

# 쥐의 초냉동기관 이소 이식 후 형태학적 변화

성숙환\* · 김경환\* · 서정욱\*\* · 박종호\*\*\*

=Abstract=

## The Morphological Changes of Cryopreserved Rat Trachea After Heterotopic Transplantation

Sook Whan Sung, M.D.\* , Kyung Hwan Kim, M.D.\* , Jeong Wook Seo, M.D.\*\* , Jong Ho Park, M.D. \*\*\*

The best treatment of congenital or acquired tracheal stenosis is resection and end to end anastomosis. Various prosthetic material and tissue graft replacement can be considered when the stenotic segment is too long, but their uses are still limited due to many serious complications. The present study examined the effect of immunosuppression and cryopreserved allograft trachea after intraperitoneal omental implantation for evaluation of the possibility of tracheal transplantation.

Thirty tracheal segments were harvested from fifteen donor Wistar rats. Among them eighteen segments were implanted immediately(group I, II, III) and twelve segments were used for cryopreservation(group IV, V). Heterotopical intraperitoneal implantation was performed in five groups of rats(n=6); Group I was Wistar syngeneic controls and received no immunosuppression. Group II and III were those of Sprague-Dawley recipients, the former receiving no immunosuppression and the latter receiving immunosuppression(Cyclosporin A 15mg/kg/day, Methylprednisolone 2mg/kg/day). Group IV and V were groups of Sprague-Dawley recipients, the former receiving immunosuppression and the latter receiving no immunosuppression.

After 28 days, rats were sacrificed and the tracheal segments were histologically evaluated. Epithelial thickness was significantly decreased in group II, IV. Epithelial regeneration score was also significantly decreased in II. All rats maintained well their round tracheal contour.

In conclusion; 1) trachea could be preserved for a long time with cryo method, 2) epithelium could regenerate fully with omentopexy in cryopreserved trachea, 3) immunosuppression was not necessary with cryopreserved trachea.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 29 : 1182-90)

**Key words:** 1. trachea  
2. transplantation, heterologous  
3. cryopreservation  
4. immunosuppression

\* 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

\* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Seoul National University

\*\* 서울대학교 의과대학 병리학교실

\*\* Department of Pathology, College of Medicine, Seoul National University

\*\*\* 원자력병원 흉부외과

\*\*\* Department of Thoracic Surgery, Korea Cancer Center Hospital

† 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 자유공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

논문접수일 : 96년 6월 14일 심사통과일 : 96년 8월 5일

책임저자 : 김경환, (110-744) 서울시 종로구 연건동 28, Tel.(02) 760-2348, Fax.(02) 760-3664

## 서 론

선천성 기도협착환자, 또는 후천적인 원인 등으로 기관협착이 유발된 환자의 치료에 있어서 가장 좋은 치료방법은 손상된 부위를 잘라내고 양측을 단단 문합하는 것이나 손상된 부위가 광범위할 경우에는 시술이 불가능하다. 기관이 광범위하게 손상되었을 경우에는 다른 물체로 대체시켜야 한다. 대체하는 물질로는 인조물질과 조직편 두 가지가 있다. 인조물질은 여러 가지가 개발되었으나 그 중에서 가장 많이 임상에서 적용된 것은 Neville silastic tube이다. 그러나 딱딱한 인조튜브는 육아종 생성에 의한 기도협착, 치명적인 주위 대혈관손상, 위치변동 등의 합병증으로 만족할 만한 대용물로 평가받지 못하고 있다<sup>1)</sup>. 조직편에 대한 연구도 활발하여 연골, 골막, 경막, 심낭, 그리고 공장이식술 등이 시도되었다<sup>2)</sup>. 그러나 이들은 대부분 기도둘레의 일부분만 대체시키는 방법이며 거부반응과 허혈성손상 기도의 둥근 모양을 잘 유지시키지 못하는 단점 등을 해결하지 못하여 좋은 결과를 얻지 못하고 있다. 그러므로 선천적, 후천적 기도질환으로 광범위 절제가 필요한 경우(기도 길이가 반이상) 현재는 절제후 적당한 대체물이 없기 때문에 수술치료를 할 수가 없다<sup>3)</sup>.

그리고 기도에 관련된 문제는 폐이식술에서도 해결해야 할 당면과제로 부상된지 오래이나 그 해결이 아직 완전하지는 않다<sup>4)</sup>. 공여체 기관의 허혈성 손상 및 기관 접합부위의 부적절한 회복은 술후 가장 빈번하면서도 심각한 합병증이 되고 있다. 이 문제는 양폐이식술때 자주 발생되는 것으로 되어 있지만 단일 폐이식술 또는 심폐 이식술에도 발생되고 있다. 폐이식술 초창기인 1980년대 후반에는 수술 사망 원인중 50% 이상이 이러한 기관지문합 합병증에 기인하였다. 유난히 기관수술에 합병증이 많은 이유는 해부학적으로 술후 외부에 노출되어 감염의 기회가 많고, 기관지혈관의 접합술을 시행하지 못하기 때문에 이식 폐의 기관지는 국소적인 혈관 재생이 이루어지기까지는 허혈상태에 노출되기 때문이다<sup>5)</sup>. 기관지문합 후 국소적 혈관재생은 보통 술후 12일에서 15일 사이에 이루어지며, 대망고정술을 시술한 경우에는 그 기간을 술후 4~5일로 단축시킬 수 있는 것으로 되어 있다<sup>6)</sup>.

