(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0095352
(43) 공개일자 2016년08월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
A01K 2267/03 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0016518
(22) 출원일자 2015년02월03일
심사청구일자 2015년02월03일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박의호
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 (안암동5가)
한희철
서울특별시 강남구 강남대로140길 24 (논현동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

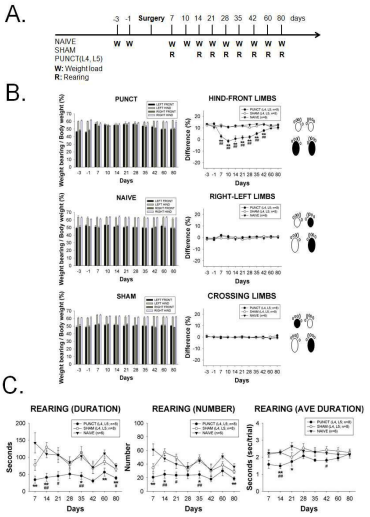
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **추간판성 요통 모델 동물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 추간판성 요통 모델 동물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 여러 구현예에 따라 제조된 추간판성 요통 모델 동물은 장기간동안 자연 발생적으로 진행되는 추간판 변성을 가속화시키고 급성 혹은 만성적 통증을 가진 환자군에서 확인되는 증상과 유사할 뿐만 아니라, 통증의 유도시기 및 유지시기에 대한 연구가 가능하므로, 상기 제조된 모델 동물은 기존의 동물모델과 달리 인간의 추간판성 요통을 의태한 증상과 발병 메커니즘을 가지고 있는 것으로 확인되어, 상기 모델 동물은 추간판성 요통의 메커니즘 연구와 추간판성 요통의 치료법 및 치료약의 개발에 유용하게 응용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

문선욱

경기도 부천시 원미구 중동로 301, 527동 1201호 (중동, 은하마을아파트)

서혜림

서울특별시 강서구 양천로27길 129, 105동 1004호 (방화동, 방화서광아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R1003401
부처명	고려대학교 의과대학 산학협력단
연구관리전문기관	나누리 병원
연구사업명	추간판 퇴행의 기전 및 치료법 개발
연구과제명	추간판 퇴행의 기전 및 치료법 개발
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.03.01 ~ 2013.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판을 천공하는 단계; 및

(b) 상기 천공된 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 음압 발생 장치를 이용하여 흡입하는 단계;를 포함하는 추간판성 요통 모델 동물 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 천공하는 단계는 실험동물을 배와위 자세로 유지시킨 후, 복부로 접근하여 수행되는 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 모델 동물 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 수핵 흡입 단계의 음압은 -765 내지 -755 ㎜Hg인 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 모델 동물 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 수핵 흡입 단계는 끝이 뭉뚝한 형태의 바늘과 음압 발생 장치를 연결하여 수행되는 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 모델 동물 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, (c) 상기 단계 (b)에서 제조된 상기 실험동물은 복부를 봉합한 후, 최소 일주일 이상의 회복시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 모델 동물 제조방법.

청구항 6

(a) 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판을 천공하는 단계; 및

(b) 상기 천공된 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 음압 발생 장치를 이용하여 흡입하는 단계;

(c) 상기 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵이 제거된 실험동물에 통증 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계에서 투여된 통증 치료 후보 물질의 치료효과를 측정하는 단계;를 포함하는 추간판성 요통 치료 후보 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 통증 치료 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 상기 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 제거한 후, 일주일 이후에 수행하는 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 치료 후보 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 통증 치료 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 실험동물의 네 발에 대한 체중 부하를 측정하여 비교하는 방법 또는 실험동물의 두발로 서는 행동의 횟수와 지속시간을 측정하여 비교하는 방법을 수행하는 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 치료 후보 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 통증 치료 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 실험동물의 추간판에 기계적 자극을 가하여 신경 흥분성을 조사하는 방법 또는 실험동물의 추간판에 압력 자극을 가하여 신경 흥분성을 조사하는 방법을 수행하는 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 치료 후보 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 모델 동물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 추간판성 요통 모델 동물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 척추질환이란 등과 허리의 뼈 혹은 신경 및 조직들의 이상이나 손상으로 인하여 요통과 하지 방사통 혹은 마비를 나타내는 질환을 의미한다. 주로 퇴행성으로 오는 경우가 척추질환의 50-70%를 차지하고, 외상이나 종양에 의한 경우가 각각 10-20%정도를 차지한다.

[0003] 추간판의 변성은 다양한 척추질환의 기본적인 병인중의 하나라고 할 수 있으며 환자의 통증과 장애의 주요한 원인이 되는 것으로 알려져 있고, 임상적으로 요통을 비롯하여 추간판 탈출증, 신경근병증, 척추관 협착증, 척추불안정증 등의 다양한 질병과 복합적으로 발현할 수 있다.

[0004] 추간판의 변성(degeneration)은 감소된 영양 공급, 과부하된 기계적 힘(overloaded mechanical force), 그리고 유전적 요소와 같은 복합적인 요소들에 의해 시작되거나 발전된다. 나이가 듦에 따라 추간판 내 세포외기질 구성의 변화는 추간판 세포의 기능을 변화시키고 세포사멸을 증가시킨다. 추간판 세포의 미세환경에서 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines) 및 관련 분해효소들의 증가가 나타난다. 이는 얇아짐과 석회화(thinning and calcification)가 진행되는 연골종판 안의 영양분 확산이 현저하게 감소되어 나타난 결과이다. 또한, 기계적 힘도 추간판 변성에 직접적인 역할을 준다. 세포 생존과 세포외기질 합성은 둘 다 압축 스트레스(compressive stress)에 민감하게 영향 받는다. 어떤 기계적 자극은 영양분 확산 촉진과 기질 합성에 필수적이지만, 과도한 힘은 국소적 조직 손상을 일으켜 조직 복구를 늦추고 세포외기질에서 나타나는 고유의 변형률(strain distribution)을 망가지게 한다. 마지막으로, 유전적 요소도 추간판 변성에 대한 개별적 취약성에 중요한데, 쌍둥이 연구와 유전체 수준의 분석(genome-wide assay)를 통한 집단연구의 결과들이 이를 뒷받침하고 있다.

