

양막과 콜라겐을 이용한 생체 적합 드레싱 소재 개발 및 백서 창상치유 실험

안강민¹ · 이지호² · 이의룡² · 이종호² · 이종원³ · 김성포³ · 양은경³ · 김기호³

¹울산대학교 의과대학 구강악안면외과, ²서울대학교 치과대학 구강악안면외과
³주식회사 바이오랜드

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:189-199)

DEVELOPMENT OF BIOCOMPATIBLE DRESSING MATERIAL MADE OF COLLAGEN AND AMNIOTIC MEMBRANE AND WOUND HEALING EXPERIMENT IN RAT

Kang-Min Ahn¹, Ji-Ho Lee², Ui-Lyong Lee², Jong-Ho Lee², Jong-Won Lee³,
Sung-Po Kim³, Eun-Kyung Yang³, Ki-Ho Kim³

¹Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Ulsan University

²Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

³Bioland Incorporation

Purpose of study: Partial thickness skin graft is the golden standard regimen for full-thickness skin defect caused by burn or trauma. However, in case of extensive burns of more than 50% of total body surface area, the donor site is not sufficient to cover all defects. As a second choice, allograft, xenograft and synthetic materials have been used to treat skin defect. Among them the amniotic membrane(AM) was used as a biological dressing for centuries because of its potential for wound healing. In this study, quantification of EGF in AM and effect of AM-collagen complex on full thickness skin defects was examined.

Materials & Methods: The concentration of EGF in fresh, deep frozen and freeze-dried AM was evaluated by ELISA. EGF-R immunostaining was performed in freeze-dried AM. SD rats weighing 250~300g was used for wound healing experiment. Three full thickness skin defects(28mm diameter) were made on dorsal surface of SD rat. The control group was covered by Vaseline gauze and AM-collagen complex and Terudermis[®] was grafted in two other defects. Healing area, Cinamon's score were evaluated before biopsy. Grafted sites were retrieved at 3 days, 1 week, 2 weeks and 4 weeks after operation. H & E and Factor VIII immunohistochemical stain was performed to evaluate the microscopic adhesion and structural integrity and microvessel formation.

Results:

1. EGF concentration of fresh, deep frozen and freeze-dried AM showed similar level and EGF-R was stained in epithelial layer of freeze-dried AM.
2. At 4 weeks after grafting, the healing area of AM-collagen and Terudermis group was $99.29 \pm 0.71\%$ and $99.19 \pm 0.77\%$ of original size. However, that of control group was $24.88 \pm 2.90\%$.
3. The Cinamon's score of AM-Collagen and Terudermis[®] group at 4 weeks was 15.6 ± 1.26 and 14.6 ± 3.13 and that of control group was 3.7 ± 0.95 . Significant difference was observed among control and experimental groups($p < 0.05$).
4. Histologic examination revealed that AM protected leukocyte infiltration and epithelial migration was nearly completed at 4 weeks. Terudermis[®] group showed mild neutrophil infiltration until 2 weeks and completion of epithelization at 4 weeks. Control group showed massive leukocyte infiltration until 4 weeks.
5. Microvessels were increased sharply at 1 week and control group at 1 and 4 week showed significant differences with Terudermis[®] group of same interval($p < 0.05$) but no differences were found with AM group($p < 0.05$).

Conclusion: EGF and EGF-R were well preserved in freeze-dried AM. AM attached to collagen acted as excellent biologic dressing which had similar effect with Terudermis[®]. AM showed anti-inflammatory action and healing was completed at 4 weeks after full-thickness skin defect.

Key words: Amniotic membrane, Biocompatible dressing, EGF, EGF-R, Wound healing

이종호

110-768 서울특별시 종로구 연건동 28

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jong-Ho Lee

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University

28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-768, South Korea

Tel: 82-2-2072-2630 Fax: 82-2-766-4948

E-mail: leejongh@plaza.snu.ac.kr

I. 서 론

화상이나 외상 등으로 인한 피부 결손이나 구강암 제거 후 발생하는 점막의 결손에는 부분층 피부이식술이나 피부 피판을 이용한 재건이 가장 널리 사용된다. 하지만 제한된 공여부 면적으로 몸 전체의 50% 이상 되는 광범위한 화상에는 사용이

※ 본 연구는 산업자원부 산업기반기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : 10002971, 기술분류:생물산업, 기술분류 code 541199)

힘들며, 구강점막의 재건을 위한 피부피판의 공여부는 통증유발과 반흔형성이 되는 단점이 있다. 이의 극복을 위하여 조직공학을 이용하여 적은 자가세포를 대량으로 배양하여 이식하는 자가 이식 법¹⁾, 기증된 사체의 피부에서 진피와 표피를 분리하여 세포를 없앤 동종이식법과^{2,3)} 동물에서 추출한 콜라겐을 이용한 이종 이식 법^{4,5)} 등 다양한 방법이 소개되었다. 이 중 자가 세포배양을 이용한 자가인공피부 이식법은 세포 배양에 최소 2주 이상이 소요되고 생착률을 예측하기 어려우며 비용이 많이 드는 단점이 있으며, 동종 이식 법은 사체 기증 부족으로 인한 이용 제한과 면역반응으로 인한 거부가 발생할 수 있으며 기저막의 부재로 인하여 생착 지연이 관찰 되며 역시 고가라는 단점이 있다. 이종이식은 값이 싸다는 장점이 있지만 역시 기저막 부재에 따른 상피화가 지연된다는 단점이 있어 현재까지 이상적인 이식재료를 개발하는 데는 한계가 있었다.

양막이나 태아조직은 고대 동양에서 약재의 일부로 사용되었으며 이러한 태아 조직이 상처를 치유해 주는 능력이 있다고 추측 되어 왔으며 현대에 와서 양막에 있는 성분이 밝혀 짐으로서 이러한 미신이 사실로 밝혀 졌다. 문헌에는 1913년 Sabeta⁶⁾가 처음으로 피부이식에서 생체 드레싱 재료로 이용하였다고 보고 하였으며 이후 부분 증 화상이나 궤양, 수술 후 절개 부위의 치료와 상처부위에 드레싱 재료로 사용 되어 왔다. 양막은 인체에 해가 없고 면역반응이 거의 없는 장점을 가지고 있으며 최근에는 다양한 성장 및 분화 인자 존재(EGF, EGF-R, TGF, VEGF, IGFs, HGF, TIMP-1)함의 밝혀 졌으며⁷⁾ 기저막 성분 및 collagen I, III, IV를 포함하고 있어⁸⁾ 상처치유의 촉진역할에 대하여 새로운 연구가 진행 되고 있다. 특히 양막에 포함된 여러 가지 인자들이 단백질 분해효소를 억제 하여 항반흔 효과를 나타내고 염증유발 유전자의 발현 역시 억제하는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

본 연구에서는 기존 동종 피부 이식이나 이종 콜라겐의 이식에서 보이는 기저막 부재에 따른 낮은 생착율의 결함을 보완하기 위하여 생물학적 재료인 양막을 이용 함으로서 생체조직에 보다 친화성을 가진 생체 친화 드레싱을 개발하고자 하였으며 양막을 부착한 콜라겐 드레싱 재료를 이용하여 백서의 등에서 전층 피부 결손부의 이식에 사용하였을 때 치유 효능을 기존에 개발되어 있는 Bovine collagen matrix dressing (Terudermis[®]) 재료와 비교하여 양막의 창상치유에 대한 효과를 관찰 하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 양막 콜라겐 드레싱의 제조

