

가토를 이용한 Osteovit®(Collagen sponge)의 골 재생에 관한 실험적 연구*

계명대학교 의과대학 정형외과학교실 및 병리학 교실

박영대 · 편영식 · 김상표**

서 론

골이식술은 골절의 유합이나 관절 고정을 촉진하기 위하여 또는 외상이나 골종양 환자에게 발생한 골결손을 치료하기 위하여 정형외과 영역에서 광범위하게 실시되고 있으며, 자가골 이식술이 널리 쓰여지고 있다^[1,2].

골이식술에는 자가골 이식, 동종골 이식, 이종골 이식 등이 있으며, 자가골을 이식할 때에는 이식골의 채취를 위한 피부의 추가 절개, 수술 시간의 연장, 골공여부의 약화 및 감염이 유발될 수 있는 단점이 있고 많은 양의 이식골이 필요한 경우나 소아에서는 자가골만으로는 부족할 때가 많다. 또한 치료방법의 발전으로 다량의 이식골이 요하는 기회가 점차 많아짐에 따라 이러한 단점을 보완하기 위하여 동종골 이식과 이종골 이식이 개발되어 왔으며, 동종골 이식은 수급이 원활치 못하여 채취한 골의 보관을 위한 골 은행의 설치가 요하고, 면역학적 거부반응이 문제로 되어 왔으며^[3,4], 이종골이식은 적혈한 면역 반응으로 더 이상 임상에서 사용되지 않는다.

1960년대 독일에서 송아지 골의 면역학적 특성을 처리한 "Kiel bone"을 개발하여 사용한 후^[5,6] 다양한 종류의 인조골이 이식용으로 개발되어 현재 널리 쓰여지고 있으나 이들의 골형성 기전이나 능력에 대해서는 논란의 여지가 있다.

저자는 이러한 인조골중 송아지의 대퇴골을 처리하여 제조한 denatured purified collagen sponge인 Osteovit®을 가토의 대퇴골 내과부에 골 결손을 만든 후 이를 이식하고 골재생 과정의 변화를 광학현미경으로 경시적 관찰하여 골재생 기전의 일단을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 동물

Osteovit®는 송아지의 해면골을 처리해서 만든 교원질 뼈대(Collagen scaffolding)로 혈액, 지방, 항원 및 효소 등의 비교원성 물질과 모든 무기질을 제거해서 멸균시킨 인조골로써, 연한 노란색을 띤 입방체로 제작되었으며 내부에 많은 구멍을 가지며 이를 구멍끼리는 서로 잘 연결되어 있고, 인체에 이식시 이 공간내에 새로운 골조직이 형성되어 골재생이 이루어진다. 또, 가위나 칼로 쉽게 자를 수 있으며, 생리식염수나 혈액과 접촉하면, 스aponin처럼 말랑말랑하고 부드러워진다.

실험동물로는 암수 구별없이 외견상 건강한 2,000~2,500gm되는 14마리의 뉴질랜드산 흰 토끼를 사용하였으며, 사료는 삼양 배합사료를 석수는 수돗물을 사용하였다.

2. 실험방법

Ketamine 200~300mg을 가토의 둔부근육내 주사하여 마취시킨 후 고정틀에 앙와위로 묶고, 양측 대퇴골 내과부의 털을 깎고 potadine 용액으로 소독을 한 후, 약 4cm 정도 피부 절개를 하였다. 연부조직을 절개해서 양측 대퇴골 내과부를 노출 시킨 후 3.2mm 및 6.0mm 드릴 비트를 사용해서 골결손을 만들고, 이 골결손을 생리식염수로 깨끗이 세척한 후, 한쪽 대퇴골 결손부에는 원통모양으로 만든 이식물인 Osteovit®로 채웠으며, 반대쪽 대퇴골 결손부에는 대조군으로 이식물을 삽입하지 않고 빈채로 절개부를 봉합하였다.

* 이 논문은 박영대의 석사학위 논문임.

각 실험군의 토끼들은 이식물을 삽입한 후 외부 고정없이 토끼장 내의 활동만 허용하였다. 각각 2 마리의 가토를 실험후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8주 그리고 12주에 규정액을 통해 공기를 30cc 주입해서, 도살하여 양쪽 대퇴골 원위부를 제거해 내었다. 채취한 양쪽 원위대퇴골은 10% 포로말린 용액에 하루동안

고정한 다음, 탈석회화 용액(physiologic decalcifying agent)으로 일주일 동안 탈석회화 과정을 거친후 4~6 μm 로 박절하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행한후 광학현미경으로 검색을 실시하였다.

