

가토 슬관절의 전층 연골 결손에서 자가 및 동종 연골 세포 이식의 결과 비교

연세대학교 의과대학 정형외과학교실, 병리학교실*

장준섭 · 이진우 · 양우익*

— Abstract —

Autologous Vs Allogenic Chondrocytes Transplantation for Full Thickness Chondral Defects in Rabbit's Patella

Jun Seop Jahng, M.D., Jin Woo Lee, M.D. and Woo Ick Yang, M.D.*

Department of Orthopaedic Surgery and Department of Pathology,*
Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea

Biologic resurfacing of the damaged joints is an area of great interest and clinical promise because of the limited potential of damaged articular cartilage healing. Several methods such as spongiolization, joint debridement and abrasion of subchondral bone, perichondral grafts, and osteochondral grafts have been used to repair cartilage defects, but the results were not satisfactory. Recently autologous chondrocyte transplantation with a periosteal patch was paid an attention for its advantage, the regeneration with hyalin cartilage. But it have many disadvantages such as too expensive cost, second staged operation, and technically difficult to isolate chondrocytes from a small volume of donor site, so we performed that a defined cartilage defect in the rabbit patella was treated with transplantation of *in vitro* expanded allogenic chondrocytes and then compared with an autologous chondrocytes transplantation.

Adult rabbits were used to transplant autogenously and allogenically harvested and *in vitro* cultured chondrocytes into patellar chondral lesions that had been made previously 3×3mm in size, extending down to the calcified zone. Chondrocytes were isolated in the femoral condyle of the opposite knee or other rabbit knee. And then enzymatic digestion (collagenase A and DNase I) was performed for 5 hours at room temperature in a spinner bottle and cells were seeded in a 25cm² culture flask in

* 통신저자 : 이 진 우

서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 정형외과학교실

* 본 연구는 연세대학교 의과대학 1996년도 일반과제(교수) 연구비에 의하여 이루어졌음(과제번호: 1996-26).

* 본 논문의 요지는 1997년 제 3차 대한정형외과 연구학회 학술대회에서 구연되었음.

Dulbecco's modified essential medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). The culture medium was changed twice weekly. After 14 days of culture, the cells were isolated by trypsinization and transplanted into previously made chondral defects with an autogenous periosteal patch taken from the medial aspect of tibia. Healing of the defects was assessed by gross examination, immunohistochemical stain, and light microscope with hematoxylin-eosin stain at 8, 16, and 24 weeks. Allogenic and autologous chondrocytes transplantation significantly increased the amount of newly formed repair tissue compared to that found in control knees in which the lesion was solely covered by a periosteal patch. The repair tissue, however, had a tendency of incomplete bonding to adjacent cartilage. This study shows that allogenic and autologous articular chondrocytes that have been expanded for 2 weeks *in vitro* can stimulate the healing phase of chondral lesion. There is no significant difference between allogenic and autologous chondrocytes transplantation.

Key Words : Rabbit, Patella, Chondral defect, Chondrocyte transplantation, Autologous, Allogenic

서 론

심한 관절염이나 외상으로 인하여 손상된 관절연골이 회복되거나 재생되는 것은 극히 제한된 경우이며, 소실된 관절기능을 회복시키기 위하여 인공 관절을 이용한 인공관절 전치환술이 있지만 이는 주로 60세이상의 환자에서 실시되며, 젊은 사람의 경우 인공관절에 의한 치료는 제한적일 수밖에 없다. 따라서 이환증이거나 손상된 관절에 연골형성 능력이 충분히 있는 조직을 이식하여 관절연골의 결손 부위에 생리적인 조직이 덮히게 하는 방법이 필요하게 되었다.

1908년에 Hofmann¹⁶⁾은 골막이 관절연골을 생성할 수 있다고 생각하고 유리골막이식을 이용하여 관절성형술을 시행하였으며, 1914년 Hass¹³⁾가 늑골의 연골막으로부터 연골이 형성된다고 보고하였다. Ham¹⁴⁾은 1930년에 골막의 골형성층에 있는 세포들은 태아 시기의 환경 조건에 따라 골형성이나 연골형성을 할 수 있다는 가능성을 시사하였다. Mitchell과 Shepard²⁴⁾는 가토에서 연골하골까지 다발성 천공을 함으로 초자연골과 유사한 조직으로 재생된다고 하였으며, Engvist⁷⁾는 개에서 실험적으로 연골막을 자가 이식함으로 관절연골이 복구됨을 관찰할 수 있었다고 한다. Rubak²⁸⁾은 가토 대퇴골의 관절연골에 결손을 만든 후 골막을 이식하여 연골형성을 얻었다고 보고하였다. 또한 Kreder²¹⁾은 동결 보관된 동종 골막을 이식하여 관절연골 결손이 생물학적으로 복구됨을

보고하였으나, 이러한 노력들은 관절연골의 전층 결손의 치유에 기여하지만 제한적인 것으로 알려져 있다.

