

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0027030 (43) 공개일자 2013년03월14일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01K 67/027 (2006.01) A01K 15/02 (2006.01) A01K 1/03 (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0007531(분할) (22) 출원일자 2013년01월23일 심사청구일자 2013년01월23일 (62) 원출원 특허 10-2011-0090158 원출원일자 2011년09월06일 심사청구일자 2011년09월06일		(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동) (72) 발명자 김현아 서울특별시 강남구 도곡동 삼성래미안아파트 102-802 이종실 서울특별시 성동구 행당동 17 한양대학교 의공학과 (74) 대리인 강성혜

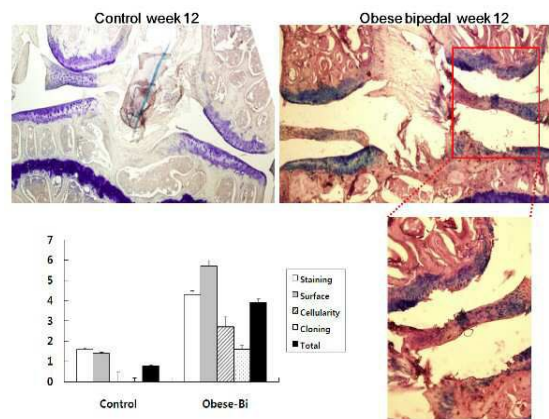
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 골관절염 모델 동물

(57) 요약

본 발명은 슬관절염, 척추관절염과 같은 골관절염 모델 동물에 관한 것으로서, 설치류 동물에서 확립한 인간의 골관절염에 가까운 자연발생 골관절염 모델에 관한 것이다.

대표도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A 100736

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 사람의 두발 보행의 진화적 측면에 근거한 rat의 자연 발생 슬관절/척추 관절 골관절염 모델 개발

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

데크와,

상기 데크의 상하면의 판면 방향을 따라 무한궤도로 회전하는 트랙 벨트와,

상기 트랙 벨트를 구동하는 구동부와,

구동부의 속도를 제어할 수 있는 제어부를 포함하는 설치류 실험동물 골관절염 유발용 트레이드밀에 있어서,

상기 데크와 연결되며, 트랙 벨트의 진행방향을 가로질러 트랙 벨트의 상부에 설치된 설치류 실험동물의 앞발을 고정할 수 있는 앞발 고정용 막대와,

상기 데크와 연결되며, 트랙 벨트의 진행방향을 가로질러 트랙 벨트의 상부에 설치되며 앞발 고정용 막대보다 높은 위치에 설치된 설치류 실험동물의 상체를 고정할 수 있는 상체 고정용 막대를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 설치류 실험동물 골관절염 유발용 트레이드밀.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 슬관절염, 척추관절염과 같은 골관절염 모델 동물에 관한 것으로서, 설치류 동물에서 확립한 인간의 골관절염에 가까운 자연발생 골관절염 모델에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 골관절염은 노화 정도, 성별, 골밀도, 호르몬, 유전 등과 같은 전신적 요인과 외상, 관절 이완, 비만, 근육 약화와 같은 국소적 요인이 진행에 영향을 주는 인자들이며, 평균수명의 증가에 따라 급속히 발생율이 높아지고 있는 질병이다. 골관절염은 사회적, 임상적 중요성에도 불구하고 아직 완치제가 개발되지 않은 상태이다. 특히 사람의 골관절염 질환을 재현할 수 있는 자연발생적이고 실용적인 질환 모델 동물이 없다는 것이 문제점으로 제기되고 있다. 골관절염에 대한 이해와 치료 약제의 효능을 연구하기 위해서는 재현 가능한 표준화된 동물 모델이 필요하다.

[0003] 무릎 골관절염의 동물 모델로 가장 대표적인 것은 개의 전방 십자 인대 절단 모델, 토끼의 전방 십자 인대 절단 모델, 토끼의 측방 반월판 절제 모델, 양이나 개의 전방 십자 인대 절단 모델 등이 있다. 표 1에 현재 가장 널리 이용되고 있는 동물의 무릎 골관절염 모델을 정리하였다.

표 1

[0004]

모델	동물 종	자연 발생	관찰 기간	사육 공간 제약
전방십자인대 절제	양	X	4-8주	0
	개		4-8주	0
	토끼		4-8주	0
	랫트		4-8주	X
반월판 절제	양	X	6개월	0
	개		3-6개월	0
	토끼		8-52주	0
	기니아피그		1-42주	X
	랫트		4-6주	X
	마우스		4-8주	X

트랜스제닉/ 녹아웃	(마우스) ADAM-15 KO MMP-14 KO MMP-13 트랜스제닉	0	12-13개월 1-2개월 5-6개월	X
화학적 주사	콜라게나제 (마우스, 래트, 토끼)	X	2-4주	X~0
	MIA(Monosodium iodoacetate) 주사 (마우스, 래트, 토끼, 기니아아피그)		1-4주	X~0
자연발생	DBA/1(마우스)	0	4개월	X
	STR/ORT(마우스)		5-50주	
	C57BL6(마우스)		18개월 ± 운동	
	하틀리 기니아피그		2-30개월	
	레수스 마카크(rhesus macaque; 원숭이)		5-25년	0
	시노몰거스 마카크 (Cynomolgus macaque; 원숭 이)		5-30년	

