

## 흰쥐 근육내 삽입된 탈회한 사람 골육종의 운명

가톨릭의과대학 부속 성바오로병원 정형외과

이 인 주 · 윤 현 모

### =Abstract=

### The Fate of Demineralized Human Osteosarcoma in Rat's Muscle Pouch

In-Ju Lee, M.D. and Hyun-Mo Yoon, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, St. Paul's Hospital, Catholic Medical College, Seoul

Demineralized homogenous bone matrix is reported to have no antigenic activity and its osteoinductive process is faster than that of undemineralized homogenous bone.

The present authors studied on the osteoinduction of demineralized human osteosarcoma in rat's muscle pouch. The results showed that demineralized human osteosarcoma tissue can induce new bone though there were inflammatory signs and giant cell reaction.

The osteoinductive process seemed to be delayed compared to that of demineralized homogenous bone matrix.

The authors believed that further immunological investigations are needed to clarify the cause of these tissue response.

**Key Words:** Demineralized Human Osteosarcoma, Fate

### 서 론

탈회한 동종골 기질은 기질내의 비교원성 단백질 중 골형성단백(bone morphogenetic protein, B.M.P.)이 간엽세포를 분화시킴으로써 근육 또는근막내에서 신생골을 유도한다고 알려져 있다. 이러한 골형성단백은 각종 동물의 피질골 및 치아에서 발견되었고, 최근에는 사람의 골육종 및 연골육종에도 그 존재가 인정되고 있다<sup>1,2</sup>.

한편 탈회한 골기질은 동종골 이식에 비해 항원성이 없고, 무기질이 제거되었기 때문에 신생골로의 전환이 빠르다고 알려져 있다<sup>10</sup>.

이러한 연구 결과들을 보면 이종골 기질도 면역억제제를 사용하지 않더라도 신생골을 신속히 형성할 수 있다는 가정이 성립된다.

이를 증명하기 위하여 저자들은 골형성단백이 많다고 알려진 사람의 골육종조직을 탈회하여, 흰쥐 근육내에 삽입하고 그 조직변화를 시기적으로 관찰하였다.

\*본 연구는 1986년 가톨릭 중앙의료원 연구비로 이루어진 것임.

### 재료 및 방법

#### 1) 골육종 골기질 제작

골육종으로 슬관절 상부 절단술을 받은 14세된 남자 환자의 경골 근위부에서 골육종 조직을 20gm을 떼어내어 이중 일부는 조직진단을 위하여 10% formalin 용액에 고정하였으며, 나머지는 연부조직을 제거한 후 혈액 및 골수를 생리적 식염수로 세척하여 0.5M 염산으로 탈회하였다. 탈회한 조직괴를 4×4×4mm 크기의 조직편으로 자른 후 0.5M 염산으로 재탈회한 후 세척액의 pH가 6.2가 될때까지 생리적 식염수로 세척하였다.

이들 조직편들은 2일간 냉동건조(Thermovac, type FD-ULT-3, Refrigeration for Science Inc., Island Park, N.Y., U.S.A.) 시켰으며 ethylene oxide로 멸균소독하였다.

#### 2) 실험 방법

실험 동물로는 150gm 내외의 흰 쥐(Wistar rat) 10마리를 암수 구별없이 사용하였으며, 일정 사료로 동일 조건하에서 사육하였다.

**Table 1.** Summary of histologic findings

Week (n=10)	Chondrogenesis	Osteogenesis	Bone marrow formation	Ossicle formation
1	0	0	0	0
2	1	0	0	0
3	5	3	0	0
5	5	4	2	0
7	1	5	3	0
9	1	6	5	0
11	2	6	5	0
15	2	7	7	0

**Fig. 1.** Photomicrographs of demineralized and freeze-dried human osteosarcoma tissue in rat's muscle pouch after 1 week, stained with hematoxylin and eosin ( $\times 50$ ).

