

Formaldehyde로 유발한 가토 관절의 변화에 관한 실험적 연구

가톨릭의과대학 정형외과학교실

김 연 일 · 문 명 상

—Abstract—

Formaldehyde-induced Arthropathy in Rabbits

Kim, Yon Il, M.D., Moon, Myung Sang, M.D.

Department of Orthopaedics, Catholic Medical College, Seoul, Korea

Of the several methods available for producing an experimental arthritis, authors adopted a relatively simple and constant method for the production of an experimental arthritis by intra-articular injection of formaldehyde, and gave a detailed description for its sequential change of articular cartilage as observed by gross examination and by light microscopy. A total of 15 growing white rabbits, weighing 1.5-1.6 kg, were used.

This animal were divided into two main groups, one designated as a control and the other as experimental group. Experimental group was subdivided into three groups to produce three form of arthritis simulating clinical forms of rheumatoid arthritis.

Both knees were selected for the site of injection.

Four rabbits received a single intra-articular injection of formaldehyde, while the other eight received 5 doses, halves at daily interval and the other halves at one week interval.

The rabbits observed clinically during the course of the experiment. They were sacrificed at 1 month after last intra-articular injection. The knee joints were then opened and examined grossly. The proximal end of tibia with the adjacent synovium of the infrapatellar region was excised *en bloc* and examined. Sections were stained with hematoxylin and eosin.

Those joints were normal in control group, but formaldehyde induced arthritic joint had mild to severe change of articular cartilage.

A single intra-articular injection could cause arthritis transiently but minimum cartilage destruction by pannus invasion at periphery.

Five daily successive injection could cause most severe progressive form of arthritis which persisted over 6 months and caused most marked cartilage destruction in entire area but 5 successive injection at 1 week interval could cause intermediate form of arthritis persisting about 2 months after last injection. Cartilage destruction were moderate at periphery.

Authors do not, however, as yet have a complete explanation for the longer perpetuation of the arthritis in the 5 dooses of successive daily injection group.

Severity of the joint destruction including cartilage seems to be responsible for the severity of initial

insult. The diseased synovium itself could be responsible for the continued joint damage and its severity including cartilage, perhaps by the release of proteolytic enzymes and the perpetuation of a chronic inflammatory response. Also it is postulated that many of the late changes in the cartilage are simply the end result of the initial injury to synovium and articular cartilage by formaldehyde.

머 리 말

각종 관절염에 대한 병리학적인 연구는 여러 학자들에 의하여 지금도 계속되고 있으며, 1940년대까지 특히 류마티스성 관절염은 감염병소가 이병을 일으키는 요인이라고 믿어졌으나 Pemberton(1940)들은 실험을 통하여 이 학설을 부정하였다. 최근에는 mycoplasma 또는 autoimmunity에 의한 발병설이 유력시되고 있다. 그러나 지금도 많은 학자들은 류마티스성 관절염과 유사한 만성 관절염을 실험적으로 유발시켜 원인규명 및 치료지침을 세울 목적으로 꾸준히 조직학적인 연구를 계속하고 있다. 특히 비특이성 만성 관절염인 류마티스성 관절염은 그 자연경과에 따라 여러가지 문제점을 제시하며 자연치유시키는 아무도 예측할 수 없다. 이 병은 경과를 달리하는 세가지 임상형으로 분류되며 대부분의 예는 재발을 반복하는 다발주기형(polycyclic form) 경과를 취하나 드물게는 단 1회의 짧은 이완기를 거친후 자연치유되는 단일주기형(monocyclic form)도 있다. 그러나 불행히도 소수 예에서는 단일주기형이면서도 치유되는 경향을 보이지 않고 계속 진행되는 진행성 중증형(progressive form)경과를 밟는 예도 있다.

이 형은 악화를 거듭함으로서 불구를 면치 못하게 되는 예가 된다. 그리하여 많은 학자들이 여러 방법을 이용하여 실험적 관절염을 일으키고 있다.

