterilized bone grafts evaluated by electron spin resonance technique and mechanical test. *Trans Proc* 8(Suppl 1) : 25-37, 1976.
 65. Ostrowski K. : Current problems of tissue banking. *Trans Proc* 1 : 126-131, 1968.
 66. Buring K., Urist M.R. : Effects of ionizing radiation of the bone induction principle in the matrix of bone implants. *Clin Orthop* 55 : 225-234, 1967.
 67. Urist M.R., Mikulsi A., Boyd S.D. : A chemosterilized antigen extracted autografted alloimplant for bone banks. *Arch Surg*, 100 : 416-428, 1975.
 68. Munting.E., Wilmart.J.F., Wijne.A., et al. : Effect of sterilization on osteoinduction ; comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta. Orthop. Scand.* 34 : 38, 59 : (1), 1988.
 69. Glowacki J. Kabn L.B., Murray J.E., et al. : Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. *Lancet*, May : 1(8227)959-62, 1981.
 70. Buring K. : Ionizing radiation for sterilization of bone. In : Sterilization and preservation of biological tissues by ionizing radiation. International Atomic Energy Agency. Panel on radiation sterilization of biological tissues for transplantation. Vienna, 71-8, 1970.
 71. Urist M.R., Hernandez A. : Excitation transfer in bone : Deleterious effects of Cobalt 60 radiation sterilization of bank bone. *Arch Surg* 109 : 486-493, 1974.
 72. Cleaton-Jones P.E., Retief D.H., Maier G. : The effect of frozen irradiated bone homografts on the healing of defects in the mandible and femur of the rat. *J Bone Joint Surg [Br]* 53B : 532-540, 1971.
 73. Pelker R.R., Fridelzender G.E. : Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthop Clin North Am* 18 : 235-239, 1987.
 74. Komender A. : Influence of preservation on some mechanical properties of human haversian bone. *Mater Med Pol* 8 : 13-17, 1976.
 75. Darmaday E.M., Hughes K.E.A., Burt M. M., et al : Radiation sterilization. *J Clin Pathol* 14 : 55-58, 1961.
 76. Silverman G.F., Sinskey A.J. : Sterilization by ionizing irradiation. In : Disinfection, sterilization and preservation(Second Edition), SS Block, ed., Philadelphia, Lea and Febiger, 542-561, 1977.
 77. Doppelt S.H., Tomford W.W., Lucas A., et al : Operational and financial aspects of a hospital bone bank. *J. Bone Joint Surg [Am]* 63A : 1472-1481, 1981.
 78. 임창준, 허성주, 김세원, 김정근, 김종여 : 타이타늄 매식체와 수종의 골이식 재료와의 조직반응 및 적합성에 관한 실험적 연구. *대한치과 의사 협회지* : 32, 4, 1994.
 79. Yim C-J. Kim S-W. : In-vitro toxicity test

of the demineralized freeze-dried bone powder(DFBP). Proceedings of 17th Annual Meeting America Association of Tissue Banks, Boston, Abst. S-37, October 22

- 25, 1993.

80. 서활 : 생체재료학 입문, 지성출판사, 1993.