

## Micro-computed tomography를 이용한 골다공증의 새로운 형태학적 연구기법

고창용, 우대곤, 김한성, 이범이<sup>1</sup>

연세대학교 원주캠퍼스 의공학부, <sup>1</sup>건국대학교 의과대학 해부학교실

**간추림** : 골다공증모델동물의 뼈잔기둥의 조직변화 및 골다공증모델연구에서 생체 내 미세 단층 촬영시스템 (SKYSCAN1076, Skyscan, Belgium)을 적용하기 적합한 실험조건을 알아보고자 본시험을 수행하였다.

암컷 흰쥐에게 난소적출과 저칼슘식이요법 (calcium free diet)을 시행하여 골다공증을 유발하였다. 골다공증의 유발된 흰쥐를 관류고정후 허리뼈를 적출하여 탈회과정을 거친후 조직표본을 제작하여 골다공증모델동물의 뼈잔기둥에 대한 조직학적변화를 관찰하였다. 또한 흰쥐의 넷째 허리뼈를 35 $\mu$ m의 해상도로 미세단층촬영을 시행하였다.

골다공증 유발후 12주후에 척추뼈를 적출후, 조직소견은 척추뼈의 뼈잔기둥의 두께가 감소하였고 일부 뼈잔기둥에서는 단락이 관찰되었으며, 뼈잔기둥내 산성점액질이 감소된 양상이 관찰되었다. 생체 내 미세 단층 촬영시스템의 평균 촬영시간은 20분정도 소요되었으며, pentobarbital, chloral hydrate, ketamine/xylazine 등의 마취제를 사용한 결과 ketamine/xylazine을 사용시 촬영에 가장 적절한 호흡주기(1.3~1.6/sec)를 유지하였으며, 마취제의 농도는 ketamine은 체중 kg당 50 mg, xylazine은 체중 kg당 6 mg이 적절한 농도였다.

이상의 결과를 종합한바, 난소적출과 저칼슘식이요법은 뼈잔기둥의 두께감소 및 산성점액질의 감소를 초래하여 뼈를 약화시키는 것으로 사료되며, 또한 고화질 생체내 미세단층촬영시스템을 이용하여 골다공증모델동물연구하는데 있어, 마취시간, 마취제 및 호흡주기가 중요한 요인이 되리라 사료된다.

**찾아보기 낱말** : 생체내미세단층촬영시스템, 골다공증, 뼈잔기둥, 난소적출술

### 서 론

뼈는 특수한 결합조직의 일종으로서, 뼈를 형성하는 세포 (osteogenic cells)가 뼈모세포 (osteoblast)로 변형되고, 뼈모세포는 풋뼈조직 (osteoid)을 형성하며, 이러한 풋뼈조직에 무기질이 침착되는 석회화 과정을 거쳐 단단한 뼈조직이 된다. 이렇게 형성된 뼈는 일생동안 변하지 않는 구조가 아니며, 상기의 과정을 거친 뼈형성과정 (bone formation)과 뼈파괴 세포 (osteoclast) 등에 의한 뼈흡수과정 (bone resorp-

tion)이 반복된다. 골다공증은 뼈흡수과정이 상대적으로 뼈형성과정보다 증가된 현상이며, 특히, 폐경기 후에 호르몬 분비가 저하된 여성들에게는 치명적인 질병인 것이다. 골다공증은 약물에 의해 발생할수 있으며, 내분비계의 질환, 위절제수술후와 같은 소화계통의 질환등 여러 질환에 의해 올수 있다고 알려져 있다 (Gennari 등 1998).

