(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0141778
(43) 공개일자 2020년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/30 (2006.01) *C12Q 1/02* (2017.01)
G01N 33/483 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 1/30 (2013.01)
C12Q 1/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0068750
(22) 출원일자 2019년06월11일
심사청구일자 2019년06월11일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
이준호
강원도 춘천시 삭주로 77, 한림대학교 춘천성심병원 이비인후과 외래
서준교
강원도 춘천시 충열로 29, 107동 303호(롯데인벤스)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김남혁

전체 청구항 수 : 총 11 항

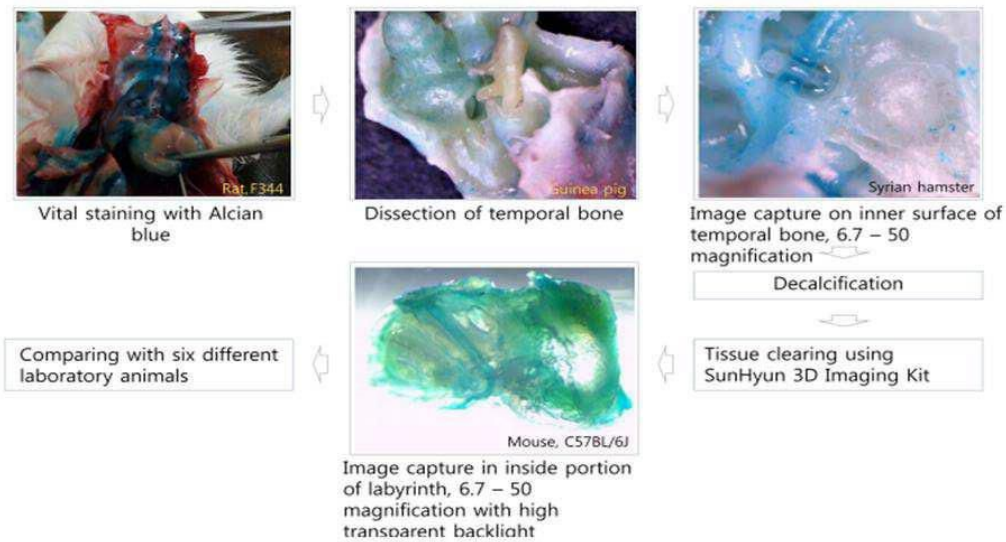
(54) 발명의 명칭 **동물 측두골 혈관 및 멜라닌세포 시각화 방법**

(57) 요 약

본원은 측두골 내부구조의 시각화 방법, 측두골 내부구조를 시각화하기 위한 조성물 및 측두골 내부구조의 멜라닌세포 분포 또는 순환계 분포를 분석하는 방법에 관한 것이다.

본원의 측두골 내부구조의 시각화 방법을 이용하면, 단단한 뼈로 둘러싸여 있고 구조가 복잡하여 정확한 해부학적 구조를 파악하기 어려운 측두골 내부구조의 3차원 이미지를 제작할 수 있으므로, 측두골 내부 구조인 달팽이관 및 전정기관의 구조, 세포 전체의 변화 패턴 등을 보다 정확하게 확인할 수 있으며, 이를 토대로 동물 실험에서의 정량적 측정을 효율적으로 할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 33/4833 (2013.01)
(72) 발명자
김철호
강원도 춘천시 서부대성로 34, 104동 804호

김유연
경기도 안산시 상록구 감골2로 58, 선경아파트 103동 404호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2016R1D1A1B0101428
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인연구지원사업
연구과제명	노인성 난청과 돌발성 난청 발생에 대한 원인 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2016.06.03 ~ 2024.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 개체의 혈관을 염색하는 단계; 및

(b) 상기 개체의 측두골 및 측두골 내부구조를 포함하는 조직을 투명화하는 단계;

를 포함하는, 측두골 내부구조의 시각화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는

i) 상기 개체의 혈액을 제거하는 단계; 및

ii) 염료를 관류 펌프를 이용하여 상기 개체의 순환계 전반에 걸쳐 순환시키는 단계

를 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 혈관 염색은 알시안 블루(Alcian Blue)를 염료로 이용하는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계는 측두골의 탈석회화(decalcification) 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 측두골의 내부구조는 달팽이관 및 전정기관을 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 시각화는 3차원 이미지를 획득하는 것인, 방법.

청구항 7

혈관 염색 염료 및 조직 투명화 조성물을 포함하는, 측두골 내부구조를 시각화하기 위한 조성물.

청구항 8

(a) 개체의 혈관을 염색하는 단계;

(b) 상기 개체의 측두골 및 측두골 내부구조를 포함하는 조직을 투명화하는 단계; 및

(c) 상기 투명화된 조직을 3차원 이미지화하는 단계

를 포함하는, 측두골 내부구조의 멜라닌세포(melanocyte) 분포를 분석하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 측두골의 내부구조는 달팽이관 및 전정기관을 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

(a) 개체의 혈관을 염색하는 단계;

(b) 상기 개체의 측두골 및 측두골 내부구조를 포함하는 조직을 투명화하는 단계; 및

(c) 상기 투명화된 조직을 3차원 이미지화하는 단계

를 포함하는, 측두골 내부구조의 순환계 분포를 분석하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 순환계 분포 분석은 달팽이관의 부행 순환(collateral circulation)을 분석하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 측두골 내부구조의 시각화 방법, 측두골 내부구조를 시각화하기 위한 조성물 및 측두골 내부구조의 멜라닌세포 분포 또는 순환계 분포를 분석하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] x-ray를 통한 의료 진단 기술은 CT나 MRI와 같은 2차원 스캐닝 후 3차원으로 재구성하는 기술에 의하여 입체적으로 관찰, 정교하게 진단할 수 있는 기술로 발전하여 왔다. 광원이 아니라 초음파 등을 활용하는 경우 역시 3차원적 영상을 구현하는 기술이 진단에 활발하게 이용되고 있다. 그러나 현재 개발된 기술 대부분은 밀리미터 수준의 상대적으로 마크로 해상력을 가진 기술들로, 세포 수준에서의 분석이 가능한 마이크로 수준의 3차원 측정하는 기술은 상대적으로 그 발전이 미흡하여, 현재 대부분의 세포 수준 분석은 전통적인 2차원 기술을 이용하고 있다. 즉, 생검 또는 부검 조직 등 생체조직을 고정액으로 고정한 후, 파라핀 또는 폴리머로 포매한 후 수 마이크로미터 또는 나노미터 두께로 절편을 만들어 빛이나 전자파가 투과할 수 있도록 한 후, 투과 이미지를 광학 또는 전자현미경을 이용하여 취득하는 기술을 사용하여 미세구조를 분석한다.

[0004] 이러한 미세 이미징 기술을 이용하여 3차원 이미지를 획득하기 위해서는 콘포칼 현미경 등을 이용해야 하며, 이 경우 일반적으로 수십 마이크로미터 수준의 두께 정보를 획득할 수 있다. 대략적으로 이 두께는 광원이 침투할 수 있는 깊이에 의하여 그 한계가 그어진다. 그러나 대부분의 생체 조직 내 유의미한 구조물들이 수백 마이크로미터 이상의 크기를 가지고 있으므로, 이와 같은 방법으로는 일부의 정보만을 취득할 수 있다. 따라서, 보다 두꺼운 조직 내 이미지를 획득하기 위해서는 수십 마이크로 두께의 연속적인 절편을 제작하고, 이를 일일이 현미경으로 통하여 이미징 한 후, 다시 재구성하는 일련의 과정을 필요로 한다.

