

**생분해성 고형물에 흡착시켜 실험동물에 국소 투여한 홀미움-166
Chitosan 복합체의 투여량, 기간 및 부위에 따른 조직의 괴사 정도와
양상**

이종석, 최창운, 정위섭, 우광선, 이태섭, 이수진, 임수정, 김은희, 임상무

**Histological Changes in the Normal Tissues of Rat after Local
Application of the Holmium-166 Chitosan Complex attached to
Biodegradable Solide Material**

원자력병원

서울시 노원구 공릉동 215-4

요약

방사성 동위원소인 홀미움-166과 chitosan 복합체를 외과적으로 도달한 생체 조직내에 투여하고 그 후 투여량과 기간, 투여 조직에 따른 조직학적 반응 양상과 그 정도를 분석하고자 하였다. 생체에 흡수되는 젤라틴 재질의 고형물에 액체 상태의 ^{166}Ho -chitosan 복합체를 부착하고 건조시킨 후 약 1.5 mCi 정도의 방사능 활성도가 되게 하였다. 이를 외과적 수술을 통하여 약 300g 되는 흰쥐의 대퇴 근육내와 대퇴골에 접촉되게 삽입하고 봉합하였다. 삽입 후 2, 4, 6주에 조직을 채취하여 연부조직과 골조직의 괴사 정도와 양상을 평가하였다. 유발된 조직 괴사의 범위는 약 3mm로 실제 임상 적용에 이용될 수 있는 토대가 될 것이며 시술 결과 실험동물의 사망을 유발하지도 않았으며 상처의 괴사, 염증, 감염 등의 시술에 따른 부작용이 없어 생체 적용에 안전한 방법으로 생각된다.

ABSTRACT

PURPOSE

The aim of this study was to find out a clinically applicable method to insert a biodegradable solid material containing holmium 166-chitosan complex into the surgical field, and to evaluate the histological changes in the normal tissues after irradiation from holmium 166 according to the dose, period and type of

tissues.

MATERIALS AND METHODS

111MBq, 50 μ l of the liquid state ^{166}Ho -chitosan complex was attached to the absorbable gelatin sponge, the size of which was 7 x 7 x 5 mm. After 24 hours in the sterile bench for drying up of the liquid ^{166}Ho -chitosan complex, the radiation activity measured by dose calibrator was 56MBq.

These ^{166}Ho -chitosan complex containing absorbable gelatin sponges were inserted into thigh muscles and over the femur bones of the Wistar rats, weighed by 300 gram. The control group was prepared by inserting only absorbable gelatin sponge. One control case and 10 radioactive absorbable gelatin sponge cases were evaluated at 2 weeks after insertion, and at 4, 6 weeks (total number ; 33) with respect to the histological changes of the soft tissues and bone, the depth of the tissue necrosis, and the changes of the ^{166}Ho -chitosan complex containing absorbable gelatin sponges.

RESULTS

The histological changes at 2 weeks after the ^{166}Ho -chitosan complex insertion were as follows; In the muscle, coagulation necrosis, degenerating myocyte, regenerating myocyte, intermuscular edema, inflammatory cells were observed and the average necrosis depth was 3.3mm (range ; 2.5-4.0, STD ; 0.54). In the bone, no osteocyte in the lacuna of cortex (empty lacuna), marrow fibrosis, inflammation and the average necrosis depth was 2.9mm (range ; 2.0-4.5, STD ; 0.82). At 4 weeks, in the muscle, calcification and increased fibrosis with average necrosis depth by 3.3mm (range ; 2.5-4.0, STD ; 0.48) were found in addition to the findings of 2 weeks. In the bone, additional findings were, increased marrow fibrosis with necrosis depth by 3.3mm (range ; 1.5-5.0, STD ; 1.0). At 6 weeks, soft tissue shrinkage, increased fibrosis and granulation tissue formation, and nearly resolving inflammatory reaction were the findings.