[0005] 그런데, 위와 같은 골관절염 모델 동물의 문제점은 첫째, 사람의 골관절염과 병인을 공유하는 모델인가 하는 점이다. 동물 모델의 가장 중요한 조건은 사람의 질환과 같은 경로로 병이 발생해야 한다는 것이다. 이 조건이 충족되어야 사람의 질환에 대한 병인 연구에 이용할 수 있고 사람에게 적용되는 골관절염 치료제를 효과적으로 검정할 수 있는 것이다. 따라서 이상적으로는 노화에 따라 자연적으로 관절염이 발생하는 모델이 가장 적합한데, 하틀리 기니아피그 (Hartley guinea pig) 모델과 마카크 원숭이 (macaque monkey) 모델이 사람의 골관절염과 가장 유사한 특성을 나타낸다. 그러나, 마카크 원숭이 모델은 물론 하틀리 기니아피그 모델도 1년 이상의 긴 사육 기간을 거쳐야 골관절염이 발생하기 때문에 실제적인 실험에 이용되기에는 많은 제약이 있다.

[0006] 이러한 실제적인 문제들을 해결하기 위해 전방 십자 인대 절제, 반월판 절제 등의 수술적인 방법, 그리고 콜라게나제 (collagenase)나 MIA (monoiodoacetate)와 같은 화학물질을 슬관절에 주입하는 화학적 주사 모델들이 개발되었다. 이들 동물에서는 시술 후 4-8주 이내에 일관성 있게 관절의 변화가 나타나 골관절염의 진행에 따른 연골과 관절의 변화를 짧은 시간 내에 관찰할 수 있어 비교적 손쉽게 치료 약제를 검정할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 이들 모델은 엄밀히 말하면 외상 후 발생하는 관절염의 모델로는 적합하나 사람의 자연발생적인 골관절염을 재현하기에는 무리가 있다.

[0007] 유전자 조작을 가한 트랜스제닉 모델 또는 녹아웃 모델들은 최근 골관절염의 분자생물학적 이해에 많은 도움을 주고 있다. 그러나 이런 모델들 역시 사람의 골관절염 치료제를 검정하는데 이용되기에는 제한점이 많은 상태이다.

[0008] 골관절염 모델 동물의 또 다른 문제는 현실적인 모델인가 하는 점이다. 사람의 골관절염을 재현하려면 사람의 관절에 부하되는 것과 비슷한 정도의 부하가 걸릴 수 있는 중동물 이상의 동물에서 실험을 하는 것이 이상적이다. 그러나 토끼 정도의 중동물을 이용하게 되는 경우에도 전방 십자 인대 절제술 후 관절염의 유도를 위해 동물의 활동이 보장되는 넓은 사육 공간이 필요하게 된다. 따라서, 동물 실험의 비용 뿐 아니라 동물 사육 시설의 제한으로 이러한 모델을 널리 이용하기는 어려운 상태이다.

[0009] 이러한 측면에서는 소동물인 설치류가 가장 손쉽게 이용될 수 있으나, 설치류를 이용한 모델들, 즉 화학적 주사 모델, 수술 모델 등은 위에서 언급한 바와 같이 인간의 자연 발생적인 골관절염을 재현하지 못한다는 문제가 있다.

[0010] 세 번째 문제는 통증을 반영하는가 하는 점이다. 인간 골관절염을 대상으로 하는 많은 역학 연구에서 방사선적 소견, 특히 연골의 손상과 통증은 직접적인 관계가 없다는 것이 보고된바 있다. 실제로 임상에서 환자가 병원을

찾아오게 되는 원인은 통증 때문이며, 상당수의 환자에서 방사선상 진행된 골관절염의 소견을 보임에도 전혀 통증을 호소하지 않는 경우도 많다. 이와 같은 맥락에서 최근 골관절염의 연구에서 관절의 손상과 통증의 발생은 함께 관찰되어야 한다는 주장들이 제기되고 있다. 해외에서도 골관절염의 동물 모델에서 통증의 평가와 측정에 대한 연구는 극히 제한적으로 이루어지고 있는 상태이다.

[0011] 결론적으로 골관절염의 동물 모델이 적절하지 않다면 골관절염 치료제를 동물 실험으로 검정하기 어렵다는 문제가 발생한다. 따라서 가격이 저렴하고 쉽게 사육할 수 있으며 사육 공간의 제약이 크지 않은 설치류를 이용하여 인간의 골관절염과 조직학적, 그리고 통증 발생 면에서 유사한 자연적인 동물 모델을 개발하는 것이 실용성의 측면에서 절실하게 요청되고 있다.

