



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0025268
(43) 공개일자 2019년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/027 (2013.01)

A01K 2207/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0111711

(22) 출원일자 2017년09월01일

심사청구일자 2017년09월01일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

송창화

대전광역시 중구 충무로107번길 100, 107동 1401호(대흥동, 센트럴자이)

조수나

대전광역시 중구 보문산로 345-27, 행복빌라 501호(문화동)

(74) 대리인

특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 6 항

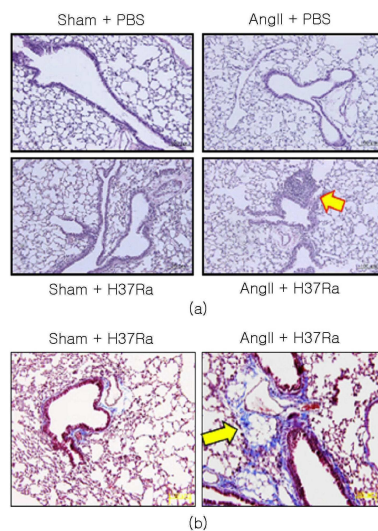
(54) 발명의 명칭 육아중 동물 모델 및 이의 제조방법

(57) 요약

육아중 동물 모델 및 이의 제조방법이 개시된다. 더욱 상세하게는 결핵균을 포함하는 항산성균 및 기타 염증성·감염성 폐질환 연구에 사용 가능한 괴사성 육아종을 갖는 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 제조방법을 통해 제조된 동물 모델은, 기존에 알려진 제작 방법과 비교할 때 더욱 쉽고 간편하며, 감염 후 생존률이 높아 연구에 적합하다. 특히 본 발명의 제조방법을 이용하여 인간에게서 발생하는 육아종과 유사한 형태인 괴사성 육아종을 형성할 수 있어, 결핵, 염증성 폐질환, 감염성 폐질환 등의 치료제 개발 및 결핵 병인 기전 등의 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2207/35 (2013.01)
A01K 2267/0368 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0395
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료기술연구개발사업
연구과제명 결핵환자 면역세포 특성 분석에 근거한 방어기전 규명 및 제어기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교산학협력단
연구기간 2015.07.01 ~ 2018.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A2B2008178
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구
연구과제명 결핵균 감염특이적 큰포식세포의 샤페론 기능과 네트워크 규명을 통한 결핵균 사멸기전 연

구

기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교산학협력단
연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 동물에 고혈압을 유도하는 단계; 및

(b) 상기 (a)단계 이후 고혈압 유도된 동물에서 결핵균을 감염시키는 단계; 를 포함하는, 폐조직에서 괴사성 육아종을 형성하는 동물 모델 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a)의 고혈압 유도 단계는, 상기 동물에 Angiotensin II, Nitric oxide synthase inhibitor, Deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 주입하는 방법을 통하여 고혈압을 유도하는 것을 특징으로 하는, 폐조직에서 괴사성 육아종을 형성하는 동물 모델 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (a)의 고혈압 유도 단계는, 상기 동물을 저산소(Hypoxia) 환경에 노출시켜 고혈압을 유도하는 것을 특징으로 하는, 폐조직에서 괴사성 육아종을 형성하는 동물 모델 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (b)의 결핵균은 마이코박테리움 튜버큐로시스 에드먼(Mycobacterium tuberculosis erdman), 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium tuberculosis), 마이코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis), 마이코박테리움 아프리카눔(Mycobacterium africanum), 마이코박테리움 미크로티(Mycobacterium microti), 마이코박테리움 포르투이툼(Mycobacterium fortuitum), 마이코박테리움 아비움(Mycobacterium avium), 마이코박테리움 제노피(Mycobacterium xenopi), 마이코박테리움 스메그마티스(Mycobacterium smegmatis), 마이코박테리움 튜버큐로시스 H37Ra(Mycobacterium tuberculosis H37Ra), 마이코박테리움 튜버큐로시스 H37Rv(Mycobacterium tuberculosis H37Rv) 및 마이코박테리움 튜버큐로시스 K(Mycobacterium tuberculosis K) 군주로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 폐조직에서 괴사성 육아종을 형성하는 동물 모델 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (a)의 동물은 마우스, 랫트, 햄스터, 토끼, 개 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 폐조직에서 괴사성 육아종을 형성하는 동물 모델 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 동물 모델.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 육아종 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 염증성 및 감염성 폐질환 연구에 사용 가능한 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 결핵은 대표적인 폐질환으로, 결핵균 및 다른 마이코박테리움(Mycobacterium) 종의 감염에 의해 유발되는 만성 감염성 질병이다. 결핵은 매년 약 8백만명의 신규 감염자가 발생되고 3백만명의 목숨을 앗아가는 개발도상국의 주요 질병이며, 최근에는 선진국에서도 문제점으로 부각되고 있다. 결핵은 감염된 환자의 면역상태에 따라 장기간의 잠복감염 상태로 유지될 수 있는데, 전 세계 인구의 약 30%인 20억명이 잠복감염 상태인 것으로 추정되고 있다.

