대한척추외과학회지 제 11 권 제 1 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 11, No. 1, pp 1~13, 2004

가토 요추 유합시 인중합체의 골유합에 대한 효과

나기호 · 하기용#

가톨릭대학교 의과대학 성바오로병원 정형외과, 강남성모병원 정형외과#

Effects of Polyphosphate on the Fusion of Rabbit Lumbar Spine

Ki-Ho Nah, M.D., Kee-Yong Ha, M.D.#

Department of Orthopaedic Surgery, St. Paul's Hospital, Kang-Nam St. Mary's Hospital#
The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

– Abstract –

Study Design: Posterior and posterolateral fusions were performed in rabbit lumbar spines.

Objectives: To investigate the osteoinductive effect of polyphosphates.

Summary and Literature review: Inorganic polyphosphates are known to be rich in osteoblasts and involved in the mineralization process in bone metabolism. However, no study has been undertaken to investigate the osteoinductive effect of polyphosphates.

Materials and Methods: Forty adult New Zealand white rabbits underwent monolevel lumbar fusions, and were divided into two groups according to the fusion beds: twenty each between the laminae (posterior fusion group, PF group) and between the transverse processes (posterolateral fusion group, PLF group). In ten of twenty rabbits in the PF group, 0.8gm of autogenous iliac bone was grafted onto the right sides of the laminae, which were used as a control group (C1), with 0.4gm autogenous bone immersed in polyphosphate solution in the left sides as an experimental group (E1). In the other ten, 0.8gm of autogenous bone was grafted onto the right sides (C2) and 0.8gm of tricalcium phosphate porous blocks containing polyphosphate in the left sides (E2). The other twenty rabbits of the PLF group were similarly divided into C1, E1, C2 and E2 groups by grafting the same amount of materials between the transverse processes. The animals were sacrificed at the 16th postoperative week and the fusions evaluated grossly, radiologically and histologically. Statistical differences between the groups (C1 vs. E1, C2 vs. E2 and E1 vs. E2) in each of the PF and PLF groups were compared by chi-square tests.

Results: The fusions were finally determined by the gross finding using manual palpation. In the PF group, bony fusions were obtained in 90, 80, 90 and 70% of the C1, E1, C2 and E2 groups, respectively. In the PLF group, these were 80, 70, 60 and 0% of the C1, E1, C2 and E2 groups, respectively. Statistical analysis revealed differences only between C2 and E2 ($p=0.005$), and between E1 and E2 ($p=0.002$) of the PLF group. Histologically, β-tricalcium phosphate particles containing polyphosphate were transformed into the osteoid in some areas of the PLF-E2 group, although only fibrous unions were obtained grossly.

Conclusions: It is suggested that the polyphosphate may have an osteoinductive effect, even though the osteoinductive potency

Address reprint requests to
Kee-Yong Ha, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, The Catholic University of Korea, Kang-Nam St. Mary's Hospital,
505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul, 137-701, Korea
Tel: 02-590-1464, Fax: 02-535-9834, E-mail: kyh@cuk.cmc.ac.kr

* 본 논문의 요지는 2003년도 제 20차 대한척추외과학회 추계학술대회에서 발표되었음.
* 본 논문은 보건복지부 의료공학 융합기술개발사업(02-PJ3-PG4-PT03B-0003)의 지원을 받아 이루어졌슴.

was very week in this fusion model of the rabbit lumbar spine. Therefore, further explorations, such as the threshold and optimal concentrations of polyphosphate in vivo and the best carrier material of polyphosphate, should be performed to obtain the optimal conditions for fusion.

Key Words: Lumbar fusion, Osteoinduction, Osteoconduction, Polyphosphate, β-tricalcium phosphate

서 론

골유합술에 사용된 이식물은 숙주골과 성공적인 유합을 이루기 위하여 골형성(osteogenesis), 골유도(osteoinduction)와 골전도(osteoconduction) 기능이 있어야 한다. 자가골 이식술은 상기한 세가지 요소들을 모두 갖춘 이상적인 방법으로, 지금까지 알려진 골이식술중 유합율이 가장 높으나 광범위한 유합술을 요하는 경우 많은 양의 이식골을 채취하기가 어렵고, 골 채취를 위한 추가적인 시술이 필요하여 장골로부터 골 채취시 25 30%의 환자에서 통증, 감염, 출혈과 미용상의 문제등 공여부의 합병증이 발생한다[32,34]. 동종골(allograft)과 이종골(xenograft)은 살아있는 세포가 적으며 골유도 기능도 미미하여 주로 골전도에 의하여 골을 형성하게 되며, 면역반응과 감염성 질환을 전파할 우려가 있다. 따라서 자가이식골 공여부의 합병증을 피하고 수술부의 골유합율을 높이기 위한 방안으로 이식골 대체물(bone graft substitutes)에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔다.

골형성은 이식물내에 존재하는 골모세포나 골형성의 잠재력을 갖는 세포들이 직접적으로 골을 형성하는 것으로 골형성능은 자가골이나 자가골수에만 존재한다. 따라서 이식골 대체물은 골전도 물질과 골유도 물질로 구분할 수 있다.

골전도는 골형성이 이루질 삼차원적인 공간인 물리적 구조체 혹은 골격(scaffold)을 제공하는 것으로서 이상적인 골전도 물질의 조건으로 생체적합성(biocompatibility), 다공성 구조(porosity), 재흡수성(resorbability)과 역학적 안정성(mechanical strength)을 요한다. 지금까지 알려진 골전도 물질로서는 탈무기질화 골기질(demineralized bone matrix), polylactic acid (PLA), polyglycolic acid(PGA), 교원질(collagen)등이 있으며[10,19,28,33] 최근에는 생합성 세라믹인 인산칼슘과 황산 칼슘[12,15]에 대한 관심이 높아지고 있다.

인산칼슘(calcium phosphates)은 인체의 골성분과 가장 유사한 화학적 조성을 가지고 있으므로 고도의 생체 적합성을 보이며, 인공적인 처리 과정에 따라 다양한 다공성 구조로 제작이 가능하며, 100 μm이상의 대기공(macro -pore)은 골이 자라 들어가는(bone ingrowth) 장소를 제공하고, 5 μm이내의 소기공(micropore)은 대식세포의 공격 대상으로 재흡수(resorption)에 관여한다고 알려져 있다[6,18]. 인산칼슘은 칼슘과 인의 비율(Ca/P ratio)에 따라 여러 종류의 인산칼슘이 존재하며, βwhitlockite구조를 가지고 Ca/P ratio가 1.67인 인산화 삼칼슘(tricalcium phosphate)과 apitite구조를 가지고 Ca/P ratio가 1.50인 수산화 인회석(hydroxyapatite)이 주로 사용되는데 수산화 인회석보다 인산화 삼칼슘이 흡수가 더 잘 일어나며[9,22], 이 두 구조물에 대하여 동물 실험 보고와[21,27] 임상 보고가 있다[29,31]. 그러나 순수한 골전도성만으로는 요추후외방 유합이 어렵고[3] 이들 골대체 물질들은 물리적 강도나 신생골 형성율에 있어서 자가골에 훨씬 미치지 못한다고 한다[13,17]. 따라서 골전도 물질은 골유도 물질과의 병용시에만 골유합을 기대할 수 있다.

골유도는 골형성의 잠재력을 갖는 세포들(osteoprogenitor cells)을 골모세포로 분화시키는 과정으로, 지금까지 골형성 단백질만이 골유도능이 있어서 이소성 골형성을 한다고 알려져 있다[1]. Urist[33]가 골형성 단백질(bone morphogenic protein, BMP)을 발견한 후 지금까지 20 여종 이상의 골형성 단백질이 발견되었으며, 동물실험과 임상에서 골유도성 물질로서 상당한 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[2,4,5,10,23]. 그러나 골형성 단백질은 유전자 재조합으로 만드므로 고가이며, 대장균에서 추출하므로 면역학적 반응과 질병전파에 대한 우려가 있고, 용량의존성이 있어 저농도에서는 연골내 골화 과정을, 고농도에서는 막내 골화 과정을 유도하는데, 골유합을 위한 골형성 단백질의 역치 농도나 최적농도에 대한 연구가 진행되고 있다[5,16].

