

실험적 성대마비 개에서 자가이개연골의 성대근육내 주입 후 조직학적 변화 : 2년 후 결과

부산대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹ 병리학교실²

이병주¹ · 왕수건¹ · 이진춘¹ · 전경명¹ · 고의경¹ · 노환중¹ · 이창훈²

= Abstract =

Histology of Injected Autologous Auricular Cartilage in the Paralyzed Canine Vocal Fold at Two Year

Byung-Joo Lee, MD¹, Soo-Geun Wang, MD¹, Jin-Choon Lee, MD¹, Kyong-Myong Chon, MD¹,
Eui-Kyung Goh, MD¹, Hwan-Jung Roh, MD¹ and Chang-Hun Lee, MD²

¹Department of Otorhinolaryngology and ²Pathology, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

Background and Objective : Vocal fold augmentation by injectable material under direct visual control is an easy and simple operation. However, when autologous fat or bovine collagen is used, the resorption creates a problem. And autologous fascia is debating about absorption now days. We previously reported on the one year results of injected autologous auricular cartilage for volumetric augmentation in paralyzed canine vocal cord. This study evaluates the long-term histomorphologic results of injected autologous auricular cartilage for the augmentation of the paralyzed canine vocal fold at two year.

Material and Methods : A prospective trial of autologous cartilage augmentation of vocal cord in animal model. Three dogs were operated upon. A piece of auricular cartilage was harvested from the ear and minced into tiny chips with a scalpel. Fat was harvested from inguinal area and minced with a scalpel. The minced cartilage and fat-paste (0.2ml) was injected using a pressure syringe into the paralyzed thyroarytenoid muscle using direct laryngoscopy. Three animals were sacrificed at 2 years. Each subject underwent laryngectomy and serial coronal sections of paraffin blocks from the posterior vocal fold were made.

Results : There was no significant complication perioperatively and during follow-up. The injected cartilage which appeared to have lost viability existed in the vocalis muscles until 24 months. Fibrotic change was exhibited in the surrounding injected cartilage.

Conclusion : The autologous auricular cartilage graft is well tolerated and may be very effective material for volumetric augmentation on paralyzed vocal cord.

KEY WORDS : Vocal cord paralysis · Autologous cartilage graft · Histology.

서 론

일측 성대마비 환자의 수술적 치료는 1911년 Brunings¹⁾가 파리핀을 성대내 주입한 것이 시초이다. 4년 후 Payr²⁾는 갑상연골의 전방을 기저로 하는 직사각형의 갑상연골편을 만들어 내측으로 밀어주어 성대내전을 도모한 후두골격

수술(laryngeal framework surgery)을 처음 시도하였다. 그러나 두 방법 모두 널리 사용되지 못하였다. 그 이유로 파리핀은 이물반응에 의한 육아종 즉 파리핀종 형성, 파리핀의 타 부위로의 이동, 색전증 등을 야기하였고,²⁾ Payr의 방법은 음성개선에 충분한 효과를 거두지 못하였기 때문이었다.³⁾ 1962년 Arnold⁴⁾가 새로운 성대내 주입물질로서 teflon을 소개하고 미국 식품의약품국이 이 물질의 인체내 사용을 승인하면서 성대내 주입술이 비로소 재개되었다. 이 방법은 1975년 Isshiki 등⁵⁾이 갑상연골성형술을 발표할 때까지 일측 성대마비에 의한 발성장애의 주 치료법으로 널리 시행되었으며, 1980년 말까지 사용되었다.⁶⁾ 그러나 이 식물질에 따라 이물반응, 흡수, 지연성 과민반응 등 여러

논문접수일 : 2005년 9월 2일

심사완료일 : 2005년 10월 15일

책임저자 : 왕수건, 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가
부산대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (051) 240-7331 · 전송 : (051) 246-8668

E-mail : wangsg@pusan.ac.kr

가지 문제점이 발생하였다. 최근 자가생체이식(autologous bioimplant)에 대한 관심이 높아지면서 흡수율을 가능한 줄이면서, 이식에 따른 조직반응이 적은 물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

연골은 조직친화성이 무생물물질(alloplastic substance)에 비해 훨씬 우수할 뿐 아니라 지방, 교원질(collagen), 근막 등 다른 자가생체 이식물질보다 흡수율이 적다고 알려져 있다. 그리하여 저자들은 이미 이개연골을 실험적으로 일측 성대를 마비시킨 개의 성대에 주입하여 1년 후에도 성대에 존재하는 것을 관찰하였고, 이러한 결과로 성대마비 혹은 위축된 성대의 치료에 세절된 연골이 적용될 수 있다고 보고하였다.⁷⁾ 그러나 아직 주입된 연골의 운명에 대한 장기간의 보고는 없다. 그리하여 저자들은 실험적으로 마비시킨 성대에 연골을 주입하여 2년 후 성대의 주입된 연골 상태에 대해 평가하고자 한다.