[0004] 결핵에 감염 시, 상당한 기간 동안 무증상일 수 있으나, 이후 공통적인 증상으로서 폐의 급성 염증을 나타낼 수 있으며, 그 결과 발열 및 마른 기침(nonproductive cough)을 유발시킨다. 이를 치료하지 않으면, 일반적으로 심각한 합병증 및 사망을 초래한다. 한편, 결핵에 감염된 개체들은 증상을 나타내지는 아니하나, 일정기간 보균상태(contagious)일 수 있다. 게다가 치료 섭생을 엄격하게 따르더라도 환자의 행동을 통제하는 것이 어렵다. 일부 환자들은 치료과정을 끝마치지 못하는데, 이는 효과 없는 치료와 약제 내성의 발달을 초래할 수 있다. 치료의 전 과정을 끝마친다 하더라도, 결핵균 감염은 감염된 개체로부터 근절되지 아니하며 여전히 재활성화될 수 있는 잠복성 감염으로 잔존하게 된다.

[0005] 결핵은 장기간에 걸친 항생제 요법을 이용하여 치료될 수 있으나, 이러한 치료법이 결핵의 확산을 막기에는 역부족인 것이 현실이다. 결핵의 확산을 통제하기 위해서는, 상기 질병에 대한 효과적인 예방접종(vaccination) 및 정확한 초기 진단이 가장 중요하다. 현재까지는 생균(live bacteria)을 이용한 예방접종이 보호 면역을 유도하기 위한 가장 효율적인 방법으로 여겨지고 있다. 상기 목적을 위해 이용되는 가장 일반적인 마이코박테리움은 M. bovis의 비병원성 종인 바실러스 칼메트-게(Bacillus Calmette-Guerin, BCG)인데, BCG의 안정성 및 효능은 논쟁의 대상이 되고 있으며, 미국과 같은 일부 국가에서는 상기 제제를 사용한 일반 대중의 예방접종을 실시하지 않고 있다. 한편, 결핵의 진단은 일반적으로 피부 검정법을 이용하여 수행되는데, 상기 검정법은 투베르쿨린 PPD(proteinpurified derivative)에 대한 피부 노출을 포함한다. 항원-특이 T 세포 반응은 주입후 48-72시간까지 주입 부위에서의 측정 가능한 정도 경화(induration)를 초래하는데, 이는 마이코박테리움 항원에 대한 노출을 의미한다. 그러나 상기 검정법은 민감도 및 특이성에서 문제가 있으며, BCG로 예방접종된 개체들은 감염된 개체들과 구별할 수 없다는 문제점이 있다.