무기질 인중합체(inorganic polyphosphates)는 지구상에 생물이 존재하기 이전에서부터 존재하여 왔던 물질로 추측되며(antiquity), 생물과 무생물의 도처에 존재하며(ubiquity), 수십에서 수백개의 인기(orthophosphate residue : Pi)가 phosphoanhydride bond로 연결된 중합체이며 인기의 수에 따라 기능이 다양하다. 아직까지 인중합체가 골유도 물질로서 작용한다는 보고는 없으나 인중합체가 골모세포에 고농도로 함유되어 있으며 골의 대사과정에서 무기질 침착에 관여한다고 알려져 있으므로[24,25,26,30] 골형성에 관여할 것으로 생각된다.

본 연구는 인중합체의 골유합에 대한 효과를 알아보기 위한 동물실험 연구로서, 토끼 요추 후궁간과 요추 횡돌기간에 적은 양의 자가골 혹은 베타-인산화 삼칼슘에 인중합체(PLF)를 함께 이식하여 육안적, 방사선학적 및 조직학적으로 관찰하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상 및 재료

실험 동물로는 체중 3 3.5 kg의 성숙한 수토끼(Newzealand white rabbit) 40마리중 20마리는 요추 후방 유합술을 시행하였고(후방 유합군), 다른 20마리는 요추 후외방 유합술을 시행하였다(후외방 유합군). 모든 토끼의 극돌기간을 8자형으로 강선고정(wiring)하고, polymethyl methacrylate(PMMA) 시멘트를 이용하여 고정하여 좌우 후궁간을 분리시켰다. 후방 유합군에서는 후궁간에, 후외방 유합군에서는 횡돌기간에 이식술을 시행하였다.

후방 유합군 20마리중 10마리에서 우측에 자가장골 0.8 gm을 이식하였고(제 1후방 대조군), 좌측에 절반의 자가장골 0.4 gm에 0.01% 인중합체 용액을 첨가하여 이식하였고(제 1후방 실험군), 다른 10마리의 우측에 자가장골 0.8 gm을 이식하였고(제 2후방 대조군), 좌측에 0.01% 인중합체 용액을 첨가하여 만들어진 베타-인산화 삼칼슘의 다공체(βtricalcium phosphate porous blocks, $Ca_3(PO_4)_2$) 0.8 gm을 이식하였다(제 2후방 실험군). 후외방 유합군 20마리에서도 골이식부위만 달리하여 동일한 방법으로 우측이 제 1 및 제 2후외방 대조군(각각 n=10), 좌측이 제 1 및 제 2후외방 실험군(각각 n=10)이 되었다(Fig. 1). 본 실험에서 사용한 베타-인산화 삼칼슘의 다공체는 대기공(macropore)의 크기를 일반적으로 골이 자라 들어가기에 적합한 크기로 알려진 100 400 μm 범위내에서 200 250 μm 사이로 만들었다. 전체 기공율이 40%이고 대기공의 용적비가 30%로서, 토끼의 경골 간부 골수내에서 3개월에 75%, 6개월에 100%가 흡수되는 다공체로 제조하였다[6]. 대기공은 인산칼슘 분말을 과산화수소 처리를 하여 만들었으며, 소기공(micropore)은 대기공을 만든 후 고온에서 소결처리를 하여 만들었다.

2. 실험 방법

1) 수술방법

가토를 에테르(ether)로 정온(sedation)시킨 후, 가토의 대퇴부에 ketamin(50 mg/ml, 1ⓐ=10 ml)과 lumpen(23.32 mg/ml, 1ⓐ=10 ml)을 1:3의 용적비로 혼합하여 kg당 3 4 ml로 근육 주사하여 마취시켰다. 수술부위인 요추부의 털을 제거하고, 자체 제작한 수술대에 복와위로 목과 다리를 고정한 후, 수술부를 betadine과 alcohol로 소독하고 멸균포로 덮었다. 약 7 8 cm의 피부 중앙 종절개를 하고 요부 후방근막(lumbodorsal fascia)을 절개한 후 양측방으로 피부와 근막을 함께 self-retaining retractor로 벌린 후 극돌기, 후궁 및 횡돌기를 따라 양측 후방근육을 골막하 박리하였다. 거즈로 수술부를 눌러 지혈시키는 동안 동 피부절개를 통하여 장골의 후상장골극을 노출시켜 우측 혹은 필요시 양측 장골에서 적당량의 피질

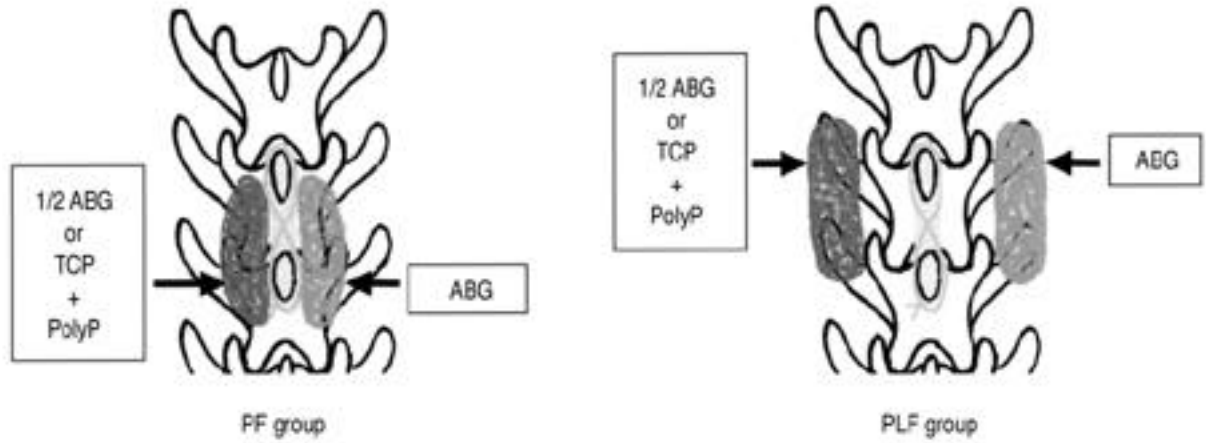

Fig. 1. Operation methods (ABG: autogenous bone graft, TCP: βtricalcium phosphate, PolyP: polyphosphate, PF: posterior fusion, PLF: posterolateral fusion)

해면골편을 채취하여 정해진 양으로 정량하였다. 유합분절의 고정을 위하여 유합분절의 연부조직을 박리하고 상하 극돌기간을 8자형으로 강선고정후, PMMA 시멘트를 도포하여 극돌기간 후방고정을 하는데 이때 인중합체 용액이 반대쪽으로 흐르지 않도록 PMMA 시멘트를 벽의 형태로 만들었다. 시멘트가 다 굳으면 피질골 제거술(decortication)을 시행하였다. 후방 유합군에서는 작은 골겸자(rongeur)를 사용하여 상하 유두 돌기를 포함한 후궁부위의 골수를 노출시켰다. 피질골 제거술이 끝나면 제 1후방 대조군(n=10)에서는 절반의 자가장골 0.4 gm에 0.01% 인중합체용액을 첨가하여 상온에서 약 5분간 기다려 끈적끈적해질때 후궁간에 이식하였고, 제 2후방 대조군(n=10)에서는 미리 0.01% 인중합체용액을 첨가하여 만들어진 베타-인산화 삼칼슘 다공체를 정량하여 후궁간에 이식하였다. 후외방 유합군에서는 횡돌기가 깊숙히 위치하고 너비가 2 mm정도이고 두께가 1 mm정도로서 쉽게 부러지므로 충분한 피질골 제거술이 불가능하였고, 15번 blade를 사용하여 연부조직을 박리하고 피질골막에 흠집을 내는 정도로 피질골 제거술을 시행하였다. 후외방 유합시에는 후궁간 대신 횡돌기간에 동일한 방법으로 이식하였다. 요부 후방근막을 2번 흡수성 봉합사로 봉합하고 피부를 3번 nylon으로 봉합하였다. 감염 예방을 위하여 수술직전과 수술후 5일간 항생제(gentamycin 40 ㎎/day)를 근육 주사하였다. 모든 실험 동물은 외고정 없이 사육장내 사육용 cage에서 전문 사육사에 의하여 사육되었다. 요추의 표본을 만들기 위하여 술후 16주에 가토의 심장에 ketamin 2 ml를 주사하여 도살한 후, 수술분절의 상하 분절을 포함하여 수술부위를 채취한 후 주변의 연부조직을 조심스럽게 최대한 박리한 후 10% 중성 포르말린에 고정시켰다.