[0012] 골관절염의 동물 모델에 대한 이러한 한계점들을 극복하기 위해 설치류 골관절염 모델을 개발하려는 시도들이 계속되고 있고 주목할 만한 모델들로 트레드밀 (treadmill)을 이용한 기계적 모델과 비만 유도를 통한 자연 발생 모델을 꼽을 수 있다.

[0013] 비스타 래트 트레드밀 모델은 13-14개월령의 비스타 래트를 6-12주간 동안 15-30km의 거리를 달리게 하는 경우 무릎 골관절염이 유도된다. 달리기 시작 시점에 전류를 흐르게 함으로써 달리기를 지속하게 하는 모델과 돌아가는 바퀴와 연결된 전극을 뇌의 내측 전두엽에 꽂고 달리는 것을 쾌감을 느끼는 전기 자극으로 보상하는 모델 등의 타입이 있다. 15km 정도의 거리를 달리는 경우에는 경한 골관절염이, 30km를 달리는 경우에는 중등도 이상의 골관절염이 유도된다. 수술적 조작이나 화학 물질에 의한 조직의 손상을 일으키지 않으면서 관절에 반복적인 기계적인 자극을 가함으로 골관절염이 유도된다는 측면에서는 사람의 골관절염과 유사한 모델이다. 그러나, 이 모델은 사육 기간이 길고 개체마다 변이가 커서 일관성 있게 골관절염이 유도되지 않는다는 단점이 있다.

[0014] 또다른 설치류 동물 모델은 비만 모델이다. 과거 설치류 비만 모델에 대한 연구는 DBA/2JN, C57BL, STR/N 마우스와 오스본-메델 래트 (Osborne-Medel rat)에서 이루어졌다. 이 중 DBA/2JN 종은 비만을 유도하여도 골관절염이 발생하지 않았다. C57BL6 마우스는 30% 라드 (lard)를 함유한 고지방 식이를 섭취하는 경우 슬관절 골관절염이 2배 증가하는데 이 경우 고열량 자체보다는 고지방이 골관절염을 유도하는 것으로 보인다. 하지만 많은 종의 설치류에서는 비만 유도 후에도 골관절염의 증가가 관찰되지 않으며, 이는 설치류의 비만이 골관절염의 발생과 직접적인 관계가 없음을 시사한다. 그 원인으로는 비만한 쥐의 경우 체중을 다리가 아닌 배에 부하하는 경향이 있다는 점, 그리고 네 발로 걷는 상태에서 체중이 사지로 분산되기 때문에 상대적으로 무릎 관절에 미치는 부하가 사람에게 비해 높지 않다는 점 등을 고려할 수 있다. 따라서, 설치류에서 비만의 유도만으로는 일관성 있게 골관절염을 유도할 수 없다.

[0015] 직립보행 (bipedalism)은 두 뒷다리만을 이용하여 이동하는 형태의 보행이며 일부의 거대 조류 (예: 타조, 학 등), 유대류, 일부의 설치류, 유인원과 인간에서 관찰할 수 있다. 유대류와 설치류에서 관찰되는 직립보행은 주로 두 발을 동시에 움직이며 뜀뛰는 형태 (hopping)로 관찰되는 반면 거대 조류와 인간, 유인원은 한 발씩 따로 떼며 보행하는 형태로 관찰된다. 인간과 유인원의 직립보행도 큰 차이가 있는데 보행시 슬관절을 완전 신전 상태로 유지할 수 있는 사람과 달리 유인원은 슬관절을 굴곡시킨 상태에서 보행하며 따라서 보행시 엄지발가락 치기 (toe off)와 뒷축 딛기 단계 (heel strike phase)가 존재하지 않는다.

[0016] 직립보행은 네 개의 다리를 모두 사용하여 이동을 하는 경우에 비하여 양 하지와 척추에 기계 역학적으로 매우 다른 영향을 미치게 된다. 레수스 원숭이 (Rhesus monkey) 연구에서 4-34세 사이의 수컷 원숭이 56마리를 관찰한 결과 연령이 증가함에 따라 척추의 골관절염 빈도가 급격히 증가하는 것으로 관찰되고, 이는 자연 발생적인 척추 골관절염이 거의 없는 일반 네발 동물과 대조적이다.

