

자기 배양 골모세포를 이용한 임상 적용례 - 증례 보고 -

김석중* · 옥인영 · 장정호** · 김용식 · 장재덕** · 박원종* · 이주형

가톨릭대학교 의과대학 의정부 성모병원 정형외과*, 강남성모병원 정형외과, 셀론택**

골절 3례와 1례의 대퇴 골두 무혈성 괴사를 자기 배양 골모세포 주입술을 이용하여 치료하였다. 환자의 장골능에서 골수를 채취하여, 여기서 세포를 분리해 낸 후 약 4주간 배양하여 이를 골이식이 필요한 부위에 주입하였다. 골절 부위는 우측 척골 간부, 좌측 요골 간부, 좌측 제 5중 족골 기저부였다. 대퇴 골두 무혈성 괴사는 양측성이었으며, 양측의 병기는 Ficat 2기였다. 골절의 경우 자기 배양 골모세포 주입 후 1주 뒤에 가골 형성의 소견을 보였으며 4주 뒤에는 현저한 가골 형성의 소견을 보였다. 대퇴 골두 무혈성 괴사의 경우, 좌측은 중심부 감압술 후 동종골 이식을 시행하였고, 우측은 중심부 감압술 후 4주 뒤에 경피적으로 자기 배양 골모세포 주입술을 시행하였다. 1년 추시 CT 검사 상 우측은 중심부 감압술 부위의 골의 재형성 소견 및 골두의 형태가 잘 유지되는 것이 관찰되었고, 좌측은 이식골의 흡수 소견을 보였다.

색인 단어: 자기 배양 골모세포 주입술, 대퇴 골두 무혈성 괴사, 골절

Clinical Applications of Autologous Cultured Osteoblasts - Case Report -

Seok-Jung Kim, M.D.*, In-Young Ok, M.D., Cheong-Ho Chang, M.D.** , Young-Sik Kim, M.D.,
Jae-Deog Jang, Ph.D.** , Won-Jong Bahk, M.D.* , Joo-Hyung Lee, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Uijongbu St. Mary's Hospital*, Kang-Nam St. Mary's Hospital,
The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul; Central Research Institute, Cellontech**, Seoul, Korea

We treated 3 cases of fracture and 1 case of avascular necrosis of femoral head using autologous cultured osteoblasts injection. The stromal cells from the bone marrow were cultured to differentiate to osteoblasts for 4 weeks. The fracture sites of each patients were right ulnar shaft, left radial shaft, and left 5th metatarsal base. All of the fractures showed callus formations after 1 week of osteoblasts injection to the fracture site. After 4 weeks, callus formations were progressed. Avascular necrosis of femoral head was bilateral and both were Ficat stage II. Core decompression and allograft impaction were performed to the left, and core decompression and autologous cultured osteoblasts injection percutaneously after 4 weeks of the decompression operation were done to the right femoral head. CT images of 1 year from the operations showed trabecular bone formation and well maintained femoral head contour of the right femur, but resorption of the grafted bone for the left.

Key Words: Autologous cultured osteoblasts injection, Avascular necrosis of femoral head, Fracture

서 론

골절 및 골 질환에 대한 치료의 궁극적 목표는 병변 부위의 기능 및 외관을 가능한 한 정상에 가깝게 회복시켜, 조기에 본래의 생활로 복귀시키는데 있으며, 골절 및 골 질환에

대한 다양한 치료 방법은 환자의 연령, 전신상태, 손상 정도 등에 따라 결정된다. 그러나 비 수술적 방법을 사용하건 수술적 방법을 사용하건 간에 환자가 이전의 상태로 회복하는데는 많은 시간이 걸리고, 이는 환자에게 경제적 손실과 전신상태의 악화를 가져올 수 있다. 따라서 치료의 기간을 단축시키고, 치료의 결과를 향상시키며 수술로 인한 합병증을

통신저자 : 김 석 중

경기도 의정부시 금오동 65-1,
가톨릭대학교 의정부성모병원 정형외과
Tel : 031-820-3066 · Fax : 031-847-3671
E-mail : peter@catholic.ac.kr

Address reprint requests to : Seok-Jung Kim, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Uijongbu St. Mary's hospital, The Catholic University of Korea, 65-1, Kumoh-dong, Uijongbu 480-130, Korea. Tel : +82.31-820-3066 · Fax : +82.31-847-3671
E-mail : peter@catholic.ac.kr

*본 논문의 요지는 2002년 10월 골절 학회 추계학술대회에서 구연되었음.