(1) 양막의 채취 및 멸균

양막을 태반으로부터 분리하여 의료 및 전임상 실험에 사용하는 내용을 포함한 동의서를 작성하여 산모의 동의를 얻은 후 전량 무상으로 기증 받아서 본 실험을 하였다. 기증자의 선별 기준을 확립하고 양막의 오염여부와 안전성 검증을 위하여

기증자의 혈청학적 시험을 시험과 제조시설에서의 미생물 오염 시험을 진행하였다. 양막의 처리는 Tyszkiewicz⁷⁾ 제시한 양막 조직은행의 원칙을 준수 하였다. 태반은 단국 대학교 산부인과에서 제왕절개를 통하여 적출된 것 만을 사용하였으며 모체의 혈액을 동시에 채취하여 혈청검사를 시행 하여 HBV, HCV, VDRL, HIV에 모두 음성인 모체의 태반만을 이용하였다. 태반은 항생제를 함유하고 있는 4°C의 0.9% NaCl에 저장하여 가져왔으며 4°C의 0.9% NaCl에 여러 번 세척을 하고 난 뒤 양막을 chorion으로부터 기계적인 분리를 하였다. 분리된 양막은 상층의 상피세포를 제거하기 위하여 37°C에서 30분간 트립신 (0.05% trypsin - 0.02% EDTA solution, Gibco, USA) 처리를 하였다. 상피층을 cell scraper를 이용하여 제거 후 적절한 크기로 자른 뒤 폴리에스터/폴리에틸렌 막으로 2중으로 포장하였으며 멸균 하기 전에 -70°C에서 보관하였다. 멸균은 의료 목적의 제품화를 위하여 SAL (sterility assurance level, 10⁻⁶)을 보장하도록 10mev로 25 kGy의 감마선 조사량을 선택하여 멸균하였다. 위의 모든 과정에서 폐기물법 준수하였으며 무균가공, 포장, 멸균은 제품공정의 시작, 중간단계, 최종단계에서 각각 미생물 검사를 시행하는 공정을 확립하였으며 ISO11737-1, 13409 프로토콜을 따라 병력 검사와 문서화 보관을 하였다. 미생물 시험법은 두가지 시험을 병행하였으며 호기성과 혐기성 실험으로 TSA(trypsin soybean agar)배지와 thioglycollate 배지를 사용 하였다. 미생물 시험 공정의 확립을 위하여 배지 성능의 시험은 Bacillus subtilis (ATCC # 6633), Candida albicans (ATCC #10231) 세포주를 구입하여 시험하였으며 미생물 시험에 음성반응을 보인 양막만 사용하였다.

(2) hEGF (human epidermal growth factor) 정량분석 및 면역염색

상처치유인자로 잘 알려진 물질 중 hEGF는 정상세포증식과 상처치유 역할을 수행하는 mitogenic protein으로 조직학적으로 양막에 분포하여 상처치유 효능을 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 이에 본 과제에서는 제품공정 상에서 가공 및 처리된 양막에서도 hEGF가 보존되는지를 판단하기 위하여 ELISA를 통한 EGF의 정량 분석을 하였다. 3명의 환자에서 채취한 양막을 신선상태의 양막, -70°C에서 4주와 16주 동안 보관한 양막과 동결 건조한 양막(freeze-dried amniotic membrane)으로 나누어서 실험을 하였다.

ELISA측정을 위하여 각 양막의 무게를 달고 PBS에 적신 뒤 양막 추출물을 얻었다. 추출물을 15,000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 상층액을 취하였으며 EGF 정량은 본 연구자들이 주문한 EGF 검출 키트(아산제약)를 사용하여 실시하였고 human EGF, anti-hEGF monoclonal antibody에 반응 시켰다. 표준 EGF(KOMA Biotech. INC) 양으로 표준 곡선을 작성하였으며 Sunrise absorbance reader (A5082, Tecan)를 이용하여 흡광도 (540nm)에서 측정하여 시료들의 EGF 양을 결정하였다.

양막의 EGF-R(epidermal growth factor receptor)에 존재를 확인하기 위하여 동결 건조된 양막을 포르말린에 고정 후 파라핀

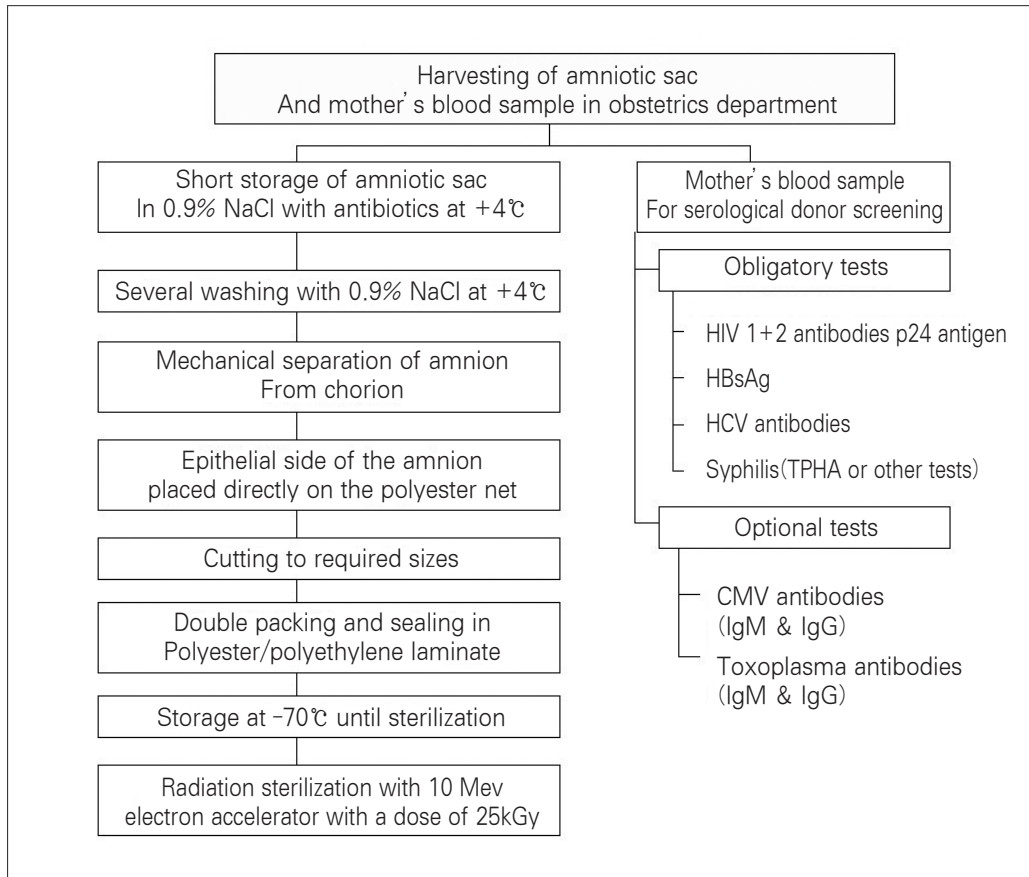


Fig. 1. Preparation of amniotic membrane and donor screening⁷⁾.

블록을 만들었으며 Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor(E3138, Sigma, USA)를 이용한 면역 화학 염색을 통하여 양막에서 EGF의 존재 부위에 대한 확인을 하였다.

