

수축된 콜라겐 격자와 배양된 각질형성세포를 이용한 피부 대용물질의 제조에 관한 연구

박재경* · 조금철 · 박호철

=Abstract=

Preparation of Living Skin Equivalent by using the Contracted Collagen Lattice and Cultured Human Keratinocytes

Jae Kyung Park*, Keum Chul Cho, Ho Chul Park

An experimental study was performed for the preparation of living skin-equivalent by the using collagen gel contraction with human fibroblasts as neodermis and cultured human keratinocytes as neodermis.

The results were as follows;

- 1) The rate of collagen gel contraction was dependent on the number of fibroblasts into the lattice and collagen contraction was progressed according to the increment of the number of the cells.
- 2) The rate of collagen gel contraction was progressed according to the decrement of the contraction of the collagen.
- 3) The rate of gel contraction was progressed according to the increment of serum concentration in the fixed concentration of the fibroblasts and collagen.
- 4) The lattice contraction was decreased according to the increment of the population doublings of the fibroblasts.
- 5) Macroscopically, the artificial dermis was gray white in color and tissue-like consistency and elasticity.
- 6) Microscopically, three dimensionally contracted artificial dermis showed more dense fibroblasts and its newly formed collagen fibrils in the matrix than one dimensionally contracted one.
- 7) Finally prepared skin-equivalent showed good attachment of living stratified keratinocytes to the dermal equivalent microscopically.

It has been proposed that newly formed skin-equivalent is suitable for the graft of extensively and deeply burned patients. Shortening of the manufacturing period of skin-equivalent and development of conservation technique as a readily usable state are to be solved for our ongoing works.

〈접수 : 1993년 1월 26일〉

경희대학교 의과대학 부속병원 면역학연구소*, 의과학교실

Laboratory of Immunology*, Department of General Surgery, Kyung Hee University Hospital

1. 서 론

인간의 피부는 그 해부학적 복잡성과 다양한 생리적 기능때문에 어떠한 인공적 대용물이라도 생체에서 완전한 피부와 같은 역할을 대신할 수는 없다. 그러나 화상등으로 인하여 광범위한 피부 결손이 있을 때 자가피부이식으로는 충분히 결손 부위를 치료할 수가 없는 경우를 경험할 수 있는데, 현대와 같이 신체 전 장기의 이식이 가능해진 시점에서 인체에서 가장 큰 장기라고 할 수 있는 피부의 동종이식은 다른 장기의 이식에 비해서 그 발전 속도가 느린 상태이다. 그러나 1970년대 초반부터 뜻있는 연구자들에 의해 위의 문제점들을 해결하기 위한 연구들이 진행되어 왔다. 우선 일시적으로 결손부위를 보호할 수 있는 인조피부가 연구되었고^{6,28)}, 한편으로 각질형성세포의 배양으로 표피층을 대신할 수 있는 표피화조직을 환자에게 성공적으로 이식한 예들이 있었고^{17,20,23)} 국내에서도 Park등²⁴⁾에 의해 최초로 각질형성세포의 배양이 성공적으로 이루어져서 배양된 표피화 조직을 일부의 화상 환자에게 자가 및 동종이식을 시행한 바가 있다. 또한 최근에 와서는 영구적으로 진피의 역할을 대신 할수있는 콜라겐 합성물질과 그 상층부에 배양된 표피대용물을 결합시킨 인조피부도 임상에 이용되는 단계에 이르렀다⁵⁾. 왜냐 하면 단순히 표피층만을 결손 부위에 이식하는 것은 다음과 같은 이유들로 해서 그 결과가 만족스럽지 못하기 때문이다. 즉(1)지속적인 창상수축 (2)심한 비대반흔의 형성 (3) 이식된 표피층 아래에서의 심한 육아조직의 형성등이다⁴⁾. 따라서 임상에서 실제 가장 최소한의 두께로 피부이식(minimum split thickness skin graft)을 하더라도 진피의 일부분을 반드시 포함시켜야 하는 것이다. 이러한 이유로 저자들은 표피층만의 이식에 따르는 단점을 해소하고 생체에 이식될때 거부되지 않는 영구적인 인조피부를 제조하기 위하여 본 연구를 진행하였다.

콜라겐 겔을 이용한 인공적인 진피의 제조 과정에서 섬유아세포의 숫자와 세포 분열횟수, 콜라겐의 농도, 혈청의 농도 변화에 따른 콜라겐 겔의 수축 정도를 관찰하여 가장 적절한 두께의 인조진피를 만들고 그 상층부에 각질형성세포(kerati-

nocyte)의 배양으로 형성된 표피화조직을 결합시켜 현미경적 소견을 관찰하고 이식적합성 여부를 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 섬유아세포의 배양

섬유아세포는 신생아의 포피(foreskin)로 부터 채취하여 체외이식법(explantation)에 의해 배양하였다²¹⁾. 무균적으로 full thickness로 태취된 포피는 안과용 가위를 이용하여 1mm의 크기로 잘게 자른 후에 이들 조직편을 배양접시위에 고정시키고 10% fetal calf serum[FCS, CSL]이 함유된 Dulbecos modified Eagle's medium[DMEM, Gibco]을 가하여 37°C 5% CO₂ 배양기[Incubator, National]에서 매 3일 마다 배양액을 교체하면서 full monolayer를 형성할 때까지 연속 배양하였다. 섬유아세포의 full monolayer가 형성되면 physiologic balanced salt solution[PBS, pH 7.4]으로 2-3회 세척한 다음 0.025%-0.01% Trypsin-EDTA[Sigma]용액으로 처리하여 낱개의 섬유아세포를 유리시킨 후 재배양(subculture)를 하였다.

