

## 맥동성 단극 자기장에 의한 탈회 촉진 효과

서울대학교 의과대학 병리학교실

이 석 근 · 정 은 영 · 김 기 진  
송 대 범 · 김 주 호 · 지 제 근

### An Effective Role of Pulsed Unipolar Magnetic Field for Bony Decalcification

Suk Keun Lee, D.D.S., Eun Young Chung, Gi Jin Kim, Dae Beom Song  
Ju Ho Kim, and Je G. Chi, M.D.

Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine

To achieve optimal decalcification in tissue and tissue preservation, we have tried magnetic field method and made some promising results. We used pulsed unipolar magnetic field obtained by rectification of 250 V-60 cycle, A.C. As a new method of bony decalcification, using 5% nitric acid, 10% formic acid and 10% formic acid+3% hydrochloric acid solutions, experimental groups were decalcified in the center of the magnetic field. The concentration of calcium ion in the decalcifying solution was measured by calcium-oxalate turbidity test by photometry method, and direct visualization of calcium radiopacity was obtained by soft X-ray view during the decalcification process. The pH change during decalcification was continuously checked and needle penetration method was also used. All the decalcification solution used in this study showed accelerated effect of bony decalcification in the strong magnetic field. Among them 5% nitric acid produced complete decalcification for the medium size bony specimen (less than 10×10×10 mm) within 24 hours, and the histologic feature was almost free of acid-chemical degeneration. The pH of all the decalcification solutions decreased in the strong magnetic field, maximum within 4~6 hours, and kept strong acidity throughout the decalcification procedure. After removal of the magnetic field the pH of all the decalcification solution returned to their original values after 24 hours. It was presumed that the cause of the accelerated decalcification in the magnetic field was due to combined effects of the rapid increase of acidity and the increased molecular resonance to stimulate the ionization of mineral elements. (**Korean J Pathol 1993; 27: 125~133**)

**Key Words:** Magnetic field, Decalcification, pH change, Bone

### 서 론

골조직의 탈회과정은 조직표본 제작에 필수적인데도 불구하고 탈회의 지연, 심부 골조직의 불충분한 탈회 및 장기간 산성 용액에 담가둠에 따른 조직 변성 등

접 수: 1992년 8월 10일, 게재승인: 1992년 12월 17일  
주 소: 서울시 중로구 연건동 28번지, 우편번호 110-744  
서울대학교 의과대학 병리학교실, 이석근

이 연구는 '93년도 서울대학교 병원 지정진료 연구비 지원에 의한 결과임.

이 항상 장애 요소가 되고 있다<sup>1)</sup>. 경골조직 탈회에는 편의상 흔히 5% 질산을 사용하고 있는데 이것은 조직이 강산에 장기간 노출됨으로써 조직을 변성시키는 단점이 있으며 통상의 전기 탈회법은 전극 위치에 따라 탈회 정도가 다르고 지나친 표재성 탈회로 경조직 표면의 손상이 심하며 자주 전극을 교환해 주어야 하는 단점들이 있다<sup>2)</sup>. 그리고 EDTA 같은 중성 탈회법은 탈회에 의한 항원의 보존성은 우수하지만 지나치게 탈회 기간이 지연되거나 장기간 탈회할 때 연조직이 쉽게 용해되는 단점들이 있어 불리하다<sup>3)</sup>. 한편 자기장의 물리적 성질중에서 유도 전류 발생과 분자의 자기공명

현상 등은 잘 알려져 있으며 자기장의 생체에 미치는 영향에 관하여 광범위하게 연구되고 있다. 본 연구는 조직손상을 극소화 하면서 탈회효과를 극대화하는 방법에 관한 것으로서 저자들은 탈회용액내에 일정한 파장의 동일 극성의 강한 자기장을 조사한 경우 경조직 탈회를 촉진시켜서 탈회 시간을 단축시킬 뿐 아니라 산성 용액에 조직 손상을 줄이는 효과를 보았기에 이를 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

연속적인 맥동성 직류 전원을 얻기 위하여 가정용 전원인 100 volt 60 cycle(10 A) 교류 전원을 트랜스를 통하여 250 volt로 상승 시켰으며 정류 다이오드를 사용해서 직류 전원으로 바꾸었다. 직경 15 cm의 원통형 용기 외벽에 다량의 에나멜 코일을 감아서 강한 자기장(1000 Gauss 이상)을 발생시켰으며 전류 장치의 발열에 의한 탈회액 온도 상승을 막기 위하여 자기장내에 별도의 작은 용기를 사용해서 온도 상승이 대조군에 비하여 3~5°C 이내로 조정 하였다.

탈회용액은 ① 5%질산, ② 10% 개미산, ③ 10% 개미산+3% 염산 등 3군으로 나누어 실험하였다. 일반적으로 탈회표본의 크기는 침생검 조직인 경우 침형, 5×5×5 mm 이하인 경우 소형, 10×10×10 mm 이상인 경우 대형이라 하고 그중간 크기를 중형으로 구분하였다. 침형은 주로 골수 조직 생검 표본을 사용 하였으며 10% 중성 포르말린에 고정한 후 탈회하였다. 소형은 골조직 소파술등으로 적출된 작은 골편들로서 10% 중성 포르말린에 고정한 후 탈회하였다. 중형 및 대형은 골 절제술에서 얻은 피질골과 해면골을 포함하는 골편으로서 크기에 따라 구별하였고 10% 중성 포르말린에 고정한 후 탈회하였다. 탈회 정도는 핀이 탈회조직을 쉽게 관통하는 것을 평가하는 탐침검사로 하였고, 조직표본 제작은 통상 방법에 의하여 파라핀 봉입한 후, 박절하여 탈수하고 hematoxylin-eosin(H&E) 염색으로 검경하였다.