Steinberg(1973)들은 ovalbumin을 생리적 식염수에 용해시킨 후 Freund's complete adjuvant를 첨가하여 피내주사함으로써 실험동물을 감염시킨후 다시 관절내에 동일물질을 주사하여 항원항체반응을 야기시켜서 관절염을 일으킬 수 있었으나 이 방법으로는 1년이상 자동적으로 지속하는 진행성 중증 관절염을 일으킬 수 있을뿐 단일주기형 및 다발주기형 관절염은 일으킬 수 없었다. 이에 저자들은 가토의 슬관절에 formaldehyde를 여러가지 방법으로 투여하여 각형의 관절염을 일으켜 임상에서 경험하는 류마티스성 관절염의 발병주기가 관절구조물 특히 관절연골에 미치는 영향을 규명하기 위해 본 실험을 실시하였다.

재 료 및 방법

재 료

실험동물로서는 체중 1.5 내지 1.6 kg의 성장기 음성

백색 가토를 대조군과 약물 투여군으로 나누어 사용하였다. 대조군에는 3마리를, 약물 투여군에는 각조에 4마리씩 택하여 모두 15마리의 토끼를 사용하였으며 약물로는 2% formaldehyde 용액과 대조군에는 정상 생리적 식염수를 사용했다.

방 법

실험가토의 양쪽 슬관절 주위의 털을 깨끗하게 깎은 후 무균적으로 다음과 같은 조작을 하였다.

(I) 대조군(생리적 식염수 주입군) :

우측 슬관절내에 생리적 식염수 0.5 cc를 매일 5일간 주사하였으며 좌측 관절내에는 1주 간격으로 5회 주사하였다.

(II) 약물 투여군(formaldehyde 주사군) :

3군으로 나누어 실험을 실시하였으며 2% formaldehyde 0.5 cc를 1회 주사량으로 하고 무균조작하여 양쪽 관절내에 주사하였다.

1. 1회 주사군

단일 주기형 관절염을 야기시킬 목적으로 양쪽 슬관절내에 2% formaldehyde 0.5 cc를 단 1회 주사하였다.

2. 5회 격주 주사군

다발주기형 관절염을 야기시킬 목적으로 양쪽 슬관절내에 격주로 주사하여 5회 주사하였다.

3. 5회 매일 주사군

진행성 중증 관절염을 유발시킬 목적으로 양쪽 슬관절내에 매일 주사하여 5일간 계속적으로 주사하였다.

위의 각군에서 주사관절의 감염을 예방하기 위하여 streptomycin 100mg 씩을 3일 간격으로 근육 주사하였으며 각군에서 최종 주사후 1개월에 모두 도살하여 조직학적인 관찰을 하였다. 도살 가토에서 경골 근위부를 관측 절취(coronal section)하여 10% formalin에 고정한후 5~6일간 EDTA 용액내에 넣고 탈회(脫灰)하고 파라핀에 포매시킨 조직편을 5~6 μ 두께로 잘라 Hematoxylin-Eosin 염색을 하여 광학현미경하에서 관절연골의 변화를 관찰하였다. 조직학적 연구는 Policard(1936)의 광학현미경하의 조직층 분류법을 이용하여 실시하였다.

성 적

1. 대조군

전 가토의 관절연골에서 육안적으로나 조직학적으로 하등의 변화를 발견할 수 없었으며 활막에서도 하등의 변화를 발견할 수 없었다. 또한 관절의 외양과 운동범위도 정상 가토와 같았다.

2. formaldehyde 주사군

ㄱ. 1회 주사군

육안적으로 관절연골의 변연부 즉 비접촉부(non-contact area)에서 육아조직(pannus of granulation)이 연골을 침식하고 있는 모습을 볼 수 있었으나 기타 부위는 정상으로 보였으며 활막염 및 관절침식도 정지된 것 같이 보였다. 변연부를 제외한 중심부 연골에서는 별다른 변화를 발견할 수 없었다.

