

# 가토에서 자가유래 골아줄기세포를 이용한 상악동 골 이식술시 비계체로서 Bio-Oss®의 효과에 관한 연구

이 준 · 성대혁 · 최재영 · 최성림 · 차수련 · 장재덕<sup>1</sup> · 김은철<sup>2</sup>

원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, <sup>1</sup>세원 셀론텍 RMS-Bio Net,

<sup>2</sup>원광대학교 치과대학 구강악안면병리학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:405-418)

## THE EFFECTS OF BIO-OSS® AS A SCAFFOLDS DURING SINUS BONE GRAFT USING MESENCHYMAL STEM CELLS IN RABBIT

Jun Lee, Dae-Hyuk Sung, Jae-Young Choi, Sung-Rym Choi,

Su-Ryun Cha, Jae-Deog Jang<sup>1</sup>, Eun-Chul Kim<sup>2</sup>

*Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Wonkwang University*

*<sup>1</sup>RMS-BioNet, Sewon Cellontech Co. Ltd.*

*<sup>2</sup>Dept. of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Wonkwang University*

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been thought to be multipotent cells that can replicate that have the potential to differentiate into lineages of mesenchymal tissue including the bone, cartilage, fat, tendon, muscle, and marrow stroma. Especially, scaffolds to support cell-based tissue engineering are critical determinants of clinical efforts to regenerate and repair the body. Selection of a matrix carrier involves consideration of the matrix's role as a scaffold for physical support and host tissue integration as well as its ability to support or synergize the osteoinductive program of the implanted mesenchymal stem cell. The aim of this study is to evaluate the effect of autobone and Bio-Oss® to adhere mesenchymal stem cells as scaffolds on sinus augmentation with fibrin glue mixture in a rabbit model.

16 New Zealand White rabbits were divided randomly into 4 groups based on their time of sacrifice (1, 2, 4 and 8 weeks). First, mesenchymal stem cells were isolated from iliac crest marrow of rabbits and expanded *in vitro*. Cell culture was performed in accordance with the technique described by Tsutsumi et al.

In the present study, the animals were sacrificed at 1, 2, 4 and 8 weeks after transplantation, and the bone formation ability of each sides was evaluated clinically, radiologically, histologically and histomorphologically. According to the histological observations, autobone scaffolds group showed integrated graft bone with host bone from sinus wall. At 2 and 4 weeks, it showed active newly formed bone and neovascularization. At 8 weeks, lamellae bone was observed in sinus graft material area. Radiologically, autobone with stem cell showed more radiopaque than Bio-Oss® scaffolds group. there were significant differences in bone volume between 4 and 8 weeks ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** Mesenchymal stem cells (MSCs), Autobone scaffolds, Bio-Oss® scaffolds, Sinus floor elevation, Tissue engineering, Fibrin glue

### I. 서 론

조직 공학 (tissue engineering)이란 생체에서 채취한 특정 세포를 일련의 배양과정을 통하여 증식시킨 후 이들 세포의 활동

#### 김 은 철

570-749 전북 익산시 신용동 344-2

원광대학교 치과대학 구강악안면병리학교실

#### Eun-Cheol Kim

Dept. of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Wonkwang Univ.

344-2, Shinyong-dong, Iksan, Chonbuk, 570-749, South Korea

Tel: 82-63-850-6929 Fax: 82-653-850-6858

E-mail: eckwkop@wonkwang.ac.kr

을 촉진시키는 성장인자 (signalling molecules, BMP 등)와 세포의 성장을 보존시킬 수 있는 비계체 (scaffolds)를 인위적으로 제작하여 이를 통하여 새로운 조직을 형성하는 과정이다<sup>1)</sup>. 최근 이러한 조직 공학의 발달과 더불어 인체 내 미분화 간엽 줄기세포를 골모세포로 분화시켜 이를 적절한 비계체와 함께 투여 혹은 이식함으로써 골의 재생능력을 높이고 골이식의 성공률을 향상 시키는 방법이 활발하게 연구되고 있다<sup>2,3)</sup>. Lee 등<sup>4)</sup>은 자가 유래 간엽 줄기세포를 calcium metaphosphate와 함께 피하에 이식하였을 때 피하에서 층판골이 형성되었다고 보고하였고, Ohya 등<sup>5)</sup>은 상악동에 자가골과 자가유래 간엽 줄기세포를

※ 이 논문은 2006년도 원광대학교 연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

각각 혈소판 농축혈장과 혼합하여 이식하고 골 형성량을 비교하였을 때 술 후 8 주에서 자가골 군과 비슷하였고, 자가유래 간엽 줄기세포로 이식한 곳에서도 약 20 % 정도의 골 형성이 있었다고 보고하였다.

이러한 자가유래 간엽 줄기세포의 골 형성능은 함께 투여되는 세포, 신호분자의 유무와 종류, 그리고 비계체의 종류에 따라 크게 결과가 달라질 수 있다. 신호분자 즉, 성장인자는 기존의 골 이식술에서 골화 촉진과 골 이식체의 활성을 위하여 사용되었는데, 이러한 인자들이 자가유래 간엽 줄기세포의 생장과 골에 대한 효과에서도 상승작용을 하고 있는 것으로 보고되고 있다<sup>7</sup>. Tsutsumi 등<sup>8</sup>은 섬유모세포 성장인자가 자가유래 간엽 줄기세포의 자가 복제에 많은 영향을 주는 것으로 보고하였으며, Martin 등<sup>9</sup>은 자가유래 간엽 줄기세포 배양시 fibroblast growth factor-2를 추가로 제공했을 때 골모세포로 분화가 촉진되었다고 보고하였는데, 이때 BMP-2는 세포의 신호조절 운동경로, fibroblast growth factor-2는 mitogen-activated protein kinase의 조절을 통해 골모세포 분화를 촉진함으로써 골 형성을 촉진한다고 보고하였다. 또한 Ueda 등<sup>10</sup>은 혈소판 농축혈장과 간엽 줄기세포를 이식한 군에서 높은 골 형성을 보고하였는데 혈소판 농축혈장이 간엽 줄기세포의 골 형성을 유도하고, 혈관화를 촉진시키는 역할을 한다고 하였다. 이런 여러 성장인자의 골 형성 효과는 간엽 줄기세포의 증식에도 영향을 주지만, 분화에 주로 영향을 주어 골모세포 형성을 촉진시키는 것이다.

일반적으로 비계체는 생체 적합성 (biocompatibility)이 있어, 이식되었을 때 생체 내에서 쉽게 생착 되어야 하며, 기계적으로 튼튼하여 골격 구조를 오랫동안 유지할 수 있어야 하고 (stability), 또한 다공성 구조여서 혈관의 신생 (angiogenesis)이 용이한 골 전도체 (osteoconductive material) 이어야 한다. 하지만, 자가유래 간엽 줄기세포 이식에 사용되는 비계체는 위와 같은 특성과 더불어 간엽 줄기세포가 비계체 내에 부착 (adhesion) 되어 군집을 형성 (colonization) 할 수 있는 구조적 및 화학적 특성을 가지고 있어야 하며<sup>11,12</sup> 또한 더불어 간엽 줄기세포의 활동을 촉진시킬 수 있는 인자를 제공할 수 있다면, 가장 이상적이라 할 수 있다.

Abukawa 등은 미니피그에서 하악제간 자가유래 줄기세포의 유용성을 보고하였고, Ueda 등<sup>10</sup>과 Yamada 등<sup>10</sup>은 자가유래 간엽 줄기세포를 생체합성 중합체 (2형 type I collagen)와 함께 사용하고, 여기에 혈소판 농축혈장을 혼합한 우수한 골이식 결과를 보고하였다. Harris 등<sup>13</sup>도 여러 합성골이나 이종골을 미분화 간엽 줄기세포를 위한 비계체로 사용하여 각각의 골 형성능을 비교한 결과, 비계체의 화학적 조성, 다공성, 용해도에 따라 골 형성능을 지지하는 차이를 보였다고 하였다.

Bio-Oss® (Geistlich Co. Switzerland)는 우골 기질에서 추출한 다공성 생체 수산화인회석 (hydroxyapatite)로서 인체 골과 비슷한 다공성을 가지고 있어 혈관의 신생이 용이하고, 구조적으로 안정적이며, 흡수에 저항하는 구조를 가지고 있어, 1980년대 이후 골 이식시 전세계적으로 가장 많이 사용되어 온 골 전도

체이다<sup>16,19</sup>. 그러나, 다른 저자들은 Bio-Oss®의 불용성을 문제로 다른 합성골에 비해 사용시 불리한 점이 많다는 것을 주장하기도 했다.