실험대상 및 방법

1. 실험대상

체중 8~10kg의 성장한 잠견 3마리를 전 실험기간 동안 동일한 사료로 사육하였으며 성대내 주입한 연골은 이개에서 채취한 자가 탄성연골을 이용하였다.

2. 실험방법

1) 일측성대마비의 유도

이전의 보고와 동일한 방법으로 하였으면, 간단히 기술하면 다음과 같다.⁷⁾ 실험 동물은 ketamine 7mg/kg을 개의 대둔근에 주사하여 진정시킨 후, 23 gauge 정맥용 카테터를 장치하여 투약로를 확보하고, pentothal을 5mg/kg을 정맥 주사한 후 내경 5.0mm 튜브로 기관내 삽관을 하였으며 그 후 100% O₂와 2~3% enflurane을 사용하여 전신 마취를 유지하였다. 운상연골 중앙부 직하에서부터 약 2~3cm 정도 수직으로 피부절개 후 기관외측근막을 박리하여 우측 반회신경을 확인한 후 절단하였다. 실험의 정확성을 높이기 위해 Hilger 신경자극기(Model 2R, WR Medical Electronics Co. U.S.A.)를 이용하여 1mA의 강도로 절단된 반회신경 근위부를 자극시 성대운동이 없으며, 원위부를 자극시 성대운동을 비디오 카메라(DCR-TRV 410, Sony Co. Japan)를 장착한 후두경(8575AV, Karl Storz, Germany)을 이용하여 모니터를 통해 확인하였다. 모든 실험 동물은 성대마비유도 후 3일간 Gentamicin®을 3일간 투여하였다. 실험동물은 연골 주입 후 2년 후 인락사 시킨 후

후두를 적출하였다.

2) 이식연골의 준비

이전의 보고와 동일한 방법으로 하였으면, 간단히 기술하면 다음과 같다.⁷⁾ 우측 이개에서 2×3cm 크기의 연골만을 채취하여 19 gauge 바늘을 통과할 수 있도록 수술용 가위로 세절하여 풀(paste) 처럼 만든 후 0.3ml를 Bruning 주사기에 채웠다 연골의 주입을 쉽게 하기 위하여, 우측 서혜부에서 0.3ml의 지방을 채취하여 역시 세절한 후 연골이 들어 있는 주사기에 다시 채워 넣었다.

3) 연골의 성대내 주입

이전의 보고와 동일한 방법으로 하였으면, 간단히 기술하면 다음과 같다.⁷⁾ 세절된 연골과 지방을 채운 Bruning 주사기에 19 gauge 긴 바늘을 꼽고 연골이 바늘 끝에 약간 나온 것을 확인한 후, 주사침의 경사면을 외측으로 향하게 하여 우측 성대의 전 1/3과 중간 1/3의 만나는 지점, 즉 성대돌기 외측부에 약 3~5mm 깊이로 성대근육에 0.2~0.3ml를 주입하였다. 이때 너무 깊숙히 주입되지 않도록 하기 위하여 주사기를 외측으로 수차례 밀어 성대점막이 주사침과 같이 움직이는 것을 확인한 후 주입하였다. 모든 과정은 비디오 카메라를 장착한 후두경을 이용하여 모니터를 통해 확인하였다.