따라서 원래의 관절연골과 동일한 조직으로 치유되게하기 위한 노력으로 최근 연골세포의 배양 및 이식이 각광을 받고 있다. Noguchi 등^{26, 32)}은 토끼에서 교원질(collagen) gel에서 연골세포를 배양하여 동종 및 자가이식을 실시하여 좋은 결과를 얻었다고 하였으며, Wakitani 등³⁰⁾도 가토에서 교원질(collagen) gel과 함께 연골세포를 동종이식하여 연골결손이 초자연골 특히 제2형 교원질로 채워짐을 보고하였다. 이들³¹⁾은 또한 골수 및 골막에서 분리한 골연골 전구 세포를 배양하여 교원질(collagen) gel과 함께 이식하여 원래의 관절연골과 유사한 조직으로 치유됨도 보고하였다. 그러나 이러한 보고들은 실험적 보고들이며 실제적으로 임상에 적용하기에는 많은 제한이 따르게되어, 실제 임상적으로 적용되는 관절연골의 결손에 대한 치료 방법으로는 spongiolization⁹⁾, joint debridement and abrasion of subchondral bone^{8, 10, 18, 19, 29)}, 연골막 이식^{1, 17)}, 골연골 이식^{12, 23, 27)} 및 탄소 섬유질 삽입(carbon fiber matrix insertion) 등^{3, 25)}의 방법이 사용되고 있으나 그 결과는 만족할 만하지 못하며, 위에서 기술한 치료방법의 가장 큰 단점은 관절연골을 구성하는 초자연골(hyaline cartilage)이 아닌 제1형 교원질로 구성된 섬유성 연골로 치유된다는 점이다.

최근 Brittberg 등^{4, 5)}이 골막과 함께 자가 관절연골세포 이식(autologous chondrocyte trans-

plantation)을 실시하여 제2형 교원질로 구성된 초자연골로 치유를 얻었다고 발표한 이후 이 방법에 대한 국내외의 관심이 고조되고 있는 상태이다. 그러나 자가연골세포 이식법의 경우 공여부에 문제를 일우킬 수 있으며, 두 번의 수술을 시행하여야하며, 수술 비용이 매우 비싸고, 적은 양의 공여 조직에서 이식하기에 충분한 양의 연골세포를 얻기가 기술적으로 매우 어렵다는 단점이 있다고 할 수 있다. 그런데 연골세포의 경우 면역원성이 약한 것으로 알려져 있어⁶ 동종연골세포를 이식에 이용할 수 있다면 위에서 언급한 자가연골세포 이식법의 단점을 극복할 수 있는 장점을 가질 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 가토의 슬관절에서 연골세포를 분리 및 배양하여 자가 및 동종 이식을 실시한 후 그 결과를 비교함으로써 향후 동종 연골세포 이식이 임상적으로 적용될 수 있는 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연골세포의 분리 및 배양

연골세포의 분리는 Brittberg 등⁴의 방법을 이용하였으며, 모든 조작은 무균적 방법으로 시행하였다. 먼저 연골세포는 체중이 약 2.5-3kg의 성숙한 New Zealand White (NZW) 토끼의 슬관절 연골을 얻어 사용하였는데, 자가이식군의 경우 반대편 슬관절에서, 동종이식의 경우 다른 개체의 슬관절에서 채취하였다. 채취된 연골조직은 Petri dish로 옮긴 후 Dubecco's modified essential medium(DMEM)에서 약 1×1mm 크기의 작은 절편으로 자른 다음 3차례 DMEM으로 세척을 실시하였다. 연골조직의 절편을 무균병에 옮긴 후 10ml의 DMEM에 10mg의 Collagenase A(Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany, 1mg/ml)와 1mg의 DNase I(Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany, 0.1mg/ml)을 넣은 후 상온에서 5시간 동안 금속봉을 이용하여 천천히 흔들어 주면서 기질을 소화시켰다. 용액을 취하여 DMEM으로 3회 세척한 후 나일론망(Nylon mesh, 100μm, Spectrum, Houston, Texas, USA)으로 걸러내어 소화되지 않은 연골조직을 제거한 다음 trypan blue를 이용하여 생체염색을 실시하고 살

아있는 세포수를 hemocytometer로 측정한 다음 1×10^6 개의 세포가 되도록 조절하여 10%의 우태혈청(Fetal bovine serum, Hyclone, Logan, Utah, USA), penicillin과 streptomycin (100 U/ml, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 DMEM용액과 함께 25cm² 배양용기에 넣어 배양을 실시하였다. 배양액은 일주일에 2회 교환하였으며, 약 2주간 배양을 실시하여 세포의 수가 1×10^7 개가 되도록 증폭한 다음 trypsin을 이용하여 배양용기에서 떼어낸 후 DMEM 용액으로 3회 세척을 실시하고 microtube에 옮겨서 20%의 우태혈청이 함유된 DMEM용액 20μl에 혼합하여 이식을 위한 세포용액을 준비하였다.