ㄴ. 5회 격주 주사군

육아조직의 침입으로 변연부 연골에 보다 심한 변화를 볼 수 있었으나 중심부에 있는 접촉부(contact area)에서는 색조와 광택이 약간 소실되었을 뿐 별 다른 변화는 없었다. 광학현미경하에서는 변연부 연골의 접선층(tangential layer) 및 상이행층(upper transitional layer)의 육아조직에 의한 침식상과 보다 중심부 관절연골면의 섬유질화(fibrillation) 현상등 가벼운 퇴행성 변화를 발견할 수 있었으나 낭포형성상은 발견되지 않았다.

ㄷ. 5회 매일 주사군

육아조직에 의한 변연부 연골의 침식상이 보다 심하며 중심부 연골도 광택을 잃고 있었다. 광학현미경하에서는 중심부인 접촉부(contact area)에서도 섬유질화 현상을 볼 수 있었고 연골세포강의 낭포형성(cyst formation)과 접선층 및 이행층 전체에서 연골세포의 퇴행성 변화 및 핵 염색성의 소실이 관찰되었으며 때때로 빈 열공(empty lacunae)도 볼 수 있었다. 그러나 방사성 배열층(radial zone)은 정상이었다.

고 안

Selye(1949)가 formaldehyde를 쥐의 족관절부에 주사하여 실험적으로 관절염을 유발시킬 수 있다고 보고한 후 여러 학자들에 의하여 각종 연구를 위하여 이 방법이 채택되어 왔다. 이 방법으로 유발된 실험적 관절염은 각종 약물의 효능판정에도 이용되고 있다. Paratt와 West(1957)는 이 방법을 더욱 체계화시켰으며 염증의 정도를 양적으로 규명하기 위하여 이 방법을 썼다고 한다.

많은 학자들이 관절염을 일으킬 수 있는 요인을 찾아내기 위하여 여러가지 약제들을 사용하여 연구를 거듭하였으나 류마티스성 관절염의 정확한 병인은 아직 밝

혀지지 않고 있다. 그러나 최기홍(1966)에 의하면 성장기백서 족부에 formaldehyde로 유발시킨 만성관절염은 그 조직학적 변화와 증상이 류마티스성 관절염의 만성기와 흡사하다고 하였고 formaldehyde에 의해 야기된 관절염에서의 조직학적 변화는 Selye(1949), Bourne(1951)에 의하여도 이미 기술된 바 있다.

그러나 이들은 류마티스성 관절염의 임상형에 유사한 관절염을 발생시켜 조직학적 연구를 한 바 없었다. 임상에서 경험하는 각형 류마티스 관절의 연골변화는 임상형에 따라 차이가 크며 관절연골의 파괴는 예후 판정의 기준이 된다. 관절연골은 여러가지 기전에 의하여 변성 또는 파괴되어 간다. 관절연골의 변성 또는 파괴의 요인은 기계적 요인과 화학적 요인으로 대별된다. 기계적 요인에는 외상과 하중(荷重)을 들 수 있고 화학적 요인은 효소와 같은 약물에 의한 파괴를 들 수 있다. 화농성 관절염에서는 두가지 종류의 효소에 의하여 파괴된다. 즉 collagen을 파괴하는 collagenase와 기질(ground substance)를 파괴하는 plasmin을 들 수 있고 통풍때는 lysosomal enzyme인 cathepsin에 의하여 파괴된다. 그러나 류마티스성 관절염에서의 연골교원섬유(cartilage collagen fiber)의 파괴는 Harris(1974)에 의하면 두가지 주기전(principal mechanism)에 의하여 일어난다. 첫째기전은 비효소성 기전(noenzymatic pathway)이며 연골내의 proteoglycans의 지속적 저하가 있을때 연골의 교원섬유가 쉽게 분절(fragmentation)을 일으키든가 기계적 파괴가 쉽게 일어난다고 한다.

