



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0113151
(43) 공개일자 2019년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 21/91 (2006.01) A61B 5/00 (2006.01)

G01N 21/27 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 21/91 (2013.01)

A61B 5/0059 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0035432

(22) 출원일자 2018년03월27일

심사청구일자 2018년03월27일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

이준호

강원도 춘천시 삭주로 77, 한림대학교 춘천성심병원 이비인후과 외래

이재준

강원도 춘천시 삭주로 77, 한림대학교 춘천성심병원 원장실

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김남혁

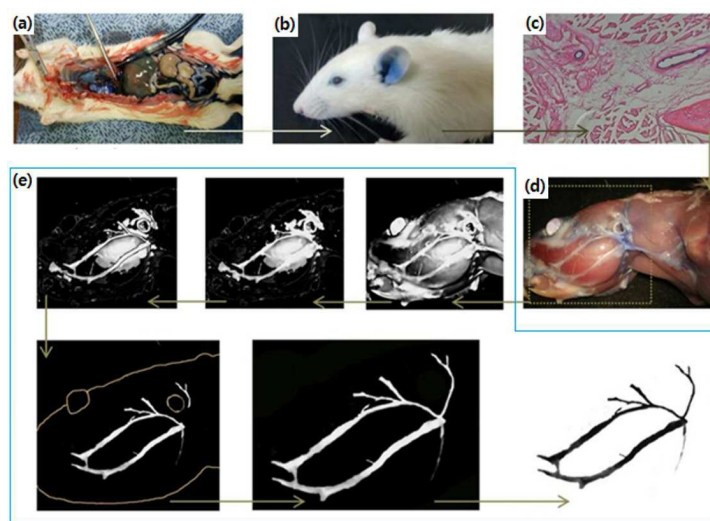
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 동물의 혈관계의 시각화 방법

(57) 요약

본 발명의 동물의 혈관계 시각화 방법은 동물의 혈관 내에 염색제를 포함하는 염색 용액을 주입하는 단계; 및 상기 염색 용액을 순환시켜 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 염색하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 21/27 (2013.01)

(72) 발명자

박혜상

강원도 춘천시 춘천로 120, 현진에버빌3차 301동
606호

서준교

강원도 춘천시 충열로 29 107동 303호(롯데인벤스)

김유연

경기도 안산시 상록구 감골2로 58 선경아파트 103
동 404호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1D1A1B01014128

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원사업

연구과제명 한국연구재단 노인성 난청과 돌발성 난청 발생에 대한 원인규명

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.03 ~ 2024.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3A9E8033206

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 3D 프린터 기술을 이용한 환자 맞춤형 기관절개관 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2017.04.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

동물의 혈관 내에 염색제를 포함하는 염색 용액을 주입하는 단계; 및
상기 염색 용액을 순환시켜 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 염색하는 단계
를 포함하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
상기 염색제는 트리판블루, 알시안블루 및 톨루이딘블루로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는
것을 특징으로 하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
상기 염색 용액은 염색제 및 식염수의 혼합액을 포함하는 것을 특징으로 하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
상기 염색 용액은 염색제를 0.01중량% 내지 0.5중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 동물의 혈관계 시각화 방
법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,
상기 염색 용액은 상기 동물의 우심방을 통하여 주입되고, 상기 동물의 혈관계를 순환한 염색 용액은 상기 동물
의 우심실을 통하여 배출되는 것을 특징으로 하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,
상기 염색 용액을 순환시키는 단계는 상기 동물의 귀 말단, 코 말단, 안구 또는 간이 변색될 때까지 수행되는
것을 특징으로 하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,
상기 염색 용액을 순환시키는 단계는 1분 내지 10분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 동물의 혈관계 시각화
방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,
상기 순환은 체외 순환인 것을 특징으로 하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 동물은 쥐과 동물인 것을 특징으로 하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

상기 쥐과 동물은 마우스, 래트, 모래쥐, 햄스터 및 기니피그로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

청구항 11

동물의 혈관 내에 염색제를 포함하는 염색 용액을 주입하는 단계;

상기 동물의 귀 말단, 코 말단 또는 간이 변색될 때까지 상기 염색 용액을 순환시켜 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 염색하는 단계;