[0005] 한편, 청각을 담당하는 달팽이관 및 평형을 담당하는 전정기관은 머리뼈를 구성하고 있는 측두골에 둘러싸여 있으며, 그 구조 또한 매우 복잡하여 정확한 해부학적 구조를 파악하는 데 한계가 있으며, 이로 인해 상기 구조를 3차원적으로 분석하는 것은 어려운 상황이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 측두골 내부구조, 구체적으로 달팽이관 및 전정기관의 구조를 시각화할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 측두골 내부구조의 시각화 방법, 측두골 내부구조를 시각화하기 위한 조성물 및 측두골 내부구조의 멜라닌세포 분포 또는 순환계 분포를 분석하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1563826호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본원의 제 1 측면은, (a) 개체의 혈관을 염색하는 단계; 및 (b) 상기 개체의 측두골 및 측두골 내부구조를 포함하는 조직을 투명화하는 단계를 포함하는, 측두골 내부구조의 시각화 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본원의 제 2 측면은, 혈관 염색 염료 및 조직 투명화 조성물을 포함하는, 측두골 내부구조를 시각화하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본원의 제 3 측면은, (a) 개체의 혈관을 염색하는 단계; (b) 상기 개체의 측두골 및 측두골 내부구조를 포함하는 조직을 투명화하는 단계; 및 (c) 상기 투명화된 조직을 3차원 이미지화하는 단계를 포함하는, 측두골 내부구조의 멜라닌세포(melanocyte) 분포를 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본원의 제 4 측면은, (a) 개체의 혈관을 염색하는 단계; (b) 상기 개체의 측두골 및 측두골 내부구조를 포함하는 조직을 투명화하는 단계; 및 (c) 상기 투명화된 조직을 3차원 이미지화하는 단계를 포함하는, 측두골 내부구조의 순환계 분포를 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0017] 본원의 제 1 측면은, (a) 개체의 혈관을 염색하는 단계; 및 (b) 상기 개체의 측두골 및 측두골 내부구조를 포함하는 조직을 투명화하는 단계를 포함하는, 측두골 내부구조의 시각화 방법을 제공한다.

[0018] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "측두골(temporal bone)"은 평형청각기를 내장하는 측두부에 있는 복잡한 형태를 갖는 뼈로서, 외측면에서는 측두근이 부착하는 측두면과 그의 하방에서 전방으로 외이공, 후방으로 유양돌기가 있고, 그의 내부는 유돌봉소라고 하는 소강의 집단이 있어 고실과 연결되어 있다. 하면에는 예리한 경상돌기가 있고, 그의 후방에 경유돌공이 있어 안면신경의 출구로 되어 있다. 그 위에 전내방에는 후두골과 경정맥공을 만드는 열극과 그의 전방에 내경동맥이 지나는 경동맥관이 개구하고 있다. 또한, 전면에는 근이관이 열려 있어 고실에 통한다. 이 뼈의 내방으로 돌출하는 부를 암양부라고 명명하여, 이 안에 중이인 고실, 내이인 골미로가 존재하는 것이지만, 암양부의 거의 중앙부 내측면에 내이공과 내이도가 있어 내이신경과 안면신경이 지나고 있으나, 후자는 안면신경관내를 지나 경유돌공 등으로 나오는 것이 된다. 또한 암양부의 선단은 경동맥관이 개구하고 있고, 이 부위와 첩형골 등에 의하여 파열골을 만들고 있다.

[0019] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 측두골의 내부구조는 측두골로 둘러싸여 있는 조직 또는 기관일 수 있으며, 구체적으로 달팽이관 및 전정기관을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "달팽이관(cochlea)"은 와우관이라고도 불리우며, 귀의 가장 안쪽인 내이에 위치하며 듣기를 담당하는 청각기관으로서, 그 안은 림프액으로 채워져 있고 소리를 받아들이는 데 중심적 역할을 하는 유모세포들이 있다. 달팽이관은 달팽이와 비슷한 모양을 하고 있기 때문에 붙여진 이름이다. 사람에서는 두바퀴 반, 곧 2.5회전을 하는데 기저, 중간, 첨단 회전부로 구분된다. 달팽이관의 내부에는 림프액과 청각 세포가 있는데 소리진동이 가운데귀의 뼈를 지나 속귀로 전달되면서 달팽이관의 림프액에 파동을 일으킨다. 이러한 움직임을 청각 세포가 감지하고 청신경을 통해 뇌까지 도달하게 된다.

[0021] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "전정기관(vestibule)"은 귀의 가장 안쪽에 있는 내이에 위치하며 머리의 수평, 수직 선형 가속도, 회전 운동을 감지하여 중추평형기관에 전달하여 신체의 균형을 유지하게 하는 기관으로, 세반고리관과 전정을 통틀어 일컫는 말이다. 전정기관은 달팽이관의 뒤 위쪽, 반고리관의 앞 아래쪽에 위치하고 있으며, 둥근주머니(구형낭, saccule)과 타원주머니(난형낭, utricle)로 이루어져 있다. 둥근주머니는 세로로 서 있는 구조이고 아래쪽의 달팽이관과 가깝게 위치해 있으며, 타원주머니는 수평면상에 위치하고 반고리관과 가깝게 위치해 있다. 둥근주머니와 타원주머니는 이음관(연낭관)이라 불리는 관으로 연결되어 있다. 머리를 기울이거나 몸을 움직이면 전정기관 속 이석이 기우는데, 이 무게는 유모세포를 자극하여 소뇌가 위치감각을 느끼게 된다. 즉, 전정은 중력이나 삼차원적인 선형 가속도 운동을 감지하는 기능을 가진다. 또한 반고리관은 세 개로 이루어져 림프액의 흐름에 따라 몸의 회전 움직임을 감지한다.

[0022] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 (a) 단계는, i) 상기 개체의 혈액을 제거하는 단계; 및 ii) 염료를 관류 펌프를 이용하여 상기 개체의 순환계 전반에 걸쳐 순환시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0023] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 (a) 단계의 혈관 염색은 알시안 블루(Alcian Blue)를 염료로 이용하는 것일 수 있다.

[0024] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "알시안 블루(Alcian Blue)"는 히알루론산과 같은 다당류를 염색하기 위한 시약으로서, 양이온을 띠고 있으며 당류의 음이온 자리와 결합하여 가역적인 정전기결합을 한다. 그러나 알시안 블루와 당류의 음이온 자리 간의 정전기결합은 쉽게 끊어질 수 있고 이러한 결합의 정도의 따라 염색 정도가 달라지고 여러 가지 종류의 다당류를 표현할 수 있다. 알시안 블루에 의해 다당류는 파란색 또는 파란빛이 나는 녹색으로 염색된다.

[0025] 본원의 일 실시예에 따르면, 실험 동물의 혈관을 염색하기 위하여, 먼저 산소가 혼합된 4% 이소프루란으로 동물을 마취시키고, 식염수 및 4% 파라포름알데하이드 (PFA)를 좌심실을 통해 5분간 관류시켜 개체의 혈액을 제거하면서 장기의 조직 고정을 유도하였고, 알시안 블루 및 4% 파라포름알데하이드 혼합물을 관류 펌프를 통해 개체의 순환계 전반에 걸쳐 순환시킴으로서 개체의 혈관을 염색하였다.

[0026] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 (b) 단계의 조직을 투명화하는 단계는 기존에 알려진 다양한 방법을 이용하는 것일 수 있으며, 구체적으로 1) 단순히 굴절률을 맞추는 방법, 2) 지방을 일부 제거한 후 굴절률을 맞추는 방법, 또는 3) 조직-겔 복합체 형성 후 지방을 일부 제거하고 굴절률을 맞추는 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본원의 일 실시예에 따르면, 측두골 및 측두골 내부구조를 포함하는 조직을 투명화하기 위하여, 실험 동물의 혈관을 염색한 후, 시옷 봉합(Lambdoid suture)선을 골절시켜, 두정골 및 전두골을 제거하고, 두개저로부터 뇌를 제거하였으며, 상악 및 하악을 분리하여 측두골을 채취한 후, 조직 투명화를 실시하였다.