2.2 각질형성세포의 배양

각질형성세포의 증식 및 성숙배양은 Park²⁴⁾의 방법에 준하여 시행하였다. 이를 약술하면 채취된 피부편을 Trpsin-EDTA 용액으로 처리후 세포간 결합이 약해지면 표피와 진피를 분리하고 다시 낱개의 각질형성세포로 분리한 다음 각질형성세포 증식용 배양액인 MCDB 153 medium[Hazleton Bilogicals]에 Epidermal growth factor[EGF, Collaborative Research], 5ug/ml; Insulin[Sigma Chemicals], 5 × 10⁻⁷ M; Ethanolamine[Sigma Chemicals], 0.1 mM; Phosphoethaloamine[Sigma Chemicals], 0.1mM; Bovine pituitary extract, 34ug/ml가 함유된 용액속에 5 × 10⁴/ml의 농도로 부유시켜 75cm 배양 접시내에 10ml씩 넣고 37°C CO₂ 배양기내에서 배양시켰으며 각질형성 세포가 full monolayer를 형성하면 0.025%-0.01%의 Trpsin-EDTA용액으로 처리하여 다시 낱개의 각질형성세포로 유리시켰으며 이 세포들을 일차배양시와 같은 방법으로 이차배양하였다. 일, 이차배양으로 다시 각질형성세포의 full monolayer가 형성되면 배양액을 10% FCS가 함유

된 DMEM 배양액으로 교체하여 성층(stratification)을 유도하였다. 피부의 채취로 부터 성층이 완전히 이루어 지기 까지는 20-21일이 소요되었다.

2.3 콜라겐 용액의 제조

인조진피의 제조에 사용할 콜라겐은 예비실험에는 실험실에서 사육하고 있는 Sprague-Dowley 쥐의 꼬리 tendon에서 type I의 콜라겐을 추출하여 사용하였다. 즉 5마리의 쥐 꼬리를 채취하여 75% ethanol에 20분간 담구어 소독한 후 무균적 조작으로 피부를 절개하여 벗겨낸 다음 tendon sheath를 채취하여 분쇄기로 잘게 부수고 여기에 1L의 0.1N acetic acid를 넣고 4°C에서 교반시키면서 48시간 동안 방치하였다. 그후 이용액을 15,000 rpm에서 2시간 원심침전[J₂-21, Beckman]시킨 후 그 상청액을 수확하였다. 이렇게 덜 정제된 콜라겐 용액(crude collagen)은 사용시까지 냉암소에 보관하였다.

본실험에서는 냉동동결건조(lyophilization)된 상품[Collagen, ICN Biochemicals,; Cellegen, Koken CO.]을 구입하여 예비실험과 같은 방법으로 정제된 콜라겐 용액을 제조하여 사용하였다.

2.4 인조진피의 제조

(1) 삼차원수축(three dimensional contraction) 인조진피의 제조

콜라겐 용액의 최종 부피가 100ml이 되도록 하기 위하여 10배 농축시킨 DMEM배지 10ml와 100배 농축시킨 HEPES 완충액 1ml, 50배 농축시킨 Streptomycin-Penicillin용액 1ml, 3mg/ml의 농도의 정제된 콜라겐 용액 57ml을 얼음물 속에서 혼합시킨 후 1N NaOH용액으로 PH를 7.2-7.4로 조정하였고 이에 10% FCS 10ml을 첨가한 다음 증류수를 가하여 전체 용액의 최종 부피가 100ml가 되도록 하였다. 여기에 왕성하게 증식중인 섬유아세포를 ml당 $1.0 \times 10^5 - 5.0 \times 10^5$ 의 농도가 되도록 부유시킨 다음 신속히 직경 60mm의 배양접시에 5ml씩 분주하여 37°C 5% CO₂ 배양기내에서 6-8일간 배양하면서 콜라겐을 수축시켰다. 또 콜라겐의 수축에 영향을 미치는 인자들을 알아 보기 위해서 콜라겐의 농도가 일정할때 섬유아세포 수의 변화에 따른 수축 정도와 섬유아세포의 수를 일정하게 한

상태에서 콜라겐의 농도를 달리했을때, 혈청 농도를 달리 하였을때, 콜라겐 용액속의 섬유아세포 분열횟수를 각각 달리하였을때 수축의 정도가 어떻게 변화하는 지를 관찰하였다.

(2) 일차원수축(one dimensional contraction) 인조진피의 제조

일차원 수축 인조진피의 제조는 삼차원 수축 인조진피의 제조 방법과 동일하나 단지 배양접시에 미리 섬유아세포를 단층 배열시킨 뒤 콜라겐 용액을 분주하여 수축시켰다. 즉 인조진피를 제조하기 1주일 전에 직경 60mm의 배양접시 당 2.0×10^5 개의 섬유아세포를 넣고 10% FCS가 함유된 DMEM 배지로 배양액을 교체하면서 1주일간 배양함으로 섬유아세포가 미리 단층 배열되도록하여 콜라겐의 수축이 한 방향으로만 일어 나도록 하였다.

2.5 피부대용물의 제조(preparation of skin equivalent)

각질형성세포의 일, 이차 배양 및 성층배양으로 표피화조직편이 형성된 배양접시를 physiologic balanced solution으로 2회 세척한 다음 4unit/ml의 neutral protease[Grade II, Boeringer Mannheim, Indianapolis, Indiana, USA]용액으로 처리하여 배양접시에서 표피화조직편을 손상없이 떼어내서 nylon mesh위에 기저세포층이 위로 향하도록 고정시킨 다음 이를 배양액이 완전히 제거된 인조진피위에 기저세포층이 밀착되도록 결합시켜서 37°C 5% CO₂ 배양기내에서 1시간 방치하였다.

1시간후 표피화조직편이 인조진피위에 고정된 것이 확인되면 nylon mesh를 제거하고 10% FCS가 함유된 DMEM배양액을 조심스럽게 가하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 2-3일간 배양시켜 피부대용물질 즉 인조피부를 제조하였다.

2.6 인조진피 및 피부대용물질의 조직학적 검사

시험관내에서 형성된 인조 진피 및 피부대용물질 중 일부를 잘라내어 10%의 formalin용액에 고정시키고 1주일 뒤 8um 두께로 cutting하여 Hematoxylin-Eosin염색 및 Masson-Trichrome염색을 하고 조직학적 소견을 관찰하였다. 인조진피내에서 생활력이 있는 섬유아세포가 1 high power field당 10개 이상 관찰되고 섬유아세포의 주위에 새로이 형성된 콜라겐 섬유들이 보이면 이식이 가능한 상태로 판정

하였으며 피부대용물질은 전술한 상태의 인조진피 위에 생활력이 있는 각질화세포층이 잘 결합되어 있으면 이식이 가능한 상태로 판정하였다.

