



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0006858
(43) 공개일자 2016년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0086130

(22) 출원일자 2014년07월09일

심사청구일자 2014년07월09일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

손대구

대구 수성구 지산로 32, 103동 906호 (지산동, 우방아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

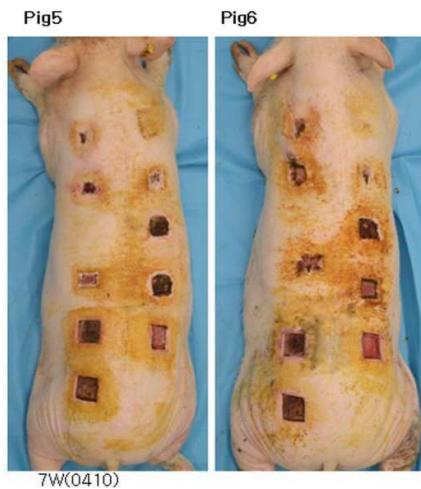
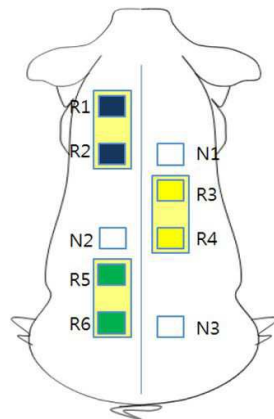
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 만성 창상용 동물 모델

(57) 요약

본 발명은 실험 동물의 피부에 방사선을 조사하는 단계; 및 상기 방사선이 조사된 피부에 상처를 내는 단계를 포함하는 만성 창상 동물 모델 제조방법, 상기 제조방법에 의한 동물 모델 및 본 발명의 동물모델을 이용한 만성 창상 치료용 약제 스크리닝 방법을 제공한다. 보다 상세하게는 본 발명에 따라 만성 창상이 유도된 돼지는 사람의 만성 창상과 가장 유사한 동물 모델로, 종래의 동물 모델에서 나타난 감염에 따른 문제를 해결함으로써, 보다 효과적인 만성 창상용 치료제 개발을 위한 약제 스크리닝 및 만성 창상 메커니즘을 밝히는데 용이한 동물 모델을 제공할 수 있다.

대표도 - 도3



명세서

청구범위

청구항 1

실험 동물의 피부에 방사선을 조사하는 단계; 및

상기 방사선이 조사된 피부에 상처를 내는 단계를 포함하는 만성 창상 동물 모델 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 방사선조사는 가로 8 cm 및 세로 18 cm의 직사각형으로 표시된 실험 동물의 피부 조사 구역에 18 Gy의 방사선량을 피부 내 2 cm 깊이로 도달하도록 조사하는 것을 특징으로 하는 만성 창상 동물 모델 제조방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 상처는 방사선 조사 4주 내지 6주 후 $4 \times 4 \text{ cm}^2$ 너비의 사각형 2개를 6 cm 이격으로 방사선이 조사된 피부에 제작하고 등의 정중선을 기준으로 방사선이 조사되지 않은 반대쪽 피부에 대조군으로 1개의 상처를 제작하는 것을 특징으로 하는 만성 창상 동물 모델 제조방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 상처는 표피, 진피 및 상층 피하지방층까지의 피부 결손을 통한 상처인 것을 특징으로 하는 만성 창상 동물 모델 제조방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 만성 창상 동물 모델은 상처 제작 후 4주간 상처를 유지시켜 만성 창상을 유도하는 것을 특징으로 하는 만성 창상 동물 모델 제조방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 동물은 돼지인 것을 특징으로 하는 만성 창상 동물 모델 제조방법.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 만성 창상 동물 모델.