비가역적 손상을 입은 다른 장기의 경우 그 치료법이 동종 이식술로 귀결되는 점을 고려하면 비가역적 기관질환도 그 해결 법을 동종 기관이식술에서 찾아야 할 것이다. 한편 이와 함께 같이 해결해야 할 문제는 필요할 때 언제든지 기도를 쉽게 공급받기 위해서 기도조직을 장기

간 보존하는 방법이 필요하다. 초냉동된 조직은 면역성이 저하되어 이식후 면역억제제 사용 없이도 제기능을 발휘하고 조직파괴가 되지 않는 것이 정자, 판막편, 연골 등에서 증명되어 실제 임상에서 적용 사용되고 있다. 금번 실험의 목적은 첫째는 장기간 냉동보관된 기관의 이종 이소이식술후에 동물의 장기생존을 유도하여 이식된 기관의 조직학적 변화를 관찰하여 기관의 장기간 보존 가능성을 실험하는 것이며 둘째로, 장기간 초냉동 보관된 기관 조직의 이소 이식술후 면역억제제의 효과를 규명하는데 있다. 세 번째 목표는 미답 상태에 있는 기관질환의 치료로서 다른 사람의 기도를 이식하는 방법을 연구하기 위해 전 단계로 신체 감염에 노출되지 않고 혈류공급이 좋은 대망에 이식하였을 때 형태학적 기능유지가 가능한지를 규명하기 위한 실험이다.

## 대상 및 방법

순수혈통을 구할 수 있는 쥐를 대상동물로 정하였으며 몸무게는 200~300gm의 생후 3주정도로 동종 번식된 Wistar 쥐와 Sprague Dawley 쥐들을 사용하였다. 30개의 기관절편을 15마리의 Wistar 쥐들로부터 취득하여 6마리의 Wistar 쥐와 24마리 Sprague Dawley 쥐들의 대망에 감싸서 복부 복강 내에 1개월간 이소 이식시켰다. 이식 대상된 쥐들을 무작위로 분류하였으며 모두 5개의 군으로 나누었다. I, II, III군은 기관절편을 취득후 곧바로 이식한 군이며, IV, V군은 기관 절편을 1개월간 -196℃에서 초냉동 보관시킨 다음 이식한 군이다. I 군은 동인자형 이식된 대조군으로 같은 Wistar 쥐이었으며 면역억제제는 사용하지 않았다. II, III군은 이인자형 이식군으로 II 군은 면역억제제를 사용하지 않았고 III 군은 면역억제제를 사용했다. IV, V군은 장기간 초냉동 보관된 이식군으로, IV 군은 면역억제제를 사용했고 V 군은 면역억제제를 사용하지 않았다(Fig 1). 이식후에는 모두 같은 환경과 조건하에서 28일간 사육하였다.

### 가. 공여기관의 획득

공여동물 Wistar 쥐들은 시술 4시간 전부터 금식시키고 pentobarbital sodium를 65mg/kg로 복강내 주사하여 마취시킨후 항혈액응고제 헤파린 500u/kg 용량을 복강내에 주사하였다. 마취후 몸무게를 측정하고 정중흉골절개술을 목부분까지 연장하여 기관을 전장 노출시켜 적출하였다. 적출된 기관은 길이가 약 3cm이었다. 항생제가 혼합된 0.9% 생리식염수 20cc로 기관내부를 세정한 다음 반으로

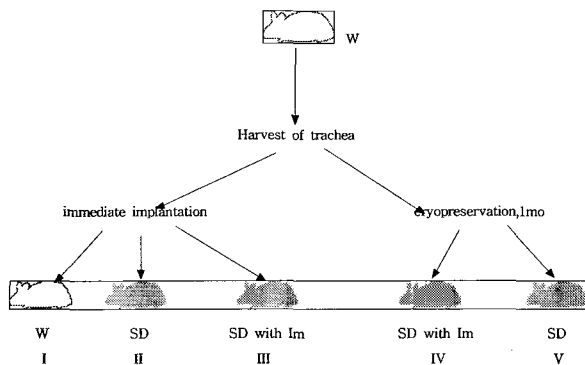


Fig 1. Experimental designs

\* Legends; W: Wistar, SD: Sprague Dawley, Im: Immunosuppression

나뉘어 기관절편을 1.5cm 정도 되게 하여 근위부와 원위부의 구별은 두지 않고 곧바로 이식하든지 초냉동 보관시켰다.