[0028] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 (b) 단계는 측두골의 탈석회화(decalcification) 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0029] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 측두골 내부구조의 시각화 방법은 염색 및 조직 투명화된 샘플을 실체현미경으로 관찰하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0030] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 일반적으로 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 양, 염소 및 닭 등을 포함하는 실험 동물로 사용될 수 있는 모든 동물을 의미하는 것일 수 있으며, 구체적으로 사람을 제외하는 것일 수 있다.

[0031] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 사람을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 설치류일 수 있고, 구체적으로 한국 야생 마우스, 마우스, 래트,

저빌, 기니피그 및 햄스터로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 설치류의 측두골 내부구조를 시각화하는 방법일 수 있고, 구체적으로 한국 야생 마우스, 마우스, 래트, 저빌, 기니피그 및 햄스터로 이루어진 군에서 선택되는 것의 측두골 내부구조를 시각화하는 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 시각화는 3차원 이미지를 획득하는 것일 수 있다.

[0035] 본원의 일 실시예에 따르면, 측두골 내부구조, 구체적으로 달팽이관 및 전정기관의 3차원 이미지를 획득함으로서, 정확한 해부학적 구조를 파악할 수 있다는 장점이 있다.

[0036] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 측두골 내부구조의 시각화는 측두골 내부구조의 멜라닌세포 분포 및/또는 순환계 분포를 분석하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본원의 일 구현예에 따르면, 본원의 혈관 염색 기술 및 조직 투명화 기술을 이용하여 측두골 내부에 존재하는 중이 및 내이의 다양한 기관, 구체적으로 달팽이관 및 전정기관의 활성화된 구조를 실체현미경을 사용하여 시각적으로 확인이 가능하였으며, 3차원적으로 멜라닌세포 분포 패턴 및 혈관 패턴 등을 재건할 수 있었다. 특히, 이미지화된 측두골 내부구조의 혈관 패턴의 경우, 일반적인 이미지화 및 3차원 재건으로 전체적인 패턴을 추적하는 것에 매우 어려움이 따르나, 본원은 3차원적 순환계 재건과 시각적인 이미지를 제공할 수 있으므로, 이를 통하여 측두골 내부구조, 구체적으로 달팽이관 및 전정기관 등의 기능 연구에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0039] 본원의 제2측면은, 혈관 염색 염료 및 조직 투명화 조성물을 포함하는, 측두골 내부구조를 시각화하기 위한 조성물을 제공한다. 제1측면과 중복되는 내용은 제2측면의 측두골 내부구조를 시각화하기 위한 조성물에도 공히 적용된다.

[0040] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 혈관 염색 염료는 알시안 블루일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조직 투명화 조성물은 기존에 알려진 다양한 조직 투명화 조성물을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 1) 단순히 굴절률을 맞추는 위한 조성물, 2) 지방 제거 및 굴절률을 맞추기 위한 조성물, 또는 3) 조직-겔 복합체 형성 지방 제거 및 굴절률을 맞추기 위한 조성물을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 측두골 내부구조는 달팽이관 및 전정기관을 포함하는 것일 수 있다.

[0043] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 시각화는 3차원 이미지화 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 설치류의 측두골 내부구조를 시각화하기 위한 조성물일 수 있고, 구체적으로 한국 야생 마우스, 마우스, 래트, 저빌, 기니피그 및 햄스터로 이루어진 군에서 선택되는 것의 측두골 내부구조를 시각화하기 위한 조성물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본원의 제3측면은, (a) 개체의 혈관을 염색하는 단계; (b) 상기 개체의 측두골 및 측두골 내부구조를 포함하는 조직을 투명화하는 단계; 및 (c) 상기 투명화된 조직을 3차원 이미지화하는 단계를 포함하는, 측두골 내부구조의 멜라닌세포(melanocyte) 분포를 분석하는 방법을 제공한다. 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 제3측면의 측두골 내부구조의 멜라닌세포 분포를 분석하는 방법에도 공히 적용된다.

[0047] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "멜라닌세포(melanocyte)"는 색소세포라고도 불리며, 멜라닌-생성 신경관 유래 세포(melanin-producing neural crest-derived cell)로서, 피부 표피의 기저층, 눈의 중간층(포도막), 내이, 질 상피, 수막, 뼈 및 심장 등에 존재하는 것으로 알려져 있다. 또한, 멜라닌은 동물들의 피부, 눈 등의 조직에 존재하는 흑색 내지 갈색 색소를 총칭하는 것으로서, 멜라닌은 일정량 이상의 자외선을 차단하는 기능이 있어서 피부의 체온을 유지시켜주고 자외선으로부터 피부를 보호해 주며, 멜라닌의 양에 의해서 피부색이 결정된다.

[0048] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 멜라닌세포 분포 분석은 측두골 내부구조에서의 멜라닌 세포 전체 세포 수를 측정하는 것일 수 있다.

[0049] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 혈관 염색 염료는 알시안 블루일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 측두골의 내부구조는 달팽이관 및 전정기관을 포함하는 것일 수 있다.

[0051] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 일반적으로 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 양, 염소 및 닭 등을 포함하는 실험 동물로 사용될 수 있는 모든 동물을 의미하는 것일 수 있으며, 구체적으로 사람을 제외하는 것일 수 있다.

[0052] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 사람일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 한국 야생 마우스, 마우스, 래트, 저빌, 기니피그 및 햄스터로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 설치류의 측두골 내부구조의 멜라닌세포 분포를 분석하는 방법일 수 있고, 구체적으로 한국 야생 마우스, 마우스, 래트, 저빌, 기니피그 및 햄스터로 이루어진 군에서 선택되는 것의 측두골 내부구조의 멜라닌세포 분포를 분석하는 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본원의 일 실시예에 따르면, 본원의 측두골 내부구조의 멜라닌세포 분포를 분석하는 방법을 이용하여, 마우스, 저빌 및 햄스터의 달팽이관에서 멜라닌세포를 관찰할 수 있었는 바, 이를 이용하여 달팽이관에 분포하고 있는 멜라닌 세포의 패턴을 3차원적 이미지로 재건할 수 있다.

[0056] 본원의 일 실시예에 따르면, 본원의 측두골 내부구조의 멜라닌세포 분포를 분석하는 방법을 이용하여 한국 야생 마우스, 마우스, 저빌 및 햄스터의 전정기관에서 멜라닌세포를 관찰할 수 있었는 바, 이를 이용하여 전정기관에 분포하고 있는 멜라닌 세포의 패턴을 3차원적 이미지로 재건할 수 있다.

[0058] 본원의 제4측면은 (a) 개체의 혈관을 염색하는 단계; (b) 상기 개체의 측두골 및 측두골 내부구조를 포함하는 조직을 투명화하는 단계; 및 (c) 상기 투명화된 조직을 3차원 이미지화하는 단계를 포함하는, 측두골 내부구조의 순환계 분포를 분석하는 방법을 제공한다. 제1측면 내지 제3측면과 중복되는 내용은 제4측면의 측두골 내부구조의 순환계 분포를 분석하는 방법에도 공히 적용된다.

[0059] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 측두골 내부구조의 순환계 분포 분석은 달팽이관의 혈관 분포를 분석하는 것일 수 있으며, 구체적으로 달팽이관의 부행 순환(collateral circulation)을 분석하는 것일 수 있다.

