

백서를 이용한 인공 피부 대체물의
성능 평가기준 개발

연세대학교 대학원
의 학 과
허 재 영

백서를 이용한 인공 피부 대체물의 성능 평가기준 개발

지도교수 박 병 윤

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006 년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

허 재 영

허재영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2006 년 12 월 일

감사의 글

전공의를 마치고 개원을 한 상태에서 학위과정을 수행하느라 많은 심려를 끼쳐드렸음에도 따뜻한 격려와 위로를 해주시면서 논문이 완성될 때까지 세심한 지도를 해주신 박병운 지도교수님께 감사를 드립니다. 또한 이 논문이 끝날 때까지 많은 지도를 해주신 나동균 교수님, 의용공학교실 서활 교수님께 감사를 드리며 실험 및 논문 작성 과정에서 많은 도움을 준 이원재 교수님, 이영대 선생님, 백현숙 연구원에게도 고마움을 전합니다.

항상 가까이에서 저를 응원해주며 저에게 힘을 주었던 부모님과 광주 부모님, 저의 아내 세리에게 이 논문을 바칩니다.

2006년 11월

허재영 올림

차 례

국문요약 -----	1
I. 서론 -----	4
II. 연구재료 및 방법 -----	7
1. 실험방법 -----	7
2. 실험에 사용된 인공 피부 -----	9
3. 실험군 설정 -----	9
4. 결과관정 -----	10
가. 창상면적의 측정 -----	10
나. 혈관의 수 -----	11
다. 기저층(basement membrane, BM)의 형성 -----	11
라. 교원질(collagen)의 발현 양 -----	12
마. 표피층(epidermal layer)의 형성 -----	12
바. 신경섬유(neurofilament)의 발현 -----	13
III. 결과 -----	14
1. 창상의 크기 변화 -----	14
2. 인공피부 내 신생혈관 수의 변화 -----	16
3. 기저층 형성 정도 -----	17
4. 교원질(collagen)의 발현량 비교 -----	19

5. 표피층(epidermal layer)의 형성 정도 비교 -----	21
6. 신경 섬유(neurofilament)의 발현 -----	22
IV. 고찰 -----	24
V. 결론 -----	29
참고문헌 -----	31
영문요약 -----	35

그림 차례

그림 1. 실험 방법 -----	8
그림 2. 이식한 후 3일, 7일, 21일 후의 창상의 크기 변화 -----	15
그림 3. 실험군의 인공피부내 신생혈관 수 -----	16
그림 4. H&E 염색 후 기저층 형성 정도 평가 -----	18
그림 5. 교원질의 발현량 비교 -----	20
그림 6. 표피층의 형성 정도 비교 -----	21
그림 7. 신경섬유의 발현 정도 -----	23

표 차례

표 1. 인공 피부 이식 4주 후 기저층 형성 정도 평가 -----	17
표 2. 인공 피부 이식 4주 후 교원질 발현 정도 평가 -----	20
표 3. 인공 피부 이식 4주 후 표피층의 형성 정도 평가 -----	22
표 4. 인공 피부 이식 4주 후 신경섬유 발현 정도 평가 -----	23

국문요약

백서를 이용한 피부 대체물의 성능평가 기준 개발

인공피부(artificial skin)는 손상된 피부를 대체하는데 광범위하게 적용되어 창상 피복제 역할을 함은 물론 본래의 피부조직이 재생하는 것을 돕는 기능도 있어서, 깊은 2도 이상의 화상, 욕창, 난치성 궤양, 당뇨병 피부 괴사 등의 치료에 이용되고 있다. 인공피부는 콜라겐, 키토산, 젤라틴, hyaluronan, glycosaminoglycan (GAG) 등 천연 고분자 재료를 이용한 것과 polylactic acid (PLA), poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) 등 합성 고분자 재료를 지지체로 하여 세포를 배양한 것이 있다. 그러나 이러한 인공피부들은 면역반응이 일어나 쉽게 탈락되기 쉽거나 분해속도가 빠르기 때문에 장기간 효과적으로 피부역할을 수행하는데 어려움이 있다. 또한 여러 종류의 인공피부들이 생체 내에서 어떠한 과정을 거쳐서 생착되며 인공피부가 생착한 후에 인공피부의 성능을 어떠한 기준을 이용해서 평가해야 하는지에 대한 특별한 기준이 없어서 이를 체계화 하는 것이 시급하다고 생각된다.

따라서 본 연구는 임상에 이용되고 있는 인공피부의 이식 후

생착 과정의 변화를 알아보고 차이점을 비교하여 생착된 인공피부 성능의 평가기준을 체계화 하고자 하였다.

누드 마우스의 등에 직경 8mm의 창상을 만들고, 실험군 1에는 PLGA scaffold, 실험군 2 에는 무세포진피, 실험군 3 에는 진피와 표피층이 존재하는 3차원 배양피부를 이식한 후 실험군 1 과 2 은 수술 후 4주, 6주에 실험군 3 는 수술 후 2주, 4주째의 조직을 hematoxyline & eosin (H&E)염색, Masson's trichrome 염색 및 neurofilament 면역화학 염색(Ki 67(clone MIB, Dako) 염색)을 시행하여 창상크기의 변화, 기저층 형성 정도, angiogenesis index를 이용한 혈관 신생 정도, 교원질의 밀도 및 다발의 배열 정도, 신경섬유 발현 정도 및 표피층의 발현 정도 등을 광학현미경 하에 비교 관찰하여, 다음과 같은 결과 얻었다.

1. 인공피부를 이식한 군의 창상면적이 아무것도 이식하지 않은 대조군의 창상면적에 비해 넓게 나타났으며 통계학적으로 유의하였다. 즉 인공피부는 창상의 수축을 억제하는 효과가 있으며 이를 바탕으로 창상의 수축 정도를 4단계로 나누어 평가할 수 있었다.

2. 합성된 기질을 이용한 진피 대체물에 비해 무세포 진피 나 진피와 표피층이 존재하는 3차원 배양피부 에는 정상적인 기저층이 유지되는 것으로 나타났다.

3. 교원질의 생성 정도와 양상 차이를 관찰한 결과 진피와 표피층이 존재하는 3차원 배양피부를 사용한 실험군과 무세포 진피, 합성기질을 이식한 실험군 사이에 교원질의 발현시기와 발현 정도의 차이가 뚜렷이 나타났다.

4. 이식 후 나타나는 신생혈관의 수는 무세포성 진피기질과 3차원 배양피부에서 더 많이 관찰되었는데, 이는 인공진피의 혈액공급의 차이를 의미하기 때문에 이식했을 때 생착률의 차이로 나타날 수 있었다.