#### 나. 이식 기관편의 장기 냉동보관법

냉동 보관액은 우태혈청 50%, RPMI 1640 배지 40%, 그리고 냉동보호액(cryoprotectant)인 DMSO(dimethylsulfoxide)가 10% 혼합된 용액을 사용하였다. 절제된 기관편을 10% DMSO가 포함된 냉동보관액에 넣은 후 분당 1°C씩 감온 될 수 있도록 4°C 냉장고에 1시간, -20°C 냉장고에 1시간, 그리고 -70°C deep freezer(Forma Scientific)에 밤새 보관하여 냉동시켰고 그 다음날 -196°C 액체 질소통에 옮겨 1개월간 보관시켰다<sup>7)</sup>. 냉동 보관되었던 조직의 녹임은 용기 채로 37°C 생리식염수에 담구어 급속히 녹인 다음 기도 조각편에 남아 있는 DMSO 제거를 위해 처음 DMSO가 5%인 배지 용액에 다음은 DMSO가 없는 배지 용액에 각각 5분간 세척하였다.

#### 다. 기관 이소이식술

이식대상동물인 Wistar 쥐 6마리와 Sprague Dawley 쥐 24마리를 시술 4시간 전부터 물 이외에는 금식시켰다. Ketamine HCl 10mg/kg 용량을 근육주사하여 마취시키고 복부의 털을 깎고 10% betadine 액으로 소독하였다. 복부정중절개로 개복하여 복강내 감염이 없는 것을 확인한 후 대망을 복강 밖으로 꺼내어 채취한 기관절편을 대망 안에 넣고 둘둘 말은 후에 양끝을 봉합사로 고정시켰다. 기관절편이 수축되는 것을 방지하기 위해 딱딱한 플라스틱 관을 기관절편과 같은 길이 1.5cm로 만들어 양쪽 끝을 봉합 고정시켰다. 모든 이식된 쥐들에게 항생제는 사용하지 않았다.

#### 라. 면역억제제 투여방법

면역억제제는 박종호 등의 실험결과에 의하여 cyclosporin A(Sandoz, USA) 15mg/kg/day와 methylprednisolone 2mg/kg/day 용량을 사용하였다<sup>8)</sup>. 면역억제 투여군 III, IV 군은 시술전날부터 시작하여 술후 14일까지 피하주입하였다.

#### 마. 이소 이식된 기관의 적출술

술후 28일째 pentobarbital sodium 65mg/kg을 복강 내로 주입하여 마취시킨 다음 개복 하여 복강 안의 감염여부를 확인하고 이식된 기관절편을 플라스틱관과 둘러싸고 있는 대망까지 합쳐 동시에 적출하였다. 적출된 덩어리에서 조심스럽게 대망과 플라스틱관을 분리시켜 기관절편만 획득하여 육안적으로 기관 형태 유지정도를 관찰하였다. 정상 생리식염수로 세정하고 포르말린용액에 담겨 기관을 고정시켰다.

#### 바. 기관의 조직학적 검사

이종 이식된 기관의 생육성 정도를 정량화하기 위하여 상피조직의 두께를 측정하였다. 조직 슬라이드는 기관절편을 연골판 3개 간격으로 횡으로 잘라 3개의 절편으로 나누어 만들었으며 염색은 H&E staining을 실시하였다. 상피조직의 두께와 재생정도는 다음에서 설명하는 방법을 이용하여 측정하였고 1개의 조직슬라이드에서 3곳의 상피를 측정하였다.

##### 1) 상피조직의 두께 측정방법.

1개의 조직 슬라이드에는 1마리의 쥐에서 적출한 3개의 기관 단면이 있도록 제작하였으며 각각의 단면에서 1곳을 무작위로 선택하여 두께를 측정하였다. 즉 1개의 슬라이드에서 3곳을 측정후 평균치를 구하였다. 측정방법은 일정부위의 상피면적을 전후 면적 측정부위의 가로길이를 측정하여 상피의 두께를 산출하였다(상피두께=면적/가로길이).

일정부위의 면적과 가로길이의 측정에는 computer-assisted morphometry(Leitz ASM 68K) software 를 사용하였다. 현미경은 Leitz Diaplan (Jeppe Trading Co)을 이용하여 250배의 배율에서 측정하였다.

##### 2) 상피조직의 재생정도 관찰방법

다음의 grade scoring system을 이용하여 이 실험의 목적 및 내용에 대하여 모르는 병리과의사에 의하여 실시되었다<sup>9)</sup>.



Fig 2. Round tracheal contour is well maintained in all groups 28days after abdominal implantation of cryopreserved trachea

Grade 0: no epithelium

single nonconfluent epithelial cells

1: confluent single layer nonciliated epithelium

2: confluent multilayer nonciliated epithelium

3: normal mucociliary epithelium (ciliated pseudostratified columnar epithelium)

사. 결과의 통계처리 방법

모든 결과는 평균과 표준편차로 나타내었고 자료의 분석은 SAS 통계 프로그램을 이용하여 실시하였다. GLM (general linear models) procedure를 이용하여 군간의 overall F test가 유의할 경우에는 비교군과 기타 각 군을 pairwise 비교를 하였다. 다중비교로 인한 type I( $\alpha$ ) error의 증가에 대해서는 Dunnett's method를 이용하여 보정함으로써 유의수준을 0.05로 유지하였다. 이인자형 이식군간의 비교분석에는 GLM procedure중에 Bon Grouping을 이용하였다.

