

황연에서 초저온 동결 보존된 동종 기관 이식

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 흉부외과, ¹신촌세브란스병원 병리학교실, ²경희대학교 의과대학
흉부외과

김도형 · 백효채 · 조상호¹ · 조규석² · 이두연

Trachea Replacement with Cryopreserved Tracheal Allograft: Experiment in Dogs

Do Hyung Kim, M.D., Hyo Chae Paik, M.D., Sang Ho Cho, M.D.¹, Kyu Seok Cho, M.D.² and Doo Yun Lee, M.D.

Department of Thoracic Surgery, Yongdong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, ¹Department of Diagnostic Pathology, Yonsei University College of Medicine, ²Department of Thoracic Surgery, Kyung Hee University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Tracheal transplantation is necessary in patients with extensive tracheal stenosis caused by trauma, congenital disease, benign or malignant tumor. Results with the cryopreserved vascular homograft have prompted us to evaluate cryopreserved trachea. When trachea is cryopreserved, it maintains viability of the cartilage and allogenicity decreased because epithelium of trachea which has major allogenicity (MHC class II Antigen) is exfoliated after some periods of cryopreservation. We assessed the proper duration of cryopreservation and probability of trachea allotransplantation. **Methods:** The trachea were harvested from Mongrel dogs and frozen to 80°C for different length preservation (group 1: 1~10 week, group 2: 1 month, 2 months, 3 months, 6 months, 2 months). Group 1 was thawed and tested epithelial viability, Group 2 was performed trachea transplantation with cryopreserved trachea allograft, after one months We checked gross appearance, viability of cartilage and grade of monocyte infiltration (rejection). **Results:** In group 1, Exfoliation of epithelium was begun after four weeks cryopreservation, in group 2, when allograft was extracted, trachea of 4 dogs was stenosed, and six months preserved trachea was not seen due to total necrosis. Cartilage viability of 4 case of transplantation, three of 4

case were mild infiltration of monocyte. **Conclusion:** We conclude that more than 1 month cryopreservation for prevention of rejection and additional procedure (omentopexy) for graft vascular supply are needed for trachea transplantation. Although cryopreservation was performed, all case of transplantation happened some degree graft rejection. if trachea transplantation will be applied, immune suppress will be needed. (J Korean Soc Transplant 2002;16:162-166)

Key Words: Cryopreservation, Trachea, Allotransplantation
중심 단어: 동결보존, 기관, 동종이식

서 론

선천성 혹은 외상에 의한 광범위 기관협착이나 기관 종양의 경우 기관이식이 이상적인 치료 방법으로 생각되고 있다. 하지만 기관이식은 이식 기관의 혈류 공급, 감염, 기관이식의 기술적 문제 등으로 임상적용을 하지 못하였다. 기관 이식 술기의 발달과 항생제의 발전으로 일부의 문제가 해결되었으나 거부 반응과 장기 부족의 문제는 아직도 해결해야 할 문제이다.(1,2) 최근 같은 흉부외과 영역에서 혈관 및 판막의 동종 이식의 임상 이용으로부터 조직학적으로 비교적 간단한 구조를 가지고 있는 기관의 초저온 동결 보존 후 동종이식의 가능성이 있다고 생각되었으며 이에 많은 실험이 시행되고 있다.(3,4) 특히 초저온 동결 보전 후 면역 거부 반응을 일으키는 주된 요소인 MHC class II 항체를 가지는 상피세포가 박리된다는 사실로 인하여 기관 초저온 동결 보존 방법이 이식 기관의 공급 부족과 동종면역 거부반응이란 문제점을 같이 해결할 수 있을 것으로 생각된다.(5)

이에 저자들은 초저온 냉동 보존된 황연 기관을 이용하여 동결 초기 기관의 상피조직의 조직학적 변화와 변화에 따른 동종 기관이식 시 생기는 결과를 비교하여 적절한 동결보존 기간 확인과 기관 동종 이식의 가능성을 확인하고자 하였다.

책임저자 : 이두연, 서울시 강남구 도곡동
영동세브란스병원 흉부외과, 135-720
Tel: 02-3497-3380, Fax: 02-3461-8282
E-mail: ydcs@yonsei.ac.kr
제32차 대한이식학회 추계학술대회 구연.

