대한정형외과학회지 제23권 제 3 호
J. of Korean Orthop. Assoc.
Vol. 23, No. 3, June 1988

동결건조골에 대한 소고

한림의과대학 정형외과학교실

장 익 열

=Abstract=

A Study on Freeze-Dried Bone

Ik Yull Chang, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Kang Nam Sacred Heart Hospital, Hallym University, Seoul, Korea

I had an opportunity to visit U.S. Naval Tissue Bank and observed tissue procurement and preservation by freeze-drying method and its clinical application while I stayed in the Naval Hospital, Bethesda in 1954.

The freeze-dried tissues, especially bone graft, has shown excellent bone repair experimentally and clinically.

Recently the mechanisms of osteoinduction have observed by many researchers and isolated the substance, bone morphogenetic protein, and clarified the interaction between BMP and the determined or inducible osteoprogenitor cells.

Key Words : Freeze-Dried Bone.

서 론

저자는 1949년 의과대학을 졸업, 현 고려대학교 의과대학 전신인 서울여자 의과대학에서 김용규외과교실의 조교로 근무하게 되었으며 따라서 일반외과 환자를 주로 치료하였고, 때로는 신경외과, 또는 정형외과 환자들의 치료도 담당하였었다.

그러나 저자의 관심과 취향은 신경외과학에 있었으며, 당시 새로운 분야로서의 신경외과학은 많은 외과의들의 관심의 대상이기도 하였다. 따라서 오늘날과 같이 세분화되지 못한 상태에서 모든 외과계 환자들을 치료하였었다.

1950년 한국전쟁이 일어나자, 각 병원에서는 전상환자들을 수용, 치료하게 되었으며, 치료대상 환자들은 처음 수일간은 국군 전상자들 이었으나, 그후 9.28수복때까지는 북괴 인민군 전상자들 이었다. 9.28수복과 함께 수도를 탈환하게 되자, 저자는 해군에 입대하여, 군의관으로서, 해군, 해병대의 전후방 각 부대에서 외과의로서, 전상자 치료에 심혈을 기울였으며, 제주도 해군병원 외과과장으로 부임한 후에는 더욱 전상자 치료에 열중하여, 일반외과, 정형외과 환자들은 물론, 신경외과 환자에 이르기까지 주야로 치료에 임하였으며, 생활의 모든 것이 수술실에서 이루어졌었다.

1954년 6월, 저자는 정형외과학을 전공하라는 군의 명령에 따라 미국유학의 길을 걷게 되었다. 그 당시 저자의 관심은 오히려 신경외과학에 있었으나, 군의 명령에 의해 부득이 정형외과학을 전공하게 되었다.

저자가 도착한 곳은 미국 워싱턴 근교에 위치한 베데스타 해군병원이었으며, 이곳은 제 2 차 세계대전 당시에 루즈벨트 대통령의 특명에 의하여 건립된 초근대식 병원으로서, 현재도 월터 리드 육군병원과 쌍벽을 이루는, 워싱턴 8경의 하나로 매우 아름다운 병원이었다.

이곳에는 NNMC(National Naval Medical Center)라고 하여, 해군병원과 함께 해군 군의

학교, 의학연구소, 치의학교 및 의무행정학교등 다섯개의 기관으로 구성되어 있었다.

저자는 해군병원에서 근무하게 되었으며, 이때 군의학교에 속해있는 조직은행(tissue bank)에 관심을 갖게 되었다. 이 조직은행에서는 동결건조법(Freeze-Drying Method)으로 조작된 골, 연골, 동맥, 건, 근막, 피부편등을 보존하고 있었다. 조직은행의 책임자로서 정형외과 의사가 겸임하고 있었으므로, 저자는 이곳에 자주 갈 수 있었으며, 많은 것을 배우고, 실제로 사체로부터 조직을 채취할 경우에는 그들과 함께 수술실에서 직접 조직들을 절취, 처치하기도 하였다. 당시에 조직채취 과정중에서 가장 중요한 부분은 무균조작으로서 마스크와 고무장갑등을 2중으로 착용함은 물론이며, 발마저도 무균상태로 차단하여 철저히 감염에 대비하였다.