많은 연구자들이 골다공증에 관하여 연구를 수행하고 있으며, 여러 실험동물모델을 제작하여 연구중이다. 최근에는 카드뮴 투여 (Uriu 등 2000), cyclosporin 투여 (Shin 등 2000), ethanol 투여 및 단백질결핍상황 (Molina 등 2000), 마그네슘결핍 (Rude 등 1999), 부동 (Jee와 Ma 1999), 아연결핍 (Eberle 등

\*2001년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 논문임  
교신저자 : 이범이 (건국대학교 의과대학 해부학교실)  
전자우편 : beobyi.lee@kku.ac.kr

1999), 담배흡연 (Syversen 등 1999) 등 여러 가지 방법으로 연구가 진행되는 것으로 알려져 있다. 그러나 현실적으로 골다공증에 관한 실험동물모델은 장기간의 사육환경과 많은 비용으로 인하여 제약을 받고 있는 실정이다.

최근에 개발된 생체 내 미세 단층 촬영시스템 (in-vivo micro-CT)은 살아있는 생물 및 시료를 비파괴로 내부구조를 관찰할 수 있는 장비이다. 국내에도 몇몇 대학에서 도입된 실정이지만 아직도 초보적인 단계에 있다. 뼈에 대한 전통적인 조직학적 관찰은 동물을 희생시킨 후 탈회, 조직처리과정을 거친 후 염색과정을 거치기 때문에 장기간의 탈회에 의한 조직손상이 나타날 수 있으며 통계적인 방법에 의하여 형태계측이 이루어진다. 반면에 생체 내 미세 단층 촬영시스템을 이용한 실험에서는 실험동물을 실험이 끝날 때까지 살아있는 상태로 추적 관찰할 수 있으며, 뼈간기둥 (trabecula of bone)에 대한 체적, 두께, 간격 등을 정확하게 측정할 수가 있다.

그러나 국내에서의 생체 내 미세 단층 촬영시스템을 이용한 추적관찰 연구는 많지 않은 실정이다. 그러한 이유로 생체 내 미세 단층 촬영시스템으로 촬영할 수 있는 환경을 구축하는 기초적인 자료로 삼기 위하여 골다공증이 실험적으로 발생된 흰쥐에서 뼈간기둥의 조직변화를 관찰하고, micro-CT의 적합한 실험조건을 알기 위하여 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 일반적인 골다공증모델 조직변화

생후 90일 정도인 체중 200그램 내외의 S/D계 암컷 흰쥐 20마리를 사용하였다. 대조군, 실험 군에 각각 10마리씩 배정하였다. 실험군은 양측난소를 제거한 후 12주 동안 저칼슘식을 병행 시행하였다. 모든 동물은 에테르 마취하에 4% paraformaldehyde 고정액 (0.2 M PBS, pH 7.2)으로 심장을 통한 관류고정을 시행하여, 넷째 허리뼈를 적출하여 24시간동안 같은 고정액에 고정후에 10% EDTA용액에 4주간

탈회를 시행하였다. 탈회된 조직은 적절한 크기로 삭정한 후 6 μm 두께의 파라핀 절편을 제작한 후, 일반적인 척추뼈의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 hematoxyline-eosin 염색을 시행하였고, 뼈간기둥내 점액다당류의 정성적 변화를 관찰하고자 alcian blue (pH 2.5)-PAS 염색을 시행하였다. 점액성상의 변화에 대한 관찰방법은 염색에 대한 착색 정도에 따라 반응 정도를 구분하여 염색되지 않는 경우 (-), 약한 양성반응을 나타내는 경우 (1), 중등도의 양성반응을 나타내는 경우 (2), 강한 양성반응을 나타내는 경우 (3)로 나누어 관찰하였으며, 조직의 착색은 청색 (B) 및 적색으로 구분하여 표시하였다.