[0005] 추간판성 요통(discogenic low back pain)은 추간판이 척추와 척추사이에서 주어지는 힘을 적절히 분산시키면서 운동성을 확보하는 정상적 기능을 잃어버리면서 나타날 수 있다. 이는 보통 변성된 추간판(degenerated IVD)과 함께 진행되며, 주변조직으로 돌출된 추간판(prolapsed or bulging IVD)은 척추 주위의 신경 및 신경근(nereve root)을 압박하거나 그것들에 염증을 일으켜서 통증을 일으킬 수 있고, 또한 더 크게 밀려나온 추간판(extruded or herniated IVD)은 척수경막에 존재하는 통증 수용체를 자극하거나 후종인대에 스트레칭 스트레스(stretching stress)를 줄 수 있다. 이는 추간판으로 인한 간접적 통증(indirect pain)이며, 최근 연구결과에서는 추간판 자체의 통증성 신경섬유를 통해 직접적 통증(direct pain)의 실험적 증거도 제시되었다. 수핵과 섬유륜의 구조적 결합, 추간판의 홈과 틈은 수핵과 섬유륜 안에 존재하는 세포로부터 전염증성 분자입자를 비정상적으로 증가시

킬 수 있을 뿐만 아니라, 면역세포들의 활성화 및 침윤을 가능케 할 수 있다. 이는 통증성 신경 섬유(nociceptive nerve fibers)가 추간판 안쪽 섬유륜까지 들어가게 하고, 후근절(dorsal root ganglia)에서는 신경영양인자(neurotrophins)가 통증관련 양이온 채널-예를 들어, acid-sensing ion channel3(ASIC3) 그리고 TRPV1의 증가를 촉진시켜서 통증 신경섬유를 과분극시킬 수 있다고 보고된바 있다.

[0006] 이와 같이 추간판으로 인한 요통의 메커니즘과 그 치료책을 위해서는 실험동물모델을 통한 풍부한 연구 성과 및 결과가 절실히 요구된다.

[0007] 종래 추간판 탈출증(herniated IVD, SD rats) 모델의 경우, 25G 주사바늘로 L4(요추 4-5번사이) 추간판 천공 후에 수핵 일부분을 적출하여 L4 신경근 및 후근절에 묻히고, 동일한 주사기 바늘을 이용하여 주위 척추를 약간 밀어서 L4 신경근 및 후근절 위치를 변경시키거나 길이가 약간 늘어나게 하는 기계적 자극을 가하여 제조된 바 있고(비특허문헌 1), 추간판 천공 혹은 손상(punctured IVD, SD rats) 동물 모델로서 21G(혹은 직경0.4mm) 주사바늘로 L4 추간판을 천공하여 제조(비특허문헌 2)되었는데, 실제로 실험동물을 이용한 추간판성 요통 모델은 그 유발조건이 까다롭고, 정형화되기 어려우며, 무엇보다도 측정 신뢰도가 높은 스크리닝 방법(통증행동검사)이 존재하지 않고 연구그룹에 따라 상호 충돌하는 행동결과를 포함하고 있다.

[0008] 이러한 이유로는 첫째, 추간판에 대한 기계적 손상 및 화학적 자극이 추간판 변성을 일으킬 수는 있지만, 요통 발생을 위한 충분한 조건이 되지 않을 수 있고, 둘째, 사지보행을 하는 실험동물의 특성상 요통으로 인한 행동변화가 적절히 보정(compensation)되어 나타나서 정상동물과 큰 차이를 나타내지 않을 수 있기 때문이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 추간판으로 인한 요통 동물 모델 제조 시, 단일 추간판을 천공 손상시킨 후, 추간판 수핵을 흡입하여, 종래 방법으로 제조된 추간판으로 인한 요통 동물보다 더욱 신뢰도가 높으면서 효과적인 방법으로 추간판성 요통을 유발할 수 있음에 착안하여 본 발명에 이르렀다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) A morphological and biochemical study of intervertebral disc degeneration induced by percutaneous puncture in rabbits, 최우진, 서울대학교 대학원:의학과(신경외과학전공), 박사학위 논문(2008)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 (a) 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판을 천공하는 단계; 및

[0012] (b) 상기 천공된 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 음압 발생 장치를 이용하여 흡입하는 단계;를 포함하는 추간판성 요통 모델 동물 제조방법을 제공하는 것이다.

[0013] 또한, (1) 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판을 천공하는 단계;

[0014] (2) 상기 천공된 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 음압 발생 장치를 이용하여 흡입하는 단계;

[0015] (3) 상기 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵이 제거된 실험동물에 통증 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및

[0016] (4) 상기 (3) 단계에서 투여된 통증 치료 후보 물질의 치료효과를 측정하는 단계;를 포함하는 추간판성 요통 치료 후보 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 나아가, 상기 제조 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 모델 동물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명의 대표적인 일 측면에 따르면,

[0019] (a) 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판을 천공하는 단계; 및

[0020] (b) 상기 천공된 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 음압 발생 장치를 이용하여 흡입하는 단계;를 포함하는 추간판성 요통 모델 동물 제조방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 천공하는 단계는 실험동물을 배와위 자세로 유지시킨 후, 복부로 접근하여 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 수핵 흡입 단계의 음압은 -765 내지 -755 ㎜Hg인 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 수핵 흡입 단계는 끝이 뭉뚝한 형태의 바늘과 음압 발생 장치를 연결하여 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, (c) 상기 단계 (b)에서 제조된 상기 실험동물은 복부를 봉합한 후, 최소 일주일 이상의 회복시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0025] 본 발명의 다른 측면에 따르면,

[0026] (a) 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판을 천공하는 단계;

[0027] (b) 상기 천공된 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 음압 발생 장치를 이용하여 흡입하는 단계;