동결건조법을 착안하게 된 연유로는, 한국전쟁이 일어나자 미군 전상자가 다량으로 발생하였으며, 따라서 골이식술의 필요성이 증대함에 따라 골은행을 설치, 항상 보존골을 공급할 수 있도록 하므로써, 수술시간과 회복기간을 단축시키고, 동시에 쇼크와 술후 동통경감을 위한 노력이 필요하였던 것이다. 그러나 당시의 신선냉동보존법은 고가의 기구와 운반의 불편, 무균상태 유지의 어려움등으로 단점이 많아 새로운 방법을 강구하던 중 동결건조법을 착안하게 되었던 것이다.

1. 건조혈청의 발견

제 2 차 세계대전이 발발하자, 일본과 미국은 태평양상에서 전쟁을 하게 되었고, 따라서 대부분의 미군들은 태평양함대 사령부가 있는 하와이를 경유하여 전선으로 배치되고 또 후방으로 돌아왔으며 모든 전상자들도 일단 하와이에 수용되었다가 본토로 후송되었다. 당시 하와이는 군사적특성으로 인하여 재정이 풍부하였으며, 적십자사의 활동도 활발하여 이곳 적십자사에서 전상자들에게 가장 필요한 것이 전혈 (Whold Blood)인 것을 알고 있었으나, 당시의 수송능력으로는 본토에서 전달되는 전혈량이 부족할 뿐만 아니라, 수송과정의 시간이 너무 길어 보존기간이 초과, 폐기되는 경우가 많았고, 더우기 적절한 혈액형의 전혈을 얻기도 어려웠다고 한다. 따라서 하와이의 적십자사는 본토에서의 개선대책을 호소하여, 이에 따라서 펜실베니아대학의 세균학교실 Flosdorf 교수는, 건조상태에서만 자라는 세균에 착안, 연구를 시작하였으며, 그는 건조상태를 만들기 위하여 가열하지 않고, 대신 감압장치를 이용하였다. 이와같은 방법을 혈청에 적용하면, 단백질과 기타 필수물질이 변질되지 않은 상태로 건조될 것으로 생각하였으며, 또한 혈청을 동결시켜서 고형(固形)으로 만들어 고체상태에서 승화작용(昇華作用)에 의하여 직접 기체상태로 변화시키는 방법을 이용하면 이상적인 건조혈청을 얻을 수 있을 것으로 생각하여, 동결시킨 혈청을 진공기에 넣어 건조시킴으로서, 건조혈청 제작에 성공하였으며, 이것이 인체에서 전혈에 못지않은 중요한 역할을 하는 것을 발견하였다.

그러나, 이종단백으로 인한 알레르기성 반응(allergic reaction)이 생기기 때문에, 수많은 사람의 혈청을 혼합한 다가혈청(多價血清, polyvalent plasma)을 이용, 건조시킨, 소위 건조혈청인 Human Plasma를 완성하였다. 이와 같은 과정을 Lyophilization이라고 하였으며, 건조혈청 (lyophilized plasma)에 생리식염수를 가하여 간단히 사용할 수 있는 것이었다. 이에 대한 필요성은 당시 일본에서도 마찬가지였으며, 미군포로들로부터 Human Plasma에 관한 정보는 획득하였으나 제조과정에 대하여는, 전혀 알지 못하였음으로 그 제조과정 및 제작을 학계에 요청하게 되었다. 돌이켜보면 저자가 의과대학 재학시절에 생화학교수의 얼굴도 못보고, 강의도 듣지 못한 사실은 이때문 이었다. 생화학교실의 나까무라(中村) 교수는 오로지 연구실에서 건조혈청 제작에만 몰두하였으나 전쟁이 끝날 때까지도 그 제조방법을 규명하지 못하였다.