3. 결 과

3.1 섬유아세포의 수에 따른 콜라겐 겔의 삼차원적 수축

섬유아세포의 수에 따른 콜라겐 겔의 수축은 Table 1 및 Fig.1과 같이 세포수가 증가함에 따라 비례하여 수축이 더 많이 진행되었고, 배양 3일째 부터는 수축이 더이상 진행되지 않았다. 배양 3일째에 섬유아세포의 수에 따른 수축의 정도는 1×10^5 /ml, 2.5×10^5 /ml 및 5×10^5 /ml의 세포 농도에서 직경이 각각 22mm, 15mm 및 12mm로 수축하여 대조군 대비 58.49% 와 71.69% 및 77.35% 수축현상을 보였다. 반면 섬유아세포가 전혀 함유되지 않은 콜라겐 겔에서는 전혀 수축이 진행되지 않았다. 또한 흥미로운 결과는 Fig.1 과 같이 콜라겐의 농도가 600ug/ml로 낮을 때에는 세포수의 차이에 관계없이 배양 3일 이후 부터는 수축의 정도가 모두 비슷하였다.

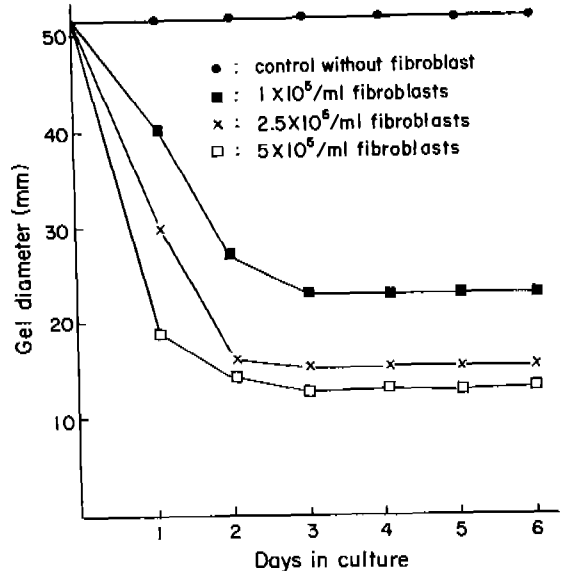


Fig. 1 Collagen gel contraction rate by the number of fibroblast Collagen concentration was fixed to 1, 200ug/ml

Table 1 Gollagen Gel Contraction Rate by the Number of Fiborblast

Days	Gel diameter ; mm(Gel contraction ;%)					
	1	2	3	4	5	6
Number of cells						
0 (control)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)
1×10^5	40(24.53)2.	26(50.94)	22(58.49)	22(58.49)	22(59.49)	21(60.38)
2.5×10^5	30(43.40)	16(69.81)	15(71.70)	15(71.70)	15(71.70)	15(71.70)
5×10^5	19(64.45)	14(73.59)	12(77.36)	12(77.36)	12(77.36)	12(77.36)

* Collagen concentration was fixed to 1,200ug/ml

Table 2 Collagen Gel Contraction Rate by the Concentration of Collagen

Days	Gel diameter ; mm (Gel contraction rate ;%)					
	1	2	3	4	5	6
Collagen concentration (ug/ml)						
control(without fibroblast)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)
600	28(47.17)	16(69.81)	13(75.47)	13(75.47)	13(75.47)	13(75.47)
900	33(37.74)	21(60.38)	19(64.15)	19(64.15)	19(64.15)	19(64.15)
1,200	40(24.53)	26(50.94)	23(56.60)	23(56.60)	23(56.60)	23(56.60)
1,700	43(18.81)	34(35.85)	32(39.62)	31(41.51)	29(45.28)	28(47.17)

* Number of fibroblast was fixed to 1×10^5 /ml

3.2 콜라겐의 농도에 따른 겔의 삼차원적 수축

섬유아세포의 수를 1×10^5 /ml의 농도로 고정시킨 다음, 서로 다른 농도의 콜라겐(600ug/ml, 900ug/ml, 1,200ug/ml, 1,700ug/ml)으로 겔의 수축 정도를 실험한 결과는 Table 2 및 Fig.2와 같았다. 즉 콜라겐의 농도가 높을수록 수축은 반비례하여 수축 정도가 낮았는데, 배양 3일째의 각각의 콜라겐 농도에 따른 수축의 정도는 600ug/ml에서 13mm, 900ug/ml에서 19mm, 1,200ug/ml 및 1,

700ug/ml에서 각각 23mm 및 32mm로 수축하여 섬유아세포가 첨가되지 않은 대조군에 비해 각각 75.47%, 64.15%, 56.60% 및 39.62%로 반비례하여 수축하였다. 또한 600ug/ml-1,200ug/ml의 농도에서는 배양 3일째에 최대 수축하여 더 이상의 수축이 진행되지 않았으나, 1,700ug/ml의 농도에서는 배양 2일까지는 급격한 수축 현상을 보이다가 5일째까지는 수축이 서서히 진행되었으며 그 이후로는 수축이 더 이상 진행되지 않았다.

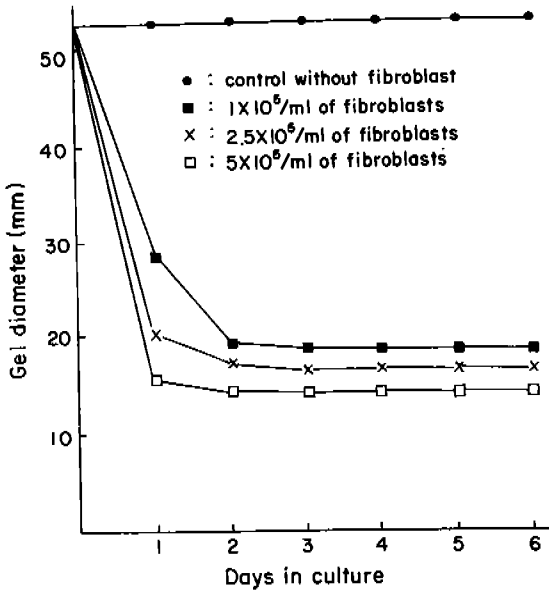


Fig. 2 Collagen gel contraction by the number of fibroblast. Collagen concentration was fixed to 600ug/ml