2) 관찰 및 계측방법

(1)방사선 관찰

요추 유합술을 시행한 부위의 이식물의 흡수 및 가골의 형성과 골유합 상태를 관찰하기 위해 수술 직후 및 술후 4주, 8주, 12주, 16주에 토끼 요추의 전후방 방사선 사진을 촬영하였다. 술후 16주에 토끼를 도살하여 채취한 요추 표본에 대하여 방사선을 촬영하였다. 요추 표본 중 육안상 골유합이 이루어진 표본을 후방 유합군과 후외방 유합군에서 각각 2개씩 추출하여 골유합부를 시상면상으로 CT촬영을 하였다.

(2) 육안 및 조직학적 관찰

채취한 요추 표본에서 유합 분절의 상하 추체간은 극돌기간에 PMMA 시멘트가 붙어 견고하게 굳어 있었으므로 운동성이 전혀 없었으나 후방의 추체간의 움직임과 상관없이 횡돌기간은 독립적인 움직임이 가능하였다. 후방 유합군에서는 육안상 시진(inspection)과 촉진(manual palpation)으로 유합부인 후궁간의 연결 상태를 확인하였고, 후외방 유합군에서는 시진과 촉진시의 횡돌기간의 운동성을 확인하여 불유합 여부를 확인하였다.

요추 표본을 약 1주일간의 탈석회화 과정을 거쳐 조직을 상하 이식부를 포함하여 시상면상에서 약 2 mm간격으로 자른 후 파라핀 포맷을 하여 2 ㎛의 두께로 조직절편을 내어 슬라이드 고정후 hematoxylin-eosin염색을 시행하였다. 광학현미경하에 이식부의 가골의 형성과 가골의 연속성을 관찰하였고, Masson's trichrome염색을

Table 1. The surgical results. Plus (+) means fusion and minus (-) means non-fusion. (ABG: autogenous bone graft, TCP: βtricalcium phosphate, PolyP: polyphosphate, C: control group, E: experimental group)

	Posterior fusion group				Posterolateral fusion group			
	ABG	1/2 ABG +polyP	ABG	TCP +polyP	ABG	1/2 ABG +polyP	ABG	TCP +polyP
	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
1	+	+	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	-	+	-	-	-
8	+	-	+	-	+	+	-	-
9	+	-	+	-	-	-	-	-
10	-	+	-	+	-	-	-	-

시행하여 교원질의 증가 및 침착 양상을 관찰하였다.

3. 통계

후방 유합군과 후외방 유합군은 수술조건중 이식부위가 다르므로 비교의 대상이 되지 않았다. 후방 유합군과 후외방 유합군 각각의 군내에서 제 1대조군과 제 2대조군은 반대쪽 실험군이 다르므로 다른 조건이므로 유합율을 합산하지 아니하였고, 후방 유합군과 후외방 유합군 각각의 군내에서 제 1대조군과 제 1실험군간, 2대조군과 제 2실험군간 그리고 제 1실험군과 제 2실험군간을 비교하였다. 모든 비교시 개체별 비교를 위하여 chi-square 검사법으로 검정하였다(Table 1). SPSS 10.0 프로그램을 사용하였으며 유의 수준은 5%로 선정하였다.

결 과

1. 육안적 관찰

술후 16주에 도살하여 채취한 표본의 육안적 관찰상 후방 유합군에서는 자가골을 이식한 후방 대조군 20례중 18례(90%)에서 골성 유합으로 후궁간이 연결되어 있었고(제 1후방 대조군의 90%와 제 2후방 대조군의 90%) 나머지 2례는 중앙부에서 골질이 끊겨져 있었다. 제 1후방 실험군 10례중 8례(80%)와. 제 2후방 실험군 10례중 7례(70%)에서 골성 유합으로 판정하였다.

후외방 유합군에서는 후방 대조군 20례중 14례(70%)에서는 골성 유합으로 전혀 움직임이 없이 횡돌기간이 연결되어 있었고(제 1후방 대조군의 80%와 제 2후방 대조군의 60%) 나머지 6례는 중앙부에서 골질이 끊겨져 있거나 가동성이 확인되었다. 제 1후외방 실험군 10례중 7례(70%)만 운동성이 없어서 골유합으로 판정하였다. 제 2후외방 실험군 10례 모두에서 횡돌기간이 연결되어 있었으나 유합부위(fusion mass)는 골조직이 아닌 섬유조직으로 판단되었고 내부에 인산화 삼칼슘 다공체가 산재하여 그대로 드러나 보였으며, 전례에서 횡돌기간의 운동성이 관찰되었으므로 전례를 불유합으로 판정하였다(Fig. 2, 3).

2. 방사선학적 관찰

후방 유합군중 육안상 유합으로 판정한 2개의 요추표본에서 시행한 전산화 단층촬영에서 세 군 모두에서 후궁위에서 유합물의 골음영이 연결됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4-A). 후외방 유합군중 육안상 유합으로 판정한 2개의 요추표본에서 시행한 전산화 단층촬영에서 세 군 모두에서 유합물이 횡돌기간을 골음영으로 연결하고 있었다(Fig. 4-B D).

후전방 단순 방사선 촬영상 후방 유합군에서는 이식물과 추체가 겹쳐지므로 유합여부를 확인할 수 없었다(Fig. 5-A, B). 후외방 유합군에서는 자가골을 이식한 대조군에서는 술후 4주 별다른 변화없이 이식골이 잘 유지되었으나, 술후 8주 사진상 술후 4주에 비하여 이식골의 음영이 특히 외측 경계부에서 감소하는 양상을 보였고 이러한 음영의 감소가 서서히 진행하였다. 술후 16주

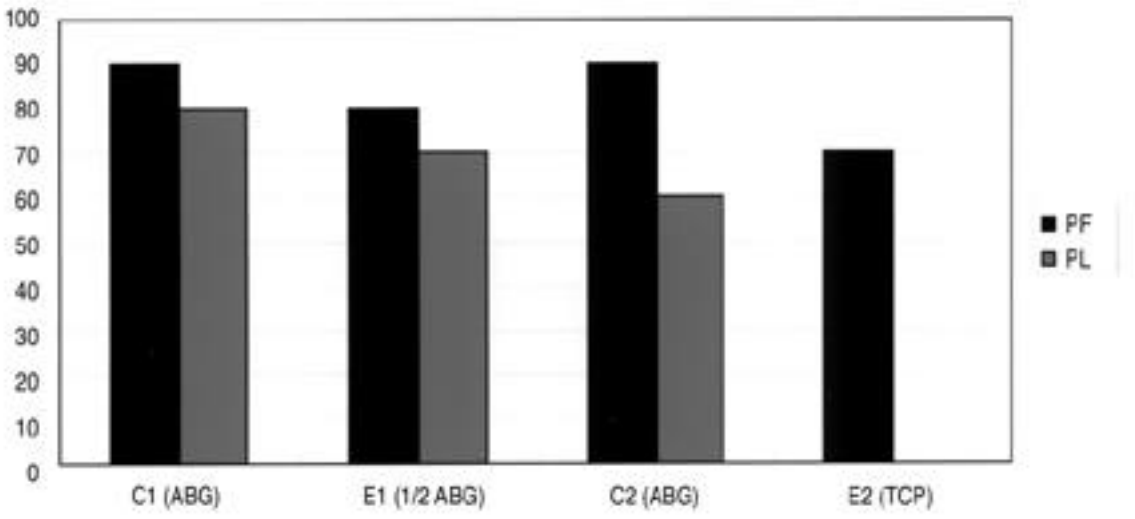

Fig. 2. Fusion rates(%) by inspection and manual palpation. Black bars indicate posterior fusion group and gray bars indicate posterolateral fusion group. (C: control group, E: experimental group, ABG: autogenous bone graft, TCP: βtricalcium phosphate, PF: posterior fusion, PLF: posterolateral fusion)