(3) 양막 콜라겐 드레싱 제작

동결 건조된 1g collagen powder (Matrixen™-ASL, (주)Bioland)을 10³N HCl (pH3.0) 100ml로 녹여 1% collagen solution으로 만들었다(36.8% HCl 시약 사용시 8.5 μl HCl/100ml DW = 10-3N HCl). 1% collagen solution을 well에 분주 한 후 (6well 기준 : 3ml/well) 동결하였으며 24시간 건조하였다. 건조된 collagen sponge를 MES (2-morpholinoethane sulphoric acid, pH5.5) 용액에 30분간 침수 (50mM MES 20ml/50mg sponge) 하고 collagen sponge를 19.5ml solution에 침수 (Solution : 50mM MES, 33mM EDC, 6mM NHS(N-hydroxysuccinimide)) 하여 실온에서 4시간 동안 방치 하였다. 0.1M Na₂HPO₄ 용액으로 1시간 2회 반복 세척하고 1M NaCl 용액으로 2시간 세척 한 뒤 하룻동안 2M NaCl 용액으로 세척 하였다. 증류수로 추가 24시간 세척 하였으며 동결 건조 후 양막을 부착 하였다. 콜라겐에 양막의 부착을 확인하기 위하여 주사 전자현미경 사진을 촬영 하였다.

(4) 백서 전층피부 결손 후 창상치유 실험

300g 내외의 웅성백서(SD rat) 40마리를 케타민 (ketamine hydrochloride, Ketara®, Yuhan Corp., 40mg/Kg)과 럼푼(xylazine, Rumpon®, Bayer Korea Ltd., 10mg/Kg)을 4:1로 혼합하여 복강내로 주사하여 마취하였으며 등 부위를 면도한 뒤 베타딘으로 소독하였다. 자연적인 치유가 일어나지 않는 범위의 피부결손 부를 만들기 위해 28mm 직경의 panniculus carnosus를 포함하는 원형의 전층 피부 결손부를 형성 하였으며 상방 정중앙과 하방에 2군데 결손부를 만든 후 상방 중앙은 대조군(C)으로서 피부결손 생성 후 아무런 이식을 하지 않고 바셀린 거즈를 이용하여 드레싱 하였으며 하방 좌측에 양막을 양측으로 부착한 콜라겐(AM)을 이식 하였고 하방 우측에는 현재 상품화 되어 있는 Terudermis® (T)를 이식하였다. 4-0 Silk(아이리, 한국)를 이용하여 4-6군데 봉합을 하여 고정하였으며 몸통 부위를 접착 테이프를 이용하여 감싸서 이식재료의 이탈을 방지하였다.

1) 창상 면적 변화

이식 후 3일, 7일, 14일, 28일에 각 10 마리씩 과량의 케타민과 럼푼을 복강내 주입하여 희생하였으며 투명 필름을 사용하여 이식 부위에 직접 접촉하여 가장자리를 그린 후 Scion Image

(Ver. beta 4.02, NIH) 프로그램을 이용하여 스캔 후 면적을 구하였다. 창상 면적 변화율은 아래의 공식과 같이 구하였으며 원래 면적에서 이식 후 면적을 빼 값을 다시 원래 면적으로 나누어 변화면적을 %로 구하였다. 이식 후 면적의 조사는 상피화가 되지 않은 부위 면적을 측정하였으며 상피화가 완전히 된 부위는 0으로 하였다.

창상면적 변화율

$$= \frac{(\pi \times 14^2 \text{mm}^2 - \text{이식 후 면적 mm}^2)}{\pi \times 14^2} \times 100$$

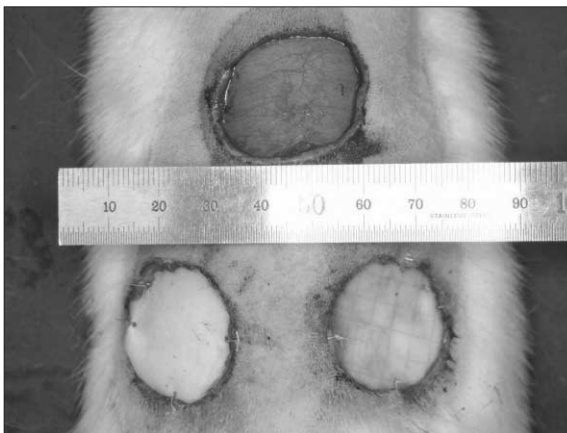


Fig. 2. Upper center : no graft (Control : C), Lower left : AM with collagen(AM), Lower right : Terudermis®(T).

2) Cinamon's scoring system & 조직현미경적 평가

이식을 한 후 평가는 거시적 평가와 미세 현미경적 평가를 종합적으로 하였으며 1993년 Cinamon 등¹¹⁾이 개발한 material performance scoring을 사용하였다. Cinamon의 이식재료 평가 방법은 2가지 항목으로 나누며 첫째 거시적인 평가는 각 이식체의 부착 정도를 3가지 단계로 구분하여 창상에서 떨어진 경우는 0점, 약하게 붙어 있는 경우는 1점, 단단히 붙어 있는 경우는 2점 등으로 평가 하였으며 이식체의 색조와 유연성을 평가 하였다. 둘째로 미세 현미경적 평가에서는 H & E 염색을 통하여 구조적인 일체성과 염증세포의 침윤정도 그리고 부착정도를 평가하였다. 미세 현미경적 평가는 0, 2, 4점으로 점수를 매기며 Cinamon's scoring의 총점은 18점이다 (Table 1).

통계학적 분석은 GraphPad Instat® Ver 3.05를 이용하였으며 각 실험 군간의 총점의 비교를 위하여 유의수준 95%에서 Kruskal-Wallis test를 하였으며 각 군간의 차이가 있는지 비교하기 위하여 Dunn's multiple comparison test 를 시행하였다.

3) 면역 화학 염색 (Factor VIII)

이식체의 생착 관찰을 위하여 진피부의 재혈관화 정도를 미세혈관의 수로 나타내었다. 미세혈관의 염색을 위하여 Rabbit anti-human von Willebrand factor polyclonal antibody (Chemicon, AB7356)을 사용하였으며 광학 현미경에서 40배율에서 혈관의 밀도가 높은 곳 3군데를 골라서 200 배율에서 미세 혈관의 수를 세었으며 세로도 잘린 혈관과 적혈구의 지름 8배 이상 되는 혈관은 제외 하였다. 하나의 내피세포와 내피세포가 뭉쳐진 것은 혈관으로 간주하여 미세 혈관 수에 포함 하였으며 12군데의 미세 혈관 수를 평균을 내었다¹²⁾. 통계처리는 각 실험 군간의 평균 미세혈관 수를 비교를 하였으며 위의 통계방법을 사용하였다.

Table 1. Criteria for assessment and scoring of material performance

Macroscopic	Score		
	0	1	2
Adherence	separated from wound	loosely adherent	tightly adherent
Color	blackened	mat gray or brown	normal
Pliability	very rough	minimally hardened	pliable and smooth
Macroscopic	Score		
	0	2	4
Structural integrity	destroyed	partially destroyed	maintained
Leukocyte infiltration	intense and/or in material	similar to control wound	not observed
Adherence	separated from wound	loosely adherent	tightly adherent

Ⅲ. 결 과

1. 양막 콜라겐 드레싱의 개발

(1) 양막의 EGF정량 분석 및 EGF-R 면역 염색

3명의 모체에서 조사한 EGF양은 아래 표와 같으며 나이와 보관상태에 따라 거의 차이가 없었다. EGF의 양은 3군에서 모두 신선 양막에서 가장 높은 수치를 보였지만 2군에서 동결 건조한 양막과 거의 같은 수치를 보였다. 이는 동결 건조 처리과정을 거쳐도 상피세포의 성장에 도움을 주는 EGF의 양이 보존이 되는 것으로 장기간의 보존이 가능할 것으로 판단되었다.

EGF-R에 대한 면역조직화학염색을 시행한 결과 EGF-R가 양막의 상피층에 양성 반응을 나타 내었으며 EGF-R 역시 동결 건조 후에도 양막에서 보존되는 것으로 판단되었다.