5. 기저층 형성 정도는 무세포 진피를 이식한 실험군 2, 3차원 배양피부를 이식한 실험군 3 에서는 정상 피부와 유사한 기저층을 관찰할 수 있었으나 PLGA scaffold를 이식한 실험군 1에서는 기저층의 흔적만을 관찰할 수 있었다

이상으로 기저층 형성, 혈관 신생 정도, 교원질 발현량, 신경섬유 발현, 표피층 형성 등은 인공 피부의 이식 후 생착 능력을 평가하는데 좋은 지표가 될 수 있으며, 각각의 평가항목을 객관화 하면 인체에 사용되는 인공피부의 성능 평가에 기준으로 이용할 수 있을 것이라 생각된다

핵심 되는 말; 인공피부(artificial skin), 생착능, 평가 기준

백서를 이용한 피부 대체물의 성능평가 기준 개발

< 지도교수 **박 병 윤** >

연세대학교 대학원 의학과

허 재 영

I. 서 론

피부는 신체를 둘러싸고 있는 하나의 막으로서 미생물, 자외선, 세균, 화학물질, 바이러스 등 여러 가지 유해 환경으로부터 인체를 보호하는 역할을 할 뿐만 아니라 수분 증발을 억제하여 탈수를 방지하고 체온을 조절하는 역할도 한다. 피부결손으로 인한 피부기능의 상실을 회복하고 화상으로 인한 반흔 구축의 교정 등을 위한 피부이식은 동종이식 보다는 대부분 자가 피부이식이 보편적으로 사용되고 있으나 그 공여부가 제한적이라는 단점이 있다.

손상된 피부를 대체하는 생체 이식용 인공피부는 큰 화상이나

외과수술 시 피부 결손이 있는 창상에 적용되어 창상 피복제 역할을 하며 본래의 피부조직이 재생하는 것을 돕는 기능도 있어서, 깊은 2도 이상의 화상, 욕창, 난치성 궤양, 연골손상, 당뇨병 피부괴사의 치료 등에 이용되고 있다. Burke와 Yannas(1980)는 광범위 화상 환자의 치료를 위하여 화상 부위를 피복할 물질을 찾던 중 인공 피부를 착안하였고, 세포외 기질을 구성하는 성분의 하나인 불용성 콜라겐과 glycosaminoglycan(GAG)으로 구성된 인공 피부를 개발하였으며,¹⁻³ Matsuda등은 불용성 콜라겐 대신 아테콜라겐을 사용하였다.⁴

인공피부는 크게 창상 피복제(wound dressing), 인공진피(artificial dermis) 그리고 조직공학적 피부(bioengineered skin) 등 세 가지로 나눌 수 있다. 창상 피복제는 손상을 입은 피부가 회복될 때까지 일시적으로 환부를 보호, 체내로부터의 수분 노출이나 감염 등을 방지하는 것으로 그 종류로는 겔, 폴리우레탄 막, 키틴 등이 있다. 인공진피는 전층 피부 결손이 있는 창상에 주로 사용되며, 섬유모세포가 쉽게 침투할 수 있는 통로를 제공하고 본래 피부조직으로 재생되는 것을 도우며, 인체 내 분해, 흡수됨을 기본으로 한다. 조직공학적 피부는 피부조직 채취 후 배양 및 증식시켜 인공진피에 부착하여 조직을 형성한 것으로 이식 시 거부반응이 거의 없고 크기를 얼마든지 크게 할 수 있어 화상

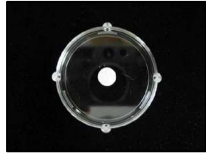
정도가 심하고 광범위한 경우 사용된다. polylactic acid (PLA), poly(lactide-co-glycolide)(PLGA)등 합성 고분자 재료를 지지체로 하여 배양한 것과 콜라겐, 키토산, 젤라틴, hyaluronan, glycosaminoglycan(GAG) 등 항 천연 고분자 재료를 이용한 것이 있다. 그러나 이러한 인공피부들은 면역반응이 일어나 쉽게 탈락되기 쉽거나 분해속도가 빠르기 때문에 장기간 효과적으로 피부역할을 수행하는데 어려움이 있다. 또한 여러 종류의 인공피부들이 생체 내에서 어떠한 과정을 거쳐서 생착 및 변화되며 인공피부가 생착한 후에 인공피부의 성능을 어떠한 기준을 이용해서 평가해야 하는지에 대한 확립된 기준이 없어서 이를 체계화 하는 것이 시급하다고 생각된다.

본 연구는 다양한 인공피부를 누드마우스의 등에 이식한 후 생착과정 중 발생하는 변화를 육안적, 조직학적 및 면역화학적 염색법 등을 이용하여 창상 크기변화, 기저층 형성 정도, 혈관 생성 정도, 교원질 발현, 표피층 형성 및 신경섬유 발현 등으로 평가하여 인공피부의 성능 평가에 기초를 마련하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험 방법

생후 약 6-8주된 누드 마우스(male BALB/c-nu 체중: 30-40g) 10마리를 사용하였다. 마취는 Ketamine 45mg/kg(케타민[®], 유한양행, 한국), xylazine(rompun[®], Bayer HealthCare, Germany) 3mg/kg를 복강에 주사하여 마취 유도 후에 누드 마우스의 등쪽 털을 제거 하였다. 베타딘(betadine)과 알코올로 환부를 소독한 후 8mm 피부 조직 검사기를 이용해서 누드 마우스 등의 위, 아래 두 곳에 전층 피부 결손 창상을 만들었다. 실험군 별로 PLGA scaffold, SureDerm[®](한스바이오메드, 한국), Neoderm[®] (테고사이언스, 한국)를 각각 이식한 후 봉합사를 이용하여 고정하고 Tegaderm[®](3M, USA)으로 완전히 밀봉 드레싱을 시행하였다.(그림. 1) 실험군 1(PLGA scaffold)과 2(Surederm[®])는 실험군 3 (Neoderm[®])과 달리 표피층이 없으므로 인공피부 이식 10일 후에 keratinocyte 시트(Kaloderm[®], 테고사이언스, 한국)를 사용하여 표피 이식을 시행하였다. 실험군 1 과 2 은 수술 후 4주, 6주에 실험군 3 는 수술 후 2주, 4주 후에 안락사 시킨 후 위, 아래 창상으로부터 주변 정상 피부를 포함하여 전층 조직 생검을 시행하였다. 결과 판정을 위해서 H&E 염색, Masson's trichrome 염색 및 neurofilament 면역화학 염색(Ki 67(clone MIB, Dako) 염색)을 시행하였다.



PLGA



Acellular human dermis

무세포진피



Bioengineered skin

3차원 배양피부



Keratinocyte sheet



Wound formation



Artificial skin graft



Fix: Tegaderm taping

그림 1) 실험 방법. 실험에 사용되는 각각의 인공피부 및 배양된 keratinocyte와 실험 순서를 보여주고 있다.