[0006] 결핵의 병인기전에 대한 최근 연구에서는 단독으로 또는 IFN- γ 또는 종양괴사인자-알파와 혼합된, 1,25-디히드록시-비타민 D3가 인간 큰포식세포(macrophage)를 활성화시켜 결핵균 감염을 억제한다는 것을 밝혀내었다. 더욱이, IFN- γ 는 인간 큰포식세포를 자극하여 1,25-디히드록시-비타민 D3를 만들어 내는 것으로 알려져 있다. 유사하게, 인터루킨-12(IL-12)는 결핵균 감염에 대한 저항력을 자극하는데 역할을 하는 것으로 밝혀진 바 있다. 하지만, 활동성 및 잠복성 감염 둘 모두에서의, 마이코박테리움 튜버쿨로시스 감염의 재활성화를 예방하기 위한 효과적인 치료 전략에 대한 요구가 여전히 존재한다.

[0007] 한편, 현재 많이 이용되고 있는 결핵균 치료제의 경우 40% 이상의 환자에서 치료효과가 나타나지 않고 있다. 또한 효과가 나타나는 환자들의 경우에도 수주에서 수개월간의 시간이 소요된다. 이에 따라서 새로운 결핵균 치료제 개발에 대한 필요성이 대두되고 있다. 효과적인 결핵균 치료제 개발을 위해 동물 모델은 필수적이라고 할 수 있다. 그러나 현재까지 결핵균의 임상적 특성을 포괄적으로 반영하는 동물 모델은 존재하지 않았다.

[0008] 특히 결핵균에 있어서 괴사성 육아종(granuloma) 형성은 대표적인 결핵의 증상으로써 여러 종류의 면역세포가 모여 생긴 병변이다. 보통 가운데 부분에 성숙화된 큰 포식세포(macrophage)가 많이 존재하며 육아종 속의 큰 포식세포는 다핵 거대 세포(multinucleated giant cell)로 변하거나 지방을 축적할 수 있는 거품 세포(foam cell)로 변하게 된다. 특이하게도 몇몇 성숙화된 큰 포식세포는 유사괴세포(epithelioid cell)로 변형되며 세포-세포 밀착 연결(tight junction)을 유지하게 도와준다. 육아종에는 큰 포식세포뿐만 아니라 호중구, 수지상세포, 자연살해세포, 섬유아세포, B 세포 및 T 세포 등이 모여있다.

[0009] 동물 모델, 특히 마우스 모델에서는 마이코박테리움 튜버쿨로시스의 감염에 의하여 T 세포가 매개하는 육아종 모양의 병변이 형성되기는 하나, 인간에서 형성되는 괴사성 육아종(Necrotic granuloma)과는 매우 다른 병변