탈회 속도를 평가하기 위하여 탈회액의 pH 변화를 pH측정계(DMS, DP-880)로 측정하였으며 calcium oxalate 형성에 의한 혼탁도는 분광광도계 spectrophotometer, (Pharmacia, LKB)로 흡광도(700 nm)를 비교하였다. 이는 5% 질산 용액군과 10% 개미산 용액군에서 조사하였는데 사람의 정상 대퇴골의 골단중절(metaphysis)에서 피질골과 해면골을 3 mm 두께의 절편으로 자른후 5 gm씩을 10% 중성 포르말린에 고정하고 각각의 탈회액 50 cc에 넣어 탈회하였다. 탈회후 24시간마다 각각 대조군과 실험군에서 3 cc의 탈회액을 채취하여 실험군은 자기장이 없는 곳에서 이틀간 방치 시킨 후 pH를 측정하였다. 그리고 탈회후 매시간마다 각각 대조군과 실험군에서 0.5 cc의 탈회액을 채취하여 실험군은 자기장이 없는 곳에서

이틀간 방치 시킨 후 5 cc의 ammonium oxalate 용액으로 반응시켜서 calcium oxalate의 혼탁액을 얻었으며 700 nm의 파장에서 흡광도를 조사하여 대조군과 실험군의 칼슘 이온의 용해 정도를 비교하였다. 한편 경조직 탈회 정도를 직접 확인하기 위하여 soft X-ray 촬영하였는데 탈회표본 종류에 따른 X-ray 상의 변화가 크므로 정상적 발육을 보인 만기 태아(태령 약 38~40 주)의 양측 대퇴골을 적출하여 각기 실험군과 대조군으로 분류하였으며 탈회기간 중에 주기적으로 50 KVP-30초의 조건으로 soft X-ray를 촬영해서 탈회 양상과 정도를 비교하였다. 이상의 실험과정에서 탐침검사에 의한 표본제작은 각 실험군에 따라 여러차례 실시한후 현미경 표본을 제작하였으며 현미경상에서 염색성이 우수한 경우의 결과를 채택하였다. PH 측정은 오차를 줄이기 위해서 각 실험군마다 실험개시 전에 pH 측정기를 pH 7로 표준화 시켰으며 각 실험군의 결과가 일정한 변화값을 얻을 때까지 2~3차 반복 실시하였다.

### 결 과

#### 1. 탐침검사에 의한 탈회 정도 및 현미경 조직표본의 염색상

##### 1) 5%질산(nitric acid)용액:

###### (1) 침형:

**대조군:** 5% 질산 용액에 10~12시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다. 5% 질산 용액에서 하루밤이 지난 경우, 즉 15시간 이상 경과한 경우 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다.

**실험군:** 5% 질산 용액에 3~5시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E의 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간이 약 10시간 이상 경과한 경우에는 H&E염색상에서 심한 변색을 보였다.

###### (2) 소형:

**대조군:** 5% 질산 용액에 48시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 60시간 경과 후에는 심부에서 H&E 염색상에 심한 변색이 관찰되었다.

**실험군:** 5% 질산 용액에 18~20시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간 30시간 이상 경과시에는 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색을 보였다.

###### (3) 중형:

**대조군:** 5% 질산 용액에 62~66시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다. 5% 질산 용액에서

80시간 이상 경과한 경우 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색이 관찰되었다.

**실험군;** 5% 질산 용액에서 22~26시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E의 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간이 40시간 이상 경과시에는 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색을 보였다.

#### (4) 대형;

**대조군;** 5% 질산 용액에 72~90시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다. 5% 질산 용액에서 100시간 이상 경과한 경우 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색이 관찰되었다.

**실험군;** 5% 질산 용액에 32~38시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간이 50시간 이상 경과시에는 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색을 보였다.

#### 2) 10% 개미산(formic acid)용액:

##### (1) 침형;

**대조군;** 10% 개미산 용액에 24~30시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다.

**실험군;** 10% 개미산 용액에 8~10시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간이 20시간 이상 경과시에는 H&E 염색상에서 심한 변색을 보였다.

##### (2) 소형;

**대조군;** 10% 개미산 용액에 72~80시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다. 10% 개미산 용액에서 100시간 이상의 경과한 경우 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색이 관찰되었다.

**실험군;** 10% 개미산 용액에 40~60시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간이 50시간 이상 경과시에는 H&E 염색상에서 심한 변색을 보였다.

##### (3) 중형;

**대조군;** 10% 개미산 용액에 110~130시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다. 10% 개미산 용액에서 150시간 이상 경과한 경우 심부에서 H&E 염색에서 심한 변색이 관찰되었다.

**실험군;** 10% 개미산 용액에 70~90시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간이 90시간 이상 경과시에는 H&E 염색상에서 심한 변색을 보였다.

#### (4) 대형;

**대조군;** 10% 개미산 용액에 200~240시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다. 10% 개미산 용액에서 300시간 이상 경과한 경우 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색이 관찰되었다.

**실험군;** 10% 개미산 용액에 120~140시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간이 200시간 이상 경과시에는 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색을 보였다.

#### 3) 10% 개미산+3% 염산(10% formic acid+3% hydrochloric acid) 용액:

##### (1) 침형;

**대조군;** 10% 개미산+3% 염산 용액에 10~12시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다. 10% 개미산+3% 염산 용액에서 40시간 이상 경과한 경우 심부에서 H&E 염색에서 심한 변색이 관찰되었다.

**실험군;** 10% 개미산+3% 염산 용액에 3~5시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간이 15시간 이상 경과시에는 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색을 보였다.

##### (2) 소형;

**대조군;** 10% 개미산+3% 염산 용액에 40~46시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다. 10% 개미산+3% 염산 용액에서 60시간 이상 경과한 경우 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색이 관찰되었다.

**실험군;** 10% 개미산+3% 염산 용액에 16~18시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간이 30시간 이상 경과시에는 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색을 보였다.

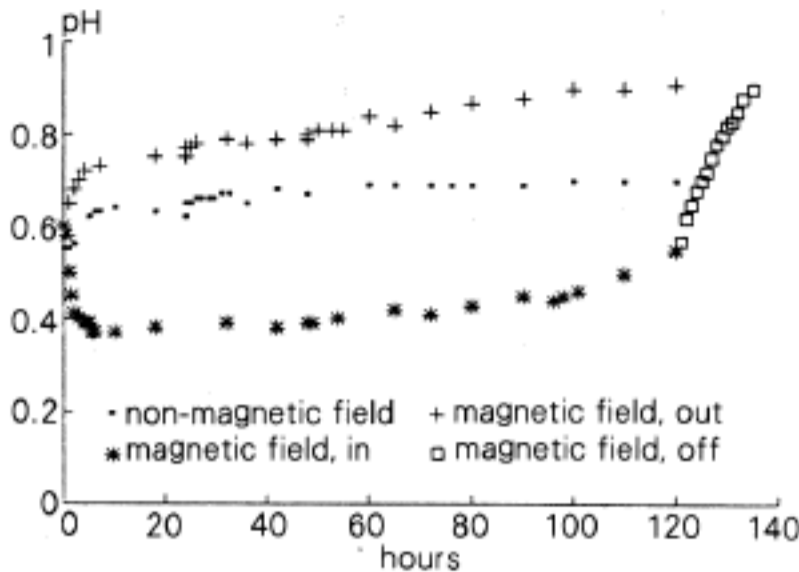
##### (3) 중형;

**대조군;** 10% 개미산+3% 염산 용액에 58~62시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다. 10% 개미산+3% 염산 용액에서 100시간 이상 경과한 경우 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색이 관찰되었다.