[0060] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "부행 순환(collateral circulation)"이란, 동맥경화증이나 혈전으로 인한 혈액 공급의 방해를 우회하기 위해 혈관 근처에 미세혈관이 생성되는 대체 시스템을 의미하며, 곁순환 또는 담보 순환이라고도 불린다.

[0061] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 혈관 염색 염료는 알시안 블루일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 일반적으로 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 양, 염소 및 닭 등을 포함하는 실험 동물로 사용될 수 있는 모든 동물을 의미하는 것일 수 있으며, 구체적으로 사람을 제외하는 것일 수 있다.

[0063] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 사람일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 한국 야생 마우스, 마우스, 래트, 저빌, 기니피그 및 햄스터로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 설치류의 측두골 내부구조의 순환계 분포를 분석하는 방법일 수 있고, 구체적으로 한국 야생 마우스, 마우스, 래트, 저빌, 기니피그 및 햄스터로 이루어진 군에서 선택되는 것의 측두골 내부구조의 순환계 분포를 분석하는 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0067] 본원의 측두골 내부구조의 시각화 방법을 이용하면, 단단한 뼈로 둘러싸여 있고 구조가 복잡하여 정확한 해부학적 구조를 파악하기 어려운 측두골 내부구조의 3차원 이미지를 제작할 수 있으므로, 측두골 내부 구조인 달팽이관 및 전정기관의 구조, 세포 전체의 변화 패턴 등을 보다 정확하게 확인할 수 있으며, 이를 토대로 동물 실험에서의 정량적 측정을 효율적으로 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 측두골의 염색 단계 및 조직 투명화 단계를 포함하는 측두골 내부구조의 시각화 방법을 대략적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 알시안 블루로 측두골 내부구조를 염색한 후의 중이강 내의 구조를 나타낸 도면으로서, a 및 b는 한국 야생 마우스의 추골병(검은색 화살표)을 나타낸 도면이고, c는 햄스터의 작은 섬유증 조밀 조직(검은색 별표)을 나타낸 도면이고, d는 저빌에서의 고막에 맞닿은 돌출된 달팽이관을 아타낸 도면이고, e는 저빌에서의 고막의 이완부의 돌기(하얀색 화살표)를 나타낸 도면이고, f는 저빌의 고막의 고실위오목 지역(하얀색 별표)을 나타낸 도면으로서, 고실끈신경(하얀색 화살표), 소고실극(검은색 별표)로부터 발생한 추골에 공급되는 동맥(검은색 화살표)을 나타낸다. g는 기니피그의 고실위오목 지역을 나타내고, h는 기니피그의 고막의 내부를 나타내는 도면으로서, 고막 긴장부(하얀색 별표)를 둘러쌓고 있는 고막 이완부(검은색 별표)를 나타내고, i는 기니피그에서 고막이 의료원적으로 관통되었을 때 뼈 고리 아래에 위치한 고막 이완부(검은색 화살표)를 나타낸다[TM(tympanic membrane): 고막, TTMP(traumatic tympanic membrane perforation): 외상성 고막 천공].

도 3은 고막 및 유양돌기 내의 공간을 나타내는 도면으로서, a-d는 기니피그의 중이강내의 구조를 나타낸 도면이고, e-h 는 한국 야생 마우스, 마우스, 저빌 및 햄스터의 달팽이관 선회 구조를 나타낸 도면이다.

도 4는 달팽이관의 멜라닌세포를 나타낸 도면으로서, 검은색 화살표는 멜라닌세포를 나타낸다.

도 5는 전정기관의 멜라닌세포를 나타낸 도면으로서, 검은색 화살표 및 검은색 별표는 멜라닌세포를 나타낸다.

도 6은 달팽이관의 부행 순환을 나타낸 도면으로서, a는 한국 야생 마우스에서의 달팽이관 축 내의 혈액 공급 동맥을 나타내고, b는 마우스에서 등골 동맥(검은색 별표)의 수막 영역으로부터 달팽이관 축으로 공급되는 소동맥(흰색 별표)을 나타내고, c는 마우스의 달팽이관 정점 회전에 존재하는 등골 동맥(검은색 별표)으로부터 공급되는 소동맥(흰색 별표)을 나타내고, d는 기니피그에서 중이 점막상에 공급된 소동맥(흰색 별표) 및 달팽이관 영역을 관통하는 소동맥(검은색 별표)를 나타내고, e는 등골 동맥(흰색 별표)사이에 작은 망상(검은색 별표)를 나타내고, f는 부행 순환을 3차원 구조로 나타낸 도면이다[AICA(anterior inferior cerebellar artery): 전하소뇌동맥, ICA(internal carotid artery): 내경동맥].

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 이하, 아래 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 아래 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0072] **실시예 1: 실험 동물 설명**

[0074] 본원의 실시예 및 실험예에서, 하기의 6종의 동물을 사용하였다.

[0075] 1) 한국 야생 마우스(Korean wild mouse, KWM); Mus musculus, 수컷, 8주령, n = 2 (Laboratory Animal Resources Center, Hallym University, Chuncheon-si, Gangwon-do, Korea),

[0076] 2) 마우스(mouse); C57BL/6J, Mus musculus, 수컷, 9주령, n = 2 (DBL Co., Eumseong-gun, Chungcheongbuk-do, Korea),

[0077] 3) 래트(rat); F344, Rattus norvegicus domesticus, 수컷, 9 주령, n = 2 (SLC, Hamamatsu, Shizuoka Prefecture, Japan)

[0078] 4) 저빌(gerbil); 몽골리안(Mongolian), Meriones unguiculatus, 수컷, 10-12 주령, n = 2 (Laboratory Animal Resources Center, Hallym University, Chuncheon-si, Gangwon-do, Korea),

[0079] 5) 햄스터(hamsters); 시리아(Syrian), Mesocricetus auratus, 수컷, 10주령, n = 2 (SLC, Hamamatsu, Shizuoka Prefecture, Japan),

[0080] 6) 기니피그(Guinea pigs); Hartley, Cavia porcellus, 수컷, 9주령, n = 2 (SLC, Hamamatsu, Shizuoka Prefecture, Japan).

[0081] 상기 동물들은 표준 조건 및 일관된 환경이 유지되는 시설에 보관되었으며(온도 22 ± 2℃, 상대 습도 55 ± 10%, 12시간 빛, 12시간 어둠 주기), 일반 설치류 펠렛 사료 및 물이 임의로 지급되었다. 상기 동물을 이용한 실험은 한림대학교 동물실험윤리위원회의 지침에 따라 수행하였다(한림 2017-28).

[0083] **실시예 2: 실험 동물의 조직 염색**

[0085] 상기 실시예 1의 동물에 대한 혈관 해부학을 확인하기 위해 알시안 블루(Alcian blue)을 이용하여 하기와 같은 방법으로 조직을 염색하였다. 구체적으로, 먼저 설치류 전용 마취기(RC2-Rodent Circuit Controller, VetEquip, Inc., Pleasanton, CA, USA)를 이용하여 산소가 혼합된 4% 이소프루란으로 동물을 마취시키고, 동물의 흉부 벽을 제거한 후, 노출된 심장을 집게로 고정시키고 26게이지 주사를 좌심실 첨단 부위에 삽입하였다(도 1, 왼쪽 상단). 다음으로, 혈액 제거 및 동물 조직의 내부 고정을 위해, 식염수 및 4% 파라포름알데하이드(PFA)을 좌심실을 통해 5분간 관류시켜 완전한 순환 및 장기의 조직 고정을 유도한 후, 알시안 블루(Alcian Blue 8GX: C56H68Cl4CuN16S4, MW:1.298.86; Sigma, Saint Louis, MI, USA 및 4% PFA 혼합물을 관류 펌프(302S; Watson-Marlow Fluid Technology Group, Falmouth, Cornwall, England)를 통해 동물의 순환계 전반에 걸쳐 순환시켰다. 염색에 사용한 알시안 블루 시약의 농도는 동물 별로 다음과 같다: KWM; 0.2% 알시안 블루 시약 20 ml, C57BL/6J 마우스; 0.2% 알시안 블루 시약 20 ml, F344 래트; 2% 알시안 블루 시약 40 ml, 몽골리안 저빌; 2% 알시안 블루 시약 40 ml, 시리아 햄스터; 2% 알시안 블루 시약 40 ml, 및 Hartley 기니피그; 2% 알시안 블루 시약 80 ml. 알시안 블루 투여 후, 고도로 혈관이 형성된 장기(간, 신장 등)의 동맥계는 밝은 푸른 색조로 구별할 수 있다 (도 1, 왼쪽 상단).