이에 본 연구에서는 가토의 장골능에서 골수를 채취한 후 실험실에서 배양한 자가유래 간엽 골모줄기세포(Ostem®)를 상약동에 이식할 때 이의 비계체로서 Bio-Oss®를 사용하고 이를 자가골을 비계체로 사용한 군과 비교함으로써 Bio-Oss® 비계체의 골 형성능에 관하여 알아보고, Bio-Oss®의 임상적 유용성을 확인하고자 하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 실험 동물 및 재료

체중 3.2~3.3 kg의 수컷 가토 16 마리를 실험동물로 사용하였으며 실온에서 동물용 고형사료와 물을 이용하여 일정기간 사육하였다.

#### 가) 자가유래 간엽 줄기세포 배양

##### (1) 골수 채취

간엽 줄기세포를 얻기 위하여 가토의 골수로부터 채취하였다. 먼저 가토의 장골부위를 손가락으로 촉진한 후 위치를 확인하였다. 피부 부위를 1: 100,000 에피네프린을 함유한 2 % 리도카인 (유한양행, 한국)으로 국소마취 한 후, 수술 3 주전에 보고된 방식<sup>20</sup>에 따라 가토의 장골 중앙으로부터 18 gauge 바늘을 사용하여 3 ml 골수를 채취하였다.

##### (2) 골수 배양 (OSTEM® 제작)

###### 1) 세포 분리 방법

가토에서 채취한 3ml의 골수를 50ml 튜브에 옮긴 후 원심분리(1600 rpm, 7 분)과정을 시행하였다. 상층액을 제거하고 HBSS로 세척한 후 다시 원심분리(1600 rpm, 7 분)과정을 시행하며 세척을 위와 같은 방법으로 3회 반복하였다. 혈구 세포를 파괴 후 다시 원심분리(1600 rpm, 7 분)과정을 시행하고 상층액을 제거하였고, 1차 배양이 이루어질 20% a-MEM으로 세척 후 바로 cell strainer로 여과과정을 시행 하였으며, 다시 원심분리 (1500 rpm, 5 분)과정을 시행 후 상층액을 제거하였다. 위의 과정 후 20% a-MEM을 첨가하고 flask로 옮긴 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 1차 배양을 실시하였다.

###### 2) 세포 배양 방법

세포를 골수에서 분리 후 75T flask, 20% a-MEM의 배지에서 1차 배양을 실시하였다. 2~3일 간격으로 배지 교환을 이루어 졌으며, 세포의 오염방지를 위해 gentamicin을 50ug/mL의 농도로 첨가하였다. 13일 후 flask에 세포가 군데 군데 군집을 이룬 상태를 확인 후 수거하여 150T flask, 10% a-MEM의 배지에 계대 배양을 실시하였으며, 골 형성능 시험을 위해 6-well plate에 5,000/cm<sup>2</sup>의 세포 수를 seeding하였다. 1차 배양과 마찬가지로

2~3일 간격으로 배지 교환이 이루어졌다.

계대 배양을 실시한 후 현미경으로 세포를 관찰하고 사진촬영을 여러 번 실시하였다.

150T flask에서 배양이 10일째 되는 날 가득 찬 세포의 상태를 확인 후 모든 세포는 저장하였다.

3) 분화능 확인 시험

- ALP 염색

배양된 세포를 HBSS로 세척한 후 70% 에탄올로 4°C에서 1시간 동안 고정한다. HBSS로 세척한 후 NBT/BCIP 용액을 가한 후 37°C에서 5분간 반응 시킨다. 증류수로 2회 세척한 후 현미경으로 세포에 존재하는 ALP와 NBT/BCIP의 반응 정도를 확인한다.

- Alizalin Red 염색(칼슘염색)

배양된 세포를 HBSS로 세척한다. 70% 에탄올로 4°C에서 1시간 동안 고정한다. HBSS로 세척한 후 Alizalin Red 용액을 가해 반응시킨다. 증류수로 5회 세척한 후 현미경으로 관찰한다.

배양 20일째에 배양액을 제거한 후 0.02% trypsin-ETDA (Gibco BRL, Gettysburg, PA, USA) 5 ml로 씻어 냈으며 다시 0.02% trypsin-ETDA 3 ml를 첨가하여 배양기에 5분간 두었다. 배양액 3 ml를 가하여 trypsin-ETDA의 활성을 멈추게 한 뒤 배양용기내의 모든 내용물을 원추 용기에 모았으며, 이를 4°C에서 265 g로 6분간 원심분리를 한 후, 상층액을 제거하고 나머지를 모아 세포수가  $1 \times 10^6$  cells/ml가 되게 한 후 이를 이식에 사용하였다.

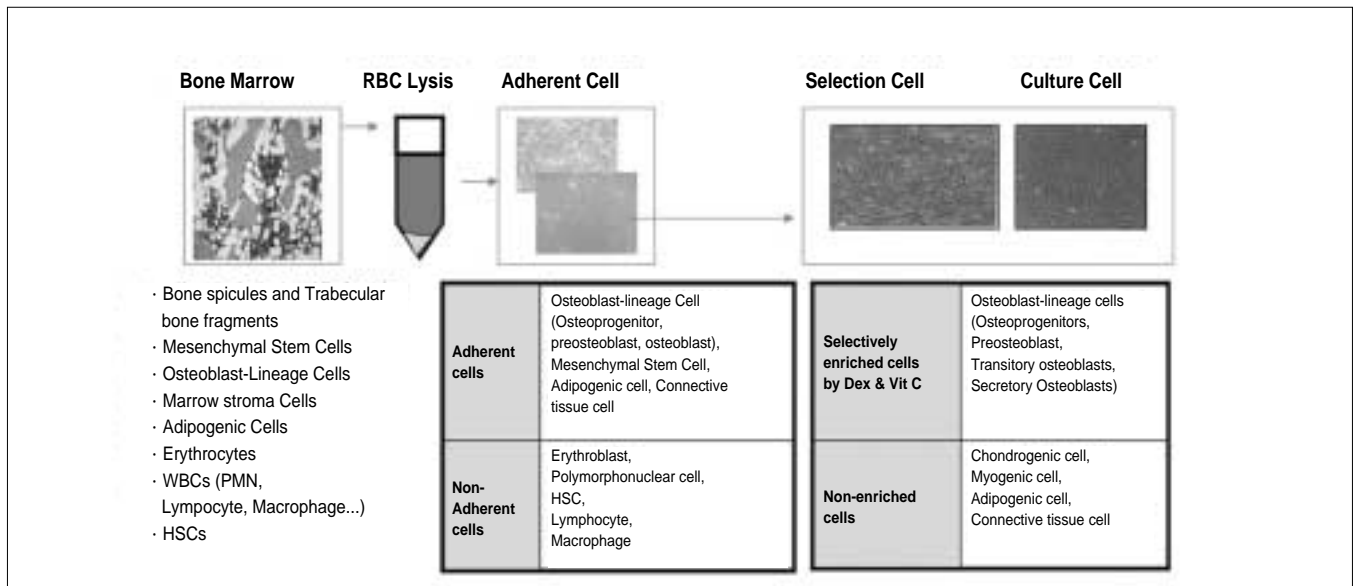
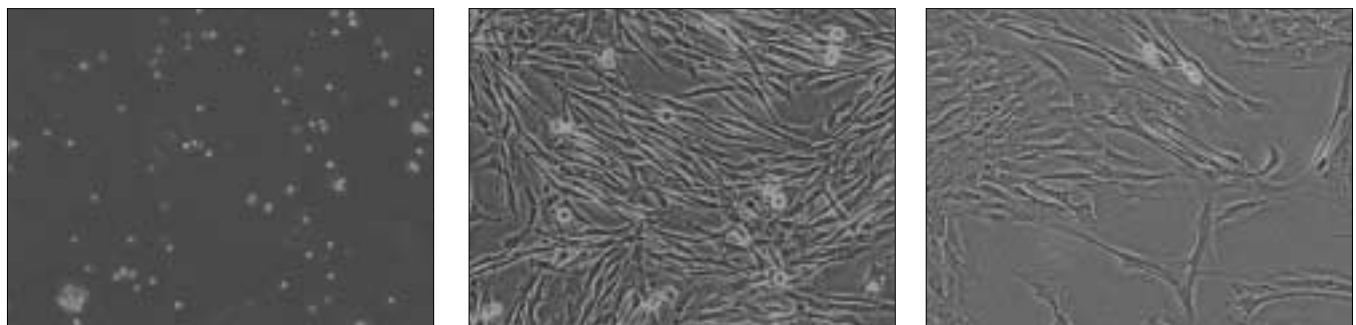


Fig.1. Culture procedures of mesenchymal stem cell(OSTEM®).



A. Culture for 1 days *in vitro* after plate 0.

B. Culture for 10 days *in vitro*.

C. Culture for 20 days *in vitro*.

Fig. 2. Morphological features of bone marrow-derived cells (× 100).