청구항 8

청구항 1의 방법에 따라 제작된 만성 창상 동물 모델에 상처 치료제 후보 물질을 2개의 만성 창상과 1개의 대조군 창상에 투여하는 단계; 및 상기 상처 치료제 후보 물질의 치료효과를 만성 창상과 대조군 창상에서 측정하는 단계를 포함하는 만성 창상 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 만성 창상 치료용 동물 모델에 관한 것으로, 돼지의 피부에 방사선 조사 후 상처 유도를 통하여 임상적으로 적용 가능한 만성 창상용 동물 모델에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

상처 치유 과정에는 일련의 생화학적, 물리학적 작용은 물론 다양한 종류의 세포들이 관여하게 된다. 상처 유발 후 혈관이 확장되고 모세혈관 삼투압이 증가함에 따라 백혈구들이 상처부위로 이동하는데, 주로 호중구와 대식

세포가 감염된 조직이나 세포성 물질들을 제거하고 상처 가장자리부터 표피화가 시작된다.

[0003] 만성적인 상처들에 대하여 현재 사용되는 동물 모델들은 당뇨-유도 동물 모델, 스테로이드 처리 또는 항암제 투여나 방사선에 의해 만들어진 모델들, 및 일시적인 압력과 열에 의해 피부 괴사를 유도하는 케양 모델이다. 그러나 이러한 상처 치유 동물 모델들은 거의 전적으로 소형 동물들을 기초로 하고 있고, 이는 인간과 관련된 피부 상처 치유 연구를 위해서는 적절하지 않은데, 소형 동물들에 있어서 피부 상처 치유 기전은 상피화(epithelialisation)에 의해 이루어지는 것보다는 주로 상처 수축(wound contraction)에 의해 이루어지기 때문이다. 하지만 소형 포유류와 달리, 돼지는 육상층(panniculus carnosus)을 가지고 있지 않고, 사람과 해부학적인 구조가 매우 유사하고 피부 상처 치유가 사람과 같이 상처 수축과 재상피화(reepithelialisation)를 통해서 일어난다. 현재 돼지는 피부 상처 치유 연구를 위한 최적의 개체이다. 돼지 모델을 이용한 상처 치유에 대한 기존 연구에서는 방사선의 효과에 대해 조사되었고, 다른 연구에서는 폴리테트라플루오로에틸렌(polytetrafluoroethylene; PTFE) 상처 챔버가 사용되었는데, 이는 상처를 분리하기 위해 사용된 것이고 만성 상처 치유를 연구하기 위한 것은 아니었다.

[0004] 상처 치유에 대한 연구 진척에도 불구하고, 연구자들은 실험 직전에 상처를 만든 비교적 깨끗한 동물 상처들을 이용하여 드레싱(dressings), 표피 유사체(epidermal analogues) 및 진피 대체체(epidermal analogues)와 같은 상처 치유 물질을 개발하기 위하여 계속 노력하였다. 하지만 연구에 사용된 조건들은 환자에서 발생한 상처와는 상당히 다른 경향을 나타낸다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 일본공개특허 제2013-236592호(공개일 2013.11.28)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 사람의 만성 창상과 가장 유사한 만성 창상 동물 모델을 제공하여 창상 발생 또는 창상 치유 매커니즘 연구 및 이를 통한 상처 치유 물질 개발을 위한 연구에 효과적이며, 임상적으로 활용 가능한 동물 모델을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 실험 동물의 피부에 방사선을 조사하는 단계; 및

[0008] 상기 방사선이 조사된 피부에 상처를 내는 단계를 포함하는 만성 창상 동물 모델 제조방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 만성 창상 동물 모델을 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 상기 방법에 따라 제작된 만성 창상 동물 모델에 상처 치료제 후보 물질을 2개의 만성 창상과 1개의 대조군 창상에 투여하는 단계; 및 상기 상처 치료제 후보 물질의 치료효과를 만성 창상과 대조군 창상에서 측정하는 단계를 포함하는 만성 창상 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 만성 창상 동물 모델에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 방사선을 이용하여 만성 창상이 유도된 돼지는 사람의 만성 창상과 가장 유사한 동물 모델로, 실제 환자의 상처에서 발생하는 상처 괴사, 지속적인 염증 등을 동반하는 만성 창상 돼지 모델을 만들었고, 이는 만성 창상 치료를 위한 치료제 개발 및 메커니즘을 밝히는 데 용이한 모델로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 따라 돼지의 등 부위에 표시된 방사선 조사구역을 나타낸 도면으로 직사각형으로 표시된 구역이 방사선 조사구역이다.