**실험군;** 10% 개미산+3% 염산 용액에 20~22시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색상의 변색은 경미하였다. 그러나 탈회 기간이 30시간 이상 경과시에는 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색을 보였다.

##### (4) 대형;

**대조군;** 10% 개미산+3% 염산 용액에 66~70시간 경과했을 때 조직 표본 제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색에서 약간의 변색이 관찰되었다. 10%



**Fig. 1a.** PH change of 5% nitric acid, comparing between the control and experimental groups. Non-magnetic field; control group. Magnetic field; experimental group. Magnetic field, out; experimental group, checked out of the magnetic field after two days. Magnetic field, off; experimental group, checked after turning off the magnetic field.

개미산+3% 염산 용액에서 120시간 이상 경과한 경우 심부에서 H&E 염색상의 심한 변색이 관찰되었다.

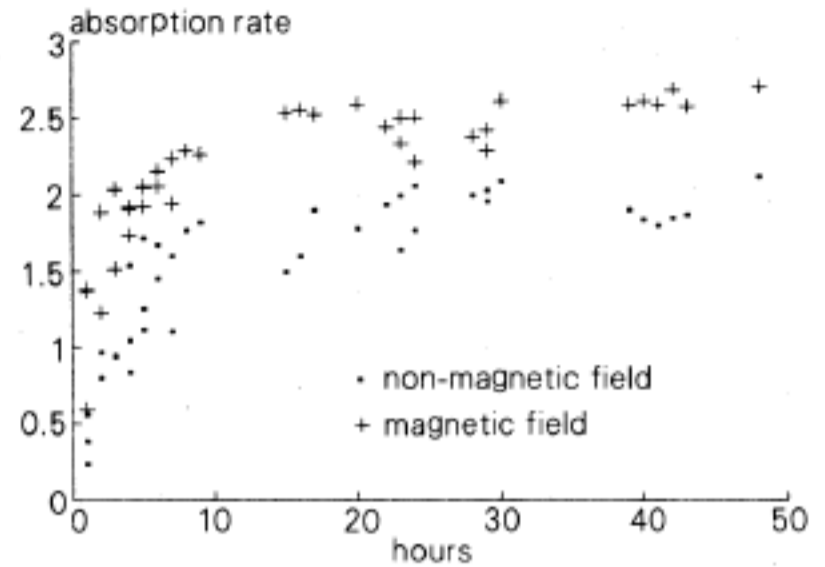
**실험군:** 10% 개미산+3% 염산 용액에 28~32시간 경과했을 때 조직 표본제작에 적합한 탈회도를 보였으며 H&E 염색상의 심한 변색을 보였다.

## 2. 탈회액의 pH변화

일반적으로 대조군에 비하여 실험군에서 pH의 증가가 더 강하였으나 탈회 72시간 후에도 탈회액은 초기의 pH에 비하여 감소되지 않았고 탈회 120시간 후에도 탈회액은 강산성을 보였다.

**1) 5% 질산 용액:** 탈회전의 pH는 0.60 정도이었고 대조군에서는 탈회 24시간 후에 pH 0.65, 탈회 48시간 후에 pH 0.67, 탈회 129시간 후에는 pH 0.68이었으며, 실험군에서는 자기장에 의한 영향이 뚜렷하였는데 실험중 채취한 탈회액을 자기장 밖에서 2일후 pH를 측정할 경우 탈회 24시간 후에는 pH 0.75, 탈회 48시간 후에 pH 0.80, 탈회 120시간 후에는 pH 0.90이었다. 한편 실험중 자기장내에 계속 pH를 측정할 경우 12시간내에 급속한 pH의 감소를 보였으며 탈회 24시간 후에는 pH 0.37, 탈회 48시간에는 pH 0.40, 탈회 120시간에는 pH 0.55의 강한 산성을 유지하였는데, 이 경우 전원을 차단하여 자기장을 소멸시키면 10시간 이내에 빠른 pH의 상승이 관찰되어서 자기장내에서 탈회 120시간후 자기장 소멸 16시간경에는 pH 0.90으로 증가되었다(Fig. 1a).

**2) 10% 개미산 용액:** 탈회전의 pH는 1.9 정도이었고 대조군에서는 탈회 6시간 후에 pH 2.45, 탈회



**Fig. 1b.** Calcium oxalate turbidity of 5% nitric acid comparing between control group and experimental group. Non-magnetic field; control group. Magnetic field; experimental group.

12시간 후에 pH 2.55, 탈회 24시간 후에는 pH 2.63이었으며 실험군에서는 자기장에 의한 영향이 뚜렷하였는데 실험중 채취한 탈회액을 자기장 밖에서 2일후 pH를 측정할 경우 탈회 6시간 후에는 pH 3.0, 탈회 12시간 후에 pH 3.1, 탈회 24시간 후에는 pH 3.1이었다. 한편 실험중 자기장내에서 계속 pH를 측정할 경우 6시간내에 급속한 pH의 감소를 보였으며 탈회 6시간 후에는 pH 1.55, 탈회 12시간에는 pH 2.7, 탈회 24시간에는 pH 2.45이었는데, 이 경우 전원을 차단하여 자기장을 소멸시키면 10시간 이내에 빠른 pH의 상승이 관찰되어서 자기장내에서 탈회 30시간후 자기장 소멸 10시간경에는 pH 3.1로 증가되었다(Fig. 2a).

**3) 10% 개미산+3% 염산 용액:** 탈회전의 pH는 0.43정도이었고 대조군에서는 탈회 10시간 후에 pH 0.45, 탈회 20시간 후에 pH 0.48, 탈회 30시간 후에는 pH 0.5 정도이었으며 실험군에서는 탈회액을 이들 이상 자기장이 미치지 않는 곳에 방치시킨 후 측정할 pH값은 탈회 10시간 후에는 pH 0.52이고, 탈회 20시간후 후에는 pH 0.55이고, 탈회 32시간 후에는 pH 0.6정도이었으며 탈회중 자기장내에서의 pH는 탈회 10시간 후에는 0.26이고, 탈회 20시간 후에는 pH 0.25이며, 탈회 32시간 후에는 pH 0.32이었는데, 이때 부터 자기장을 소멸시켰을 경우 탈회 40시간까지 pH가 점차 상승하여 pH 0.58로 회복되었으며 실험군의 이틀간 방치 시킨 경우와 유사한 pH 값을 나타냈다(Fig. 3a).