proteoglycans가 저하되었을때 관절연골은 변형을 초래하는 외력에 저항치 못하게 된다. 그러나 Chaplin(1971)은 비효소성 기전중에 침식해 들어가는 pannus의 국소적 파괴작용과 연골세포 자체의 병적파괴를 포함시켰다. Kulka(1959)에 의하면 pannus는 관절연골의 변연부로부터 중심부로 진입한다고 한다. 이는 류마티스성 관절염의 활동성 병변에 있어서는 연골의 연화(softening) 및 사멸이 변연부로부터 시작되며 이 부위에 활막성 육아조직(pannus)의 침식이 시작된다. 또한 변연부는 활막과 직접 접촉하고, 생리적 압박을 받지 못하여 영양장애가 오기 쉬우므로 pannus의 침식이 용이하게 된다. 둘째기전은 효소 즉 collagenase에 의한 파괴이며 이것이 이차적으로 관절연골을 파괴한다. 이 물질은 관절활막과 백혈구내 과립과 관절액에서도 발견된다. Ball(1969)에 의하면 연골의 침식은 국소적이며 언제나 파괴효소의 분비에 의해 일어난다고 한다. 관절액내에 분비된 효소는 전반적인 변색현상(metachromasia)의 소실을 초래하나 연골의 전반적 용해는 일으키

지 않는다고 하였다. 저자들이 야기시킨 여러모양의 만성관절염에서의 관절연골의 변화가 어느 기전에 의한 것인지 분명치 않으나 기계적 요인에 의한다고 보다는 pannus에 의한 침식작용과 교원섬유분해효소(collagenase)에 의한 파괴라고 믿어지며 이외에 formaldehyde 주입에 따른 관절연골의 영양장애도 어느 정도 관절연골의 변성을 일으키는데 기여할 것으로 생각된다. formaldehyde의 단 1회 주사군에서 연골의 변화가 가장 가벼웠던 것은 주사직후 급성활막염을 유발시킬 수 있었으나 도살직전에는 외관상 염증소견을 전혀 발견할 수 없었고 조직학적으로 병이 정지된 상태에 있는 것으로 미루어 보아 일시적 자극에 의한 활막염의 결과 발생한 pannus에 의한 침식만으로 풀이되며 lysosomal enzyme은 그 분비가 적어 파괴의 기회가 적었을 것으로 생각된다. 즉 단 1회 주사로서는 자동적으로 영속하는 만성 활막염을 일으킬 수 없기 때문이라고 믿어진다

5회 주사군에서 주입된 formaldehyde의 양은 일정한 데도 불구하고 격주 주사군의 슬관절이 도살직전에 거의 외관상 정상으로 보이는 반면 매일 주사군에서는 최종 주사후 1개월까지도 만성활막염의 증상을 나타내어 매일 주사군에서의 보다 심한 관절연골파괴는 formaldehyde에 의한 직접작용이기 보다 lysosomal enzyme의 활동성(activity)의 차이와 심한 pannus형성에 의한 차이라고 풀이된다. 그러므로 진행성 중증형 류마티스성 관절염은 자연소멸이 다발주기형에 비해 빨리 일어나는 것을 고려한다면 병의 경과중 약물 및 물리치료에 의하여 병의 진행을 반복, 중단 또는 경감시키는 것이 관절연골의 파괴를 줄이게 될것으로 생각된다.

또한 이 실험을 통하여 formaldehyde의 5회 매일 주사로서 보다 심한 만성활막염을 지속시킬 수 있었다는 것은 의의있는 발견이다. 만성활막염의 후기소견들은 활막 및 연골에 대한 단순한 일차 손상의 결과로 믿어지며 저자들로서는 이 실험이 오래된 것이지만 많은 실험 방법중 가장 만족스런 방법으로 믿어진다. 그러나 이 방법이 사람의 류마티스성 관절염과 얼마만큼 유사한지 현단계로서 판정키 어렵다.