CONCLUSIONS

The local application of the ^{166}Ho -chitosan complex attached to biodegradable gelatin material with surgery in the laboratory animals resulted in no mortality, no wound complication, and satisfactory tissue necrosis induced by β -ray irradiation.

Key Words : Holmium 166, Absorbable gelatin sponge, Tissue necrosis

1. 서론

악성 종양의 치료에 방사선이 사용된 역사는 비교적 길고 방사선 치료법의 발전으로 과거에 비해 치료의 영역을 지속적으로 넓혀온 것이 사실이다. 하지만 악성 종양의 치료 분야에서 주로 사용된 체외 방사선(external beam irradiation)은 고에너지의 감마선에 의한 것으로 이는 체내 투과성이 좋아 국소 침투가 광범위하게 이루어지는 악성 세포의 사멸을 깊고 넓게 성취할 수 있어 종양의 완전한 절제가 어려운 경우 국소 수술의 보조 요법으로 좋은 선택의 한 가지였다. 하지만 이런 장점의 이면으로 종양에 침투되지 않은 정상조직 예를 들면 피부, 주요 장기(vital organ), 뼈, 신경, 혈관 등에도 원하지 않는 방사선 조사가 이루어져 피부괴사, 섬유화, 인접 장기의 손상, 방사선 조사에 의한 2차적 악성 종양(radiation induced secondary malignancy)의 발생 등을 피하기 어려웠다.

악성 종양의 절제시 종괴(tumor mass)를 전혀 남기지 않고 최소한의 하지만 최적의 절제후 microinvasion을 제거할 수 있는 제한적인 국소 방사선치료를 시행할 수 있다면 국소재발의 문제와 사지 기능의 보존 문제 및 외부조사 방사선 치료의 합병증 등을 해결할 수 있을 것이다. 특히 종양의 일부가 주요 신경-혈관계에 근접한 경우 절단수술이 아닌 종양 절제수술후 잔존 가능성이 있는 혈관부위에 적절한 국소 방사선조사로 국소재발을 해소 할 수 있으며 또한 과도한 방사선 조사로 인한 건강한 주위조직의 손상을 최소화 할 수 있고, 외부 방사선 치료와 병용할 경우 방사선 조사량을 줄일 수 있는 장점도 있을 것이다.

베타 방사선은 에너지가 작기 때문에 주로 진단용이나 제한적으로 치료용으로 사용되었지만 사지의 육종치료에는 사용되지 못하였다. 하지만 이런 침투력의 제한적인 면이 보다 특정적인 곳에 정상조직을 손상시키지 않고 방사선 조사를 할 수 있는 장점일 수도 있다. 홀미움 166은 임상에서 류마티스성 관절염에서 chemical synovectomy의 방법으로 사용되고 있고, 종양 치료 면에서는 간 및 뇌 종양, 피부암 등에 그 적용이 시도되고 있다.

사지에 생긴 악성종양에서 홀미움 166을 국소 투여할 경우 신경조직, 혈관조직, 골조직, 근육조직 등에 따라 투여한 홀미움에 대한 반응정도가 다를 것이며 이런

조직에 손상을 최소화하여 사지의 정상기능을 유지시키기 위해서 각 조직에 따른 가장 적절한 투여량을 실험적으로 산출할 수 있다면 홀미움 166을 악성 종양의 국소 치료에 보다 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 연구 대상 및 방법

1. 생분해성 고형물의 선택

저자들은 생체내에 삽입한 후 스스로 분해, 흡수되는 gelatin sponge 재료인 Johnson & Johnson Medical사의 SPONGOSTAN, Standard 제품을 사용하였다. 이는 실제 수술에서도 지혈 물질로 사용되고 있는 고형 biodegradable material이다.

2. 홀미움-166 흡착 고형물의 제작

2-1. absorbable gelatin sponge를 7 x 7 x 5 mm 크기로 준비하였다.