### 2. 생체 내 미세 단층 촬영시스템의 구축단계

양쪽 난소적출후 저칼슘식을 병행하면서 골다공증을 유발시킨 후 촬영조건을 구축하였다. 사용된 마취제는 pentobarbital, chloral hydrate, ketamine/xylazine 병행마취를 사용하였으며, 단층촬영시스템에 부착된 호흡측정장치를 이용하여 호흡주기를 측정하였다. 촬영방법은 마취된 흰쥐를 촬영대에 올려 놓고, 코부위에는 호흡주기측정장치를 연결하였고, 일정한 호흡수가 유지될 때까지 안정화를 시킨 후 micro-CT 촬영을 시작하였으며, 촬영중에 급격한 호흡수의 변화 혹은 마취문제로 흰쥐가 움직이면 곧바로 촬영을 중단하고 실험조건을 맞춘 후 재촬영을

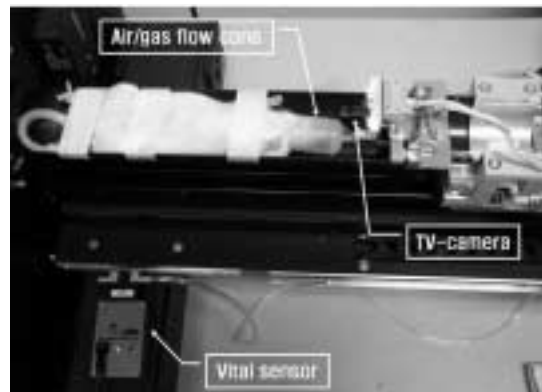


Fig. 1. Rat laid on bed in Micro-CT

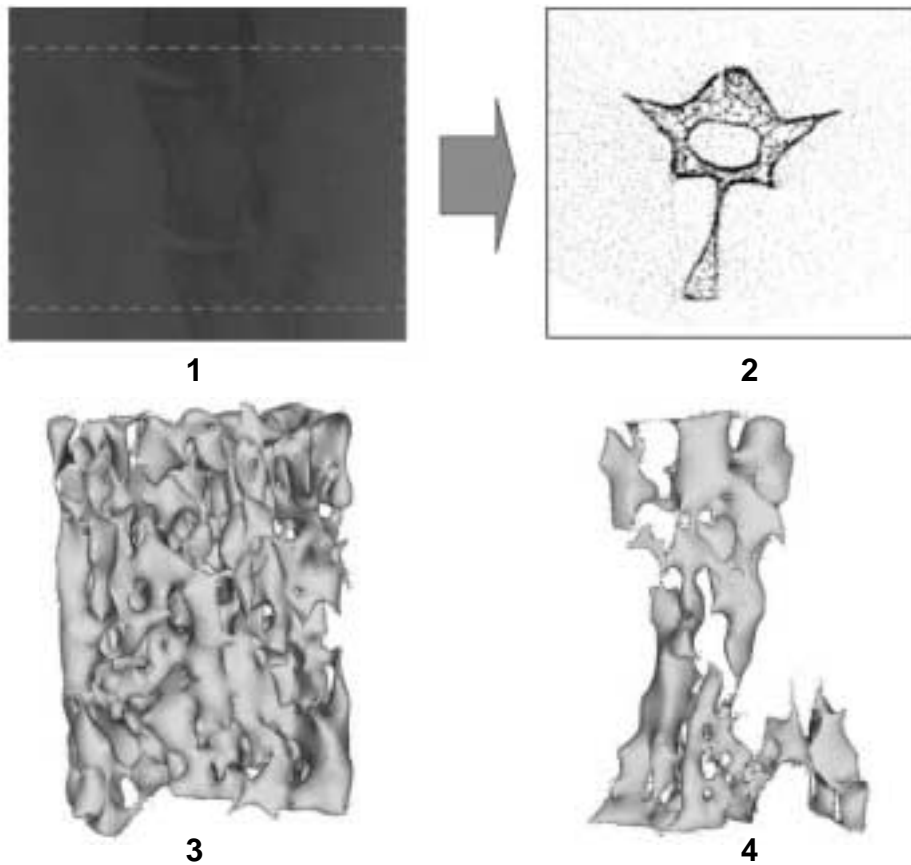


Fig. 2. Micro-CT images of fourth lumbar vertebra, 1: x-ray transmission image, 2: reconstructed cross section image, 3: 3D reconstructed image of vertebral body of normal rat, 4: 3D reconstructed image of vertebral body of osteoporosis model

수행하였다 (Figs. 1, 2).