[0017] 직립보행을 적용한 설치류의 골관절에 관한 다음과 같은 선행 연구들이 있었다. 1957년에 Goff 등은 태어난 직후의 마우스와 래트의 앞다리와 꼬리를 절제하고 강제 직립보행 (obligatory bipedalism)을 유도한 후 척추와 하지 발달에 미치는 영향을 관찰하였다 (도 1). 이 모델에서 외반슬 (knockknee) 변형과 척추뼈 가시돌기 (spinous process)의 연장 등의 소견이 관찰되었다. 그러나, 이 모델에서 래트와 마우스가 직립보행하는 시간은 대조군에 비하여 차이가 없고 대부분 배로 기는 형태의 보행을 한다는 것이 후에 보고되어 진정한 직립보행 모델이 아닐 가능성이 제기되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 따라서, 본 발명은 상기 종래기술의 문제점들을 해결하고 설치류에서 인간의 골관절염에 가까운 자연발생적 골관절염 모델을 확립함으로써 실용적이고도 생물학적으로 개연성 있는 골관절염 모델 동물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명자들은 진화론적 관점에서 무릎과 척추 등의 골관절염이 직립보행 동물에서 주로 발생한다는 점, 그리고 역학연구 조사에서 밝혀진 비만과 골관절염의 연관성에 착안하여 설치류 동물에 고지방 식이로 비만을 유도함과 동시에 설치류용으로 제작된 강제 직립 트레드밀 보행을 통하여 무릎관절과 척추관절의 골관절염을 유도하였다. 나아가, 본 발명자들은 실험을 통하여 대조군과 비만운동군 간의 연골 손상 정도를 평가함으로써 비만 유도된 설치류에 대해 양 발이 각각 따로 움직이는 형태의 강제 직립보행 운동을 유도하여 수정 맨킨 등급이 매우 높은 골관절염 모델 동물을 제조하였고, 이러한 동물 모델은 골관절염 치료제 검증에 유용할 것으로 예상된다.
- [0020] 본 발명은
- [0021] a) 설치류 동물에 고지방 식이로 최소 8주 이상 비만을 유도하는 단계;
- [0022] b) 상기 비만 유도된 설치류 동물을 무한궤도로 회전하는 트랙 벨트 및 트랙 벨트를 구동시키는 구동부를 포함하는 설치류용 소형 트레드밀에 올려놓는 단계;
- [0023] c) 상기 설치류 동물의 앞발을 트레드밀의 트랙 벨트 상측에 좌우를 가로질러 설치된 앞발 고정용 막대에 고정시키고, 몸통 상체를 묶어 상기 앞발 고정용 막대보다 높게 트레드밀의 트랙 벨트 상측에 좌우를 가로질러 설치된 상체 고정용 막대에 연결, 고정시키는 단계;
- [0024] d) 상기 트레드밀을 2~5m/min의 속도로 구동시켜 상기 설치류 동물이 왼쪽 뒷발과 오른쪽 뒷발을 교대로 움직이도록 하는 직립보행 운동단계;
- [0025] e) 비만 유도 후 1주일간 1시간씩 트레드밀에서 상기 직립보행 운동하는 단계;
- [0026] f) 5% 이상의 유의한 체중 감량이 없는 경우 2주차부터 하루 2시간씩 운동을 3~5주 지속하는 단계; 및
- [0027] g) 5% 이상의 유의한 체중 감량이 없는 경우 일일 3시간씩 트레드밀에서 상기 직립보행 운동하여 골관절염을 유발하는 단계;를 포함하는 골관절염 모델 동물 제조방법에 관한 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 설치류 동물이 래트 또는 마우스임을 특징으로 한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 f) 또는 g) 단계에서 5% 이상의 유의한 체중 감량이 발생한 경우 그 전단계로 되돌아가는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조되며, 수정 맨킨 등급(modified Mankin grade)에 따라 골관절염의 특징을 나타내는 골관절염 모델 동물에 관한 것이다.
- [0031] 또한, 본 발명은 데크와, 상기 데크의 상하면의 관면 방향을 따라 무한궤도로 회전하는 트랙 벨트와, 상기 트랙 벨트를 구동하는 구동부와, 구동부의 속도를 제어할 수 있는 제어부를 포함하는 설치류 실험동물 골관절염 유발용 트레드밀에 있어서,
- [0032] 상기 데크와 연결되며, 트랙 벨트의 진행방향을 가로질러 트랙 벨트의 상부에 설치된 설치류 실험동물의 앞발을 고정할 수 있는 앞발 고정용 막대와,
- [0033] 상기 데크와 연결되며, 트랙 벨트의 진행방향을 가로질러 트랙 벨트의 상부에 설치되며 앞발 고정용 막대보다 높은 위치에 설치된 설치류 실험동물의 상체를 고정할 수 있는 상체 고정용 막대를 더 포함하는 것을 특징으로

하는 설치류 실험동물 골관절염 유발용 트레드밀에 관한 것이다.