[0028] (c) 상기 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵이 제거된 실험동물에 통증 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및

[0029] (d) 상기 (c) 단계에서 투여된 통증 치료 후보 물질의 치료효과를 측정하는 단계;를 포함하는 추간판성 요통 치료 후보 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 통증 치료 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 상기 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 제거한 후, 일주일 이후에 수행하는 것을 특징으로 한다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 통증 치료 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 실험동물의 네 발에 대한 체중 부하를 측정하여 비교하는 방법 또는 실험동물의 두발로 서는 행동의 횟수와 지속시간을 측정하여 비교하는 방법을 수행하는 것을 특징으로 한다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 통증 치료 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 실험동물의 추간판에 기계적 자극을 가하여 신경 흥분성을 조사하는 방법 또는 실험동물의 추간판에 압력 자극을 가하여 신경 흥분성을 조사하는 방법을 수행하는 것을 특징으로 한다.

[0033] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 제조 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 모델 동물을 제공한다.

발명의 효과

[0034] 본 발명의 여러 구현예에 따라 제조된 추간판성 요통 모델 동물은 장기간동안 자연 발생적으로 진행되는 추간판 변성을 가속화시키고 추간판성 통증의 유도시기 및 유지시기를 조절하는 장점을 가지고 있으며, 상기 제조된 모델 동물은 기존의 동물모델과 달리 인간의 추간판성 요통을 의태한 증상과 발병 메커니즘을 가지고 있는 것으로 확인되어, 상기 모델 동물은 추간판성 요통의 메커니즘 연구와 추간판성 요통의 치료법 및 치료약의 개발에 유용하게 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 추간판 요통 모델 동물을 제조한 후, 7일(7D)부터 80일(80D) 동안 네발 각각에 미치는 체중부하(weight load)를 반복적으로 측정한 결과를 나타내는 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 추간판 요통 모델 동물이 기계적 자극에 반응하여 나타나는 추간판 감각신경의 단위 시간당 흥분된 활동전위의 최대발사개수(peak spikes per second) 및 역치값(threshold)을 조사한 결과를 나타내는 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 추간판 요통 모델 동물이 압력자극에 반응하여 나타나는 감각신경의 단위 시간당 흥분된 활동전위의 최대발사개수(peak spikes per second) 및 역치값(threshold)을 조사한 결과를 나타

내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.

[0037] 본 발명은 추간판성 요통 모델 동물 제조방법으로서, (a) 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판을 천공하는 단계; 및 (b) 상기 천공된 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 음압 발생 장치(negative pressure)를 이용하여 흡입하는 단계;를 포함하는 추간판성 요통 모델 동물 제조방법을 제공한다.

[0038] 본 명세서에 있어서, 실험동물이란 추간판성 요통 질환 증상을 갖지 않은 동물을 의미한다. 상기 실험동물은 특별히 한정되는 것은 아니고, 인간을 제외한 어떠한 동물도 가능하며, 바람직하게는 포유동물일 수 있으며, 일례로 설치류 동물일 수 있고, 보다 구체적으로 랫, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 개 등일 수 있다.

[0039] 상기 추간판성 요통(discogenic low back pain) 모델 동물이란, 척추뼈와 척추뼈 사이에 있는 척추에 가해지는 충격을 완화하는 쿠션 역할을 하고 있는 구조물인 추간판이 척추와 척추사이에서 주어지는 힘을 적절히 분산시키면서 운동성을 확보해야 하는데, 정상적 기능을 하지 못해 요추에 통증이 유발된 모델 동물을 의미하며, 추간판성 요통은 자연 발생적으로는 일어나지 않는 증상으로 급성 혹은 만성적 통증을 의미하고, 본 발명의 추간판성 요통 모델 동물을 통해 살아있는 상태에서 통증 행동 및 신경 흥분의 활동성이 실시간으로 관찰 가능하다.

[0040] 한편, 추간판성 요통은 병태생리적 기전에 의해 장기간동안 자연발생적으로 나타나는 추간판성 변성(degeneration)과는 전혀 다르다고 볼 수 있는데, 추간판성 요통은 추간판에 직접적으로 연결된 신경 및 주변 신경까지도 함께 이해해야 한다.

[0041] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 천공하는 단계는 실험동물을 배와위 자세로 유지시킨 후, 복부로 접근하여 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판을 천공하는 과정은 실험동물을 마취시킨 후, 실험동물의 복부 접근(배와위 자세, supine position)을 통해 추간판 주변을 주행하는 신경 손상 없이, 최소 근육을 제거하고 추간판을 노출시켜 천공하는 방법으로 수행할 수 있다.

[0043] 이때, 추간판과 연결된 신경 손상을 피하기 위해서 광학현미경을 통해 직접 눈으로 관찰하면서 추간판 천공 과정이 수행된다.

[0044] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 수핵 흡입 단계의 음압은 -800 내지 -700 ㎜Hg인 것을 특징으로 한다.

[0045] 상기 추간판성 요통 모델 동물 제조방법의 수핵을 흡입 과정은 -765 내지 -755 ㎜Hg 음압(negative pressure)을 유지한 상태로 수행되는 것이 바람직한데, 가장 바람직하게는 1 대기압(760 ㎜Hg)을 기준으로 -760 ㎜Hg로 음압을 고정시킬 수 있다.

[0046] 경험적으로 -760 ㎜Hg 보다 적은 음압은 추간판내 수핵을 흡입할 때 시간이 오래 걸리고 수핵 흡입 효율성이 떨어지는 문제가 있고, -760 ㎜Hg보다 더 큰 강한 음압은 추간판 수핵 흡입과정 동안 추간판 자체 혹은 섬유륜에 불필요한 손상을 주는 문제점이 있다.