Donor age	Fresh (pg/mg)	Deep frozen		FD (pg/mg)
		4w	16w	
26	3.02	2.20	2.30	2.31
29	2.53	2.27	2.16	2.54
37	3.89	3.40	3.20	3.7

주사 현미경을 통한 양막의 하방 콜라겐에 대한 부착을 확인한 결과 단단한 부착을 볼 수 있었으며 하방의 콜라겐 섬유는 양막에 사선으로 부착됨을 보였다. 양막은 비교적 편평한 면을 보였으며 양막의 두께는 5 μ m 내외로 관찰되었다.

2. 백서에서 창상치유 실험 결과

(1) 창상 면적 변화

이식 수 3일에 대조군(C)에서는 8.72 \pm 2.45%의 창상의 감소가 보여 가장 많은 수축을 보였다. 이는 초기 공간유지가 없는 상태에서 초기 수축에 의한 감소로 판단 되었다. 이에 비해 AM과 T군은 초기에는 드레싱이 공간을 유지하고 있었으며 봉합사로 드레싱이 유지되어 초기 3일의 창상은 2% 이내의 수축을 보였다.

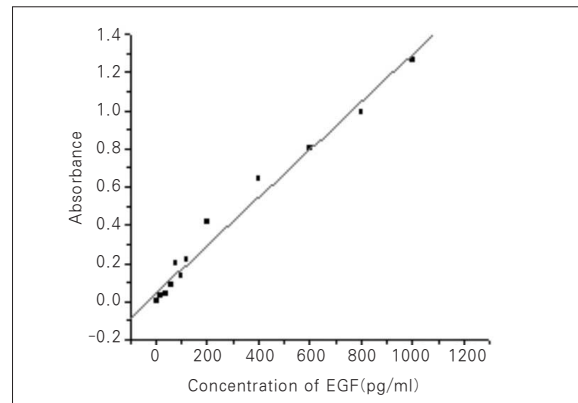


Fig. 3. ELISA result : quantification table and curve of EGF in fresh, deep frozen and freeze-dried amniotic membrane (FD: freeze-dried).

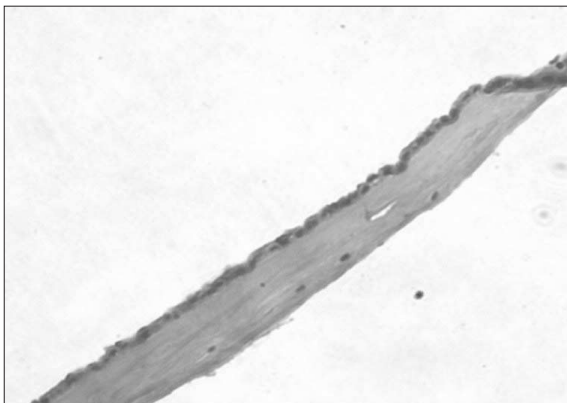


Fig. 4. Immunohistochemical staining of EGF-receptor - dark brown color is the positive area of EGF-R.

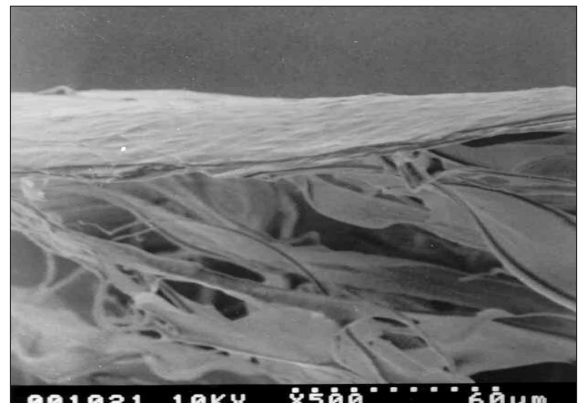


Fig. 5. Scanning electron microscopic examination - Amniotic membrane was well attached to collagen fiber (\times 500).

1주와 2주군에서는 대조군이 약 25%의 치유를 보인데 비하여 AM과 T군은 52-57%의 치유를 보였으며 창상부위는 scab으로 덮여 있었다. 대조군은 쉽게 떨어지는 scab으로 덮여 있었으며 쉽게 출혈이 되었다. 이에 비하여 AM군의 scab은 가장 부드러운 표면을 보였으며 안정된 치유를 보였다. T군 역시 50%이상의 창상면적 감소를 보였으나 표면은 AM군 보다는 더 딱딱하였으며 일부에서 하방의 창상 부위와 분리 되어 있었다.

4주군에서는 AM과 T군은 창상 치유가 거의 완성 되어 미세 부위의 상피화만 덜 되었으며 99% 이상 창상 치유가 완성 되었다. 이에 반해 대조군은 4주가 지나서도 약 25% 정도의 치유만을 보여 1, 2 주와 차이를 거의 보이지 않았으며 자연치유가 발생하지 않음을 보였다.

(2) Cinamon's scoring system

각군의 총점 평균은 다음 표(Table 3)와 같으며 대조군에서는 상처의 치유가 완전히 일어나지 않아 지속적인 염증세포의 침윤이 관찰 되었으며 Scab 역시 생겼다가 자주 탈락 하는 현상이 보였으며 출혈이 잦음을 보였다. 대조군은 4주가 지나도 치유가 완전히 되지 않아 총합계 점수도 1, 2 주와 비슷한 3.7±0.95를 보였다.

AM 군에서는 3일과 7일에 양막의 항염증 효과와 성장인자의 초기 효능에 의하여 다른 군보다 좋은 효과를 보였으며 이는 양막의 창상치유 능력에 있어서 초기에 중요한 작용을 하는 것으로 보였다. 부착도에 있어서는 AM군에서 좋은 효과를 보였으며 T군과 비교 하였을 때 비슷한 결과를 보였다. AM군

Table 2. Healing Rate of Control and experimental group

	3 Day	1 Week	2 Weeks	4 Weeks
C	8.72±2.45	24.88±2.90	28.21±2.84	24.88±2.90
T	1.87±2.45	55.85±5.38	57.97±5.55	99.19±0.77
AM	1.46±1.38	58.05±5.30	52.85±8.33	99.27±0.71

(C ; control group, AM ; Amniotic membrane + collagen group, T ; Terudermis® group)