맺 음 말

저자는 체중 1.5~1.6kg 내외의 웅성 백색 가토 15마리를 택하여 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였으며 대조군에는 생리적 식염수를 실험군에는 formaldehyde를 양슬관절내에 주사하여 세가지형의 실험적 관절염을 일으켜 이때 관절연골의 변화를 관찰하였다.

1) formaldehyde의 관절내 주사로서 급성활막염을

일으킬 수 있었으나 1회 주사로서는 1개월이상 지속하는 만성활막염을 일으킬 수 없었다. 그러나 5일간 매일 주사함으로써 6개월이상 지속하는 만성활막염을 일으킬 수 있었다.

2) 대조군에서는 관절연골의 변화를 전혀 발견할 수 없었으나 formaldehyde 주사군에서는 모두 변화를 나타내었다. 즉 5회 매일 주사군에서 가장 심한 변화를 보였으며 변연부 연골뿐 아니라 점차 중심부 연골도 침범됨을 볼 수 있었으나, 1회 주사군에서는 주사 1개월 후 활막염 증상이 자연 소멸됨과 함께 진행성 관절연골의 파괴도 멈추게됨을 관찰할 수 있었다. 한편 5회 격주 주사군에서는 상기한 두군의 중간형의 변화를 발견할 수 있었지만 최종주사 2개월후에는 임상적으로 활막염의 증상이 소실되었음을 관찰하였다.

상기한 여러 소견을 종합하면 관절연골의 파괴정도는 처음 관절연골에 가해진 손상의 정도에 좌우되며 심한 관절연골의 파괴를 나타냈던 예가 임상적으로도 만성경과를 취하는 활막염을 일으키는 것을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Ball, J. (1969): *Pathological Aspects of Rheumatoid Arthritis. In Early Synovectomy in Rheumatoid Arthritis, Excerpta Medica.*
- Bourne, G. H. (1951): *Some histological aspects of formalin "arthritis" in rats. Brit. J. Exp. Path. 32:377-381.*
- Chaplin, D. M. (1971): *The pattern of bone and cartilage damage in the rheumatoid knee. J. Bone and Joint Surg. 53:404.*
- 최기홍 (1966.): 실험적 만성관절염에 미치는 Corticosteroid의 영향. 대한외과학회잡지 제8권 제1호 57-72.
- Harris, E. D. Jr. (1974): *Degradation of cartilage collagen by rheumatoid synovial collagenase. J. New Eng. Med. 290:1-5.*
- Kulka, J. P. (1959): *The pathogenesis of rheumatoid arthritis. Journal of Chronic Disease. 10:388.*
- Parratt, J. R. & West, G. B. (1958): *Inhibition by various substances of oedema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxy-tryptamine, histamine, egg white and compound 48/80. Brit. J. Pharmacol. 14:484-487.*
- Pemberton, R., Eiman, J., Patterson, S. & Stackjous, E. A. (1947): *Attempts at the experimental production of arthritis. J. Lab. Med. 32: 1121-*

1129.

Policard, A. (1936): *In physiologie generale des articulations a l'etat normal et pathologique*, Paris, cited from Masson et Cie: *J. Bone and Joint Surg.* 53-B, 732-750.

Selye, H. (1949): *Further studies in the participation*

of the adrenal cortex in the pathogenesis of arthritis. *Brit. Med. J.* 2:1129-1135.

Steinberg, M. E., McCrae, C. R., Cohon, L. D. & Schumacher, H. R. (1973): *Pathogenesis of antigen-induced arthritis.* *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 97:248-260.