[0047] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 수핵 흡입 단계는 끝이 뭉뚝한 형태의 바늘과 음압 발생 장치를 연결하여 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0048] 한편, 상기 흡입 과정 수행 시 사용되는 바늘은 끝이 뭉뚝한 형태의 바늘을 음압 발생 장치와 연결하여 사용하는데, 끝이 뾰족한 바늘을 사용하거나, 종래 많이 사용하고 있는 주사기 실린더를 사용하게 되면, 섬유륜 외에 주위 조직이나 골막 등에 과도한 자극을 주어 주위 조직을 변화시키거나, 수핵을 흡입하는데 시간이 오래 걸리게 하거나 효율성을 떨어뜨린다.

[0049] 특히, 끝이 뭉뚝한 형태의 바늘을 음압 발생 장치와 연결하여 사용하는 것은 종래의 주사기 끝은 뾰족하여 구멍

을 쉽게 내기에 적합하지만, 섬유륜에 상처를 주고 섬유륜을 뚫고 나가서 주위조직, 골막 및 주위신경에 자극을 줄 수 있고, 이는 추간판성 요통이 추간판 변성 자체보다는 뚫린 구멍을 통해 흘러나간 일부 추간판 수핵 혹은 주사바늘로 인한 추간판 주위 조직 자극으로부터 나타날 수 있다.

[0050] 본 발명의 일 구현예에 있어서, (c) 상기 단계 (b)에서 제조된 상기 실험동물은 복부를 봉합한 후, 최소 일주일 이상의 회복시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0051] 본 발명에 따른 실험동물은 다시 절개된 복부를 봉합하고, 상처치료를 수행한 후, 마취에서 회복될 때까지 또는 마취에서 회복된 후 일정 시간 동안 상기 실험동물을 사육하기 위한 최적 조건 또는 상기 실험동물에 적합한 조건에서 안정을 취하게 할 수 있다.

[0052] 바람직하게는 최소 일주일 이상의 시간동안 회복시켜야지만, 수술부위에 의한 통증요소를 배체시킬 수 있다.

[0053] 본 발명의 다른 측면에 따르면,

[0054] (a) 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판을 천공하는 단계;

[0055] (b) 상기 천공된 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 음압 발생 장치를 이용하여 흡입하는 단계;

[0056] (c) 상기 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵이 제거된 실험동물에 통증 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및

[0057] (d) 상기 (c) 단계에서 투여된 통증 치료 후보 물질의 치료효과를 측정하는 단계;를 포함하는 추간판성 요통 치료 후보 물질을 스크리닝하는 방법이 개시된다.

[0058] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 통증 치료 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 상기 실험동물의 요추 4번 및 5번 추간판 내의 수핵을 제거한 후, 일주일 이후에 수행하는 것을 특징으로 한다.

[0059] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 통증 치료 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 실험동물의 네 발에 대한 체중 부하를 측정하여 비교하는 방법 또는 실험동물의 두발로 서는 행동의 횟수와 지속시간을 측정하여 비교하는 방법을 수행하는 것을 특징으로 한다.

[0060] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 통증 치료 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 실험동물의 추간판에 기계적 자극을 가하여 신경 흥분성을 조사하는 방법 또는 실험동물의 추간판에 압력 자극을 가하여 신경 흥분성을 조사하는 방법을 수행하는 것을 특징으로 한다.

[0061] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 제조방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 추간판성 요통 모델 동물이 개시된다.

[0062] 본 발명의 추간판성 요통 모델 동물은 장기간동안 자연 발생적으로 진행되는 추간판 변성을 가속화시키고 급성 혹은 만성적 통증을 가진 환자군에서 확인되는 증상과 유사할 뿐만 아니라, 통증의 유도시기 및 유지시기에 대한 연구가 가능하므로, 상기 제조된 모델 동물은 기존의 동물모델과 달리 인간의 추간판성 요통을 의태한 증상과 발병 메커니즘을 가지고 있는 것으로 확인되어, 상기 모델 동물은 추간판성 요통의 메커니즘 연구와 추간판성 요통의 치료법 및 치료약의 개발에 유용하게 응용될 수 있다.

[0063] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[0064] **실험동물 및 사육방법**

[0065] 실험에 사용된 실험동물은 300 내지 350g의 수컷 Sprague-Dawley 쥐(Sprague-Dawley rat, 고려대학교 의과대학

동물실험센터, 대한민국)로 수행하였으며, 동물실험 수험과정은 고려대학교 동물실험윤리위원회(승인번호: KUIACUC-20131104-2)의 승인하에 NIH(NIH publication No.86-23, revised 1985) 동물실험 기준을 준수하였다.

[0066] 실험동물은 12시간 간격의 명암주기, 20 내지 25 ℃의 온도조건 및 40 내지 60%의 습도조건으로 이루어진 표준 조건을 유지하면서 사육하였고, 동물의 사료와 물은 실험기간 동안 상시로 섭취할 수 있게 하였다.

[0067] **실시예 1: 추간판성 요통 모델(이하, PUNCT) 제조**

[0068] 흰 쥐의 체온을 37 ℃로 정상적으로 유지시키는 가운데 케타민(80-100 mg/kg)과 자일라진(5-10 mg/kg)으로 마취를 유도하였다. 복부 접근(배와위 자세, supine position)을 통하여 내장을 생리 식염수로 적셔진 멸균거즈로 둘러싼 후 한쪽 편으로 걷어낸 후, 추간판 주변을 주행하는 신경 손상 없이 최소의 근육을 제거하고 추간판을 노출시켰다.

[0069] 요추 2, 3, 6번과 천추 1번 추간판은 제외하고, 요추 L4와 L5 추간판만을 광학현미경을 통해 직접 눈으로 관찰하면서 22G 주사바늘(끝이 뾰족한 주사바늘 사용)로 천공한 후, 음압(negative pressure)을 발생시키는 장치(CW-300, CHANG WOO)를 사용하여 -760 mmHg 음압을 유지한 상태로 추간판 수핵을 흡입하고, 그 후 빠른 시간 안에 복부를 봉합하였다.

[0070] 이때, 추간판 내 수핵을 흡입할 때에는 주사바늘 끝을 마모하여 뭉뚝한 상태로 음압 발생기와 연결하여 사용하였다.