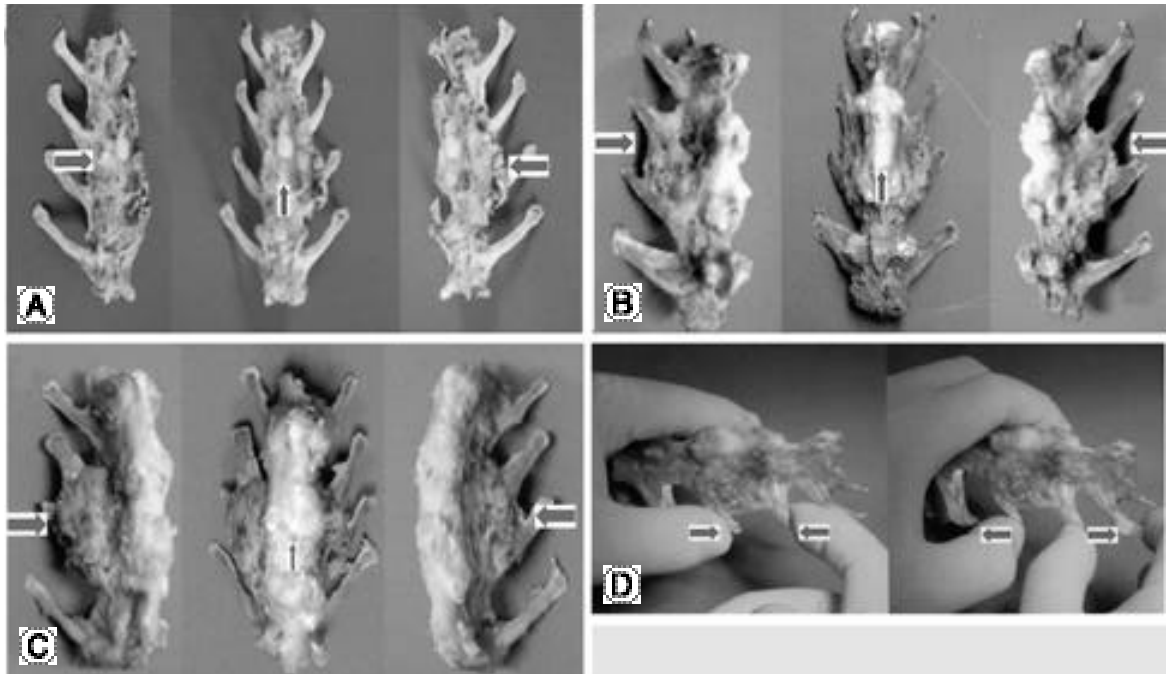

Fig. 3. PA views of gross lumbar fusion specimens obtained at postoperative 16weeks. Leftward arrows in right sides indicate fusion masses of control groups and rightward arrow in left side that of experimental group. Small upward arrows indicate PMMA cements bridging the spinous processes. (**A**) Posterior fusion group: the fusion masses of control group and experimental group 2 show bony union bridging the upper and lower laminae. (**B**) Posterolateral fusion group: the fusion masses of control group and experimental group 1 show bony union bridging the transverse processes. (**C, D**) Posterolateral fusion group: the fusion mass of experimental group 2 shows fibrous union, which was confirmed by manual compression and distraction stress test(D).

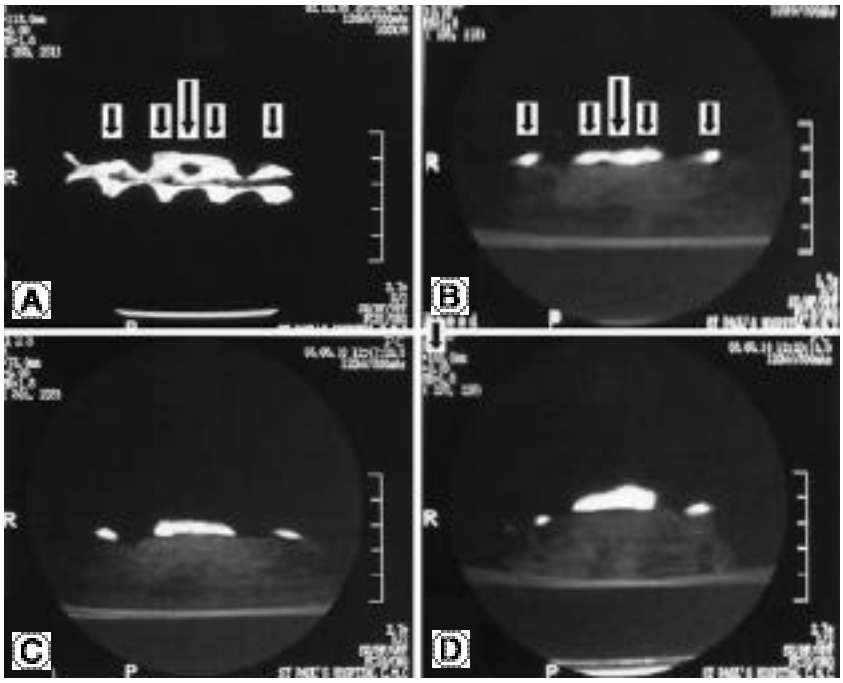

Fig. 4. Computerized tomograms at postoperative 16weeks, sagitally cutting the gross fusion specimens including fusion masses, which all show continuous fusion mass(large arrow) bridging the laminae or transverse processes(small arrows). (**A**) Experimental group 2 in the posterior fusion group. (**B-D**) Control group(**B**), experimental group 1(**C**) and 2(**D**) in the posterolateral fusion group

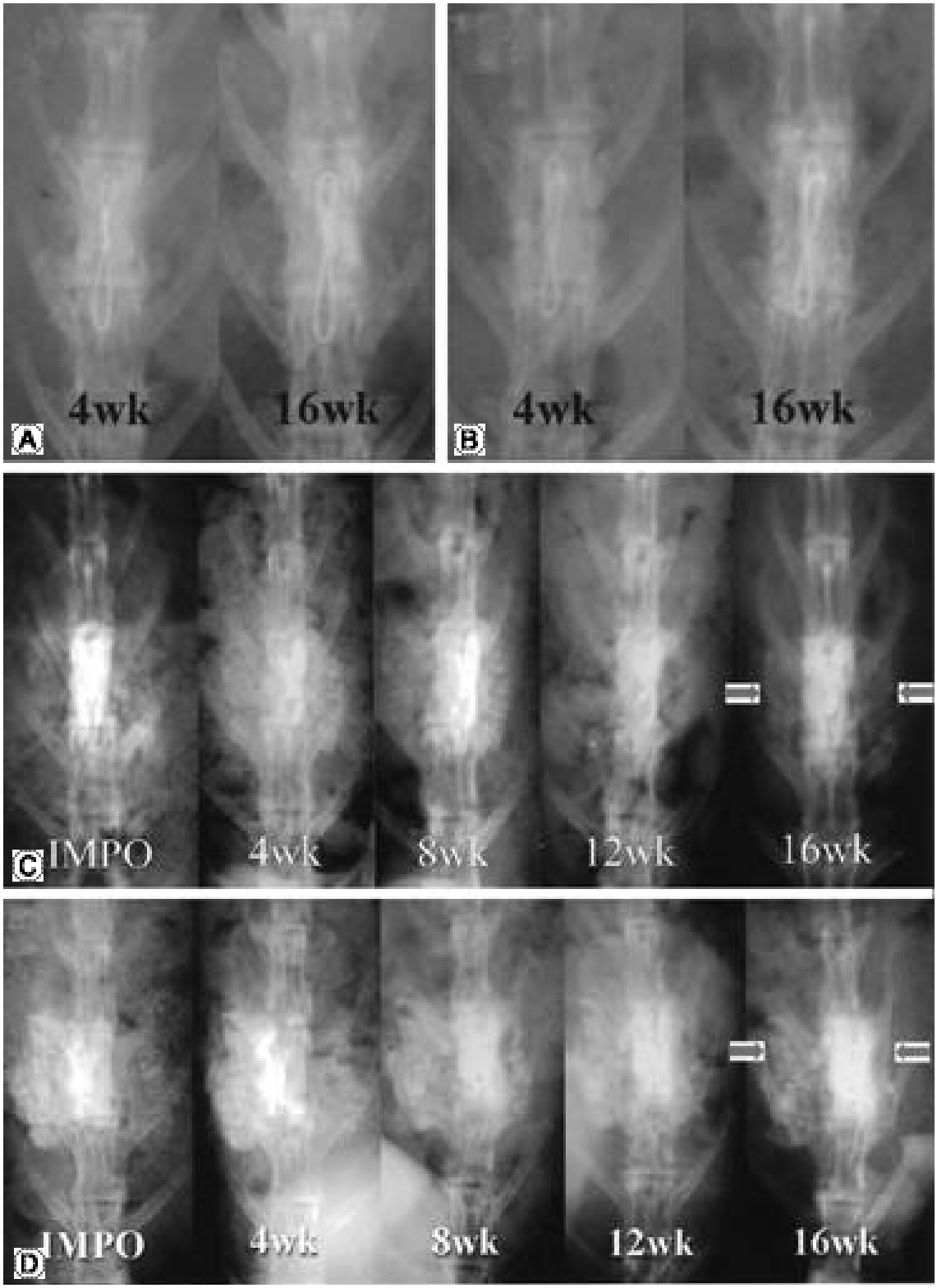

Fig. 5. Plain PA radiographic findings. (**A, B**) The fusion masses on the laminae of posterior fusion group were overlapped with the vertebral bodies, so it is impossible to determine whether fused or not. (**C, D**) The fusion masses between the transverse processes of posterolateral fusion group control group (right sides of C and D), experimental group 1 (left side of C) and experimental group 2 (left side of D) were all considered to be fused.