Fig. 1. Anteroposterior radiographs of the left 5th metatarsal base shows progression of fracture healing.
(A) After 3 month of non-operative treatment, fracture healing does not occurred.
(B) Radiograph of 1 week of osteoblasts injection shows callus formation.
(C) Radiograph of 4 weeks of osteoblasts injection shows progression of callus formation.

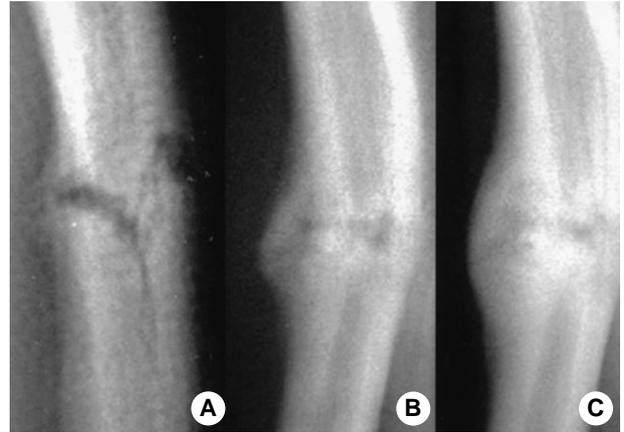


Fig. 2. Radiographs of the right ulnar shaft shows progression of fracture healing.
(A) After 10 weeks of non-operative treatment, inadequate callus formation shows.
(B) Radiograph of 1 week of osteoblasts injection shows callus formation.
(C) Radiograph of 4 weeks of osteoblasts injection shows progression of callus formation.

줄이기 위한 시도가 계속 되고 있다. 이에 골절 및 대퇴 골 두 무혈성 괴사를 자기 배양 골모세포를 이식하여 치료하였기에 이를 보고하고자 한다.

증 례

증 례 1

21세 남자로 좌측 제 5중족골 기저부의 골절에 대해서 6주간의 석고 고정과 이후 정기적인 방사선 검사를 시행하여 골 유합의 여부를 확인하였다. 3개월이 지난 후에도 골절 부위의 유합이 이루어지지 않아 골반의 장골에서 골수를 채취하여 이를 골모세포로 배양한 후 약 6,000,000개의 골모세포를 골절 부위에 주입하였다. 술 후 1주 뒤에 골절 부위에 가골 형성이 관찰되었으며 술 후 4주에는 완전 유합 소견을 보였다 (Fig. 1).

증 례 2

20세 남자로 럭비 경기 중 수상 당하여 우측 전완부 척골 골절이 발생하였다. 석고 부목 고정으로 치료하였으나 골절 유합의 진행이 느려, 수상 10주에 증례 1과 같은 방법으로 배양한 약 12,000,000개의 자기 배양 골모세포를 골절 부위에 주입하였다. 이식 4주 후 방사선 검사 상 골절 유합의 현저한 진행 소견을 보였다 (Fig. 2).

증 례 3

28세 남자로 축구 경기 중 수상 당하여 좌측 요골 간부에

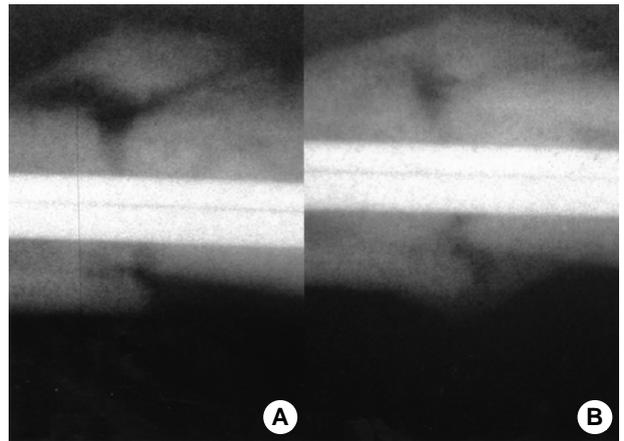


Fig. 3. Radiographs of the left radial shaft shows progression of fracture healing.
(A) After 10 weeks of operative treatment, no definite callus formation shows.
(B) Radiograph of 4 weeks of osteoblasts injection shows callus formation.