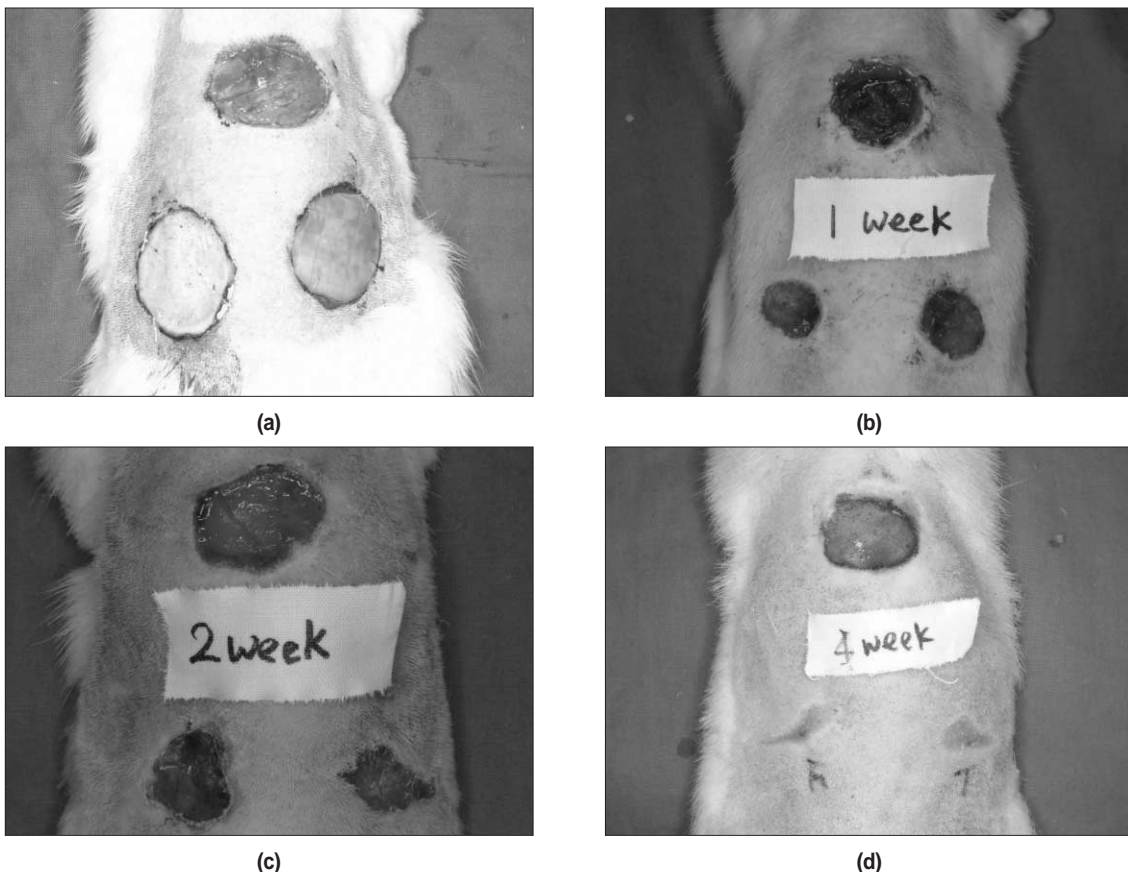


Fig. 6. Macroscopic observation of full-thickness skin defect (Upper center : no graft, Lower left : AM with collagen, Lower right : Terudermis®) No complete healing was observed in control group after 4 weeks.

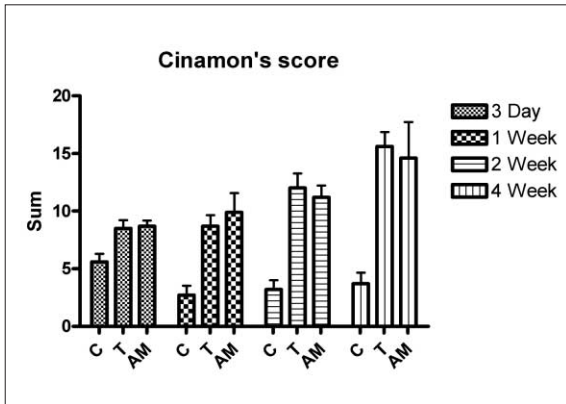
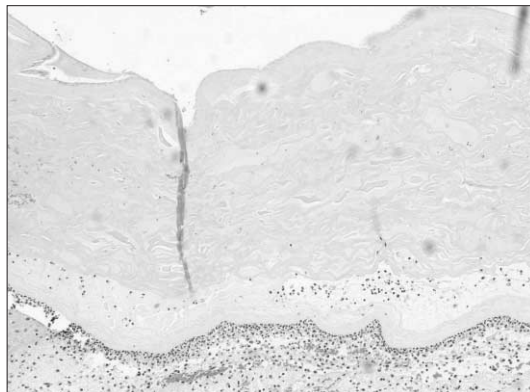


Fig. 7. Total score of Cinamon's material performance test.

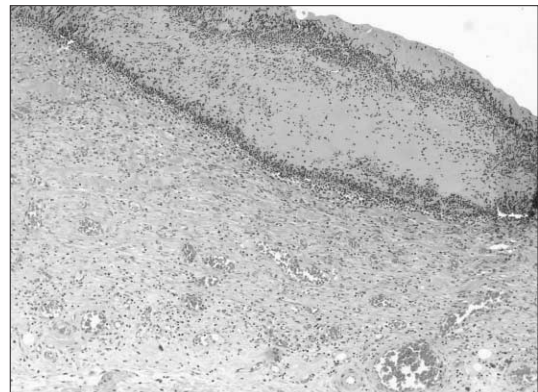
에서 창상부위의 유연성에서 가장 좋은 결과를 보였으며 이는 이식부위를 만졌을 때 가장 유연한 상태를 나타내었다. 이에 반해 드레싱을 하지 않은 대조군에서는 창상부위가 딱딱한 scab으로 덮여 있었으며 쉽게 탈락 하였다. 구조적인 일체성에서도 하방의 조직과 접촉이 좋은 AM군에서 가장 좋은 결과를 나타 내었다. 염증세포의 침윤은 T군에서 가장 적었으나 AM군에서도 농양의 형성을 보이지 않았다. 시기별로 총점을 구하여 비교한 결과 3일군에서 실험 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며($p>0.05$) 1주군에서는 대조군과 AM군 사이만 유의적인 차이를 보였다($p<0.05$). 2주와 4주군에서는 대조군과 AM, T군은 모두 유의적인 차이를 보였으며($p<0.05$), AM군과 T군 사이는 유의적인 차이가 없었다($p>0.05$).

Table 3. Cinamon's scoring system

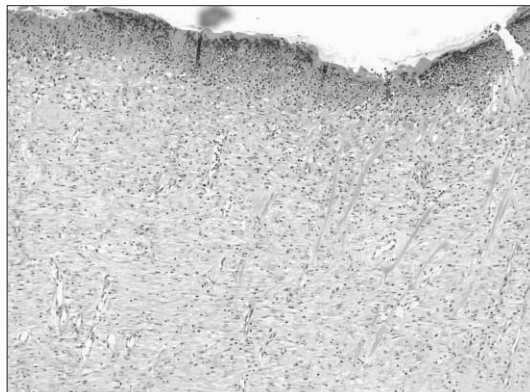
	3 Day	1 Week	2 Weeks	4 Weeks
C	5.6±0.70	2.7±0.82	3.2±0.79	3.7±0.95
T	8.5±0.71	8.7±0.95	12.0±1.25	15.6±1.26
AM	8.7±0.48	9.9±1.66	11.2±1.03	14.6±3.13



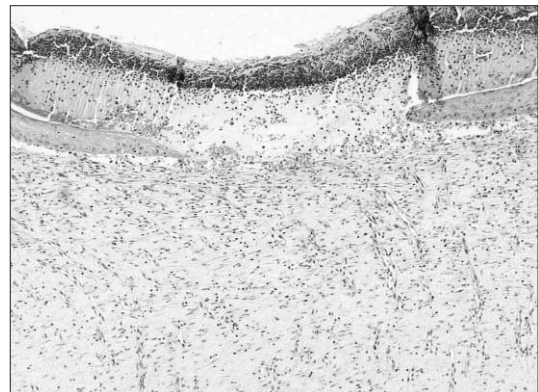
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 8. H & E staining of AM group. (a) Day 3, (b) 1 week, (c) 2 weeks, (d) 4 weeks (×200)