결 과

기관의 이소 이식술을 받은 30마리의 쥐들 중에 이식술중이나 술후 사망한 경우는 없었다. 장기간 보존하지 않고 곧바로 기관을 이식한 I군, II군, III군 18마리에서 모두 1개월간의 장기간 생존을 유도할 수 있었고 기관적출시 복강 내 감염 흔적이나 창상 감염의 증거도 찾아볼

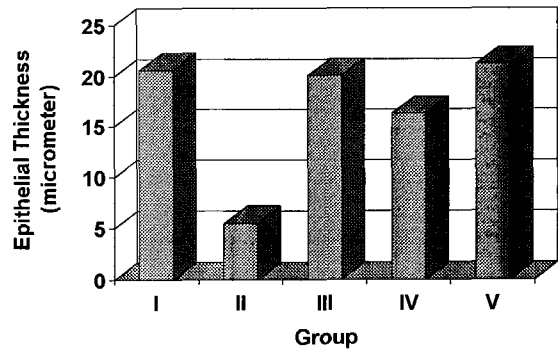


Fig. 3. Average epithelial thickness decreased in group II significantly

수 없었다(술후 감염방지를 위한 항생제사용은 없었다). 초냉동으로 1개월간 보관한 기관을 이소 이식한 IV군과 V군에서도 감염이나 염증의 증거를 찾을 수 없었다. 적출한 30개의 조직을 모두 슬라이드로 제작하였고 그 직전에 육안적 소견을 관찰하였다. 모두 육안적으로 기관의 형태가 잘 유지되어 있었고(Fig 2) 기관 내에서는 점액이 분비된 상태였다. 면역억제제를 사용한 III군과 IV군에서 술후 15일째부터 체중감소 및 활동성저하가 일부에서 관찰되었으나 경구섭취는 양호하였고 술후 1개월까지 생존을 비교적 양호하게 유지할 수 있었다.

기관의 조직소견상 기관내 점액에서 염증세포는 발견할 수 없었고 기관의 외경을 따라 대망조직이 혈관과 더불어 잘 관찰되었다. 일부에서 기관의 점막부위가 점막하층 및 연골부위와 박리되어 있었는데 이는 초냉동보관 후 조직을 녹이는 과정에서 일어날 수 있는 상황이라고 생각되어진다(즉 조직을 다루는 과정에 다소 부주의한 것에 기인한 것으로 추정됨)

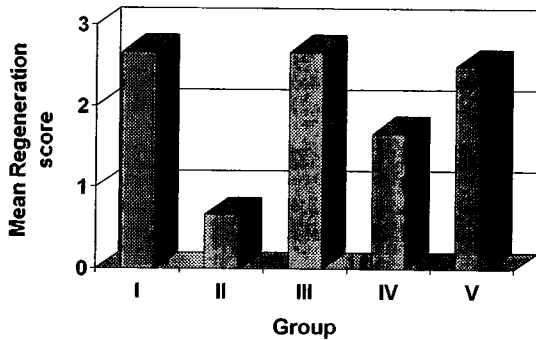
상피조직의 두께를 측정하여 동인자형 이식된 I군을 기준으로 비교하였다. 30개 상피조직 두께의 측정결과는 Fig 3에 나타내었다. 각 군별로 상피조직 두께의 평균 및 표준편차는 다음과 같다 I군 20.6 ± 1.86 μm, II군 5.5 ± 1.48 μm, III군 20.1 ± 2.26 μm, IV군 16.3 ± 4.18 μm, V군 22.0 ± 2.10 μm. Wistar-Wistar 간에 동인자형 이식된 I군과 비교하여 보면 이인자형에 면역억제제를 사용한 III군과 초냉동 보관하고 면역억제제를 사용하지 않은 V군에서 이와 비슷한 상피조직층의 두께를 보였다. 면역억제제를 사용하지 않은 이인자형 II군과 면역억제제를 사용한 초냉동보관한 IV군은 I군과 비교하여 볼때 상피조직의 두께가 감소되어 있음을 관찰할 수 있었고 이는 통계적으

**Table 1.** Bonferroni(Dunn) T test for epithelial thickness. (means with the same letter "A or B" are not significantly different)

| General Linear Models Procedure |                        |   |       |
|---------------------------------|------------------------|---|-------|
| Bon Grouping                    | Mean ( $\mu\text{m}$ ) | n | Group |
| A                               | 21.233                 | 6 | V     |
| B A                             | 20.117                 | 6 | III   |
| B                               | 16.333                 | 6 | IV    |
| C                               | 5.500                  | 6 | II    |

**Table 2.** Bonferroni(Dunn) T test for epithelial regeneration score.(means with the same letter "A or B" are not significantly different)