[0087] **실시예 3: 실험 동물의 측두골 해부**

[0089] 동물의 측두골을 해부하기 위해 하기와 같은 방법을 수행하였다. 구체적으로, 먼저 코 끝 부분에서 어깨 부분까지 피부를 제거한 후, 곡선 멧젠바움(metzenbaum)을 사용하여 시옷 봉합(Lambdoid suture)선을 골절시키고, 두정골 및 전두골을 제거하였다. 두개저로부터 뇌가 제거된 후에 측두골이 확인되었다. 다음으로, 몸에서 머리를 분리시킨 후, 상악으로부터 하악을 분리시켰으며, 측두골을 채취한 후 (도 1, 중간 상단), 측두골의 내면 (도 1, 오른쪽 상단)을 실체현미경 (Nikon stereoscope, SMZ 745T, and Nikon eXcope T300)으로 관찰하였다. 다음으로, 고막의 형태와 측두골의 내부 구조를 확인하기 위해, 유돌 피질골(mastoid cortical bone)을 제거하였다.

[0091] **실시예 4: 실험 동물의 조직 투명화**

[0093] 동물의 조직 투명화를 위해 하기와 같은 방법을 수행하였다. 먼저, 각각의 동물로부터 2개의 측두골을 해부하고, 실온에서 4% PFA로 하룻밤동안 인큐베이션시켰다. 고정 후에, 5시간동안 탈석회화(decalcification) 용액-lite (Cat. N. D0818; Sigma)을 이용하여 뼈로 구성된 물질을 제거하였다. SunHyun 3D Imaging Kit (Cat. N. SH3DI-01; NeoScience Co., Suwon-si, Gyeonggi-do, Korea)의 프로토콜에 따라 측두골의 투명 이미지를 얻었다. 측두골의 달팽이관 및 전정기관의 내부 형태를 실체현미경을 이용하여 관찰하였다 (도 1, 중간 하단).

[0095] **실험예 1: 실험 동물의 중이강 관찰**

[0097] 실험 동물의 조직 투명화를 수행하기 전에, 각각의 생체 염색된 중이를 관찰하였다. 그 결과, KWM, 마우스, 햄스터 및 저빌에서는 페르시안 칼과 같은 추골병(malleus handle)이 관찰되었다(도 2a 내지 e). 또한, 저빌 및 햄스터에서는 고막의 중심 부분(돌기)에서 작은 섬유증 조밀 조직이 관찰되었으며(도 2c 및 e), 이와 같은 섬유증 조직은 다른 종에서는 관찰되지 않았다. 상기 결과는 클릭-소리 압력 자극 및 돌기 속도 반응의 밀접한 관계를 설명할 수 있다.

[0098] 기니피그의 경우, 추골 머리 및 침골 체부 가까이에 위치하고 있는 고실위오목(attic) 지역의 측면 부분을 일컫는 고막의 이완부(pars flaccida) (도 2f, 2g)는 크기면에서 중요성이 적다고 알려져 있었으나, 고막 내부를 관찰한 결과, 얇은 부분이 가장자리 부분 전체에 위치하고 있었으며, 상기 부분이 기니피그의 이완부로 판단된다 (도 2h,i)

[0099] 또한, 다른 종들과는 달리, 기니피그에서는 차가운 기구를 이용하여 유돌의 피질골을 쉽게 제거할 수 있어, 밀폐된 구조에 쉽게 접근이 가능하며, 고실위오목 지역을 관찰할 수 있다(도 3a). 상기 방법을 이용하여, 편평하고 투명한 중이 점막 상태를 조직 절편 없이 직접 연구할 수 있는 바(도 3b), 상기 기술을 중이 병리학의 실험적 모델링에 적용할 수 있다. 또한, 기니피그에서 소골, 등자뼈 발판이 있는 난원창, 내창(도 3c) 및 전체 달팽이관(도 3d)을 확인하였으며, KWM, 마우스, 저빌 및 햄스터의 달팽이관 선회(Cochlea turning)를 관찰하고 서로 비교하였다 (도 3e-h). 그 결과, 달팽기관 기저부 주변에서, 청색으로 염색된 등골 동맥이 확인되었으며 (도 3e-h, 파란색 선), 골성 미로를 통해 달팽기관 상의 짙은색 세포를 관찰하였다.

[0101] **실험예 2: 달팽이관 내의 멜라닌세포 확인**

[0103] 실시예 1의 실험 동물의 조직 염색 및 조직 투명화 후 달팽이관 내의 멜라닌세포를 관찰하였다. 구체적으로, 모든 실험 동물 종의 내부 미궁 공동은 투명화되었고(도 4a-f), 달팽이관의 멜라닌세포는 마우스(도 4b), 저빌(도 4c) 및 햄스터(도 4d)에서 관찰되었다. 다만, KWM의 경우 멜라닌세포는 조직 투명화 과정 전에 관찰되었고(도 3e), 조직 투명화 후에는 사라졌다. 또한, 청색으로 염색된 달팽이관 동맥은 모든 종에서 쉽게 관찰되었다. 모든 실험 동물 종의 달팽이관 멜라닌세포의 분포 및 패턴은 도 4g에 나타냈다.

[0105] **실험예 3: 전정기관 내의 멜라닌세포 확인**

[0107] 실시예 1의 실험 동물의 조직 염색 및 조직 투명화 후 전정기관 내의 멜라닌세포를 관찰하였다. 구체적으로, KWM (도 5a) 및 마우스 (도 5b)에서는 "뫼비우스띠-모양"으로 축척된 멜라닌세포가 관찰되었으며, 난원낭 및 구형낭에서 밀도가 가장 높았다.

[0108] 저빌의 경우, 멜라닌세포의 분포 패턴이 마우스와는 상이했으며, 구체적으로 전정기관 내부 표면에 산재된 멜라닌세포 클러스터가 위치하고 있었다(도 5c). 또한, 햄스터에서는 적은 수의 멜라닌세포가 반고리관 내부 표면에 존재하고 있었으며(도 5d), 래트 및 기니피그의 경우 전정기관 내에서 멜라닌세포가 관찰되지 않았다(도 5e).

[0109] 기존 방법인 전체-마운트 F4/80 라벨링을 통해 관찰한 결과, 혈관주변 대식세포-유사 멜라닌세포는 전정기관, 난원낭, 구형낭, 전방, 후방 및 수평 관의 모든 부분에 분포한다고 알려져 있었으나, 멜라닌 세포의 세포 발현과는 대조적으로, 가시광선 증진 하에서의 직접적인 발현은 멜라닌 세포의 클러스터 및 분포 패턴을 3차원 분석상에서 관찰할 수 있게 하였다. 따라서, 본원의 분석 기술을 이용하여, 멜라닌세포 클러스터는 마우스 종 및 저빌에서 최대이고, 특히 난원낭 및 구형낭에서 최대인 것을 알 수 있다.