Loose connective tissue with some inflammatory cell infiltration, covered the implant peripherally (**a**). Centrally, scanty cellular invasion into preexisting channels and spaces of matrix was observed (**b**).

**Fig. 2.** Photomicrographs of demineralized and freeze-dried human osteosarcoma tissue in rat's muscle pouch after 2 weeks, stained with hematoxylin and eosin ( $\times 50$ ).

Surrounding connective tissue and invading connective tissue into preexisting spaces were heavily infiltrated with acute inflammatory cells (**a**). Giant cells were observed as well (**b**).

**Fig. 3.** A photomicrograph of demineralized human osteosarcoma tissue in rat's muscle pouch after 3 weeks, stained with alcian blue PAS ( $\times 50$ ).

Cartilage islets appeared at preexisting vascular channels and spaces.

**Fig. 4.** A photomicrograph of demineralized human osteosarcoma tissue in rat's muscle pouch after 5 weeks, stained with hematoxylin and eosin ( $\times 50$ ). Minimal new bone formation was observed in the cartilage islets.

**Fig. 5.** A photomicrograph of demineralized human osteosarcoma tissue in rat's much pouch after 15 weeks, stained with hematoxylin and eosin(×50).

The matrix was not completely replaced with new bone, and cartilage islets could be found.

흰 쥐를 에테르 점적 마취하에 배부를 삭모하고 소독한 후 정중, 종 절개하여 양측 배부 근육을 노출시키고, 10개의 골육종 기질을 근육내에 삽입하였다.

수술창의 봉합후 감염을 방지하기 위하여 ampicillin을 Kg 당 50mg씩 5일간 근육주사 하였다.

수술후 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 및 15주에 10마리의 흰쥐로부터 각각 1개씩의 골육종 기질을 채취하여 10% formalin에 고정하고 10% E.D.T.A. 로 4일간 탈회한 후 hematoxylin-eosin 염색 및 alcian blue PAS 염색으로 조직 변화를 관찰하였다.

## 성 적

### 조직 소견

**술후 1주 :** 삽입된 골육종 기질은 모세혈관이 풍부한 조밀하지 않은 섬유성 결체조직으로 둘러싸였으며 기존의 골 격자구조 내에도 미미한 세포 침윤이 관찰되었다. 결체조직 내에는 급성염증세포의 침윤이 있었다(Table 1, Fig. 1a and b).

**술후 2주 :** 10개의 골육종 기질중 1개에서 연골 형성을 보일 뿐 나머지의 골육종 기질은 1주와 유사한 조직 반응을 나타냈다. 다만, 급성 염증이 보다 심하여졌다(Table 1, Fig. 2a and b).

**술후 3주 :** 연골형성이 10개의 골육종 기질중 5개에서 관찰되었으며 이중 3개에서는 신생골 형성이 시작됨이 관찰되었다(Table 1, Fig. 3).

**술후 5주 :** 10개의 골육종 기질중 5개에서 연골을 관찰할 수 있었으며 이중 4개에서 신생골 형성이 관찰되었고 2개에서는 신생 골수형성이 나타났다(Table 1, Fig. 4).

**술후 7주 :** 10개의 골육종 기질중 5개에서 신생골 형성이 나타났고 이중 1개는 연골조직도 발견되었다. 신생골 형성이 된 것중 3개에서는 골수가 출현하였다. 그러나 염증 소견은 지속되었다.

**술후 9주 :** 10개의 골육종 기질중 6개에서 신생골 형성이 보였고 이중 5개에서 골수가 확인되었으나 1개에서는 연골 조직도 관찰되었다.

**술후 11주 :** 10개의 골육종 기질중 6개에서 신생골 형성이 보였고 이중 5개에서는 골수내의 지방세포들이 많이 나타났다. 이들중 2개에서는 연골조직이 관찰되었으며 골육종 기질을 둘러싼 결체조직 내에는 만성 염증 소견이 있었다.