2. 실험에 사용된 인공 피부

가) PLGA scaffold (REGEN Biotech., USA) - 합성고분자 지지체로 10mm 직경과 3mm 두께를 가지는 것을 사용하였다.

나) SureDerm[®] (한스바이오메드, 한국) - 세포성 면역반응의 항원 대상인 표피층과 진피 내 세포들을 제거한 후 동결 건조로 진피층의 3차원 구조를 그대로 유지한 동종 진피(allogenic human dermis)이다. 면역학적 반응이 없는 상태에서 섬유모세포의 유입, 신경, 혈관 재생성에 필요한 골격을 마련해 준다.

다) Neoderm[®] (테고사이언스, 한국) - 섬유모세포(fibroblast)와 콜라겐 젤로 구성된 진피와 케라틴 세포가 다층으로 구성된 표피층이 존재하는 3차원 배양 피부이다

3. 실험군 설정

실험군은 3개로 나누었다.

1) 실험군 1 - PLGA scaffold와 Keratinocyte sheet(Kaloderm[®], 테고사이언스, 한국)를 이식한 군

2) 실험군 2 - 무세포진피 (SureDerm[®], 한스바이오메드, 한국) 과 Keratinocyte sheet(Kaloderm[®], 테고사이언스, 한국)를 이식한 군

3) 실험군 3 - 표피층을 포함하는 3차원 배양피부(Neoderm[®], 테고사이언스, 한국)를 이식한 군

4. 결과판정

가. 창상면적의 측정

각 실험군에서 인공 피부 이식 후 3일, 7일, 21일째에 디지털 카메라를 이용하여 영상을 얻고 이를 이용해서 실험군의 창상의 면적을 영상분석방법인 image analysis program인 Scion-image®(NIH-Scion corporation, USA)를 통해서 비교하였다. 이를 통해 각 실험군의 창상의 크기와 대조군을 비교해서 창상의 수축 정도를 평가하고자 하였다. 처음 창상과 백분율로 표시하여

+3: 처음 창상의 면적 75% 이상을 유지하며 창상 수축의 정도가 미미한 경우

+2: 처음 창상의 면적 50% 이상을 유지하며 경도의 창상 수축을 보이는 경우

+1: 처음 창상의 면적 25% 이상을 유지하며 중등도의 창상 수축을 보이는 경우

+0: 처음 창상의 면적 25% 이하를 유지하며 심한 창상 수축을 보이는 경우 등 4단계로 나누어 평가 하였다.

나. 혈관의 수

H&E 염색을 실시한 후 400배 배율의 광학 현미경으로 한 개의 조직 슬라이드에서 각기 다른 10개의 시야에서 혈관 수를 측정하였다. 평균 혈관 수 (angiogenesis index)를 이용하여 각각의 실험군을 비교하였다.

- + 3 : 신생 혈관 수가 평균 5개 이상을 유지한다.
- + 2 : 신생 혈관 수가 평균 4개를 유지한다.
- + 1 : 신생 혈관 수가 평균 3개를 유지한다.
- + 0 : 신생 혈관 수가 평균 1개 이상을 유지한다.

다. 기저층(basement membrane, BM)의 형성

실험군에서 수술 후 생검한 조직을 H&E 염색과 PAS 염색을 실시하고, 광학현미경으로 관찰하여 기저층 형성 정도를 다음과 같은 기준을 이용하여 각각의 실험군을 평가하였다.

- + 3: 정상피부의 기저층과 구분할 수 없을 정도로 정상적인 기저층을 유지한다.
- + 2: 기저층의 유지가 확인되지만 정상의 기저층과는 구분이 된다.
- + 1: 정확한 기저층을 형성하지는 않지만 기저층 형성의 흔적을 보인다.
- + 0: 기저층을 형성하지 않는다.

라. 교원질(collagen)의 발현 양

인공피부 이식 4주 후에 조직을 생검한 후 Masson's trichrome 염색을 실시하고, 광학현미경으로 관찰하여 교원질 발현 정도를 다음과 같은 기준으로 평가하였다.

- + 3: 정상 진피 조직과 유사한 교원질의 양과 배열을 보인다.
- + 2: 발현되는 교원질의 발현 양의 정도는 정상이지만 교원질의 배열이 불규칙적이다.
- + 1: 발현되는 교원질의 발현량이 부족하다.
- + 0: 이식된 진피 층 전체에서 미미한 교원질 발현을 보인다.

마. 표피층(epidermal layer)의 형성

인공피부 이식 4주 후에 조직을 생검한 후 Ki67(clone MIB, Dako) 염색을 실시하고, 광학현미경으로 관찰하여 표피층의 형성 정도를 다음과 같은 기준으로 평가하였다.

- + 3: 전형적인 5개 세포 층(기저층, 유극층, 과립층, 투명층, 각질층)을 유지한다.
- + 2: 평균 3-4개의 세포 층을 유지한다.
- + 1: 평균 2-3개 세포 층을 유지한다.
- + 0: 평균 1개 세포층 이하를 유지한다.

바. 신경섬유(neurofilament)의 발현

이식 4주 후에 조직을 생검한 후 신경 표지자인 neurofilament에 대한 면역화학염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하여 신경섬유의 발현 정도를 다음과 같은 기준으로 평가하였다.

- + 3 : 이식된 피부의 진피 및 표피층 모두에서 신경섬유의 발현이 잘 관찰된다.
- + 2 : 신경섬유의 발현이 이식된 조직의 진피에서 풍부하게 관찰되지만 표피층에서는 발현이 관찰되지 않는다.
- + 1 : 신경섬유의 발현이 이식된 조직의 진피에서 관찰되지만 발현 정도가 적다.
- + 0 : 신경섬유의 발현이 이식 피부와 정상 조직간의 경계에 국한되어 발현이 미미하다.