상기 염색된 동물의 혈관 및 주변 조직의 광학 이미지를 획득하는 단계; 및

상기 광학 이미지를 가공하는 단계

를 포함하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

청구항 12

동물의 혈관 내에 염색제를 포함하는 염색 용액을 주입하는 단계;

상기 동물의 귀 말단, 코 말단 또는 간이 변색될 때까지 상기 염색 용액을 순환시켜 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 1차 염색하는 단계; 및

상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 예오신 Y 시약으로 2차 염색하는 단계

를 포함하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

청구항 13

동물의 혈관 내에 염색제를 포함하는 염색 용액을 주입하는 단계;

상기 동물의 귀 말단, 코 말단 또는 간이 변색될 때까지 상기 염색 용액을 순환시켜 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 1차 염색하는 단계;

상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 예오신 Y 시약으로 2차 염색하는 단계;

상기 염색된 동물의 혈관 및 주변 조직의 광학 이미지를 획득하는 단계; 및

상기 광학 이미지를 가공하는 단계

를 포함하는 동물의 혈관계 시각화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 동물 실험에 있어, 동물의 기관, 구체적으로는 혈관계를 염색하여 동물의 기관의 해부학적 구조를 보다 명확하게 구별할 수 있도록 시각화하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 질병에 대한 새로운 치료법 또는 약물 치료의 병리학적 기전 또는 효과를 평가하기 위해서는 대형 포유류를 통한 실험이 최적이나, 이들을 실험적 연구에서 사용하는 것에는 한계가 있다. 상대적으로 짧은 발달 기간과 비교적 저렴한 가격으로 인해, 쥐과(murine) 동물은 생체내(*in vivo*) 모델로 자주 사용된다. 동물 실험에 있어 정확한 해부학적 구조를 이해하는 것은 매우 중요하다. 정확한 해부학적 이해가 수반되어야 정확한 실험 동물 모델링이 가능하며, 질환에 대한 병적 변화를 판단하는 데 있어서도 매우 중요하다.

[0003] 그러나, 쥐과 동물은 상대적으로 작은 크기의 신체 구조를 가지고 있어, 두경부 구조는 특히 작고 복잡한 구조

를 가지고 있어, 혈관 및 신경의 해부학적 구조를 식별하는 데 필요한 어려움이 있으며, 일반적 해부학의 외과 도감을 사용할 수 없는 문제가 있다.

[0004] 이와 관련하여, 이전 연구는 두 가지 주요한 문제로 어려움을 겪어 왔다. 먼저, 기관 염색 후 수행되는 절개는 미세 혈관 시스템에 외상을 일으켜 전체 절개 부위의 염색을 일으켰으며, 이는 주요 혈관을 제거해야 할 때 보다 심각한 문제가 된다. 다음으로, 상기 문제를 해결하기 위해 시도된, 포르말데히드를 이용한 조직 고정은 다양한 기관의 연약한 해부체들이 작동하기 어렵게 만들고, 동맥계, 정맥계 및 신경의 확인을 곤란하게 하며, 정상 해부학적 구조의 조직 고정 이후의 인공 산물 및 왜곡을 유발한다.