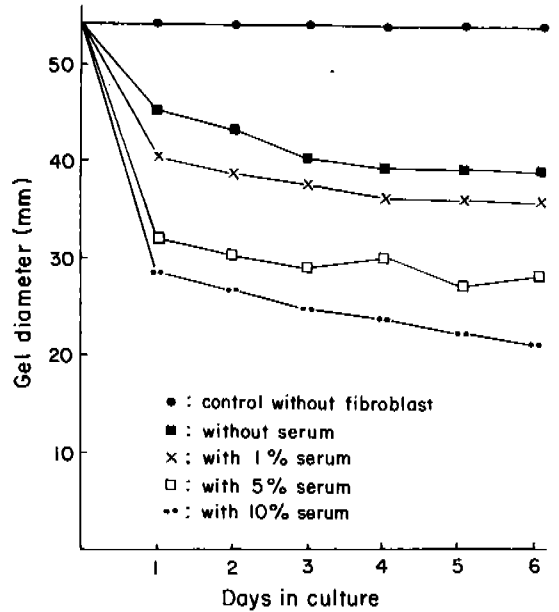


Fig. 3 Collagen gel contraction rate by the serum concentration. Collagen concentration was fixed to 1,700ug/ml and the number of fibroblast was fixed to 2.0×10^5 /ml

Table 3 Collagen Gel Contraction Rate by the Serum Concentration

Days	Gel diameter ; mm (Gel contraction rate ; %)					
	1	2	3	4	5	6
Serum concentration (%)						
control (without fibroblast)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)
0	44(16.98)	42(20.76)	40(24.53)	39(26.42)	39(26.42)	39(26.42)
1	40(24.53)	38(28.30)	37(30.19)	36(32.08)	36(32.08)	36(32.08)
5	32(39.62)	30(43.40)	29(45.28)	30(43.40)	26(50.94)	27(49.06)
10	29(45.28)	27(45.28)	25(52.83)	24(54.72)	22(58.49)	21(60.38)

* Collagen concentration was fixed to 1,700 ug/ml and the number of fibroblast was fixed to 2×10^5 /ml

3.3 혈청 농도에 따른 젤의 삼차원적 수축

섬유아세포를 2×10^5 /ml의 농도로 하고 콜라겐은 1,700ug/ml의 농도로 조정한 후 여기에 서로 다른 농도의 FCS(0%,1%,5% 및 10%)를 첨가하여 혈청 농도에 따른 콜라겐 젤의 수축정도를 측정하였다. Table 3 및 Fig.3과 같이 배양 6일째의 혈청이 첨가되지 않은 콜라겐 젤의 직경은 39mm로서 섬유아세포가 첨가되지 않은 대조군에 비해서 26.42

%의 수축 정도를 보였으나 15,5% 및 10%의 혈청이 첨가된 군에서는 직경이 각각 36mm, 27mm 및 21mm로서 대조군에 비해서 32.08%, 49.06% 및 60.38%가 줄어 혈청 농도에 비례하여 수축이 진행됨을 알 수 있었다.

3.4 섬유아세포의 세포분열횟수(population doublings; PDs)에 따른 콜라겐 젤의 삼차원적 수축

섬유아세포의 세포분열횟수의 증가가 콜라겐 젤의 수축에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Kuchler²¹⁾가 제시한 세포분열횟수 계산법에 따라($N = \log Y - \log X / \log 2$; $N = PDs$, $Y = \text{growth cycle}$ 이 끝난 후의 세포수, $X = \text{배양 시작시 투입한 세포수}$) 섬유아세포의 세포분열횟수를 측정하였으며 Fig.4에서와 같이 55회, 35회 및 15회 분열된 섬유아세포 군에서의 수축력은 차이가 없었으나 55회 분열된 섬유아세포 군에서는 수축력이 크게 저하되어 배양 6일째에서는 55회 분열군, 35회 분열군 및 15회 분열군의 콜라겐 젤의 직경이 각각 30mm, 17mm 및 15mm로 대조군에 비해 각각 43.40%, 67.93 및 71.70% 수축하였다.

3.5 일차 및 삼차원적 수축에 의한 인조진피의 육안적 소견

일차 및 삼차원적으로 수축된 인조진피는 회백색의 색상을 보였고 비교적 탄력성이 있었다. 특히 일차원적으로 수축된 인조진피는 반투명의 얇은 막 같았고 배양액 속에서 꺼낼 때 약간 안쪽으로 말려 드는 성질이 있었다. 삼차원적으로 수축된 인조진피는 불투명하며 보다 직경이 줄어 든 상태로 소 두께는 1-2mm였으며 말려 드는 성질은 없었다

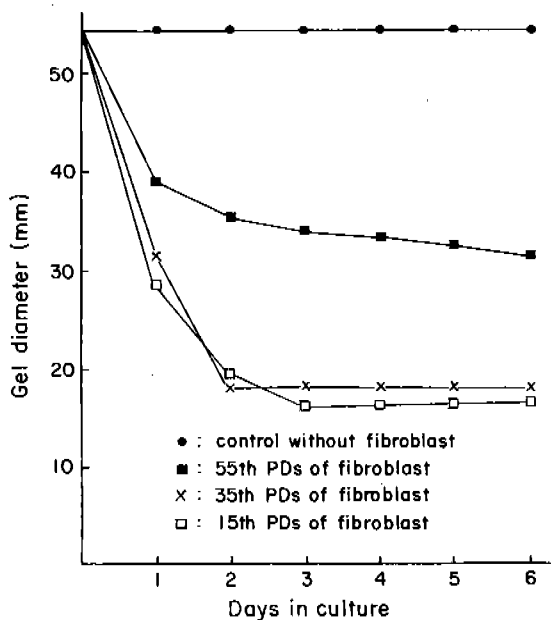


Fig. 4 Collagen gel contraction rate by the different population doublings (PDs) of fibroblast. Collagen concentration was fixed to 1,200ug/ml and the number of fibroblast was fixed to 2.0×10^5 /ml

Table 4 Collagen Gel Contraction Rate by the Different Population Doublings of Fibroblast

Days	Gel diameter ; mm (Gel contraction rate ; %)					
	1	2	3	4	5	6
No. of population doublings						
control (without fibroblast)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)	53(0)
55th	39(26.42)	35(33.96)	33(37.74)	32(39.62)	31(41.51)	30(43.40)
35th	31(41.51)	17(67.93)	17(67.93)	17(67.93)	17(67.93)	17(67.93)
15th	28(47.17)	19(64.15)	15(71.70)	15(71.70)	15(71.70)	15(71.70)

* Cell number was fixed to 2×10^5 /ml and collagen concentration was fixed to 1,200ug/ml

(Fig. 5).