## 3. Calcium 이온의 용해도

탈회액내에 용해된 칼슘이온의 양을 측정하기 위하여 calcium oxalate의 침전물을 만들었으며 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

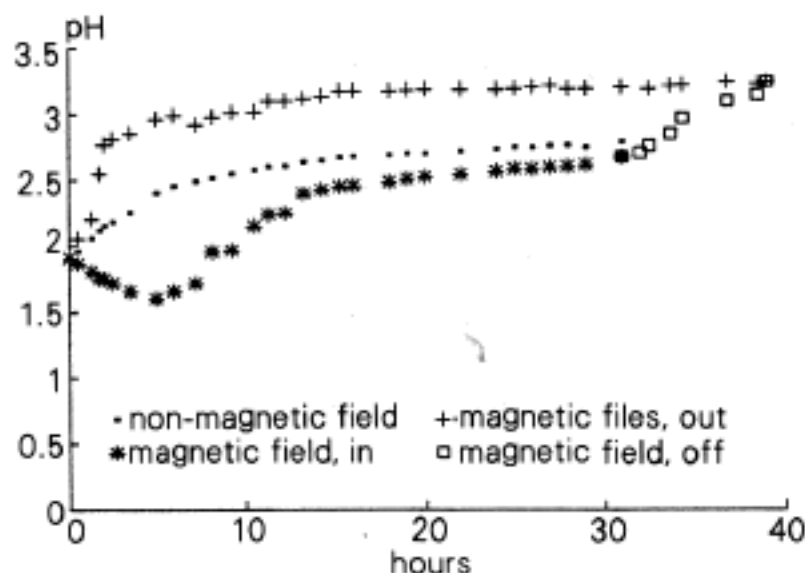


Fig. 2a. PH change of 10% formic acid, comparing between the control and experimental groups.

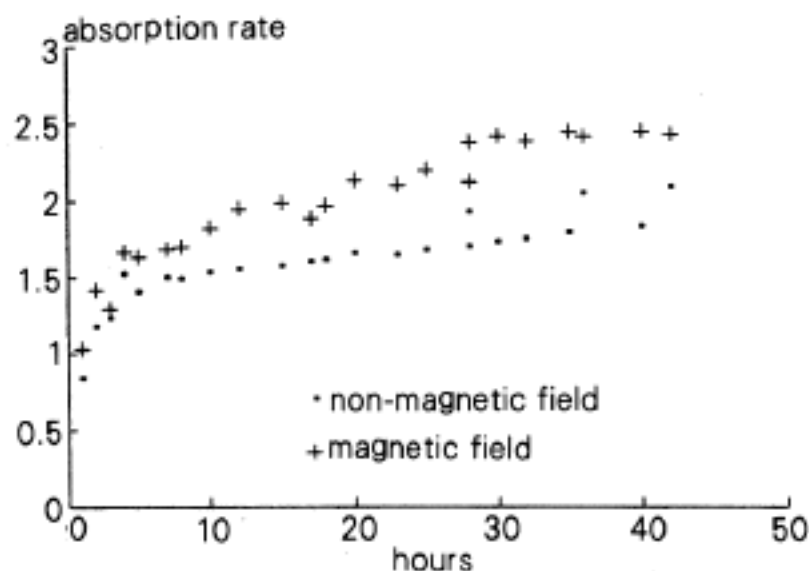


Fig. 2b. Calcium oxalate turbidity of 10% formic acid comparing between control group and experimental group.

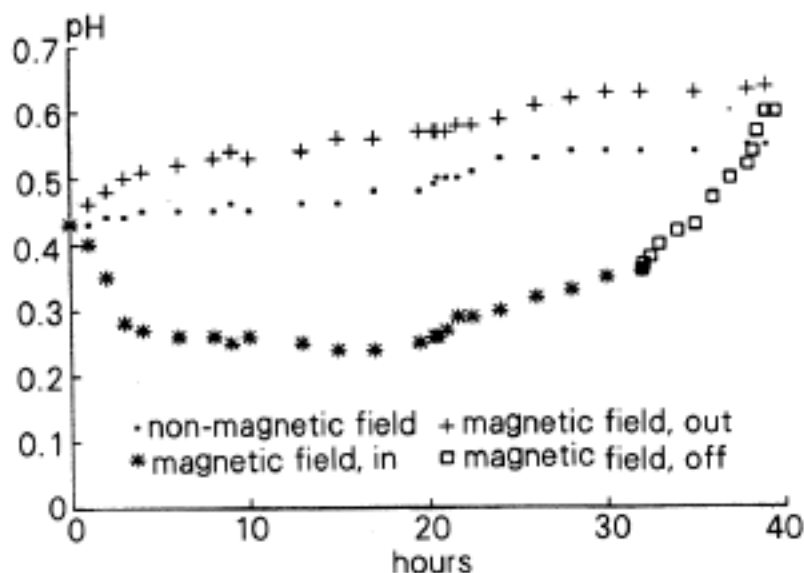


Fig. 3a. pH change of 10% formic acid+3% hydrochloric acid, comparing between the control and experimental groups.

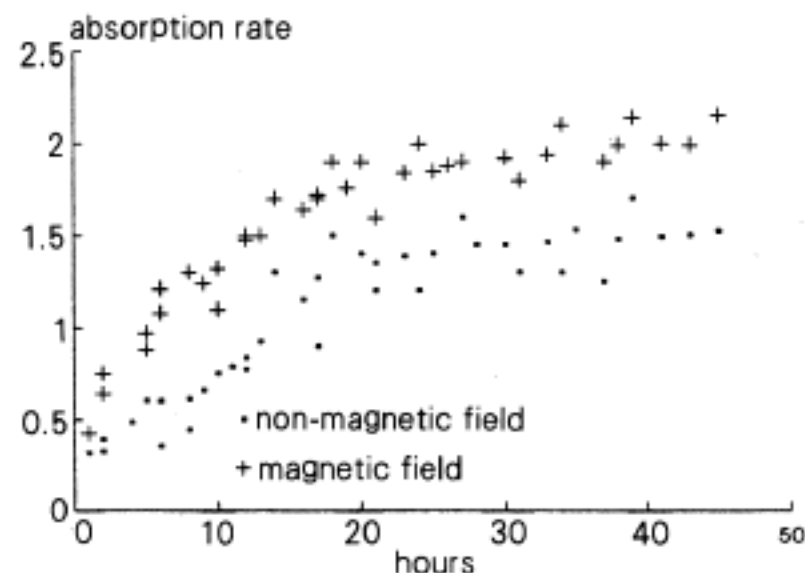


Fig. 3b. Calcium oxalate turbidity of 10% formic acid +3% hydrochloric acid comparing between control group and experimental group.

1) 5% 질산 용액: 대조군에 비하여 실험군에서 탈회 후 10시간내에 calcium oxalate 형성에 의한 흡광도의 증가가 현저하였으며 탈회 후 15시간후에는 대조군의 흡광도가 1.5 인데 비하여 실험군에서는 2.5 정도로 높았으며 탈회 지속 48시간후에도 대조군에 비하여 실험군에서 높은 흡광도를 보였다(Fig. 1b).