## 결 과

### 1. 골다공증모델의 조직학적 연구

#### 1) hematoxyline-eosin염색 소견

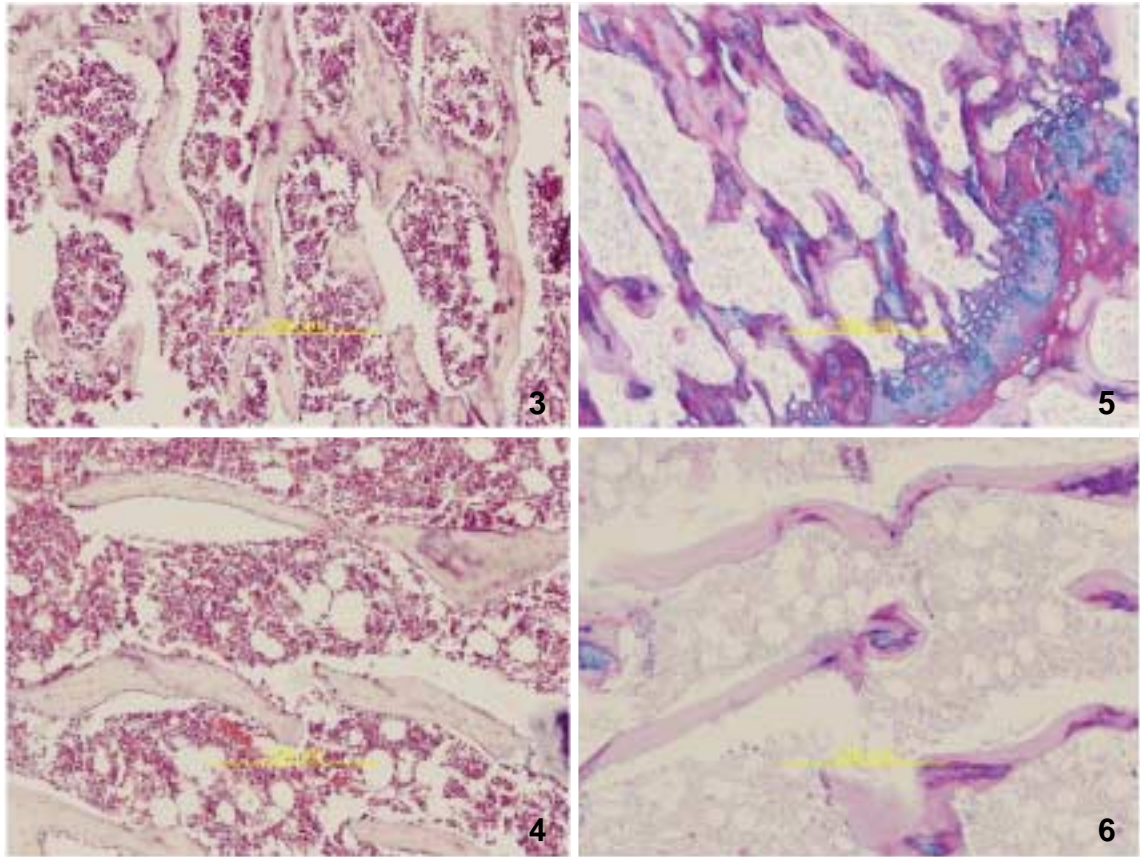
정상대조군의 척추뼈는 잘 발달된 뼈간기둥 (trabecula)이 관찰되었으며 (Fig. 3), 실험군에서는 뼈간기둥은 가늘어진 양상을 보였으며 일부의 뼈간기둥의 연결은 단절된 양상도 관찰되었으며, 골수공간에는 지방이 다수 관찰되었다 (Fig. 4).