(lesion)을 보임으로써 약물의 투과성, 면역반응 등의 차이를 나타낸다. 따라서 마우스 모델에서 효과가 있었던 약물들도 실제 사람에게 적용 시 효과가 떨어지는 경우도 있다. 따라서, 기존 동물 모델이 가지고 있는 한계점을 극복하고, 인간 결핵 감염의 특성을 갖는 동물 모델이 필요하며, 특히 감염 후 인간에게서 발생하는 육아종과 유사한 형태의 육아종을 형성할 수 있는 동물 모델의 구축이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 본 발명은 육아종 형성이 유리한 동물 모델을 사용하여, 체내에서 미생물 감염에 대항할 수 있는 질병모델을 구축하여, 결핵균을 포함하는 항산성균 및 기타 염증성 폐질환 등 다양한 연구분야에서 활용 가능한 육아종 동물 모델을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 1) 동물에 고혈압을 유도하는 단계; 이후 2) 결핵균을 감염시키는 단계;를 포함하는, 폐조직에서 괴사성 육아종을 형성하는 동물 모델 제조방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명에서 고혈압 유도 단계는, 상기 동물에 Angiotensin II, Nitric oxide synthase inhibitor, Deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 주입하는 방법을 통하여 고혈압을 유도하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 또한, 본 발명에서 고혈압 유도 단계는, 상기 동물을 저산소(Hypoxia) 환경에 노출시켜 고혈압을 유도하는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 또한 상기의 감염 결핵균은 마이코박테리움 튜버큘로시스 애드먼(Mycobacterium tuberculosis erdman), 마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium tuberculosis), 마이코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis), 마이코박테리움 아프리카눔(Mycobacterium africanum), 마이코박테리움 미크로티(Mycobacterium microti), 마이코박테리움 포르투이툼(Mycobacterium fortuitum), 마이코박테리움 아비움(Mycobacterium avium), 마이코박테리움 제노피(Mycobacterium xenopi), 마이코박테리움 스메그마티스(Mycobacterium smegmatis), 마이코박테리움 튜버큘로시스 H37Ra(Mycobacterium tuberculosis H37Ra), 마이코박테리움 튜버큘로시스 H37Rv(Mycobacterium tuberculosis H37Rv) 및 마이코박테리움 튜버큘로시스 K(Mycobacterium tuberculosis K) 군주로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0018] 또한 상기의 동물은 마우스, 랫트, 햄스터, 토끼, 개 중 어느 하나 인 것을 특징으로 한다.
- [0019] 그리고 상기 언급한 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 동물 모델을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 동물 모델은 기존에 알려진 제작 방법과 비교할 때 더욱 쉽고 간편하며, 감염 후 생존률이 높아 연구에 적합하다. 특히 본 발명의 제조방법을 이용하여 인간에게서 발생하는 육아종과 유사한 형태인 괴사성 육아종을 효과적으로 형성할 수 있어, 결핵, 염증성 폐질환, 감염성 폐질환 등의 치료제 개발 및 결핵 병인기전 등의 연구에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0022] 다만, 본 발명의 실시 예들에 따른 육아종 동물 모델 및 이의 제조방법이 달성할 수 있는 효과는 이상에서 언급한 것들로 제한되지 않으며, 언급하지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0024] 본 발명에 관한 이해를 돕기 위해 상세한 설명의 일부로 포함되는, 첨부도면은 본 발명에 대한 실시예를 제공하고, 상세한 설명과 함께 본 발명의 기술적 사상을 설명한다.

도 1은 마우스 모델 제조의 전체적인 실험 스케줄을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 Angiotensin II 주입 후 마우스 모델의 혈압 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 마우스 모델의 Angiotensin II 및 결핵균 H37Ra 주입 여부에 따른 폐조직에 대한 염색 사진으로, 도 3의 (a)는 육아종 형성 결과를 확인할 수 있는 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색 사진을 나타낸 것이고, 도 3의 (b)는 폐섬유화 결과를 확인할 수 있는 Masson's trichrome 염색 사진을 나타낸 것이다.

도 4의 (a)는 마우스 모델의 Angiotensin II 및 결핵균 H37Ra 주입 여부에 따른 육아종 형성 결과를 확인할 수 있는 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색 사진을 나타낸 것이고, 도 4의 (b)는 마우스 모델의 Angiotensin II 및 결핵균 H37Ra 주입 여부에 따른 폐 조직의 결핵균 증식 결과를 확인할 수 있는 Acid-Fast Bacteria(AFB) 염색 사진을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정하여 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해서 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여, 본 발명의 기술적 사상에 부합되는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 하나의 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0026] 이하에서는, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 따른 육아종 동물 모델 및 이의 제조방법을 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명이 이러한 구현에 및 실시예와 도면에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 도 1은 마우스 모델 제조의 전체적인 실험 스케줄을 개략적으로 나타낸 것이다.

[0029] 본 발명은 고혈압을 유도하는 단계 이후 결핵균을 감염시키는 단계를 포함하는 육아종 동물 모델에 관한 것이다.