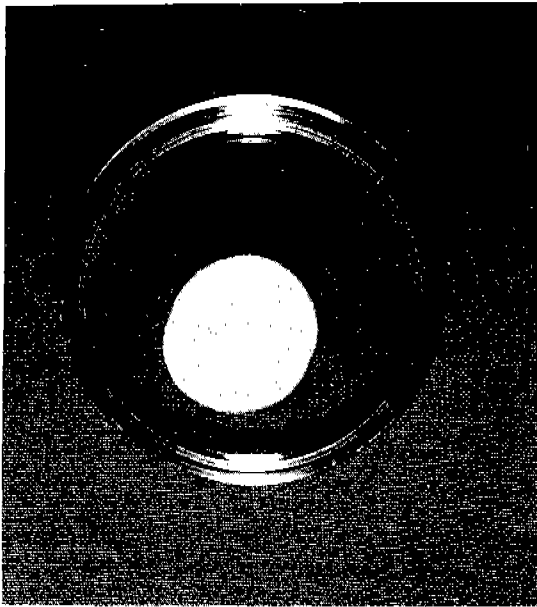


Fig. 5 Fully contracted collagen lattice showed gray white in color and tissue-like consistency and elasticity.

3.6 일차 및 삼차원적 수축에 의한 인조진피의 현미경적 소견

H-E염색 및 M-T염색으로 광학현미경하에서 관찰된 일차원적 수축 인조진피는 섬유아세포가 비교적 드물게 관찰되었고 콜라겐 섬유도 보다 미성숙한 상태였다. 그리고 한쪽 면에서 섬유아세포가 단층을 이루고 있었다(Fig. 6). 삼차원적으로 수축된 인조진피는 두께도 보다 두껍고 섬유아세포의 수도 더 많이 관찰되었으며 콜라겐 섬유도 훨씬 더 생성되어 뚜렷이 보였다(Fig. 7).

3.7 피부대용물질의 현미경적 소견

일차원적으로 수축시킨 인조진피의 상층부에 성층배양이 완료된 표피화 조직을 결합시켜 2-3일간 배양한 후 관찰한 피부대용물질의 현미경적 소견은 Fig.8과 같이 진피층에는 영성하게 배열된 콜라겐 섬유와 섬유아세포가 드문 드문 보였으나 섬유아세포의 기저층은 비교적 뚜렷하였고 상층부에 결합시킨 각질형성세포들은 생활력이 있고 진피층



Fig. 6 Photomicrograph of one dimensionally contracted artificial dermis showed some newly formed collagen fibrils and rather sparse fibroblasts. (M-T; $\times 200$)

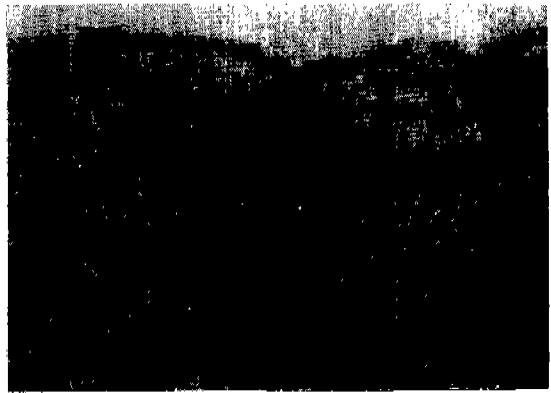


Fig. 7 Photomicrograph of three dimensionally contracted collagen lattice showed more infiltration of fibroblasts and more dense newly formed collagen fibrils. (M-T; $\times 200$)

과 잘 결합하고 있어서 생체 이식이 가능한 상태로 판단되었다(Fig. 9).

4. 고 찰

광범위 화상을 입은 환자뿐만 아니라 어떤 질병이나 사고로 인하여 넓은 면적의 피부 결손이 있는 환자의 치료를 위해 피부의 기능을 영구적으로 대신할 수 있는 인조피부의 필요성은 이미 오래 전부터 대두되어 있는 문제이다. 임상가들에게는 피할 수 없는 이런 문제점에 대해서 여러 가지 연

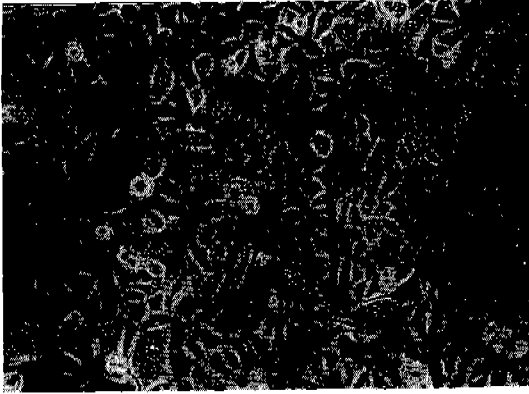


Fig. 8 Phase-contrast photomicrography of living skin-equivalent. Keratinocytes were beginning to adhere on collagen lattice and form a monolayer ($\times 200$)

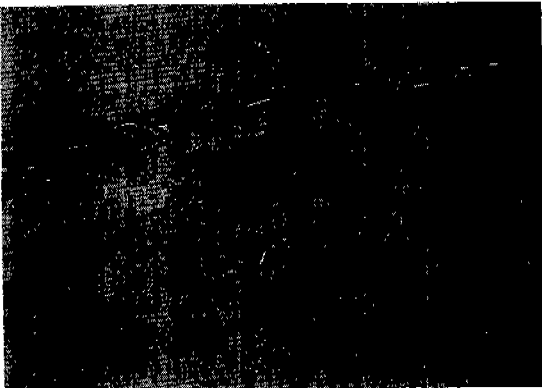


Fig. 9 Photomicrograph of living skin-equivalent showed stratified keratinocytes on the collagen lattice (H-E; $\times 100$)