2. 자가 및 동종 연골세포의 이식

2.5-3kg내외의 토끼에 Entobar(pentobarbital sodium, Hanlim Pharm Co., Seoul, Korea)을 주사후 전신마취하에서 전내방도달법을 이용하여 슬개골을 노출시킨 후 그림과 같이 칼을 이용하여 3×3mm의 전총 연골 결손을 만들었다. 이 전총 연골 결손 부위에 동일 개체의 경골 내측부에서 채취한 골막피만을 덮은 후에 현미경을 이용하여 No 8.0 Dexon (Ethicon, Edinburgh, United Kingdom)으로 4군데 봉합을 실시한 다음 섬유소 아교 (Beriplast, Behringwerke, Marburg/Lahn, Germany)를 이용하여 연골 결손부와 골막피판 사이의 간격을 메웠다(Fig. 1). 이후 준비된 세포용액을 micro-syringe (SGE, Ringwood, Australia)를 이용하여 연골결손부와 골막피판 사이의 공간에 주사하였다. 활액막과 판질막을 No. 4.0 Dexon (Ethicon, Edinburgh, United Kingdom)으로 봉합한 다음 피부를 같은 봉합사로 봉합을 실시하고 상처부위는 Potadine으로 도포후 수술을 끝마쳤다. 술후 tobramycin 5mg/kg을 근육주사하고 고정없이 자유로이 운동을 허용하였다. 대조군으로는 골막피판만을 이식한 경우와 연골 결손만 만든 경우로 나누어 비교관찰을 실시하였다. 연골결손만 있는 대조군은 7개 슬관절, 골막이식군은 7개 슬관절, 자가연골세포 이식군은 16 개 슬관절, 동종연골세포 이식군은 20개 슬관절에서 시행하였다.

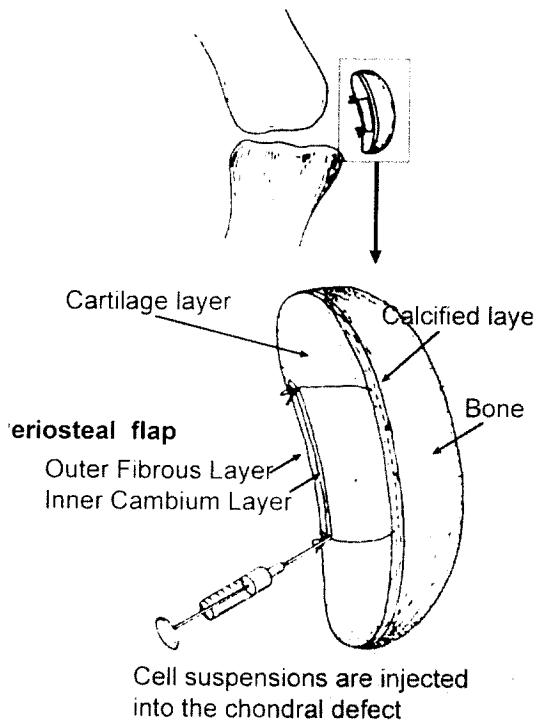


Fig. 1. Standard surgical procedure. A 3×3mm sized chondral defect down to the calcified zone was created in the center of the rabbit patella. A periosteal flap was taken from the medial side of the proximal tibia and grafted onto the chondral defect site with interrupted 8.0 resorbable sutures. Finally, the cell suspension was injected into the chondral defect under the periosteal flap using microsyringe.