[0111] **실험예 4: 달팽이관으로의 부행 순환 확인**

[0113] 기존에는, 전하소뇌동맥(AICA)로부터의 단일 혈관을 통해 고막 및 전정기관에 혈액이 공급된다고 알려져 있었다. 이를 확인하기 위해, 본원의 기술을 이용하여, 전방 순환(경동맥)의 다른 부분에서 측부 혈관을 관찰하였다.

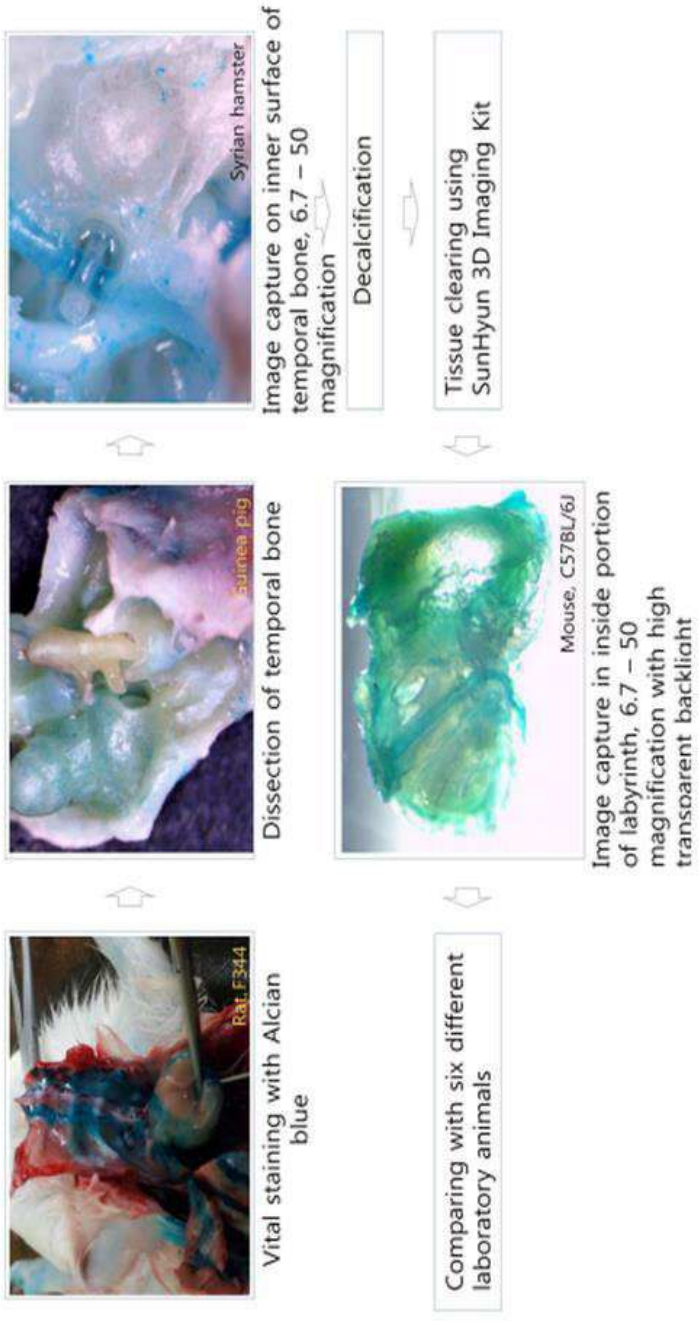
[0114] 그 결과, KWM(도 6a)과 비교해서, 마우스에서의 고막으로의 부행 순환(도 6b, 흰색별표)은 등골 동맥의 두개 내부분(도 6b, 검은별표)에서 유래된 것을 확인하였다. 또한, 마우스 및 래트에서의 부행 순환은 고막 내 공동 영역에서 유래되었으며(도 6c, e), 달팽이관의 정점(도 6c) 및 기저부(도 6e)는 등골 동맥으로부터 혈액공급을 받는 것을 확인하였다. 기니피그에서는, 달팽이관의 곳상의 점막 소동맥(도 6d, 흰색별표)은 골미로(membranous labyrinth)를 관통했다(도 6d, 검은 별표). 실험 동물 종에서의 달팽이관으로의 부행 혈액 공급은 도 6f에 요약

하고 기재하였다.

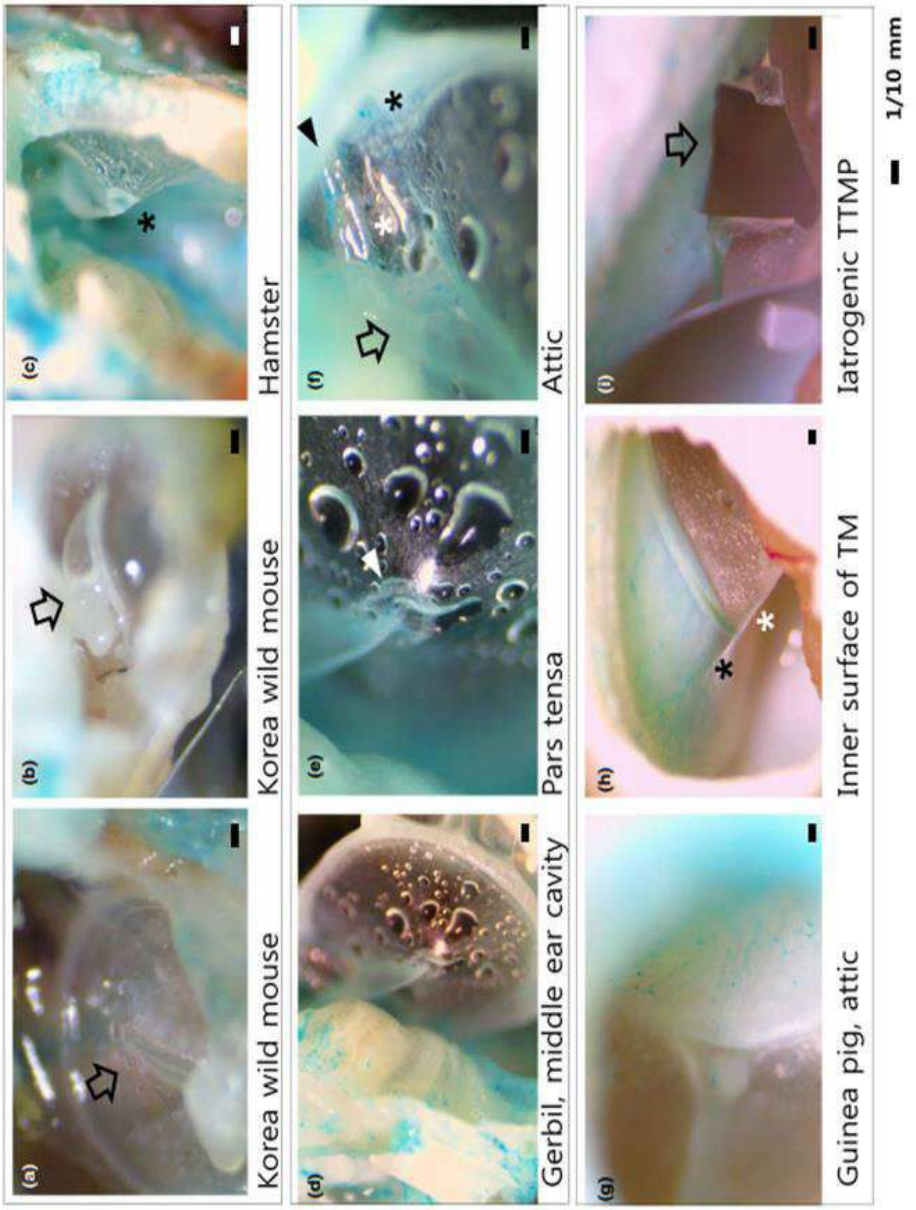
[0116] 이상의 설명으로부터, 본원이 속하는 기술분야의 당업자는 본원이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예 및 실험예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