2-2. Holmium 166-chitosan complex를 240mCi/4ml정도의 activity로 준비하였다. 이는 50 μ l당 3.0mCi에 해당되는 것이다.

2-3. Pippeting으로 50 μ l씩을 gelatin sponge에 도포하였고 이를 각각 6개의 well이 있는 멸균된 cell culture plate에 보관, 멸균 벤치에서 자연 건조시켰다.

2-4. 24시간 후 건조된 Holmium 166-chitosan complex의 도포 직경은 약 4mm 정도였고 반감기에 따른 예상치는 약 1.7 mCi였으나 실제로 10%를 추출하여 미국 Victoreen사에서 제작한 Model 34-056인 dose calibrator로 측정하였는데 약 1.5 mCi였다.

3. 국소 방사선 조사량의 결정

Monte Carlo 방법(Monte Carlo simulation using EGS4)을 사용한 방사선 선량평가 (dosimetry)에서 표면에서 약 3mm 깊이에서는 흡수 선량이 330Gy 였고, 5mm 깊이에서는 22Gy로 계산되었다.

4. 조직내에 홀미움-166 흡착 gelatin sponge를 삽입하는 방법

약 300g되는 Wistar종 수컷 흰쥐를 사용하여 좌측 대퇴부 피부에 약 2cm의 절개를 가하고 근육내에도 얇은 절개를 가하여 좌측 대퇴근육내에 Holmium 166-chitosan complex가 부착된 gelatin sponge를 동위원소 부착부위가 심부(deep

side)를 향하게 삽입후 근육과 피부를 따로 봉합하였다. 우측 대퇴부에 전술한 절개를 가하고 대퇴골이 노출될 때까지 출혈에 최대한 주의하여 절개를 가하고 동위원소 부착 gelatin sponge를 삽입하고 근육과 피부를 봉합하였다.

5. 조직 변화 관찰 대상 군 및 관점

방사선 조사 후 골과 연부조직의 괴사 두께를 측정하고, 조직의 질적 변화 양상을 관찰하며, 삽입된 gelatin sponge의 변화양상을 주로 관찰하였다.

조직소견 변화 관찰 대상군은 골조직과 근육내 동위원소 투여 군으로, 동위원소를 대퇴근육내에 투여후 2주, 4주, 6주후 조직 변화를 관찰한 세 군 각각 10마리와, 그에 대한 control 군 각각 1마리로 총 33마리였다.

3. 연구 결과

1. 경과 관찰 2주 군

근육내 삽입 control 군에서는 gross상 특별한 이상 소견은 관찰되지 않았고 단지 삽입한 상처 주위로 백색의 경미한 반흔조직만 관찰 되었다. 절제조직상 육안적으로 gelatin sponge의 존재를 확인할 수 있었다. 현미경 소견상 삽입되었던 gelatin sponge가 원형보다 약간 축소된 형태로 관찰되었으며 그 주위로 염증 세포의 침투와 약간의 섬유화(fibrosis)를 관찰할 수 있었으나 주위의 근육 조직이나 골조직에서는 특별한 괴사소견은 없었다. 근육내 holmium 166 투여 군에서는 육안 소견상 gelatin spongel의 존재를 확인할 수 있었고 삽입부 주위로 꽤 넓은 부위로 백색의 반흔 조직을 보였고 특히 절제조직 편상에서 Holmium 166과 직접 접촉되었던 조직면에서 그 정도가 크고 잘 관찰 되었다. 현미경 소견상 gelatin sponge의 축소는 control과 그 정도가 비슷하였으나 holmium-166과의 접촉면에서는 정상 근육세포의 모양을 찾아볼 수 없이 심한 괴사(coagulation necrosis) 소견을 보였고(Fig. 1) 근육세포의 퇴화(degenerating myocyte) 및 재생(regenerating myocyte), 근육간 부종(intermuscular edema), 염증세포의 침윤 소견을 보였고 유발된 괴사의 깊이는 평균 3.3mm 였다.