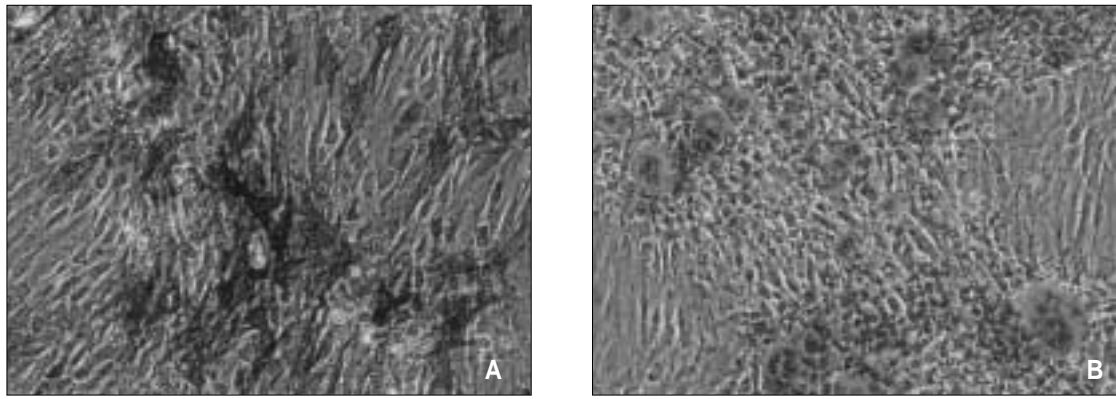


Fig. 3. Expression of (A) alkaline phosphatase(ALP), (B) Calcium.

나) 대조군 및 실험군 준비

수술 직전 실험실에서 배양해  $1 \times 10^7$  cells/ml로 농축된 간엽 줄기세포 1 ml (OSTEM®, 세원 셀론택, 한국)를 분리시키고, 가토의 전두골에서 채취한 입자형 자가골과 조직 접착제 (Greenplast®, 녹십자, 한국)를 혼합하여 이를 대조군으로 제작하였으며, 자가골 대신 Bio-Oss®를 혼합하여 이를 실험군으로 준비 하였다.

2. 실험 방법

상악동 골 이식술을 위해 동물용 진정 마취제 (럼폰® 3 mg/kg, 한국 바이엘화학)와 미다졸람 (도미컴® 1 mg/kg, 한국 로슈)을 각각 근육 주사하여 진신마취를 유도하였다. 전두부위에서 코 부위까지 제모를 하고 포타딘 용액으로 소독을 한 후 국소 마취 유도과 지혈을 위해 1: 100,000 에피네프린을 함유한 2% 리도카인 (유한양행, 한국)을 피하 주사하였다.

가토의 전두부에 5 cm 정도의 절개를 가해 층별 바리를 시행 하였고 골을 노출시킨 후 전두골 봉합선 (frontal bone suture line)의 1.5 cm 하방, 5 mm 측방에 5 mm × 10 mm의 골편을 제거하여 상악동의 전벽을 제거한 후 둔한 큐렛을 이용하여 상악동 점막을 상방으로 거상 시켰다. 대조군은 전두골에서 1 cm × 2 cm 크기의 골을 채취하였고, 제거된 상악동 전벽의 골과 함께 섞은 후 골 결자를 이용하여 입자형 골편을 제작하였다. 이어 4개의 용기로 분리되어 있는 조직 접착제를 통법에 따라 처리하여 자가골과 1 ml 자가유래 골아 줄기세포(OSTEM®)를 혼합한 부위에 적용하여 자가유래 골아 줄기세포를 자가골 비계체에 고정하였다. 실험군은 자가골 대신 Bio-Oss®를 사용하여 대조군과 유사한 방식으로 고정하였다.

16 마리의 가토에서 우측의 상악동 내에는 대조군으로서 자가골과 자가유래 골아 줄기세포(OSTEM®), 조직 접착제를 혼합한 이식편을 적용하였고, 좌측에는 실험군으로서 Bio-Oss®와 자가유래 골아 줄기세포(OSTEM®), 조직 접착제를 섞은 혼합물을 이식하였다. 그 후 골막을 4-0 vicryl과 4-0 nylon을 이용

하여 봉합하였다. 모든 실험동물은 술 후 감염예방을 위하여 3일간 아목사실린 (티라목스, 삼진제약, 한국)과 디클로페낙 나트륨 (킨포인, 삼진제약, 한국)을 근육주사 하였다 (Fig. 4).

3. 육안적 검사

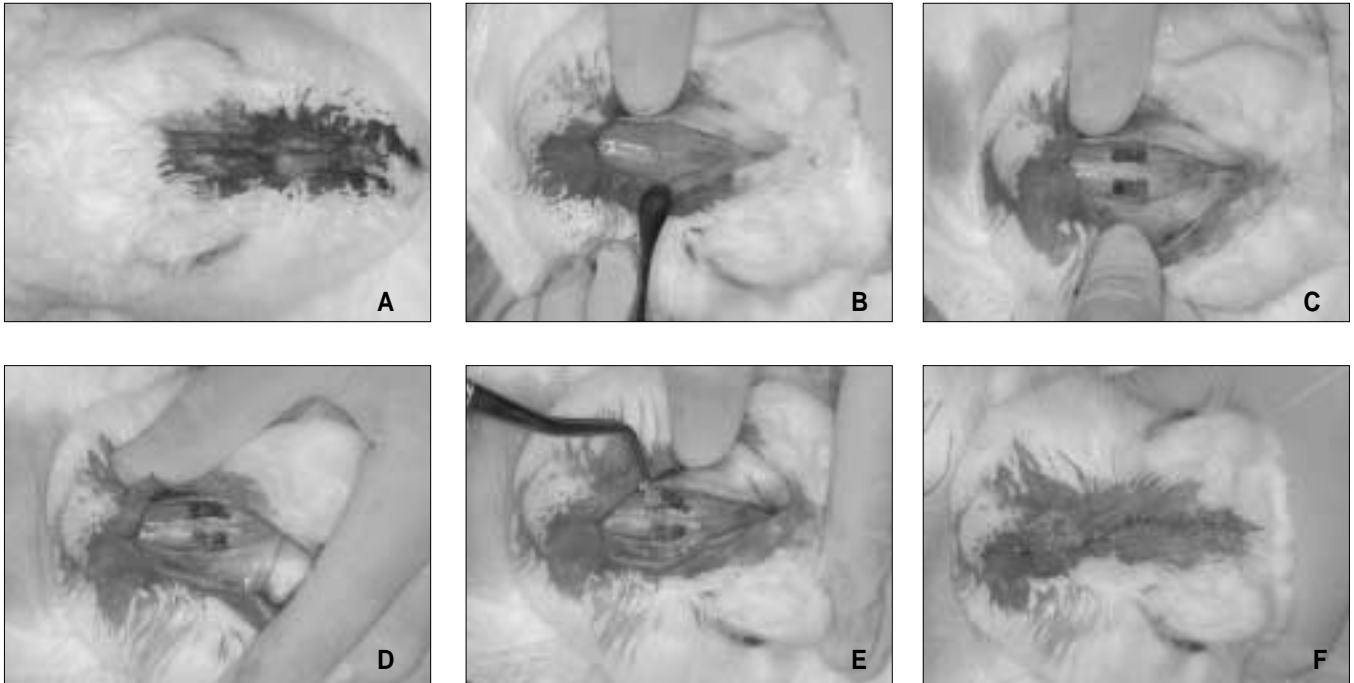
상악동 골 이식술 후 가토의 사료 섭취상태, 골이식 부위의 조직반응에 대해 검사하였다. 술 후 1, 2, 4, 8 주에 희생하여 탈회하기 전에 골이식 부위의 치유양상과 염증 상태 및 골화 정도를 육안적으로 관찰한 후 탐침을 이용한 골 경도 검사를 시행하였다.

4. 방사선학적 검사

이식술 후 1, 2, 4, 8 주에 가토를 희생하여 상악골을 채취한 후 골이식 부위를 중심으로 치과용 CDX 2000 sensor (Medico TECH, Finland)를 이용하여 65 kvp, 7.5 mA, 0.25 sec의 조건하에 Step wedge와 함께 방사선 촬영을 하였고, Scion image program으로 step-wedge를 기준으로 흑화도를 측정 하였다. Step wedge는 0.03 mm 두께에서 0.27 mm 까지 9 단계로 0.03 mm 씩 두께가 증가하는 것을 이용 하였다. Scion program 을 이용하여 각 방사선 사진 마다 바탕면과 각 step wedge층의 흑화도를 측정한 후 골이식 부위를 측정 하였다. 평가는 골이식 부위의 흑화도가 step wedge의 어느 두께에 해당되는지 측정하여 골 밀도를 평가하였다.