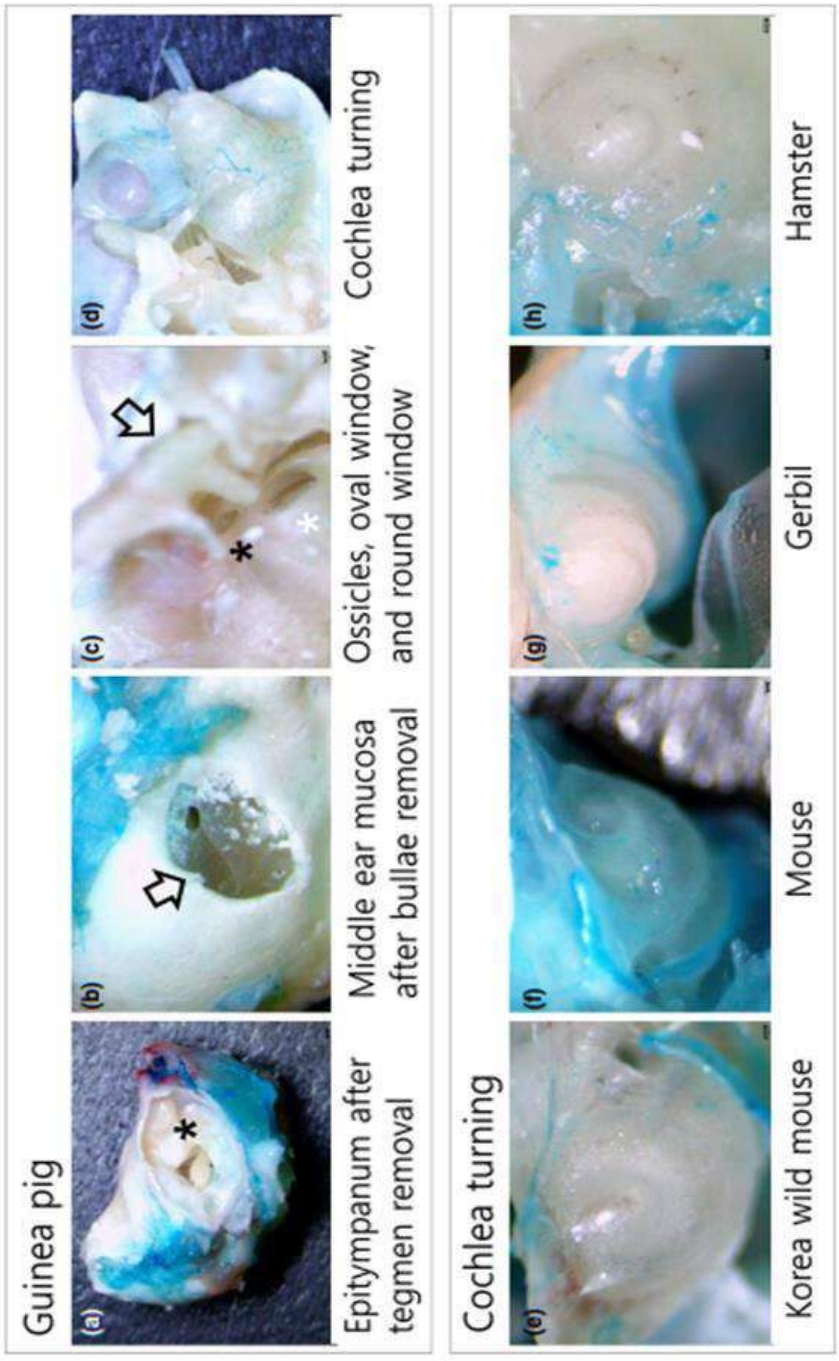
도면1



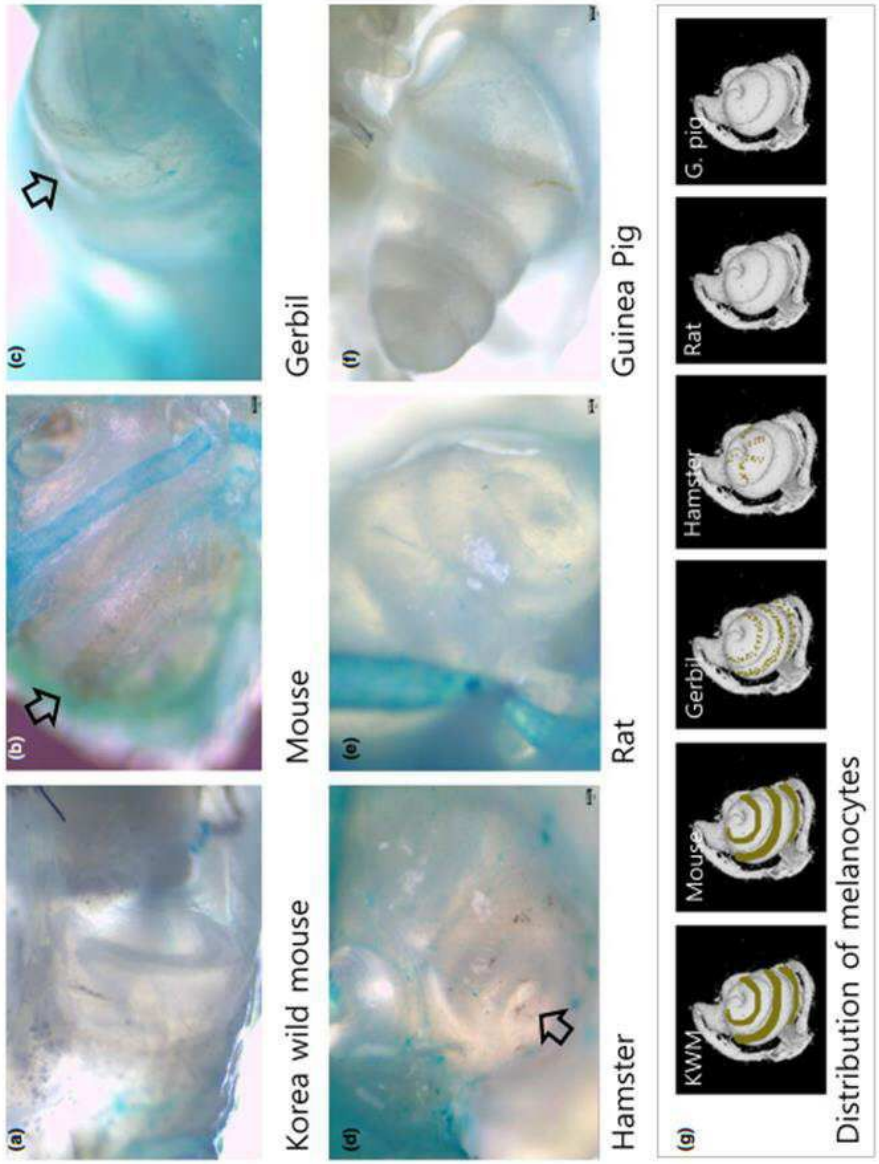
도면2


(a)
(b)
(c)
Korea wild mouse
Korea wild mouse
Hamster
(d)
(e)
(f)
Gerbil, middle ear cavity
Pars tensa
Attic
(g)
(h)
(i)
Guinea pig, attic
Inner surface of TM
Iatrogenic TTMP
1/10 mm