도 2는 곡면의 돼지 등에 방사선이 동일하게 도달할 수 있도록 방사선원을 곡면의 수직으로 위치시킨 모습을 나타낸 사진이다.

도 3은 방사선 조사 후 방사선 조사구역에 제작한 상처 및 정중선 기준 반대편에 제작한 대조군 상처의 위치 및 모양을 나타낸 도면이다.

도 4는 방사선조사 후 상처제작 군의 상피화를 헤마톡실린-에오신 염색 후 현미경으로 관찰한 결과로, 도 A, B 및 C는 방사선조사 2주 후 상처제작 군의 상피화 결과이며, 도 D 및 E는 방사선조사 4주 후 상처제작 군 및 F는 방사선조사 6주 후 상처제작 군의 상피화 결과이다.

도 5는 방사선 조사군의 상처 제작 후 급성 및 만성 염증 정도를 확인한 현미경 결과로, 도 A, B 및 C는 방사선 조사 2주 후 상처를 만든 그룹의 2주, 4주 및 9주째의 결과이며, 도 D, E 및 F는 방사선 조사 4주 후 상처를 만든 그룹의 2주, 4주 및 9주째의 결과이며, 도 G, H 및 I는 방사선 조사 6주 후 상처를 만든 그룹의 2주, 4주 및 9주째의 결과이다.

도 6은 방사선 조사군의 방사선 조사 후 2주, 4주 및 6주에 각각 상처를 제작한 후 상처 치유 속도를 확인한 그래프이다.

도 7은 본 발명에 따른 만성 창상용 동물 모델의 방사선 처리 후 제작된 상처에 지방줄기세포(ADSC)를 10×10^{10} 으로 투여한 실험군 및 비 투여한 대조군 상처의 상피화 정도를 확인한 결과로, 도 A, E, 및 I는 비 투여 대조군의 상피화 정도를 확인한 결과이며, 도 C, G 및 K는 ADSC 투여군의 상피화 정도를 확인한 결과이며, 도 B, F 및 J는 비 투여 대조군의 만성 염증 정도를 확인한 결과이며, 도 D, H 및 L은 ADSC 투여군의 만성 염증 정도를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 실험 동물의 피부에 방사선을 조사하는 단계; 및 상기 방사선이 조사된 피부에 상처를 내는 단계를 포함하는 만성 창상 동물 모델 제조방법을 제공한다.
- [0014] 상기 방사선조사는 가로 8 cm 및 세로 18 cm의 직사각형으로 표시된 실험 동물의 피부 조사구역에 18 Gy의 방사선량을 피부 내 2 cm 깊이로 도달하도록 조사할 수 있다.
- [0015] 상기 조사되는 방사선은 피부 세포성분의 감소와 진피 및 피하지방층에 있는 모세혈관의 폐색을 가져와 상처를 낼 경우 상처 치유를 지연시키는 역할을 할 수 있다.
- [0016] 보다 바람직하게는 상기 방사선 조사되는 구역은 가로 8 cm 및 세로 18 cm의 직사각형으로 표시된 실험 동물의 3 부위 이내의 피부 조사구역일 수 있다. 상기 방사선 조사범위를 벗어나 과도한 면적에 조사하게 하면 돼지가 사망에 이를 수 있는데, 이는 마치 사람에게서 중화상을 입히는 것과 같다. 또한 상기 조사되는 방사선은 18 Gy의 6 MeV 전자선(electron beam) 방사선량으로 할 수 있으며, 상기 방사선 조사 깊이는 전 층 피부 두께인 2 cm 깊이에 도달하도록 조사하여 조사되는 방사선을 피부 전 층에만 국한시킴으로써, 피부 만성 상처와 가장 유사한 창상을 재현하는 동물모델을 만들 수 있다.
- [0017] 또한 상기 상처는 방사선 조사 4주 내지 6주 후 $4 \times 4 \text{ cm}^2$ 너비의 사각형 2개를 6 cm 이격으로 방사선이 조사된 피부에 제작하고 등의 정중선을 기준으로 방사선이 조사되지 않은 반대쪽 피부에 대조군으로 1개의 상처로 제작될 수 있다.
- [0018] 보다 상세하게는 상기 방사선 조사 후 상처 제작기간을 벗어나면 만성상처의 특징적인 조직소견이 나타나지 않는 문제점이 야기될 수 있다.
- [0019] 보다 바람직하게는 방사선 조사 6주 후 상처를 제작하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0020] 일실시예에 따르면, 도 5와 같이 방사선 조사 4주 후 상처제작 군에서 우수한 만성 염증을 확인할 수 있었으며, 도 6과 같이 방사선 조사 6주 후 상처제작 군의 상처 치유 속도가 지연되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명에 따른 만성 창상 돼지 모델은 지속적인 염증을 동반하고 우수한 만성 창상 효과를 나타낼 수 있으므로, 이를 이용한 만성 창상 치료를 위한 치료제 개발 및 메커니즘을 밝히는데 용이한 모델로 이용될 수 있다.
- [0021] 또한 상처 제작은 하나의 방사선 조사구역의 2개의 상처는 6 cm 이격을 두고 제작되는데, 방사선이 조사된 상처는 감염에 매우 취약하여 종래의 동물 모델과 같이 상처 사이의 간격이 좁고, 상처 수가 많으면 한쪽의 감염이