- [0034] 설치류 동물용 소형 트레드밀은 일반 트레드밀과 구조상 큰 차이가 없고, 다만, 크기를 설치류 동물에 맞도록 소형으로 축소하여 제작한 것으로, 구조를 간단히 설명하면, 데크와, 상기 데크의 상하면의 판면 방향을 따라 무한궤도로 회전하는 트랙 벨트와, 상기 트랙 벨트를 구동하는 구동부를 구비하고, 구동부의 속도를 제어할 수 있는 제어부로 이루어진다.
- [0035] 본 발명에서는 앞발 고정용 막대와 상체 고정용 막대를 트랙의 진행방향을 가로질러 설치하였고, 상체 고정용 막대는 좀더 높은 위치로 설치하고, 앞발 고정용 막대는 좀더 낮게 설치하였다. 앞발 고정용 막대와 상체 고정용 막대는 트레드밀과 연결하여 설치할 수도 있고, 별도의 스탠드 형태로 트레드밀과 함께 설치하여 사용할 수도 있다.
- [0036] 트레드밀의 구동 속도는 분당 2~5m 정도로 하는 것이 인간의 보행과 유사한 형태로 좌, 우 발을 번갈아 사용하는 동물의 직립보행을 유도하기에 적합하다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명은 설치류를 이용하여 고지방 식이 및 트레드밀을 이용한 강제 직립보행을 유도하여 슬관절과 척추 관절의 골관절염을 유도하였다. 본 발명의 골관절염 동물 모델의 장점은 중동물 이상을 사육할 때와 같은 사육 공간의 제한이 없고, 쉽게 동물을 구할 수 있으며, 화학 물질이나 수술적 조작이 없이 인간의 골관절염과 가장 유사한 관절염을 유도할 수 있다는 점이다. 또한, 설치류 중 래트를 이용하는 모델의 경우에는 마우스에 비해 비교적 관절이 크고 연골을 다루기가 용이하다는 장점도 있다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 앞다리와 꼬리를 절단한 직립보행 래트와 마우스 모델 사진이다.
- 도 2는 고지방 식이로 비만 유도 4주 후 마우스의 체중 변화를 나타낸다 (왼쪽 그래프). 오른쪽 그래프는 대조군, 고도 체중증가군 (high weight gain group; HG)과 저도 체중증가군 (low weight gain group; LG)이 각각 비만 유도후 주수 경과에 따른 체중 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 비만 C57BL6 마우스에서 상체 전체를 매단 직립보행 동물 사진이다.
- 도 4는 쥐의 앞다리를 엮을 수 있는 막대를 앞다리와 몸통의 연결부분 정도의 높이로 설치하였고, 트레드밀의 속도를 약3~5 m/min으로 조절하여 뒷 다리 양쪽이 각각 따로 움직이며 직립보행하도록 한 사진이다.
- 도 5는 대조군, 운동대조군, 비만군, 비만운동군에 대하여 16주간 체중 변화를 그래프로 나타낸 것이다. cont-bi: 운동대조군, cont: 대조군, obese-bi: 비만운동군, obese: 비만군
- 도 6은 연골 손상의 심각성을 평가하는 수정 맨킨 스코어 (Modified Mankin score)의 등급 매기기 기준이다.
- 도 7은 종래 골관절염 설치류 모델에서 관절 조직을 촬영한 사진이다. 표면 피브릴화 (surface fibrillation)가 거의 관찰되지 않는다.
- 도 8은 8주후 대조군과 비만운동군의 관절 조직 사진 및 그래프이다. 대조군과 비교할 때 비만운동군 (도면에서 obese bipedal로 기재됨)에서 연골 손상 등급이 매우 높음을 알 수 있다.
- 도 9는 10주후 대조군과 비만운동군의 관절 조직 사진 및 그래프이다. 대조군과 비교할 때 비만운동군 (도면에서 obese bipedal로 기재됨)에서 연골 손상 등급이 매우 높음을 알 수 있다.
- 도 10은 12주후 대조군과 비만운동군의 관절 조직 사진 및 그래프이다. 대조군과 비교할 때 비만운동군 (도면에서 obese bipedal로 기재됨)에서 연골 손상 등급이 매우 높음을 알 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 이하, 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기

재 범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0040] 먼저, 설치류 비만 직립보행 골관절염 모델 (Obese bipedal rodent OA model)을 확립하기 위해 몇 가지 실험을 실시하였다.

[0041] <실시에 1: 마우스에서 고지방 식이로 비만 유도>

[0042] 31주령 C57BL6 마우스를 실험동물로 이용하였다. 30% kcal 지방을 함유한 고지방 식이를 지속적으로 섭취시켰다. C57BL6 마우스에 대해 위와 같이 비만 유도시 다음과 같이 4주 경과 후 정상식이군 (대조군)에 비해 체중 증가의 편차가 크게 벌어지는 것을 관찰하였다. 또한, 비만 유도군을 고도 체중증가군 (high weight gain group)과 저도 체중증가군 (low weight gain group)으로 나누어 2개월간 체중의 변화 추이를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 결과적으로 운동 시작 시기인 8주에는 저도 체중증가군에서도 고도 체중증가군과 근접한 체중 증가가 관찰되었다.

[0043] <비교예 1: 상체 전체를 매달아 직립보행 유도>

[0044] 비만 유도 8주 후 4주간은 매일 4시간 동안, 4주간은 밤시간 (overnight) 동안 직립보행을 유도한다. 이때 직립보행은 케이지 천정에 자유롭게 움직이는 볼 밸브 (freely moving ball valve)를 설치하고 여기에 쥐의 상체 몸통을 들어 매는 방법으로 유도한다 (hanging bipedalism). 그러나, 이 방법에서는 비만군의 경우 4주 경과 후 체중이 대조군 수준으로 감소되어 비만 유도의 효과가 상쇄될 뿐 아니라 과도한 스트레스가 유도될 가능성이 있다. 또한, 오버나잇 모니터링에서 쥐의 움직임은 미미했고 대부분의 시간 매달린 상태로 정지하고 있어 직립보행이 효과적으로 일어나지 않음을 관찰하였다.