2. 냉동건조 조직의 착상

베데스타 해군병원 정형외과 과장이었던 F.P. Kreuz는 G.W. Hyatt를 위시하여, T.C. Turner, A.L. Basett등과 함께 팀을 구성하여, 동결건조혈청(lyophilized plasma)과 같은 제조방법이 골에도 적용가능할 것으로 생각되어, 건조혈청을 발견한 Stokes기기회사 연구발전실장 Flosdorf (E.W. Flosdorf, Director, Research and Development Division, F.J. Stokes Machine Company)로 부터 그 가능성을 확인, 동물실험에 착수하였고, 그 결과 단순한 동결골보다 양호한 성적을 나타내므로, Stokes기기를 도입, 설치하게 되었다.

3. 배　　경

1867년 Ollier에 의해 동종골이식술이 발표된 이래, Macewen이 1878년 상박골 재건을 위하여 동종골이식을 시행 하였으며, 1934년 Ghormley[1], 1937년 Smith[2], 1942년 Inclan[3]등에 의하여 동종골이식술이 시행되어 좋은 결과를 얻었다고 보고 하였다. 더우기 Inclan은 자가골이식 34예 가운데 24예에서 성공 하였고, 2℃~5℃에 저장하였던 동종골이식 8예 가운데 6예에서 성공하였다고 보고 하였다.

1947년 Wilson[4]과, 1948년 Bush와 Garber[5]에 의하여 소개된 동결동종골 이식술은 정형외과학 발전에 크게 기여하였다. 동결상태로 보존한 동종골을 이식하여 그 임상결과를 장기간 추적한 결과, 그 성적이 양호하였으므로, 이후에 Bone Bank를 부설한 병원이 많아졌으며, 이와 같은 임상적 발전과 함께 한국전쟁으로 인한 많은 전상환자들의 치료에 큰 도움이 되었다.

베데스타 해군병원 정형외과의 Kreuz등은 보존 동종골 이식술을 연구하다가 결국에는 동결건조에 의한 골보존법을 연구하기로 결정하였으며, 이는 전술한 바와 같이 제 2 차 세계대전 당시 발견한 건조혈청방법을 인용하여 골보존에 적용한 것이다[6].

임상 성적이 진전됨에 따라, 계속적인 보존골이 필요하게 되었고, 또한 동종골이식의 결과를 분석하기 위하여 조직은행(tissue bank)이 해군 군의학교에 부설되어 G.W. Hyatt가 그 책임을 맡게 되었다. 이곳 조직은행에서는 사체로부터 조직을 채취하는데, 골뿐만아니라 연골, 동맥, 건, 근막, 뇌막, 피부편등을 절취 하였고, 채취된 조직은 즉시 −72 C(무수알코홀에 드라이 아이스를 가한다)에 동결 시킨다. 그후 동결된 상태에서 Stokes동결건조기로 건조시키는데, 이때 기름펌프(Mechanical Oil Pump)를 이용, 진공(眞空)을 만들어, 골에서 수분을 거의 완전히 제거하게 된다. 이와 같은 조작은 약 2주간이 소요되며, 건조가 끝나면 건조기내의 온도를 실내온도까지 점차 상승시키며, 골을 소독된 진공용기에 밀봉하여 실온에서 보관하는 것이다. 이때 전과정에서 모든 조작은 무균상태하에서 이루어져야 하며, 공기중의 습기도 흡수되지 않도록 하여야 한다.

냉동건조골은 건조된 상태에서는 비교적 깨지기 쉬우나, 수술전에 생리식염수를 가하여 원상태로 복구시키면 탄력성(elasticity)과 물리적 성질(physical property)이 회복되며, 피질골을 복구시킬 경우에는 생리식염수로 약 24시간 처리하여야 하지만, 해면골의 경우에는 건조상태 그대로 수술부위에 직접 사용하기 때문에, 사용이 용이하며, 출혈된 혈액에 의하여 자연 복구가 가능하다.

4. 동결건조골의 특징

Kreuz와 Hyatt[7]등은 동결건조골의 특징을 다음 두가지로 설명하였다.