5. 조직학적 검사

상악동 거상술 후 1, 2, 4, 8 주에 희생시켜, 상악동 부위에서 조직 표본을 형성한 후 2일간 10% 중성 포르말린용액에 고정하고, 10% EDTA로 50일간 탈회한 후, 통상적인 방법에 의하여 탈수 및 파라핀 포매를 하였으며, 4~6 μm의 박절 표본을 Poly-L-Lysine 을 도포한 슬라이드에 부착하여 표본을 제작하



**Fig. 4.** Surgical procedures.

- A. painting with povidone iodine.
- B. incision & dissection to exposure the bone with periosteal elevator.
- C. trap door was removed, and the antral membrane was elevated carefully to avoid perforation.
- D. E. MSCs/ fibrin glue/ autobone mixture was placed into the left sinus, and MSCs/ fibrin glue/ Bio-Oss® mixture was placed into the right one.
- F. the periosteum and skin flap were replaced, sutured, and allowed to heal.

였다. 조직 절편에는 골이식 부위 및 정상부위가 모두 포함되도록 제작하였으며 신생골과 섬유조직의 형태 관찰과 변화를 알아보기 위해 H & E, Masson's trichrome, Periodic acid Schiff (PAS) 염색을 시행하여 검경하였다.

#### 6. 조직 계측학적 검사

상악동벽의 측면 중심부에서 석회화된 조직상은 color reversal film에 8 비트의 밀도 값의 256×256 array로 디지털화하여 복사되었고, 분석을 위해 마이크로 컴퓨터에 전사되었다 (NIH image, version 1.61, National Institutes of Health, U. S. A).

골 이식 부위는 상악과 비강 벽, 상악동 막, 상악동 전벽에 골 라벨에 둘러싸인 부위로 규정하였다. 증대된 부위에서 전체 골량(새로 형성된 골과 이식 골)과 증대된 높이(증대된 공간의 최대 높이)는 컴퓨터 이미지 분석 시스템으로 정량화 하였다.

#### 7. 통계 분석

각각의 분석 값을 가지고 그룹의 평균과 표준 편차를 산출하였다. 데이터는  $p < 0.05$  이하에서 유의성 검정을 하였으며 paired, two-tailed Student' t-test를 시행하였다.

### III. 실험 성적

#### 1. 임상적 소견

모든 실험 동물들은 상악동 골 이식술 후 체중감소 등의 별다른 이상소견 없이 건강하였으며, 수술 부위는 특별한 염증 소견이나 창상 이개 없이 잘 치유된 모습을 보였다. 가토를 희생한 후 수술부위를 다시 노출 시켰을 때, 대조군은 1,2주군에서 숙주골과 부분적 분리는 보였으나 4주, 8주에서는 주변 숙주골과 잘 융합 되어졌다. 하지만 실험군의 1,2,4주 군에서는 이식골이 주변 숙주골과 부분적으로 분리되어 있었고, 일부 Bio-Oss® 입자들은 따로 이식체로부터 떨어져 분산되어 있는 모습이였다. 또, 탐침을 이용하여 눌러 보았을 때 각 주군에서 경도는 시간이 갈수록 증가하였으나, 대조군에 비하여 실험군에서 경도가 현저히 낮았다.

#### 2. 방사선학적 소견

방사선학적 소견에서 대조군에서는 시간이 경과 할수록 골 밀도가 증가하는 경향을 보였으나, 실험군에서는 변화가 없었다. 또 1,2주군에서는 실험군과 대조군 사이의 큰 흑화도 차이

를 보이지 않았으나, 4, 8 주군에서는 대조군에서 실험군에 비해 유의할 정도의 차이를 보였다 (Table 1, Fig. 6-8). ( $p < 0.05$ )

### 3. 조직학적 소견

#### 가. 대조군 (자가골 비계체에 이식된 자가유래 골아 줄기세포 줄기세포군)

상악동 내부의 골 이식부 (Fig. 9 A)는 1 주에서는 출혈 및 육아조직이 거의 없어 실험군보다 염증반응이 적었고 숙주골과 이식골간의 융합도 관찰되었으나 (Fig. 9 C), 골 흡수와 골 형성이 동반되는 골 개조의 활성을 보였다. 2 주에는 파골세포에 의한 골 흡수와 염증세포 침윤은 거의 사라졌으며 신생골 형성이 현저하게 나타나 대조군 중 가장 우수한 신생골 형성과 골모세포 활성을 보였다 (Fig. 10 A, 10 C). 4 주에서는 골 개조가 계속 진행되어 이식부가 신생골과 치밀 섬유조직으로 대체되었는데 골모세포 활성은 2 주에 비해 4 주에서부터 감소되었다 (Fig. 11 A, 11 C). 8 주에는 이식부가 층판골로 대체되었고 완전한 골성 융합을 이루었으며 염증세포 침윤이나 골 흡수는 관찰되지 않았다 (Fig. 12 A, 12 C).

나. 실험군 (Bio-Oss®에 이식된 자가유래 골아 줄기세포군)  
 상악동 내부의 골 이식부 (Fig. 9 B)는 1 주에서는 출혈 및 육아조직을 관찰할 수 있었는데 급 만성 염증세포에 의한 이식골의 파괴를 일부에서 볼 수 있었고 신생골 형성은 거의 없었으나 파골세포에 의한 골 흡수는 현저하였다 (Fig. 9 D). 2 주의 실험군은 급성 염증반응이 사라지고 만성 염증세포 침윤과 함께 이식골 주위에서 신생골 형성은 없었으며 파골세포의 활성이 자가골에 비해 현저하였다 (Fig. 10 B, 10 D). 4 주에는 섬유아세포가 이주하여 골모세포로 분화된 모습이 관찰되나 신생골의 형성은 아직 이식골 주위에서 관찰되지 않았고 (Fig. 11 B) 파골세포에 의한 골 흡수가 지속되었다 (Fig. 11 D). 8 주에는 이식부에서 골 형성이 관찰 되었으나 완전한 층판골로 대체는 관찰되지 않았고 정도의 만성 염증세포 침윤이 잔존되고 있으며 자가골에 비해 이식골은 섬유성 융합이 많이 남아있었다 (Fig. 12 B, 12 D). 결론적으로 실험군은 초기 염증반응이 심하고 골 흡수가 4 주 까지 장기간 지속되며 말기에도 완전한 골성 융합 및 치유가 나타나지 않아 골치유가 느린 것으로 나타났다.

**Table 1.** Changes of Bone Density by Radiology (mm)

	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control group	0.11	0.13	0.16*	0.17*
Experimental group	0.13	0.14	0.13	0.14

Control group : Autobone + Mesenchymal stem cell + Fibrin glue  
 Experimental group : Bio-Oss® + Mesenchymal stem cell + Fibrin glue  
 \*  $p < 0.05$

**Table 2.** Histological Summary of Sinus Bone Graft according to Autobone & Bio-Oss® Scaffolds

Period	Control group				Experimental group			
	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Inflammation	+	±	-	-	+++	++	+	±
Hemorrhage	±	±	-	-	++	+	±	±
New bone formation	++	+++	++	+	-	+	+	+
Angiogenesis	++	+	±	±	+	±	±	±
Fibrosis	+	+++	±	±	++	+++	±	+

(- : negative ± : rare + : mild ++ : moderate +++ : intense)  
 Control group: Autobone + Mesenchymal stem cell + Fibrin glue  
 Experimental group: Bio-Oss® + Mesenchymal stem cell + Fibrin glue

**Table 3.** Histomorphology of New Bone Formation (%)

	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control group	7.60	22.41	34.97*	66.08*
Experimental group	8.75	16.76	20.76	26.13

Control group : Autogene + Mesenchymal stem cell + Fibrin glue

Experimental group : Bio-Oss® + Mesenchymal stem cell + Fibrin glue

\* P < 0.05, %: New bone area / total grafted area

### 3. 조직 계측학적 소견

조직 형태학적인 분석에서 대조군의 4 주, 8 주에 유의성 있게 골 형성이 우수하였으며 (p<0.05), 골 형성부의 면적은 각 군 모두에서 시간 경과에 따라 증가 하였으나, 골 형성량은 특히 4 주 및 8 주에서 실험군은 대조군에 비하여 유의성 있게 골 형성이 저조하여 (p<0.05), 매우 느리게 골 형성이 이루어지고 있었고, 대조군은 8 주에서 이미 정상적인 숙주골과 유사한 소견을 보였다.