구들이 진행되어 왔는데 대부분은 실험실내에서 만들어진 합성물질이거나^{5, 6, 10, 11, 12, 25} 또는 콜라겐 합성물에 관한 연구들이었다^{9, 19, 26}). 이런 물질들은 대개 개방된 피부 결손부위에 어떠한 생물학적인 결합은 없이 부착되어서 수액의 손실과 감염을 방지 하는 단순한 물리적 작용만을 하는 것으로서 그 효과가 일시적이어서 결국은 자가피부이식이라는 영구적인 처치를 필요로 하였기 때문에 임상에서 많이 이용되지 못하였다. 이러한 관점에서 본 연구에서는 생체조직과 밀접한 상호활성 작용을 하는 비염증성의 영구적인 인조진피를 제조하여 이것이 새로운 진피(neodermis)의 역할을 할 수

있도록 하고 그 상층부에는 역시 영구적으로 생체의 표피를 대신할 수 있는 배양된 표피화조직을 결합시켜 봄으로써 종래 방법들의 단점을 해소하여 보고자 하였다.

이런 목적을 충족시킬 수 있는 인조진피의 조건으로는 첫째, 개방된 창상 부위에 잘 부착될 수 있어야 하며 둘째, 적절한 탄력성과 생체와 비슷한 정도의 강도가 요구되며 셋째, 정상적인 섬유아세포와 혈관의 이동으로 새로운 결체조직의 기질(new connective tissue matrix)을 형성할 수 있어야 하는 것들을 들 수 있다⁵). 이러한 인조진피의 제조에 이용할 수 있는 물질로는 이미 많은 연구가 이루어진 바와 같이^{2, 5}) 생화학적 분해시에 아무런 독성 물질을 생성하지 않는 콜라겐이 가장 적합한 것으로 생각되었다. 또한 콜라겐 겔을 수축시켜서 진피를 대신할 수 있는 상태로 만들기 위해서는 콜라겐 기질내에 섬유아세포가 존재하여야 하는데 이는 이미 Ehrmann¹⁵), Elsdale¹⁶)의 연구에서 확인되고 있다. 섬유아세포는 콜라겐 섬유에 작용하여 보다 치밀한 배열을 이룸으로서 그 과정에서 수분이 감소되어 수축이 일어난다¹¹). 저자들의 실험 결과를 보면 역시 섬유아세포가 전혀 포함되지 않은 상태의 콜라겐 겔은 전혀 수축이 일어나지 않았고 또 한편 섬유아세포의 수가 많을 수록 수축도 더 많이 일어났지만 배양 3일째 부터는 수축력에 변화가 없었다. Bell¹²)의 보고에서 보면 세포수에 따른 수축력의 변화에 대해서는 본 실험과 같은 결과였으나 배양후 3-4일 까지는 수축이 급격히 진행되었다고 하고 그 이후로도 약 10일간 서서히 수축이 진행되었다고 기술하고 있다. 단 이러한 결과는 겔의 삼차원적 수축에 의한 것으로 겔의 일차원적 수축은 미리 배양접시의 바닥에 섬유아세포를 단층으로 깔고 콜라겐 겔의 수축을 진행시키기 때문에 미리 깔려 있는 섬유아세포의 단층으로 인하여 수축이 단지 일차원적인 방향으로만 일어나며 따라서 그 두께가 아주 얇아서 수축의 변화를 측정할 수가 없었다. 그래서 이 실험의 성적에서는 일차원적 수축의 변화에 대한 결과는 제외하였다. 가수콜라겐(hydrated collagen)의 농도에 따라서도 겔의 수축 상태가 다르게 나타났는데 섬유아세포의 농도가 일정하게 고정된 상태에서 콜라겐의 농도가 높을 수록 수축은 적게 일어나고 또 서서히 진행되는 현상을 관찰하였다. 또한

겔속의 혈청 농도를 달리 하였을때는 혈청의 농도가 높을 수록 수축이 많이 일어 났는데 이것은 섬유아세포의 콜라겐섬유에 대한 생화학적 작용이 혈청에 의해 더욱 촉진되는 것으로 해석할 수 있다.

섬유아세포의 세포분열횟수에 따라서도 수축의 정도가 상이하았는데 15회 및 35회 분열된 섬유아세포를 이용한 경우의 수축력은 각각 71.70%, 67.93%였고 55회 분열된 경우에는 43.40%로 나타났다. Bell등¹⁾은 보고하기를 19회 때에는 배양 6일째에 75.38%, 35회 때에는 67.30%, 55회 때에는 역시 많이 감소하여 57.70%의 수축력을 보였다고 하였다. 이것은 섬유아세포 뿐만 아니라 다른 세포에서도 마찬가지로 세포 분열이 많이 될수록 그 세포의 생물학적 능력이 감소된다는 점에서 당연한 결과라고 하겠다.

수축이 완료된 인조진피를 육안적으로 관찰하였을때 회백색의 비교적 탄력성이 있는 반투명의 혹은 불투명의 막으로 보였으며 안쪽으로 말려 드는 성질이 있었다. 삼차원적으로 수축된 인조진피는 두께가 비교적 두껍고 강도가 적절하여 실제 환자에게 이식시 봉합이 가능한 상태였다. 이를 광학현미경하에서 관찰해 본 결과 삼차원적으로 관찰되었으며 또 콜라겐 섬유도 더 많이 보였으며 원래의 겔속에 있던 콜라겐 섬유뿐만 아니라 섬유아세포의 주위에 새로 형성된 콜라겐 섬유들도 뚜렷이 관찰되었다. 이들 새로이 형성된 콜라겐 섬유들은 다른 연구자들의 보고^{1,3)}와 같이 세포의 운동 방향과 거의 직각으로 치밀하게 배열되어 있었다. 따라서 콜라겐 겔속에 넣어준 섬유아세포들의 수축이 완료된 상태에서도 그 생활력이 왕성하다는 것을 알 수 있었다.

섬유아세포는 배양전이나 배양후에도 이식면역에 관계하는 조직적합성 항원인 HLA-DR이나 CD₁/T₆ 항원 즉, class II 항원을 전혀 갖고 있지 않기 때문에 이들 섬유아세포가 타인의 것이라도 이식에 따른 면역 반응은 없음이 알려져 있다²⁷⁾.