4) 후두표본의 광학현미경적 관찰

이전의 보고와 동일한 방법으로 하였으면, 간단히 기술하면 다음과 같다.⁷⁾ 연골주입 후 2년 후에 실험동물을 ketamin 10mg/kg을 대둔근에 근육주사하여 진정시킨 후, 17 gauge 주사바늘을 이용하여 심장내로 리도케인 주입으로 인락사시켜 후두를 적출하였다. 적출한 후두를 10% 포르말린에 고정시킨 후, 5% nitric acid에 10~14일간 담구어 탈회시켜 후 5mm 두께의 관상면(coronal section)으로 연속 절제를 하였다. 파라핀 블록 제작하여 5 μ m 두께의 조직절편을 작성(cutting)한 후 hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 실시하였다. 광학현미경(Olympus Bx, Tokyo, Japan)으로 성대내에 주입된 연골조직을 확인하였고, 연골조직과 주위조직과의 관계를 2배, 20배, 100배로 확대하여 관찰하였다.

결 과

1. 적출된 후두 성대의 육안적 소견

2년 후 적출된 후두의 우측 성대에서 특이한 소견을 관찰할 수 없었다.

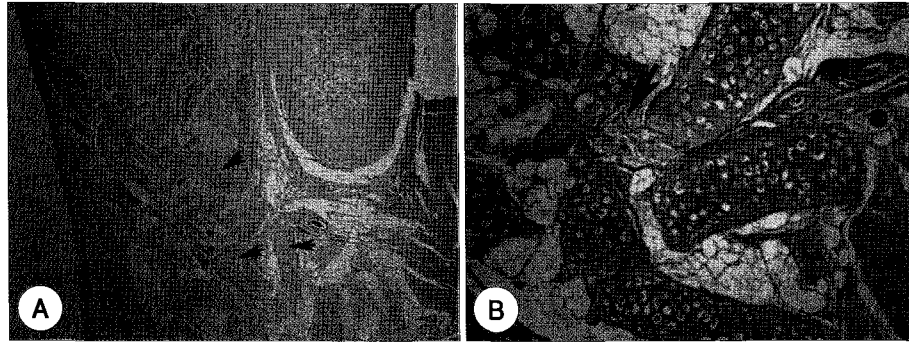


Fig. 1. Histomorphologic findings at 24 months after cartilage injection. A : The injected cartilage (arrows) remains fairly discrete and localized within vocalis muscle, which shows severe atrophic changes (H-E stain, ×20). B : There is no inflammatory changes, foreign body reaction, or degenerative changes surrounding the injected cartilage. The outlines of grafted cartilages have been preserved. Fibrotic changes (arrow) are present surrounding the injected cartilage (H-E stain, ×100).

Table 1. Chronological histomorphology of grafted auricular cartilage and laryngeal tissue

Histomorphology	Postoperative time					
	3 Day ⁷	3 Week ⁷	3 Month ⁷	6 Month ⁷	12 Month ⁷	24 M
Grafted cartilage	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Volume change of cartilage	No	No	No	No	No	No
Loss of cartilage viability	+	++	++	+	+	+
Fatty vacuole	Yes	No	No	No	No	No
Muscle atrophy	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Acute inflammation	+	++	0	0	0	0
Degenerative change	+	++	0	0	0	0
Granuloma and foreign body reaction	No	No	No	No	No	No
Fibrosis	No	No	No	No	Yes	Yes

0 : none, + : some, ++ : extensive

2. 연골 주입 2년 후 성대의 조직 소견

주입된 연골 조각들이 성대근육 내에서 존재하였고, 주위 성대 근육은 위축 소견을 보였다(Fig. 1A). 연골 조각들의 전체적인 형태와 용적은 이미 보고한 1년 후의 조직학적 소견⁷⁾과 비교하여 뚜렷한 차이를 보이지 않았고 연골 조각들 주위에서 염증소견 역시 관찰되지 않았다(Fig. 1B). 주입된 연골 세포는 생존능을 소실한 것으로 관찰되었으나 전체적인 용적의 변화는 없는 것으로 보였다. 연골 주입에 의한 육아종 형성, 이물반응의 소견은 관찰되지 않았지만, 주입한 연골 주위에 섬유화는 관찰되었다(Table 1) (Fig. 1).