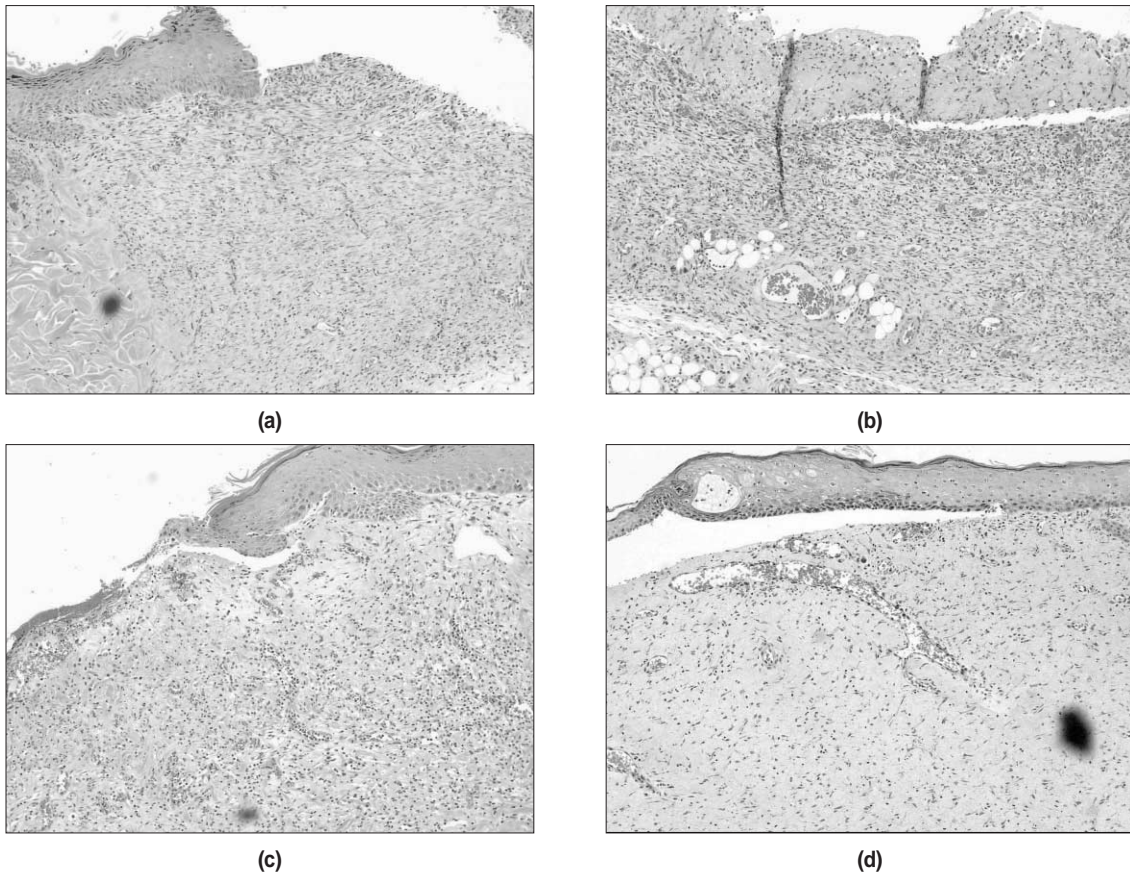


Fig. 9. H & E staining Terudermis group. (a) Day 3, (b) 1 week, (c) 2 weeks, (d) 4 weeks

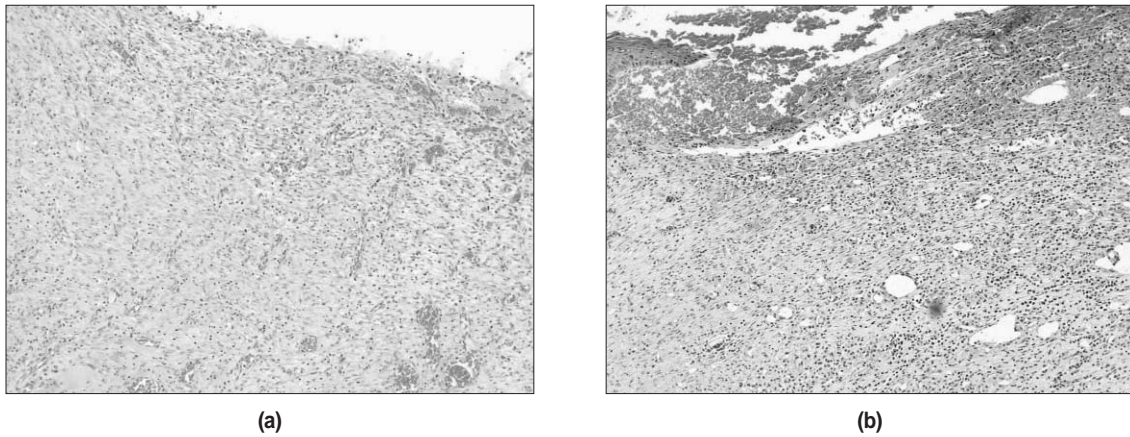


Fig. 10. H & E staining of Control group. (a) 1 week, (b) 4 week. Massive infiltration of inflammatory cells were found in Subepithelial connective tissue. (×200)

(3) 조직학적 검사

H&E염색에서 AM군에서는 양막이 하방의 피부결손부위에 부착이 잘 되어 있는 것을 관찰 할 수 있었으며 하방의 염증세포 침윤을 막아 주었다. 3일 군에서는 양막의 직하방에 많은 염증 세포가 침윤 하였으나 상방의 콜라겐으로 이동을 하지 못

하였으며 이는 양막의 항염증 효과가 나타난 것으로 판단되었다(Fig. 8-a). 7일 군에서는 염증세포의 침윤이 3일 보다 심해 졌으나 양막 드레싱은 하방의 창상에 잘 부착 되어 있었으며 미세혈관의 생성이 시작되기 시작하였다(Fig. 8-b). 2주군에는 일부 콜라겐은 흡수 되고 탈락 되었으며 scab이 생겨서 하방의 창

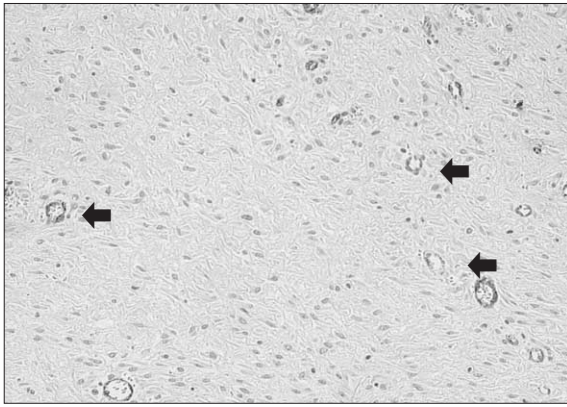


Fig. 11. Factor VIII immunohistochemical staining for microvessel (arrow) (T group, 4 weeks, ×400).

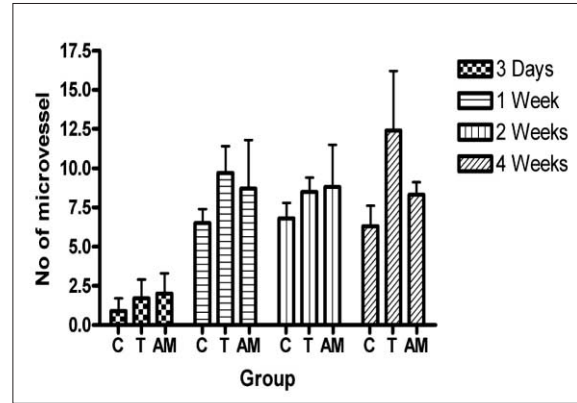


Fig. 12. Number of microvessels (C-control, T-Terudermis, AM-Amniotic membrane attached to collagen).