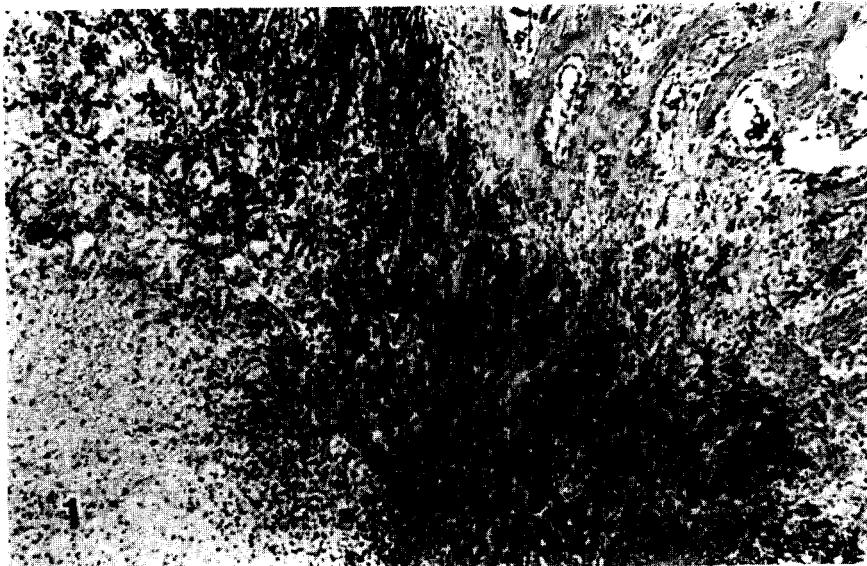


Fig. 1. One week after bore hole without implantation. The central organized blood coagulum and activated osteoblast with osteoid formation in the periphery(H & E, x 40).



Fig. 2. Two weeks after bore hole without implantation. The center of the defect is filled with fibrous granulation tissue and the peripheral area shows partial mature bone formation(H & E, x 40).

성 적

1. 조직학적 소견

1) 대조군

1주째 끌결손부는 응고된 혈액과 섬유아세포 및 모세혈관으로 구성된 섬유성 육아조직이 관찰되었으며, 끌 결손부의 가장자리에는 끌아세포 증식으로 인하여 유골조직이 형성되었고 드물게 과골세포도 있었다(Fig. 1).

2주째 응고된 혈액이 섬유성 육아조직으로 대부분

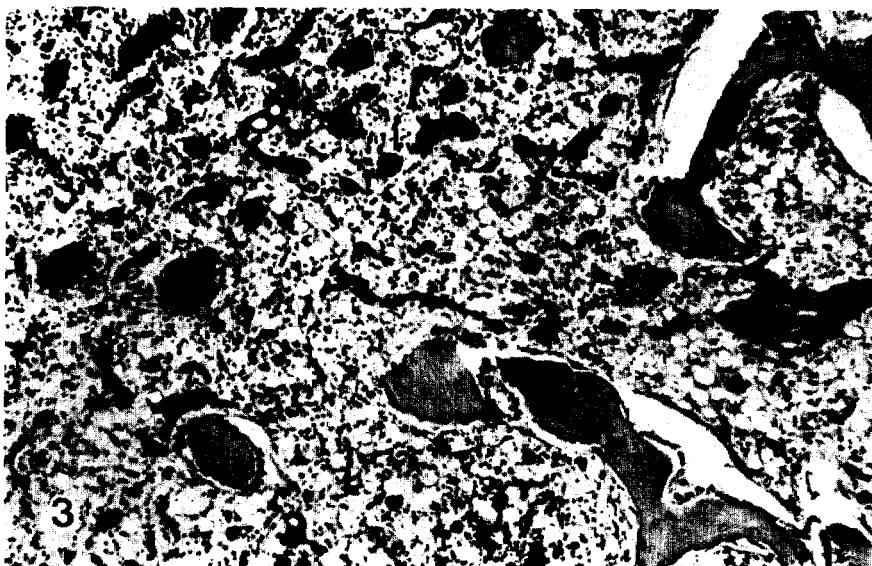


Fig. 3. Three weeks after bore hole without implantation. Fatty bone marrow and peripheral mature bone formation are present(H & E, x 40).