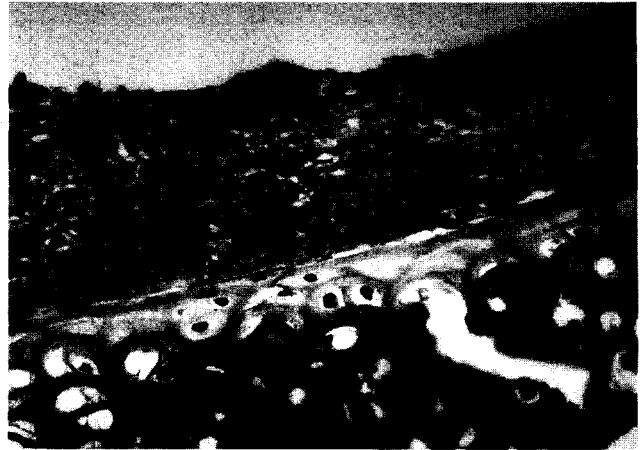
| General Linear Models Procedure |       |   |       |
|---------------------------------|-------|---|-------|
| Bon Grouping                    | Mean  | n | Group |
| A                               | 2.667 | 6 | III   |
| B A                             | 2.500 | 6 | V     |
| B                               | 1.667 | 6 | IV    |
| C                               | 0.667 | 6 | II    |



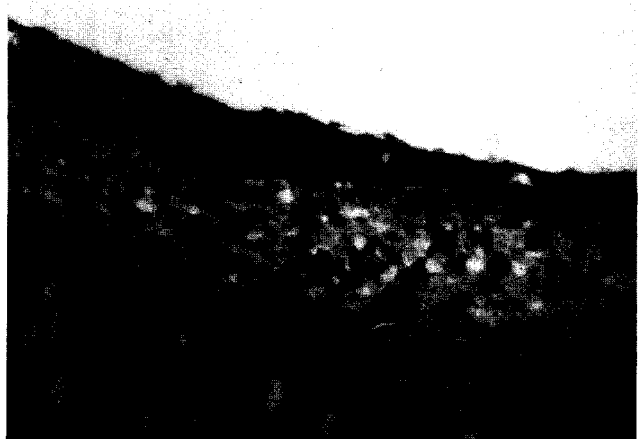
**Fig. 4** Average epithelial regeneration score decreased also in group II significantly

로도 유의한 차이가 있었다. 또한 IV군과 V군사이의 상피세포 두께의 비교에서도 IV군에서 유의한 감소가 있음을 알 수 있었다. 이는 장기간 초냉동 보관한 기관의 이소이식술시에 면역억제제의 사용이 오히려 상피세포의 성장을 저해할 수도 있다는 제시가 아닌가 생각된다 (Table 1).

상피세포의 재생정도를 관찰한 결과로 II군에서는 예상대로 상피조직이 남아있지않거나 있더라도 단층으로 유지되어 있는 반면 III군, IV군에서는 동인자형 이식군과 비슷한 상피조직의 재생이 가능함을 알 수 있었다 (Fig. 4). 각 군별 비교를 보면 IV군과 V군 사이에는 상피세포의 두께에서와는 달리 통계학적으로 상피세포 재



**Fig 5.** Example of Grade 0 tracheal epithelium



**Fig 6.** Example of Grade I tracheal epithelium

생의 유의한 차이는 없었다. 재생정도를 수치상으로 본다면 IV, V군간에 차이가 보이는 듯 했으나 통계학적 차이는 볼 수 없었다(Table 2).

상피세포의 재생정도별 조직소견을 Fig 5~8에 나타내었다.

## 고 찰

선천성 또는 후천성 기관질환의 경우 그 범위가 광범위한 경우에 이를 해결하기 위하여 여러 방법들이 시도되어 왔다. 환자 자신의 조각 편을 이용한 보고례를 살펴보면 1982년 Nakayama 등이 선천성 기도협착을 보이는 환아들을 대상으로 연골조직을 이용하였고 1991년 Cosentino 등은 심낭을<sup>9)</sup> 그리고 1986년 Cohen 등은 골막을 이용한 치



Fig 7. Example of Grade II tracheal epithelium



Fig 8. Example of Grade III tracheal epithelium

료 방법 및 임상결과를 발표한 바 있다<sup>10)</sup>. 이 결과들을 보면 그 성공률이 일정하지 않고 매우 낮음을 알 수 있다. 따라서 자가조직의 선택은 가능한 조각편의 길이, 기도 안정성의 필요, 그리고 흉부외과 의사의 선호도에 따라 결정되는 경향이 있다.

즉 이는 아직까지 정형화되고 표준화된 치료방법이 없음을 의미한다. 이중에서 가장 많이 임상에서 이용된 것은 늑연골이나 육아종의 형성, 이식편의 괴사, 그리고 봉합부위의 재협착 등이 문제시되고 있다<sup>11)</sup>. 또 늑연골을 사용할 경우 이를 기도에 맞추어 성형하여야 하는데 이것에도 문제점이 있고, 시간이 지남에 따라 모양이 뒤틀리는 경우도 보고되고 있다<sup>12)</sup>.

일찌기 Gibbon등은 연골 동종이식이 자가이식과 같이 작용할 수 있다는 것을 보여줌으로써, 재건 성형수술에 있어서 광범위한 동종연골이식의 가능성을 시사한 바 있다<sup>13)</sup>. 오늘날 연골동종이식은 정형외과 영역의 관절 수술에 광범위하게 적용되고 있다. 이와 같이 연골동종이식이 비교적 쉽게 성공을 거둔 이유는 다른 장기이식에 비하여 거부반응의 발생률이 아주 낮는데 크게 기인하고 있다. Gertzbein등은 연골세포는 그 표면에 tissue-specific antigen을 가지고 있지만, 이 연골세포들은 보호막 역할을 하는 아주 약한 antigenic matrix에 의하여 둘러 쌓여 있음을 발견하였다<sup>14)</sup>.