## IV. 총괄 및 고찰

외상 혹은 수술 등에 의하여 골 결손이 발생 되거나 이 결손 부위에 인위적으로 골 이식을 시행한 경우에는 골모세포와 파골세포의 상호작용으로 골 생성 및 재생이 일어난다. 이러한 골 치유 과정은 인간에게 있어서는 골 이식부 또는 골 결손부에 염증반응이 일어나면서 재 혈관화가 이루어지는 초기 2 주 내의 염증기와 이어 3-4 주에 걸쳐 골 유도 (osteinduction), 골 전도 (osteochondduction) 및 골 생성 (osteogenesis)의 과정을 거쳐 가골 및 직조골 (woven bone)이 형성되는 1 단계 골 재생 (phase 1 bone regeneration), 및 이후 6 주에서 수개월 동안 1 단계 골 재생 단계에서 형성된 가골 및 직조골이 흡수 (resorption), 교체 (replacement)되어 골 개조 (remodeling)가 일어나는 2 단계 골 재생 (phase 2 bone regeneration)으로 이루어진다<sup>20</sup>. 1 단계 골 재생 (phase 1 bone regeneration)을 거치면 이식되어 새로 생성된 골은 광화 (mineralization)되어 단단하고 세포수는 적으며, 성숙한 haversian system을 갖춘 층판 형태의 골로써 외부의 압력이나 기능적인 힘을 견딜 수 있다.

골이식술시 가장 많이 이용되는 자가골 이식술은 자가골 내에 골 생성, 골 유도능력을 가진 골모세포를 함유하고 있고, 자가골의 골격구조는 훌륭한 골 전도체로 작용하고 있어 가장 이상적인 골 이식 형태라고 할 수 있다. 하지만 자가골은 이를 얻기 위하여 신체의 일부에서 채취하여야 하는 부담감이 있고, 골이식 후 치유과정에서 쉽게 흡수되는 단점을 가지고 있다. 이와 같은 단점을 극복하기 위하여 동종골이나 이종골, 또

는 다른 합성골 재료들이 자가골을 대신하여 개발되어 왔으나, 아직까지는 자가골 만큼의 골 형성 능력을 가진 재료는 개발되지 못하였다.

인체내 간엽 줄기세포를 이용한 조직공학 방법은 골 이식시 골 형성세포의 숫자와 질 (quantity and quality)을 획기적으로 향상시켜 빠른 생착과 우수한 골 이식체를 얻기 위한 방법<sup>22, 23</sup>이라 할 수 있다. 즉 숙주의 골수로부터 미분화 간엽 줄기세포를 채취하여 이를 체외에서 골 형성 세포로 분화, 증식시켜 적절한 비계체와 함께 골이식 함으로써 골이식의 성공률을 높이고 우수한 이식골을 얻으려는 것이다.

일반적으로 골이식을 위한 간엽 줄기세포는 흡입법 (aspiration)<sup>20</sup>, 또는 골 블록을 채취하여 이를 세척 하는 방법<sup>24</sup> 등으로 얻어진다. 이렇게 하여 얻어진 간엽 줄기세포는 실험실 내에서 증식, 분화의 과정을 거쳐 다양한 골 형성세포 집단 (osteoblast colony)을 만드는데, 골수의 간엽 줄기세포는  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM, Gibco, USA) 배지에서 배양 증식되며 세포는 다양한 숫자와 형태로 사용되어진다. 간엽줄기세포를 실험실에서 직접 골 형성세포로 분화시켜 사용할 것인가 혹은 미분화된 상태로 증식만 시켜 이식할 것인가 하는 것은 아직 많은 논란이 있다. 이때 전통적으로 골 형성세포로 분화시키기 위한 유도 배지로는 10<sup>-8</sup> M dexamethasone, 80  $\mu$ g/ml L-ascorbic acid 와 10 mM Na  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma Chemical Co.) 가 사용된다.

그러나 이러한 dexamethason (Dex)이나 bone morphogenic protein-2 (BMP-2) 등은 일반적으로 alkaline phosphatase의 활성을 유도하여 기질광화를 촉진시킨다고 보고 되고 있지만<sup>25</sup> Beresford 등<sup>26</sup>과 Kim 등<sup>27</sup>은 때로는 1 형 collagen의 발현을 억제시키거나 골세포뿐만 아니라 지방 세포로의 분화도 유도한다고 보고 하여, 세포분화의 불확실성을 제시하기도 하였다. 이에 본 실험에서는 특수한 방법으로 분화를 유도하여 자가유래 골아줄기 세포를 사용하였고, 각각의 단계마다 alkaline phosphatase의 활성과 칼슘 활성등을 통하여 검증한 줄기 세포를 실험에 사용하였다.

골수에서 채취된 간엽 줄기세포가 골 형성세포로 분화되어 이식되고 이어서 골 형성을 이루려면 이것이 안착되고 유지되

는 매개체 즉, 기계적 강도와 3차원 구조를 가진 비계체 (scaffolds)가 반드시 필요하다. 대표적인 비계체로는 bioactive hydroxyapatite<sup>28)</sup>,  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics<sup>29)</sup>, glass ceramics<sup>30,31)</sup>, bioinert alumina ceramics<sup>32)</sup>. 또한 calcium carbonate<sup>33)</sup>나 polylactic acid같은 중합체<sup>34,36)</sup>도 사용하고 있는데, 이러한 재료를 미분화 간엽 줄기세포와 함께 이식하거나, 실험실내에서 비계체 내에 세포를 증식, 분화시켜 이식하는 방식 등이 있다. 하지만 비계체로써 이러한 다양한 합성 재료를 사용하고 여기에 간엽 줄기세포를 첨가하여 이식하였을 때 자가골을 이식한 만큼의 골 형성 능력을 보일 수 있는가 하는 문제는 자가골을 대신 할 수 있는 골 이식법을 개발하기 위하여 매우 중요하다.

이에 본 연구에서는 가토의 상악동 골이식시 위의 비계체 중 현재 임상적으로 가장 많이 사용되는 Bio-Oss<sup>®</sup> 골 전도체를 비계체로 사용하고 여기에 자가 유래 골아 줄기세포를 첨가함으로써 Bio-Oss<sup>®</sup>가 비계체로서 자가골을 대신하여 골을 형성할 수 있는가를 규명하고자 하였다. 즉 가토의 골수로부터 미분화 간엽 줄기세포를 채취하여 실험실에서 증식 시키고 이어  $1 \times 10^7$  cells/ml의 자가 유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)를 준비하여 비계체인 자가골과 Bio-Oss<sup>®</sup>에 각각 첨가하여 조직 접착제로 고정된 후 좌우 상악동에 이식하고 이의 치유과정을 이식 후 1 주, 2 주, 4 주, 8 주 기간 동안 육안적, 방사선학적, 조직학적 및 조직 계측학적으로 관찰 하였다.

그 결과, 자가골을 비계체로 이용한 대조군에서 Bio-Oss<sup>®</sup>을 이용한 실험군에 비해 육안적으로 보다 빠르게 그리고 단단하게 치유되는 것을 관찰할 수 있었으며 방사선학적으로는 4, 8 주군에서 유의성 있는 방사선 골밀도의 차이를 보여 빠른 골 생성과 광화 (mineralization)를 관찰할 수 있었다 ( $p < 0.05$ ).

위와 같은 사실은 조직학적 또는 조직계측학적 검사결과에서도 증명되었는데 먼저 대조군에 비하여 실험군에서 현저하게 초기 염증반응이 많고 염증세포에 의한 골 파괴가 컸으며 신생 혈관증식이 적어 골 생성이 느리게 진행되었고 이에 따라 보다 적은 양의 신생골 형성을 볼 수 있었는데 조직계측학적 검사결과에서도 이식 8 주에서는 대조군에 비하여 약 40% 이상 골 형성량 차이를 보였다. 즉, 자가골을 이용한 미분화 간엽 줄기세포는 초기 염증기와 1 단계 골 재생 과정에서 획기적으로 골 치유를 촉진시키고 있었고, 이것은 자가골 비계체에 이식된 자가유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)가 1 단계 골 재생과정에 영향을 주어 골을 형성하는데 관여했으며, 자가골에서 유래된 골유도 효과 때문이라고 할 수 있다. 위와 같은 실험군과 대조군에서의 결과를 자가유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)를 첨가하지 않은 자가골 이식술의 결과와 비교하였을 때 실험군의 골 형성량은 현저히 낮고, 대조군은 현저히 높았<sup>37)</sup> 비계체로써 자가골의 중요한 역할을 증명할 수 있었다. 그러나 Bio-Oss<sup>®</sup>를 비계체로 사용한 군에서는 초기 염증반응이 심하고 골 흡수가 4 주까지 장기간 지속되며 말기에도 완전한 골성 융합 및 치유가 나타나지 않았다.