[0071] 수술 후 7일 동안 회복하는 시간을 주었다.

[0072] 한편, 대조군(SHAM)으로는 복부만 절개되고, 요추 2, 3, 4, 5, 6번 천추 1번 추간판이 정상인 쥐를 사용하였고, 무처리군(NORMAL)으로는 복부절개 없이 추간판도 정상인 쥐를 사용하였다.

[0073] **실험예 1: 추간판성 요통 모델의 통증관련 행동 측정**

[0074] **(1) 네 발에 대한 체중 부하(weight load) 측정**

[0075] 본 발명자에 의해 개발된 행동 평가 장치(US6629056 B2)를 이용하여 보행 시에 발에 전달되는 체중부하를 이용한 측정 장치로 자유롭게 걷는 상황에서 통증을 측정하였다.

[0076] 실험 장치는 아크릴로 제작된 출발지와 통로 그리고 도착지로 구성되어 있는데 통로의 발판은 무게 감지 센서인 로드셀(Dana load cell, working range 0-1000g, Dana load cell LTD., Korea)를 부착하여 각 발판에 부하 되는 무게를 기록하였다. 발판 밑에 부착된 각각의 로드셀은 증폭기(DN-AM300, Dana load cell LTD.)와 디지털 변환기(1716, Dana load cell LTD.)를 통해 컴퓨터로 전송하고 자체 제작한 소프트웨어(WBT, Korea)에 의해서 시간 축을 가지는 무게의 변화곡선을 확인하고 분석하였다.

[0077] 추간판 천공 전에 모든 실험동물들은 격리된 방과 측정 장치 안에서 환경적응(habituation)시키고, 천공 전 3일(-3D)과 1일(-1D) 2회 baseline 값을 추출하였다. 체중부하 검사는 측정 장치의 출발지에서 도착지까지 5-6회 통과시키고, 앞발(left and right front limb)과 뒷발(left and right hind limb)에 실리는 모든 체중부하(g)를 기록하였다. 각 발에서 추출된 체중 부하를 체중으로 나눈 퍼센트(%)를 이용하여 측정값을 비교 분석하였다.

[0078] 추가 분석을 위해 짝지어진 각 발의 평균을 사용하여 분석한 방법은 다음과 같다:

[0079] a. FRONT-HIND(왼쪽오른쪽 뒷발 평균-(빼기)왼쪽 오른쪽 앞발 평균)

[0080] b. RIGHT-LEFT(왼쪽 앞뒷발 평균-(빼기)오른쪽 앞뒷발 평균)

[0081] c. CROSSING(왼쪽 앞발 오른쪽 뒷발 평균-(빼기)오른쪽 앞발과 왼쪽 뒷발의 평균).

[0082] 실험결과에서 통증행동의 개별지표들 및 기계적 자극(혹은 압력자극)으로 흥분된 활동전위의 최대발사개수와 역치값에 대한 집단 간의 통계적 유의미성은 1차원 분산 분석(One-way ANOVA)과 Tukey 사후검정을 이용하여 변별

하였다. 모든 측정된 데이터와 관련해서, $p < 0.05$ 을 기준으로 적용하였다.

[0083] 도 1에 나타낸 바와 같이, 천공 및 수핵 흡입을 한 후 7일(7D)부터 80일(80D) 동안 네발 각각에 미치는 체중부하(weight load)를 반복적으로 측정한 결과, 통제집단들(naive 및 sham)은 RIGHT-LEFT 및 CROSSING LIMBS의 차이를 보이지 않고, HIND-FRONT LIMBS에서 앞발보다 뒷발에 비중이 약 12-13% 정도가 더 큰 상태에서 보행하는 행동경향을 보였다.

[0084] 한편, 추간판 천공집단(실시예 1)은 통제집단들과 유사하게 RIGHT-LEFT 및 CROSSING LIMBS는 변동이 보이지 않았지만, HIND-FRONT LIMBS에서는 앞발과 뒷발의 비중 차이가 거의 사라지는 보행을 보였다.

[0085] 이런 '앞발 의존성 보행' 특징은 천공 후 7일부터 42일 동안 나타나다가 점차 정상보행으로 회복되었다(PUNCT 및 naive, 7D, $p < 0.01$, 10D, $p < 0.01$, 14D, $p < 0.01$, 21D, $p < 0.01$, 28D, $p < 0.01$, 35D, $p < 0.01$, 42D, $p < 0.01$; PUNCT 및 sham, 7D, $p < 0.01$, 10D, $p < 0.01$, 14D, $p < 0.01$, 21D, $p < 0.01$, 28D, $p < 0.01$, 35D, $p < 0.01$, 42D, $p < 0.01$) (도 1B 참고).

[0086] **(2) 뒷다리 두발로 서기(rearing)**

[0087] 흰 쥐를 격리된 방에 설치한 투명한 아크릴 벽으로 둘러싸인 원형 공간(지름 80 cm)안에서 자유롭게 탐색할 수 있는 시간(10 min)을 주고 난 뒤, 뒷다리 두발로 서기 행동의 총 횟수와 총 지속시간을 초시계를 이용하여 직접(manually) 측정하였다. 추가적 분석을 위해 1회 평균지속시간(총 지속시간/총 횟수)을 사용하여 비교하였다.

[0088] 도 1에서와 같이 천공 후 7일부터 80일까지 반복해서 측정된 결과는, 통제집단들과 비교해서 추간판 천공 집단은 일정한 관찰시간 동안(10분) 총 지속시간, 총 횟수, 1회 평균 지속시간(총 지속시간/총 횟수)이 현저하게 떨어지는 현상이 지속되었다(PUNCT 및 naive, 총 지속지간, 7D, $p < 0.01$, 14D, $p < 0.01$, 35D, $p < 0.05$, 60D, $p < 0.01$, 80D, $p < 0.01$; 총 횟수, 7D, $p < 0.01$, 14D, $p < 0.05$, 35D, $p < 0.05$, 80D, $p < 0.01$;1회 평균지속시간, 14D, $p < 0.01$, 21D, $p < 0.05$; PUNCT 및 sham; 총 지속지간, 14D, $p < 0.01$, 35D, $p < 0.01$, 80D, $p < 0.05$; 총 횟수, 14D, $p < 0.01$, 21D, $p < 0.05$, 35D, $p < 0.01$; 1회 평균지속 시간, 14D, $p < 0.01$, 42D, $p < 0.05$) (도1 C).