첫째, -72℃의 저온에서 급격히 동결시키므로서, 단백질의 변질(denaturation)을 극소화시킬 수 있고, 둘째, 동결상태에서 건조시키므로서, 건조과정중 계속 고체상태를 유지하기 때문에, 유해로운 염분의 농도를 감소 시킬 수 있다고 하였다.

Gersh[8]에 의하면 -20℃는 정상인체의 체액을 동결 시키기에는 충분한 온도이지만, 증발로 인한 수분의 감소로 염분의 농도가 증가되며, 따라서 결빙온도(freezing point)가 저하된다고 하였다. 그러므로 건조가 진행됨에 따라 염분농도는 더욱 증가하여 결빙온도가 -20℃ 이하로 내려갈 경우에는 오히려 동결된 고체가 용해된다고 하였으며, 이와 같이 건조하면 단백질의 변질이 초래되며, 이는 pH변화 뿐만아니라 용해효과에 의한 것으로 생각된다. 이와 같은 단백질의 변질, 즉 peptide chain의 재배열에 의한 단백질의 기본적인 물리적 성질의 변화는 이식골의 혈관재생을 지연시키는 요인이 되며, 자불골의 경우에서 혈관재생이 지연되는 것은 좋은 예라고 하겠다.

이와 같은 현상은 임상에서도 볼 수 있어서, Wilson은 1년간 저장한 동결골이, 단기간 저장한 동결골보다 임상결과가 만족하지 못하다는 것을 관찰하였고, Speed와 Smith는 3개월간 저장한 동결골에서 육안적으로 변색, 건조, 탄력소실등을 관찰하였다.

동결과정에 대하여도 급냉각(quick freezing)과 완냉각(slow freezing)에는 큰 차이가 있다. 급냉각때에는 온도의 충격(thermal shock)으로 세포의 생육력(viability)은 소실되지만, 빙결정(ice crystal)이 미세하고 균등하게, 혹은 균질(homogenous)하게 동결되며, 단백질, 효소, 비타민 등의 변화가 거의 없는 것이 특징이다. 그러나 완냉각때에는 세포의 생육성은 유지되지만,

빙결정이 크게 형성되어 세포막이 손상되고, 결빙상태가 불균형하게 되므로 건조후 이식하여도 그 성적은 양호하지 못하게 된다. 기타의 동결건조골의 장점으로는 보존기간이 비교적 장기간 가능하여 수십년까지도 보존 할 수 있고, 실내온도에서의 보존이 가능하며, 취급이 용이하고, 운반에도 편리하다.

1987년 Tomford와 Mankin[9]등은 보존골의 저장방법에 관하여, 동결저장, 동결건조저장, 냉장저장등을 비교 평가하였다. 이들의 평가에 의하면, -80℃에서 동결저장 하는 것이 가장 이상적이라고 하였으며, 그 이유로는 ① 효소의 파괴없이 장기간 저장할 수 있고, ② 기계적 냉동장치를 이용하면 합리적인 비용으로 -80℃를 유지할 수 있으며, ③ 액화질소를 사용하면 냉각제(coolant)를 계속 보충하여야 하므로 비경제적이라고 하였다. 또한 ④ 동결은 이식골의 생체역학적 변화를 초래하지 않는다고 하였다. 그러나 결점으로서는, ① 동결기(freezer)에는 항상 온도변화에 대비하여 경보장치 (alarm)와 감시장치(monitor)를 설치하여 용해되지 않도록 하여야 하며, 용해될 경우 collagenase와 protease등의 효소가 활성화되어 조직을 감성(減成, degrade)시킬 수 있다고 하였다. ② 또한 동결법은 동결건조법에 비해 항원성(antigenecity)을 감소 시키지 못한다고 하였고, ③ 동결장치는 많은 공간을 점유하며, ④ 정전될 경우에는 커다란 지장을 초래하기 때문에 액체탄산 등을 구비하여야 하고, ⑤ 동결건조법은 설치 당시에 비용이 많이 소요되지만 기계적 동결장치는 보다 많은 투자가 필요하다고 하였다. 동결건조방법에 대하여, Mankin등은 훌륭한 방법이라고 단정하였고, 그 장점은 장기간 보관이라고 하였다. 해군병원의 조직은행은 진공용기로 밀봉하므로 20년 이상 보존이 가능하다고 하였으며, 실제로 저자가 그곳에서 근무할 당시에도 그들은 장기간 보존을 자랑하고 있었고, 현재까지도 임상에서 많이 사용되고 있으며, 그 성적도 우수하다. 또한 전술한 바와 같이, 동결건조하므로써 항원성이 감소되어 면역반응이 적은 것이 특징이며[10], 진공용기에 밀폐하여 무균상태를 유지하기 때문에 항상 사용이 용이하다. 그러나 엄격한 무균상태를 유지하기 위하여, 건조기 내부를 E.T.O.(ethylene oxide)로 소독하여야 하며, 건조골은 역학적으로 약화된다고 하지만[11], 임상적으로는 그로인한 지장은 없었다고 한다[12].