▷김연일 논문 사진 부도 ①◁

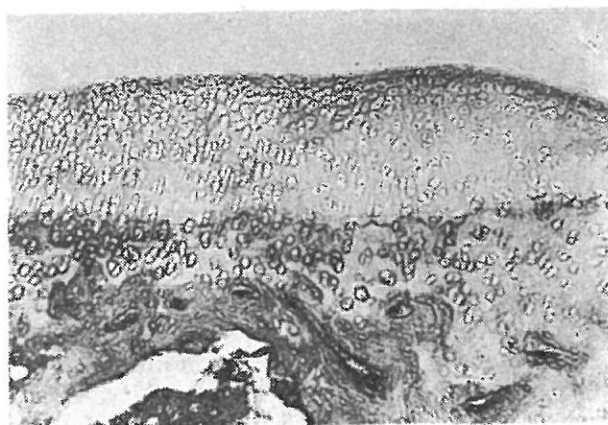
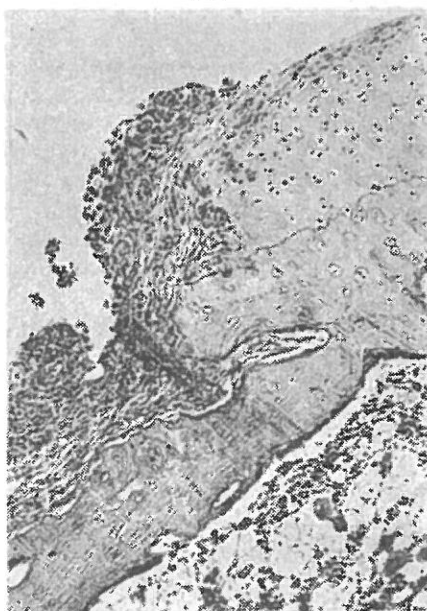


Fig. 1. Articular cartilage are well arranged in well defined linear arcades (Hematoxylin-eosin stain: one month after intra-articular injection of normal saline $\times 100$).

(A)



(B)

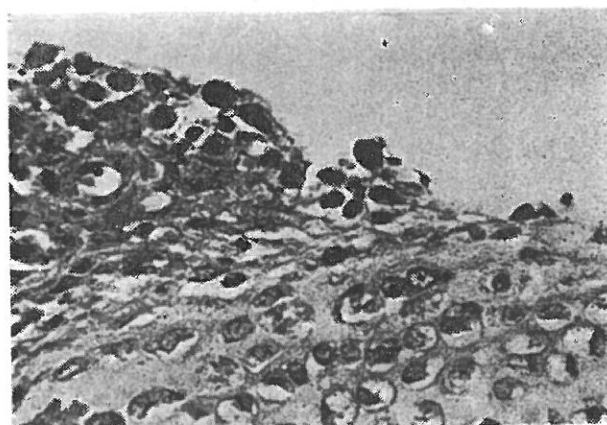


Fig. 2. There is mild synovial reaction with a superficial marginal cartilage change (Hematoxylin-eosin stain: one month after a single intra-articular formaldehyde injection $\times 100$ (A), $\times 450$ (B)).