이상과 같은 자가 유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>) 이식에서 Bio-Oss<sup>®</sup>를 비계체로 사용했을 때 자가 유래 골아 줄기세포

(OSTEM<sup>®</sup>)를 첨가하지 않고 자가골 단독으로 이식하였을 때 보다 더 감소하는 이유는 다음 2 가지 원인으로 분석할 수 있다. 첫째는 Bio-Oss<sup>®</sup> 표면의 화학적 조성이 자가 유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)의 부착과 군집형성에 알맞지 않을 수 있다. 즉 Bio-Oss<sup>®</sup>의 다공성 구조체는 우골에서 채취한 생체 무기질 수산화인회석이므로 자가골의 구조와 비슷하겠지만, Bio-Oss<sup>®</sup>나 coralline HA 등의 제조과정 (sintering process)을 거치면서 세포 부착에 영향을 주는 표면전하 (surface charge)가 자가골과 차이가 나거나 혹은 물에 용해되는 정도의 차이 때문이라 생각할 수 있다. 이에 따라 Harris 등<sup>15)</sup>은 Bio-Oss<sup>®</sup>보다 HA/TCP 등이 자가 유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)의 부착에는 더 알맞은 재료라고 보고한 바 있다. 둘째 원인은 신호분자 즉, 성장인자의 부족을 고려할 수 있을 것이다. 자가골은 이식되었을 때 자체로부터 여러 골유도 물질을 분비하면서 같이 이식된 자가 유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)로부터 분비되고 여러 성장인자와 상호 작용하여 골의 초기 염증을 줄이고 골 흡수에 저항하며 초기 골 형성을 촉진 시킬 수 있지만, Bio-Oss<sup>®</sup>를 비계체로 한 골 이식에서는 성장인자가 이식된 자가 유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)로부터 일부만 분비되기 때문에 자가 유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)의 골 형성능이 현저하게 저하되었고 분석할 수 있었다. 위와 같은 결과에서 자가 유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)가 여러 성장인자와 같이 투여 되었을 때 1차적 골형성이 촉진된다는 보고<sup>8,10)</sup>와 일치하며 자가 유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)의 이식시 Bio-Oss<sup>®</sup>를 비계체로 사용할 때에는 성장인자의 투여가 필요하다고 할 수 있다.

## V. 결 론

본 연구에서는 가토의 상악동 골이식시 자가유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)를 각각 자가골 및 Bio-Oss<sup>®</sup>에 적용하고 조직 접착제로 고정 하였다. 이 혼합물을 좌우 상악동에 이식한 후 자가골 및 Bio-Oss<sup>®</sup>의 골 치유과정에서 비계체로서 어떤 효과가 있는지 육안적, 방사선학적, 조직학적 및 조직 계측학적 분석을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

가토의 상악동 골이식시 Bio-Oss<sup>®</sup>를 비계체로 사용한 군은 자가골을 비계체로 사용한 군에 비하여

첫째, 육안적 검사에서 골화가 늦고 8 주에 완전하게 골화되지 못하였다.

둘째, 방사선학적 검사에서 2주 및 4주에서 현저하게 낮은 골 밀도를 보였다.

셋째, 조직학적 및 조직 형태학적 검사에서 초기 염증반응이 많고, 신생 혈관의 증식과 초기 골 생성이 적었다.

결론적으로 골이식시 골수에서 채취한 자가 유래 골아 줄기세포(OSTEM<sup>®</sup>)를 첨가하는 술식은 Bio-Oss<sup>®</sup>만을 단독으로 비계체로 사용하기보다 다른 성장인자를 첨가하여 단점을 보완하는 것이 좋으며, 자가골을 사용하였을 때 매우 양호한 골 형성을 보인다고 사료 된다.



## 참고문헌

- Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-926.
- Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ: Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2:477-488.
- Bianchi G, Muraglia A, Daga A, Corte G: Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Wound Repair Regen* 2001;9:460-466.
- Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, Dennis JE: A chemically defined medium supports *in vitro* proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 1995;219:211-222.
- Lee CH, Singla A, Lee Y: Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001;221:1-22.
- Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K: Sinus floor elevation applied tissue engineer-red bone. *Clin Oral Impl Res* 2005;16:622-629.
- Kato Y, Gospodarowicz D: Sulfated proteoglycan synthesis by confluent cultures of rabbit costal chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1985;100:477-485.
- Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H: Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;288:413-419.
- Matin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R: Fibroblast growth factor-2 supports *ex vivo* expansion & maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology* 1997;138:4456-4462.
- Ueda M, Yamada Y, Naiki T, Takahachi M: Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Tissue Engineering* 2004;10:955-964.
- Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T, Tamai S: Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics. *J Biomed Mat Res* 1996;32:341-8.
- Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, Inoue K: Dropped apatite-wollastonite containing glass ceramic provokes osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells. *J Biomed Mater Res* 1999;44:381-8.
- Abukawa H, Shin M, Vacanti J, Williams WB, Kaban LB, Troulis MJ: Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:601-606.
- Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T: Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:589-597.
- Harris CT, Cooper LF: Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *J Dent Res* 2003;80:314-320.
- Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, Misch C: Sinus lift grafts and endosseous implants: Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am* 1992;36:151-186.
- Paul C, Peichev M, Naiyer A, Pereira D: Bovines apatit-Wertigkeit beim Knochenersatz. *Pesch HJ, Stoss. Osteologie aktuell* 1993;288-291.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC: Characterization of xenogeneic bone material. *Quintessence* 1997;87-100.
- Boyne PJ, James RA: Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Maxillofac Surg* 1980;38:613-616.
- Kadiyara S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP: Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplantation* 1997b;6:125-134.
- Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, Souyris F: Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994;23:395-398.
- Lind M: Growth factors: Possible new clinical tools. *Acta Orthop Scand* 1996;67:407-417.
- Garg AK: The future role of growth factors in bone grafting. *Dent Implantol Update* 1999;10:5-7.
- Caplan AI, Denis JE: Mesenchymal stem cells: Progenitors, progeny, and pathways. *J Bone Miner Metab* 1996;14:193.
- Kitamura S, Hirose H, Funaoka H, Takakura Y: Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on alumina ceramics.
- Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS: Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 1992;102:341.
- Kim IS, Cho TH, Zhang YL, Lee KB: Problems in osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Korean J Maxillofac Surg* 2005;27:1-8.
- Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, Tamai S: *In vitro* bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mat Res* 1996;32:333-40.
- Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI: Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induce by marrow cells. *J Orthop Res* 1989;7:568-78.
- Uchida A, Nade SM, McCartney ER, Ching W: The use of ceramics for bone replacement. A comparative study of three different glass ceramics. *J Bone Joint Surg Br* 1984;66:269-275.
- Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Hubner U: Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. *Biomaterials* 2002;23:3319.
- Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, Inoue K: Bone formation process in porous calcium carbonate & hydroxyapatite. *J Biomed Mat Res* 1992;26:885-95.
- Hasegawa Y, Ishimura M, Habata T, Tamai S: Marrow cell culture on poly-L-lactic acid fabrics. *Clin Orthop* 1999;358:235-43.
- Thomas von Arx, David L. Cochran, Joachim S. Hermann: Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. *Clin Oral Impl Res* 2001;12:260-269.
- Cho MI, Lin WL, Genco RJ: Platelet derived growth factor modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodont* 1995;66:522-528.
- Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R: Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology* 2003;22:81-91.
- Sung Hwan Oh, Young Won Choi, Bum Soo Kim, In Bum Yeo, Pil Kwy Jo: The Effects of Undifferentiated Mesenchymal Stem Cells on Sinus Bone Grafting in Rabbits. *Kor J Maxillofac Surg* 2006;28(6):520-530.

사진부도 ①

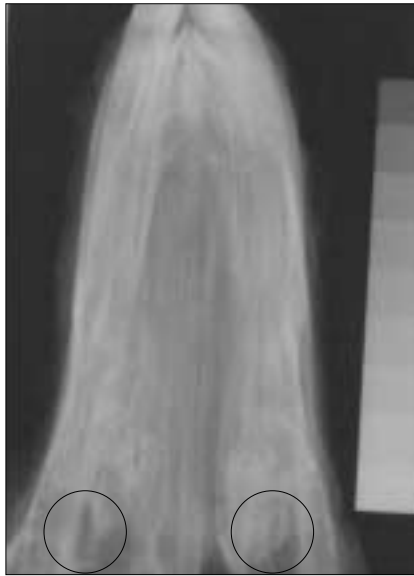


Fig. 5. 1 week.



Fig. 6. 2 weeks.



Fig. 7. 4 weeks.

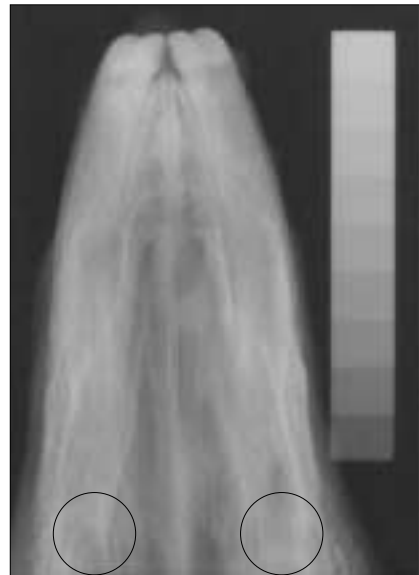


Fig. 8. 8 weeks.

Rt: Control group, Lt: Experimental group.