근막을 따라 전체 상처 부위로 감염되는 문제가 발생할 수 있으므로, 상처 사이에 충분한 간격과 적당한 상처 수가 중요하며, 또한 상처 바닥에 피하지방층의 하층을 남김으로써 근막이 상처바닥에 노출되지 않도록 하는 것이 중요하다.

- [0022] 따라서, 상기 상처는 표피, 진피 및 상층 피하지방층까지의 피부 결손을 통한 만성 상처로 제작될 수 있다.
- [0023] 보다 상세하게는 20-30 kg의 돼지는 피부 두께가 약 2cm 로, 피부는 표피, 진피 및 피하지방층으로 나뉘며, 피하지방은 얇은 막을 사이로 상층 및 하층으로 나뉜다. 본 발명은 피하지방의 상층과 하층 지방을 나누는 얇은 막을 경계로 그 윗 부분을 절제하여 표피 및 진피를 포함하는 피하지방 상층까지의 피부 결손을 유도함으로써 균일한 상처 바닥을 갖는 창상을 제작할 수 있을 뿐만 아니라 상처바닥에 근막이 바로 노출되지 않기 때문에 근막을 통한 감염의 전파를 막을 수 있다. 이에 따라 제작된 창상은 피부에 국한된 만성 창상치유 지연 효과를 나타낼 수 있다.
- [0024] 상기 만성 창상 동물 모델은 상처 제작 후 4주간 상처를 유지시켜 만성 창상을 유도할 수 있으며, 상기 동물은 돼지일 수 있다.
- [0025] 또한 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 만성 창상 동물 모델을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 관한 모델 동물은 만성 창상 연구의 피험 약제의 약효 평가에 적합한 것이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 형태의 것이어도 사용할 수 있다. 예컨대, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물 어느 것이나 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 돼지(암컷 요크셔(Yorkshire))를 사용하였으나 이에 제한되지 않는다. 모델 동물을 제작하기 전의 사육 조건은 통상적인 방법에 따라 선택하면 되고 특별히 한정되지 않는다.
- [0027] 또한 본 발명은 본 발명에 따라 제작된 만성 창상 동물 모델에 상처 치료제 후보 물질을 2개의 만성 창상과 1개의 대조군 창상에 투여하는 단계; 및 상기 상처 치료제 후보 물질의 치료효과를 만성 창상과 대조군 창상에서 측정하는 단계를 포함하는 만성 창상 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0028] 상기 상처 치료제 후보 물질이란 상기 상처에 대한 치료효과가 있는 것으로 예상되어, 치료 효과를 측정하기 위한 실험대상으로 사용될 수 있는 모든 물질을 의미하며, 실험동물에 적용할 수 있고 치료 효과를 측정할 수 있으면 천연물질 또는 그로부터 얻어진 것이든, 인공적으로 합성된 것이든 제한되지 않고, 그 종류도 제한되지 않는다. 상기 실험동물에 적용이란 경구로 섭취시키거나 주사 등의 방법을 이용하거나 외용하는 등의 모든 방법을 의미하며, 상기 방법은 제형이나 제제의 종류에 의해서 제한되지 아니한다.
- [0029] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0030] **<실시예 1> 방사선을 이용한 만성 창상 제작**
- [0031] 1. 실험 동물
- [0032] 피부병이 없는 2 마리 암컷 요크셔(Yorkshire) 돼지가 본 발명에 사용되었다. 상기 돼지들은 7-8 개월령으로 비슷한 키, 체형 및 평균 30-32 kg의 몸무게를 나타냈다. 돼지들은 실험 1주 전에 동물 사육장에서 실험실로 옮겨졌고, 분리된 장소에 두었다. 표준화된 먹이를 주고, 장소 환경은 온도를 21-23 ℃ 및 39-56 % 습도를 유지하였다. 또한, 생물학적 주기 리듬을 유지하기 위해서 12 시간 명/암 사이클을 시행하였다.
- [0033] 2. 방사선 조사
- [0034] 모든 동물 실험 과정에 대해 계명대학교 의과대학 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다. 각각의 동물에 졸레틸 및 자일라진 하이드로클로라이드(xylazine hydrochloride)(Rompun, Bayer Korea, Gyeonggi, Korea) 2 mL를 돼지 엉덩이 근육 내에 주사하여 마취 상태를 유도하였다. 그 후, 털을 면도하였으며, 피부는 식염수로 씻어냈고, 글루쿠론산 클로헥시딘(glucuronic acid chlorhexidine) 용액 및 베타딘(Betadine)으로 멸균하였다.
- [0035] 그 다음, 돼지 등의 정중선에서 양방향으로 3 cm 수평간격 두고 18×8 cm 넓이의 직사각형을 방사선 조사부위 간에는 1cm의 수직 간격을 두어 총 3개의 방사선 조사구역으로 표시한 후 방사선 가속장치(Clinacix, Varian Medical system, USA)를 곡면의 돼지 등에 방사선이 양쪽으로 동일하게 도달할 수 있도록 도 2와 같이 수직으로 위치시킨 후 6-MeV 전자를 18Gy로 표시된 구역에 조사하였으며, 그 맞은 편에는 방사선을 조사하지 않았다.

[0036] 또한 돼지 등은 미측으로 갈수록 피부의 두께가 얇아져 조사됨으로써 방사선의 깊이가 깊어지는 문제점을 보완하여 동일한 방사선량 및 방사선 도달 깊이를 위해 피부두께를 0.5 cm 두껍게 보정해 줄 수 있는 방사선 흡수 장치인 볼러스(bolus)를 미측에 덧대어 줌으로써 90%의 방사선량이 최대 깊이 2 cm내에 동일하게 도달하도록 하였다.

[0037] 3. 만성 창상 제작

[0038] 방사선 조사 2, 4 및 6주 후 창상을 제작하였다.

[0039] 창상은 도 3과 같이 방사선 조사 부위의 직사각형 변연으로부터 2cm 떨어진 부위에 $4 \times 4 \text{ cm}^2$ 넓이의 사각형 모양으로 표피, 진피 및 상층 피하지방층을 제거함으로써 피부가 결손된 2개의 상처를 실험군으로 제작하였으며, 두 창상의 간격은 6cm로 하여 총 6개의 창상(R1~R6)을 제작하였다. 또한 그 맞은 편의 방사선을 조사하지 않은 부위에는 실험군과 동일한 조건으로 1개의 창상을 제작하여 총 3개의 창상(N1~N3)이 제작되었다.