상에 부착되어 있었으며 scab에는 염증세포가 많이 관찰되었지만 하방의 결합조직에는 염증이 적어졌으며 미세혈관의 형성이 관찰되었다(Fig. 8-c). 4주군에서는 일부 치유가 안된 부위가 있었으나 상피의 이동이 일어났으며 염증 반응은 거의 없었다(Fig. 8-d).

T군에서는 3일에는 창상에서 일부 분리된 것을 관찰할 수 있었으며 이는 아직 하방에 생착이 되지 않은 것으로 판단되었다(Fig. 9-a). 7일 군에서는 하방으로 염증세포의 침윤이 관찰되었고 상방의 드레싱 재료로 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 이는 콜라겐이 하방의 삼출액이나 혈액을 흡수하여 발생된 결과이며 이로 인하여 일부 콜라겐의 흡수가 시작되었다(Fig. 9-b). 2주 군에서는 콜라겐이 흡수되거나 탈락되었으며 창상의 가장자리에서 상피가 자라 들어오는 것이 관찰되었으나 아직 창상 하방에 염증세포는 많이 관찰되었다(Fig. 9-c). 4주 군에서는 일정한 두께를 가진 상피로 완전 재생이 되었으며 일부 하방의 결합조직과 분리되어 있으나 염증세포는 많이 감소하였으며 상피 직하방에 다수의 미세혈관을 관찰할 수 있었다(Fig. 9-d).

C군은 1주와 4주에 모두 과도한 염증반응이 관찰되었으며 창상의 중앙 부위는 4주에서도 상피화가 완전하지 않았으며 scab으로 이루어져 있었다(Fig. 10).

(4) Factor VIII 면역화학 염색

1주와 2주 군에서는 T군이 AM 군에 비하여 약간 많은 수의 미세혈관을 보였으나(Fig. 11) 유의적인 차이는 없었으며 ($p>0.05$) 4주 군에서는 AM군 보다 T군이 유의할 만한 수준의 더 많은 수의 미세혈관을 보였다($p<0.05$) (Fig. 12).

IV. 고 찰

몸 전체의 50%이상의 전층 화상은 자가 부분층 피부 이식으로는 치료가 어려우며 다양한 생물학적 드레싱 재료를 이용하

여 수분의 소실과 감염을 방지한다. 구강악안면 영역에서 구강암의 제거술 후 피부 피판을 이식하여 재건하게 되고 이 중 많이 사용되는 전완 피판이나 족배 피판의 경우 피판의 공여부에 피부이식이 필요하게 된다. 피부이식의 공여부는 주로 대퇴부를 이용하며 채취 후 공여 부위는 통증이 심하고 국소적인 박테리아성 감염의 위험성이 높아 생체 적합성을 가진 드레싱 재료를 사용하여 왔으며 현재는 hydrocolloid로 만들어진 Duoderm[®]이나 폴리우레탄으로 만들어진 Mediform[®]을 주로 이용하지만 고가이며 합성 재료이어서 이용의 제한이나 생착의 지연 등의 문제점 많았다. 이러한 전층 피부 결손을 치료하기 위하여 콜라겐을 이용한 창상치유 역시 많은 연구가 되어 왔으며 생체내에서 collagenase에 의해 쉽게 분해되는 것을 방지하기 위하여 가교(cross-linking)를 하여 강화시킨 제품이 사용되고 있다¹³⁾.

본 연구에서는 콜라겐을 가교 처리한 후 다시 양막을 부착하여 콜라겐의 드레싱 효능과 양막의 생물학적 효능을 결합하여 보다 생체 적합한 생물학적 드레싱을 만들고자 하였다. 양막의 경우 환자의 동의만 구하면 저렴한 비용으로 간단한 과정을 거쳐 대량으로 구할 수 있으며 항염증 작용과 재생피화 촉진작용을 하는 것으로 알려져 있어 궤양이나 화상의 치료에 많이 사용되어 왔다¹⁴⁾. 특히 부분층 피부이식을 한 공여부의 드레싱으로 이용되거나 부분층 화상을 입은 부위에 유용하게 사용되어지며 통증의 감소와 창상치유를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 양막은 보관 역시 용이하여 20%의 글리세린(glycerin) 용액에 저장하여 액화 질소에 보관하거나 신선조직을 1% 항생제 용액에 담가 냉장고에 보관하면서 사용할 수 있으며 동결건조를 통해 멸균 포장을 한 경우 3년까지 보관할 수 있다⁷⁾.

양막은 다양한 성장인자를 포함하고 그 중 특히 상피세포의 성장과 이주를 도와주는 성장인자인 EGF가 포함되어있음이 보고되었다. 하지만 양막은 장기간 보관을 하기 위하여서는 동결 건조 과정이 필요하고 콜라겐과 결합이 필요하거나 단독으로 사용할 때도 동결 건조를 하게 되면 유용하게 조작할 수

있다. 하지만 이러한 처리 과정을 거쳤을 때 기존의 성장인자가 파괴 되면 생물학적인 효능이 떨어지므로 신선 상태와 초저온 저장 및 동결건조 시 성장인자 중 EGF의 양이 보존되는지를 확인하였다. 본 연구에서 EGF의 ELISA결과 신선양막과 냉동 보관과 동결건조 보관상태의 양막에서 EGF의 양은 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 양막의 채취 후 동결건조나 냉동 보관을 하여도 성분의 변화가 없는 것으로 양막의 부착된 동결건조 양막도 신선한 양막과 비슷한 성장인자를 가지고 있다고 판단되었으며 동결건조법으로 처리한 양막은 장기간 보존하기가 쉬운 장점이 있어서 조각이나 이식 하기에 적절하다고 판단되었다.

양막이 이식된 부위는 양막의 혈관생성 작용에 의해 많은 양의 육아조직이 관찰되며 이는 추가적인 이식에 좋은 환경을 만든다. 그리고 양막은 얇으며 유연성이 좋아 불규칙한 표면에도 적합이 잘되어 다른 동종이나 이종 이식재에 비하여 감염율을 낮춘다고 보고되었다⁶⁾. 하지만 양막만을 사용하여 넓은 피부결손부위를 드레싱한 경우에는 표면이 쉽게 건조하게 되어 떨어져 반복하여 드레싱을 하여야 하는 단점을 가지고 있다⁶⁾. 본 연구에서는 이러한 단점을 극복하고자 양막의 하방에 콜라겐을 이용한 스캐폴드를 적합시켜 진피 역할을 할 수 있는 부위를 만들어서 창상의 치유를 촉진시키고 드레싱을 하거나 봉합을 할 때 조각이 쉽게 하였다

본 연구에 사용된 콜라겐은 백서 꼬리부분의 인대에서 추출한 콜라겐으로 기존의 콜라겐 제조 방법은 콜라겐 분자의 가교방법으로 화학시약인 glutaraldehyde (GAD)를 사용하여 처리하여 이식 후 collagenase와 같은 효소들에 의한 분해를 지연시키는 방법이다. 그러나 이러한 기존의 제조 방법은 주로 조직 고정액으로 사용되는 GAD시약을 사용함에 따라 이식 후 콜라겐 스캐폴드가 점차 분해되면서 함께 용출되는 GAD에 의한 세포독성의 문제점이 지적되고 있다. 그러므로 저자들은 콜라겐을 제조하는 과정에서 화학가교시약을 사용하지 않는 방법을 이용하여 콜라겐을 제조 하였으며 송아지로부터 추출한 콜라겐의 항원성을 절단한 atelocollagen과 열변성된 콜라겐을 원료로 하여, in vivo에서 관찰되는 것과 유사한 banding pattern을 갖는 fiber 형태의 콜라겐 스캐폴드를 제조하는 것으로서 보다 우수한 생체친화성을 갖는 장점을 가지고 있었다. 비교 재료로 사용된 Terudermis®제품은 하층의 콜라겐 스캐폴드와 상층의 실리콘 막으로 구성된 이중구조로 되어 있으며, 역시 화학시약을 사용하지 않고 송아지에서 추출한 콜라겐을 원료로 하였으며 상부의 실리콘 막을 부착하여 신생진피가 형성되기 까지 감염 방지, 습윤 환경 유지 등의 역할을 하게 하였으며 봉합 시 유리하게 작용할 수 있게 하였다. 백서의 창상치유에 사용된 결과 2주경에는 진피 하방의 섬유모세포가 콜라겐 내부로 성장 해서 들어가는 것으로 확인 되었으며 모세혈관도 형성 되었다¹³⁾. 하지만 이 제품도 역시 실제 피부에 있는 기저막 층이 없음에 따라 이식 시 신생 진피의 형성이 되나 표피층의 추가이식 시 생착 지연 등의 단점을 가지고 있다.