3. 결과의 분석

결과의 분석은 먼저 육안적으로 관절면의 함몰 정도, 재생조직과 주변 정상조직과의 관계 및 주위 관절연골의 퇴행성 변화 상태 등을 조사하였으며, 재생된 조직이 섬유성 연골 혹은 초자 연골로 재생되었는지의 여부를 파악하기 위하여 술후 4, 6개월째에 각각 2 슬관절에서 면역조직화학 염색 (immunohistochemical stain) 실시하였다. 조직학적 관찰을 위하여 술후 2개월, 4개월, 6개월에 동물을 안락사 시킨 후 슬개골을 채취하여 10% buffered formalin에 고정시킨 후 탈석회화 과정을 거쳐 paraffin block을 만든 다음 표본을 절단하여 Hematoxylineosin (H-E) stain을 실

시하여 조직학적 소견을 검사하였다. 두가지 검사를 통하여 이식조직이 면역화학 염색상 초자 연골의 특성을 보이며, 육안 및 조직 소견상 관절의 함몰 없이 주위 조직과 높이가 같고 염증반응이 적은 경우에 성공이라고 판정하였다.

1) 면역조직화학 염색 (Immunohistochemical stain)

술후 4개월, 6개월째에 실험동물을 희생시킨 후 슬개골을 채취한 다음 수술조작부위의 연골을 석회화 조직이 포함되지 않도록 조심스럽게 채취 한다. 채취된 조직을 동결절편을 통해 4μm로 조직슬라이드를 제작한 다음 상온에서 하룻밤 동안 건조시킨 후 차가운 acetone용액으로 고정을 실시하였다. 상온에서 30분간 건조시킨 후 제1형 및 2형 교원질에 대한 항체 (affinity purified goat anti-type I or II collagen antibody, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA)로 1시간동안 incubation을 실시하고 PBS로 세척을 실시한 다음 비특이 peroxidase (nonspecific peoxidase)의 blocking을 위해 PBS에 녹인 0.3% 과산화수소수 (H_2O_2)로 30분간 처리를 실시하였다. 다시 PBS로 세척 후 biotinylated anti-goat IgG (Vector Laboratories, USA)로 30분간 incubation을 실시하고 PBS로 세척을 5분간 실시한 다음 peroxidase labelled streptavidin으로 30분간 incubation을 실시하였다. 다시 PBS로 세척을 실시하고 chromogen (AEC, USA)을 투여하고 세척한 다음 Mayer's hematoxylin으로 counterstaining을 실시하고 세척한 후 coverslip을 얹어 관찰하였다.

2) 육안 및 조직학적 검사

술후 2, 4, 6개월째에 실험동물을 희생시켜 슬관절을 노출시키고 육안적 검사를 통해 주위 조직과 연골의 퇴행성반응정도, 연골의 함몰, 불규칙성, 평坦도, 인접 연골과의 색깔 차이, 주변 조직과의 결합 정도를 확인하였으며, 슬개골을 채취하여 탈석회화 (decalcification) 과정을 거친 후 조직 절편을 만들어 H-E 염색후 결과를 판정하였는데, 관절연골의 상태, 관절면의 재생조직이 초자 연골로 재생되었는지 여부, 재생조직 주위의

염증세포 침윤정도 등을 파악하였다.

결 과

1. 면역조직화학 염색

우선 정상 관절연골에 대하여 제 1형 및 2형 교원질에 대한 염색을 실시하여 판정의 기준으로 삼았으며, 그 관찰소견은 제1형 교원질에 양성을 보이는 세포는 관찰할 수 없었고, 제2형 교원질에 양성을 보였으며 세포외 기질은 양성을 보이지 않았다. 술후 4개월째에 대조군의 경우 1형 교원질에 강양성을 보였으며 세포외 기질에서도 양성을 보였고, 제2형 교원질에 대해서는 음성을 보여 섬유성 조직으로 재생되어 있음을 알 수 있었다. 골

막 이식군의 경우 동결절편의 제작 과정중 기술적 오류로 인하여 조직이 손실되어 면역조직화학 염색을 실시할 수 없었다. 자가연골 이식군의 경우 제1형 교원질에 대하여 음성을 보였으며 제2형 교원질에 대해서는 세포와 세포외 기질에서 강양성을 관찰할 수 있어 재생조직이 초자 연골임을 확인할 수 있었으며, 동종이식군의 경우 제1형 교원질에 대하여 양성을 보였으나 염색의 강도가 약하였으며, 제2형 교원질에 대해서는 세포외 기질은 음성을, 세포에 대해서는 양성의 소견을 관찰할 수 있어 섬유성 연골 조직과 초자 연골의 성분이 혼합되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

술후 6개월째에 대조군의 경우 4개월째와 마찬가지로 세포와 세포외 기질에서 제1형 교원질에

Fig. 2. Immunohistochemical stain with type I and II collagen at 4 month after operation. Brown color was considered as positive staining. The control group showed fibrous tissue represented type I collagen, but autograft and allograft groups showed type II collagen.