**술후 15주 :** 10개의 골육종 기질중 7개에서 신생골 형성 및 골수 형성이 있었으나 골육종 기질이 완전 신생골로 대체되지 못했을 뿐 아니라 계속 연골 조직이 관찰되기도 하였다. 결체조직 내에는 만성 염증세포들이 침윤되어 있음이 발견되었다(Table 1, Fig. 5).

## 고 찰

임상적으로나 또는 실험적으로 자가골이식이 동종골 이식보다 우수하다는 점은 잘 알려져 있다. 이는 자가골은 숙주에게 자기 것으로 인지되나 동종골은 남의 것으로 인지되어 다른 조직이식에서 볼 수 있는 면역 반응이 일어나기 때문이다<sup>2,4,5</sup>. 그러나 자가골 이식에서는 자가골을 얻기 위해서 정상 골격에 손상을 주게 되고 충분한 양의 자가골을 얻을 수 없는 약점이 있다<sup>6</sup>.

동종골 이식은 거부반응이 일어나므로 동종골 내의 골세포들은 죽게되고 이식부의 결체조직이 metaplasia를 일으켜 골형성을 하므로 자가골에 비해 골형성능이 떨어진 다.

이러한 동종골의 면역성은 골조직의 어떤 성분에서 기인되는 지는 잘 알려져 있지 않으나 냉동 건조하거나 방사선을 조사하거나 또는 merthiolate 용액에 고정하면 그 면역성을 줄일 수, 있다고 알려져 있다<sup>7</sup>.

그러나 염산으로 탈회한 동종골 기질은 항원성이 없고 무기질이 제거되었기 때문에 혈관 침투가 빠르고 기질의 흡수가 빨리 일어나, 쉽게 간엽세포로 채워진다고 알려져 있다<sup>8</sup>. 이 간엽세포들은 골 기질내의 비교원성 단백질로 분자량이 17,500 내지 18,500 Dalton으로 알려진 골형성단백(bone morphogenetic protein, BMP)에 의해 연골 모세포, 골 모세포 또는 골수 모세포로 변하여 신생골 및 골수를 형성하게 된다고 알려져 있다<sup>2,9</sup>.

골 형성단백은 각종 동물의 피질골, 치아 조직 및

쥐의 골육종에서 그 존재가 확인되었으며, 최근에는 사람의 골육종 및 연골육종에서도 발견되었다<sup>2,4)</sup>.

이종골 이식은 강한 거부반응으로 Kiel bone을 제외하고는 임상적으로 널리 이용되지 못하고 있으며 그 원인으로 생각되는 것은 이종 동물의 골수 및 혈액 성분때문인 것으로 추측되고 있다<sup>2,4)</sup>.

이러한 연구 결과를 종합하여 보면 이종골이더라도 면역반응을 일으킨다고 알려진 골수 및 혈액 성분을 제거한 후 탈회 및 냉동 건조를 실시하면 항원성이 감소하고 여기에 골형성 단백질이 존재한다면 면역억제제를 사용치 않고서도 신생골형성이 일어나리라 추측된다.

저자들은 이를 증명하기 위해 골형성 단백질이 존재한다고 알려진 사람의 골육종 조직을 생리적 식염수로 세척, 탈회후 냉동 건조하였으며 감염을 예방하기 위하여 ethylene oxide로 멸균한 후 흰쥐의 배부 근육에 삽입하고 항생제를 투여하여 그 조직 반응을 관찰하였다.

그 결과 삽입후 1 주에는 골육종 기질은 염증세포가 침윤된 결체조직으로 싸였으며, 2 주에는 일부의 조직면에서 빈약한 연골 형성이 기존의 골 소주 구조 및 혈관 구조에서 나타났다.

그러나 급성 염증세포의 침윤이 더 심해지고 일부에서는 이물형 거대세포 (foreign body giant cell)의 출현이 관찰되었다(Fig. 1 and 2).