[0089] **실험예 2: 생체조건의 전기 생리학적 방법으로 단일 감각신경의 흥분성 측정**

[0090] 흰 쥐를 Urethane(1ml/200g)으로 마취 시킨 뒤, 기도확보를 위해 기관 삽관을 시행하고 수술 중 수액과 마취제의 주입이 용이하도록 피부정맥에 폴리에틸렌 튜브(polyethylene tube)를 삽입했다.

[0091] 수술 중 혈압 감시를 위하여 좌측 경동맥에 폴리에틸렌 튜브를 삽입하여 압력전달기(WPI, model BP-1, USA)를 통하여 연속적으로 감시 기록하고, 체온 유지를 위하여 식도 내 온도를 측정하여 항온 통제기에 연결하여 체온을 37 ℃로 유지시켰다.

[0092] 근육운동으로 인하여 기록전극에 발생할 수 있는 노이즈를 제거하기 위하여 근이완제를 일정시간에 주입하여 신경-근 접합부를 차단하고, 호기 끝의 탄산가스분압(End exporatory carbon dioxide)을 4.0 vol%로 유지시켰다.

[0093] 추간판에 연결되어 있다고 알려져 있는 구심성 섬유 중 척추주위 교감신경줄기 중의 단일 신경섬유를 백금선 위에 올려놓았다. 증폭기(DAM 80, WPI)를 이용하여 10000-20000배 증폭된 활동전위를 계속적으로 오실로스코프로 모니터링 하며, 증폭된 활동전위는 A/D converter(CED1401, England)에서 디지털 신호로 변환되어 컴퓨터의 소프트웨어(spike2)에서 실시간으로 기록되고 분석되었다.

[0094]

[0095] **(1) 추간판에 기계적 자극(von Frey filaments)을 가했을 때의 신경 흥분성 조사**

[0096] 추간판에 대한 기계적 자극으로는 본프레이 필라멘트(0.4, 0.6, 1, 2, 4, 6, 10, 26g; 자극간 간격: 30-40sec)를 사용하였고, 기계적 자극에 반응하여 나타나는 추간판 감각신경의 단위 시간당 흥분된 활동전위의 최대발사개수(peak spikes per second) 및 역치값(threshold)을 조사하였다.

[0097] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 기계적 자극강도(0.4-26 g)에 따른 활동 전위가 천공 요추 추간판 집단(천공 후 35일째, 35D PUNCT)이 통제집단들(sham 및 naive)보다 더욱 뚜렷하게 증가되는 경향을 보였다(도 2 A, B).

[0098] 기계적 자극에 반응하는 역치에서는 집단간의 유의미한 차이를 보이지 않았지만, 자극-감각신경 반응곡선에서 35D PUNCT이 통제 집단들과 비교해서 주어진 자극수준에서 더 큰 활동전위 반응양상을 보였다(35D PUNCT 및 naive, 1g, $p < 0.05$, 2g, $p < 0.05$, 6g, $p < 0.05$, 26g, $p < 0.05$; 35D PUNCT 및 sham, 1g, $p < 0.05$, 2g, $p < 0.05$, 6g, $p < 0.05$, 10g, $p < 0.05$, 26g, $p < 0.01$)(도 2 B). 집단별로 추간판조직 내 전기 자극을 통해 얻은 감각신경의 전도속도(CV)는 일부분은 C-신경섬유(CV < 3 m/s)로 다른 일부분은 Aδ-신경섬유(3 < CV < 20 m/s)로 나타났다(도 2 C).

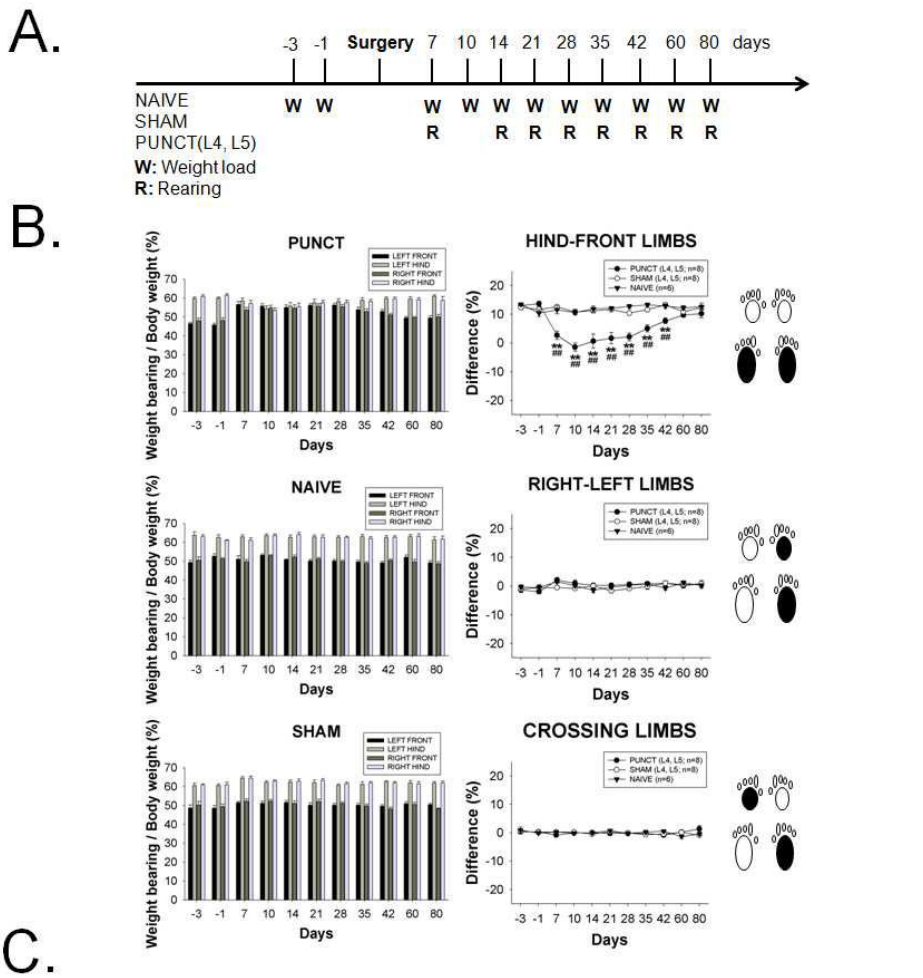
[0099] **(2) 추간판 내 압력자극(intradiscal pressure)을 가했을 때의 신경 흥분성 조사**