[0030] 실험을 통해, 상기의 방법으로 제조된 동물모델은, 결핵균 증상이 균일하게 증가하여, 향상된 염증반응 및 육아종 형성능력이 있음을 확인하였다. 여기서 상기 동물은 인간을 제외한 어떠한 동물도 가능하며, 바람직하게는 마우스, 랫트, 햄스터, 토끼, 개 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 고혈압이 유도된 동물 모델일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따라 고혈압 유도 단계로서 고혈압 유도제인 Angiotensin II를 체내 노출시키고, 이후 결핵균을 체내 감염(intra-tracheal infection)시킨다. 여기서 고혈압 유도제는 Angiotensin II가 아닌 고혈압을 유도할 수 있는 다른 유도제가 사용될 수 있음은 물론이다.

[0033] 도 2는 Angiotensin II를 체내 노출시킨 후 마우스 모델의 혈압 측정 결과를 나타낸 것이다.

[0034] 도 2에서 Sham + PBS 및 Sham + H37Ra는 Angiotensin II를 주입하지 않은 경우이고, AngII + PBS 및 AngII + H37a는 Angiotensin II를 주입한 경우에 해당한다.

[0035] 본 발명에서 고혈압을 유도하는 단계는, 동물 모델의 혈압 상승을 일으키는 방법이라면 어떠한 방법도 가능하며, 일 실시예로서 동물을 저산소 환경(챔버)에서 노출시켜 폐고혈압을 유도하는 것(Hypoxia induced pulmonary hypertension)이 가능하며, 또 다른 실시예로서 고혈압 유도제를 주입하는 방법을 사용할 수 있다. 또한, 본 발명에서 고혈압 유도제는 동물 모델의 혈압을 상승시킬 수 있는 모든 약물로 치료의 투여량은 투여 방법이나 사전 실험 결과 등에 따라 적절히 선택할 수 있다. 상기 고혈압 유도제는 결핵균에 감염된 폐조직의 육아종 형성을 유도함으로써 더욱 효과적인 약물 치료 등의 연구 결과를 제시한다. 고혈압 유도제는 바람직하게는 펩티드 호르몬(Peptide hormone)으로 알도스테론(Aldosterone)의 분비를 자극하여 혈관수축 및 혈압 증가 조절하는데 관여하는 Angiotensin II 또는 그 상위 및 하위의 물질 (예: Nitric oxide synthase inhibitor,

Deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt 등)일 수 있으며, 고혈압을 유도 및 그와 관련한 분자(molecular)의 발현 및 제거를 통하여 이루어질 수 있다.