[0045] 8주 경과 후 대조군 3마리와 관찰군 3마리 모두 무릎 관절에서 골관절염의 소견이 관찰되지 않았다. 척추에서는 요추의 5 부위 척추간판 관절을 관찰한 결과, 대조군에서는 추간판 이상의 소견이 관찰되지 않았으나 직립보행군에서는 15 레벨 중 5 레벨에서 경미한 추간판의 돌출 소견이 관찰되었다. 이상의 결과에서 쥐의 상체 전체를 들어올리는 매달린 직립보행 (hanging bipedalism)의 경우 쥐의 움직임이 최소화되어 효과적인 직립보행을 위하여 움직임을 유도하는 별도의 기작이 필요함이 확인되었다.

[0046] <비교예 2: 상체를 볼 밸브로 들어올려 고정시키는 직립보행 유도방법>

[0047] 쥐의 상체를 케이지 천정의 자유롭게 움직이는 볼 밸브로 들어올린 상태로 고정시키고 트레드밀 보행을 한 결과, 다리의 움직임은 유도되나 직립보행 설치류 (bipedal rodent) 특유의 양발 동시 뛰기 (hopping gait)가 관찰되고, 사람과 같이 양 다리를 따로 움직이는 형태의 보행은 관찰되지 않았다.

[0048] <실시에 2: 마우스용 강제 직립보행 트레드밀 제작 및 훈련>

[0049] 이에 트레드밀의 구조를 바꾸어 트레드밀 양단을 가로지르는 상체 고정용 막대를 설치하고, 이 막대에 동물의 앞다리를 고정시켰다. 이때, 동물의 배가 트레드밀에 닿지 않도록 하였다.

[0050] 그 다음은 설치류에 골관절염을 유도하기 위한 최적 프로토콜 확립에 관한 것이다. 본 발명자들은 다음과 같은 프로토콜로 스트레스를 최소화하면서 관절염을 유도하는 최적 조건을 확립하였다.

[0051] 첫째, 트레드밀의 속도는 4m/min 로 1시간 당 240m를 운동하도록 조절하였고, 고지방 식이로 설치류 비만 유도 8주 후 1주일간 1시간씩 운동시켰다. 유의한 체중의 감량 (5% 이상)이 없는 경우 2주차부터 하루 2시간씩 운동을 3주간 지속하였다. 이후 유의한 체중 감량이 없으면 일일 3시간 (1시간 반 운동 후 다음 운동 사이 주간 휴식 시간 5시간 두어 설치류의 야행성을 감안함)씩 운동시켰다. 유의한 체중 감량이 발생한 경우 전 주의 시간대로 운동시켰다. 이 프로토콜대로 운동하는 경우 유의한 체중 감소나 피로 신호 (distress sign)는 관찰되지 않았다.

[0052] 이에 실험군을 4군으로 나누고 각각 대조군 (control), 운동대조군 (control-exercise), 비만군 (obese), 비만

운동군 (obese-exercise)으로 관찰하였다.

[0053] 위와 같은 실시예를 통하여 확립된 설치류 비만 직립보행 골관절염 모델에서 슬관절과 척추관절을 평가하였다.