방. 법

1) 실험 개요

5마리의 황견에서 동종 기관 이식을 시행하였다. 다른 개에서 최초로 적출한 기관 절편 3개는 각각 1, 2, 3개월 냉동 보존한 후 기관 이식을 시행하였으며 나머지 2개의 절편은 기관 이식술 시 적출된 기관절편을 이용하여 2개월, 6개월 보존한 후 기관 이식을 하였다. 이식 기관 적출 시기는 수술 후 1달을 기준으로 하였으나 증세가 악화되어 사망 가능성 이 있으면 사망 전에 기관 적출을 시행하였다.

2) 기관 적출

25 kg 내외의 황견을 Ketamine (10 ml/kg), Sodium phenobarbital (30 ml/kg) 및 Pancuronium bromide (2 mg)로 전신마취를 한 후 기관 삽관하고 Volume-limited respirator (Tidal volume 20 ml/kg, frequency 15 breaths/min)를 연결한 후 50% 산소와 50% 질소로 마취한다. 황견을 앙와위로 위치시킨 후 경부에 세로로 피부절개를 하여 전장의 기도를 노출시킨 후 가능한 한 전체 길이와 주기판지를 적출한 후 기도를 6~7개의 ring을 포함한 조각으로 절단한다. 한편 상피 세포의 생육성 검사를 위해서 기관의 남은 부위를 10개의 기관 조각으로 절단한다.

3) 초저온 냉동보존

적출된 기관절편은 각각 다른 Bicell freezer vessel (Nihon freezer Co)용기에 저장액 (Dulbecco's modified Eagle medium, 20% fetal calf serum, 10% dimethyl sulfoxide and 0.1 mol/l sucrose)과 함께 담근 후 4°C에서 4시간 동안 보관 후 -80°C 초저온 냉장고에서 냉동 보관한다.

4) 기관 동종 이식

수용동물을 Ketamine (10 ml/kg), Sodium phenobarbital (30 ml/kg) 및 Pancuronium bromide (2 mg)로 전신마취를 하고 기관 삽관을 시행하여 Volume-limited respirator (Tidal volume 20 ml/kg, frequency 15 breaths/min)에 연결한 후 50% 산소와 50% 질소로 유지한다. 수술 시작 직전에 초저온 냉동 보관한 동종 기관 절편을 37도의 생리식염수에 담가 15분간 급속 해동한 후 경부와 흉부의 수술예상부위의 털을 제거하고 앙아위로 위치하고, 경부의 종 절개를 하여 기관 부위를 노출시킨 후 기관의 중간부위 중 6~7 ring 절편을 제거한 후 절개 부위에 새로운 기관을 삽입하여 호흡을 유지하면서 해동시킨 공여기관 절편을 이식한다. 봉합은 Vicryl 3-0으로 연속 봉합하면서 하부 기관 삽입을 제거하고 구강 내에 있던 기관 삽입을 말단 기관까지 진행시켜서 전신 마취와 호흡을 유지시킨다. 봉합부위에 공기 누출이 없는 것을 확인한 후 주위 지방 조직을 둘러싸거나 대량 성형

술을 시행하고 수술을 끝낸다. 수술 후 5일간은 경구 항생제를 복용시키고 면역 억제 약물이나 스테로이드는 사용하지 않는다. 4주 후 이식된 기관과 상하 2개의 ring을 포함 기관을 적출하였고 육안 검사 후 일부는 10% 포르말린에 고정시킨 후 Hematoxylin Eosin 염색을 하여 광학 현미경으로 연골의 생육성과 거부 반응을 관찰한다.

5) 상피조직 생육성 검사

Fresh, 1~10주로 각각 표기한 냉동 보존 기관을 해당 기간에 해동하여 각 상피의 생육성 검사를 한다. 모든 조직은 10% 포르말린에 고정하여 Hematoxylin eosin 염색을 시행 후 광학 현미경으로 상피세포의 생육성을 조사한다. Epithelial grading system에 따라: 0: no epithelium, 1: a single layer of nonciliated epithelium, 2: multiple layers of nonciliated epithelium, 3: normal mucociliary epithelium으로 나누어 생육성과 재생 정도를 판정한다.