골절이 발생하였다. 수술 후 10주 방사선 사진에서 가골 형성이 관찰되지 않아 약 8,000,000개의 자기 배양 골모세포를 골절 부위에 주입하였다. 이식 4주 후 방사선 검사 상 현저한 가골 형성이 관찰되었다 (Fig. 3).

증 례 4

30세 남자로 양측 고관절 통을 주소로 내원하였으며, Ficat II기의 양측 대퇴 골두 무혈성 괴사로 진단되었다 (Fig. 4).

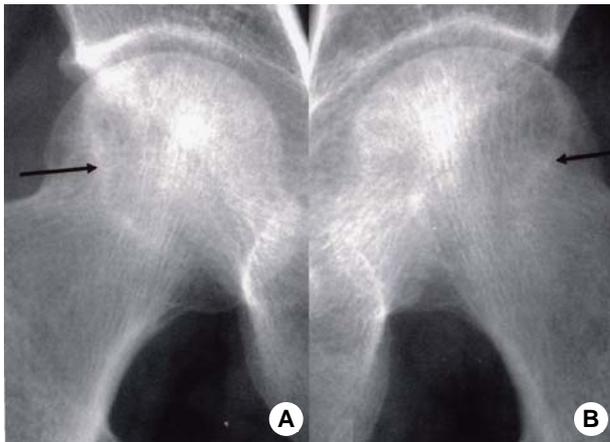


Fig. 4. Anteroposterior radiographs of the both femoral head show round cystic change with sclerotic rim (arrows) and no femoral head flattening in right (A) and left (B) femoral heads.

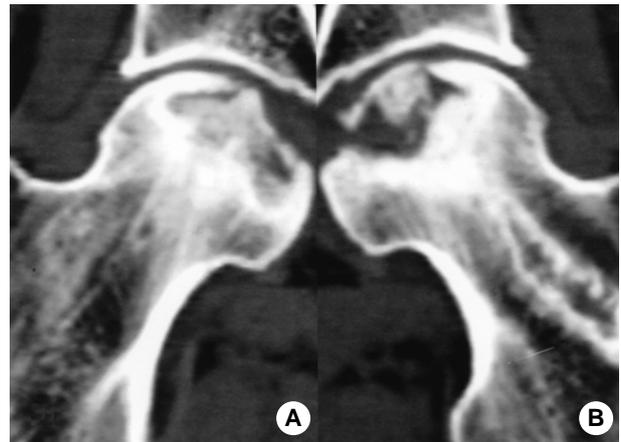


Fig. 6. CT images of both femoral head after 1 year from the operation shows trabecular bone formation of weight bearing portion of right femoral head (A), but resorption of grafted bone and no supportable bone formation in the necrotic area of left femoral head (B).

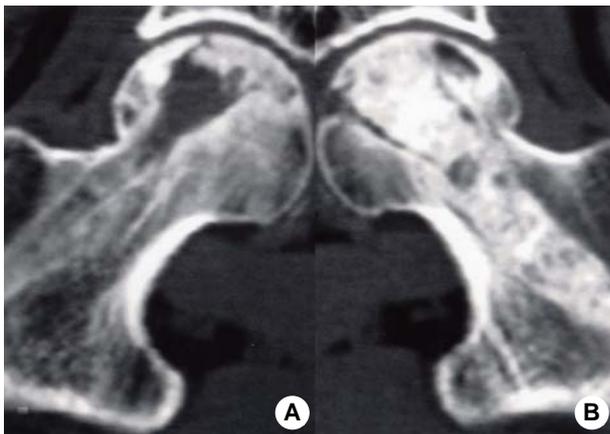


Fig. 5. Post operative CT image of both femoral head show core decompression sites of both femoral head (A, B) and allograft impaction of left femoral head (B).