사진상 20례중 17례(85%)에서 횡돌기간 골질의 연속성이 관찰되어 골유합으로 판정하였고, 3례에서는 이식골이 끊겨져 보였다. 제 1실험군도 비슷한 양상으로 10례 중 8례(80%)에서 횡돌기간 골질의 연속성이 관찰되어 골유합으로 판정하였다(Fig. 5-C). 제 2실험군의 인산화 삼칼슘은 모든 례에서 술후 8주 사진상 술후 4주에 비하여 음영이 전체적으로 감소하는 양상을 보였으나 이후로 술후 16주까지 음영의 감소없이 잘 유지되었다(Fig. 5-D). 그러나 인산화 삼칼슘이 방사선 비투과성이므로 방사선학적으로 골유합을 판정하기는 어려웠다.

3. 조직학적 관찰

후방 유합군에서, 육안적 관찰상 유합으로 판정한 세군 모두에서 H-E염색상 직골(woven bone)이 형성되어 있었고 그 내부에 많은 세포를 관찰할 수 있었으며 직골이 후궁위에서 연결되어 골성유합을 보였다(Fig. 6).

후외방 유합군중 육안적 관찰상 유합으로 판정한 대조군에서는 H-E염색상 직골이 형성되어 있었고 그 내부에 많은 세포를 관찰할 수 있었으며 직골이 횡돌기사이를 완벽하게 연결하고 있어서 완전한 골성유합을 보였다. Masson 's trichrome염색상에서도 횡돌기 사이가 대부분 직골로 채워져 있었으며 부분적으로 직골사이에 산재한 초록색의 교원질 섬유를 관찰할 수 있었다(Fig. 7-A). 제 1후외방 실험군에서는 H-E염색상 직골의 형성이 대조군보다 부족하였으나 횡돌기간을 연결하고 있었으며, Masson 's trichrome염색상에서는 횡돌기 사이의 많은 부분에서 직골의 형성을 관찰할 수 있으며 직골 주변으로 초록색의 교원질 섬유를 관찰할 수 있었다(Fig. 7-B). 육안적 관찰상 불유합으로 판정한 후외방 대조군과 제 1후외방 실험군에서는 횡돌기간이 대부분 직골로 구성되었으나 섬유조직으로 끊겨져 보였다. 제 2후외방 실험군에서는 10례 모두에서 인산화 삼칼슘 다공체가 무수히 산재하여 있었고 횡돌기간의 직골의 연결성은 없었다. 그러나 인산화 삼칼슘 다공체 입자의 내부로 교원질이 자라 들어가고 점차로 직골로 변화해 가는 과정이 발견되었다. 이러한 과정은 횡돌기 사이의 중앙부(central zone, Fig. 7-D)에서보다 횡돌기 근처(transverse process zone, Fig. 7-C)에서 더 활발하게 진행되었다.

유합의 판정기준은 육안적, 방사선학적 및 조직학적 조건을 모두 만족시키는 경우로 하였는데 결국 육안적 관찰이 최종적인 판단의 기준이 되었다.

후방 유합군에서는 제 1후방 대조군, 제 1후방 실험군, 제 2후방 대조군과 제 2후방 실험군의 90%, 80%, 90%와 70%에서 각각 유합으로 판정하였다. 불유합으로 판정한 경우는 횡돌기 사이의 중앙부의 이식물이 흡수되어 PMMA 시멘트가 노출되어 보였다.

후외방 유합군에서는 횡돌기간 유합부의 움직임 여부

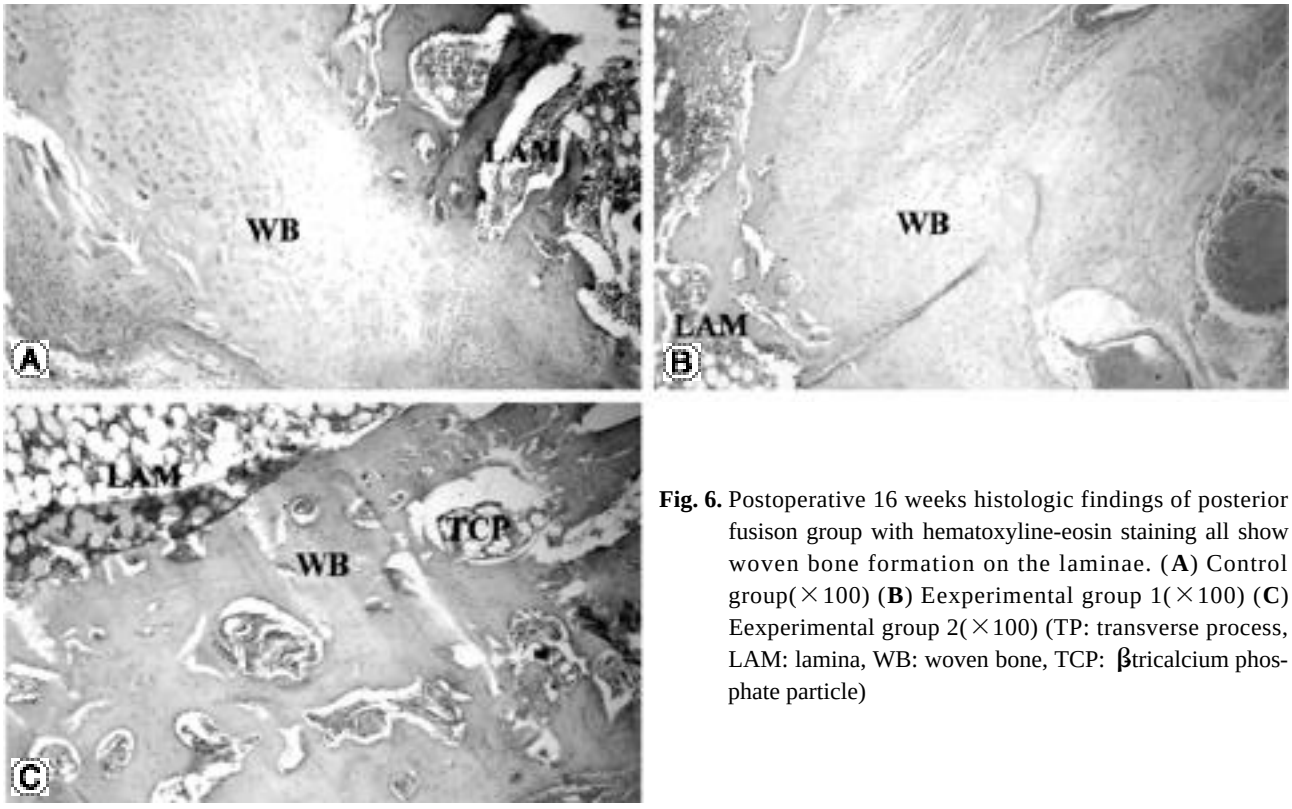

Fig. 6. Postoperative 16 weeks histologic findings of posterior fusison group with hematoxyline-eosin staining all show woven bone formation on the laminae. (**A**) Control group(×100) (**B**) Eexperimental group 1(×100) (**C**) Eexperimental group 2(×100) (TP: transverse process, LAM: lamina, WB: woven bone, TCP: βtricalcium phosphate particle)