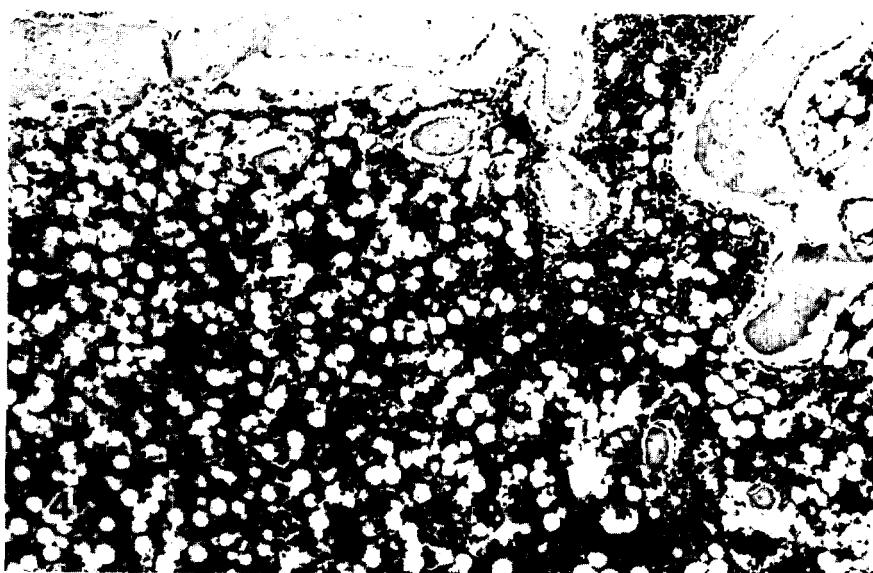


Fig. 4. Four weeks after bore hole without implantation. The large part of the bony defect is free of bone and filled with a fatty bone marrow(H & E, x 40).

대체되었고, 가장자리에 중석된 끌아세포들에 의한 유골조직의 형성이 보다 더 왕성하고, 유골조직의 석회화가 진행되어 부분적으로 성숙골 형성이 관찰되었다(Fig. 2).

3주째 골결손 중앙부에는 지방성 골수가 나타나고, 가장자리에는 대부분 성숙골이 관찰되었으며 끌아

세포들도 비교적 정상 수로 감소되었다(Fig. 3).

4주째 부터는 골결손 중앙부가 지방성 골수로 완전히 대체되었으며(Fig. 4), 그후 6, 8주 및 12주에서는 가장자리에 관찰되는 골조직의 재형성이 점차적으로 강화된 소견을 보였다.

2) 이식군



Fig. 5. One week after Osteovit® implantation. Organized blood is intermixed with Osteovit® and newly built bone is seen on the periphery (H & E, x 40).

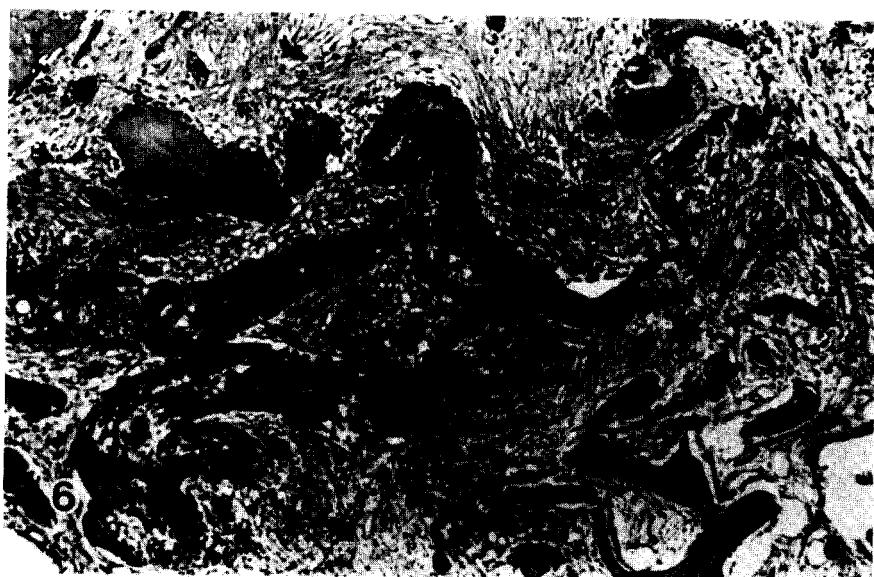


Fig. 6. Two weeks after Osteovit® implantation. Fibrous connective tissue is admixed with multiple fragments of absorptive Osteovit® (H & E, x 40).

1주째에는 이식물 구조내에 응고된 혈액이 침투되어 있었으며 가장자리에는 끌아세포의 증식과 유골조직의 형성이 관찰되었다(Fig. 5).

2주째 소견으로 이식물 구조내에 섬유성 육아조직의 증식이 현저해지면서 이식물이 조금 흡수되어 불규칙한 모양을 보였고 국소적으로 염증세포 및

탐식세포 침윤이 동반되었다(Fig. 6).