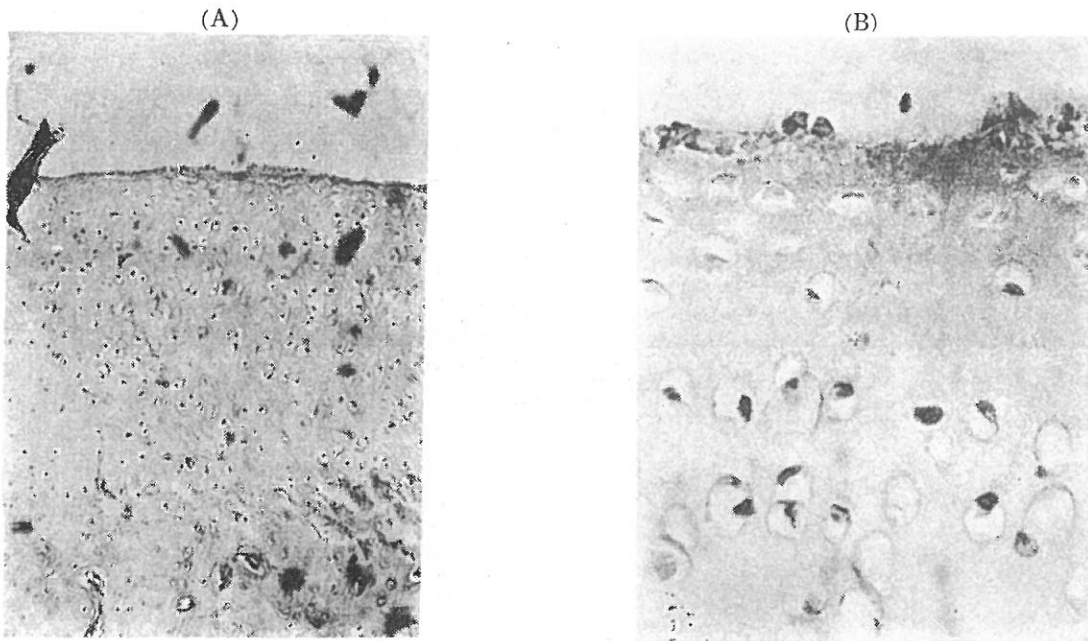


Fig. 3. There is mild fraying of marginal articular surface, superficial ulceration and early chondrocyte degeneration in the tangential and transitional layer (Hematoxylin-eosin stain: one month after 5 successive intra-articular formaldehyde injection at a week interval $\times 100$ (A), $\times 450$ (B)).

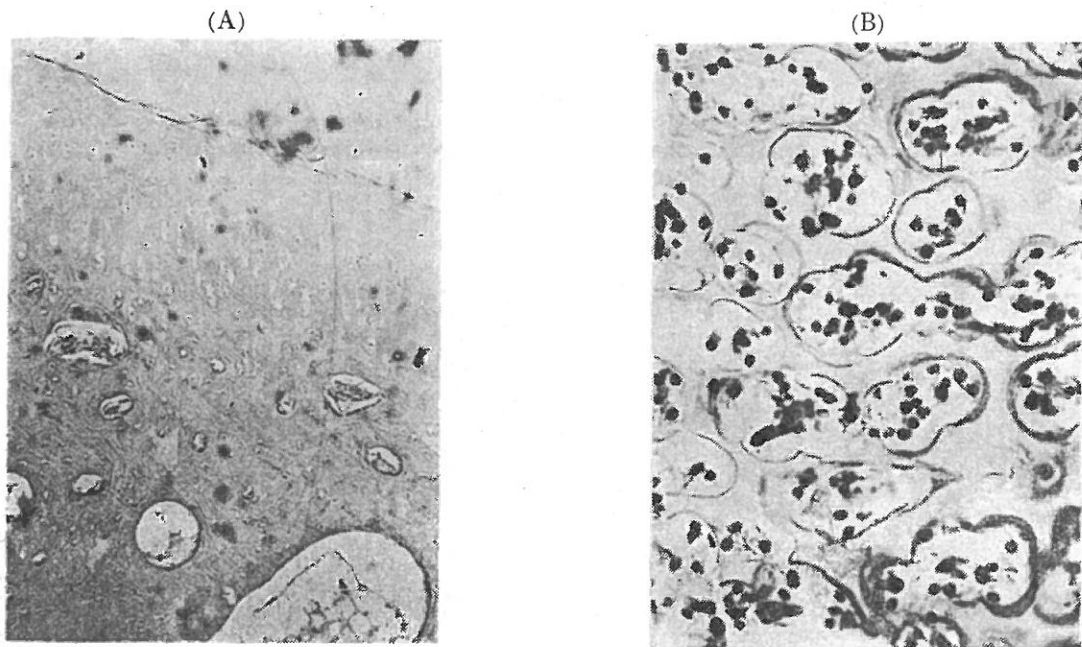


Fig. 4. There is a moderate fibrillation-fraying of the cartilage surface, ulceration at the pariphery, fibrillary appearance of matrix from tangential zone to upper radial zone. Also there is nuclear degeneration and empty lacuna (Hematoxylin-eosin stain: one month after 5 successive intra-articular injection at daily interval $\times 100$ (A), $\times 450$ (B)).