대퇴골에 접촉시켜 삽입한 control 군에서는 근육군과 동일한 정도의 소견을 보였고 골조직의 변화는 전혀 없었다. 동위 원소 삽입 군에서는 holmium-166과의 접촉면

의 골피질은 골소강(lacuna)내 골세포(osteocyte)의 소실(empty lacuna)이 관찰되었고 골수강내의 골수 세포도 파괴되고 섬유화 또는 염증성 반응을 보였다. 피사의 깊이는 평균 2.9mm 였다(Fig. 2)

육안적으로 피부와 피하조직을 포함한 방사선 동위원소가 삽입되었던 부위의 표층 조직에는 피사, 염증, 감염 등의 문제는 전혀 관찰되지 않았다. 현미경 소견상 표층 조직 방향으로 약 0.5-1mm 정도의 피사 부위가 관찰 되었다.

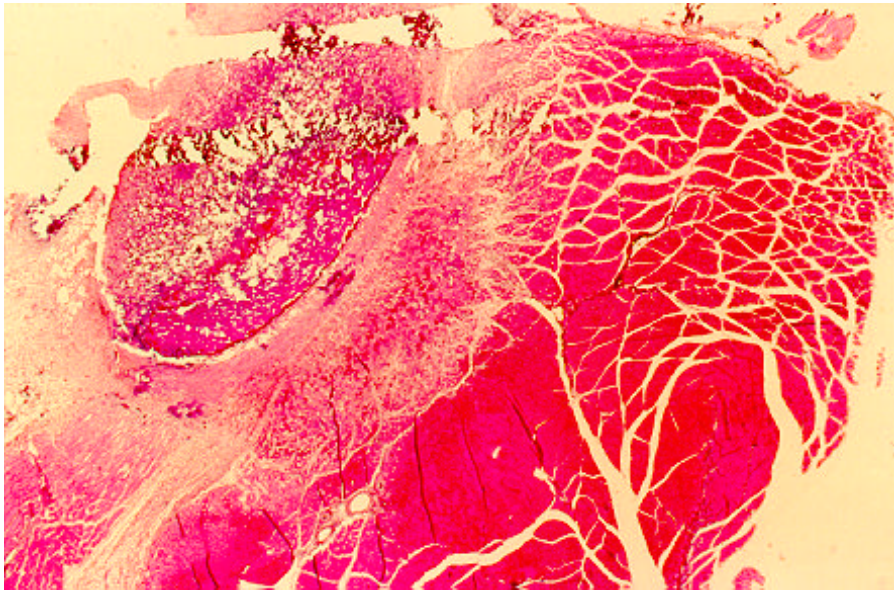


Fig. 1. At 2 weeks, muscle contacted to the 166Ho attached gelatin sponge (left) showed tissue necrosis(right) in low power view