[0100] 추간판에 대한 압력은 매 실험마다 압력센서의 수치를 PRSIM Pressure Stimulator(WPI, calibrator)로 교정(calibration) 후, 23G 주사바늘과 식염수가 채워진 튜빙을 통해 추간판 내 압력자극(100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mmHg; 자극 지속시간: 10 sec; 자극간 간격: 70 sec)이 전달되었다. 측정 수치는 압력자극에 반응하여 나타나는 감각신경의 단위 시간당 흥분된 활동전위의 최대발사개수(peak spikes per second) 및 역치값(threshold)을 조사하였다.

[0101] 실시예에 대한 결과로서, 주사기 실린지(5 ml)와 튜빙으로 연결된 23G 주사바늘로 요추 추간판에 삽입 후 식염수(saline) 주입을 통해 추간판 내 압력이 증가하면(100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mmHg; 자극시간-10sec; 자극간격-70sec), 추간판과 연결된 감각신경의 단위시간당 발화개수가 증가하였다(도 3A). 압력자극-반응곡선의 경우에서 천공 요추 추간판 집단(천공 후 35일째, 35D PUNCT; 천공 후 14일째, 14D PUNCT)은 통제집단들(naive 및 sham)과 비교했을 때, 동일한 일련의 압력자극의 세기에 따른 활동전위 개수는 더욱 뚜렷하게 증가하는 현상을 보였다(35D PUNCT 및 naive, 2000 mmHg, $p < 0.05$, 2500 mmHg, $p < 0.01$, 3000 mmHg, $p < 0.05$; 35D PUNCT 및 sham, 2000 mmHg, $p < 0.05$, 2500 mmHg, $p < 0.01$, 3000 mmHg, $p < 0.05$; 14D PUNCT 및 naive, 2500 mmHg, $p < 0.05$; 14D PUNCT 및 sham, 1500 mmHg, $p < 0.05$, 2500 mmHg, $p < 0.05$)(도 3B left). 또한, 압력 자극에 대한 역치값에서도 35D 및 14D PUNCT이 통제집단들 보다 더 낮은 수준을 보였다(35D PUNCT 및 sham, $p < 0.05$; 14D PUNCT 및 naive, $p < 0.01$, 14D PUNCT 및 sham, $p < 0.01$)(도 3 B right). 그러나 35D 및 14D PUNCT 상호간의 비교에 있어서 압력자극-반응곡선 및 역치값은 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다.