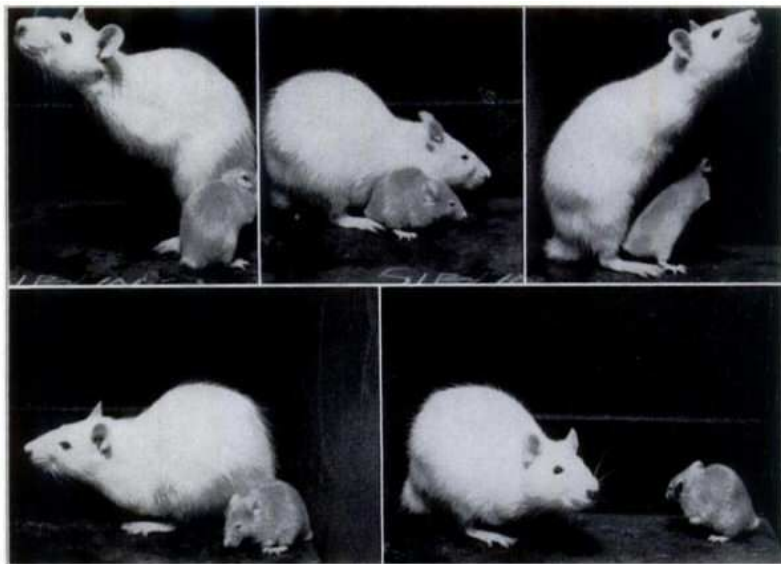
[0054] <실시예 3: 슬관절 골관절염 평가>

[0055] 운동 시작 각 8주, 10주, 12주에 모델 동물을 희생시킨 후 무릎 관절을 채취하였다. 연속 관상면 절단 (consecutive coronal section)으로 절편을 제작하였다. 개체당 6 μ m 두께로 절단하여 관절의 네 표면 (medial-lateral, femoral-tibial)이 모두 관찰되는 중앙의 30 절단체에서 0, 10, 20, 30 번째의 4장을 사프란닌-O (Safranin-O), 헤마토자일린 (Hematoxylin) 염색 또는 톨루이딘 블루 (Toluidine blue) 염색 후 수정 맨킨 등급 (modified Mankin grade)에 따라 평가하였다. 각각의 표면에서 등급을 매긴 후 (각 표면 당 0-12 등급) 4 표면의 값을 합산하여 총 등급을 산출하였다 (각 슬관절에 대해 0-48 등급).

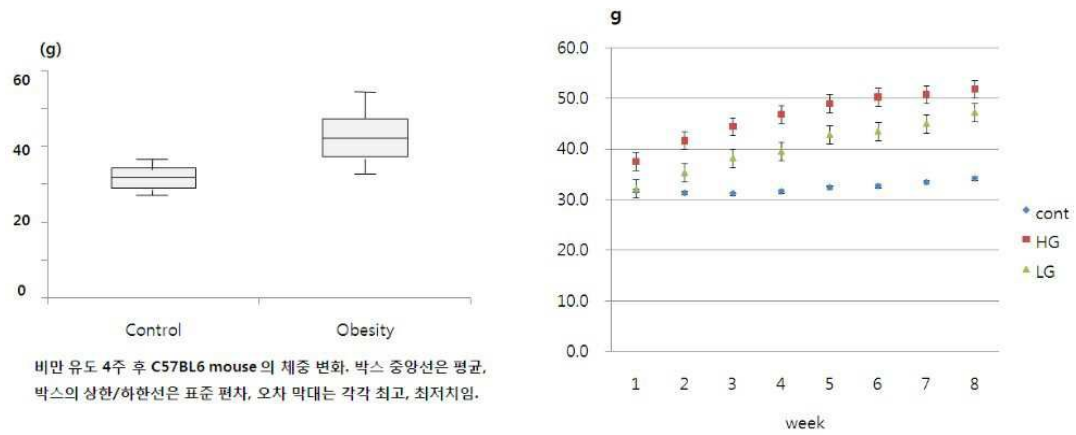
[0056] 그 결과, 비만운동군 (Obese-exercise)에서 운동 시작 8주 후부터 관절의 손상이 관찰되기 시작하고 운동이 진행됨에 따라 등급이 높아짐을 관찰하였다. 이러한 소견은 주로 관절의 중막 표면 (medial surface)에서 관찰되었다. 대조군이나 비만군에서는 관절 손상 소견이 미미하게 나타났다. 관절의 손상은 그림과 같이 8주에서부터 표면 피브릴화 (surface fibrillation) 소견이 나타났다 (도 8의 화살표). 이는 사람의 골관절염과 유사한 소견으로서, 과거 설치류 골관절염 모델들에서는 표면 피브릴화 소견을 관찰하기 어렵다는 점에서 특기할 만하다. 한편 10주째에는 갈라짐 (clefting) 등이 더 심하게 진행되고 일부 연골에서는 전층 소실이 관찰되어 심한 골관절염의 소견이 관찰되었다. 12주의 등급은 10주보다 유의하게 증가되지는 않았다.