강양성을 보였으나, 제 2형 교원질에 대해서는 음성을 보여 섬유성 조직임을 알 수 있었으며, 골막 이식군의 경우 세포보다는 세포외 기질에서 제 1형 및 2형 교원질에 양성을 보였다. 자가연골이식 군의 경우 4개월째의 소견과 마찬가지로 제 1형 교원질에는 음성을, 2형 교원질에서는 세포와 세포외 기질에서 양성을 보였으나 정상연골과 비교하면 세포외 기질의 양성이 강하게 관찰되었다. 동종이식군의 경우 4개월째에 관찰되던 세포외 기질의 제 1형 교원질에 대한 양성 반응이 현저히

감소하였으며, 제 2형 교원질에 대해서는 세포와 세포외 기질에서 강양성의 소견을 보여 시간이 경과함에 따라 초자연골의 특성을 보임을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

2. 육안 및 조직학적 관찰 소견

1) 육안 소견

술관절의 활액 및 활액막에는 별다른 특이소견은 관찰할 수 없었다. 대조군의 경우 술후 4개월 째에 슬개대퇴 관절(patellofemoral joint)에 전

Fig. 3. Immunohistochemical stain with type I and II collagen at 6 month after operation. Brown color was considered as positive staining. The control group was positive to type I collagen, the periosteal group was positive in type I and II collagen, but autograft and allograft group showed hyalin cartilage character represented type II collagen.

Fig. 4. Gross morphology. The control group showed extensive degenerative change on patella. In autogenous and allogenic chondrocytes transplantation groups, the repair tissue was very similar to the adjacent articular cartilage(smooth and no depressed articular cartilage), but had slightly whitish color.

반적인 퇴행성 변화를 관찰할 수 있었으며 주위 연골과 확연히 구별되게 함몰되어 있는 모습이 관찰되었고 색깔도 주위 조직과 구별되었으며 이러한 양상은 술후 6개월째에서도 비슷하게 관찰되었다. 골막이식군의 경우 수술부위의 함몰이 관찰되나 대조군보다는 덜하였으며, 색깔의 차이도 관찰되나 대조군보다는 덜하였다. 함몰의 정도는 시간이 경과함에 따라 호전되었으나 술후 6개월째에서도 주위 관절보다는 함몰되어 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 자가연골 이식군의 경우 함몰의 정도는 시간이 경과함에 따라 회복되어 술후 6개월째에는 주위 관절연골과 비슷한 높이를 보였으며, 색깔의 경우 술후 4개월까지는 주위 조직보다 흰색을 띠었으며, 술후 6개월째에는 주위 조직과 비슷한 색깔을 보였으나 주위 조직과 이식부의 경계부에서는 구별되는 색깔을 관찰할 수 있었다. 동종 이식군의 경우도 자가 이식군과 마찬가지로 함몰의 정도는 시간의 경과에 따라 회복되었으며, 색깔도 시간이 경과함에 따라 주위 조직과 비슷한 색깔을 띠었으며, 술후 6개월째에도 주위조직보다 흰색을 띠을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

2) 조직학적 소견

대조군의 경우 술후 4개월째 조직 표본에서 전반적인 퇴행성 변화의 소견과 함께 연골 결손부가 주위 연골과 비교하여 함몰되어 있는 모습이 관찰되었으며, 술후 6개월째에서도 연골결손부의 함몰이 관찰되며, 주위 정상조직으로부터 연골이 재생

되면서 연골세포의 cluster가 형성되는 모습이 관찰되나 그 재생조직은 극히 제한적이었으며 주변부로부터 결손부쪽으로 갈수록 섬유화 조직이 형성되어 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 골막이식군의 경우 술후 4개월째에 관절면이 불규칙하게 형성되며 연골세포의 재생에 의한 cluster 형성이 관찰되고 있으며, 술후 6개월째에는 관절면쪽의 표면은 균등하게 되었으나 연골하골과의 결합이 불완전하였으며 연골의 석회화 층이 골화되어 연골이 얇아진 모습이 관찰되었다(Fig. 5, 6).

자가 연골세포 이식군의 경우 2개월째에는 주변 연골과는 분리된 연골세포의 cluster와 재생된 연골이 섬모양으로 형성되는 모습이 관찰되며 주위의 염증세포의 침착등은 관찰되지 않았다. 술후 4개월째에 재생된 연골은 연골하골과 결합되어 있었으며 연골세포의 cluster가 관찰되며 관절면의 함몰은 관찰되지 않았으나 부분적으로 연골부의 골화에 의해 연골이 얇아지는 소견이 관찰되었으며 주변정상 관절연골과의 경계부의 결합은 아직 이루어지지 않고 있는 모습이 관찰되었다. 술후 6개월째에 자가연골 이식군은 4개월째의 소견보다 더욱 주변 연골과 유사한 보습을 보여주게 되는데 먼저 관절면의 함몰은 관찰되지 않으며 그 연속성과 매끈함이 주위 연골과 유사하였다. 또한 연골세포의 cluster 형성 또한 호전되어 주변 연골과 유사한 관절연골의 종배열(longitudinal array)의 모습을 갖추기 시작하나 정상연골과 비교하여 보다 loose한 모습이 관찰되며, 심층연골부의 골