- [0036] 또한, 고혈압 유도 시 고혈압 유도제는 피내, 피하, 혈관 및 경구 투여 모두 가능하나, 삼투압펌프를 이용하여 피하내로 유출 시키는 것이 효과적인데, 이는 혈압 조절에 작용하는 Angiotension II의 체내 반감기를 생각하여 체내에 존재하는 Angiotension II의 양을 일정하게 유지시킴으로써 지속적인 고혈압 유도를 하기 위함이다. 피하 내로 삼투압 펌프를 통하여 주입하는 경우 원하는 농도와 양을 일정하게 유지할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 고혈압 유도는 삼투압 펌프(osmotic pump)를 통하여 고혈압 유도제를 체내 노출 시키고, 생체내(in vivo) 상태에서 일어나는 것을 특징으로 한다. 구체적으로는 동물의 피하에 삼투압 펌프를 이용하여 0.5-1.5 mg/kg/day의 Angiotensin II를 체내 노출시키는 것을 특징으로 한다.
- [0039] 도 3 및 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 실험 대상 마우스의 폐조직 염색 사진을 나타낸 것이다
- [0040] 도 3의 (a)의 H&E 염색 사진을 참조하면, 결핵균만을 감염시킨 마우스 폐조직에서와 달리, 고혈압을 유도한 후 결핵균을 감염시킨 마우스 폐조직에서 세포가 군집된 육아종을 확인 할 수 있다. 즉, 고혈압을 유도한 후 결핵균을 감염시킨 경우 더욱 효과적인 육아종 형성이 이루어지는 것을 확인할 수 있다.
- [0041] 도 3의 (b)의 Masson's trichrome 염색 사진을 참조하면, 고혈압 유도 후 결핵균을 감염한 마우스 조직에서 섬유세포가 염색된 것을 상당 부분 관찰할 수 있다. 이는 고혈압 유도 후 결핵균 감염한 마우스 모델에서 폐조직을 구성하고 있는 상피세포가 섬유세포로 변화하여 발생하는 폐섬유화 및 염증반응의 정도가 더 심각한 것을 나타내는 것이다.
- [0042] 도 4의 (a)의 H&E 염색 사진을 참조하면, 고혈압 유도 후 결핵균 감염한 마우스 모델에서 결핵균 감염 약 1주 후부터 3주 이상 효과적으로 형성된 육아종이 유지되고 있음을 확인할 수 있다. 또한, 계속적인 고혈압 유도제 유지 없이도, 즉 14일째 까지만 Angiotensin II를 체내 노출 시킨 경우(도 4(a)의 AngII + H37Ra(-14) 참조)에도 (고혈압을 유도하지 않은 마우스 모델에 비해) 더욱 효과적으로 육아종을 형성하는 것을 확인할 수 있다.
- [0043] 도 4의 (b)는 결핵균 감염 14일 후와 28일 후의 폐 조직을 관찰한 AFB 염색 사진을 나타낸 것이다. 감염 14일 후와 28일 후의 군 증식 정도를 비교해보면, 고혈압 유도 마우스 모델의 폐 조직에서 실질적인 결핵균의 증식이 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 계속적인 고혈압 유도제 유지 없이도(도 4(b)의 AngII + H37Ra(-14day) 참조) 실질적인 결핵균 증식이 증가하는 것은 마찬가지이다.
- [0044] 본 발명에서 결핵균은 마이코박테리움 튜버큐로시스 애드먼(Mycobacterium tuberculosis erdman), 마이코박테리움 튜버큐로시스(Mycobacterium tuberculosis), 마이코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis), 마이코박테리움 아프리카눔(Mycobacterium africanum), 마이코박테리움 미크로티(Mycobacterium microti), 마이코박테리움 포르투이툼(Mycobacterium fortuitum), 마이코박테리움 아비움(Mycobacterium avium), 마이코박테리움 제노피(Mycobacterium xenopi), 마이코박테리움 스메그마티스(Mycobacterium smegmatis), 마이코박테리움 튜버큐로시스 H37Ra(Mycobacterium tuberculosis H37Ra), 마이코박테리움 튜버큐로시스 H37Rv(Mycobacterium tuberculosis H37Rv) 및 마이코박테리움 튜버큐로시스 K(Mycobacterium tuberculosis K) 균주로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0045] 본 발명의 동물 모델 제조방법은 기존에 알려진 여러 제작 방법에 비해 본 더욱 쉽고 간편하며, 실험 동물의 어떠한 유전자 조작이나 변이 없이 효과적으로 육아종 형성을 유도할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 결핵 동물 모델은 상술한 제조방법에 의해 제조되는 것으로, 동물에 결핵균을 감염시키기 전 고혈압을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다. 이와 같은 결핵 동물 모델은 고혈압 유도 처리를 하지 않은 동물 모델에 비해, 결핵이 발명한 사람에게서 특징적으로 나타나는 괴사성 육아종이 발생한다.
- [0047] 본 발명에 따른 동물모델은 감염 28일까지 100% 생존율을 보여, 지속적으로 연구에 따른 군 증식의 변화와 염증반응의 차이 및 약물의 효과를 확인하기에 적합한 것을 확인하였다. 이러한 점을 고려할 때, 본 발명을 통하여 제작된 마우스를 이용하여 신약 스크리닝 시스템을 구축할 경우 다양한 물질의 효능을 개체 수준에서 단기간에 광범위하게 테스트가 가능할 수 있다.