좌측 대퇴 골두는 중심부 감압술 후 동종골 이식을 시행하였고 우측은 중심부 감압술 후 4주 뒤에 경피적으로 자기 배양 골모세포 주입술을 시행하였다 (Fig. 5). 술 후 1년 추시 CT 검사 상 우측은 괴사 부위의 골의 재형성조건 및 골두의 형태가 잘 유지되는 것이 관찰되었고, 좌측은 이식골의 흡수 및 질환의 진행 소견을 보였다 (Fig. 6).

골수의 채취 및 골모세포 배양

환자의 장골 능에서 골수를 채취하고 이때 추가로 얻어지는 골편을 함께 30 ml의 10% FBS - aMEM 배양액 (M-0644, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)과 350 unit의 heparin이 든 용기에 넣어 실험실로 옮겼다. 이를 조심스럽게 흔들어 섞은 후 큰 골편은 제거하고, 4°C에서 3,000 rpm으로

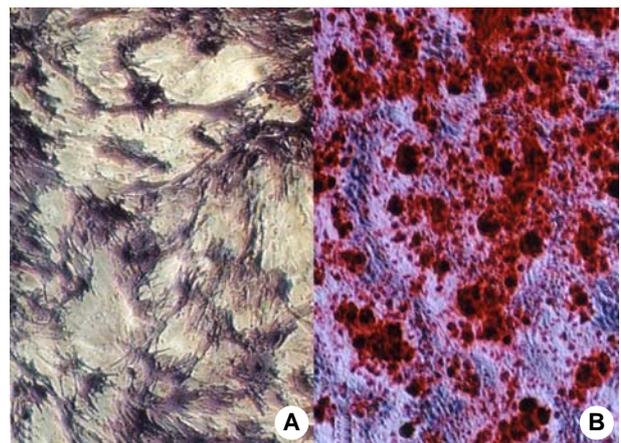


Fig. 7. (A) Alkaline phosphatase is highly positive and stained dark brown in NBT-BCIP stain at 2 weeks of culture. (B) Calcium is highly positive and stained dark red in Alizarin red stain after 4 weeks of culture.

10분간 원심분리를 하였고 (RT6000B, Refrigerated Centrifuge, DuPONT Company, Newtown, CT, USA), 골편은 collagenase를 24시간 처리한 후 원심분리를 하여 상층액을 제거하고 남은 침전물에 20 ml의 배양액을 첨가하여, 여과기 (No 2350, Falcon, Franklin lakes, NJ, USA)를 이용하여 여과시킨 후 이를 배양 용기 (No 25020, Corning, NY, USA)에 10 ml씩 담아서 배양을 시작하였으며 배양기 (Model 3194, Automatic CO₂ Incubator, Forma Scientific Inc, Ohio, USA)는 37°C, 5% CO₂ 환경으로 유지하였다. 다음날부터 3일에 한번씩 L-ascorbic acid (A-4544, Sigma Chemical Company) 50 µg을 첨가하여 세포들이 골모세포 (osteoblast)로 분화토록 하였다. 광학 현미경으

로 세포의 배양 정도를 평가하면서, 배양 5일째에 배양액을 교환하여 주었고, 이후부터는 3일마다 배양액 교환 후에 L-ascorbic acid를 첨가하였다. 배양 14일째 alkaline phosphatase 활성을 확인하는 NBT-BCIP 염색 (Fig. 7A)을 시행하였고, 배양 28일이 지난 후 세포 기질 내에 새로이 형성된 칼슘을 확인하는 Alizarin red 염색 (Fig. 7B)을 하여 주로 골모세포들이 배양되었음을 확인하였다. 배양 26일째에 배양액을 제거한 후 trypsin-ETDA (No 25200-056, Gibco BRL, Gettysburg, USA) 5 ml로 씻어 냈으며 다시 trypsin-ETDA 3 ml를 첨가하여 배양기에 5분간 두었다. 배양액 3 ml를 가하여 trypsin-ETDA의 활성을 멈추게 한 뒤 배양 용기내의 모든 내용물을 원추 용기에 모았으며, 이를 4°C에서 1,500 rpm으로 6분간 원심분리를 한 후, 상층액을 제거하고 나머지를 모아 12,000,000/ml가 되게 한 후 이를 이식에 이용하였다.