사진부도 ②

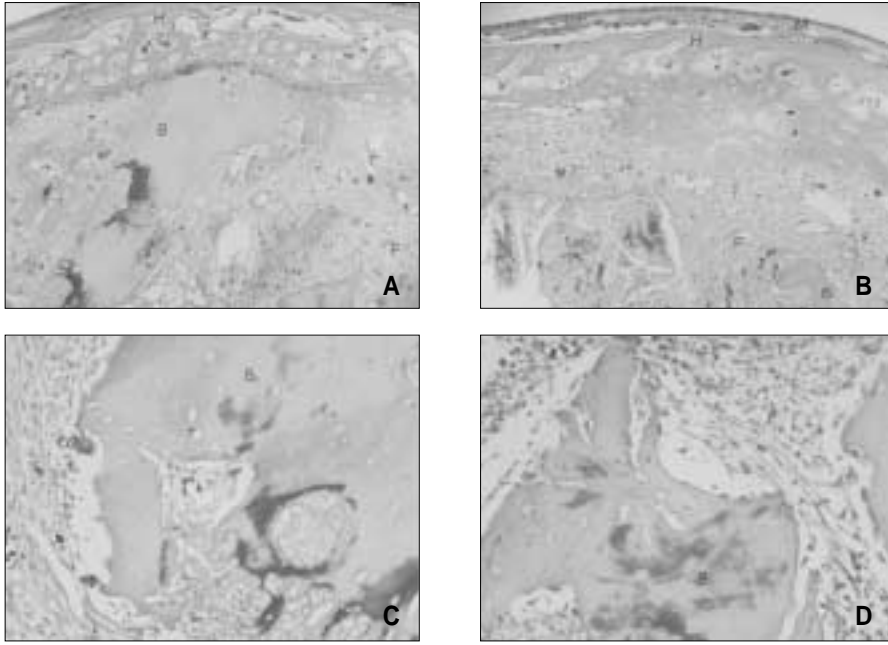


Fig. 9. 1 week.

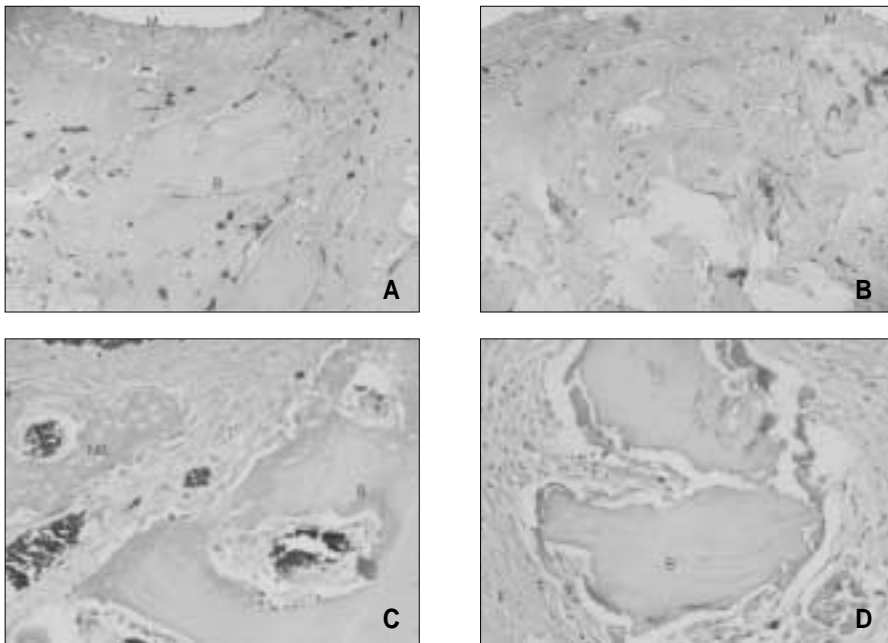


Fig. 10. 2 weeks.

사진부도 ③

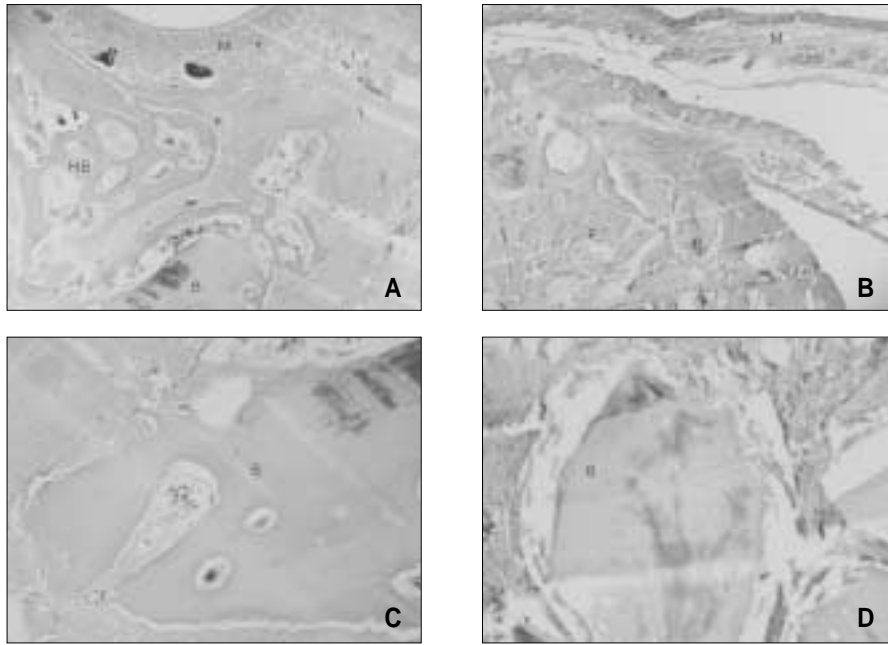


Fig. 11. 4 weeks.

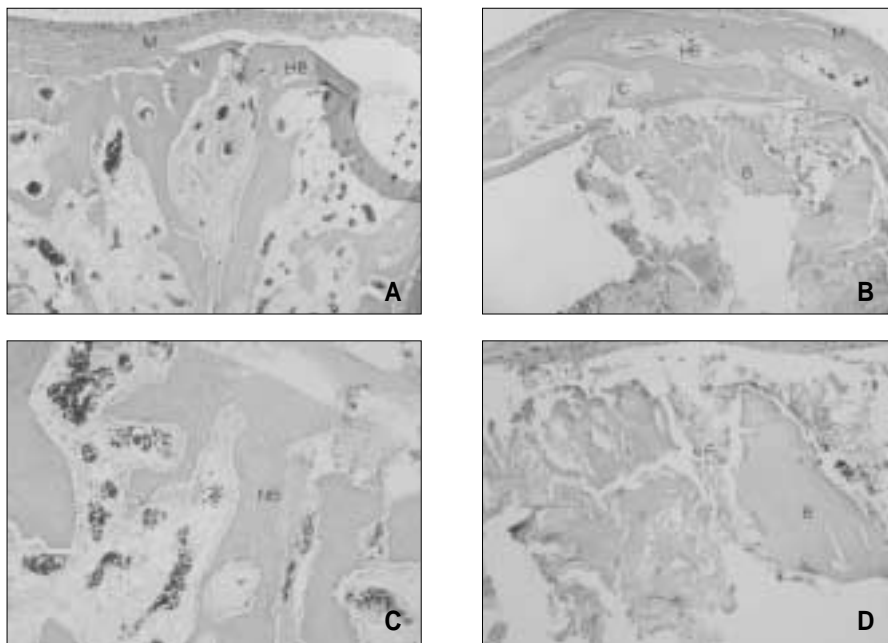
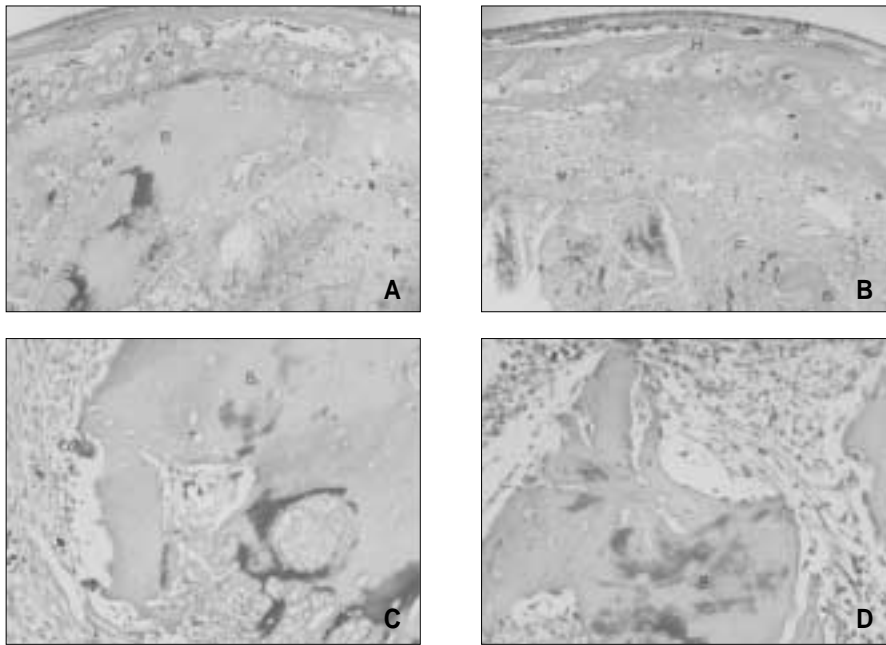
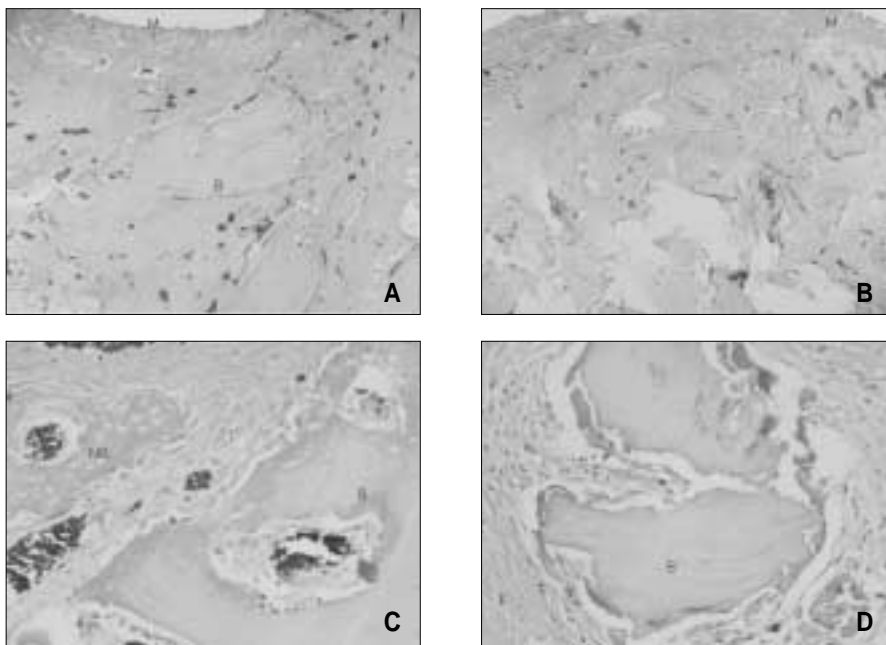