6) 조직 생육성 및 면역성 검사

기관이식 4주 후 기관을 적출하여 10% 포르말린에 고정하여 Hematoxylin eosin 염색을 시행 후 광학 현미경으로 연골조직의 생육성과 거부반응정도를 조사한다.

연골조직 생육성 검사는 고배율 광학 현미경에서 생존 가능한 연골세포의 개수를 측정하여 그 비로 생육성을 측정한다. 이 때 생존 가능한 연골세포는 염색이 잘되고 clear nuclear membrane을 가진 세포로 정의한다. 생육성의 등급은 0: severe change (necrotic area > 70% of microscopic visual field), 1: moderate change (30% < necrotic area < 70%), 2: mild change (30% > necrotic area), 3: absence of any abnormality에 따라 생육성을 판정한다.

거부반응은 전체 간질 조직중의 염증 단세포의 침윤 정도를 가지고 측정한다.

거부반응의 등급은 severe; diffuse infiltration (> 70%),

Table 1. Viability of epithelium

Cryopreservation duration	Score
1st week	3
2nd week	3
3rd week	3
4th week	3
5th week	1
6th week	0~1
7th week	3
8th week	0~1
9th week	1
10th week	0~1

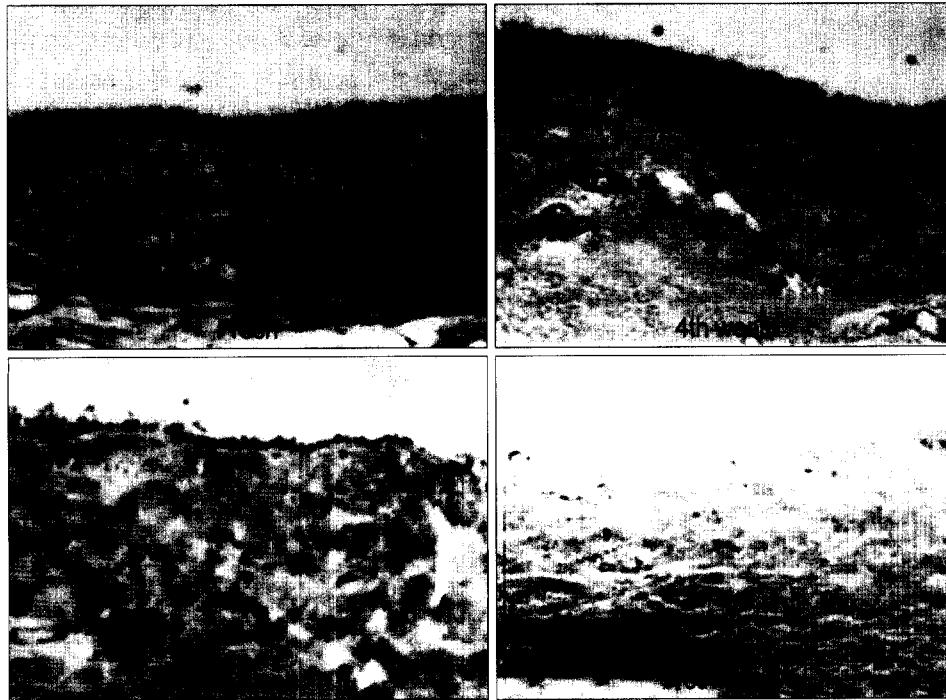


Fig. 1. Microscopic finding, after cryopreservation (H-E, $\times 200$). Epithelium of trachea is exfoliated after four weeks cryopreservation.

moderate; local infiltration (30% to 70%), mild; limited infiltration ($30\% >$), none; absent infiltration에 따라 침윤 정도를 측정한다.

결 과

1) 상피의 생육성

초저온 냉동 보관한 기관 절편 11조각을 각각 1주 간격으로 해동하여 상피 조직의 생육성을 검사한 결과 냉동 보존 기간 5주부터 상피의 생육성이 grade 0-1로 감소됨을 알 수 있었다(Table 1). 광학 현미경 소견을 보았을 때 1주와 4주의 상피 세포는 전층의 세포가 모두 보존된 grade 3의 소견을 보였으나 7주와 10주의 기관 상피는 상피 조직의 일부 혹은 전층의 박리를 보이는 소견을 보였다(Fig. 1). 동종 이식 시 최소한 1달 이상 보관하여야 상피 조직의 생육성이 감소함을 알 수 있었다.