3주째는 많은 이식물의 흡수가 관찰되었고 동시에 증식된 끌아세포가 유골조직을 형성하면서 이식물과 유골조직이 혼합된 양상을 보였다(Fig. 7). 가장자리에는 유골조직의 석회화에 의한 성숙골 형성이 나타나면서 중앙으로 이들 유골조직이 약간 침윤

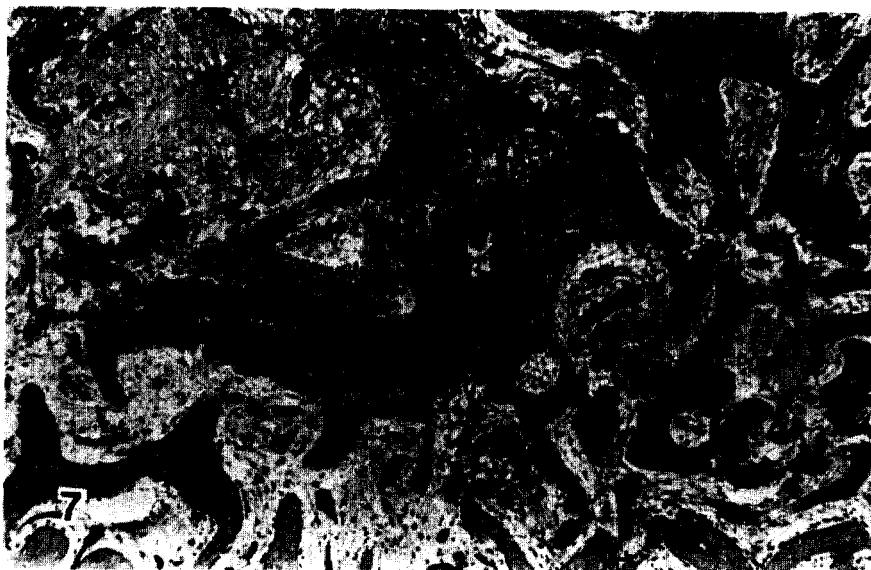


Fig. 7. Three weeks after Osteovit® implantation. Osteovit® is covered with newly formed bone in the central area (H & E, x 40).

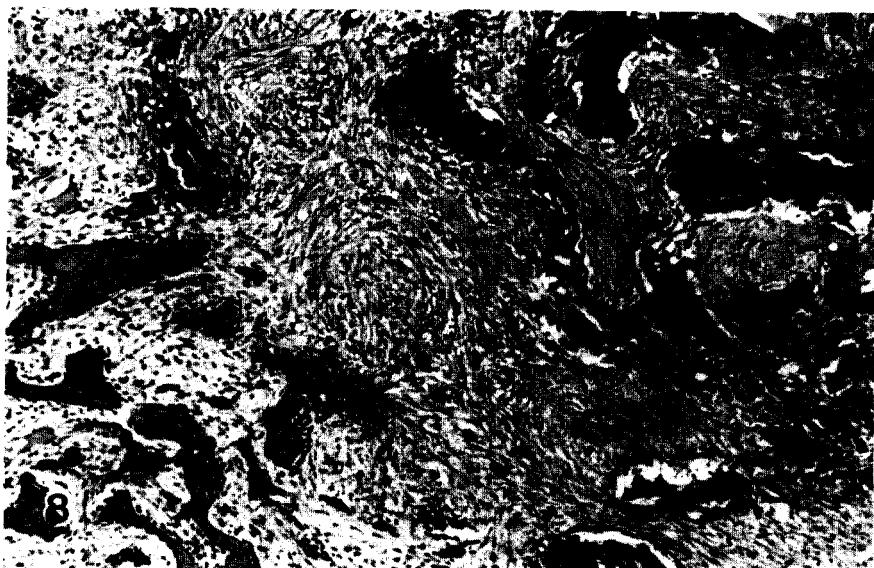


Fig. 8. Three weeks after Osteovit® implantation. Mineralized new bone has formed in the periphery, which has extended into the central area(H & E, x 40).

하는 경향을 보였다(Fig. 8).

4주째에는 이식물이 보다 더 많이 흡수되면서, 중앙부위에 유골조직이 관찰되었다. 반면에 증식된 골아세포들은 정상 수로 감소하면서 현저한 유골조직 형성은 보이지 않았고 유골조직과 이식물 사이에는 섬유조직이 남아 있었으며 성숙골 형성이

현저하였다(Fig. 9).

6주째에서는 국소적으로 이식물이 남아있고 중앙에 유골조직이 석회화되어 성숙골을 형성하였으며, 가장자리에서 자라온 유골조직들도 골형성이 되어 골결손부의 크기가 작아졌다(Fig. 10).