[0049] 실시예 1

[0050] 1. 높은 혈압을 유지하는 마우스 모델 제조

[0051] 마우스 모델의 혈압을 증가시키기 위해, 마우스의 피하 내로 삼투압 펌프를 통하여 고혈압 유도제 일종인 Angiotensin II를 체내 노출시킨다. 고혈압 유도제에 Oil 또는 Silicon 등의 용매를 이용한다.

[0053] 2. 혈압의 증가를 확인

[0054] Angiotensin II를 체내 노출시킨 후, 0, 7, 14, 21, 28일째 마우스 모델의 꼬리에 커프(cuff)를 감아 수축기 혈압을 측정한다 (도 2 참조).

[0056] 3. 고혈압 유도된 마우스에 결핵균을 감염

[0057] Angiotensin II 체내 노출 후 1일에, 고혈압이 유도되지 않은 마우스, 고혈압 유도된 마우스에 각각 약 100만개의 결핵균(Mycobacterium tuberculosis H37Ra)을 기관지 내로 감염시킨다.

[0059] 4. 감염시킨 후 육아종 형성 및 폐섬유화 정도를 확인

[0060] 감염된 마우스 모델의 폐조직을 적출하여 형태학적인 병변을 확인한다. H&E 염색을 이용하여 확인하면, 결핵균만을 감염시킨 마우스 폐조직(Sham + H37Ra)과 고혈압을 유도한 후 결핵균을 감염시킨 마우스 폐조직(Ang II + H37Ra)을 비교할 때, 고혈압 유도 후 결핵균 감염한 마우스 모델에서 더욱 효과적인 육아종 형성이 이루어지는 것을 확인할 수 있다(도 3의 (a) 참조).

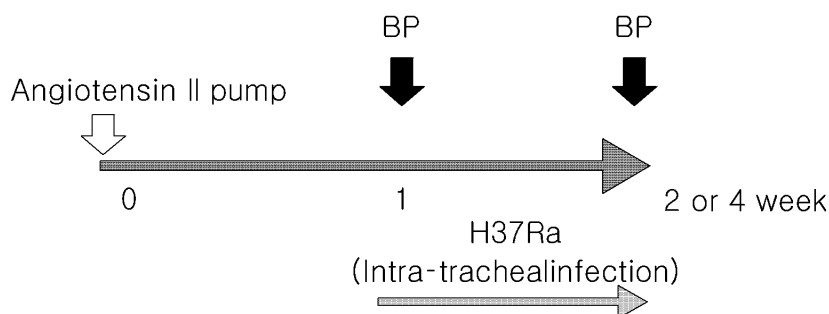
[0061] Masson's trichrome 염색을 이용하여 확인하면, 고혈압 유도 후 결핵균 감염한 마우스 모델(Ang II + H37Ra)에서 육아종 형성뿐 아니라 폐조직을 구성하고 있는 상피세포가 섬유세포로 변화하여 발생하는 폐섬유화 및 염증반응의 정도가 더 심각한 것을 확인할 수 있다(도 3의 (b) 참조).

[0062] 또한, 고혈압 유도 후 결핵균 감염한 마우스 모델에서 결핵균 감염 약 1주 후부터 3주 이상 효과적으로 형성된 육아종이 유지되고 있으며, 지속적인 고혈압 유도제 유지 없이도 (고혈압 유도하지 않은 마우스 모델에 비해) 더욱 효과적으로 육아종을 형성하는 것을 H&E 염색 사진으로 확인할 수 있으며(도 4의 (a) 참조), 결핵균 감염 14-28일 후의 고혈압 유도 마우스 모델의 폐 조직에서 실질적인 결핵균의 증식이 더욱 증가하는 것을 AFB 염색 사진으로 확인할 수 있다(도 4의 (b) 참조).