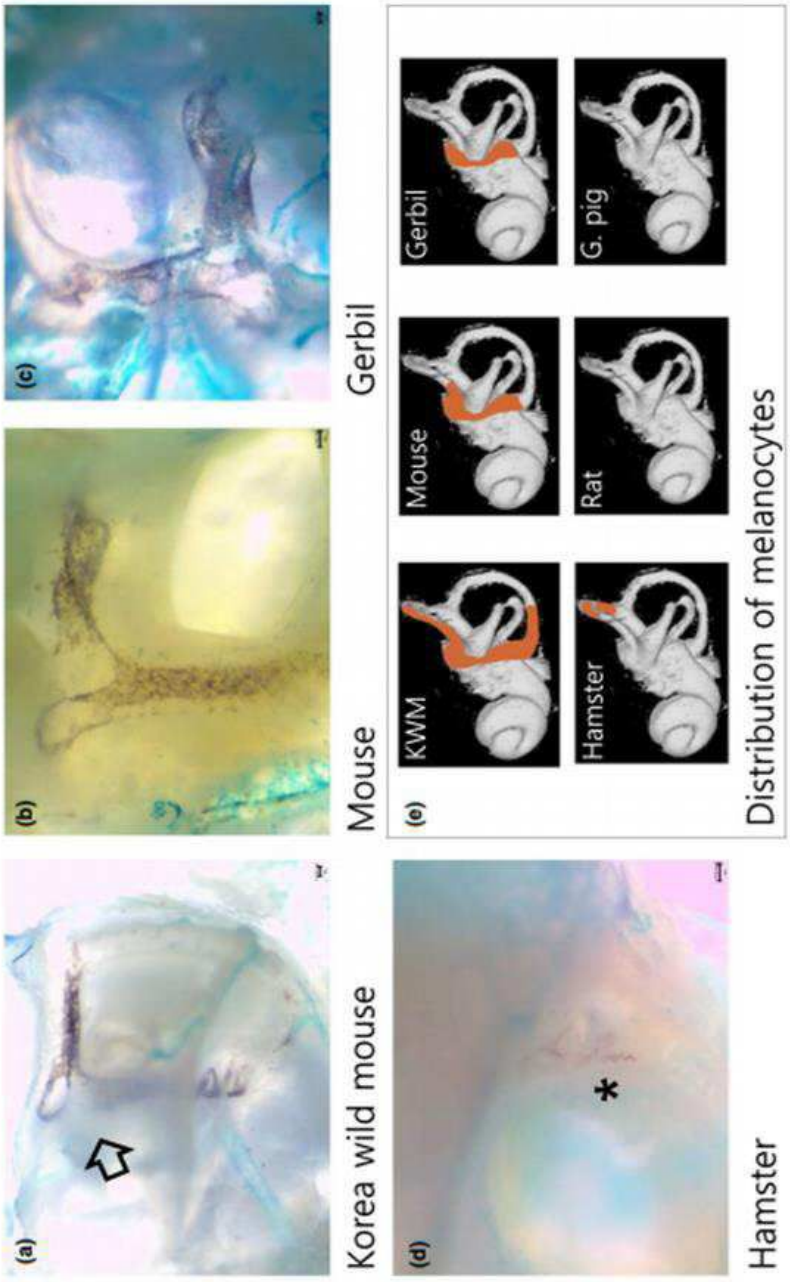
도면3


Guinea pig
(a)
(b)
(c)
(d)
Epitympanum after tegmen removal
Middle ear mucosa after bullae removal
Ossicles, oval window, and round window
Cochlea turning
Cochlea turning
(e)
(f)
(g)
(h)
Korea wild mouse
Mouse
Gerbil
Hamster

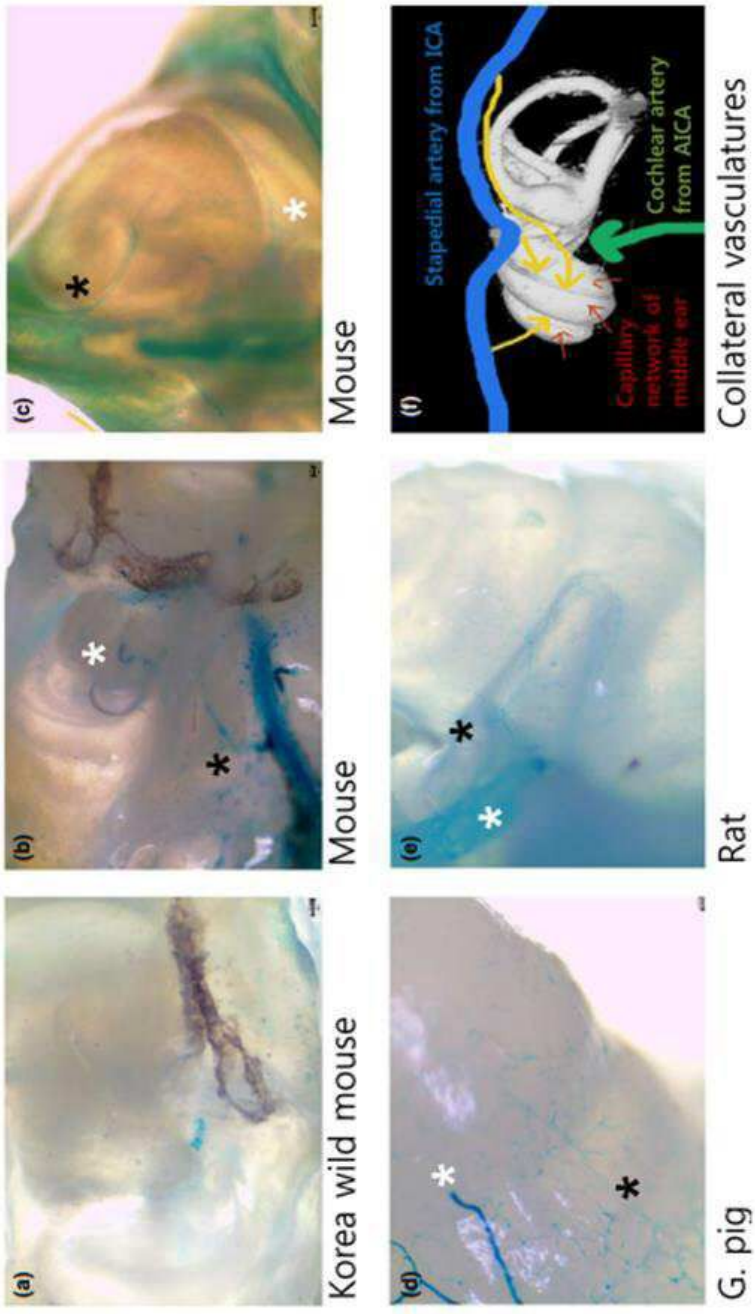
도면4


(a)
(b)
(c)
Korea wild mouse
Mouse
Gerbil
(d)
(e)
(f)
Hamster
Rat
Guinea Pig
(g)
KWM
Mouse
Gerbil
Hamster
Rat
G. pig
Distribution of melanocytes

도면5


(a)
Korea wild mouse
(b)
Mouse
(c)
Gerbil
(d)
Hamster
(e)
KWM
Mouse
Gerbil
Hamster
Rat
G. pig
Distribution of melanocytes

도면6


(a)
Korea wild mouse
(b)
Mouse
(c)
Mouse
(d)
G. pig
(e)
Rat
(f)
Stapedial artery from ICA
Cochlear artery from AICA
Capillary network of middle ear
Collateral vasculatures