5. 골유발 (Bone induction)

골이식후 골재생의 기본 기전은, 골형성(Osteogenesis), 골유발(osteoinduction), 골유도(osteoconduction) 이다[13]. 골형성은 기존의 분화된 골형성 세포(pre-existing differentiated bone forming cell), 또는 결정된 골형성 세포(determined osteoprogenitor cell)에 의하여 진행된다. 골유발은 골유발의 자극을 받은 결체조직(inducible osteoprogenitor cell)이 골형성 세포로 분화되는 것이며, 골유도는 이식골이 신생혈관과 잠행성대치작용(creeping substitution, Schleichender Ersatz)에 의하여 생성된 신생골의 발판(scaffolding)이 된다. 최근 골형성 물질, 골유발 물질, 골유도 물질의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 골유발에 관하여는, 1987년 Reddi[14~17]등에 의해서 탈광염골기질(demineralized bone matrix)을 사용한 골유발 과정을 여러단계로 관찰하였다. 그중에서 주된 단계로는 화학주성기(chemotaxis), 핵분열기(mitosis), 세포분화기 등으로서, ① 화학주성기는 화학적 반응에 따라 세포가 이전하는 것을 말하며, 탈광염골기질은 주위 세포의 화학주성을 상승시킨다고 한다. 즉 혈장내의 fibrinectin은 이식된 골기질에 잘 결합하며, 이는 450 Kd의 분자량을 가진 단백질로서 화학주성과 유사분열성을 가지고 있다고 한다. ② 핵분열기에서, 골기질은 국소 핵분열원으로 작용하여 새로운 간엽세포를 증식 시킨다[18]. ③ 또한 세포분화기에는 먼저 연골이 생기는데, 이는 기질세포의 상호작용에 의하여 증식된 간엽세포를 연골아세포로 변화시키고, 이는 연골세포로 된다.

연골세포는 점차 비대되고, 비대된 연골세포의 기질은 석회화되며, 이어서 혈관이 침입하여 골을 형성하게 된다(Table 1).

생화학적 변화도 세포변화에 동일하게 진행된다. 즉, 간엽세포가 증식하는 시기에는 세포내의 DNA에 함유되어 있는 [^{3}H]-thymidine의 양이 증가한다. 연골의 증식은 연골 고유의 proteoglycan에 함유되어 있는 $^{35}SO_4$의 양을 증가시킨다. 골형성과 신생골의 석회화는 alkaline phosphatase의 증가와 ^{45}Ca의 증가로 증명되며, 골의 재형성시기(remodeling)에는 lysosomal enzyme이 증가한다.