1990년 Dykes의 실험결과를 보면 타원형의 기관 결손을 심낭을 이용하여 기관성형을 한 경우 며칠 안에 이식조각편의 괴사가 유발되는 것을 알았다. 반대로 1992년 Antonio등의 실험은 상반되는 결과를 보여주고 있다<sup>15)</sup>. 즉 이런 일련의 결과들을 종합하여 보면 기관 성형시 이용되는 조각편의 성질도 중요하지만, 결손 위치(경부 혹은 흉

부), 봉합 방법(단속 봉합 혹은 연속 봉합), 봉합사의 종류, 결손 모양(4각형 혹은 장방형), 결손 길이, 그리고 stent의 종류(silastic tube vs silastic coated coil)등에 의해서도 그 결과에 큰 차이를 보이고 있다.

기관편, 연골, 골막 등의 냉동보관법에 있어서도 많은 연구가 진행되었다. 1990년 Kawabe등은 10% DMSO를 사용하는 방법에 대한 실험결과를 발표한 바 있다<sup>16)</sup>. 냉동보관법에 있어서 중요한 요인은 세가지로 냉동보호액 주입과 제거, 냉동속도, 그리고 녹이는 속도이다. 냉동보호액으로는 glycerol 과 DMSO 두 종류가 있는데 후자를 더 많이 선호하며 농도는 10%로 사용하고 있다. 냉동속도는 세포마다 적절한 범위가 있는데 그 차이가 약 1000배나 된다. 이것은 각 세포의 물에 대한 투과계수와 세포크기에 좌우된다. 조직 및 장기는 수많은 세포들의 집합체이므로 각 세포들의 적합한 냉동속도를 고려해야 되며, 수분의 이동 및 열 발산이 인접해 있는 세포나 혈관을 통하므로 냉동 속도를 훨씬 더 낮추어야 한다. 지금까지 시행된 연구 결과 분당 0.5℃에서 2℃정도 감온시키는 것이 제일 좋은 결과를 보여주고 있다.

1983년에 처음으로 임상에서 폐이식술에 성공하기 이전에는 이식술후 10일 이상 생존한 사람들의 가장 큰 사망원인은 기관지 접합부위의 합병증이었다. 초창기 Toronto 그룹의 이식술 성공도 부분적으로는 기관지 접합부위에 항상 대망고정술을 시술하였기 때문이다. 대망고정술을 사용하여 이식폐 기관지의 혈관재생을 촉진하고, 약간의 접합부 합병증은 여전히 이식술후의 유병률과 사망률의 주요한 원인이 되어왔다.

1990년까지도 이식술후 스테로이드의 사용은 기관지 결합력을 저하시킨다는 이유로 회피되어 왔다. 그러나 최근

의 실험에서는 스테로이드의 사용이 도리어 결합부의 염증 및 기관지 합병증을 줄인다는 보고가 이어지면서, San Antonio 그룹을 중심으로 임상에서의 스테로이드 사용이 검토되기 시작했으며, 좋은 임상결과들이 보고되고 있다. 즉 최근의 폐이식술의 성공은 Cyclosporin의 등장과 이로 인한 기관지합부위의 합병증을 줄인 데 기인하고 있다.

이상의 결과들을 종합하여 보면 현재까지 개발되거나, 이용되고 있는 조직편들은 어느 정도 한계를 보이고 있음을 알 수 있다. 따라서 다른 장기에 있어서도 마찬가지지만 이의 해결책을 동종기관 이식에서 찾고자 하는 것은 당연한 귀결이라 생각된다. 특히 냉동보관법을 이용한 동종혈관대치술이 최근에 성공을 보이는 것을 보면 그 가능성을 높다고 생각되어 진다. 이 실험에서 본 연구자는 상피조직을 정량적, 또는 정성적으로 평가하여 이종 이식된 기관 생육성의 정량적 분석을 시도하였다. 최근에는 기관의 혈관신생과 상피조직 재생과의 밀접한 관계가 보고되었으며, 혈관신생을 측정하는 방법 등이 소개되고 있다<sup>17,18</sup>.

본 실험 결과에서도 나타났듯이 기관의 초냉동 보관후 상피세포의 재생정도는 만족할만하나 연골 세포의 손상이 문제가 되었고 앞으로 이에 대한 개선 방향이 연구과제가 되어야 할 것으로 생각된다. 기관 상피세포의 섬모, 상피세포, 평활근육 등이 온전히 보존된 데 비하여 연골 손상이 두드러진 것은 냉동보호제(cryoprotectant)인 10% DMSO의 연골 내로의 불충분한 확산에 의한 것이라는 것이 Spencer 등의 주장이고 이는 충분한 설득력을 얻고 있는 것으로 생각된다<sup>19</sup>. 초 냉동 보관된 기관의 이소이식술 후 면역억제제의 사용은 오히려 악영향을 끼칠 수 있다는 것이 이번 연구에 결과인데 이는 다른 여러 실험에 의해 다시 논의되어야 할 사항이라 생각하며, 본 실험과 달리 면역억제제의 용량을 달리했을 때의 변화 관찰로 중요한 자료가 되리라 생각된다.