8주째에는 이식물이 존재하지 않고 대부분 성숙

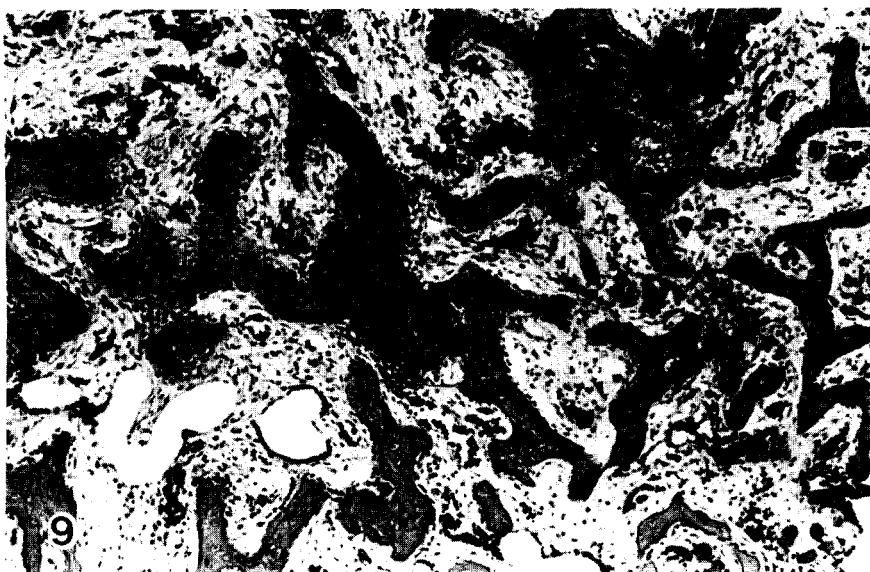


Fig. 9. Four weeks after Osteovit^R implantation. The whole defective cavity is filled with a dense network of regenerated bone and some fibrous tissue (H & E, x 40).

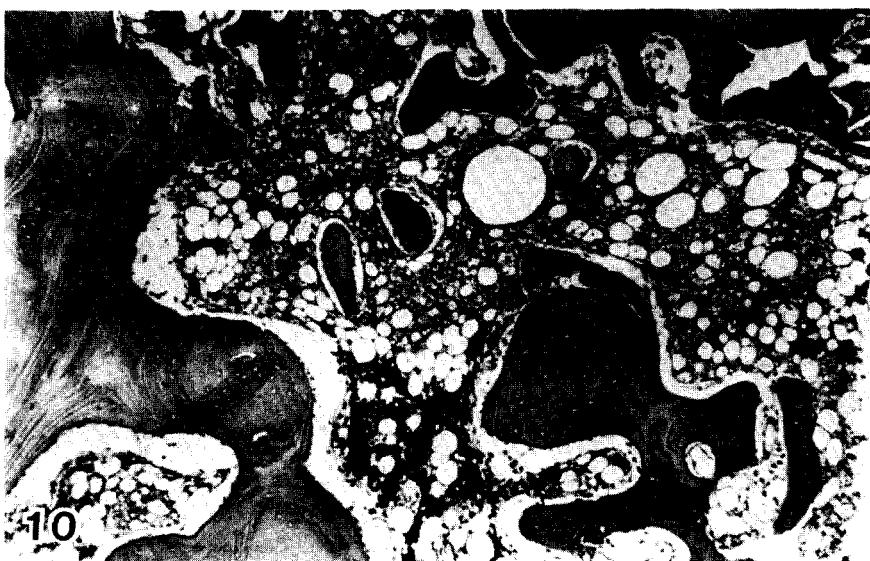


Fig. 10. Six weeks after Osteovit^R implantation. Large area of mineralized mature bone which appears to be dense and broad(H & E, x 40).

골의 형성이 관찰되었으며 성숙골 사이에는 혈관증식이 동반된 지방성 골수의 출현을 보였다(Fig. 11).

12주째에는 성숙골 및 지방성 골수로 구성되어 있었다(Fig. 12).

고 찰

자가 해면골 이식이 골 결손의 재건에 가장 이상적인 방법이며^{1,2)}, 성인에서 골결손이 작은 경우는 자가골을 얻을 수 있기 때문에 인조골의 필요성이



Fig. 11. Eight weeks after Osteovit® implantation. New built mature bone without Osteovit® is seen and well-vascularized fatty marrow is formed (H & E, x 40).



Fig. 12. 12 weeks after Osteovit® implantation. Mature bone and fatty marrow are also present (H & E, x 40).