이와 같이 골유발 인자의 작용이 규명되면서

Table 1. *Multistep Process of Bone Induction*

Time after implantation	Cellular events	Molecular processes
1 min	Blood clot formation Platelet release	Fibrin network formation Release of platelet-derived growth factors Binding of plasma fibronectin to implanted matrix
1 h	Arrival of polymorphonuclear leukocytes (PMN) by chemotaxis	Release of proteolytic enzymes such as collagenase and elastase Release of collagenous peptides
3～18 h	Accumulation of PMN Adhesion of cells	Limited proteolysis and release of chemotactic factors for fibroblasts
Day 1	Chemotaxis of fibroblasts and cell attachment to the implanted extracellular matrix	Release of peptides of fibronectin Increased cell motility Role of microtubules and microfilaments
Day 2	Continuation of chemotaxis for fibroblasts	Initiation of protein and uncleic acid synthesis Release of growth factors
	Signal transduction from matrix to cell surface	
Day 3	Cell proliferation	^{3}H-thymidine incorporation into DNA Increase in ornithine decarboxylase activity
	Cell proliferation	Type Ⅲ-collagen synthesis
Day 5	Differentiation of chondroblasts	Increase in $^{35}SO_4$ incorporation into proteoglycans
Day 7	Chondrocytes, synthesis and secretion of matrix	Type Ⅱ-collagen synthesis, cartilage-Specific proteoglycans
Day 9	Hypertrophy of chondrocytes	Increase in ^{45}Ca incorporation and alkaline phosphatase activity
	Calcification of cartilage matrix	Type Ⅳ-collagen synthesis Laminin and Factor Ⅷ in blood ves sels
	Vascular invasion	
Days 10～12	Osteoblasts Bone formation and mineralization	Type Ⅰ-collagen synthesis Bone proteoglycan synthesis Peak in ^{45}Ca incorporation and alkaline phosphatase activity
Day 12～18	Osteoclasts Bone remodeling and dissolution of the implanted matrix	Increase in lysosomal enzymes(acid phosphatase, aryl sulfatase, and β-glucuronidase) Upswing in accumulation of γ-carboxyglutamic acid containing protein (osteocalcin) Release of collagenases and proteases
Day 21	Bone marrow differentiation	Increase in ^{59}Fe incorporation into heme Accumulation of lysozyme Type Ⅲ-collagen synthesis

1979년 Urist[19]등은 이 인자를 분리하여 골형태발생 단백(Bone Morphogenetic Protein ; BMP)이라 명명하였다. 최근에는 BMP를 증강시켜 골유합과정을 실험적으로 성공시켰다. 이 BMP에

대하여, 수골측 골(recipient bone)은 2종류의 골형성 전계세포(precursor cell)가 있다[20,21]. 첫째, 기결 골형성 전계세포(determined osteogenic precursor cell), 또는 DOPC(determined osteoprogenitor cell)는 골표면이나 골수간질에 존재하며 간세포(stem cell)와 같은 역할을 하며, 골유발 물질의 영향을 받지 않고 독자적으로 골아세포로 분화된다. 둘째, 유발성 골형성 전계세포(inducible osteogenic precursor cell), 또는 IOPC(inducible osteoprogenitor cell)는 이식골로부터의 골유발인자의 존재하에 골형성 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 이 두종류 세포가운데 IOPC는 BMP에 의하여 자극되어 골형성에 참여하게 된다. 따라서 동결건조골 기질에는 BMP가 잘 보존되어 있으므로 골유합이 잘 되는 것으로 생각된다.

결 론

1. 제 2 차 세계대전에서 인간을 살상하기 위하여 원자탄을 발명한 반면에는 인간을 구하기 위하여 건조혈청(Human Plasma)을 발견하였다. 이는 인간의 혈청을 동결된 상태에서 승화의 원리로 감압건조 시킨 것이며, 이 과정을, Lyophilization이라고 하였다.

2. 한국전쟁을 계기로 베데스타 해군병원에서는 골 보존에 있어서 동결건조법이라는 새로운 방법을 고안하여 이식골로서는 물론, 실내온도에서 저장 할 수 있고, 진공상태로 보존하기 때문에 장기간 저장이 가능하며, 운반에도 편리한 잇점을 갖게 되었다. 1950년경 발족한 동결건조골은 지금도 그 임상성적이 우수하다.

3. 동결건조골은, 단백질은 물론, 효소, 비타민 등이 변하지 아니하므로, 골형성, 골유발, 골유도의 기능이 우수하여 골유합이 자가골 이식에 못지않은 우수한 성적을 나타낸다. 최근에는 골유발 인자를 분리하여 골 신생기전을 규명하고 있다.