초냉동 보관의 가장 중요한 과정중의 하나라 할 수 있는 녹임과정은 조직이 작으므로 세심한 주의가 필요하다. 쥐의 기관자체가 3~4mm의 직경에 길이 2cm 정도의 작은 장기이기 때문에 본격적인 실험전에 실시한 기초 실험도 중 잦은 오류가 발생하였는데 10% DMSO 용액을 희석하는 과정에 있어 우태혈청과 RPMI 1640 용액을 미세 피펫을 이용하여 조심스럽게 섞는 것이 매우 중요함을 알 수 있었고 이때의 부주의로 초냉동보관 장기의 치명적 손상을 유발할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 이에 기초한 다른 실험 수행의 참고 사항이 되었으면 한다. 또한 이러한 실험 수행에 가장 중요한 동물 실험실의 환경 개선에 대하여도 앞으로 더욱더 발전이 있어야 할 것으로

생각된다. 이 실험에서 사용한 상피 재생정도의 판정 방법은 1979년과 1989년 쥐와 햄스터의 기관에 기계적 또는 화학적 자극후의 상피재생에 대한 실험 결과에 근거하였다<sup>19</sup>. 이번 실험에 사용된 쥐 기관을 이용한 실험모델은 간단하며, 경제적이고, 많은 수의 실험이 가능하며 통계학적으로 유의성 산출에 유리한 점이 있고 폐순환으로부터의 역행적 측부 순환을 배제할 수 있는 장점이 있는 반면 폐실질과 접하고 있는 기관 이식에 비하여 거부반응발생율이 떨어지고 기관수축 방지를 위해 이 물질을 같이 넣어야 한다는 점, 작은 크기로 인한 조직손상의 가능성이 높은 점등이 단점으로 지적될 수 있다.

예방목적의 항생제 사용은 없었으며 이에 따른 감염 또한 문제되지 않았고 흡수 가능한 봉합사를 이용하여 창상 부위를 폐쇄함으로써 다른 쥐에 의해 봉합사가 손상되어 탈장될 수 있는 가능성을 배제하였다. 이 실험에 사용된 면역억제제의 용량은 Cyclosporin A가 피하 주사와 경구 투여의 흡수율이 비슷한 점을 고려하여 사람의 경구 용량을 기준으로 하였고 이전의 실험으로 용량의 적정함이 밝혀졌다<sup>8</sup>.

## 결 론

본 연구자는 초냉동 보관된 쥐 기관의 이소 이식술후 조직학적 변화양상을 관찰하고, 그 결과를 정량적으로 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

### 1. 장기간 초냉동 보관하지 않은 기관이식술

① 이종 이식된 기관의 상피조직 재생은 동인자형이식군에 비하여 면역억제제를 사용하지 않은 군에서 의미 있게 감소되었다.

② cyclosporin A와 methylprednisolone을 충분히 사용한 경우 이인자형 이식군에서도 동인자형 이식군과 같은 상피조직 재생을 보일 수 있었다.

### 2. 장기간 초냉동 보관된 기관이식술

① 장기간 냉동 보관된 기도조직을 1개월간 이소 이식하여도 기관의 육안적 형태가 온전하였고, 기관의 섬모와 상피도 잘 보존되어 있었다.

② 초냉동 보관후 이소 이식술시 이인자형 이식군에서 면역억제제를 사용하지 않은 군이 사용한 군에 비해 상피세포의 재생정도가 우월하였다.

이상의 결과로 기관조직의 초냉동 보관이 가능하였고, 측행혈류 형성을 촉진시키는 복부 대만에 고정시켜 복강

내에 이식하였을 때 기관의 형태학적 유지가 가능하였고, 상피세포가 재생되고 면역억제제 사용이 필요하지 않았다.