[0040] 모든 상처들은 감염에 노출시키기 위해 봉대를 감지 않고 열린 채로 4주간 유지시킴으로써 방사선 조사부위의 상처가 만성 창상이 되도록 제작하였다.

[0041] **<실시에 2> 조직 생검 및 분자생물학적 분석**

[0042] 1. 만성 창상의 적합성 확인

[0043] 앞선 방법과 같이 방사선 조사 부위에 제작된 상처와 정상 부위에 제작된 상처의 치유되는 정도를 현미경 관찰한 후 방사선 조사 후 상처제작 군과 대조군의 상피화 정도를 표 1과 같은 점수 등급으로 점수화하여 비교하였으며, 상처 치유속도를 분석하였다.

[0044] 그 결과, 상처 제작 직후 대조군과 방사선 조사군 모두 염증반응은 나타나지 않다. 방사선조사 2주 후 상처제작 군은 도 4A, B 및 C와 같이 완전한 상피화가 확인되었으나, 방사선 조사 4주, 6주 후 상처제작 군은 도 4D, E 및 F와 같이 불완전한 상피화가 확인되었다.

[0045] 방사선조사 2주 후 상처제작 군의 2주째(도 5A) 및 방사선조사 4주 후 상처 제작 군의 2주째(도 5D)에서 급성염증세포가 매우 증가해 있었으며, 만성염증세포는 방사선조사 2주 후 상처제작 군에서 4주째(도 5B)와 9주째(도 5C)에 감소하여 거의 확인되지 않았다. 그러나, 방사선조사 4주 후 상처제작 군에서 4주째(도 5E)에 만성염증이 가장 증가되었고 9주째(도 5F)에 급격히 감소하였다. 또한 방사선조사 6주 후 상처제작 군에서 2주째(도 5G)에는 급, 만성 염증이 미미하게 나타났으나, 4주째(도 5H)에는 만성염증이 조금 증가하였고 9주(도 5I)까지 유지되었다.

[0046] 또한 도 6과 같이 상처 치유속도를 분석한 결과, 방사선 조사 6주 후 상처제작 군은 방사선 조사 2주 또는 4주 상처제작 군 보다 상처 치유효과가 느리게 나타났다.

[0047] 상기 결과로부터 방사선 조사 그룹 중 만성 염증은 방사선 조사 4주 후 상처제작 군이 가장 적합한 것으로 확인되었으며, 만성 상처는 방사선 조사 6주 후 상처제작 군이 가장 적합한 것으로 확인되었다.

표 1

[0048]

Score	Severity	Extent
0	None	None
1	Mild	<10%
2	Moderate	10-50%
3	Severe/Marked	51-80%
4		>80%

[0049] 2. 만성 창상 치료 물질 스크리닝

[0050] 본 발명의 만성 창상 동물모델로 제작된 돼지의 상처에 돼지의 지방조직에서 추출한 자가 지방줄기세포(ADSC)를 10×10^{10} 으로 투여한 실험군과 비 투여한 대조군의 상처치유 정도를 헤마톡실린-에오신 염색을 통하여 조직학적으로 확인하였다.