2) 기관의 동종 이식 결과

동종 기관이식의 시행 1달 후 case 1, 2, 3에서는 계획적으로 기관을 적출하였으며 case 4, 5는 기관이식 17, 15일 만에 호흡곤란 증세가 악화되어 계획보다 먼저 기관을 적출하였다. 적출 당시 육안 소견상 case 1, 2, 3, 4에서는 이식 기관 조각의 협착 소견이 보였으며 6개월간 냉동 보존한 case 5에서는 전체적으로 괴사 소견을 보였다(Fig. 2).

기관 연골의 생육성 검사에서는 case 2, 3에서 necrotic

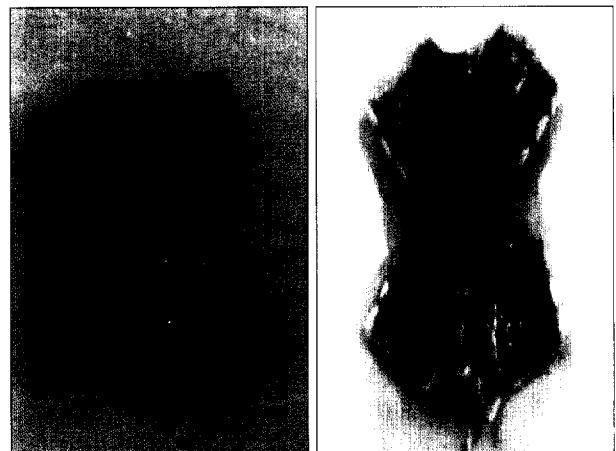


Fig. 2. Gross finding, transplanted allograft shows stenosis and endoluminal granulation tissue.

cartilage, case 4에서는 viable cartilage가 보였으나 case 1, 2, 3, 4에서 grade 0의 severe necrosis 소견을 보였으며 6개월간 보존한 case 5에서는 이식 기관의 완전 괴사로 기관 연골 생육성 확인이 불가능하였다(Table 2). 기관의 단핵구 침윤 정도는 case 1, 2, 3에서 30% 이하인 mild infiltration을 보였으나 case 4에서는 30%에서 70%인 moderate infiltration을 보여 초저온 동결 보존이 거부반응을 완전히 없애지는 못한다는 것을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2. Result of cryopreserved trachea transplantation

	Preservation duration	Outcome	Graft status	Cartilage viability	Rejection grade
Case 1	1 month	Killed (POD#29)	Stenosis	0: severe No cartilage	2: mild
Case 2	2 months	Killed (POD#28)	Stenosis	0: severe Necrotic cartilage	2: mild
Case 3	3 months	Killed (POD#34)	Stenosis	0: severe Necrotic cartilage	2: mild
Case 4	2 months	Killed (POD#17)	Stenosis	0: severe Viable cartilage	1: moderate
Case 5	6 months	Killed (POD#15)	Necrosis	Not checked	Not checked

POD = post operation day.

성의 감소가 발생함을 알 수 있었다.