2) 10% 개미산 용액: 대조군에 비하여 실험군에서 탈회 후 20시간 이내에 calcium oxalate 형성에 의한 흡광도의 높은 증가를 보였으며 탈회 후 40시간까지 대체로 완만한 증가를 보여서 대조군에서는 흡광도가 1.6까지 증가하였으며 실험군에서는 2.5까지 증가하였다(Fig. 2b).

3) 10% 개미산+3% 염산 용액: 대조군에 비하여 실험군에서 탈회 후 20시간 이내에 calcium oxalate 형성에 의한 흡광도의 높은 증가를 보였으며 탈회 후

40시간까지 대체로 완만한 증가를 보여서 대조군에서는 흡광도가 1.5까지 증가하였으며 실험군에서는 2.3까지 증가하였다(Fig. 3b).

#### 4. Soft X-ray 소견 관찰

동일한 골표본을 얻기 위하여 만기(태령 38~40주)에 사산된 태아의 양측 대퇴골을 대조군과 실험군으로 구분하였으며 이 경우 피질골과 해면골에서의 탈회 진행 상태를 비교하였다(Table 2).

1) 5% 질산 용액: 대조군에서는 탈회 12시간후에 연골층에 탈회가 진행되었으며 탈회 16시간후에는 피질골부에 경도의 탈회가 보였고 탈회 32시간 경에는 피질골의 탈회가 거의 완전히 이루어졌으며 탈회 40시간경에는 중심부에서 탈회가 진행되었으며 탈회 72시간경에는 중심부에서도 완전히 탈회가 이루어 졌다.

**Table 1.** Comparison of decalcifying rate between the control and experimental groups, estimated by pin insertion test on the various sized specimens

Solutions	Needle size		Small size		Medium size		Large size	
	Cont.	Exp.	Cont.	Exp.	Cont.	Exp.	Cont.	Exp.
50% nitric acid	10~12	3~5	48~52	18~20	62~66	22~26	72~90	32~38
10% formic acid	24~30	8~10	72~80	40~60	110~130	70~90	200~240	120~140
10% formic acid +3% HCl	10~12	3~5	40~46	16~18	58~62	20~22	66~70	28~32

unit; hour, Cont.; control group, Exp.; experimental group

**Table 2.** Decalcifying effect on the soft X-ray view with both femurs of full term human fetuses

Solutions		6h	12h	16h	20h	24h	32h	40h	48h	72h
5% nitric acid	Control	0~1	1	2	2	2~3	3	4	4	5
	Magnetic	1	2	2~3	3	3~4	4	4~5	5	5
10% formic acid	Control	0	0	0~1	1	2	2	2~3	3	4
	Magnetic	0	1	2	2	2~3	3	3	4	4~5
10% formic acid +3% HCl	Control	0	1	2	2	3	3~4	4	4~5	5
	Magnetic	1	2	2~3	3	3~4	4	4~5	5	5

unit; hour(h)

Degree: 0; on decalcification,

- 1; decalcification of cartilaginous layer
- 2; partial decalcification of cortical layer
- 3; complete decalcification of cortical layer
- 4; partial decalcification of central portion of bone
- 5; complete decalcification of central portion of bone

실험군에서는 탈회 6시간후에 연골층에 탈회가 진행되었으며 탈회 12시간후에는 피질골부에 경도의 탈회가 보였고 탈회 20시간경에는 피질골의 탈회가 거의 완전히 이루어졌으며 탈회 32시간경에는 중심부에서 탈회가 진행되었으며 탈회 48시간경에는 중심부에서도 거의 완전히 탈회가 이루어졌다(Fig. 4a, ab, 4c).

**2) 10% 개미산 용액:** 대조군에서는 탈회 16시간후에 연골층에 탈회가 진행되었으며 탈회 24시간후에 피질골부에 경도의 탈회가 보였고 탈회 48시간경에는 피질골의 탈회가 거의 완전히 이루어졌으며 탈회 72시간경에는 중심부에서 부분적으로 탈회가 진행되었다.

실험군에서는 탈회 12시간후에 연골층에 탈회가 진행되었으며 탈회 16시간후에는 피질골부에 경도의 탈회가 보였고 탈회 32시간경에는 피질골의 탈회가 거의 완전히 이루어졌으며 탈회 48시간경에는 중심부에서 탈회가 진행되었으며 탈회 72시간경에는 중심부에서 탈회가 증가되었다.

**3) 10% 개미산 + 3% 염산 용액:** 대조군에서는 탈

회 12시간후에 연골층에 탈회가 진행되었으며 탈회 16시간후에는 피질골부에 경도의 탈회가 보였고 탈회 24시간경에는 피질골의 탈회가 거의 완전히 이루어졌으며 탈회 40시간경에는 중심부에서 탈회가 진행되었으며 탈회 72시간경에는 중심부에서도 거의 완전히 탈회가 이루어졌다.

실험군에서는 탈회 6시간후에 연골층에 탈회가 진행되었으며 탈회 12시간후에는 피질골부에 경도의 탈회가 보였고 탈회 20시간경에는 피질골의 탈회가 거의 완전히 이루어졌으며 탈회 32시간경에는 중심부에서 탈회가 진행되었으며 탈회 48시간경에는 중심부에서도 거의 완전한 탈회가 이루어졌다.

### 5. 대조군과 실험군의 동일한 산성도 유지하에서의 탈회

자기장에 의한 pH 강하가 탈회 촉진의 주요 원인인가를 확인하기 위하여 pH 0.37(자기장내에서 5% 질산 용액이 최대로 강하되는 pH 값)의 질산 용액을 대조군의 탈회액으로 사용하였으며 각각 만기 태아의 대