[0051] 그 결과, 도 6A, E 및 I와 같이 대조군인 ADSC를 투여하지 않은 모든 방사선 조사 후 상처제작 군에서는 불완전

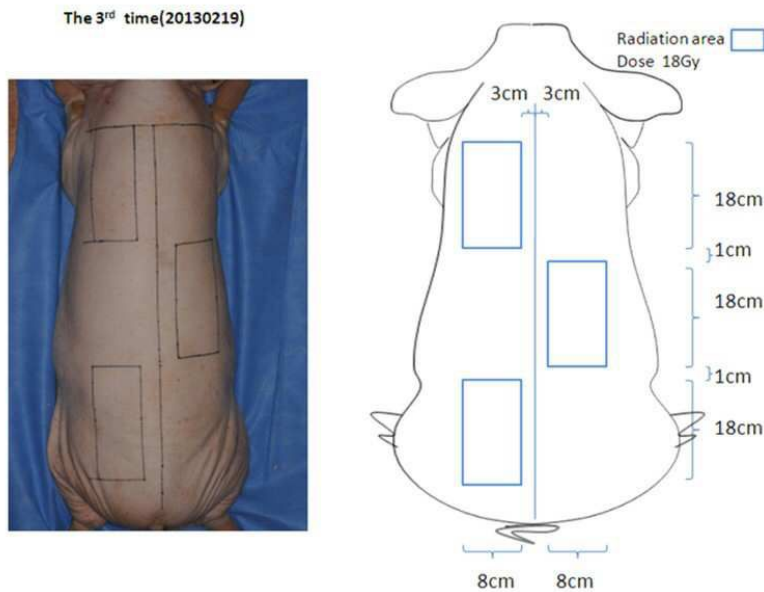
한 상피화가 확인된 반면, ADSC를 투여한 모든 방사선 조사 후 상처제작 군에서는 도 6C, G 및 K와 같이 완전한 상피화가 확인되었으며, 도 6D, H 및 L과 같이 심각한 만성염증세포수의 유의한 감소를 확인하였다.

[0052]

반면, ADSC를 투여하지 않은 모든 방사선 조사 후 상처제작 군에서는 도 6B, F 및 J와 같이 ADSC를 처리한 실험군 보다 약간 증가된 만성 염증세포를 확인할 수 있었다.