Bujia 등(5)은 HLA class II gene product가 인간의 기관상피에 있다고 하였으며 기관상피세포가 기관의 동종이식에 동종면역성을 나타내는 주인자라고 보고하였다. Mukaida 등(11)은 19마리의 개를 대상으로 자가이식, 동종이식, 초저온 냉동 보존 후 동종이식을 시행하여 자가이식 군과 초저온 냉동 보존 후 동종이식 군에서는 이식 후 기관협착이 없었으며 냉동 보존을 하지 않은 군에서는 모든 실험동물에서 기관협착이 있었다고 하였으며 동종면역성을 가지는 이식 기관의 상피세포는 이식 후 20일 이내에 사라지고 수혜 기관에서 상피세포가 자라 6주 내에 이식기관을 덮어 면역 억제 약물 없이 동종 기관 이식을 할 수 있었다고 하였다. Tojo 등(12)은 쥐를 대상으로 실험하여 기관 동종이식 실험을 하여 기관 이식 후 이식 기관의 상피는 수혜 쥐의 상피였으며 연골은 공여 쥐의 연골이었다고 보고하였으며 기관 이식 시 수혜동물의 상피가 공여기관에 피복하여 면역성이 감소될 것이라고 주장하였다. Mukaida 등(13)은 개를 대상으로 한 실험에서 14일간 초저온 냉동 보존된 기간을 동종 이식하였을 시 공여기관의 상피세포가 20일 이내에 사라지며 기관 이식 시 수혜동물의 기관에서 상피세포가 자라나서 공여기관을 덮게 되는데 최장 50일 내에 대치 된다고 보고하였다. 기관은 기관 상피와 기관연골로 구성되어 있으며 주된 면역성은 MHC class II 세포를 가지고 있는 상피 세포에서 일어난다. 초저온 냉동 보관된 기관은 상피세포의 파괴와 박리가 일어나 동종이식 시 면역거부의 감소를 일으킨다. 기관 상피세포의 박리 및 파괴는 초저온 냉동 보관의 기관과 연관성이 있으며 상피세포가 남아있는 양이 많을 수록 기관 이식 후 거부 반응을 더 일으켜 초기 냉동보존 기간이 수술의 성공 여부에 보존 없이 동종이식을 한 경우, 각각 1주, 1달, 3달, 6달 동결보존 후 동종이식을 한 경우를 비교하여 1달 이상 동결 보존된 경우 MHC class

고찰

기관의 심한 협착이나 종양이 있는 경우 기관의 절제 후 단단 문합법이 가장 좋은 치료법으로 받아들여지고 있으나 병변이 광범위한 경우 단단 문합법이 불가능하여 기관이식이 필요하다. Rose 등(6)은 사람에서 기관이식을 시행하였다고 보고하였으나 성공적이진 못하였다. 최근 초저온 동결 보존에 의한 조직 보존법의 개발로 다시 기관 이식의 관심이 높아져 많은 동물 실험이 시행되고 있다.

Yokomise 등(7)은 기관을 9개월간 냉동 보존 후 동종기관 이식을 하고 2개월 이상 이식기관이 생존했음을 보고하였고 Kushibe 등(8)은 -196°C에 보존된 기관에서 연골의 생육성이 67~76% 감소되며 그 후 24개월까지 보존 기간과 상관없이 생육성이 보존된다고 하였다. Nakanish 등(9)은 쥐의 기관을 Bicell biofreezing vessel에 보관하였으며 -80°C 보존된 쥐 기관을 가지고 실험하여 장기간 냉동보존은 상피와 연골세포에 퇴행성 변화를 일으키며 연골은 상피세포에 비해 더욱 퇴화하는 경향이 있는데 이는 냉동 보호제가 연골의 깊은 곳까지 관통하지 못하기 때문이라고 하였다. 3개월 이내의 기관 냉동 보관 시 상피세포와 연골세포의 퇴화는 없었으며 6개월 이상 냉동 보존 시 상피세포와 연골세포의 퇴화가 있었다고 하였으며 이 차이는 냉동보존 온도의 제한성 때문이라고 하였다. -130°C 이상에서 장기간 보관 시 세포 내에서 재결정이 일어나 세포막에 손상을 주며 -130°C 이하에서는 물 분자의 변화가 완전히 정지하므로 거의 영구적 보존이 가능하다. 따라서 -196°C 액체질소에서 조직을 보존하면 영구보존이 가능하다.(10) 본 실험에서 -80°C에서 기관을 보관하였고 6개월 보존한 기관에서는 대망성형술을 시행했음에도 완전 파사가 2주만에 발생한 것으로 보아 -80°C 보관은 시간이 경과함에 따라 생육