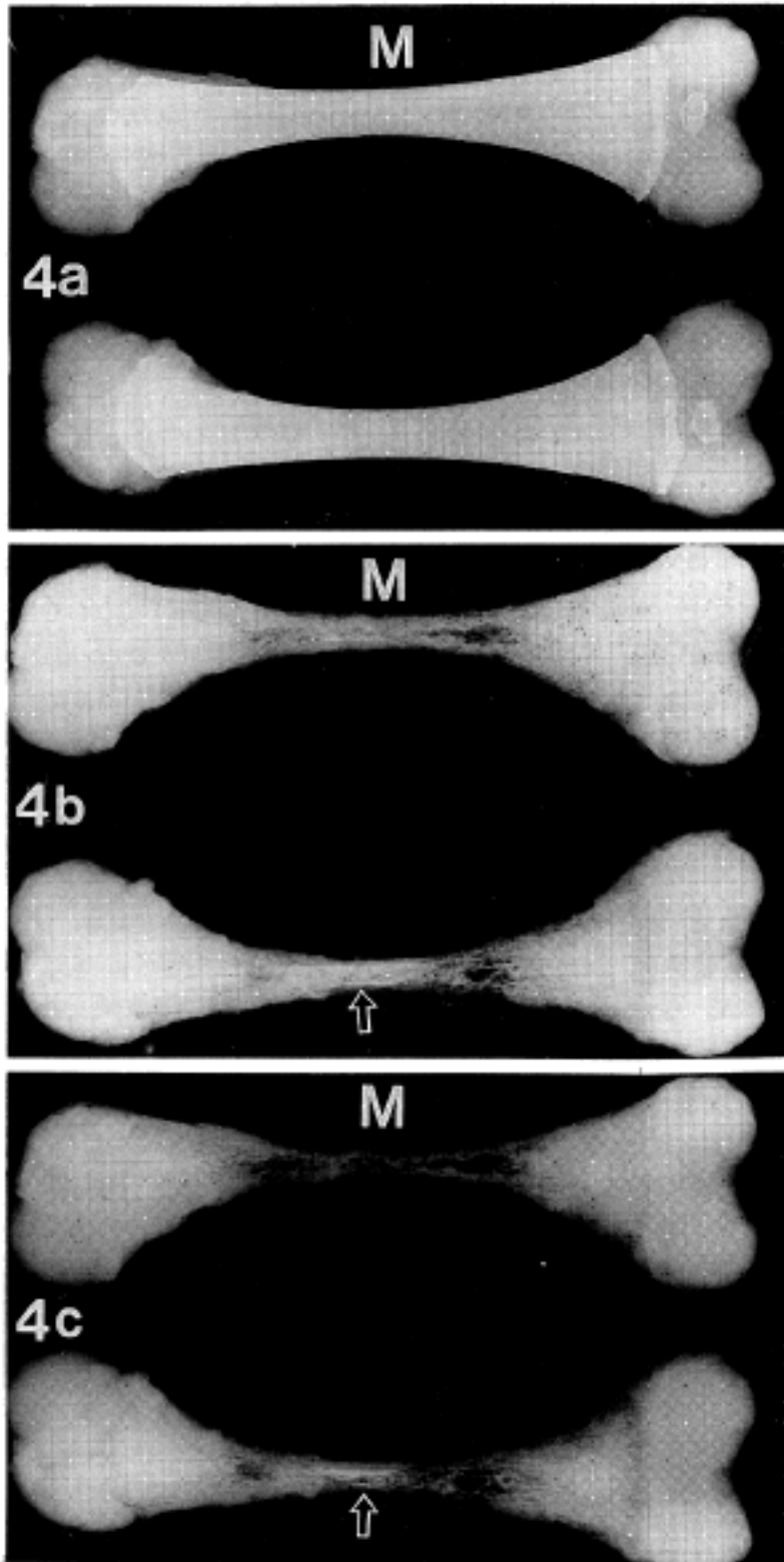


Fig. 4. Soft X-ray radiograph of full term fetal femurs. 4a; before decalcification, 4b; after 12 hours, 4c; after 20 hours

퇴골을 탈회해서 5% 질산 용액을 사용한 실험군과 soft X-ray상으로 비교하였다. 실험후 8시간, 16시간에 soft X-ray를 촬영하여 비교한 결과 pH 0.37로 강하시킨 본 실험의 대조군이 5% 질산 용액을 사용한 이전의 대조군보다 탈회가 더 신속하게 이루어졌으나, pH 0.37로 강하 시킨 본 실험의 대조군 보다 자기장을 사용한 실험군에서 더 증가된 탈회상을 보였다 (Fig. 5a, 5b).

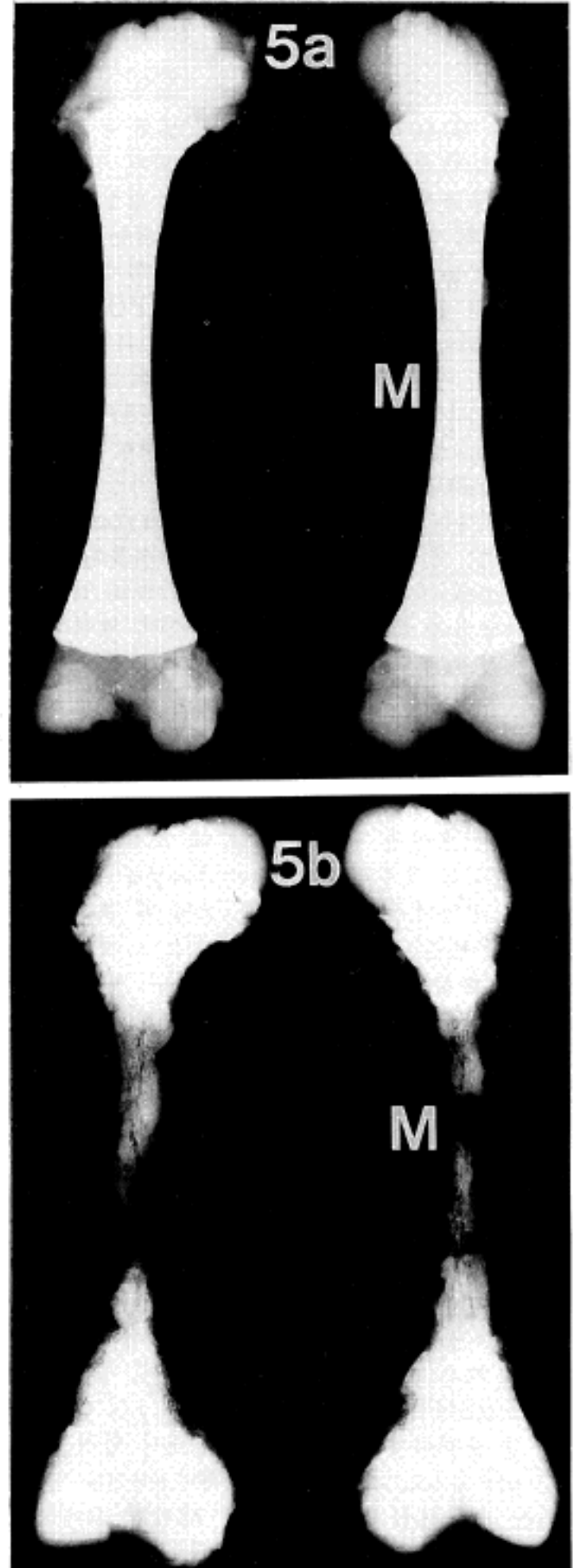


Fig. 5. Soft X-ray radiograph. 5a; before decalcification, control group; pH 0.37 nitric acid, experimental group; 5% nitric acid in the magnetic field, 5b; after 16 hours, M; magnetic field group (experimental), arrow; undecalcified cortical bone