화에 의해 연골이 얇아진 모습을 관찰할 수 있었다. 동종이식군의 경우 술후 2개월째에 주변 연골에 비해 약간 핵물되어 있으며 불규칙한 관절면의 모습이 관찰되나 술후 4개월째에는 자가 연골 이식군의 2개월째에서 관찰되는 재생된 연골조직의 섬이 관찰되며 그 내부에는 연골세포의 cluster가 관찰되며 주위 연골보다 오히려 돌출되어 있는 모습을 관찰할 수 있으며, 연골하골 및 주위 연골조직과 분리되어 완전히 결합되어 있지 않은 모습을 관찰할 수 있었으나 염증세포의 침윤은 관찰할 수

없었다. 술후 6개월째에는 주위 연골과 비슷한 높이를 유지하고 있으면서 주변 연골보다는 다소 불규칙한 모습이 관찰되나 내부에는 풍부한 연골조직의 형성이 관찰되며, 연골세포의 cluster 형성과 일부에서는 연골세포의 종배열 양상도 관찰할 수 있었다. 역시 염증세포의 침윤은 관찰할 수 없었으며, 자가 연골세포 이식군에서 관찰되는 심층 연골부의 골화에 의해 연골이 얇아지는 현상도 관찰할 수 있었다(Fig. 5, 6).

Fig. 5. Histologic findings at 4 month after operation. Control and periosteal graft groups showed irregular articular surface, but autograft and allograft groups showed relatively smooth articular surface and cluster of chondrocytes.

Fig. 6. Histologic findings at 6 month after operation. In control group, the expanding regenerating tissue from the adjacent articular cartilage was found around the margin of the chondral defect. In autograft and allograft, the longitudinal array of chondrocytes and the thinning of articular cartilage due to the calcification were observed.

고 찰

가토 슬관절의 전층 관절연골 결손에서 자가 혹은 동종 연골세포 이식을 실시한 경우 골막만 이식한 경우나 아무런 처치를 안한 경우보다 관절연골의 재생이 더욱 잘되어 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 결손부를 메우는 재생조직의 기원은 이식된 연골세포, 골막으로부터 세포의 재생, 주변 연골 혹은 tide mark 밑의 연골전구세포등에서의 재생이라고 할 수 있다⁹. 그러나 본 연구의 결과 골막

이식군과 연골 세포 이식군을 비교할 때 월등하게 연골세포 이식군에서 재생조직이 많이 관찰되는 것으로 보아 재생조직은 주로 이식된 연골세포에서 기원한다고 간접적으로 설명이 가능해 진다. 모든 군에서 관찰되는 연골세포의 cluster는 일반적으로 두가지 의미를 가지게 되는데 첫 번째는 골관절염 환자의 연골에서 관찰되는 일반적인 사향이라는 점과 증가된 세포분열의 결과라고 말할 수 있다. 본 연구에서 관찰되는 연골세포의 cluster는 전자보다는 후자에 가까워서 재생조직의 초기 형태라고 말할 수 있는 데 이는 수술 초기에 주사된

세포가 일정하게 퍼지지 못한 상태에서 나름대로의 분열과 세포의 기질의 생산 및 분비 과정중 세포 지주(column)를 형성키 위해 인접세포의 도움을 받는 과정에 의해 형성된 것이라고 추론 할 수 있으며, 이는 술후 6개월째에 동종 및 자가 연골세포 이식군에서 연골세포의 cluster가 감소하면서 종배열의 모습을 보이기 시작한다는 점에서 위의 추론을 뒷받침한다고 할 수 있다.