#### 2) alcian blue (pH 2.5)-PAS 염색소견

정상대조군의 척추뼈의 뼈간기둥은 대부분 PAS에 양성반응을 나타내어 적색반응을 나타내는 중성 점액질로 구성되어 있으며, 일부에서는 alcian blue에 양성반응을 나타내어 청색반응도 관찰되었다 (Fig. 5). 저칼슘식이와 난소절제병행군에서는 뼈간기둥내 청색반응이 감소되어 산성점액질이 감소된 양상이 관찰되었다 (Fig. 6).

### 2. 생체 내 미세 단층 촬영시스템 조건화과정

pentobarbital (50 mg/kg), chloral hydrate (360 mg/kg), ketamine (50 mg/kg)/xylazine (6 mg/kg)을 사용



**Fig. 3.** Vertebral body of control rat, Well developed bony trabeculae are seen. Many marrow cells are seen in the intervening space between trabeculae. H-E stain,  $\times 100$   
**Fig. 4.** Vertebral body of rat treated with low-calcium diet and bilateral ovariectomy, Significant thinning and loss of bony trabeculae are seen. Disconnection of trabeculae (arrow) are seen. Many adipose tissues are seen. H-E stain,  $\times 100$   
**Fig. 5.** Vertebral body of control rat, Bony trabeculae show PAS reactivity in red colors. In the middle portion of trabeculae, bony trabeculae show alcian blue reactivity in blue colors. Alcian blue (pH 2.5)-PAS  $\times 100$   
**Fig. 6.** Vertebral body of rat treated with low-calcium diet and bilateral ovariectomy, Decrease blue colors in bony trabeculae are seen. Alcian blue (pH 2.5)-PAS  $\times 100$

한 결과 측정시간(20분)에 적합한 마취제는 ketamine 과 xylazine을 병행투여시 가장 안정적인 조건을 나타내었으며, 이때 호흡주기는 초당 1.3에서 1.6회를 나타내었다.

### 고 찰

골다공증은 여러 원인에 의해 나타날 수 있으며,

이러한 골다공증은 뼈에 심각한 영향을 나타내며, 대표적으로 뼈가 약해짐에 따라 골절이 올수 있다.

본 연구자는 골다공증에 대한 연구를 시작함에 있어서, 먼저 실험동물모델을 제작하고자 하였다. 실험동물에 대한 골다공증모델은 장기간의 실험기간을 요구하고 있으며, 개 혹은 돼지를 이용한 모델은 엄청난 실험비용이 필수적인 관계로 소동물인 흰쥐를 이용하고자 하였다. 또한, 뼈에 대한 형태학적인

연구는 표본제작에 어려움이 있는 문제이다. 본 실험에서 사용된 탈회방법은 10% EDTA용액은 관류 고정시 사용된 4% paraformaldehyde용액을 자석교반기에서 가열시킨후 10%가 되도록 EDTA를 용해하였으며, 이러한 용해는 NaOH를 적정하면서 시행하여, 용해후 산염기 평형을 맞추었다. 상기 탈회용액의 장점은 뼈속의 칼슘을 뽑아내면서 동시에 고정을 시키는 작용에 의해 원하는 탈회정도와 조직의 형태적 변형을 예방할수 있어 비교적 좋은 결과를 얻었다. 일반적으로 뼈조직의 표본제작은 탈회라는 단계를 거쳐야 하지만, 탈회방법에 대하여는 많은 연구가 이루어지지 않는 실정이다.