이렇게 만들어진 인조진피는 인체의 노출된 창상 부위에 아주 잘 생착되는 것으로 되어 있고⁵⁾ 1주-2주 이내에 혈관이 대단히 풍부해지고 host-tissue bed로 부터의 섬유아세포이 이동이 많아지고 새로운 콜라겐 기질을 형성하여 드디어는 새로운 진피의 완성이 완료된다. 약 5주 뒤에 보면 생착시킨

인조진피와 host-tissue bed의 진피층간에 경계가 없어진다고 하였다^{5,27)}. 그러나 이 상태로는 표피층이 없기 때문에 세균의 침입을 막을 수가 없고 결국 조직의 기저로 부터는 표피세포의 이동이 일어나지 않으므로 따로 표피층이 필요하게 된다. 인조진피위에 표피층을 더하는 방법으로는 세가지를 생각할 수 있는데, 첫째는 먼저 인조진피를 이식하고 그 상부에는 일시적으로 표피를 대신 할 수 있는 silastic membrane을 덮어 두었다가 새로운 진피가 완전히 형성되고 자신의 피부 공여 부위가 충분히 지면(약4-5주) silastic membrane을 제거하고 그 위에 자가피부이식을 시행하는 방법이 있고⁵⁾, 둘째로는 첫번째 방법대로 창상부위를 보호하다가 자신의 공여 가능한 피부가 모자라면 각질화형성세포를 배양시켜 만든 표피화조직을 자가 또는 동종이식하는 방법이 있으며²²⁾, 셋째로는 인조진피위에 처음부터 배양시킨 표피화조직을 바로 결합시켜 이식하는 방법이 있을 수 있다.

저자들은 위의 셋째번 방법으로 즉시 이용이 가능한 피부대용물질의 제조에 관한 연구를 진행하였는데 이의 또다른 변형 방법으로는 Ehriche등¹⁴⁾이 인조진피를 만드는 과정에 섬유아세포와 각질형성세포를 같이 넣어 주어서 이를 창상 부위에 이식하였다고 보고한바 있다. 그러나 이 경우에는 표피세포가 분열 및 증식하여 표피층의 역할을 대신할 수 있을 만큼 성장하기까지는 많은 시간이 소요되고 그 성숙화 성장의 정도가 미약하므로 비록 생착이 된 뒤에도 심한 비대반흔의 구축이 생기고 외부 압력에 의해 쉽게 손상을 받는 등의 단점이 있다. 따라서 현재로는 가장 이성적이라고 생각되는 방법은 먼저 인조진피를 이식하고 곧 혈관의 생성이 이루어 지면 그 위에 배양시킨 표피화조직을 이식하는 것이라고 할 수 있다. 하지만 이 방법에도 단점이 있어서 silastic membrane을 부착하고 있는 동안에는 세균의 침입에 비교적 취약하고 신체의 움직임에 따라 silastic membrane이 거진피층으로부터 잘 떨어진다라는 것이다.

그래서 저자들은 처음부터 인조진피위에 배양시킨 표피화조직을 결합시켜 보았는데 인체의 각질형성세포는 배양후에는 이식면역항원인 class II 항원이 소실된다는 연구 결과가 있고^{13,22)}, 또 실제 임상적으로 이미 적용된 예들^{7,20,24)}이 있으므로 본 실험에서 만들어진 피부대용물질을 실제로 동종이식

에 이용할 수 있는 여건은 구비되어 있다. 이렇게 만들어진 피부대용물질을 광학현미경하에서 관찰하였을때 섬유아세포의 기저세포층이 뚜렷이 보였으며 인조진피의 상층부에 성층화된 각질형성세포층이 잘 결합되어 있었다. coulomb등⁹⁾의 연구에서 보면 살아 있는 섬유아세포가 콜라겐 기질속에 존재할때 각질형성세포의 성장이 촉진된다고 하여 섬유아세포가 콜라겐 기질속에 존재할때 각질형성세포의 성장을 촉진시키는 어떤 물질을 분비하는 것으로 추측하였고 Bell등¹⁰⁾도 콜라겐 겔속에 섬유아세포가 있을때 배양시킨 사람의 표피화조직이 더 쉽게 콜라겐 층과 결합한다고 하였고 이를 전자현미경으로 관찰하면 결합시킨 표피화조직이 잘 분화되고 있는 것을 볼 수 있다고 하였다.

이상과 같은 결과들을 종합하여 볼때 본 연구를 통하여 제조된 피부대용물질은 직접인체에 자가 또는 동종이식하는데 아무런 문제가 없으므로 앞으로 실제 임상실험을 통하여 이를 증명하는 것이 남아 있는 과제라고 하겠으며 또 배양시킨 표피화조직을 나중에 이식하는 것과 본 연구의 피부대용물질을 바로 이식하는 방법 사이에는 어떤 차이점이 있으며 또 인조진피를 만들 때에 그 두께를 어느 정도로 하는 것이 가장 잘 생착이 되는지와 멜라닌세포를 동시에 이용함으로써 생착후 치료 부위의 피부 색깔을 어느 정도 만들어 줄 수 있는지에 대한 연구가 앞으로의 과제들이라고 하겠다.

5. 결 론

피부 결손이 광범위하고 또 진피층까지 깊이 손상을 받은 환자의 치료에 새로운 방법을 제시하여 보고자 섬유아세포에 의한 콜라겐 겔의 수축 현상을 이용하여 인조진피를 만들고 수축 과정에 영향을 미치는 인자들을 관찰하였으며 인조진피의 상층부에 배양시킨 표피화조직을 결합시켜 새로운 피부대용물질을 제조하였는데 그 결과는 다음과 같았다.

1) 섬유아세포의 숫자에 따라 콜라겐 겔의 수축 정도는 달랐으며 세포수가 많을 수록 겔의 수축이 더 많이 일어났고 또 겔속의 콜라겐 농도가 낮을 때에는 세포수의 차이에 관계없이 배양 3일 이후 부터는 수축의 정도가 같았다.

2) 섬유아세포의 숫자를 일정하게 한 상태에서 콜라겐의 농도를 다르게 했을 때에는 콜라겐의 농도가 높을 수록 수축이 적게 되었고 오랫동안 서서히 수축이 진행되었다.