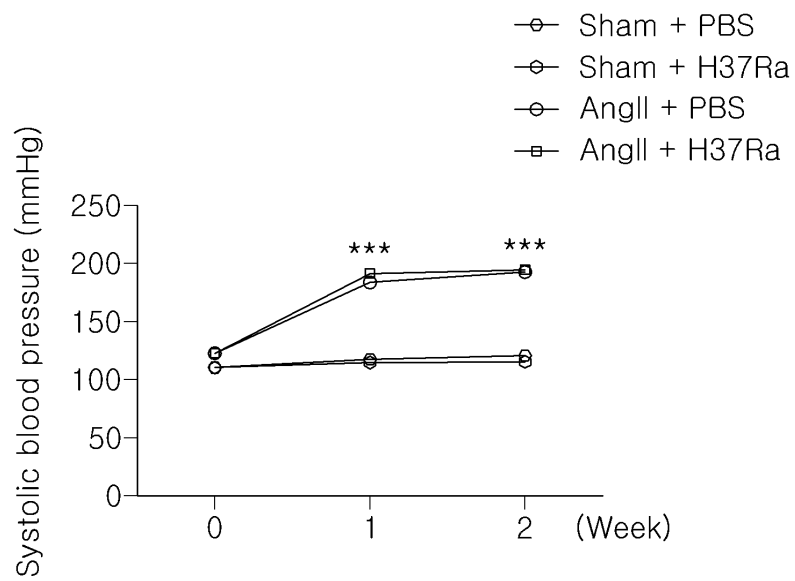
[0063] 이상에서 본 발명의 대표적인 실시예들을 상세하게 설명하였으나, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 상술한 실시예에 대하여 본 발명의 범주에서 벗어나지 않는 한도 내에서 다양한 변형이 가능함을 이해할 것이다. 그러므로 본 발명의 권리범위는 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 안되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

도면

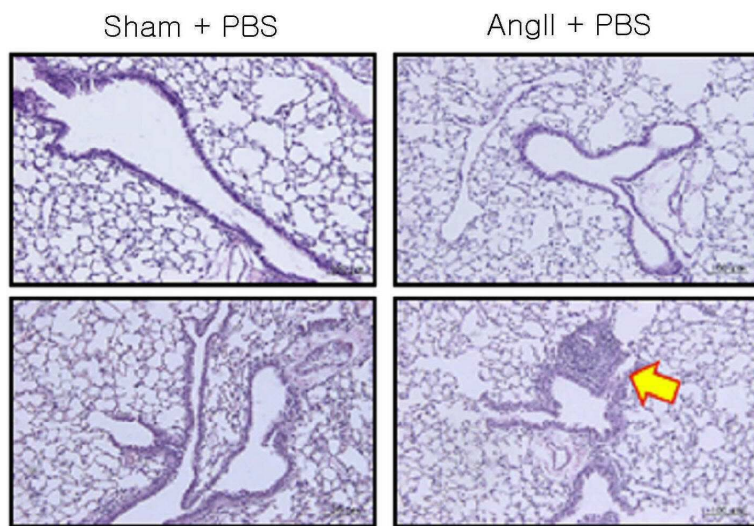
도면1



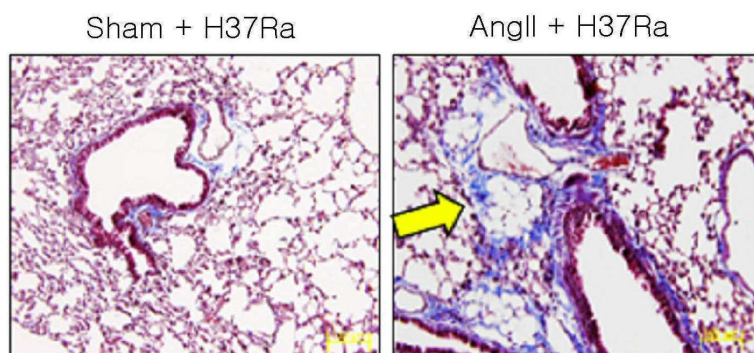
도면2



도면3



(a)



(b)

도면4