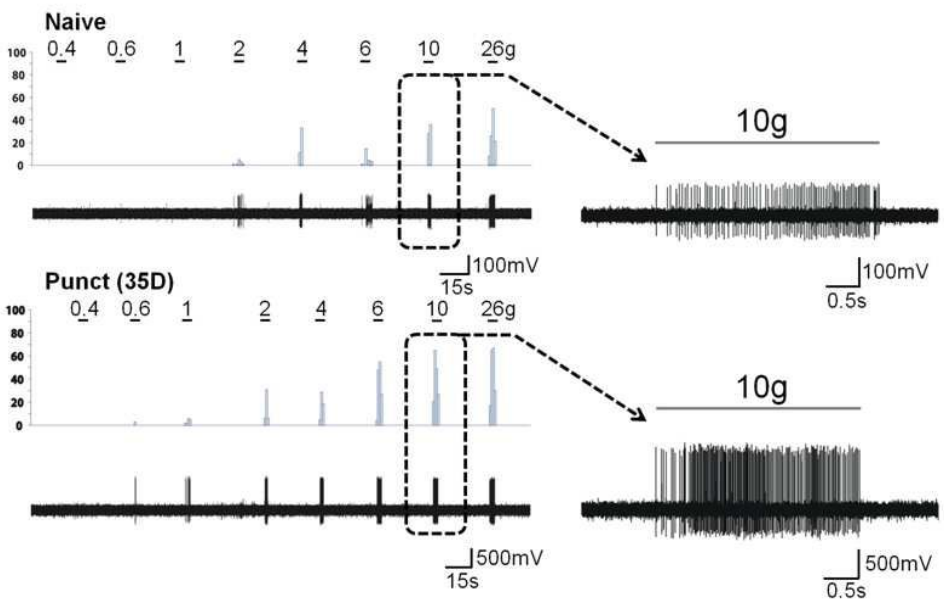
도면

도면1

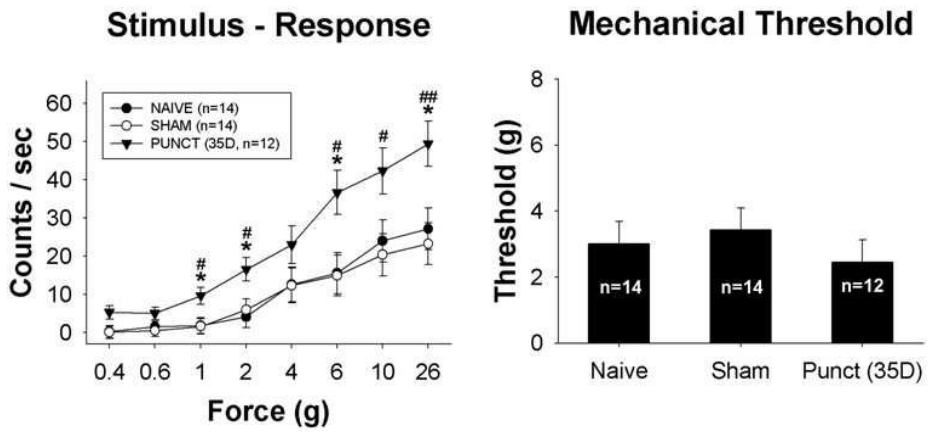

A.
-3 -1 Surgery 7 10 14 21 28 35 42 60 80 days
NAIVE
SHAM
PUNCT(L4, L5)
W: Weight load
R: Rearing
B.
PUNCT
HIND-FRONT LIMBS
NAIVE
RIGHT-LEFT LIMBS
SHAM
CROSSING LIMBS
Weight bearing / Body weight (%)
Difference (%)
Days
C.
REARING (DURATION)
REARING (NUMBER)
REARING (AVE DURATION)
Seconds
Number
Seconds (sec/trial)
PUNCT (L4, L5; n=8)
SHAM (L4, L5; n=8)
NAIVE (n=6)

도면2

A.



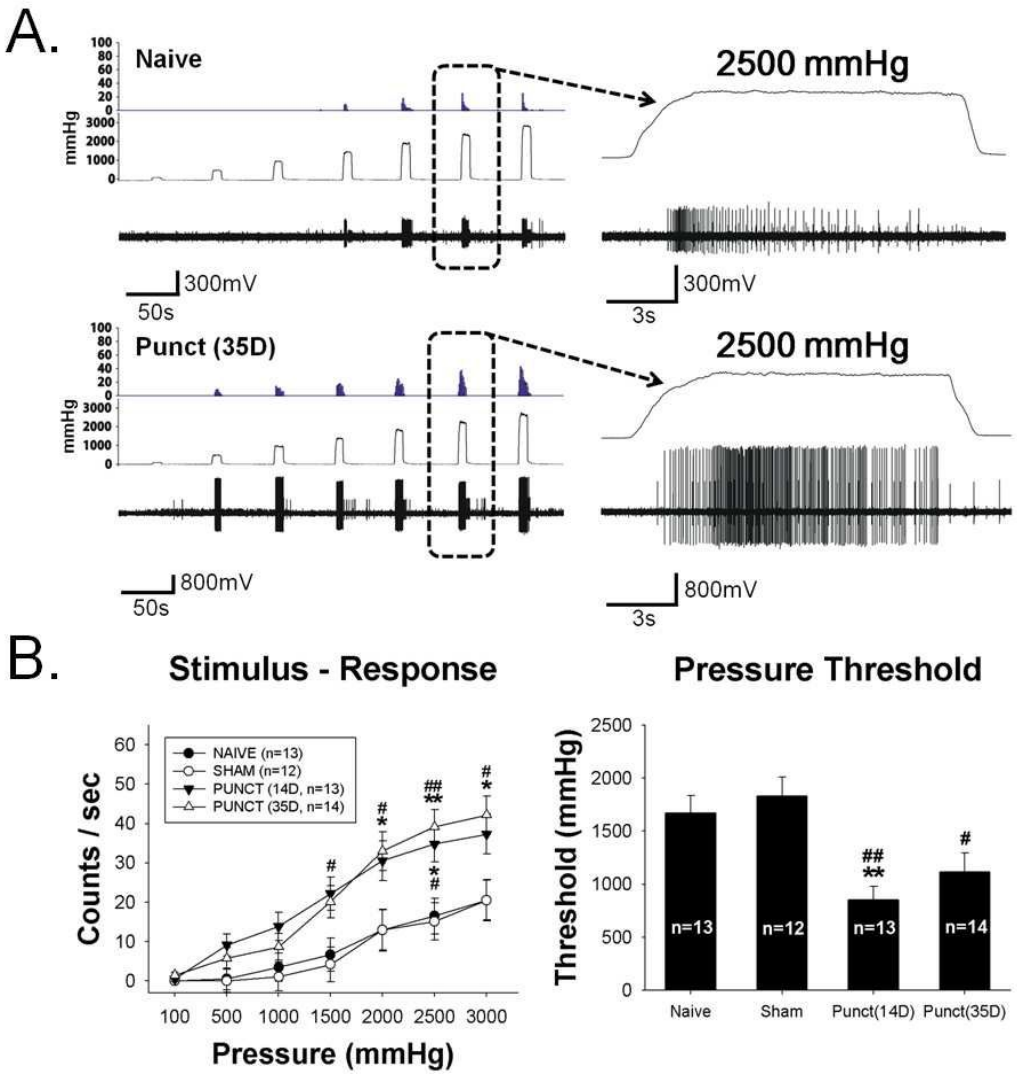
B.



C.

Group	Conduction Velocity (m/sec)	
	C fiber	Aδ fiber
Naïve	2.5 ± 0.8 (n=3)	9 ± 4.6 (n=7)
Sham	1.8 ± 0.8 (n=4)	12.2 ± 7.7 (n=5)
Punct (35D)	1.5 ± 0.7 (n=4)	7.5 ± 5.1 (n=4)

도면3


A.
Naive
2500 mmHg
mmHg
300mV
50s
300mV
3s
Punct (35D)
2500 mmHg
800mV
50s
800mV
3s
B.
Stimulus - Response
Pressure Threshold
NAIVE (n=13)
SHAM (n=12)
PUNCT (14D, n=13)
PUNCT (35D, n=14)
Counts / sec
Pressure (mmHg)
Threshold (mmHg)
n=13
n=12
n=13
n=14
Naive
Sham
Punct(14D)
Punct(35D)