재생된 조직의 특성 즉 섬유성 연골 혹은 초자연골로의 재생 여부를 알아보기위해서 본 연구에서는 제 1형 및 2형 교원질 항체를 이용하여 재생 조직을 면역조직화학 염색을 통하여 관찰하였는데, 대조군의 경우 술후 4개월째나 6개월째에 제1형 교원질 항체에만 염색되는 섬유성 연골의 특성을 보이나, 골막 이식군의 경우 제1형 교원질과 2형 교원질 모두에서 술후 6개월째에 양성을 보이고 있으나 제 1형 교원질의 경우 주로 세포의 기질에서 관찰되며, 제2형 교원질의 경우 세포의 기질과 세포에서 모두 양성을 보임을 관찰할 수 있었다. 자가이식군과 동종이식군을 비교할 때 자가 이식군의 경우 술후 4개월째부터 벌써 1형 교원질에는 음성의 소견을 보이며, 2형 교원질에는 양성을 보여 초자연골의 특성을 보이나 동종이식군의 경우 술후 4개월째에는 제1형 및 2형 교원질 모두에 양성을 보이나 술후 6개월째에는 제2형 교원질에만 양성을 보임으로써 시간이 경과함에 따라 초자연골의 특성을 보임을 알 수 있었다. 그러나 자가 및 동종이식군 모두에서 정상연골에서는 관찰되지 않는 세포의 기질의 양성 반응현상이 관찰되었다. 정상연골의 경우 제2형 교원질이 용이하게 근접할 수 있으며, 상대적으로 높은 농도를 보이는 세포질에서만 양성을 보이나 재생된 조직들의 경우 정상연골조직과 비교하여 교원질의 triple helix 형성이 미흡하며, 단백다당(proteoglycan)의 치밀화가 덜하여 항체의 근접성이 향상되어 면역조직화학염색상 세포의 기질에서도 양성의 반응을 보이는 것으로 추론할 수 있을 것으로 사료된다¹⁵⁾.

자가연골세포 이식군과 동종연골세포이식군을 조직학적으로 비교할 경우 두군 모두에서 유사한 양상을 보이나 자가이식군에서 보다더 빠르게 재생됨을 관찰할 수 있었다. 그러나 시간이 경과함

에 따라 동종이식군에서도 자가이식군과 동일한 치유의 과정을 보임을 관찰할 수 있어 결국에는 두군 모두에서 동일하게 초자연골로 재생됨을 알 수 있었다. Wakitani 등³⁰⁾이 언급한 동종이식군의 경우 염증세포가 증가한다는 소견은 본 연구에서는 관찰할 수 없었다. 이는 지금까지 알려진 바와 같이 연골세포는 그 자체 면역원성(immunogenecity)이 약하며^{6,22)}, 자가골막 피판에 의해서 이러한 약한 면역원성을 보이는 연골세포가 면역계 세포에 노출되는 기회를 최소화 하였으며, 석회화층까지만 연골 결손을 만듦으로써 또한 순환계로의 노출을 최소화 하였다는 점으로 설명이 가능해진다.

또한 본 연구에서는 비교적 성숙한 토키를 이용하여 실험을 진행하여 자가 및 동종연골세포 이식을 통하여 연골의 재생을 얻을 수 있음을 밝힘으로써 동종연골세포이식을 통한 연골결손의 치료의 가능성을 제시하였는데 이는 자가연골세포의 이식에 따른 공여부의 부족, 고비용, 2번의 수술을 해야하는 점, 세포의 분리 및 배양을 위한 기술이 매우 어렵다는 점 등을 극복할 수 있는 방향을 제시하고 있다고 할 수 있다. 또한 연골세포의 경우 단층(monolayer)으로 실험실내 배양을 실시할 경우 2-3주 경과후 그 표현형을 잃어 섬유모세포의 양상을 띠게 된다고 하여 그 표현형유지를 위해 3차원적인 배양이 요구된다고 하며^{2,20)}, 또한 이식시에도 이러한 3차원 배양을 통해서 표현형을 유지하면서 교원질 젤이나 섬유소아교 등의 생물학적 전달자(biologic carrier)를 이용하고자 하는 노력들이 행해지고 있으나^{11,30)}, 본 연구에서는 단층 배양을 통해 증폭된 세포를 생물학적 전달자없이 이식하여 연골의 재생을 얻을 수 있었다.

이상의 결과로 보아 자가 및 동종연골세포이식을 통하여 관절연골의 결손이 초자연골로 재생됨을 알 수 있었으며, 자가연골세포이식군이 동종연골세포이식군보다 빠르게 재생됨을 알 수 있었다.

결 론

토키 슬개골의 관절연골결손에 대하여 자가 및

동종 연골세포 이식을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 면역조직화학염색을 통하여 자가 및 동종 이식군에서 모두 제2형 교원질에 양성을 보여 재생조직이 초자 연골의 특성을 보임을 알 수 있었다. 동종이식군과 자가이식군을 비교할 때 자가이식군에서 더 빠르게 제 2형 교원질이 표현되었다.
2. 육안 및 조직학적 소견상 대조군 및 골막 이식군 보다는 자가 및 동종이식군에서 조직의 재생이 풍부하게 이루어졌으며, 술후 6개월 째에는 정상 연골에서 관찰되는 종배열의 모습을 보이기 시작하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 관절결손에 대한 자가 및 동종 연골세포 이식은 초자 연골의 형성을 유도하나 자가연골세포이식군에서 보다 빠르게 재생됨을 관찰할 수 있었다.