3) 섬유아세포의 숫자와 콜라겐의 농도를 일정하게 한 상태에서 첨가시킨 혈청의 농도를 달리 했을 때에는 혈청의 농도가 높을 수록 수축이 더 많이 일어났다.

4) 섬유아세포의 세포 분열횟수에 따라 각각 콜라겐의 수축 정도를 관찰한 바 세포 분열횟수가 많아 질수록 겔의 수축 능력은 약화되었다.

5) 수축시킨 인조진피를 육안적으로 관찰하였을때 그 두께에 따라서 반투명 혹은 불투명의 회백색 막으로 보였으며 인체의 진피조직과 유사한 정도의 탄력성 및 강도가 있었다.

6) 인조진피를 광학현미경으로 관찰한 결과 삼차원적으로 수축시킨 경우에 일차원적 수축의 경우보다 많은 섬유아세포 및 그에 따른 보다 활발한 콜라겐 섬유의 형성을 볼수 있었다.

7) 최종적으로 완성된 피부대용물질을 광학현미경으로 관찰한 결과 일차원적으로 수축된 인조진피의 상층부에 잘 결합되어 있는 각질형성세포층이 생활력을 유지하고 있음을 알 수 있었다.

이상과 같은 결과로 보아 콜라겐 겔의 수축으로 인조진피를 만들기 위해서는 섬유아세포의 존재가 필수적이며 혈청은 고농도로 첨가하는 것이 좋겠고 콜라겐 겔속의 콜라겐 농도는 높지 않은 것이 이상적임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Bell E, Ivansson B, Merrill C : Production of tissue like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. Proc Natl Acad Sci USA. 1978, 76:1274-1278.
- 2) Bell E, Merrill C, Solomon D : Characteristics of a tissue equivalent formed by fibroblasts cast in a collagen gel. J Cell Biol. 1979, 83:398A.
- 3) Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Charson A, Asselineau D, Dubertret L, Coulomb B, Lapiere C, Nusgens B, Neveux Y: The reconstruction of living skin. J Invest Dermatol. 1983,

- 81:21s-10s.
- 4) Billingerham RE, Russel PS : Studies on wound healing with special reference to the phenomenon of contraction in experimental wounds in rabbit skin. *Ann Surg.* 1956, 144:961.
 - 5) Burke JF, Yannas IV, Quinby WC Jr, Bondoc CC, Jung WK : Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg.* -1981, 194:413-427.
 - 6) Chardak WM, Martin MM, Jewett TC, Boyer BE : Synthetic substitute for skin. *Plast Reconstr Surg.* 1962, 30:554.
 - 7) Chih-Chun Y, Tsi-Siang S, Te-An C : The intermingled transplantation of auto-and homografts in severe burns. *Burns.* 1980, 6:141.
 - 8) Chvapil M, Koronenthal RL, Vanwinkle W : Medical and surgical applications of collagen. *Int Rev Conn Tis Res.* 1973, 6:1.
 - 9) Coloumb B, Leberton C, Dubertret L : Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol.* 1989, 92:122-125.
 - 10) Dagalakis N, Flink J, Stasikelis P : Design of artificial skin: part III, Control of pore structure. *J Biomed Mater Res.* 1980, 14:511.
 - 11) Davies JW : Synthetic materials for covering burn wounds: Progress towards perfection. Part I, Short-term dressing materials. *Burns.* 1983, 10:94.
 - 12) Davies JW : Synthetic materials for covering burn wounds: Progress towards perfection. Part II, Longer-term substitutes for skin. *Burns.* 1983, 10:104.13 Demidem A, Faure M, Dezutter-Dambuyant C, Thivolet J : Loss of allogeneic T cell activating ability and Langerhans cell markers in human epidermal cell culture. *Clin Immunol & Immunopathol.* 1986, 38:319-326.
 - 14) Ehrich PH, Buttle DJ, Nakatsuji T : Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science.* 1981, 211:1052-1054.
 - 15) Ehrmann RL, Gey GO : Inroduction of tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979, 76:1274-1278.
 - 16) Elsdale T, Bard J : Role of human fibroblasts in collagen contraction. *J Cell Biol.* 1972, 54: 626-637.
 - 17) Gallico CG, O'Connor NE, Campton CC, Kehinde O, Green H : Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med.* 1984, 311: 448-451.
 - 18) Grillo HC, Mckhann CF : The acceptance and evolution of dermal homografts freed of viable cells. *Transplantation.* 1964, 2:48.
 - 19) Hanke CW, Robinson JK : Injectable collagen implants. *Arch dermatol.* 1983, 119:533-534.
 - 20) Hefton JM, Madden MR, Finkelstein JL, Shires GT : Grafting of burn patients with allografts of cultured epidermal cells. *Lancet.* 1983, 2:428-430.
 - 21) Kuchler RJ : Biochemical methods in cell culture and virology. Dowdery, Hutchinson & Ross Inc., Strasburg, Penn. 1977, 1st ed.
 - 22) Morhenn VB, Benike CJ, Cox AJ, Charron DJ, Engleman EG : Cultured human epithelial cells do not synthesize HLA-DR. *J Invest Dermatol.* 1982, 78:32-37.
 - 23) O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H : Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet.* 1981, 1:75-78.
 - 24) Park HC, Oh SM, Joo HZ, Park JK, Choi YM : In vitro culture of human keratinocytes and perspectives on their use for grafting of patients with extensive burns. *J Kor Surg Soc.* 1989, 37 (2):135-148.
 - 25) Prude GF, Hunt JL, Gillespis RW : Biosynthetic skin substitute versus frozen human cadaver allograft for temporary coverage of excised burn wounds. *J Trauma.* 1987, 27:155-157.
 - 26) Siegel RJ, McCoy JP, Schade W, Swanson NA

- : Intradermal implantation of bovine collagen;
Human immune responses associated with clinical reactions. Arch Dermatol. 1984, 120:183-187.
- 27) Sher SE, Hull B, Rosen S, Church D, Friedman L, Bell E : Acceptance of allogeneic fibroblasts in skin equivalent transplants. Transplantation. 1983, 36:552-557.
- 28) Yannas IV, Burke JF : Design of an artificial skin; I. Basic design principles. J Biomed Mater Res. 1980, 14:65.