비교적 드물다. 그러나 이식물이 많이 필요한 재건 수술, 특히 소아에서 골종양, 골파괴 질환, 선천성 혹은 후천성 골 결손의 치료시나 척추 축만증에서 광범위한 척추 유합술이 요할때에는 충분한 양의 자가골을 얻기가 어렵다. 또 소아에서 자가골 채취시 골단판 손상으로 인한 골성장 장애의 가능성이 높으며, 자가골 이식시 수술 시간의 연장, 실혈의 증가, 감염 가능성 증가, 신경 및 혈관의 손상, 색전증, 골절 가능성의 증가 등의 단점이 있으며 술후 골 공여부에 통증이 심해지고 수술 반흔이 남는다. 그리고 자가골 이식에서 비용이 적게 들 것으로 생각할 수 있지만, 마취시간이 긴 점, 수술 부위의 소독, 수술기구, 배액법, 드레싱용 가제 및 봉대등이 추가됨을 감안하면 이식골 구입시와 비슷한 경제적 부담이 있다.

따라서, 자가골 이식에 대한 대체의 필요성을 절감하게 되어 이식에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 비록 동종골 이식은 이식후 첫 1주간 자가골 이식과 진행과정이 비슷하나, 이식후 8일 또는 9일에 면역학적 방어기전으로 이식골이 죽기 시작한다.^{3,4,5,6,7,8)} 그러나 완전한 거부반응이 일어나지 않고, 잠행성 치환(creeping substitution)에 의해서 신생골이 서서히 형성되나^{12,13)}, 골은행(bone bank)을 이용해야 하는 경제적 부담이 있다.⁹⁾

이종골 이식은 각별한 면역반응으로, 더이상 임상에서 사용되지 않지만, 이종골의 면역학적 특성을 처리한 제품의 개발이 시작되어 1960년대 초 "Kiel bone"이 Maatz 등에 의해서 개발된^{10,11)} 후에 많은 종류의 인조 합성물 또는 변성 생체물이 골의 재생에 도움을 준다는 문헌이 발표되고 있다. 현재까지 개발되어 사용되는 골이식 대체물은 크게 세가지로 분류 되어지고 있다.

1. 골상(bone matrix)의 내이식(implantation).

탈석회화 및 저지방화 시킨 천연골로 Senn¹⁴⁾과 Urist^{15,16)} 등이 연구하였다.

2. Denatured purified collagen sponge의 내이식.

Bedacht¹⁷⁾, Chvapil¹⁸⁾, Joos¹⁹⁾, 그리고 Springorm²⁰⁾ 등이 연구하였다.

3. 골 재생 유도물.

Calcium phosphate나 hydroxyapatite 등의 골재생 유도물로써 Getter 등²¹⁾, Clarke 등²²⁾, Ferraro²³⁾가 연구하였다.

"Kiel bone"이 고칼슘으로 조직 내성이 부족하고, 골 전환이 매우 느린 단점 때문에 비록 물리적 안전성을 줄 수 없지만 조직 내성이 크며 흡수가 빨라

골 전환이 쉬운 denatured purified collagen sponge인 Osteovit[®]를 1969년 Bedacht¹⁷⁾가 개발하였다. 80년대 이후 Mittelmeier²⁴⁾는 교원질 스폰지와 calcium phosphate나 hydroxyapatate를 혼합 제조한 이식물인 Collapat[®]를 사용하여 좋은 결과를 보고하고 있다.

자가골 및 골이식 대체물 이식시 신생골 형성이 일어나는 과정은 아직까지 정확하게 밝혀지지 않고 있으나 Axhausen²⁵⁾은 골재생이 수혜골의 골막으로부터, Levander²⁶⁾은 이식골에 남아있는 골막으로부터 일어난다고 주장했으며 또, Axhausen은 이식골의 재혈관화에는 수혜골의 골세포가 빈 이식골의 소강에 침투한다고 했으며, 반면에 Phemister²⁷⁾는 살아있는 이식세포가(transplanted viable cell) 복구작업에 참여해서, 피사조직을 살아있는 골조직으로 치환시킨다고 했다. 최근에는 Barth²⁸⁾, Marchand²⁹⁾ 등이 주장한 수혜자 및 이식골의 골막과 골수 주위조직으로부터의 혈관 및 결체조직이 침투되어 신생골 형성이 일어난다는 잠행성 치환 이론(creeping substitution theory)이 지배적이다. 즉 이식세포 또는 수혜세포 중 어느것이 골형성의 중추적인 역할을 하는지 알수 없으나, 양쪽 모두 잠행성 치환에서 상당한 역할을 하고 있다고 하였다. 따라서 Osteovit[®] 내에 신생골 형성 과정은 더욱 연구되어야 할 사항으로 지적되지만, 본 실험에서는 광학현미경 소견상 신생골 형성이 수혜골의 골막 및 골수 주위조직으로부터 나타나는 것으로 판단된다. 그리고 Osteovit[®] 등의 교원질이 어떻게 골재생을 일으키는가에 관한 견해는 확실치는 않으나 Urist^{15,16)}는 탈석회화된 골기질 또는 교원질이 간엽세포의 분화를 자극하며, 또 빠르게 교원질 흡수가 일어나는 장소에서 활성화된 결체조직 간엽세포(connective tissue stem cell)가 골아세포로 분화된다고 하였다. 즉 교원질 스폰지가 골조직으로 대치될 수 있는 육아조직의 성장을 촉진한다고 하였다.