일반적인 탈회방법으로는 formic acid를 쓰거나 산(acid)용액으로 탈회를 하지만 formic acid는 조직 손상이 적은 반면에 탈회능력은 떨어지며, 산용액은 탈회능력은 좋지만 조직손상이 큰 단점이 있다. 본 연구자가 속귀(inner ear) 혹은 다른 뼈에 대한 연구를 수행하면서 10% EDTA용액을 탈회용액으로 사용할바, 탈회능력도 좋고 조직손상도 비교적 없는 것이라 판단되어 본 실험에서도 상기용액을 탈회용액으로 사용하였다(Shin 등 1999, 김 등 2002).

골다공증모델의 조직학적 변화는 저칼슘식이와 난소절제를 병행한 군 모두에서 척추뼈의 뼈잔기둥의 변화가 관찰되었는데, 뼈잔기둥이 가늘어지며, 일부의 뼈잔기둥은 단락된 양상을 나타내었으며, 골수 세포들이 지방세포로 대체되는 양상이 관찰되었다. 척추뼈의 형태적인 변화는 어느 정도 예견된 사실이지만, 지방조직이 증가된 양상은 흥미로운 사실이었다. 부검시 복강내에는 많은 지방조직이 정상대조군에서보다는 골다공증모델에서 증가된 양상을 나타내었으며, 향후 지방증가와 골다공증에 관한 연구도 수행해야 할 것으로 사료된다. 뼈를 형성시켜주는 모세포(osteoprogenic cells)의 기원은 중간엽세포(mesenchymal cells)로 알려져있다. 골다공증모델에서 지방조직의 증가는 중간엽세포가 뼈형성세포로 변하지 않고, 지방세포로 변하는 것이 아닌가 판단되며, 추가적인 연구가 필요하리라 사료되며, Martin 등(1991)의 결과와도 일치하였다.

또한, 뼈잔기둥의 뼈기질에 존재하는 점액다당류의 변화를 보면, 저칼슘식이와 난소절제병행군에서

는 뼈잔기둥내 산성점액다당류의 감소가 관찰되었다. 점액이라는 용어는 과거부터 점액다당류(mucopolysaccharides) 혹은 점액질(mucosubstances) 등으로 불리어 졌으며, 최근에는 당결합체(glycoconjugates)라는 용어로 일반화되어 있으며, 당결합체는 proteoglycans 및 glycoproteins으로 다시 구분될수 있다(Reid와 Clamp 1978). 이러한 점액은 조직화학적으로는 산성기의 유무에 따라 산성점액과 중성점액으로 분류하고 있으며, 산성점액은  $-SO_4H$ 를 갖는 sulfated mucins과 없는 nonsulfated mucins으로 분류되고 있다(Meyer 1949). 또한, Streedman (1959)이 alcian blue염색을 이용하여 점액을 염색한 이후 점액성분을 분석하는데 많은 발전이 이루어졌다. Mowry(1956)는 산성점액이 착색되는 alcian blue 염색과 중성점액에 반응력이 우수한 periodic acid-Schiff염색을 이용한 여러 조직화학적 연구에서 산성점액질은 alcian blue용액에서 청색으로 반응하며, PAS염색에 약하게 반응하거나 염색성이 없으며, 중성점액질은 PAS용액에서 적색으로 반응한다고 하였다.

생체 내 미세 단층 촬영시스템(in-vivo micro-CT)은 초기 개발단계에서는 뼈생검(bone biopsy)과 같은 생체밖조직을 촬영하였고(Ruegsegger 등 1996), 최근에는 생체내 상태의 소동물을 대상으로 촬영이 되고 있다(Panulus 등 2001). 최근에 국내에도 몇몇 대학에서도 연구용 기자재로 도입된 실정이다. 본 연구자들이 사용한 생체 내 미세 단층 촬영시스템은 벨기에 제품인 SKYSCAN1076기종으로 9  $\mu$ m, 18  $\mu$ m, 35  $\mu$ m의 해상도로 촬영할 수 있으며, 해상도가 커질수록 촬영시간은 길어지며, 본 실험에서는 실험동물의 방사능 피해를 최소화하기위하여 35  $\mu$ m 해상도로 촬영하여 촬영시간은 최소화 하였고 셔터(shutter)를 사용하여 방사선 노출을 최소화 시켰다. 흰쥐의 넷째 허리뼈의 몸통에 대하여 뼈 장축에 직각으로 촬영하였으며 평균 촬영시간은 20분 정도가 소요되었다. 척추뼈에 대한 촬영시 중요한 조건은 살아있는 동물을 대상으로 촬영하기 때문에 호흡주기에 따라 영상이미지는 달라지고, 특히, 내부장기의 촬영시 흡기와 호기의 일정한 호흡양상을 조건화시키는 것이 중요한 관건이다. 또한, 투여된 마취제에