고 찰

성문폐쇄부전(glottic incompetence)은 일측 성대마비, 성대근 위축, 성대구중(sulcus vocalis), 외상에 의한 성대내 반흔형성 등에 의해 발생할 수 있다. 이러한 성문폐쇄부전의 수술적 치료법은 지방⁸⁾ 혹은 교원질⁹⁾과 같은 연부조직을 이용하여 위축된 성대를 보강시키는 성대내 주입법(intracordal injection), 갑상연골성형술⁵⁾과 같은 후두골격 즉 연골부를 조작하는 방법(medialization laryngoplasty), 피

열연골의 근돌기를 전측방으로 땀겨 성대내전을 도모한 피열연골내전술(arytenoid adduction), 신경근육변이식(nerve-muscle pedicle transfer)¹⁰⁾ 혹은 마비된 반회후두신경에 건전한 주위 신경을 문합¹¹⁾하는 신경재지배방법들이 있다. 후두골격수술은 경부의 피부를 절개하여 시행하기 때문에 수술에 따른 다양한 합병증 뿐 아니라 갑상연골성형술의 경우 이식물질의 이탈, 피열연골내전술의 경우 기도 폐쇄와 인두피부누공의 위험성이 있다.³⁾ 후두신경 재지배방법은 이론적으로는 가장 좋은 방법으로 설하신경고리-견갑설골근육변이식법(ansa hypoglossi-omohyoid muscle pedicle graft)¹⁰⁾이 널리 알려져 있으나, 이 방법도 시술자에 따라 매우 다양한 결과를 보고¹¹⁾하여 추천할만한 방법이라고는 할 수 없는 실정이다.

성대내 주입하는 물질은 무생물 물질과 생물학적 물질(biologic substance)로 대별되며, 생물학적 물질은 자가(auto-ologous)와 비자가(nonautologous)조직으로 나누고, 비자가조직은 다시 동종(homogenous)과 이종(heterogenous)조직으로 나눈다. 무생물 물질의 대표적인 것은 teflon이며 그외 gelfoam,¹²⁾ silicone¹³⁾이 있다. 자가 조직은 지방,⁸⁾ 근막,¹⁴⁾ 교원질⁹⁾ 등이 있으며, 이종조직으로는 소(bovine)에

서 추출한 교원질,⁹⁾ 연골,¹⁵⁾ dextranomer in hyaluronan (DiHA)¹⁶⁾ 등이 사용되었고, 동종조직으로는 최근 사체에서 추출한 교원질(Cymetra[®])¹⁷⁾이 시도되고 있다.

Hyaluronan은 고분자량의 다당류로 외인성 hyaluronan 추출물은 단백질을 함유하고 있지 않기 때문에 항원성이 없으며 무독성물질이다. 1%의 hyaluronan 용액과 동량의 dextranomer를 혼합한 DiHA를 토끼의 성대에 주사하였을 경우 hyaluronan은 일주일 이내에 사라지고 반면에 dextranomer 미세조각은 6개월 이상 남아 있는 것을 확인할 수 있었다.¹⁶⁾ 그러나 Stenberg 등¹⁸⁾은 동물실험에서 DiHA를 주사하여도 12개월 후 주입한 DiHA의 23%에서 흡수되었다고 보고하였다.

자가 지방은 조직의 양에 관계없이 쉽게 추출할 수 있으며, 매우 부드럽고 유연하기 때문에 주입이 용이하고, 이식 후 이물반응과 과민반응이 없으며, 이식 후 염증반응도 드물기 때문에 성대조직의 경직에 의한 성대진동 장애도 거의 없으나, 주입 후 20~90% 정도의 흡수가 문제이다.⁸⁾¹⁹⁾ 지방은 회복 가능한 성문폐쇄부전 환자에서 효과적인 주입 물질로 사료되지만 영구적인 치료를 위한 재료로서는 다소 문제점을 갖고 있다.

자가 교원질은 1995년 Ford 등⁹⁾이 처음 성문폐쇄부전의 치료에 사용하였다. 교원질의 장점은 가는 주사바늘로도 주입할 수 있기 때문에 정확한 부위에 주입이 가능할 뿐만 아니라 성대의 고유층(lamina propria) 즉 Reinke 공간에 주사할 때도 불구하고 성대점막의 진동에는 별 영향을 주지 않는다. 또한 반흔 조직을 부드럽게 하는 효과도 있어 외상에 의한 반흔형성, 성대구증, 성대의 위축과 부분적 결손이 있는 경우에 특히 유용하다는 보고도 있다.⁹⁾ 자가 교원질의 경우 2ml 정도를 얻기 위해서는 약 30cm² 넓이의 피부가 필요하며 정제하기까지 약 45일 정도가 소요되는 결점이 있다.²⁰⁾ 일반적으로는 흡수를 고려하여 20~30% 과교정이 필요하다.