본 실험에서도 술후 2주부터 이식물이 주위에서 침투한 섬유성 육아조직에 의하여 흡수되면서 3주부터는 많은 골아세포가 출현하여 유골조직을 형성했고, 이를 유골조직은 석회화를 통해서 골조직이 되며 8주이내에 이식물이 대부분 흡수되어 신생골로 대치되었다. 교원질 이식물인 Osteovit[®]는 골재생을 촉진하는 배지로서 강한 역할을 하며 이식부위의 거부반응이 나타나지 않으므로 이식물로서 우수한 제품중의 하나로 사료된다.

요 약

골이식 대체물 중 Denatured purified collagen sponge인 Osteovit®를 가토의 한쪽 대퇴골 내과에 삽입하고 반대쪽 대퇴골 내과에는 구멍만 뚫고 그냥 두었다. 각각 2마리의 가토를 1, 2, 3, 4, 6, 8주 및 12주에 도살하여 총 14마리, 28구멍의 골표본을 시상면이 길게 채취한 후 고정 및 탈석회화하여 hematoxylin-eosin 염색후 광학현미경 관찰을 시행하였다.

Osteovit®를 삽입한 부위에서 골재생이 2주에 시작하여, 3주에 극도로 완성하였으며, 8주 이후에는 성숙골의 재생이 완성되었다.

골재생 부위에 Osteovit®에 의한 이물반응이나 알레르기성 반응은 없었다.

교원질 스폰지인 Osteovit®는 점차적으로 재흡수됨으로서 골의 재구성(remodelling)을 방해하지 않았다.

따라서 Osteovit®는 골조직 재생을 유도 및 촉진하는데 긍정적인 효과를 가진 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- Albrektsson T, Linder L: Intravital, long-term follow-up of autologous experimental bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 1981; 98: 189-195.
- Burri D, Henkmeyer H, Ruedi T: Chirurgische Beobachtung Infizierter Knochendefekte. *Langenbecks Arch Chir* 1971; 330: 54-65.
- Amsel S, Dell ES: Bone marrow repopulation of subcutaneously grafted mouse femur. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 138: 550-552.
- Bonfiglio M, Jeter WS: Immunological responses to bone. *Clin Orthop* 1972; 87: 19-27.
- Bonfiglio M, Jeter WS, Smith CL: The immune concept: Its relation to bone transplantation. *Ann NY Acad Sci* 1955; 59: 417-433.
- Burwell RG, Gowland G: Studies in the transplantation of bone. II. the changes occurring in the lymphoid tissue after homografts and autografts of fresh cancellous bone and homologous bone treated by different methods. *J Bone Joint Surg* 1961; 43B: 820-843.
- Burwell RG, Gowland G: Studies in the transplantation of bone. III. The immune responses of lymph nodes draining components of fresh homologous cancellous bone and homologous bone treated by different methods. *J Bone Joint Surg* 1962; 44B: 131-148.
- Siffert RS: Experimental bone transplants. *J Bone Joint Surg* 1955; 37A: 742-758.
- Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, et al: Bone bank procedures. *Clin Orthop* 1983; 174: 15-20.
- Bauermeister A: Die Behandlung von Zysten, Tumoren und entzündlichen Prozessen des Knochens mit dem "Kieler Knochenspan", *Beitr Orthop Traumatol* 1961; 203: 287-301.
- Maatz R: Klinische Erfahrungen mit dem eiweißarmen Tierspan. *Langenbecks Arch Chir* 1959; 292: 831-852.
- Bonfiglio M, Jeter WS: Further experimental studies on bone transplantation. *J Bone Joint Surg* 1962; 44A: 1029-1033.
- Burwell RG: Studies in the transplantation of bone. V. The capacity of fresh and treated homografts of bone to evoke transplantation immunity. *J Bone Joint Surg* 1963; 45B: 386-401.
- Senn N: On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci* 1989; 98: 219-225.
- Urist MR: Formation by autoinduction. *Sci Am* 1965; 150: 893-900.
- Urist MR, Mikulski A, Boyd SD: A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks. *Arch Surg* 1975; 110: 416-430.
- Bedacht R: *Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen über die Anwendung von heterologem Kollagen als Implantat in der Knochenhöhle von Rohrenknochen*. Habilitationschrift, Universität München, 1969.
- Chvapil M, Kronenthal RL, van Winkle W Jr: Medical and surgical applications of collagen. *Connect Tissue Res* 1973; 6: 43-44.
- Joos U, Vogel D, Ries P: Collagen-Fleece as a biomaterial for mandibular defects. *Presentation at the Third Conference on Materials for Use in Medicine and Biology*. Kiel University, 1978, pp 13-15.
- Springorum HW, Adler CP, Jager W, et al: Tierexperimentelle Untersuchung der Knochenregeneration am standardisierten Tibiadefeat des Kaninchens nach Implantation von collagenvlies im Vergleich zur autologen und homo-