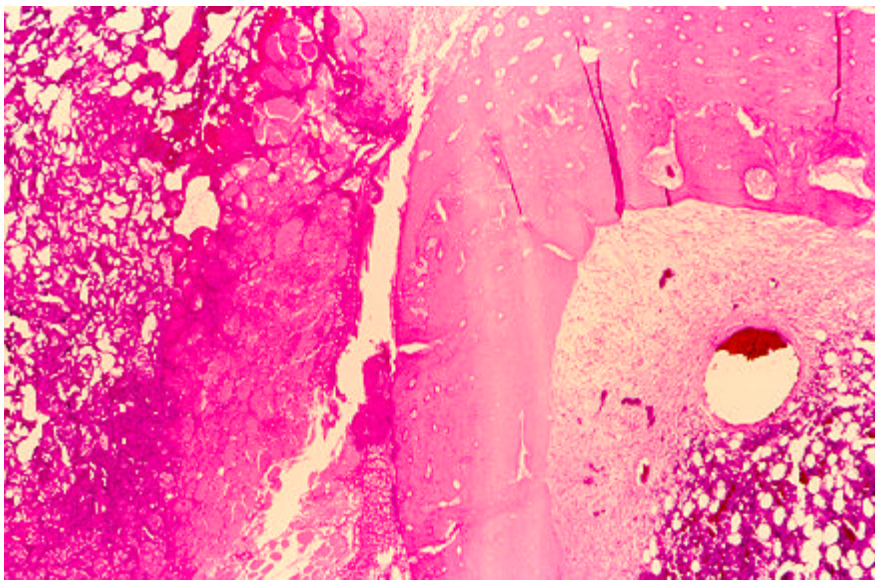


Fig. 2. At 2 weeks, bone group showed gelatin sponge(left), cortex necrosis, and bone marrow fibrosis(right)

2. 경과 관찰 4주 군

근육내 삽입 control 군에서는, gross상 특별한 이상 소견은 관찰 되지 않았고 2주 군에서 관찰되었던 삽입한 상처주위로 백색의 경미한 반흔조직도 거의 없었다. 단지 약간의 경결형성(nodule formation)을 보였다. 절제조직상 육안적으로 섬유성조직의 경결이외 gelatin sponge 존재는 확인할 수 없었다. 현미경 소견상 삽입되었던 gelatin sponge는 관찰할 수 없었고 단지 약간의 섬유화만 보였으며 염증 세포의 침투도 없었다.

근육내 holmium 166 투여 군에서는 육안 소견상 collagen material의 존재를 경미하게 확인 할 수 있었고 여전히 삽입부 주위로 백색의 반흔 조직을 보였고 특히 절제조직 편상에서 Holmium 166과 직접 접촉되었던 조직면에서 그 정도가 뚜렷하였고 2주 군과는 다르게 약간의 흰색 band가 관찰되어 조직 괴사 후 calcification이 의심되었다. 현미경 소견상 gelatin sponge는 원형 보다 축소되었고 2주때보다 약간 더 염증 세포의 침투를 보였다. 방사선이 조사된 근육에서는 괴사된 근육세포에 석회화(calcification) 소견과 2 주때 보다 심해진 섬유화 소견을 보였으나 2주때 관찰되었던 근육세포의 퇴화(degenerating myocyte) 및 재생(regenerating myocyte), 근육간 부종(intermuscular edema), 염증세포의 침윤 등의 소견은 줄어들어 염증반응의 해소 경향을 보였다. 유발된 괴사의 깊이는 평균 3.3mm 였다.

대퇴골에 접촉시켜 삽입한 control 군에서는 삽입한 gelatin sponge를 관찰 할 수 없었고 골조직의 변화도 없었다. 골조직에서는 특별한 괴사소견은 없었다.

동위 원소 삽입 군에서는 2주 때와 같이 골피질은 골소강(lacuna)내 골세포(osteocyte)의 소실(empty lacuna)이 관찰되었고 골수강내의 골수 세포도 파괴되고 섬유화 또는 염증성 반응을 보였는데 골수강의 섬유화는 더 증가되었고 골피질과 gelatin sponge 사이로 육아조직(granulation)이 자라들어 오는 것이 관찰되었다. 괴사의 깊이는 평균 3.3mm 였다.

3. 경과 관찰 6주 군

Control 군에서는 근육과 골조직에서 동일하게 삽입한 gelatin sponge를 관찰 할 수 없었다. 동위원소를 삽입한 근육조직 군에서는 근육연부 조직의 위축(shrinkage)로 인해 괴사 부위가 줄어들었고 괴사조직으로 육아조직(granulation tissue)이 자라들어 왔으며 4 주에 비해 섬유화의 증가되었고 염증 소견은 소실되었다. 괴사의 깊

이는 평균 2.0mm 였다. 동위원소를 삽입한 골조직 군에서는 골피질과 gelatin sponge 사이로 육아조직이 4 주때 비해 훨씬 많이 자라 들어 왔고 삽입된 gelatin sponge는 fragmentation되고 원형이 많이 파괴(breakage)되어 granulation tissue로 대체(replace)되었다. 염증 세포는 소실되었으며 괴사의 깊이는 평균 2.5mm 였다.