근막은 조직학적으로 비교적 안정된 물질로서 최근에 성대의 보강에 사용되고 있으며, 자가 근막은 낮은 대사율을 나타내기 때문에 유리 이식한 근막도 장기간 조직내에서 생존하지만 이식 후 6~12개월 사이에 관찰한 동물실험에서 약간의 용적감소가 있다.²¹⁾ Rihkanen은 성대마비 환자 9예에서 근막주입술을 시행하여 5예에서 주사 후 거의 정상에 가까운 발성을 하였다고 보고하였다.¹⁴⁾ 그리고 주사 후 평균 10개월(3~18개월) 간의 관찰에서 발성의 악화를 관찰할 수 없어 성대마비 환자에서 사용할 수 있는 좋은 재료라고 하였다.¹⁴⁾

연골의 이식은 성형수술에 많이 사용되고 있으며, Peer²²⁾

는 신선한 자가연골은 생체내에 살아있는 연골과 마찬가지로 생존율이 높기 때문에 여러 가지 성형물질 중 가장 바람직한 물질이라고 보고하였다. 그러나, 소아의 연골을 이식한 경우에는 지속적인 성장이 일어나며 또한 이식연골의 생존률은 크기에 반비례하여 크기가 작을수록 생존률이 높다고 하였다. Carter²³⁾의 연구에 의하면 연골은 골조직과 달라서 이식된 연골은 모세혈관의 증식은 전혀 없고 세포간순환(intercellular circulation)만을 받는다고 하였다. Salinger²⁴⁾는 이식연골은 영구적으로 존재하며 이식연골세포가 생존능을 소실하여도 수년 후에도 세포간질(matrix)은 존재하며 뿐만 아니라 일부에서 흡수가 되어도 섬유질로 대체되어 전체적인 형태는 유지한다고 하였다.

Arnold¹⁵⁾는 개에서 인위적으로 성대마비를 유발시킨 후 교원연골인 자가 늑골 연골 또는 포르말린에 보관된 인간의 비중격 연골을 잘게 자른 후 procaine-penicillin-oil을 매개물(vehicle)로 하여 마비된 개의 성대에 주입하였다. 그러나 oil에 의한 이물반응과 면역반응으로 대부분의 연골이 흡수되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 탄성연골인 자가 이개연골과 윤활유 목적으로 서혜부의 지방을 이용하여 비교적 용이하게 주사할 수 있었으며 심한 염증반응과 이물반응은 관찰되지 않았다. 연골 주입 후 2년 동안의 조직변화를 경시적으로 관찰한 결과, 주입된 연골은 극히 일부만 흡수되며 세포가 사멸되더라도 전체적인 용적은 유지되며 최소한의 과교정이 필요 할 것으로 생각되었다.

Karpenko 등¹⁷⁾은 이상적인 성대 주입 물질의 요건은 1) 흡수가 없거나 적을 것, 2) 성대의 진동에 영향을 주지 않으면서 조직 친화성이 좋은 것, 3) 주입한 부분에 조직 반응이 없을 것, 4) 다른 부가적인 치료가 가능할 것, 5) 수술 방이나 외래에서 쉽게 할 수 있을 것, 6) 주입한 물질의 이동이 없을 것 등이라고 하였다. 주입한 연골은 흡수가 거의 없이 2년 동안 존재하였고, 자가 물질이므로 조직친화성이 좋고, 근육내에 주사하므로 성대 진동에 장애가 없을 것으로 생각된다. 또한 효과가 미흡할 경우 갑상연골성형술이나 피열연골내전술을 시행 할 수 있고, 이미 저자들은 수술 방에서 성대 마비 환자를 대상으로 이개 연골을 세절하여 성대에 주입하여 좋은 효과를 관찰하고 있다. 2년 후에서 주위의 섬유화에 의해 이동은 미미한 것으로 생각된다. 이러한 소견은 마비된 성대의 물질로서 연골이 이상적인 조건에 합당하다고 생각된다.

결 론

자가연골이식은 주입 후 24개월까지 큰 용적의 변화없이

성대내에서 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 자가연골이식이 성대폐쇄부전 치료의 이상적인 새로운 성대보강 물질로 생각된다.

중심 단어 : 성대마비 · 자가 연골 · 조직.