REFERENCES

1) Ghormley, R.K. and Stuek, W.G. : *Experimental Bone Transplantation with Special Reference to the Effect of "Decalcification". Arch. Surg. 28 : 742 (April) 1934.*

2) Smith, A.D. : *Use of Homologous Bone Graft in Cases of Osteogenesis Imperfecta. Arch. Surg. 34 : 687 (April) 1937.*

3) Inclan, A. : *The Use of Preserved Bone Graft in Orthopaedic Surgery. J. Bone Surg. No. 1, January, 1942.*

4) Wilson, P.D. : *Experiences with a Bone Bank. Ann. Surg. 126 : 932-946, 1947.*

5) Bush, L.R. and Garber, C.Z. : *The Bone Bank. J. Am. Med. Assn., 137 : 588-591, 1948.*

6) Carr, C.R. and Hyatt, G.W. : *Clinical Evaluation of Freeze-Dried Bone Grafts. J. Bone Joint Surg., Vol. 37-A, No. 3, June, 1955.*

7) Kreuz, F.P., Hyatt, G.W., Turner, T.C. and Basset, A.S. : *The preservation and Clinical Use of Freeze-Dried Bone. J. Bone Joint Surg., Vol. 33-A, No. 4, 863-872, 1951.*

8) Gersh, I. : *The Altman Technique for Fixation by Drying with Freezing. Ant. Rec., 53 : 308-337, 1932.*

9) Tomford, W.W., Mankin, H.J., Friedlaeŭder, G.E. and Gibhardt, S.H. : *Methods of Banking Bone and Cartilage for Allograft Transplantation. Orthop. Clinics of North America, Vol. 18, No. 2, April, 1987.*

10) Friedlaeŭder, G.E., Strong, D.M. and Sell, K.W. : *Studies on the Antigenicity of Bone. I Freeze-Dried and Deep-frozen Allografts in Rabbits. J. Bone Joint Surg., 58-A, 854-858, 1976.*

11) Pelker, R.R., Friedlaeŭder, G.E. and Markham, T.C. : *Biomechanical Properties of Bone Allografts. Clin. Orthop. 174 : 54-57, 1983.*

12) Dick, H.M., Malinin, T.I. and Mnaymneh, W.A. : *Massive Allograft Implantation following Radical Resection of High-grade Tumors requiring Adjuvant Chemotherapy Treatment. Clin. Orthop. 197 : 88-95, 1985.*

13) Glowacki, J. and Mulliken, J.B. : *Demineralized Bone Implants. Clin. Plast. Surg., 12 : 233, 1985.*

14) Muthukumaran, N. and Reddi, A.H. : *Bone Matrix-induced Local Bone Induction.*

Clin. Orthop., 200 : 159, 1985.
15) Reddi, A.H. : *Cell Biology and Biochemistry of Endochondral Bone Development. Coll Redat Res 1 : 209, 1981.*
16) Reddi, A.H. Wientroub, S. and Muthukumaran, N. : *Biologic Principles of Bone induction. Orthop. Clinics of North America, Vol. 18, No, 2, April, 1987.*
17) Reddi, A.H. : *Extracellular matrix and Development. In Piez, K.A., Reddi, A.H. : Extracellular Matrix Biochemistry. New York, Elsevier, pp. 375-412, 1984.*
18) Rath, N.C. and Reddi, A.H. : *Collagenous Bone Matrix is a Local Mitogen Nature, 278 : 855-857, 1979.*
19) Urist, M.R., Mikulski, A. and Lietz, A. : *Solubilized and Insolubilized Bone Morphogenetic protein. Proc. Natl Acad Sci USA 76 : 1828, 1979.*
20) Friedenstein, A.J. : *Determined and inducible osteogenic Precursor Cells. Ciba Foundation Symposium Ⅱ. New York, Elsevier, p169, 1973.*
21) Vaughan, J. : *Osteogenesis and Haematopoiesis. Lancet 2 : 133, 1981.*