III. 결과

1. 창상의 크기 변화

처음의 창상면적을 100%로 하였을 때 각 군에서 평균 면적백분율 (창상 크기 척도)의 변화는 실험군 1 (PLGA scaffold)은 97.5%(+ 3), 92.5%(+ 3), 57.5%(+ 1)이었으며, 실험군 2 (무세포 진피) 에서 87.5%(+ 3), 82.5%(+ 3), 47.5%(+ 0)였으며 실험군 3 (3차원 배양피부) 에서는 85.0%(+ 3), 77.5%(+ 2), 47.5%(+ 0) 이었다. 이식 후 3주가 지나면 PLGA scaffold를 이용한 실험군 1 보다 실험군 2(무세포 진피), 3(3차원배양피부)에서 경한 창상 수축을 보였다. 그러나, 아무것도 이식하지 않은 대조군에서는 3주가 지나면 심한 창상 수축이 진행되어 처음 창상의 10% 미만을 유지하였다. 실험군에서는 대조군 보다 창상의 크기를 유지하면서 생착되는 것을 관찰할 수 있었다. ($p < 0.05$)

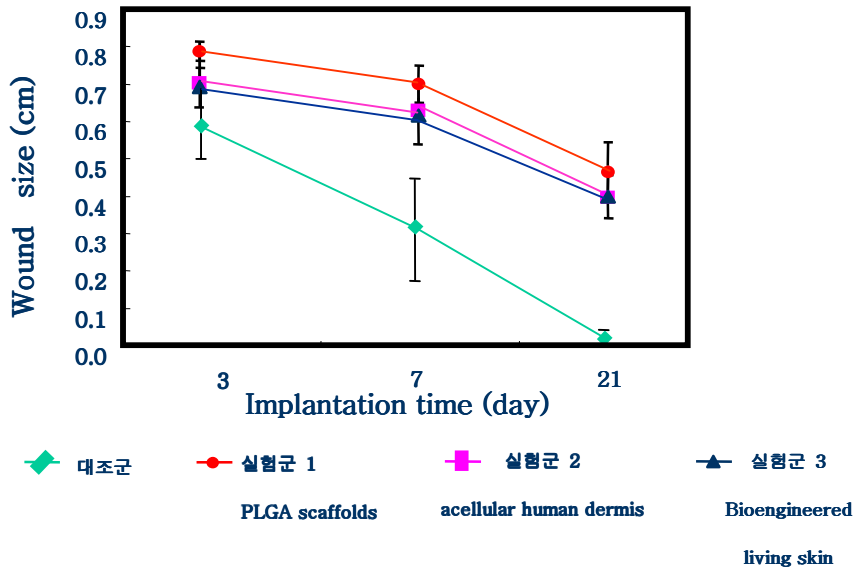


그림 2. 이식한 후 3일, 7일, 21일 후의 창상의 크기 변화. 이식 후 3주가 지나면 PLGA scaffold를 이용한 실험군 1 보다 실험군 2(무세포 진피), 3(3차원배양피부)에서 경한 창상 수축을 보였다. 실험군에서는 대조군 보다 창상의 크기를 유지하면서 생착되는 것을 관찰할 수 있었다. ($p < 0.05$)

2. 신생혈관 수의 변화

이식 후 2주째부터 실험군 3 (3차원배양피부)에서 혈관 신생이 관찰되었으며 이식 후 6주째에는 모든 실험군에서 혈관 신생이 관찰되었다. 혈관의 수는 실험군 1(PLGA scaffold) 에서 4주째 1.6개 6주째 0.3개였고 실험군 2(무세포 진피) 에서는 4주째 3.4개, 6주째 2.6개 였으며, 실험군 3 (3차원배양피부)에서는 2주째 3.7개, 4주째 4.0개로 PLGA scaffold 를 이용한 인공피부(실험군 1)에서 신생혈관이 더 적게 관찰되었다. (그림 3)이것을 신생혈관 숫자 척도를 이용하여 나타내보면 다음과 같다.(표 1)

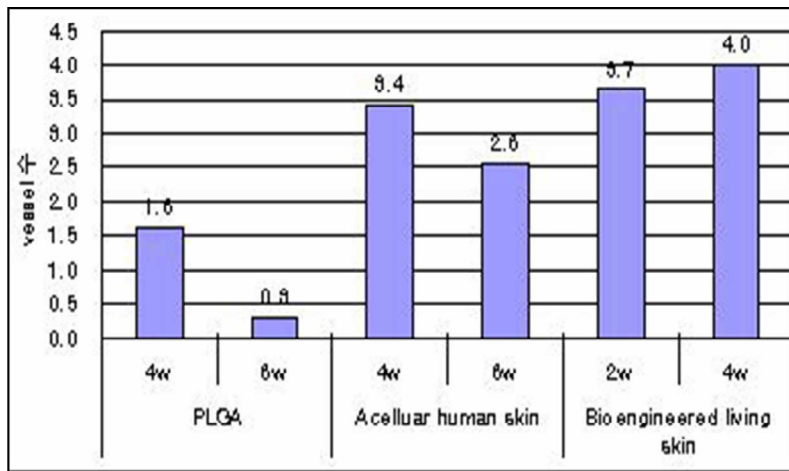


그림 3. 실험군의 인공피부 내 신생혈관 수. 실험군 1 (PLGA scaffold)에서 실험군 2 (무세포 진피)나 실험군 3 (3차원 배양피부) 보다 신생혈관이 더 적게 관찰되었다.

3. 기저층 형성 정도

기저층 형성 정도는 실험군 2(무세포 진피), 3 (3차원 배양피부)에 서는 정상 피부와 유사한 기저층을 관찰할 수 있었으나 실험군 1에 서는 기저층의 흔적만을 관찰할 수 있었다.(표 1., 그림 4.)

표 1) 인공 피부 이식 4주 후 기저층 형성 정도 평가.

	기저층 형성 정도
실험군 1 (PLGA scaffold)	+ 1
실험군 2 (무세포 진피, SureDerm [®])	+ 3
실험군 3 (3차원 배양피부, Neoderm [®])	+ 3

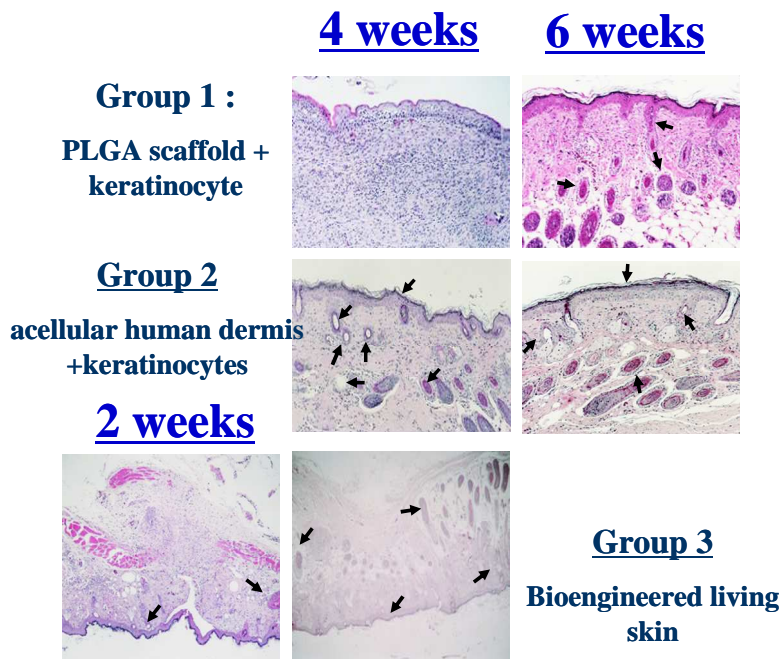


그림 4. H&E 염색 후 기저층 형성 정도 평가. 기저층 형성 정도는 실험군 2(무세포 진피), 3(3차원 배양피부)에서는 정상 피부와 유사한 기저층을 관찰할 수 있었으나 실험군 1(PLGA scaffold)에서는 기저층의 흔적만을 관찰할 수 있었다