골모세포 이식

골수를 채취하고 이를 약 4주 간 배양한 후 골절 부위와 미리 중심부 감압술을 시행하고, 만들어진 공간에 방사선 영상기기를 이용하여 spinal needle을 찔러 넣었다. 골절의 경우 약 6,000,000개에서 12,000,000개의 골모세포를 배양액과 함께 주사기에 담은 후, spinal needle에 연결하여 서서히 주입하였으며, 대퇴 골두 무혈성 괴사의 경우 24,000,000개의 세포를 주입하였다.

고 찰

실험적으로 골수 기질 세포는 주변 조직의 환경에 따라 골모세포, 연골모세포, 섬유모세포 또는 지방세포 등으로 분화할 수 있는 능력을 갖고 있다고 알려져 있다^{2,9,11}). 그러나 골수 기질 세포는 골수 내 수효가 극히 적어, 이를 이용하기 위해서는 세포 배양이 필수적이며^{4,5}), 이러한 잠재적 분화 능력을 가진 골수 기질 세포가 대량 증폭되어 골절 부위나 골형성이 요구되는 부위에 이식될 경우, 치유에 도움을 줄 수 있을 것이라는 예상이 가능하다¹⁵). 배양된 자가 세포를 골이식 대신에 사용할 경우에는, 일반적인 자가 골이식 (autograft)시 생길 수 있는 공여 부위의 문제점 (donor site morbidity)^{1,10,12,14})과 동종골이식 (allograft)시 생길 수 있는 면역학적 문제점, 이식물의 이완 (implant loosening)과 같은 문제점^{6,8})들이 해결될 수 있으며, 따라서 자연스러운 재생을 유도할 수 있다⁸). 그러나 이러한 세포의 기원과 형태학적 특징들에 대한 정보나 골형성과 재형성을 조절하는 요인들에 대한 지식은 제한되어 있다^{2,3,13}). 또한 효과를 얻기 위해 필요한 세포 수, 배양법, 시술법 등에 대한 많은 임상적인 시도와 연구를 통해 효과적인 치료의 방법에 대한 어느 정도의 공통된 인식이 필요하다. 본 증례에서는 이식에 필요한 세포 수를

결정하는데 있어 기존의 자료를 통해 가설을 세웠는데, 새로 형성되는 골조직은 해면골 조직에 가깝고 이러한 골조직에 포함되는 뼈세포의 수는 Vashishth 등에 의해, 뼈세포가 골조직에 균등하게 분포한다고 가정하고 부피단위로 환산하면 뼈 1 cm³당 약 4.07×10⁵개의 뼈세포가 존재하는 것으로 계산이 된다¹⁶). 따라서 1200만개의 골모세포가 형성할 수 있는 뼈의 이론적인 부피량은 약 30 cm³이 된다. 이는 대퇴골 골두의 약 절반의 용적에 해당하며⁶), 50% 정도가 재형성으로 흡수된다 하더라도, 나머지 괴사부위를 채우는데 충분한 양이 되며 본 증례의 골절 부위의 경우는 그 크기가 훨씬 작아서 무혈성 괴사에 사용된 골모세포의 절반 이하의 수를 이식하여도 원하는 부분의 골형성을 얻을 수 있다⁷). 그러나 이는 어디까지나 이론적인 수치일 뿐, 이를 뒷받침 하기 위해서는 많은 시도가 필요하다. 본 증례에서는 골절의 치유가 지연되는 경우에 시도하여 만족할 만한 가골의 형성을 예상보다 빨리 얻을 수 있었다. 이러한 이유는 자가골이나 동종골을 이식하는 경우에는 이식을 위한 수술시, 주변의 혈액 공급에 장애를 가져올 수 있고 또한 골 유합을 위해서 이식골이 흡수되고 재형성되는 과정을 거쳐야 하지만, 골모세포만을 이식하는 경우에는 이러한 과정을 거치지 않고 골모세포에 의해 형성된 미성숙 골조직이 쉽게 주변의 조직과 연계되기 때문으로 생각된다. 골절의 유합을 위해서 자가골 이식은 가장 빠르고 효과적인 방법임에는 틀림이 없지만, 수술로 인한 공여 부위의 통증과 이식골의 양적인 제한점, 그리고 이식을 위해 추가의 수술이 필요하다는 점들을 고려한다면, 골 유합의 효과를 낼 수 있는 골모세포 이식술은 이러한 자가골 이식술의 대안이 될 수 있다고 생각된다. 대퇴 골두 무혈성 괴사의 증례에서는 수술 후 환자의 임상 증상에는 아직 별다른 차이가 없었지만, 중심부 감압술 후 동종골의 이식술을 시행한 부분은 이식골이 거의 흡수되어 추후에 대퇴 골두가 함몰될 수 있는 위험성을 보이고 있으며, 중심부 감압술 후 자기 배양 골모세포를 이식한 부분은 감압술을 시행한 부위에 약간의 골소주의 형성이 보이고 있어 동종골 이식술에 비해서 비교적 좋은 경과를 밝을 것으로 기대된다. 자기 배양 골모세포 이식술의 임상적 적용을 위해서 해결해야 할 많은 의문점들이 있지만 이러한 시도는 골절 및 골 질환에 대해 앞으로 요구되는 효과적이고도 자연스러운 치료법의 발전에 기여를 할 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- 1) Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L and Holtom P: Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg*, **84-A**: 716-720, 2002.