## 고 찰

골조직은 약 10%의 세포성분과 60%의 무기질성분, 그리고 30%의 유기질 성분으로 구성되어 있으며, 대체로 경화 골조직은 무기질과 유기질이 밀접한 관계를 이루면서 침착 및 흡수시 뚜렷하게 구분되는 이상성 구조(biphasic structure)를 이룬다. 석회화 성분은 결정화가 불량한 hydroxyapatite( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )의 구조로 되어 있으며 이 hydroxyapatite는 음성 전하가 커서 다량의 산성에 의해 중화되면서 탈회된다. 한편, 유기질 성분에는 type I 교원질이 약 88%, 다른 단백질 성분(osteocalcin, osteonectin, bone morphogenetic protein)이 약 10%, 지방과 glycosaminoglycan 성분이 약 1~2%이고 type IV 교원질은 극소량 존재한다. 이들 유기질 성분의 일부는 hydroxyapatite와 강한 이온 결합을 하고 있어서 골 흡수시 나중까지 잔존되어 있으며 강산에 의해서도 쉽게 탈회되지 않는다<sup>(4-6)</sup>.

본 연구에서 탐침 검사와 방사선 촬영을 통한 탈회 정도 판정후 조직 표본을 제작한 결과 탐침 검사에서 용이하게 침을 관통시킬 수 있는 경우에도 방사선 촬영에는 경도의 미만성 석회화가 잔존되어 있었으며 탐침 검사에서 용이한 관통이 보일 때 조직표본을 제작한 경우 비교적 우수한 절단성과 염색성을 관찰하였으나 방사선 촬영에서 완전 탈회를 보일 때 조직 표본을 제작한 경우에는 절단성은 우수하였으나 지나친 탈회에 의해서 불량한 염색성을 관찰하였다. 따라서 조직 표본 제작을 위한 탈회는 방사선상의 완전 탈회보다는 방사선상에 치밀골과 골주의 상이 사라지고 전체적으로 균등하게 희미한 정도의 석회화가 잔존되어도 충분한 조직표본의 절단성과 좋은 염색성은 얻을 수 있음을 알게 되었다. 자기장에 의한 경골조직의 탈회현상은 자기장에 의하여 산 염기의 이온화가 증가되어서 탈회액내의 용해도가 증가되는 것으로 생각되며 결과적으로 칼슘이온뿐 아니라 다른 용해성 성분들도 탈회액내로 유리된다고 추측된다. 탈회가 진행될수록 탈회액의 pH가 점차 상승되었는데 자기장내에서 탈회시킨 경우에 더 빠른 pH 상승이 보이지만 5% 질산 용액은 초기 pH 0.6에서 탈회 72시간 후에는 pH 0.8로, 10% 개미산 용액에서는 초기 pH 1.9에서 탈회 12시간 후에는 pH 3.1로, 그리고 10% 개미산+3% 염산 용액에서는 초기 pH 0.4에서 탈회 72시간 후에는 pH 0.5로 되는 등 큰 변동을 볼 수 있었다. 따라서 5% 질산 용액과 10% 개미산+3% 염산 용액은 72시간 이후까지 탈회가 지연되는 강한 산성도에 의한 비용해성 성분들의 변성이 우려될 수 있으며 10% 개미산의 경우 탈회개시 12시간 후에 pH 3.1로 상승되므로 충분한 탈회가 이루어 질 수 없으므로 12시간마다 탈회액을 교환해 주거나 골조직에 비하여 다량의(본 실험에

서는 5 gm/50 cc) 탈회액을 사용하여야 지속적인 탈회를 유지할 수 있을 것으로 생각된다.

탈회액내에 칼슘이온은 ammonium oxalate에 의하여 calcium oxalate의 침전물이 생기는데 이때 혼탁액으로 나타난다. 그런데 탈회액을 강한 자기장내에 장시간 노출시킨 경우에 증가된 이온화 경향이 자기장 밖에서도 어느정도 지속되므로 탈회액 채취후 자기장이 없는 곳에서 이틀동안 방치한 후에 calcium oxalate 혼탁액의 산염기 반응을 시켰으며 침전물의 형성이 되지 않게 충분히 혼합한 후 분광광도계로 분석하였다. 이러한 산염기 반응은 pH 3.5~7.5 범위에서 가장 활발히 나타나는데 본 실험에서 pH 범위를 맞추기 위하여 5% NaOH를 사용한 결과 탈회액내에서 지방산과 반응하여 심한 비누화 현상이 나타났으므로 5% NaOH 용액으로 중화시키지 않고 다량의 ammonium oxalate(5 cc)를 소량의 탈회액(0.5 cc)에 넣어 산염기 반응을 시켰는데 탈회 원액만의 pH 변화는 5% 질산용액의 경우 혼탁액이 pH 2.5이었으며 10% 개미산 용액은 pH 4.5, 10% 개미산+3% 염산 용액의 경우 pH 2.0으로 나타났다. 따라서 10% 개미산 용액에서 가장 활발한 산염기 반응이 생겼고 5% 질산 용액에서는 비교적 저조한 산염기 반응이 생겼을 것으로 추측되므로 이 연구에서 탈회액 종류에 따른 calcium oxalate 형성량에 관한 비교는 불가능하지만 각 탈회액내에서 대조군과 실험군의 비교는 유의성이 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서 5 gm의 골편을 50 cc의 탈회액에 탈회시켰을 경우 5% 질산, 10% 개미산, 그리고 10% 개미산+3% 염산 용액에서 자기장을 사용했을 때가 자기장을 사용하지 않았을 때보다 높은 calcium oxalate의 혼탁도를 보였으므로 자기장에 의한 탈회 촉진 효과를 탈회액내에 유리된 칼슘 이온의 양으로 측정할 수 있었다.

대체로 전류장치에 의한 자기장 발생시 에나멜 코일에 발열현상이 생기고 주변의 전도체에도 유도 전류에 의하여 소량의 발열현상이 발생되는데 본 연구에서는 실험시 공기 대류에 의한 발열을 감소시키기 위하여 실제 탈회 용기보다 충분히 큰 원통형 용기를 사용해서 실내 온도 약 20°C보다 3~5°C이상 상승하는 것을 방지하였으며 예비 실험에서 대조군의 탈회액을 25°C 수조에서 탈회 시킨 경우 20°C의 실내에서 탈회 시킨 경우와 비교할 때 soft X-ray관찰에서 큰 차이가 없었으므로 탈회액 온도 차이(3~5°C)에 의한 대조군과 실험군의 탈회 속도 변화는 본 실험에서 배제할 수 있었다. 그러나 실제로는 탈회시 온도상승이 신속한 탈회 촉진 효과를 나타낼 수 있으므로 최소한 37.5°C까지 온도를 상승시켜 주는 것이 자기장에 의한 효과 외에도 탈회 촉진에 도움이 될 수 있으므로 오히려 바람직할 것으로 생각된다.