4. 교원질(collagen)의 발현량 비교

이식 2주째 실험군 3 (3차원 배양피부) 에서 표피와 진피 일부에서 신생 교원질의 형성이 일어나기 시작하였으며 이식 4주째 실험군 1(PLGA scaffold) 에서는 교원질이 관찰되지 않았고 실험군2(무세포진피)에서는 미미한 교원질의 형성이 관찰되었다.

4주째에는 실험군 3 (3차원 배양피부) 에서 2주군에서보다 다소 밀집되어있었고 진피 전체에 걸쳐 교원질이 증가하였으며 6주째 실험군 1 (PLGA scaffold) 에서는 표피층 에서만 교원질의 형성이 관찰되나 실험군 2 (무세포 진피)와 3 (3차원 배양피부) 에서는 표피와 진피 전체에 걸쳐 고르게 관찰되었고 교원섭유가 섬세하였으며 배열양상도 질서가 있었다. 실험군 3 (3차원 배양피부)에서는 교원질의 배열이 더 질서가 있어 성숙된 양상을 보였다.(그림 5.) 교원질의 발현 정도를 성능평가 기준을 이용해서 나타내보면 표 2와 같다.

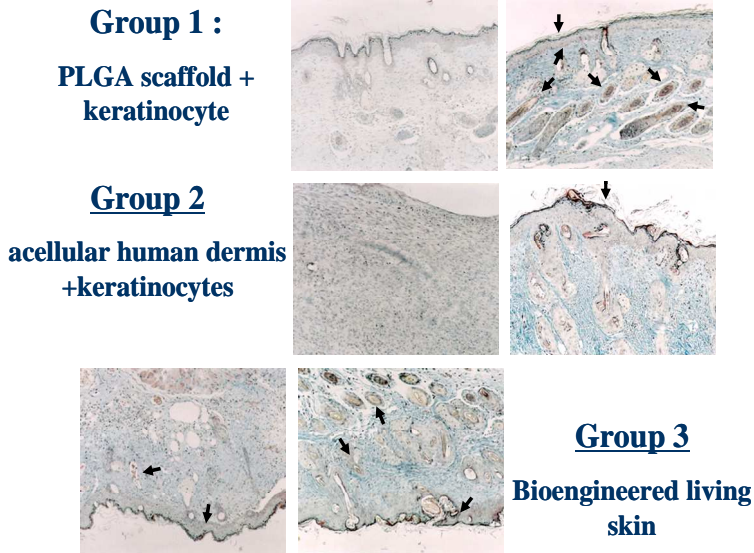


그림 5. 교원질의 발현량 비교. 실험군 1 (PLGA scaffold)에서는 이식 6주 후에 교원질이 표피와 진피층에 국한되어 발현되었으며, 실험군 3 (3차원 배양피부)의 경우 이식 4주 후에 표피와 진피 전체에 걸쳐 섬세하고 고르게 관찰되었다.

표 2) 인공 피부 이식 4주 후 교원질 발현 정도 평가.

	교원질 발현 정도
실험군 1 (PLGA scaffold)	+ 0
실험군 2 (무세포 진피, SureDerm®)	+ 1
실험군 3 (3차원 배양피부, Neoderm®)	+ 3

5. 표피층(epidermal layer)의 형성 정도 비교

실험군 1 (PLGA scaffold), 2 (무세포 진피) 의 경우 에서 이식 4 주 후부터 표피층의 생성이 관찰되었으며 6주 후에 명확한 표피층이 관찰 되었다. (그림6.) 실험군 3 (3차원 배양피부)의 경우 이식 4 주 후에 이미 명확한 표피층의 형성이 관찰되었으며 이것을 성능평가 기준에 맞추어 표시하면 표 3과 같다.

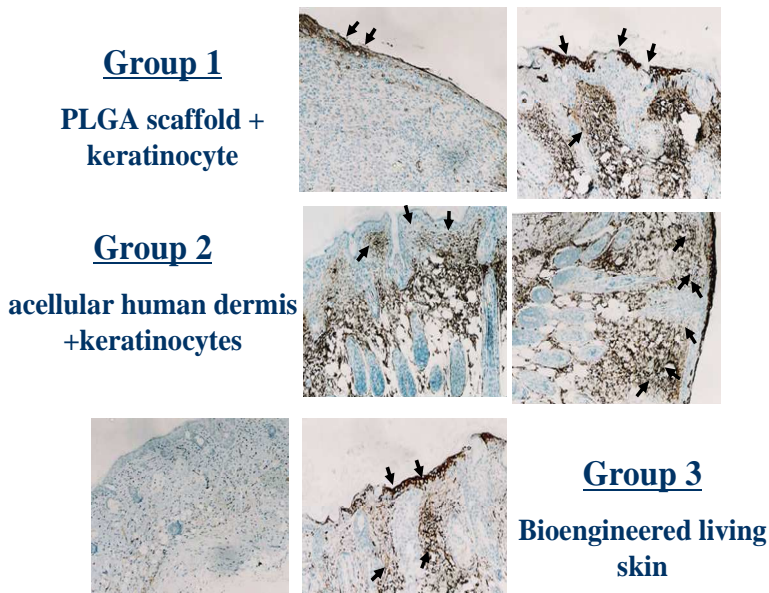


그림 6. 표피층의 형성 정도 비교. 실험군 3 (3차원 배양피부)에서 제일 먼저 완전한 표피층의 형성이 관찰되었다.

표 3) 인공 피부 이식 4주 후 표피층의 형성 정도 평가.

	표피층 형성 정도
실험군 1 (PLGA scaffold)	+ 1
실험군 2 (무세포 진피, SureDerm [®])	+ 2
실험군 3 (3차원 배양피부, Neoderm [®])	+ 3

6. 신경 섬유(Neurofilament)의 발현

실험군 3 (3차원 배양피부) 에서는 이식 2주 후부터 진피 내에 신경섬유의 발현이 보였으며 이식 4주 후에는 진피와 표피층 모두에서 신경섬유 발현이 관찰되었다. 실험군 1 (PLGA scaffold)의 경우 이식 6주 후가 되어야 진피층 내에서 신경섬유의 발현이 관찰 되었 으며 실험군 2 (무세포 진피)의 경우 이식 4주 후에 진피층 내에서 발현되기 시작한 신경섬유가 이식 6주 후에는 표피층에서도 관찰 되었다. (그림 7.) 이것을 기능평가 기준에 따라 표시하면 표 4와 같다.