- 2) **Ashton BA, Allen TD, Howlet CR, Eaglesom CC, Hatori A and Maureen Owen:** Formation of Bone and Cartilage by Marrow Stromal Cells in Diffusion Chambers In Vivo. *Clin Orthop*, **151**: 294-307, 1980.
 - 3) **Bruder SP, Fink DJ and Caplan AI:** Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*, **56**: 283-294, 1994.
 - 4) **Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH and Kadiyala S:** Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop*, **355**: 247-256, 1998.
 - 5) **Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N and Kadiyala S:** Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, **16**: 155-162, 1998.
 - 6) **Hauser DL, Pierre MA and Snyder BD:** Bilateral variation of bone structure of the femur in normal adults measured by ex-vivo orthogonal radiography, DEXA, and QCT, 47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, February 25-28, 2001.
 - 7) **Kim KW, Ha KY, Moon MS, Kim YS, Kwon SY and Woo YK:** Volumetric change of the graft bone after intertransverse fusion. *Spine*, **24**: 428-433, 1999.
 - 8) **Liu J, Wang Z, Hu Y, et al:** Complications of massive allografts after segmental resection of malignant bone tumors. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, **38**: 332-335, 2000.
 - 9) **Lu X, Li S and Cheng J:** Bone marrow mesenchymal stem cells: progress in bone/cartilage defect repair. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, **19**: 135-139, 2002.
 - 10) **Novakovic M, Panajotovic L, Kozarski J, Piscevic B and Stepic N:** Complications in the use of vascularized fibular grafts: classification and treatment. *Acta Chi*, **48**: 19-23, 2001.
 - 11) **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al:** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**: 143-147, 1999.
 - 12) **Robertson PA and Wray AC:** Natural history of posterior iliac crest bone graft donation for spinal surgery. *Spine*, **26**: 1473-1476, 2001.
 - 13) **Schneider U:** Autogenous bone cell transplantation. *Orthopaed*, **27**: 143-146, 1998.
 - 14) **Skaggs DL, Samuelson MA, Hale JM, Kay RM and Tolo VT:** Complications of posterior iliac crest bone grafting in spine surgery in children. *Spine*, **25**: 2400-2402, 2000.
 - 15) **Song S, Zhu S and Sun C:** Treatment of avascular necrosis of femoral head by periosteal cell transplantation: an experimental study. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **78**: 52-55, 1998.
 - 16) **Vashishth D, Gibson G, Kimura J, Shcaffler MB and Fyhrie DP:** determination of bone volume by osteocyte population. *The Anatomical Record*, **267**: 292-295, 2002.
-