REFERENCES

- 1) Brunings W. *Über eine neue behandlungsmethode der rekurrenslähmung. Verhandl Ver Deutsch Laryngol* 1911;8:93-151.
- 2) Payr A. *Plastik am schildknorpel zur behebung der folgen einseitiger stimmbandlähmung. Deut Med Wochenschr (Stuttgart)* 1915;41:1265-70.
- 3) Koufman JA, Isaacson G. *Laryngoplastic phonosurgery. Otolaryngol Clin North Am* 1991;24:1151-77.
- 4) Arnold GE. *Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia: IX. technique of intracordal injection. Arch Otolaryngol* 1962;76:358-68.
- 5) Isshiki N, Okamura H, Ishikawa T. *Thyroplasty type I: lateral compression for dysphonia due to vocal cord paralysis or atrophy. Acta Otolaryngol (Stockh)* 1975;80:465-73.
- 6) Sadek SAA, Nassar WY, Tobias MA. *Teflon injection of the vocal cords under general anesthesia. J Laryngol Otol* 1987;101:695-705.
- 7) Lee BJ, Wang SG, Goh EK, Chon KM, Lee CH. *Intracordal injection of autologous auricular cartilage in the paralyzed canine vocal fold. Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:34-43.
- 8) Hill DP, Meyers AD, Harris J. *Autologous fat injection for vocal cord medialization in the canine larynx. Laryngoscope* 1991;101:344-8.
- 9) Ford CN, Staskowski PA, Bless DM. *Autologous collagen vocal cord injection: a preliminary clinical study. Laryngoscope* 1995;105:944-8.
- 10) Tucker HM, Harvey J, Ogura JH. *Vocal cord remobilization in the canine larynx. Arch Otolaryngol* 1970;92:530-3.
- 11) Crumley RL. *Update: Ansa cervicalis to recurrent laryngeal nerve anastomosis for unilateral laryngeal paralysis. Laryngoscope* 1991;101:384-7.
- 12) Schramm VL, May M, Lavorato AS. *Gelfoam paste injection for vocal cord paralysis: temporary rehabilitation of glottic incompetence. Laryngoscope* 1978;88:1268-73.
- 13) Rubin HJ. *Intracordal injection of silicone in selected dysphonias. Arch otolaryngol* 1965;81:604.
- 14) Rihkanen H. *Vocal fold augmentation by injection of autologous fascia. Laryngoscope* 1998;108:51-4.
- 15) Arnold GE. *Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia. Arch Otolaryngol* 1955;62:1-17.
- 16) Hallen L, Dahlqvist A, Laurent C. *Dextranomer in hyaluronan (DiHA): a promising substance in treating vocal cord insufficiency. Laryngoscope* 1998;108:393-7.
- 17) Karpenko AN, Dworkin JP, Meleca RJ, Stachler RJ. *Cymetra injection for unilateral vocal fold paralysis. Ann Otol Laryngol* 2003;112:927-34.
- 18) Stenberg A, Larsson E, Lindholm A, Ronneus B, Stenberg A, Lackgren G. *Injectable dextranomer-based implant: histopathology, volume changes and DNA-analysis. Scand J Urol Nephrol* 1999;33:355-61.
- 19) Lee DG, Lee JW, Lee JW, Roh HJ, Goh EK, Wang SG, et al. *An experimental study of voluminous and histological changes after autogenous fat injection. Korean J Otolaryngol* 1996;39:2043-8.
- 20) Remacle M, Lawson G, Delos M, Jamart J. *Correcting vocal fold immobility by autologous collagen injection for voice rehabilitation: a short-term study. Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:788-93.
- 21) Reijonen B, Leivovo I, Nevalainen T, Rihkanen H. *Histology of injected autologous fascia in the paralysis canine vocal fold. Laryngoscope* 2001;111:1068-74.
- 22) Peer LA. *Reconstruction of the auricle with diced cartilage grafts in a vitallium ear mold. Plast Reconstr Surg* 1948;3:653-66.
- 23) Carter WW. *The ultimate fate of bone when transplanted into the nose for the purpose of correcting a deformity. Arch Otolaryngol* 1932;15:563.
- 24) Salinger S. *Cartilage homografts in rhinoplasty: a critical evaluation. Ann Otol Rhinol Laryngol* 1952;61:533-41.