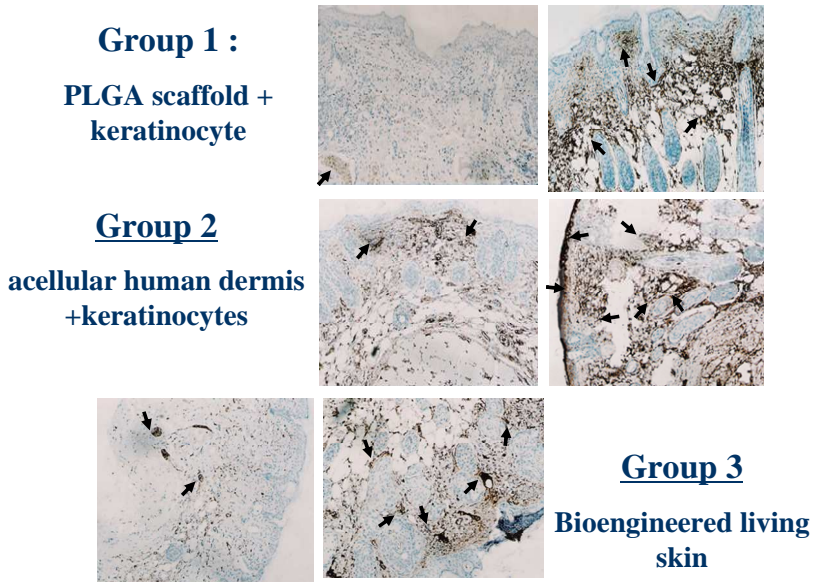


그림 7. 신경섬유의 발현 정도. 실험군 3 (3차원 배양피부)에서 제일 빨리 진피층 내에서 관찰되었으며 이식 4주 후에는 실험군 2 (무세포 진피)에서 이식 6주 후에는 실험군 1 (PLGA scaffold)에서 발현되었다.

표 4) 인공 피부 이식 4주 후 신경섬유 발현 정도 평가.

	신경섬유 발현 정도
실험군 1 (PLGA scaffold)	+ 1
실험군 2 (무세포 진피, SureDerm®)	+ 2
실험군 3 (3차원 배양피부, Neoderm®)	+ 3

IV. 고찰

피부가 손상 되었을 때 이를 회복하기 위하여 자가피부 이식술이 주로 이용되고 있으나 피부 공여부가 부족하거나 국소 혈액순환의 장애로 인해 자가 피부이식을 시행할 수 없는 경우도 있고, 피부이식을 시행한 후 반흔 구축이나 과색소 침착 등으로 기능상이나 미용상의 문제가 발생하는 경우도 있다. 또한 부족한 피부 공여부를 해결하기 위해 표피세포 배양을 통해 광범위한 피부결손에 사용하기도 하였다. 그러나 진피층 없이 표피층만을 이식하였을 때는 생착률이 낮고 생착되어도 쉽게 표피가 벗겨지며 생착된 부위에 반흔 구축과 비후성 반흔이 잘 생김이 밝혀졌다.⁵⁻⁷ 이와 같은 이유로 얇은 부분층 식피편이나 자가배양표피세포를 이식하기에 적합한 좋은 진피층을 만들기 위한 시도로서 진피 대체물의 개발이 필요하게 되었다.

진피는 교원섬유와 탄성섬유 그리고 세포간 기질 단백질로 구성되어 있으며 피부의 탄력성, 안정성 및 외양을 결정해 준다. 진피 대체물로는 합성된 기질을 이용한 진피 대체물¹⁻³과 동종피부에서 항원성을 가진 세포를 제거한 무세포 진피 (acellular dermis)등이 있다. 합성기질을 이용한 진피대체물은 생체 내 단백질성분의 1/3을 차지하는 교원질을 이용한 것으로 교원질은

조직과의 친화성이 높아 생체 내에서 자연스럽게 흡수되어 숙주의 조직과 치환되는 장점 때문에 조직 재구축 재료로 이용되고 있다.⁸ 이러한 인공진피들은 국내에서 현재 실제로 임상에 적용되고 있으며 원래의 목적인 피부결손의 재건 외에 여러 가지 분야에서 이용되고 있다.

진피 대용물질은 정상 진피가 갖는 특성에 가깝도록 고안 되어야 한다. 정상진피는 콜라겐 섬유의 3차원적 배열에 의해 그 기능이 특징지어지며 콜라겐의 3차원적 배열구조의 이상은 진피의 정상적인 기능상실을 유발할 수 있다.⁹ 그렇기 때문에 인공진피는 구조적으로 창상으로부터 창상 치유 과정에 필요한 세포가 잘 이동할 수 있게 하는 일종의 골격과 같으며 이것에서 새로 형성되는 결체조직은 알맞은 3차원 구조를 이루어야 한다.¹⁰ 인공진피는 새로운 진피로 대체되기 전까지는 그 골격을 유지해야 하지만 서서히 생 분해되어 새로운 신생 결체조직으로 대체되어야 하고 생물학적 유사성이 있어 면역반응이 최소화 되어야 한다. 또한 인공진피에서 세포독성이 있는 물질이 유리되어서는 안되며 사용할 때 조각이 용이해야 한다. 임상적으로는 감염과 체액의 분실을 방지하고 이식 후의 창상 수축과 반흔 형성을 최소화할 수 있어야 한다.

본 연구에서는 이러한 여러 종류의 인공피부들이 이식된 후 생체

내에서 발생하는 변화를 평가하여 인공피부의 성능 평가를 위한 기초를 마련하기 위해 누드 마우스를 통한 생체 내 실험을 시행하였다. 인위적인 전층 피부 결손 창상을 형성하고 인공피부를 이식한 후 육안적, 조직학적 및 면역조직화학 염색법을 이용하여 평가하였다.