REFERENCES

- Reconstr Surg, 13:361-9,1979
- 8) **Ewing JW** : Arthroscopic treatment of degenerative meniscal lesions and early degenerative arthritis of the knee. In Ewing JW, ed. Articular cartilage and knee joint function. New York, Raven Press, 1990,137-145
 - 9) **Ficat RP, Ficat C, Gedeon P and Toussaint JB** : Spongialization: a new treatment for diseased patellae. *Clin Orthop*, 144:74-83,1979
 - 10) **Friedman MJ, Berasi DO, Fox JM, Pizzo WD, Snyder SJ and Ferkel RD** : Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. *Clin Orthop*, 182:200-205, 1984
 - 11) **Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D and Klein M** : The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res*, 7:208-18,1989
 - 12) **Gross AE, Beaver RJ and Mohammed MN** : Fresh fragment osteochondral allografts used for post-traumatic defects in the knee joint. In Finerman GAM, ed. Biology and biomechanics of the traumatized synovial joint. Rosemont IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1992, 123-141
 - 13) **Haas SL** : Regeneration of cartilage and bone with a special study of these processes as they occur at the chondrocostal junction. *Surg Gynec Obstet*, 19:604-617,1914
 - 14) **Ham AW** : A histologic study of the early phases of bone repair. *J Bone Joint Surg*, 12:827-844, 1930
 - 15) **Harlow E and Lane D** : Cell staining. In: Harlow Ed., ed. Antibodies. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 363, 1988.
 - 16) **Hofmann M** : Weitere Untersuchungen und Erfahrungen über Periost-transplantation bei Behandlung knocherner Gelenkankylosen. (Further studies and experiences concerning periosteal transplantation in the treatment of bony ankylosis of joints). *Brun's Beitr Klin Chir*, 59:717-732, 1908
 - 17) **Hommenga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PM and Linden AJVD** : Perichondrial grafting for cartilage lesion of the knee. *J Bone Joint Surg*, 72B:1003-1007, 1990
 - 18) **Johnson LL** : Arthroscopic abrasion arthroplasty. Historical and pathological perspective: present status. *Arthroscopy*, 2:54-59, 1986

- 19) **Johnson LL** : Arthroscopic abrasion arthroplasty. In:McGinty J.B., ed. *Operative arthroscopy*. New York: Raven Press, 341-60, 1991
- 20) **Kimura T, Yasui N, Ohsawa S and Ono K** : Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop*, 186:231,1984
- 21) **Kreder HJ, Moran M, Keeley FW and Salter RB** : Biologic resurfacing of a major joint defect with cryopreserved allogenic periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model. *Clin Orthop*, 300:288-296,1994
- 22) **Langer F and Gross AE** : Immunogenicity of allograft articular cartilage. *J Bone Joint Surg*, 56-A:297-304,1974
- 23) **Meyers MH, Akeson W and Convery FR** : Resurfacing the knee with fresh osteochondral allografts. *J Bone Joint Surg*, 71A:704-713, 1989
- 24) **Mitchell N and Shepard N** : The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg*, 58-A:230-3, 1976
- 25) **Muckle DS and Minns RJ** : Biological response to woven carbon fiber pads in the knee: a clinical and experimental study. *J Bone Joint Surg*, 72B: 60-62, 1990
- 26) **Noguchi T, Oka M, Fujino M, Neo M and Yamamuro T** : Repair of osteochondral defects with grafts of cultured chondrocytes: comparison of allografts and isografts. *Clin Orthop*, 302:251-8, 1994
- 27) **O'Driscoll SW and Salter RB** : The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. *Clin Orthop*, 208:131-140,1986
- 28) **Rubak JM** : Reconstruction of articular cartilage defects with free periosteal grafts. An experimental study. *Acta Orthop Scand*, 53:175-180, 1982
- 29) **Sprague NF** : Arthroscopic debridement for degenerative knee joint disease. *Clin Orthop*, 160: 118-123, 1981
- 30) **Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H and Ono K** : Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg*, 71-B:1:74-80,1989
- 31) **Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI and Goldberg VM** : Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg*, 76-A:4:579-92,1994
- 32) **Yasui N, Osawa S, Ochi T, Nakashima H and Ono K** : Primary culture of chondrocytes embedded in collagen gels. *Exp Cell Biol*, 50:92-100, 1982