도면

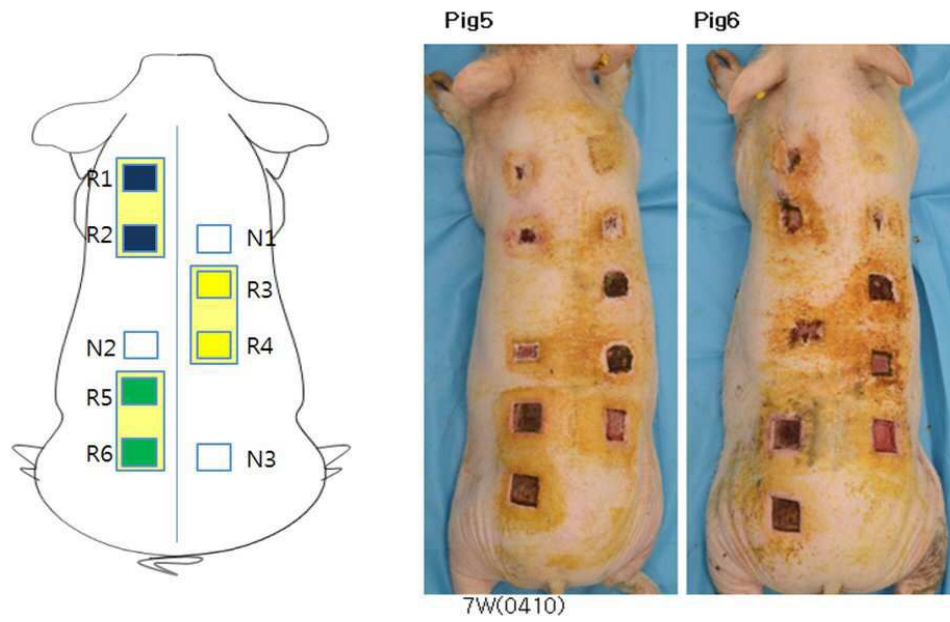
도면1



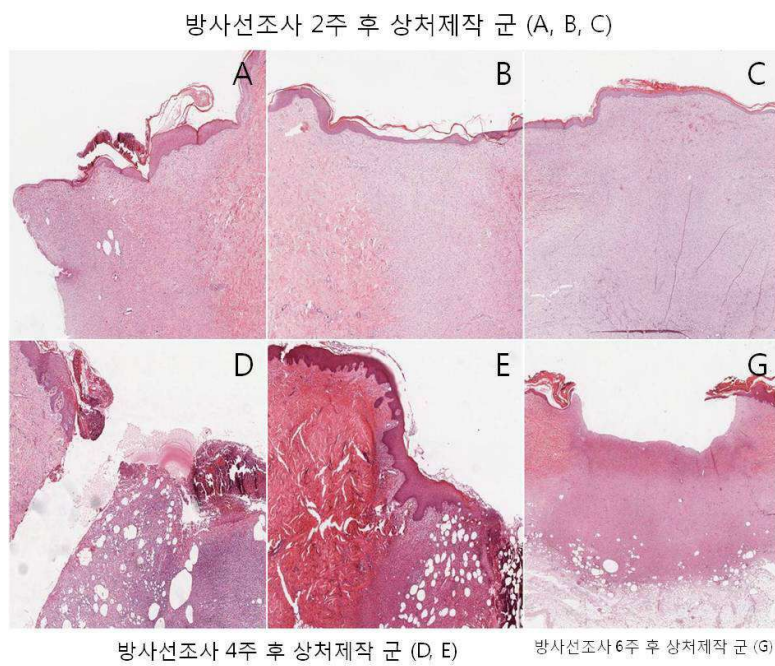
도면2