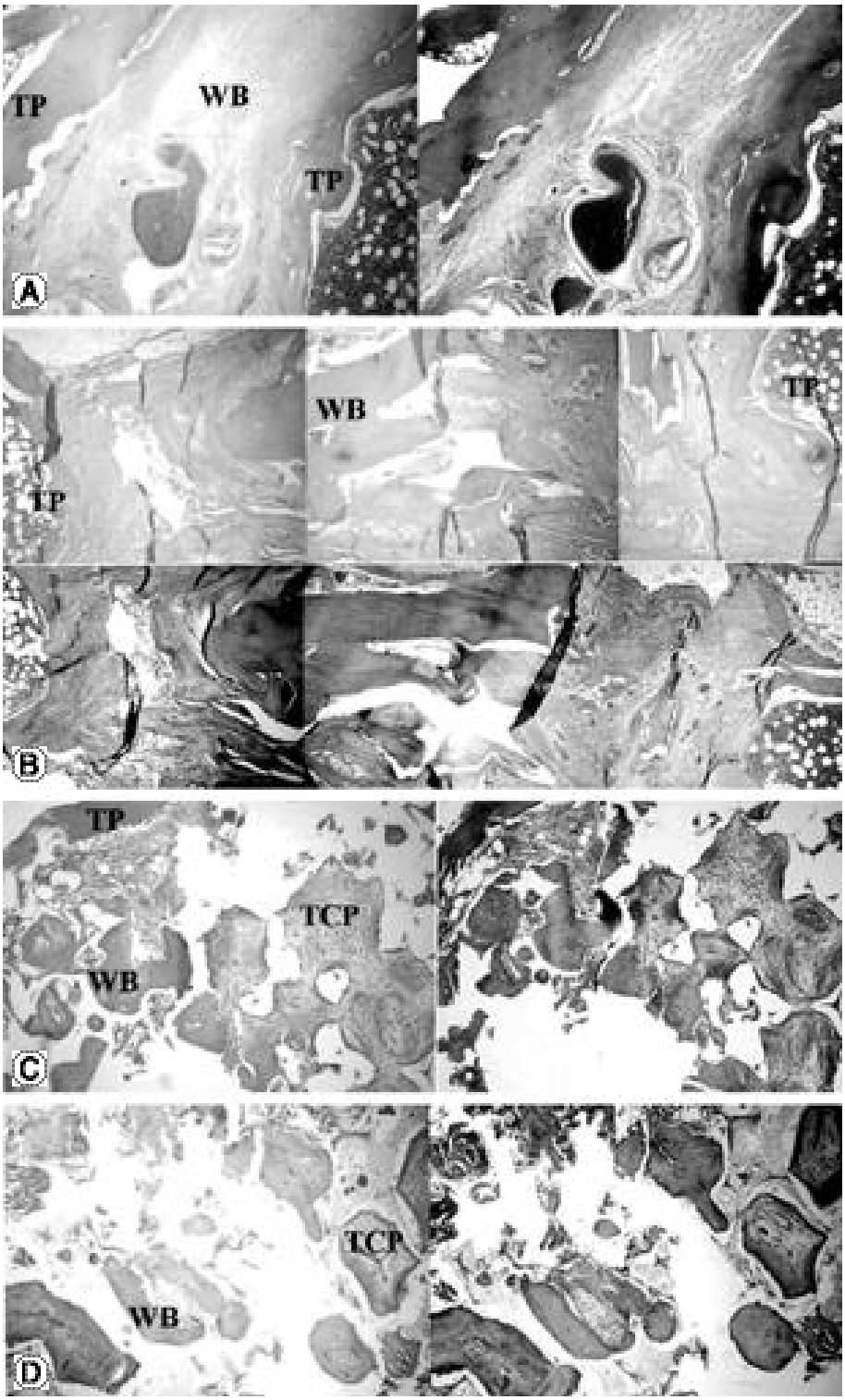

Fig. 7. Postoperative 16 weeks histologic findings of fusion masses in posterolateral fusion group with hematoxyline-eosin staining (left side or upside) and Masson's trichrome staining(right side or downside). (**A**) Control group: woven bone formation completely bridging the transverse processes (×40). (**B**) Experimental group 1: woven bone formation bridging the transverse processes with interpersed collagen fibers (×100). (**C**) Experimental group 2 (transverse process zone): transformation of tricalcium phosphate particles into woven bones (×100). (**D**) Experimental group 2 (central zone): transformation of tricalcium phosphate particles into woven bones, less frequently than in the transverse process zone(×100). (TP: transverse process, LAM: lamina, WB: woven bone, TCP: βtricalcium phosphate particle)

가 판단의 기준이 되었다. 제 1후외방 대조군, 제 1후외방 실험군, 제 2후외방 대조군과 제 2후외방 실험군의 80%, 70%, 60%와 0%에서 각각 유합으로 판정하였다. 제 2후외방 실험군에서는 육안상 전례에서 섬유성 유합이 관찰되었으며 전례에서 불유합으로 판정하였으나, 조직 소견상 횡돌기간을 직골이 연결시키지는 못하였으나 베타-인산화삼칼슘 다공체내가 직골로 전환되는 과정이 관찰되었다.

4. 통계학적 검정

후방 유합군의 유합결과에 대하여 제 1후방 대조군과 제 1후방 실험군사이(p=0.500), 제 2후방 대조군과 제 2후방 실험군사이(p=0.291) 그리고 제 1후방 실험군과 제 2후방 실험군사이(p=0.500)에 통계학적으로 유의성이 없었다. 후외방 유합군에서는 제 1후외방 대조군과 제 1후외방 실험군사이에는 통계학적으로 유의성이 없었다(p=0.500). 그러나 제 2후외방 대조군과 제 2후외방 실험군사이(p=0.005)와 제 1후외방 실험군과 제 2후외방 실험군사이(p=0.002)에는통계학적으로유의하였다(Table 1).

고 찰

인산칼슘은 흰색의 분말로서 물과 잘 혼합되며 물이 증발되면서 어느 정도 굳어지게 되어 골결손부의 모양에 잘 맞게 변형된 상태로 유지되나, 본 실험에서는 베타-인산화 삼칼슘을 골전도 능력을 높이기 위하여 다공체로 제조하여 사용하였다. 베타-인산화 삼칼슘 다공체는 역학적 강도가 약한 것을 제외하면 일반적인 골전도체로서의 조건인 생체적합성, 다공성 구조와 재흡수성을 모두 만족시킨다. 재흡수에 있어서 황산칼슘(calcium sulfate)은 너무 빨리 흡수되고[15] 수산화 인회석(hydroxapatite)은 거의 재흡수가 안되므로[22] 인산화 삼칼슘(tricalcium phosphate)을 사용하였다.

대부분의 골전도 물질은 그 차체만으로는 횡돌기간에서 골유합을 기대하기 어렵다. Minamide 등[28]은 본 실험과 동일한 토끼의 요추 횡돌기간의 실험에서 교원질 단독과 골세라믹(우골을 고온조작하여 만든 골조직으로서 성분은 인산칼슘) 단독을 각각 이식하여 6주 경과한 조직 소견상 각각 섬유조직만 관찰되었을 뿐 전혀 골형성을 관찰할 수 없었다고 하였다. Ha 등[14]은 동일한 조건의 토끼 실험에서 황산칼슘만 이식하여 16주 경과한 조직 소견상 골성분을 관찰할 수 없었다고 하였다. 따라서 본 실험에서 인산 칼슘은 골유도 능력이 없으므로, 인산칼슘 단독의 이식은 골형성을 이루지 못할 것으로 생각되어 시행하지 않았다.

Eggli 등[9]은 수산화 인회석과 인산화 삼칼슘을 50 100 μm와 200 400 μm크기의 기공을 가지는 네가지 조합의 다공체로 제조하여 각각을 골수내에 이식시, 첫 1개월내에 작은 기공을 가지는 인산화 삼칼슘에서 골이 자라 들어가고 이식물이 재흡수되는 속도가 가장 빠르다고 하였고, 4개월후 작은 기공을 가지는 수산화 인회석의 대부분이 새로운 골로 대치되었고, 큰 기공을 가지는 수산화 인회석에는 새로운 골의 양이 적었다고 하였다. 또한 이식전 이식물의 전자 현미경 소견상 약 20 μm 크기의 기공간 연결(pore interconnection)이 작은 기공을 가지는 이식물에서는 무수히 많았으나 큰 기공을 가지는 이식물에서는 드물었다고 하면서, 이러한 기공간 연결이 이식물로의 신생 혈관의 침투와 신생골의 형성에 중요한 역할을 한다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 200 250 μm의 큰 기공을 가지는 인산화 삼칼슘을 사용하였고 이것이 골유합을 이루지 못한 한 요인이었을 가능성이 있다. 따라서 본 실험에서 사용한 인산화 삼칼슘이 다공 구조가 최선의 구조가 아닐 수도 있다.