의해 실험동물이 마취유도가 되는데, 마취초기와 중기 또는 마취가 깬 무렵에서 일정한 호흡양상을 보여주어야 한다. 만약 그러한 적합한 호흡조건이 충족이 안되면 촬영은 중단될 수밖에 없다. 3가지 정도의 마취제를 쓰고 실험을 한 결과 ketamine/xylazine 병행마취시 가장 좋은 영상을 획득 할 수가 있었다. 본 실험에서는 초당 1.3에서 1.6회의 호흡주기를 나타내었을때 가장 좋은 영상을 취득할수 있었으며, 이때 사용된 마취제의 농도는 흰쥐에 있어서는 ketamine은 체중 kg당 50 mg, xylazine은 체중 kg당 6 mg이 적절한 농도였다. 뼈 연구에 있어서 조직학적인 연구와 생체 내 미세 단층 촬영시스템을 이용한 연구는 서로간에 장, 단점을 갖고 있다. 조직학적 연구는 현미경적 연구를 통하여 조직의 형태와 조직화학적 연구를 수행할수 있는 장점이 있지만, 실험동물을 죽인후에 뼈조직을 적출해야 하며, 또한 뼈조직의 전반적인 형태를 파악하는데 취약한 단점이 있다. 생체내 미세 단층 촬영시스템은 살아있는 실험동물의 뼈형태를 전반적으로 파악할 수 있으며 뼈속의 구조를 정확하게 계측할수 있는 장점이 있지만, 단점으로는 측정장비가 고가이며, 측정하고자 하는 뼈의 위치에 따라 측정시간, 마취제의 선택, 호흡주기의 조절등의 적합한 실험조건을 잡는데 어려움이 있다. 본 연구자들은 일차적으로 골다공증에 대한 모델을 확립하였으며 현재 확립된 골다공증 실험동물에 대한 미세전산화단층촬영작업을 수행중이며 뼈잔기동에 대한 부피, 두께, 간격, 수등의 구조적 파라미터를 측정하고 있으며, 향후에는 골다공증에 대한 치료제로 알려져 있는 여러 약제에 대한 예방 및 치료효과에 대한 연구를 수행할 예정이다.