4. 고찰

<holmium 166의 재원과 선택의 이유>

holmium-166은 여러 저자들에 의해 동물실험 및 임상실험에서 국소부위에 투여할 수 있는 동위 원소로 개발된 방사성 동위원소로 국내에서는 현재 chitosan에 complex 형태로 결합시켜 임상에서 류마티스성 관절염에서 chemical synovectomy의 방법으로 사용되고 있고, 종양 치료 면에서는 간 및 뇌 종양, 피부암 등에 그 적용이 시도되고 있으며 혈관 시술에도 사용이 보고되었다.

holmium 166은 반감기가 약 26.8시간으로 짧고, 1.78 및 1.86 MeV의 베타선과 6.2%의 80.6 KeV의 감마선을 방출하여 비교적 방사능량이 높다. 또한 연부조직의 투과력이 최대 8.4mm, 평균 3mm정도로 알려져 치료용 핵종으로 사용할 수 있다.

holmium 166의 운반체로 chitosan을 사용하여 생체 적합성을 높이고 투여 부위 이외의 전신적 흡수 및 타장기로의 누출을 줄여 국소 부위에 잔존할 수 있는 형태로 사용되고 있다. holmium 166-chitosan 복합체를 쥐의 간과 쥐에 이식한 종양에 투여한 실험과, 토끼의 관절내에 투여한 실험에서 생체분포상 타 장기로의 방사능 누출이 적다고 보고되었다.

holmium 166-chitosan complex는 임상 적용예가 보고되었는데 종괴의 크기가 크지 않은 간암의 경우와 낭성(cystic) 뇌종양에서 종양에 직접 투여한 예가 보고 되었고 위암의 복강내 전이에 대한 치료에 사용한 예도 보고되었다.

<holmium 166 containing solide material의 고안>

정형외과 영역의 사지에 발생한 육종의 경우 국소 치료는 수술적으로 종양을 제거하는 것이 우선이고 거기에 더하여 holmium 166에 의한 선택적 방사선 치료를 시행하는 것이다. 하지만 홀미움을 외과적 시술을 시행한 생체 조직에 안전하고 효과적으로 투여하는 방법은 아직 연구된 적이 없다. 액체상태의 홀미움을 관절과 같

은 패쇄된 채강이나 cystic한 종양 등에서 투여하는 경우 전신적 흡수 문제나 흡수선량 평가(dosimetry)상의 어려움은 별로 없는 것으로 알려져 있다. 하지만 수술 등으로 외과적 조작을 받은 조직은 vessel channel들이 열려 있으며 수술부위의 출혈 등으로 액체상태의 동위 원소가 처음 투여한 국소 부위가 아닌 원하지 않는 인접 부위나 전신적으로 유출되는 문제가 있을 수 있다. 또한 투여한 방사성 동위원소가 고형(solid state)을 유지하지 않아 정확한 dosimetry가 어려우므로 원하는 부위에 원하는 양만큼의 효과적인 방사선 조사량도 결정할 수 없다. 이를 해결하기 위해서는 고체형태로 국소부위의 선량조절과 평가가 가능하고, 체내 삽입 후 동위원소의 누출이 적으며, 삽입된 고형물은 체내에서 흡수되어야 할 것으로 생각된다. 저자들이 사용한 absorbable gelatin sponge의 경우 같은 성분이라도 만들어진 재형에 따라 액체상태의 holmium 166-chitosan 복합체를 흡수시키는 데 문제점들이 있었다. 너무 흡수성이 좋은 경우는 액상의 동위원소가 삽입할 고형물 밖으로 누출되거나 고형물의 원형이 유지되지 않고 변형되어 흡수선량 평가가 어려웠다. 소동물 실험에서 체내 흡수 가능한 작은 동위원소 patch를 제작하였기에 전술한 재료로 가능하였지만 실제 인체에 적용할 크기가 비교적 큰 동위원소 patch를 만들기 위해서는 액상의 동위원소를 even하게 흡착시키는 방법이 연구 되어야 할 것이다. 아니면 생체에 흡수되는 고형물에 방사성 동위원소를 바로 부착할 수 있는 방법이 연구되어야 하겠다.