본 실험에서는 요추 후방 후궁간의 실험을 먼저 시행하여 좋은 결과를 얻었고, 이를 바탕으로 요추 후외방 횡돌기간의 실험을 시행하였다. Delecrin 등[7,8]은 골성유합에 영향을 미치는 인자로서 골대체물 자체의 물리적, 화학적 성상 뿐만 아니라 국소적 인자가 작용한다고 하면서 이식부를 후궁 부위(laminar site)와 횡돌기간 부위(intertransverse site)로 나누어 비교하였는데, 후궁 부위는 피질골을 벗겨내어 골수를 충분히 노출시킬 수 있어서 골이 자라 들어오기(bone ingrowth)가 용이하나, 횡돌기간 부위는 피질골 박리가 어렵고 주변이 모두 근육으로 둘러 쌓여 있으므로 골구조가 불충분하여 이식물로 골이 자라 들어오기가 어렵다고 하였다. 또한 Boden[3]은 순수한 골전도 물질은 요추 후외방 유합에서 실패하며, 경추의 전방 유합시 고정을 견고하게 하였을 경우에만 성공할 수 있다고 하면서, 경추의 전방 추체간은 골성환경(bony environment)이고 요추 횡돌기간은 비골성 환경(nonbony environment)이라고 하였다. 따라서 본 실험에서 요추 후궁에 인산 칼슘과 인중합체를 이식시 자가골 이식에 버금가는 70%의 유합율을 보인 것은 요추 후궁이 피질골을 벗겨내어 골수를 충분히 노출시킬 수 있었던 골성 환경이었기 때문으로 해석된다. 그러나 요추 횡돌기간에 인산 칼슘과 인중합체를 이식시 전례에서 유합을 얻지 못하였던 이유는 횡돌기간이 비골성 환경이었기 때문으로 해석된다. 횡돌기간 조직 소견상 베타-인산화 삼칼슘 다공체 입자내에 Masson 's trichrome 염색상 초록색의 교원질이 자라 들어가고 점차로 교원질이 두꺼워지면서 직골로 변환되는 일련의 골생성 과정을

관찰할 수 있었다. 따라서 시간이 더 경과하였다면 골성 유합도 기대해 볼 수 있다고 생각된다.

현재까지 골형성 단백질만이 골유도성 물질로 알려져 있으며, 여러 가지 골전도 물질에 골형성 단백질을 함께 이식하여 자가골만의 이식보다도 우수한 골유합율을 보고하고 있다. 여러 보고에서 토끼 요추 횡돌기간에 자가골만의 이식시 50 70%, 골전도성 물질과 함께 골형성 단백질을 이식시 80 100%의 유합율을 보인다고 한다. Minamide 등[28]은 자가골 이식하여 57%, 교원질과 골형성 단백질-2를 이식하여 80%, 골세라믹과 골형성 단백질-2를 이식하여 100%의 유합율을 보였다고 보고하였고, Grauer 등[11]은 자가골 이식시 63%, 제 1형 우형 교원질에 골형성 단백질-7을 이식하여 100%의 유합율을 보였다고 보고하였다. 본 실험에서도 횡돌기간에 자가골만 이식하여 70%의 유합율을 보였다. 그러나 Ha 등[14]은 자가골 이식군에서 53%의 저조한 유합율을 보고하였는데 이는 당시 실험에서는 극돌기간 고정을 시행하지 않았으므로 본 실험에서 사용한 극돌기간 고정효과가 이러한 차이를 유발하였다고 생각한다.

Schroeder 등[30]은 인중합체가 인체내 세포내외에 모두 분포하며, 분포하는 장소에 따라 기능이 다르다고 하였다. 인산(phosphate)분자간의 결합시 에너지를 함유하고 분리시 에너지를 방출하여 생체내 에너지원으로 작용하며, 칼슘 이온의 킬레이터(chelator), 세포내 adenylate nucleotides농도의 조절인자등 다양한 역할을 한다고 하였다. 특히 인중합체는 골모세포에 고농도로 함유되어 있고, 골의 대사과정에서 무기질 침착에 관여한다고 하였다. 즉 당질 코르티코이드 (glucocorticoids), vitamine-D나 스테로이드와 같은 골생성 혹은 골흡수와 관련된 호르몬의 자극으로 골모세포내 alkaline phosphatase등 여러 효소들의 농도가 변화되며, 이러한 효소의 변화에 의하여 골모세포 내외의 피로인산(pyrophosphate : PPi)과 인산(momophosphate : Pi)의 농도가 증감하면서 무기질 침착에 관여한다고 하였다. 그러나 아직까지 골유도 혹은 골형성과 관련된 인중합체에 대한 보고는 없다. 인중합체는 치과 보철 과정에 충진재료로 사용되는데 이는 치아와 비금속성 보철재료사이에 일종의 접착체 역할을 한다. Kim[20]은 이러한 인중합체의 접착 역할이 골유합의 과정이라 판단하고 실험을 진행하였다. 실험 결과로서 생체외 환경에서 인중합체(PX)와 함께 골모세포를 배양하여 골모세포내 골형성 단백질(BMP-4)의 농도가 증가함을 관찰하였고, beagle dog의 원위 대퇴골 골수내에 인산칼슘 단독의 이식시보다 인산칼슘과 인중합체를 함께 이식시 골형성이 더 많이 이루어지는 것을 방사선학적 및 조직학적으로 관찰하였다.

본 실험에서 인중합체와 베타-인산화 삼칼슘을 이용한 요추 횡돌기간의 유합율은 0%를 보였다. 따라서 골형성 단백질을 사용하여 80 100%의 횡돌기간 유합율을 보인 보고들과 비교하면, 인중합체는 골형성 단백질보다 골유도능이 떨어진다고 생각된다. 그러나 본 실험에서 인중합체는 최소한 골형성을 증강시켰으며, 골형성 단백질보다는 골유도능이 훨씬 떨어지나 최소한의 골유도 효과는 있다고 생각된다. 그 이유는 첫째, 요추 후궁간에 인중합체를 포함한 베타-인산화 삼칼슘의 이식시 유합율이 70%로서 자가골의 유합율인 90%에 버금갔으며(p=0.291), 둘째, 횡돌기간의 비골성환경에서 반량의 자가골에 인중합체를 혼합 이식하여 정량의 자가골 이식과 동등한 70%의 우수한 골유합을 얻을 수 있었으며(p=0.500), 셋째, 횡돌기간에 인중합체와 베타-인산화 삼칼슘을 이식한 조직 소견상 베타-인산화 삼칼슘이 점차적으로 미숙골로 변환되는 과정이 관찰되었기 때문이다. 그러나 유합율을 향상시키기 위하여는 인중합체의 생체내 역치농도(threshold concentration)나 최적 농도(생체외 실험상 0.1 0.01%)에 대한 연구와 인중합체에 대한 최적의 전달체(화학적 성상과 다공 구조가 다른 인산칼슘)등에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

가토를 이용한 요추 유합술시 인중합체는 최소한 골형성을 증강시켰으며, 비록 약하지만 골유도 효과가 있다고 판단된다. 따라서 가토를 이용한 요추 후외방 유합술에서 인중합체의 생체내 역치 농도와 최적 농도, 인중합체에 대한 전달체등 유합의 최적 조건에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

임상적으로 요추 후외방 유합술시 인중합체와 베타-인산화삼칼슘 다공체의 병용이식은 아직 시기상조라 생각되나, 채취한 자가골의 양이 부족할 경우에 인중합체를 적은 양의 자가골에 병용해볼 만하다고 생각된다.

REFERENCES

1) **Boden SD, Andersson GBJ, Anderson DG et al**: *Overview of bone morphogenetic proteins for spine fusion, Spine 2002;15:S1.*

2) **Boden SD, Kang J, Sandhu H, MD and Heller JG**: *Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: A prospective, randomized clinical pilot trial. Spine 2002;*

27:2662-2673.