먼저 인공피부가 창상 수축에 미치는 영향을 평가하기 위해 각각의 인공피부를 이식한 실험군과 아무것도 이식하지 않은 대조군에서의 창상의 크기 변화를 비교하였는데 3주 후 실험군 간에 미미한 차이는 있으나 대체로 창상의 크기를 유지하면서 생착되는 반면 대조군에서는 심한 창상 수축이 진행되어 처음 창상의 10%미만의 크기로 줄면서 치유되었다. 이는 인공피부가 창상수축을 억제하는데 관여하는 것으로 생각 된다.¹¹ 정상 진피는 이식하였을 때 창상 수축을 억제하는 능력이 있는데 아직까지 그 기전은 완전히 밝혀져 있지 않다. 창상 수축은 창상의 치유에 필요한 하나의 생물학적 기전이나, 임상적으로는 유방 보형물의 주위에 생기는 피막 구축, 피부의 반흔 구축 등의 예에서 볼 수 있듯이 바람직하지 않은 결과를 초래할 수 있다.^{12,13} 창상수축의 기전에 대해서, Rudolph 등은 근섬유모세포가 중요한 역할을 한다고 하였으나¹⁴ 다른 의견도 있으며¹⁵ 최근에는 콜라겐 간질로서의 진피의 중요성이 강조되고 있다.¹⁶⁻¹⁸

인공진피가 수용자의 진피로 대체되기 위해서 혈관이나 섬유모세포 등이 인공진피 내로 침습이 잘 되어야 하는데 본 실험결과 이식 후 4일째부터 실험군 3 (3차원 배양피부)에서 혈관 신생이 관찰되었으나 실험군 1 (PLGA scaffold)에서는 관찰되지 않았다. 이식 후 6주째에는 모든 실험군에서 혈관신생이 관찰되었다. 평균 혈관의 수는 실험군 1 (PLGA scaffold)에서 4주째 1.6개 6주째 0.3개였고 실험군 2 (무세포 진피)에서는 4주째 3.4개, 6주째 2.6개 였으며, 실험군 3 (3차원 배양피부)에서는 2주째 3.7개, 4주째 4.0개로 실험군 1 (PLGA scaffold)에서 신생혈관이 더 적게 관찰되었다. 이러한 차이는 곧 인공피부의 혈액공급의 차이를 의미하기 때문에 인공피부를 이식하였을 때 생착율의 차이로 나타날 수도 있을 것이다.

기저층 형성 정도는 실험군 1 (PLGA scaffold)에서는 정확한 기저층을 형성하지는 않고 기저층 형성의 흔적을 보이는 정도였으나 실험군 2 (무세포 진피), 3 (3차원 배양피부)에서는 모두 정상조직과 구분할 수 없을 정도로 정상적인 기저층을 유지하였다. 표피세포는 기저막이 있는 부위에서 잘 부착되고 증식하여, 표피화가 잘 일어나는 것으로 되어 있다.¹⁹ PLGA 지지체를 이용한 실험군 1 (PLGA scaffold)과는 달리 무세포성 진피기질이나 3차원 배양피부에는 기저층이 유지되기 때문에 배양된 표피를 이식하였을

경우에도 표피와 진피 사이에 반결합소체 (hemidesmosome)나 고정 섬유소 등이 유지가 잘 되어 다른 인공진피에 비해 술 후 표피가 벗겨지거나 물집이 잘 생기지 않는다. 인공진피 이식 후 빠른 생착을 위해서는 정상과 유사한 구조의 새로운 진피가 조속히 형성되어야 한다. 이런 과정을 위해서는 섬유모세포가 빨리 자라 들어와서 새로운 콜라겐을 만들어 주어야 한다. 트릭롬 염색으로 평가한 새로이 생성되는 교원질의 발현은 실험군별로 차이를 보였는데 실험군 3 (3차원 배양피부)에서는 정상 진피 조직과 유사한 교원질 양과 배열을 보였으며 진피층 만으로는 정상조직과 이식된 인공 진피간의 구별이 힘들었으며 실험군 2 (무세포 진피)에서는 발현되는 교원질 양이 정상의 50%미만이었고 실험군 1 (PLGA scaffold)에서는 이식된 진피층 전체에서 미미한 교원질의 발현을 보였다. 이는 인공진피를 만들 때 콜라겐을 교차 결합시키는 과정에서 어떠한 물질을 사용하는가에 따라 생착률에 차이가 생길 수 있다는 것을 의미한다. Mori 등은 개방성 창상에서 키토산으로 치료한 결과 대조군에 비해 콜라겐이 많이 생성되고 유사분열 세포가 많이 관찰된다고 하여 키토산으로 교차 결합시킨 인공진피는 섬유모세포의 증식이 빠르고 콜라겐 합성이 촉진될 것으로 예상 하였다.²⁰ 또한 실험군 2 (무세포 진피)와 3 (3차원 배양피부)에서처럼 동종진피에서 만들어진 인공피부의 경우

정상진피 구조를 가진 상태이기 때문에 수혜부 조직과의 친화성이
높아 조기에 섬유모세포의 침윤이 생기고 그로 인해 교원질의
생성이 빨리 나타난 것으로 보인다.

V. 결 론

본 연구는 누드 마우스에서 인공피부를 이식 후 생착 과정의 변화를 알아보고 생착된 인공피부의 평가를 창상의 크기 측정, 혈관의 수, 기저층의 형성, 교원질 발현량, 표피층의 형성 및 신경섬유의 발현 등의 기준으로 시행한 결과,

1. 합성된 기질을 이용한 진피 대체물에 비해 무세포 진피 (acellular dermis)나 3차원 배양피부에는 정상적인 기저층이 유지되는 것으로 나타났다.

2. 교원질의 생성 정도와 양상 차이를 trichrome 염색을 통하여 관찰한 결과 3차원 배양피부를 사용한 실험군과 무세포 진피, 합성기질을 이식한 실험군 사이에 교원질의 발현시기와 발현 정도의 차이가 뚜렷이 나타났다.

3. 이식 후 인공피부에 나타나는 신생혈관의 수는 무세포 진피와 3차원 배양피부에서 더 많이 관찰되었는데, 이는 혈액공급의 차이를 의미하기 때문에 이식했을 때 생착률의 차이로 나타날 수 있다.

4. 기저층 형성 정도는 실험군 2 (무세포 진피), 3 (3차원 배양피부)에서는 정상 피부와 유사한 기저층을 관찰할 수 있었으나 실험군 1 (PLGA scaffold)에서는 기저층의 흔적만을 관찰할 수 있었다

5. 인공피부를 이식한 군의 창상면적 백분율이 아무것도 이식하지 않은 대조군의 창상면적 백분율에 비해 통계학적으로 유의하게 더 컸다. 즉 인공피부는 창상수축을 억제하는 효과가 있으며 창상의 수축 정도를 4단계로 나누어 평가할 수 있다.