이러한 조직반응은 동종골 기질 실험연구들<sup>1,4,5)</sup>에서는 뚜렷히 언급되지 않았는데 이종골기질에 대한 면역반응의 결과로 추측되나 골기질중 어느 성분 때문인가를 알려면 더 많은 연구가 시행되어야 하리라 생각된다.

3 주에는 연골 형성은 보다 왕성해지고 5 주에는 신생골 형성 및 골수 형성이 관찰되나(Fig. 3 and 4) 7 주에 이르러서도 염증세포 침윤 및 거대세포의 출현이 관찰되었다. 15 주에는 신생골과 골수 뿐 아니라 골수 내에서 지방세포들이 풍부하게 관찰되었으나 아직 골화가 되지 못한 연골이 발견되며 흡수되지 못한 골육종 기질도 많이 남아 있었다(Fig. 5).

본 실험의 결과가 지금까지의 동종골기질 실험결과들 보다 지연되는 이유로서는 이종 골 기질에 대한 면역성 뿐 아니라 사용된 골 기질의 형태(geometry) 및 표면 전하(surface charge)의 차이 때문으로 추측되었으며 이를 밝히려면 동종골 기질 및 골육종 기질을 각각 동일한 형태로 만든 후 비교 실험하여야 할 것으로 추측되었다.

14 세된 남자 환자의 근위 경골부에서 채취한 골육종 조직을 세척, 탈회하고 냉동 건조하여 흰 쥐 배부 근육내에 삽입하여 그 조직 변화를 15 주까지 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 사람의 골육종 기질은 이종 동물의 근육내에서 신생골 형성을 일으키는것이 확인되었다.

2. 사람의 골육종 기질은 골유도 과정이 느릴 뿐 아니라 15주가 되어도 신생골로 완전히 대체되지도 않았다.

3. 사람의 골육종 기질은 흰 쥐 근육내에서 염증 반응 및 거대세포의 출현을 일으켰다.

이상의 결과를 볼때 사람의 골육종 기질내의 골형성 단백질이 흰쥐 근육내에서 신생골을 유도했다고 추정된다. 한편, 사람의 골육종 기질의 골형성 단백질과 흰쥐의 골형성 단백질의 유사성이 있다고 추정되나 이에 대해서는 더 많은 연구가 시행되어야 할 것이다.

## REFERENCES

- 1) 이인주·김 인 : 근육내 삽입된 동종골 기질의 골유도에 대한 전기자극의 효과. 가톨릭 의대 의학부 논문집. 제 38집, 제 4호, 169-177, 1985.
- 2) Bauer, F.C.H. and Urist, M.R.: Human osteosarcoma-derived soluble bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop.* 154:291-295, 1981.
- 3) Bonfiglio, M. and Jeter, W.S.: Immunological responses to bone. *Clin. Orthop.* 87:19-27, 1972.
- 4) Burchardt, H.: The biology of bone graft repair. *Clin. Orthop.* 174:28-42, 1983.
- 5) Burwell, R.G.: Studies in the transplantation of bone. V. The capacity of fresh and treated homografts of bone to evoke transplantation immunity. *J. Bone and Joint Surg.* 45-B:386, -401, 1963.
- 6) Nogami, H. and Oshira, A.: Postnatal new bone formation. *Clin. Orthop.* 184:106-113, 1984.
- 7) McMurray, G.N.: The evaluation of Kiel bone in spinal fusion. *J. Bone and Joint Surg.* 64-B:101-104, 1982.
- 8) Reddi, A.H. and Anderson, W.A.: Collagenous bone matrix-induced enchondral ossification and hemopoiesis. *J. Cell Biol.* 557-572, 1976.
- 9) Smith, R.T.: The mechanism of graft rejection

*Clin. Orthop.* 87:15-27, 1972.

- 10) Tuli, S.M. and Singh, A.D.: *The osteoinductive property of decalcified bone matrix.* *J. Bone*

*and Joint Surg.* 60-B:116-123, 1978.

- 11) Urist, M.R.: *Bone Formation by autoinduction.* *Science* 150, 893-899, 1965.