도면

도면1



도면2



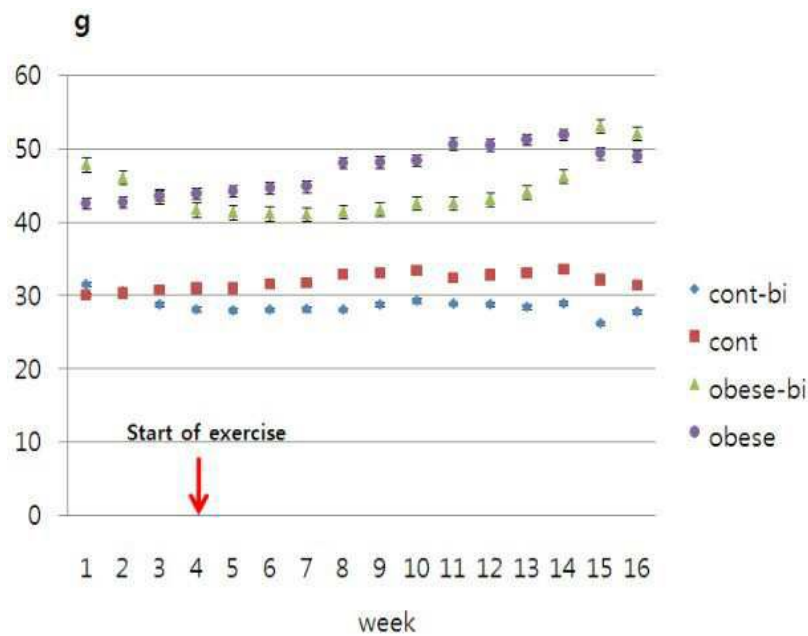
도면3



도면4



도면5

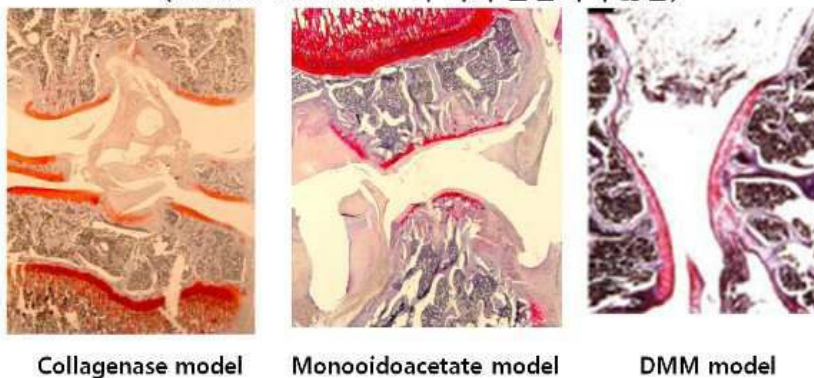


도면6

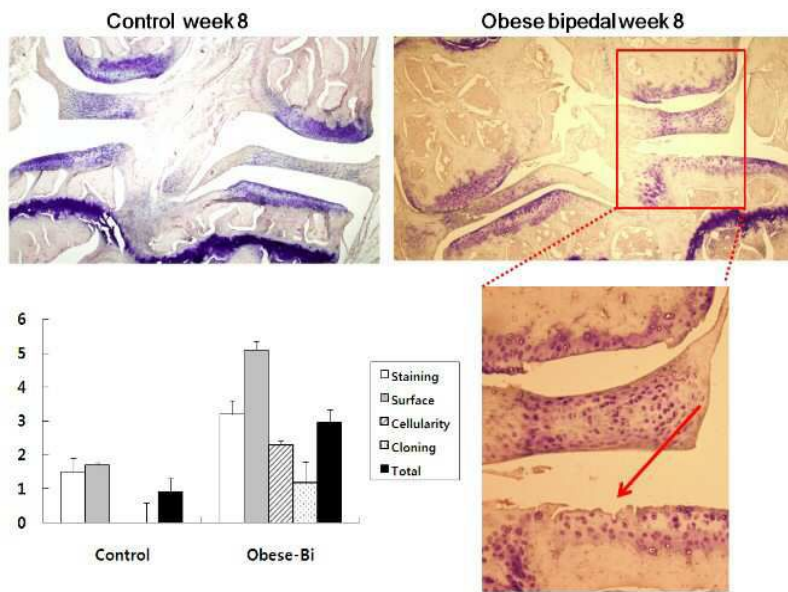
Variable	Score
Staining	0 = normal 1 = little decrease in staining 2 = marked decrease in staining 3 = no staining
Surface	0 = normal 1 = irregular 2 = fibrillated / vacuolated 3 = clefts / erosion
Cellularity	0 = normal 1 = slight decrease in chondrocytes 2 = marked decrease in chondrocytes 3 = no cells
Cloning	0 = normal 1 = occasional doublets 2 = doublets and triplets 3 = multiple nested cells

도면7

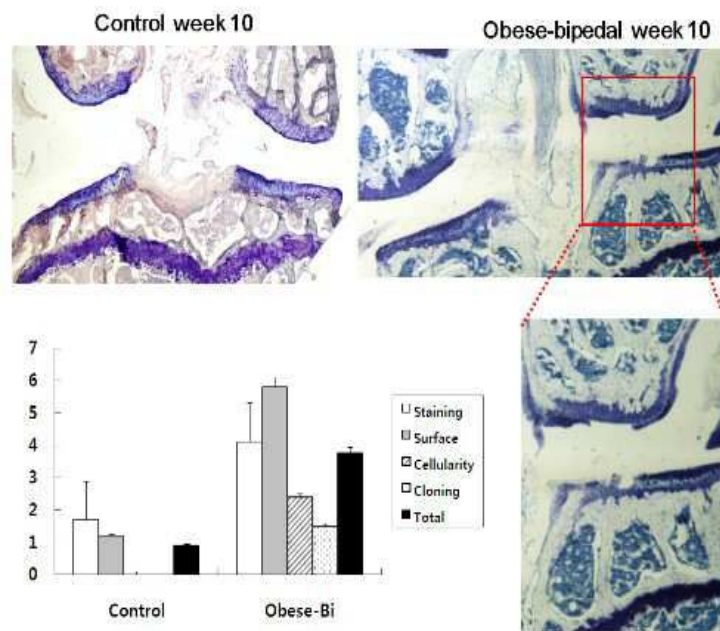
일반적인 Rodent OA 모델에서의 관절 조직 소견
(surface fibrillation 이 거의 관찰되지 않음)



도면8



도면9



도면10