Fig. 12. 8 weeks.

사진부도 ④



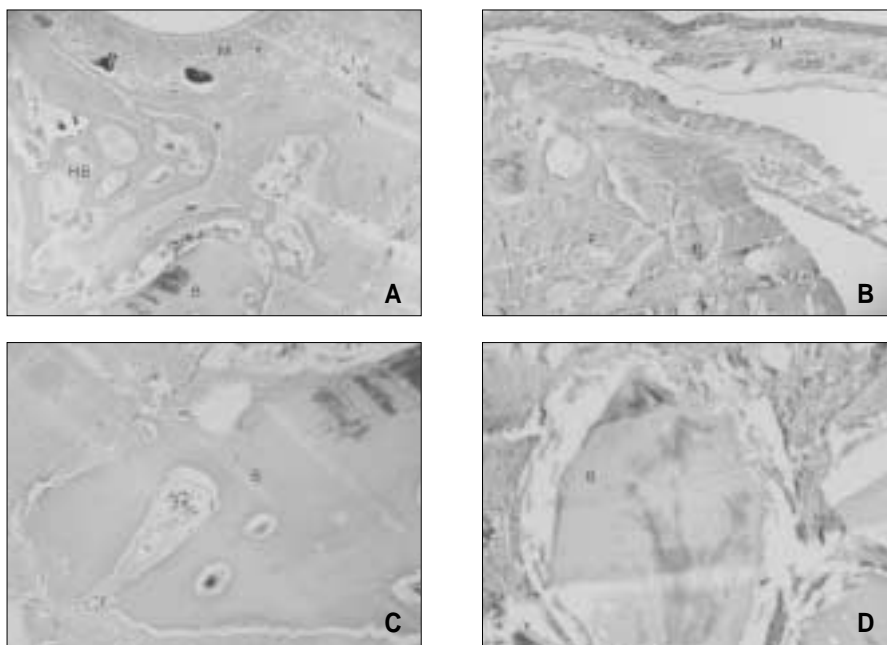
**Fig. 9A-9D.** Microphotography in Sinus Wall Antrum at 1 week. (Modified M.T. stain, A and C: Autobone + Fibrin glue + Stem cell Group, B and D : Bio-Oss® + Fibrin glue + Stem cell Group, A and B; ×40, C, D; ×200). Autobone group shows integrated graft bone with host bone from sinus anterior wall (A), which reveal severe bone resorption by osteoclasts and new bone formation (C) at 1 week. Bio-Oss® group showed no integrated grafted bone particle into host bone, and similar inflammatory cell infiltration compared with Autobone group at 1 week (B, D).



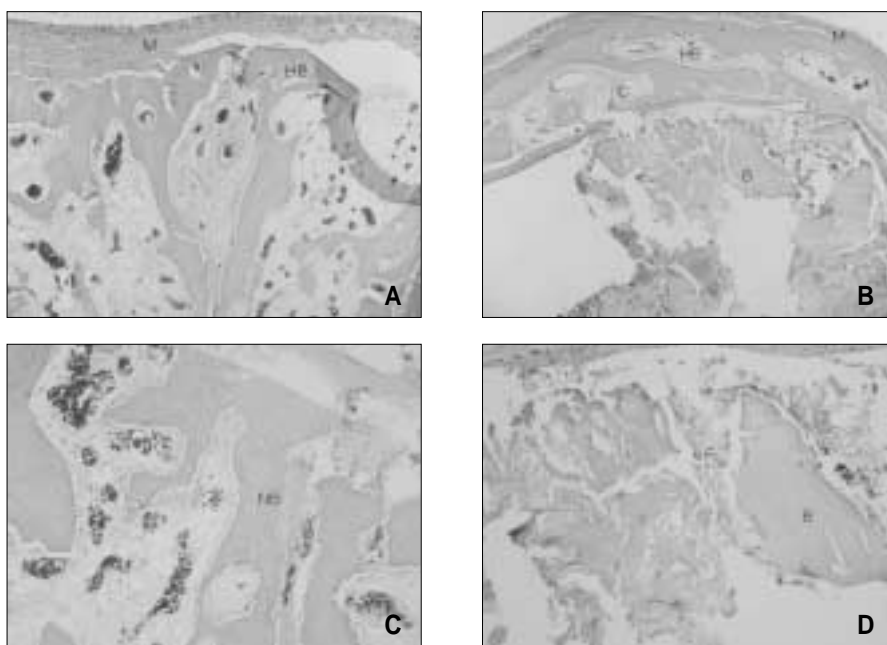
**Fig. 10A-10D.** Microphotography in Sinus Wall Antrum at 2 weeks. (Modified M.T. stain, A and C: Autobone + Fibrin glue + Stem cell Group, B and D : Bio-Oss® + Fibrin glue + Stem cell, A and B; ×40, C, D; ×200). Autobone group shows disappearance of osteoclasts and active bone formation by osteoblasts (A, C). Bio-Oss® group showed persistent bone resorption by osteoclasts and inflammatory cell infiltration at 2 weeks (B, D).

Abbreviation; F: fibrous tissue, H: host bone, M: mucosa, OS: osteoclast, OB: osteoblast, B: grafted bone, NB: new bone.

사진부도 ⑤



**Fig. 11A-11D.** Microphotography in Sinus Wall Antrum at 4 weeks. (Modified M.T. stain, A and C; Autobone + Fibrin glue + Stem cell Group, B and D ; Bio-Oss® + Fibrin glue + Stem cell Group, A and B; ×40, C, D; ×200). Autobone group shows fibrous union of grafted bone and inactive osteoblasts (A, C). Bio-Oss® group showed persistent inflammatory cell and bone resorption by osteoclasts at 4 weeks (B, D).



**Fig. 12A-12D.** Microphotography in Sinus Wall Antrum at 8 weeks. (Modified M.T. stain, A and C; Autobone + Fibrin glue + Stem cell Group, B and D ; Bio-Oss® + Fibrin glue + Stem cell Group, A and B; ×40, C, D; ×200). Autobone group shows normal appearing union of grafted bone and host bone (A, C). Bio-Oss® group showed no integrated grafted bone with fibrous union at 8 weeks (B, D).

Abbreviation; F: fibrous tissue, H: host bone, M: mucosa, OS: osteoclast, OB: osteoblast, B: grafted bone, NB: new bone.