3) **Boden SD**: *Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute. Spine 2002; 15:S26-31.*
4) **Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC and Chen MI**: *The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part I: Biology of spinal fusion. Spine 1995; 20:2626-2632.*
5) **Boden SD, Schimandle JH and Hutton WC**: *The use of an osteeoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part II: Study of dose, carrier, and species. Spine 1995; 20:2633-2644.*
6) **De Groot K**: *Bioceramics consisting of calcium phos - phate salts. Biomaterials 1980;1:47-50.*
7) **Delecrin J, Aguado E, NGuyen JM, Pyre D, Royer J and Passuti N**: *Influence of local environment on incorpo - ration of ceramic for lumbar fusion. Comparison of lami - nar and intertransverse sites in a canine model. Spine 1997;1:1683-1689.*
8) **Delecrin J, Deschamps C, Romih M, Heymann D and Passuti N**: *Influence of bone environment on ceramic osteointegration in spinal fusion: comparison of bone-poor and bone-rich sites. Eur Spine J 2001;10:S110-113.*
9) **Eggli PS, Muller W and Schenk RK**: *Porous hydroxyap - atite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rab - bits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. Clin Orthop 1988;232:127-138.*
10) **Fischgrund JS, James SB, Chabot MC et al**: *Augmenta - tion of autograft using rhBMP-2 and different carrier media in the canine spinal fusion model. J Spinal Disord 1997;10:467-472.*
11) **Grauer JN, Patel TC, Erulkar JS, Troiano NW, Pan-jabi MM and Friedlaender GE**: *Evaluation of OP-1 as a graft substitute for intertransverse process lumbar fusion. Spine 2001;26:127-133.*
12) **Ha KY and Roh SH**: *Tumor Necrosis Factor- α and resorption of calcium sulfate used as a bone graft substi - tute in spinal fusion in rabbits. J Kor Spine Surg 2002; 37:115-122.*
13) **Ha KY**: *Biosynthetic graft as a bone graft substitute in spinal fusion. J Kor Spine Surg 2000;7:150-161.*
14) **Ha KY, Han CW and Ryoo SJ**: *Intertransverse lumbar fuion using calcium sulfate as a bone graft substitute in rabbit. J Kor Spine Surg 1999;6:336-343.*
15) **Ha KY, Park SJ, Choi WS and Roh SH**: *Calcium sulfate as a bone graft substitute for spinal fusion. J Kor Spine Surg 2001;8:53-61.*
16) **Helm G, Anderson DG, Andersson GBJ et al**: *Bone morphogenetic proteins, basic science. Spine 2002;27:S9.*
17) **Holinger JO, Brekke J, Gruskin E and Lee D**: *Role of bone substitutes. Clin Orthop 1996;324:55-65.*
18) **Hubbard WG**: *Physiological calcium phosphate as orthopedic implant. Diss Abstr Int 1974;35:1683B.*
19) **Kandziora F, Schmidmaier G, Schollmeier G, Bail H, Pflugmacher R, Gorke T, Wagner M, Raschke M, Mit-tlmeier T and Haas NP**: *IGF-I and TGF-beta1 applica - tion by a poly-(D,L-Lactide)-coated cage promotes inter - vertebral bone matrix formation in the sheep cervical spine. Spine 2002;27:1710-1723.*
20) **Kim HY**: *Personal communication.*
21) **Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T, Kotani S, Kokubo T and Takeuchi H**: *Four calcium phosphate ceramics as bone substitutes for non-weight-bearing. Bio - materials 1993;14:216-224.*
22) **Klein CP, Driessen AA, de Groot K and van den Hooff A**: *Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. J Biomed Mater Res 1983; 17:769-784.*
23) **Konishi S, Nakamura H, Seki M, Nagayama R and Yamano Y**: *Hydroxyapatite granule graft combined with recombinant human bone morphogenic protein-2 for solid lumbar fusion. J Spinal Disord 2002;15:237-244.*
24) **Kornberg A**: *Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. J Bacteriol 1995; 177:491-496.*
25) **Kornberg A, Rao NN and Ault-Riche D**: *Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. Annu Rev Biochem 1999;68:89-125.*
26) **Leyhausen G, Lorenz B, Zhu H et al**: *Inorganic polyphosphate in human osteblast-like cells. J Bone Miner Res 1998;13:803-812.*
27) **Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar RV and Sastry TP**: *Bioactivity and osseointegration study of cal - cium phosphate ceramic of different chemical composi - tion. J Biomed Mater Res 2002;63:200-208.*
28) **Minamide A, Kawakami M, Hashizume H, Sakata R and Tamaki T**: *Evaluation of carriers of bone morpho - genetic protein for spinal fusion. Spine 2001;26:933-939.*
29) **Ogose A, Hotta T, Hatano H et al**: *Histological exami - nation of beta-tricalcium phosphate graft in human femur.*

J Biomed Mater Res 2002;63:601-604.

30) **Schroeder HC, Kuerz L, Mueller WE and Lorenz B**: *Polyphosphate in bone. Biochemistry 2000;65:296-303.*

31) **Spivak JM and Hasharoni A**: *Use of hydroxyapatite in spine surgery. Eur Spine J 2001;10:S197-204.*

32) **Summer BN and Eisenstein SM**: *Donor site pain from the ilium: A complication of lumbar spine fusion. J Bone Joint Surg 1989;71-B:667-680.*

33) **Urist MR**: *Bone formation by autoinduction. Science 1965;150:893-899.*

34) **Young EM and Chapman MW**: *Morbidity at bone graft sites. J Orthop Trauma 1989;3:192-195*

국 문 초 록

연구계획: 자가장골, 베타-인산화 삼칼슘(βtricalcium phosphate, βTCP)과 무기질 인중합체(polyphosphate)를 사용하여 가토의 요추 단분절 후방 및 후외방 유합술을 시행하였다.

연구목적: 대부분의 골전도 물질은 그 자체만으로는 유합율이 저조한 실정으로 골유도 물질과의 병용시에만 골유합을 기대할 수 있다. 골형성 단백질만이 골유도능이 있다고 알려져 있으나, 인중합체가 골모세포에 고농도로 함유되어 있고 골의 대사과정에서 무기질 침착에 관여한다고 알려져 있으므로 인중합체의 골유도 물질로서의 효과를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: 40마리의 토끼중 20마리는 후궁간 후방 유합술을 시행하였고(후방 유합군), 다른 20 마리는 횡돌기간 후외방 유합술을 시행하였다(후외방 유합군). 후방 유합군 20마리중 10마리에서 우측에 자가장골 0.8 gm을 이식하였고(제 1후방 대조군), 좌측에 절반의 자가장골 0.4 gm에 0.01% 인중합체 용액을 첨가하여 이식하였고(제 1후방 실험군), 다른 10마리의 우측에 자가장골 0.8 gm을 이식하였고(제 2후방 대조군), 좌측에 0.01% 인중합체 용액을 첨가하여 만들어진 베타-인산화 삼칼슘의 다공체 0.8 gm을 이식하였다(제 2후방 실험군). 후외방 유합군 20마리에서도 골이식부위만 달리하여 동일한 방법으로 우측이 제 1 및 제 2후외방 대조군(각각 n=10), 좌측이 제 1 및 제 2후외방 실험군(각각 n=10)이 되었다. 수술 직후, 술후 4 주, 8 주, 12 주, 16 주에 골유합 여부 및 진행양상을 방사선학적으로 관찰하였고, 술후 16주에 토끼를 도살하여 골이식부를 채취한 후 골유합 여부를 육안적, 방사선학적 및 조직학적으로 관찰하였다. 통계적학적으로 후방 유합군과 후외방 유합군 각각의 군내에서 제 1대조군과 제 1실험군간, 2대조군과 제 2실험군간 그리고 제 1실험군과 제 2실험군간을 chi-square 검사법으로 비교하였다.

결과: 골성유합의 판정기준은 육안적, 방사선학적 및 조직학적 조건을 모두 만족시키는 경우로 하였는데 결국 육안적 촉진이 최종적인 판단의 기준이 되었다. 후방 유합군에서는 제 1후방 대조군, 제 1후방 실험군, 제 2후방 대조군과 제 2후방 실험군의 90%, 80%, 90%와 70%에서 각각 골성유합으로 판정하였다. 후외방 유합군에서는 제 1후방 대조군, 제 1후방 실험군, 제 2후방 대조군과 제 2후방 실험군의 80%, 70%, 60%와 0%에서 각각 골성유합으로 판정하였다. 통계적학적으로 제 2후외방 대조군과 제 2후외방 실험군간(p=0.005)과 제 1후외방 실험군과 제 2후외방 실험군간(p=0.002)에서만 통계학적으로 유의하였다. 제 2후외방 실험군에서는 육안상 전례에서 섬유성 유합만이 관찰되었으나, 조직 소견상 인중합체를 포함한 베타-인산화삼칼슘 다공체 입자들이 직골로 전환되는 과정이 관찰되었다.

결론: 가토를 이용한 요추 유합술에서 인중합체는 비록 약하지만 골유도 효과가 있다고 판단된다. 따라서 가토를 이용한 요추 후외방 유합술에서 인중합체의 생체내 역치 농도와 최적 농도, 인중합체에 대한 전달체등 유합의 최적 조건에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

색인단어: 요추 유합술, 골유도, 골전도, 인중합체, 베타-인산화 삼칼슘

※ **통신저자 :** 하 기 용
서울시 강남구 반포동 505번지
가톨릭대학교 강남성모병원 정형외과학교실
Tel: 02-590-1464 Fax: 02-535-9834 E-mail: kyh@cuk.cmc.ac.kr