## 참 고 문 헌

- Eberle J, Schmidmayer S, Erben RG, Stangassinger M, Roth HP : Skeletal effects of Zinc deficiency in growing rats. J Trace Elem Med Biol 13: 21-26, 1999.
- Gennari C, Martini G, Nuti R : Secondary osteoporosis. Aging Clin Exp Res 10: 214-224, 1998.
- Jee WS, Ma Y : Animal models of immobilization osteopenia. Morphologie 83: 25-34, 1999.
- Kim BH, Lim DJ, Lee GS, Ryu JM, Lee BY : Morphological changes of cochlear structures after cisplatin administration. Korean J Otolaryngol 45: 538-543, 2002.
- Martin RB, Zissimos SL : Relationships between marrow fat and bone turnover in ovariectomized and intact rats. Bone. 12: 123-131, 1991.
- Meyer K : Biologic significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. Physiol 27: 335, 1949.
- Molina PM, Gonzalez RE, Santolaria FF, Martinez RA, Rodriguez MF, Rodriguez RE, Milena AA, Velasco VJ : Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on bone histology and mineral metabolism. Alcohol 20: 1-8, 2000.
- Mowry RW : Alcian blue techniques for histochemical study of acidic carbohydrates. J Histochem Cytochem, 4: 407, 1956.
- Panulus MJ, Gleason SS, Easterly ME, Foltz CJ : A review of high-resolution X-ray computed tomography and other imaging modalities for small animal research. Lab Anim (NY) 30: 36-45, 2001.
- Reid L, Clamp JR : The biochemical and histochemical nomenclature of mucins. British Medical Bulletin, 34: 1-8, 1978.
- Rueggsegger P, Koller B, Muller R : A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. Calcif Tissue Int 58: 24-29, 1996.
- Rude RK, Kirchen ME, Gruber HE, Meyer MH, Luck JS, Crawford DL : Magnesium deficiency-induced osteoporosis in the rat uncoupling of bone formation and bone resorption. Magnes Res 12: 257-267, 1999.
- Shin KC, Kim DH, KDH, Lee BY : Effect of Cephalosporins on growth plates of femoral heads of Rats. J Kor Ortho Asso 34: 351-356, 1999.
- Shin WY, Li SZ, Chung SS, Lee HC, Huh KB, Lim SK : Effects of cyclosporine A on sex hormone and estrogen receptor in male rat with special reference to cyclosporin A-induced osteoporosis. Yonsei Med J 41: 61-67, 2000.
- Steedman HF : Alcian blue 8GX : A new stain for mucin. Quart J Microbiol Sci 91: 477-479, 1959.
- Syversen U, Nordsletten L, Falch JA, Madsen JE, Nilsen OG, Waldum HL : Effects of lifelong nicotine inhalation on bone mass and mechanical properties in female rat femurs. Calcif Tissue Int 65: 246-249, 1999.

Uriu K, Mroimoto I, Kai K, Okazaki Y, Okada Y, Qie YL,  
Okimoto N, Kaizu K, Nakamura T, Eto S : Uncoupling  
between bone formation and resorption and resorption in

ovariectomized with chronic cadmium exposure. *Toxicol.  
Appl Pharmacol* 164: 264-272, 2000.

K C I

**Abstract**

## **Micro-CT Evaluation in Osteoporosis Model**

**Chang-Yong Ko, Dae-Gon Woo, Han-Sung Kim, Beob-Yi Lee<sup>1</sup>**

*Department of Biomedical Engineering, College of Health Science, Yonsei University*

<sup>1</sup>*Department of Anatomy, College of Medicine, Konkuk University*

Osteoporosis is a major health-care problem for aging communities. And postmenopausal osteoporosis is a common disorder characterized by an increase in bone resorption relative to bone formation, generally in conjunction with an increased rate of bone turnover.

Twenty female rats were used as rat model of osteoporosis. They randomly were divided into two groups: a normal control group, and calcium-free diet groups treated with bilateral ovariectomy. The animals were sacrificed at 12 weeks after treatment.

In the rats with osteoporosis, there was significant thinning and loss of trabeculae, accompanied by a disconnection of trabeculae. And acid mucopolysaccharides were decreased in osteoporotic animals. In order to setup conditions of *in-vivo* micro-CT, proper anesthetic is ketamine (50 mg/kg)/xylazine (6 mg/kg). And proper breathing rate of experimental animals is 1.3~1.6/sec.

Our finding suggest that bilateral ovariectomy and calcium-free diet induce decrease in thickness of trabecular bone and decrease in acid mucopolysaccharide, therefore cause weakness of bone. And micro-CT imaging system is useful to evaluate trabecular bone. Anesthetic time, anesthetics and respiration rate also signify much in micro-CT imaging system.

**Key words :** *In-vivo*, Micro-CT, Osteoporosis, Trabecular bone, Ovariectomy