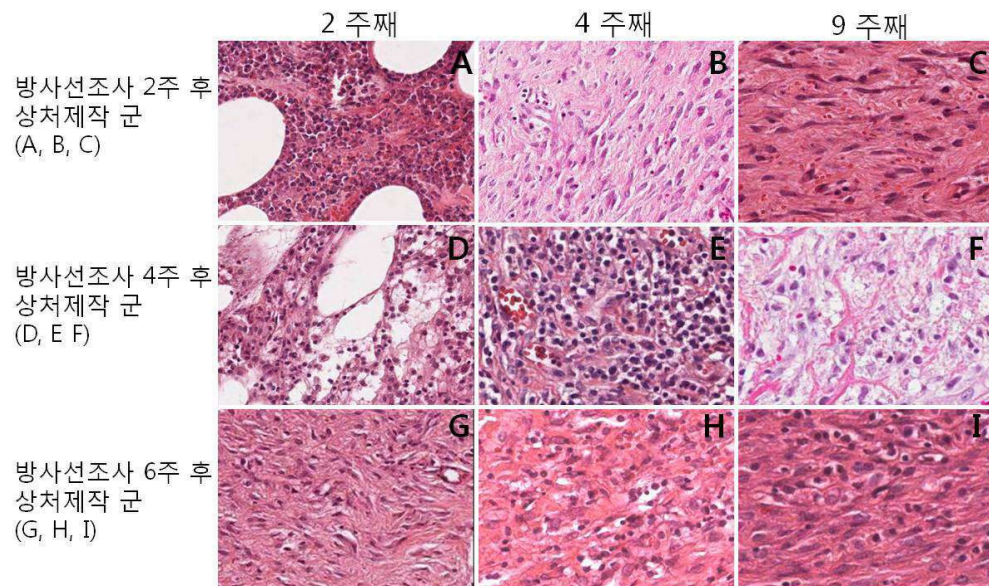
도면3



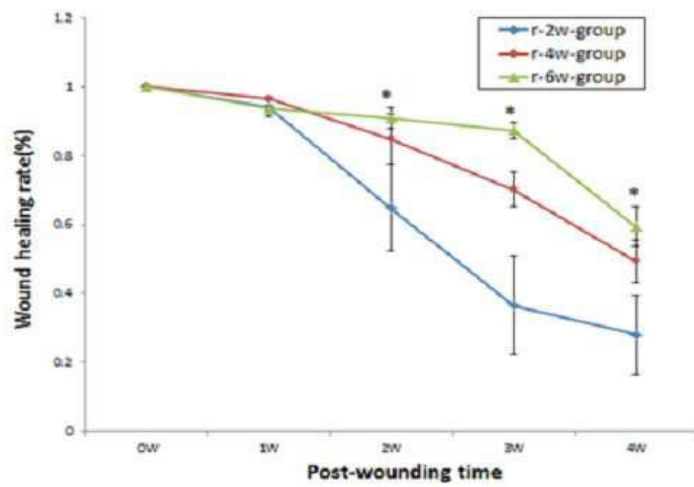
도면4



도면5



도면6



도면7