<시간에 따른 조직소견의 변화>

동위원소를 부착한 gelatin sponge를 삽입하고 2주에는 근육조직이나 골조직에서 심한 괴사 소견이 보였고 그에 따른 조직의 국소 부종을 동반한 염증성 반응도 관찰되었다. 이 시기는 방사선에 의한 조직의 파괴가 극대화 되는 시점으로 생각된다. 동위원소를 삽입한 표층면 즉 피부쪽 괴사는 0.5-1mm 정도로 미미하였고 피부괴사나 수술 부위의 창상 문제는 야기되지 않았다. 비교적 방사선 조사의 방향성을 유지할 수 있었다. 일부 삽입된 gelatin sponge의 삽입후 변형으로 목표조직이 아닌 주위 조직으로 괴사가 일어난 경우도 있었으나 소 동물에 작은 동위원소 patch로 한 실험이라 수술 수기의 개선에 따라 이러한 문제점도 해소될 것으로 생각된다. gelatin sponge 삽입 4주에는 control 군에서는 거의 흡수 되어 관찰할 수 없어 완전한 생분해성을 보였다. 동위원소 삽입군에서는 괴사 조직의 석회화와 증

가된 섬유화, 만성 염증세포들이 관찰되는 등 2주에 극대화되었던 방사선에 의한 조직 손상이 조직의 치유력에 의해 회복의 단계로 접어드는 소견을 보였다. gelatin sponge 삽입 6주에는 근육조직의 괴사는 심한 섬유화로 조직의 위축 (shrinkage)과 석회질 침착을 보였고 염증 반응은 거의 관찰할 수가 없어 조직회복 단계가 많이 진행되어 장기적으로 크게 변하지 않는 안정기 또는 고착기에 접어드는 것으로 판단된다. 골조직에서도 육아조직이 많이 발견되어 이러한 소견을 뒷받침 하였다. 단 피질골의 회복은 관찰되지 않아 골조직의 회복은 훨씬 더 긴 기간이 소요될 것으로 판단된다. control에서는 흡수되고 없던 gelatin sponge가 동위원소를 부착했던 경우에는 아직 남아있긴 하지만 육아 조직이 많이 침투해 들어 오고 fragmentation이 심하게 관찰 되는 것으로 보여 control 군에 비해 늦긴 하지만 생체내로 흡수되는 과정은 진행되는 것으로 판단된다.

5. 결 론

Holmium 166-chitosan complex를 생체내에서 흡수가능한 gelatin sponge에 부착시킨 후 실험동물에 삽입한 결과 실험동물의 사망을 유발하지도 않았으며 상처의 괴사, 염증, 감염 등의 부작용이 전혀 없었고 삽입한 collagen material도 생체내에 잘 흡수되는 등 생체 적용에 안전한 방법으로 생각된다. 전술한 제작 방법은 방사선 동위원소의 투여전 미리 산출한 투여량과 실제 collagen material에 부착 제작한 후 측정된 수치가 비교적 일치하였으며, 제작시 각각에서 측정된 투여량도 일정하게 검출되는 등 비교적 predictable하고 reproducible한 방법으로 생각된다. 유발된 조직 괴사의 범위는 약 3mm로 미리 예측한 정도에 근접하는 것으로 실제임상 적용에 이용될 수 있는 토대가 될 것이다.