강한 자기장내에서 5~6시간 이내에 모든 탈회액의



pH가 급속히 감소 된다는 사실은 흥미 있는 현상이었으며 자기장을 소멸시켰을 경우 10시간 이내에 원래의 pH로 복귀됨을 관찰하였다. 따라서 자기장에 의한 골조직의 탈회촉진효과가 자기장이 탈회액의 pH를 강하시키는 것과 연관이 있으리라 생각되었으나 한편 질산 용액에서 대조군의 pH를 자기장내에서 최대한으로 강하되는 pH 0.37로 조정된 경우에도 실험군이 대조군보다 더 신속하게 탈회되는 것으로 보아 pH뿐만 아니라 자기장이 골조직 분해에 직접적인 영향을 주는 특이한 물리화학적인 성질이 있을 것으로 추측되었다.

한편 전자파(microwave) 조사가 골조직의 고정 및 탈회를 증진시킨다고 보고되어 있으며<sup>9,10)</sup>, 전자파 조사가 치아의 탈회를 촉진시키는 요인은 주로 온도 상승에 의한 것으로 주장되었다<sup>11)</sup>. 본 연구에서는 실험군의 온도 상승을 3~5°C 이내로 최소화 하였으며 본 실험 결과에는 포함시키지 않았으나 대조군을 30~35°C의 증탕조에 넣고 탈회시킨 경우에도 본 실험에 사용된 대조군의 결과에 큰 차이가 없었으며 대체로 용액의 온도를 상승시키는 경우 약간의 pH 증가가 생기는데 비하여 본 연구의 실험군에서는 자기장내에서 급속한 pH 감소가 발생하는 것은 매우 흥미있는 결과였다. 그리고 이러한 pH 감소가 우선적으로 탈회를 촉진시킨 것으로 생각되지만 본 연구에서 대조군의 탈회액 pH를 자기장내에서 최대한 감소되는 pH 값으로 조정시킨 후의 탈회 효과 보다 자기장내에서 계속 탈회시킨 실험군의 탈회 효과가 더 신속한 것으로 보아 이는 자기장이 탈회액의 pH만을 감소시키는 것이 아니라 분자간의 활성도를 증가 시켜서 무기질 성분의 유리가 촉진될 것으로 생각된다. 이러한 자기장은 조직에 지나친 위해 작용을 일으키지 않으며 골조직 심부에도 산염기 반응을 촉진 시킴으로써 탈회를 용이하게 함으로 적용이 간편하다. 본 실험에서 사용된 전원은 편의상 가정용 전원인 100 volt~60 cycle의 교류 전원을 250 volt로 상승시킨후 정류하여 125 volt~60 cycle의 직류 전원을 이용하였다. 그러나 자기장의 강도를 높이기 위하여 에나멜 코일의 회전수를 높이고 전압을 500 volt 이상으로 높일 수 있으며, 주파수의 크기도 골조직내의 유도 감응되는 무기질의 종류에 따라 주파수를 임의로 조절할 수 있으므로 앞으로 이에 대한 연구가 수행되어져야 한다고 생각된다.

### 결 론

가정용 전원을 정류하여 125 volt-60 cycle의 직류 전원을 사용하여 지름 15 cm의 원통관 주위에 에나멜 코일을 감아서 자기장을 발생 시킨후 원통관 내부에서 탈회를 시킴으로써 우수한 탈회촉진 효과를 얻었다. 탈회액내의 칼슘이온 용해도는 calcium oxalate의 혼탁도로 측정하였고, 탈회 과정중에 soft X-ray를 사

용하여 탈회 정도를 직접 관찰하였으며 탈회후 조직표본을 제작하고 H&E 염색을 하여 이를 평가하였다.

그 결과 5% 질산용액, 10% 개미산 용액 그리고 10% 개미산+3% 염산용액의 모든 탈회액에서 탈회 촉진 효과를 얻었는데 크기가 10×10×10 mm이하의 골편인 경우 5% 질산용액에서 24시간 이내에 탈회가 완료되었으며 표본제작 결과 10% 개미산+3% 염산 용액보다 조직 손상이 적었다. 각각의 탈회액은 실험군에서 자기장에 의하여 약 4~6시간 이내에 최대 pH 감소를 보였다. 이러한 자기장의 탈회 촉진 현상은 우선 탈회액의 pH를 감소시키고 분자간의 활성도를 증진시킴으로써 무기질의 용해를 촉진시키는 물리화학적 성질에 의한 것으로 해석하였다.

### 참 고 문 헌

- 1) Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histopathology*. 2nd ed. pp89-96 Mosby Co. 1980.
- 2) Lillie RD, Fullmer HM. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 4th ed. pp787-798, McGraw-Hill Book Co. 1982.
- 3) Mori S, Sawai T, Teshima T, Kyogoku M. A new decalcifying technique for immunohistochemical studies of calcified tissue, especially applicable to cell surface marker demonstration. *J Histochem Cytochem* 1988; 36: 111-4.
- 4) Epker BN, Frost HM. A histological study of remodelling at the periosteal, haversian canal, cortical endosteal, and trabecular endosteal surfaces in human rib. *Anat Rec* 1965; 152: 129-36.
- 5) Frost HM. Bone dynamics in metabolic bone diseases. *J Bone Joint Surg* 1966; 48(A): 1192-203.
- 6) Frost HM. Tetracycline-based histologic and analysis of bone remodelling. *Calcif Tis Res* 1969; 3: 211-7.
- 7) Jaworski ZF, Meunier P, Frost HM. Observations on two types of resorption in human lamellar cortical bone. *Clin Orthop* 1972; 83: 279-85.
- 8) Müller S, Pleul J, Götz M, Jähnig J, Schädlich H. A method to determine the end point of decalcification of hard tissue and bone. *Stain Technol* 1990; 64: 77-83.
- 9) Balaton AJ, Loget P. Accelerated decalcification using microwaves. *Ann Pathol* 1989; 9: 140-1.
- 10) Roncaroli F, Mussa B, Bussolati G. Microwave oven for improved tissue fixation and decalcification. *Pathologica* 1991; 83: 307-10.
- 11) Vongsavan N, Matthews B, Harrison GK. Decalcification of teeth in a microwave oven. *Histochem J* 1990; 22: 377-80.