### 참고 문헌

1. Tomes H, Mickies G, Boat-Moykopf I. *Experience with prosthetic reconstruction of the trachea and bifurcation*. Thorax 1985;40:32
2. Costantino MD, Nuss DW, Snyderman CH. *Experimental tracheal replacement using a revascularized jejunal autograft with an implantable Dacron mesh tube*. Ann Otol Rhinol Laryngol 1992;101:807-14
3. Grillo HC, Mathisen DJ. *Primary tracheal tumors: treatment and results*. Ann Thorac Surg 49:69, 1990
4. Ramirez J, Patterson GA. *Airway complications after lung transplantation*. Semin Thorac Cardiovasc Surg 1992;46:147-53
5. Deffebach ME, Charan NB, Lakshminarayan S, et al. *The bronchial circulation: Small but vital attribute of the lung*. Am Rev respir Dis 135:463-81, 1987
6. Lima O, Goldberrg M, Peters WJ, et al. *Bronchial omentopexy in canine lung transplantation*. J Thorac Cardiovasc Surg 1982;83:418 -21
7. 성숙환, 박성희. 실험동물 잡견 기도의 장기간 보존을 위한 냉동 보관법의 효과. 대흉외지 1991;24:451-7
8. 박종호, 이정상, 김주현. Cyclosporin A와 methyl-prednisolone 이 이인자형 이식된 쥐 기관의 상피세포 재생에 미치는 영향에 대한 연구. 대흉외지 1994;27:15-23
9. Couraut L, Nashef SAM, Nicolini P, Jougon J. *Classification of airway anastomotic healing*. Eur J Cardiothorac Surg 1992;6:496-7
10. Cohen RC, filler RM, Konuma K. *A new model of tracheal stenosis and its repair with free periosteal grafts*. J Thorac Cardiovasc Surg 1986;92:296-304
11. Tsugawa C, Kimura K, Muraji T. *Congenital stenosis involving a long segment of trachea : Further experience in reconstructive surgery*. J Pediatr Surg 1988;23:471-5
12. Zalzal GH, Cotton RT, McAdams AJ. *The survival of costal cartilage graft in laryngotracheal reconstruction*. Otolaryngol Head Neck Surg 1986;94:204-211
13. Gibbon T, Davis WB, Curran RC. *The long-term survival of cartilage homografts in man*. Br J Plast Surg 195;11:177-87
14. Gertzbein SD, Tair JH, Devlin SR. *The antigenicity of chondrocytes*. Immunology 1977;33:141-5
15. Antonio M, Robert MF, Andrej B, charles R. *Repair of long tracheal defects with cryopreserved cartilaginous allografts*. J Pediatr Surg 1992;27:1131-5
16. Kawabe N, Yoshinao M. *Cryopreservation of cartilage*. Int Orthop 1990;14:231-5
17. Eckhard M, Paulo FG, Puskas JD. *The effects of basic fibroblast growth factor and omentopexy on revascularization and epithelial regeneration of heterotopic rat tracheal isografts*. J Thorac Cardiovasc Surg 1992;104:180-8
18. Olech VM, Keshavije SH, Chamberlain DW, Slutsky AS, Patterson GA. *Role of basic fibroblast growth factors in revascularization of rabbit tracheal autografts*. Ann Thorac Surg 1991;52:258-64
19. Deschamps C, Trastek VF, Ferguson JL, Martin WJ. *Cryopreservation of canine trachea : Functional and histological changes*. Ann Thorac Surg 1989;47:208-12



**=국문초록=**

선천성 기도협착 또는 후천적 원인 등으로 기관협착이 유발된 환자의 치료에 있어 병변이 너무 길어 절제후 단단문합이 불가능한 경우에 인조물질과 생체조직편 등을 고려할 수 있으나 수많은 합병증으로 인해 사용하기가 어렵다. 본 연구는 다른 장기에서처럼 기관도 이식술이 가능한지를 규명하기 위한 첫 단계로 초냉동 보관된 기관 조직을 복강 내에 이식하여 생명력과 기관의 형태학적 기능의 유지 여부를 파악하였다.

15마리의 공여동물인 Wistar쥐로부터 30개의 기관절편을 분리하였다. 이 중 18개의 절편을 장기 보관하지 않은 이소 이식술에, 12개의 절편을 초냉동장기 보관후 이소 이식술에 이용하였다. 모두 다섯 군이며 각 군은 6마리로 구성되었다. 각 군을 살펴보면 다음과 같다. I군은 동인자형 이식된 비교군으로 면역억제제를 투여하지 않았으며, II군은 이인자형이식후 면역억제제를 투여하지 않은 군이었다. III군은 이인자형이식후 면역억제제를 투여한 군으로 위 세 가지 군은 조직을 장기간 보관하지 않았다. IV군과 V군은 초냉동 보관된 기관을 이소 이식에 이용한 군으로 IV군은 면역억제제를 투여하였으며 V군은 이를 투여하지 않았다.

모두 술후 28일째 이식 쥐를 절명시킨 후 이소 이식된 기관을 분리하여 조직학적 검사를 실시하여 상피의 두께와 재생정도를 조사하였다. 상피세포의 두께를 비교하여보면 II군과 IV군에서 나머지 군과 비교하여 유의한 감소가 있음을 관찰할 수 있었고 재생정도의 관찰에서는 II군이 타군과 비교하여 재생이 감소되어 있음을 알 수 있었다. 초냉동 보관된 기관의 이소이식술후에는 면역억제제의 사용한 군(IV) 상피세포의 두께는 감소하나 재생정도는 면역억제제를 사용하지 않은 군과 비교하여 큰 차이는 없었다. 5군 모두 기관의 등근 형태를 잘 유지하고 있었다.

이상의 결과로 기관조직의 장기간 초냉동 보관이 가능하고, 측행혈류를 조기에 생성해 주는 대망에 감싸주었을 때 기관의 등근 형태를 유지하고 상피세포가 재생되어 기관의 동종이식이 가능할 것이며 면역억제제는 필요하지 않겠다는 것을 알 수 있었다.

**중심단어:** 기관, 이소 이식술, 초냉동 보관, 면역억제제