II antigen을 가진 기관상피세포가 없어져 면역거부반응에 의한 기관 협착이 없었다고 보고하였다. Aoki 등(14)은 기관의 상피세포에서 면역성을 나타내는 MHC class II antigen이 나타나며 쥐에서 20일 이상 초저온 냉동 보존된 경우 기관에 상피세포가 소실되며 20일 이상 냉동 보존된 기관을 동종 이식한 쥐에서 20일 이내 냉동 보관된 쥐보다 통계학적으로 유의한 거부반응 정도를 보였다고 보고하였다. 본 실험에서도 상피의 생육성 검사에서 5주부터 상피세포의 박리가 보이기 시작하였다. 이는 1달 이상 동결 보존 시 해동과장에서 상피세포의 박리가 일어나며 동결 보존 시간이 길수록 상피세포의 박리가 더욱 증가됨을 알 수 있었다. 하지만 여러 실험에서 보고된 것과는 다르게 상피세포의 박리가 이식 초기 거부 반응을 예방하지는 못하여 대부분의 예에서 mild에서 moderate의 거부반응을 보였다.

결 론

초저온 냉동 보관된 기관조직의 상피조직은 4주 이상 냉동 보존되었을 때 상피 조직의 박리가 나타났다. 최소 1달 이상의 냉동 동결 보존 후 기관 이식을 시행하는 것이 상피조직에 의한 거부 반응을 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서 기관 연골은 전 예에서 severe의 기관 연골 생육성을 보였는데 이식 조직의 생육성 유지를 위한 충분한 혈류 공급이 없었기 때문으로 생각되며 대망 성형술 등 부가적 혈류공급 수술이 동반되어야 할 것으로 생각된다. 또한 모든 예에서 단핵구 침윤이 mild에서 moderate 정도 있었는데 이는 동결 보존 자체가 완전히 면역 거부반응을 예방할 수 없으며 기관 이식 시 적정량의 면역억제 약물 사용이 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ferdinand A, Luk SK, Cooper JD. Successful revascularization of total ischemic bronchial autograft with omental pedicle flap in dogs. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1982;84:204-10.
- 2) Biegel A, Ruchholz WM. Tracheal transplantation, The immunologic effect of rat tracheal transplants. *Arch Otolaryngol* 1984;240:185-92.
- 3) Kirklin JK, Smith D, Novicks W, Naftel DC, Kirklin JW, Placo AD, Nanda NC, Helmcke FR, Bourge RC. Long term function of cryopreserved aortic homograft: a ten-year study. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1993;106:154-66.
- 4) Deschamps C, Trastek VF, Ferguson JL, Martin WJ, Colby TJ, Pairolo PC, Payne WS. Cryopreservation of canine trachea: functional and histological changes. *Ann Thorac Surg* 1989;47:208-12.
- 5) Bujia J, Wilmes E, Hammer C, Kastenbauer E. Tracheal transplantation: demonstration of HLA class II sub region gene products on human trachea. *Acta Otolaryngol* 1990;110:174-84.
- 6) Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man. *Lancet* 1979;1:433-6.
- 7) Yokomise H, Inui K, Wada H, Ueda M, Hitomi S. Long term cryopreservation can prevent rejection of canine tracheal allografts with preservation of graft viability. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1996;111:930-4.
- 8) Kushibe K, Nezu K, Nishizaki K, Takahama M, Taniguchi S. Tracheal allotransplantation maintaining cartilage viability with long term cryopreserved allografts. *Ann Thorac Surg* 2001; 71:1666-9.
- 9) Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka R, Umesue M, Kohno H, Yasumoto K. Maximal period of cryopreservation with the Bi-cell biofreezing vessel for rat tracheal isograft. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1999;117:1070-6.
- 10) Grout B, Morris J, McLellan M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. *Trends Biotechnol* 1990;8:293-7.
- 11) Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, Andou A, Date H, Yamashita M, Ichibas S. Experimental sturdy of tracheal allotransplantation with cryopreserved graft. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1998;116:262-6.
- 12) Tojo T, Kitamur S, Gojo S, Kushibe K, Nezu K, Taniguchi S. Epithelial regeneration and preservation of tracheal cartilage after tracheal replacement with cryopreserved allograft in the rat. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1998;116:624-7.
- 13) Mukaida T, Shimizu N, Aoe M, Andou A, Date H. Tracheal allotransplantation after varying term of cryopreservation. *Transplant Proc* 1998;30:3397-400.
- 14) Aoki T, Yamamoto Y, Tsukida M, Souma T, Yoshiya K, Watanabe T, Hayashi J. Successful tracheal transplantation using cryopreserved allografts in rat model. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:169-73.