[0005] 따라서, 동물 모델을 제작하거나 동물의 구조를 파악하기 위한 해부 시에 수반되는 단점을 보완하기 위한 개선된 염색 방식에 대한 요구가 꾸준히 이어져 왔다. 발명자들은 이러한 문제를 해결하기 위하여, 동물실험에 있어 두부, 경부 분야의 해부학적 구조를 보다 명확하게 구별할 수 있는 염색 방식에 대하여 연구하였으며, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) (1) 일본 공개특허공보 특개2011-53119호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 동물 실험에서 동물 모델을 제작하거나 동물의 해부학적 구조를 파악함에 있어, 동물의 기관, 구체적으로는 혈관계를 염색함으로써 동물의 기관의 해부학적 구조를 보다 명확하게 구별할 수 있도록 동물의 혈관계를 시각화하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은 종래 동물의 조직 고정 시 수반되었던 단점을 보완하는 동물의 혈관계를 시각화하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 동물의 혈관계에 트리판블루(trypan blue) 시약 등의 염색제를 관류시키고, 이로부터 수득한 이미지를 가공함으로써, 작은 크기로 인해 종래의 방법으로는 구별이 어려웠던 쥐과 동물의 혈관계의 해부학적 구조를 명확하게 구별할 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명의 일 양태의 동물의 혈관계 시각화 방법은, 동물의 혈관 내에 염색제를 포함하는 염색 용액을 주입하는 단계; 및 상기 염색 용액을 순환시켜 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 염색하는 단계를 포함한다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염색제는 트리판블루, 알시안블루 및 톨루이딘블루로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염색 용액은 염색제 및 식염수의 혼합액을 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염색 용액은 염색제를 0.01중량% 내지 0.5중량%로 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염색 용액은 상기 동물의 우심방을 통하여 주입되고, 상기 동물의 혈관계를 순환한 염색 용액은 상기 동물의 우심실을 통하여 배출될 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염색 용액을 순환시키는 단계는 상기 동물의 귀 말단, 코 말단, 안구 또는 간지 변색될 때까지 수행될 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염색 용액을 순환시키는 단계는 1분 내지 10분 동안 수행될 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 순환은 체외 순환일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 동물은 쥐과 동물일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 쥐과 동물은 마우스(mouse), 래트(rat), 모래쥐(mongolian gerbils), 햄스터(hamster) 및 기니피그(guinea pig)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 일 양태의 동물의 혈관계 시각화 방법은, 동물의 혈관 내에 염색제를 포함하는 염색 용액을 주입하는 단계; 상기 동물의 귀 말단, 코 말단 또는 간이 변색될 때까지 상기 염색 용액을 순환시켜 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 염색하는 단계; 상기 염색된 동물의 혈관 및 주변 조직의 광학 이미지를 획득하는 단계; 및 상기 광학 이미지를 가공하는 단계를 포함한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 일 양태의 동물의 혈관계 시각화 방법은, 동물의 혈관 내에 염색제를 포함하는 염색 용액을 주입하는 단계; 상기 동물의 귀 말단, 코 말단 또는 간이 변색될 때까지 상기 염색 용액을 순환시켜 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 1차 염색하는 단계; 및 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 예오신 Y 시약으로 2차 염색하는 단계를 포함한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 일 양태의 동물의 혈관계 시각화 방법은, 동물의 혈관 내에 염색제를 포함하는 염색 용액을 주입하는 단계; 상기 동물의 귀 말단, 코 말단 또는 간이 변색될 때까지 상기 염색 용액을 순환시켜 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 1차 염색하는 단계; 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 예오신 Y 시약으로 2차 염색하는 단계; 상기 염색된 동물의 혈관 및 주변 조직의 광학 이미지를 획득하는 단계; 및 상기 광학 이미지를 가공하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 동물의 혈관계 시각화 방법에 따르면, 동물 실험에서 동물 모델을 제작하거나 동물의 해부학적 구조를 파악함에 있어, 동물의 혈관계의 해부학적 구조를 보다 명확하게 구별할 수 있다. 특히, 작은 크기로 인해 종래의 방법으로는 구별이 어려웠던, 쥐과 동물의 혈관계, 특히 두경부의 혈관계의 해부학적 구조를 명확하게 구별할 수 있다.

[0023] 본 발명은 포름알데히드 등을 사용해 조직을 고정하는 방법을 생략하여, 염색 후에도 본래 조직 및 기관의 특성을 유지시킬 수 있다.

[0024] 본 발명은 인간의 질병에 대한 이해 및 치료의 개선을 위한 연구에 적합한 동물 모델을 선택하는 데 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에 따른 동물의 혈관계 시각화 방법의 개략적인 과정을 나타낸다.

도 2 내지 도 6은 본 발명에 따라 동물의 혈관계가 염색된 각각 마우스, 래트, 모래쥐, 햄스터 및 기니피그의 해부학적 구조를 나타낸다.

도 7 내지 도 9는 본 발명에 따라 확인된 마우스, 래트, 모래쥐, 햄스터 및 기니피그의 안면신경, 침샘 및 경동맥의 구조의 차이점을 분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 첨부 도면을 참조하여 본 발명에 따른 실시 양태에 대하여 상세하게 설명한다. 이하 설명은 본 발명에 실시 양태들을 용이하게 이해하기 위한 것일 뿐이며, 보호범위를 제한하기 위한 것은 아니다.