본 연구에서는 이러한 기저막 부재에 따른 단점을 극복하고

자 콜라겐 하방에 양막을 추가로 부착하여 기저막의 역할을 대신 하도록 하여 좋은 결과를 보였다. 특히 콜라겐과 양막의 부착은 특별한 접착제 없이 가능 하였으며 이는 콜라겐이 액체 상태일 때 쉽게 제작 할 수 있는 장점이 있었다. 양막과 콜라겐의 결합은 약45도 각도로 부착되어 결합력이 충분하였다.

전층 피부결손을 형성한 뒤 이식한 창상치유 실험에서 양막은 초기에 콜라겐으로 염증세포의 침윤을 막아주는 역할을 하였으며 이는 초기 콜라겐의 빠른 흡수를 막아서 쉽게 드레싱이 탈락하는 단점을 방지 하였으며 부드러운 표면은 하방의 장액이 나오는 상태에서 접착이 잘 되게 하였다. 이는 다른 기존에 제품이 실리콘을 사용하는 것 보다 나은 효과를 보였으며 안정적인 창상을 만드는데 기여 하였다.

전층의 피부 결손 된 창상의 경우 그 치유 과정 동안 콜라겐 matrix에 의한 수축 감소에 대한 연구는 여러 연구자들에 의해 이미 보고되어 왔다^{13,17)}. 즉, 창상의 수축이 많이 진행되어 수축율이 높을수록 치유 후에 반흔형성과 켈로이드형성(keloid formation) 등의 장애가 발생할 확률이 높아진다. 본 실험에서는 3일군에서는 대조군 가장 높은 수축율을 보였다. 이것은 초기 공간 유지 능력이 없기 때문이며 초기에는 과 수축을 막는 것이 중요한 것으로 사료 되었다. AM과 T군은 1주 지난 뒤는 50%이상의 치유를 보였으며 4주에는 99% 이상 치유를 보였다. 하지만 대조군은 4주가 지난 뒤에도 25%만의 치유를 보여 피부 결손부에 생체 적합한 드레싱의 중요성을 확인하여 주었다. AM과 T군은 서로 비슷한 창상 치유 효능을 보였으나 AM군은 초기에 염증을 억제하는 능력이 탁월 하였으며 표면의 유연성에 있어서도 뛰어난 결과를 보였다. 이는 기존에 시판되고 있는 상품의 대체 가능성을 시사하였다.

미세혈관 수의 관찰 결과 1주에서 급격한 증가를 보였으며 이는 생착이 1주부터 활발히 일어나는 것을 확인하여 주었으며 T군에서 통계학적으로 차이가 있는 가장 많은 수의 미세혈관이 관찰 되어 생착에 있어서는 T군이 AM과 C군에 비하여 우수함을 알 수 있었다.

V. 결 론

동결건조처리과정을 거친 양막은 EGF와 EGF-R이 잘 보존되어 있었으며 콜라겐에 부착하여 생물학적 드레싱재료로 제작 할 수 있었다. 백서 등의 창상치유 모델에서 치유 효능의 결과 대조군에 비하여 월등한 치유 능을 나타내었으며 기존에 개발된 제품과도 유사한 효능을 보였다. 조직학적 검사에서 양막의 항염증 작용을 확인 할 수 있었으며 AM과 T군의 미세혈관은 1주부터 급격히 증가하여 활발한 생착과정이 일어남을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Compton CC, Gill JM, Bradford DA, Regauer S, Gallico GG, O'Connor NE: Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A

- light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Lab Invest* 1989;60(5):600-12.
2. Barret JP, Dziewulski P, McCauley RL, Herndon DN, Desai MH: Dural reconstruction of a class IV calvarial burn with decellularized human dermis. *Burns* 1999;25(5):459-62.
 3. Tsai CC, Lin SD, Lai CS, Lin TM: The use of composite acellular alodermis-ultrathin autograft on joint area in major burn patients--one year follow-up. *Kaohsiung J Med Sci* 1999;15(11):651-8.
 4. Heitland A, Piatkowski A, Noah EM, Pallua N: Update on the use of collagen/glycosaminoglycate skin substitute-six years of experiences with artificial skin in 15 German burn centers. *Burns* 2004;30(5):471-5.
 5. Wisser D, Rennekampff HO, Schaller HE: Skin assessment of burn wounds covered with a collagen based dermal substitute in a 2 year-follow-up. *Burns* 2004;30(4):399-401.
 6. Sabeta. Use of fetal membrane in skin grafting. *Med Rec NY* 1913;83:178.
 7. Tyszkiewicz JT, Uhrynowska-Tyszkiewicz IA, Kaminski A, Dziedzic-Goclawska A: Amnion allografts prepared in the Central Tissue Bank in Warsaw. *Ann Transplant* 1999;4(3-4):85-90.
 8. Yam HF, Pang CP, Fan DS, Fan BJ, Yu EY, Lam DS: Growth factor changes in ex vivo expansion of human limbal epithelial cells on human amniotic membrane. *Cornea* 2002;21(1):101-5.
 9. Bourcier T, Patteau F, Borderie V, Baudrimont M, Rondeau N, Bonnel S, et al: [Amniotic membrane transplantation for the treatment severe acanthamoeba keratitis]. *Can J Ophthalmol* 2004;39(6):621-31.
 10. Valente S, Souto B, Balter H, Welling MM, Roman E, Robles A, et al: Interaction of a monoclonal antibody against hEGF with a receptor site for EGF. *Nucl Med Biol* 1999;26(8):937-42.
 11. Cinamon U, Eldad A, Chaouat M, Wexler MR, Israeli A, Zagher U, et al: A simplified testing system to evaluate performance after transplantation of human skin preserved in glycerol or in liquid nitrogen. *J Burn Care Rehabil* 1993;14(4):435-9.
 12. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML: Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992;23(7):755-61.
 13. Matsui R, Osaki K, Konishi J, Ikegami K, Koide M: Evaluation of an artificial dermis full-thickness skin defect model in the rat. *Biomaterials* 1996;17(10):989-94.
 14. Colocho G, Graham WP, 3rd, Greene AE, Matheson DW, Lynch D: Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing. *Arch Surg* 1974;109(3):370-3.
 15. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC: The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol* 1992;150(2):243-55.
 16. Ward DJ, Bennett JP: The long-term results of the use of human amnion in the treatment of leg ulcers. *Br J Plast Surg* 1984;37(2):191-3.
 17. Kashiwa N, Ito O, Ueda T, Kubo K, Matsui H, Kuroyanagi Y: Treatment of full-thickness skin defect with concomitant grafting of 6-fold extended mesh auto-skin and allogeneic cultured dermal substitute. *Artif Organs* 2004;28(5):444-50.