이상으로 기저층 형성, 혈관 신생 정도, 교원질 발현, 신경섬유 발현, 표피층 형성 등 본 실험에서 사용한 기준은 인공 피부의 이식 후 생착 및 성능을 평가하는데 좋은 지표가 될 수 있으며, 각각의 평가항목을 좀더 수치화한다면 인체에 사용되는 인공피부의 성능 평가에 좋은 지표로 이용할 수 있을 것이라 생각된다

참고문헌

1. Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* 1980;14: 65-81
2. Yannas IV, Burke JF, Orgill DP, Skrabut EM. Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. *Science* 1982;215:174-6
3. Burke JF, Yannas IV, Quinby WC Jr, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* 1981;194:413-28
4. Matsuda K, Suzuki S, Isshiki N, Ikada Y. Re-freeze dried bilayer artificial skin. *Biomaterials* 1993;14:1030-5
5. Wainwright DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix(Alloderm) in the management of full-thickness burns. *Burn* 1995;21:243-8
6. Kumagai N, Nishima H, Tanabe H, Hosaka T, Ogino Y. Clinical application of autologous cultured epithelia for treatment of burn wounds and burn scars. *Plast Reconstr Surg* 1988;82:99-110
7. Hansbrough JF, Cooper ML, Cohen R, Spielvogel R, Greenleaf G, Bartel RL, Naughton G. Evaluation of a biodegradable matrix

- containing cultured human fibroblasts as a dermal replacement beneath meshed skin grafts on athymic mice. *Surgery* 1992;111:438-46
8. McPherson JM, Sawamura S, Armstrong R. An examination of the biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants. *J Biomed Mater Res* 1986;20:93-107
 9. Burke JF. Observation on the development of an artificial skin: Presidential Address, 1982 American Burn Association Meeting *J Trauma* 1983;23:543-51
 10. Matsui R, Osaki K, Konishi J, Ikegami K, Koide M. Evaluation of an artificial dermis full-thickness skin defect model in the rat. *Biomaterials* 1996;17:989-94
 11. Frank DH, Bonaldi LC. Inhibition of wound contraction: a comparison of full thickness skin grafts, Biobrane and aspartate membranes. *Ann Plast Surg* 1985;14:103-10
 12. Billingham RE, Medawar PB. Contracture and intussusceptive growth in healing of extensive wounds in mammalian skin. *J Anat* 1955;89:114-23
 13. Rudolph R, Abraham J, Vecchione T. Myofibroblasts and free silicone around breast implants. *Plast Reconstr Surg*

1978;62:185-96

14. Rudolph R. Inhibition of myofibroblasts by skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 1979;63:473-80
15. Hembry RM, Bernanke DH, Hayashi K, Trelstad RL, Ehrlich HP. Morphologic examination of mesenchymal cells in healing wound of normal and tight skin mice. *Am J Pathol* 1986;125:81-9
16. Brown D, Garner W, Young VL. Skin grafting: dermal components in inhibition of wound contraction. *South Med J* 1990;83:789-95
17. Agren MS, Mertz PM. Are excessive granulation tissue formation and retarded wound contraction due to decreased collagenase activity in wound in tight-skin mice? *Br J Dermatol* 1994;131:337-40
18. Corps BV. The effect of graft thickness, donor site and graft bed on graft shrinkage in the hooded rat. *Br J Plast Surg* 1969;22:125-33
19. Chetty BV, Boissy RE, Warden GD, Nordlund JJ. Basement membrane and fibroblast aberration in blisters at the donor, graft, and spontaneously healed sites in patients with burns. *Arch Dermatol* 1992;128:181-6

20. Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, Minami S, Fujinaga T. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblast in vitro. *Biomaterials* 1997;18:947-51

Abstract

Evaluation of Artificial Skin Substitute Implanted onto Nude mice

Jae Young Hur

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Beyoung Yun Park)

Artificial skin substitute is composed of synthesized macromolecule such as PLGA and natural macromolecule such as collagen and chitosan. Understanding the physiologic and biochemical characteristics and changes when the artificial skin is transplanted into the body may be the most important marker for the assessment of the artificial skin substitute. The purpose of this study is to evaluate the remodeling process of the various skin substitutes at 4th and 6th weeks following the transplantation when transplanted onto nude mice.

Application of dermal graft to wound on nude mouse (male BALB/c-nu weighting 20g – 34g housed in cages). The experimental groups are consisted with 3 groups, such as PLGA scaffold with keratinocyte sheets(group 1), acellular human dermis (SuredermTM) and keratinocyte sheet(group 2), bioengineered skin (NeoderTM) (group 3). The PLGA scaffold and artificial skin were into circle form of 8mm diameter. Acellular human dermis (SureDermTM) and Bioengineered skin

(Neoderm™) were used. Nude mice approximately 6–8 weeks in age (24–32g in weight) were anesthetized using a mixture of ketamine and xylazine (200 µg and 10 µg/g, respectively). A 8mm sized full-thickness skin wound was made on the central dorsum of each animal and covered with the artificial skin (Neoderm™ and SureDerm™)/PLGA scaffold. Epidermis grafting with keratinocyte sheets was applied after 10 days to artificial skin implant. All mice were killed at 2, 4 weeks and/or 6 weeks after grafting and harvested tissue samples. Biopsied tissue samples were fixed in buffered formalin (10%) and embedded in paraffin wax. Five-micron sections were stained hematoxylin-eosin (H&E). During the observation period, formation of basement membrane and skin appendage was examined and changes of wound size at 3 days, 1 week, and 3 weeks postoperatively was measured and evaluated with human eyes. Angiogenesis index was used to figure out the degree of angiogenesis. The cell count, density, arrangement of collagen fibers in the transplanted artificial skin was examined. The immunohistochemistry of Ki67 staining and neurofilament was done to evaluate the degree of proliferation and neural restoration in the transplanted dermis.

According to the changes of wound size following the transplantation, no significant changes between the three groups were noticed. However, in the non-substituted contrast group, the size of wound decreased significantly due to contraction. In reference to degree of blood vessel formation by H & E staining, neovascularization was noted in Group 3 on the 2nd week of substitution, while no neovascularization was noted in Group 1. On the 6th week, neovascularization was noticed in all groups. According to the degree of collagen synthesis and arrangement in dermis, newly formed vessels were noted on the 2nd week in Group 2 and 6th week in Group 3, 1 respectively. In the 4th week, vascularization was witnessed

uniformly in the entire dermis, where as in Group 1, only slight labeling in upper dermis level was noticed. Neurofilament and epithelial cell staining was noticed on the 4th week in all study groups and significantly increased in the 6th week.

The remodeling efficiency of artificial skin substitute in the human body was studied with various methods. The degree of basement membrane formation, new blood vessel formation, collagen expression, neurofilament expression, epithelial cell staining may be the categories to anticipate the success of artificial skin substitution in early stages. We believe that measurement of mentioned categories may be used as guidelines for evaluating efficiency of the artificial skin substitution.

Key Words: Artificial skin, Efficiency evaluation