- logen Spongisaplastik. *Z Orthop* 1977; 115: 686-694.
21. Getter L, Bhaskar SM, Cutright DE, et al: Three biodegradable calcium phosphate slurry implants in bone. *J Oral Surg* 1972; 30: 263-268.
22. Clarke WJ, Driskell T, Hassler CR, et al: *Calcium phosphate resorbable ceramics: a potential alternative to bone grafting IADR 51st General Meeting, Chicago, Abstr* 259, 1973.
23. Ferraro J, App G, Foreman D: Analysis of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bone implant in ilium canis to assess resorption, *IADR 67th General Meeting New Orleans Abstr*, 1278-1978.
24. Katthagen BD, Mittelmeier H: Experimental animal investigation of bone regeneration with collagen-apatite. *Arch Orthop Trauma Surg* 1984; 103: 291-302.
25. Axhausen G: *Die Pathologisch anatomischen Grundlagen der Lehre von der freien Knochentransplantation beim Menschen und beim Tier*.
26. Levander G: On the Formation of new Bone in Bone Transplantation. *Acta Chir Scand* 1934; 74: 425-426.
27. Ray RD: Vascularization of bone grafts and implants. *Clin Orthop* 1972; 87: 43-50.
28. Karges De, et al.: Experimental evaluation of processed heterogenous bone transplants. *Clin Orthop* 1963; 29: 230-235.
29. Marchand F: Zur Kenntnis der knochentransplantation. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1899; 2: 268-275.

=Abstract=

Experimental Animal Investigation of Bone Regeneration with Osteovit®(Collagen Sponge)

Young Dae Park, MD; Young Sik Pyung, MD; Sang Pyo Kim**, MD

*Department of Orthopaedic Surgery and Pathology**, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

Large segmental bone defects secondary to major oncologic surgery or trauma are major clinical problems. Autogenous cancellous bone graft is the most effective method for fusing joint and repairing skeletal defect. But owing to additional surgical incision, increased postoperative morbidity and weakened donor bone sites, alternatives to autogenous bone transplant, e. g., allograft and synthetic implant, have developed.

Bone allografts demonstrate behavior similar to that of autografts during the 1st week, they start to die after the 8th or 9th day due to immunologic defense processes. Nevertheless, allogenic bone is not completely rejected but is destroyed and built up again by "creeping substitution". Xenogenic bone transplants are accompanied by an even more violent immunological defense reaction and are therefore no longer used in clinical practice.

Attempts were made to develop a special preparation to deal with the immunological qualities of the xenogenic bone material.

Denatured purified collagen sponge(Osteovit®) as synthetic implant is some effect on osteoregeneration. This was histologically proved in the present study involving 14 rabbits with 28 6mm wide bore holes in the distal femoral condyles. With Osteovit®, much more new bone was regenerated than in the control defects without implant.

The material and method were summarized as follow. We inserted Osteovit® implant into femoral condyle of one side of New Zealand white rabbit and left the hole in the opposite femoral condyle empty as a control cavity. Two rabbits each time were killed after 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 12 wks, so that a total of 14 experimental animals with 28 bore holes were available for the histological research. The bone samples were cut lengthwise in the saggital plane for the examination after fixation and decalcification. For histologic study by light microscopy, the specimens were stained with hematoxylin and eosin.

At sites of Osteovit® insertion, bone regeneration begins in the 2nd week, reaches it's climax in the 3rd week, and is completed after the 8th week.

Foreign body or allergic reaction are not observed.

Remodeling of bone is not hindered by the slowly resorbable collagen sponge.

Therefore, Osteovit® has positive effect on osteoregeneration.

Key Words: Animal investigation, Bone regeneration, Osteovit®(Collagen sponge)