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 동물의 혈관계 시각화 방법의 개략적인 과정을 나타낸다.

[0028] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 동물의 혈관계 시각화 방법은 (a) 동물의 혈관 내에 염색제를 포함하는 염색 용액을 주입하는 단계를 포함한다.

[0029] 본 명세서에서 “동물”은 관찰의 대상이 되는 객체로서, 혈관계를 가진 동물이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 인간 질병에 대한 연구를 위해, 상기 동물은 포유류, 예를 들어, 쥐, 토끼, 돼지, 원숭이, 개, 염소, 양, 말과 동물일 수 있으며, 실험 상의 편의를 위해 크기가 작은 쥐과 동물일 수 있다. 쥐과 동물은 마우스, 래트, 모래쥐(mongolian gerbils), 햄스터, 기니피그, 모르모트, 친칠라, 레밍 및 프레리독으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 동물 실험에 일반적으로 사용되는 마우스, 래트, 모래쥐, 햄스터 또는 기니피그인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 명세서에서 동물은 마취된 상태로 준비될 수 있다. 마취는 당분야에 공지된 방법 및 용법 하에, 동물의 상태에 따라 적절하게 수행될 수 있다.

- [0031] 본 명세서에서 ““혈관”” 또는 ““혈관계””는 동물의 혈액을 심장으로부터 동물체의 각 기관 및 조직 사이를 순환시킬 수 있는 통로를 지칭하며, 대동맥, 대정맥, 폐동맥, 폐정맥 및 모세혈관을 포함한다. 예를 들어, 혈관은 체외 순환이 일어나는 대동맥, 대정맥 및 모세혈관일 수 있다.
- [0032] 체구가 작은 쥐과 동물의 혈관계는 그 크기에 의해 육안으로 그 구조를 관찰하기 곤란하며, 특히 복잡한 구조를 가지는 쥐과 동물의 두부, 경부의 혈관계 구조는 일정 부위의 조직이 주변조직과 구별하기가 매우 힘들며, 동물 실험 시 관리하기가 매우 힘들다.
- [0033] 본 명세서에서 ““염색제””는 혈관 조직 및 그 주변 조직을 이루는 세포를 염색하는 물질로서, 당업계에 생체 염색제로 공지된 물질, 예를 들어, 트리판블루, 알시안블루, 톨루이딘블루, 사프라닌, 뉴트랄레드, 니그로신, 패스트그린 등을 포함할 수 있으며, 트리판블루, 알시안블루 및 톨루이딘블루로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 염색제들은 전하를 갖는 분자로서, 확산에 의해 세포 내로 이동하여 세포의 다당류, 단백질에 가역적인 정전기 결합을 함으로써 세포를 염색할 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서, ““염색 용액””은 염색제와 식염수를 혼합한 혼합액을 지칭하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 염색 용액은 고정액, 예를 들어, 포르말데히드 용액을 포함하지 않으므로, 염색된 조직의 변형을 일으키지 않는다. 따라서, 혈관의 염색에 불구하고, 실제 실험 동물 제작의 수행 시와 동일 또는 극히 유사한 촉감을 유지할 수 있다.
- [0036] 염색 용액은 염색제를 0.01중량% 내지 0.5중량%로 포함할 수 있다. 염색 용액 중의 염색제의 농도가 0.01중량% 미만인 경우, 염색된 조직의 색깔이 열어 원하는 시각적 이미지를 얻을 수 없으며, 염색제의 농도가 0.5중량% 이상인 경우, 주변 조직에까지 염색제가 침투하여 염색 대상 조직과 주변 조직과의 경계가 불분명해질 수 있다. 염색 용액 중의 염색제의 농도는 동물체의 크기에 따라 조절할 수 있으며, 예를 들어, 동물이 마우스인 경우, 염색 용액 중 염색제의 농도는 0.01중량% 내지 0.1중량%, 예컨대 0.05중량%일 수 있으며, 동물이 래트, 모래쥐, 햄스터, 기니피그인 경우에는, 0.05중량% 내지 0.3중량%, 예컨대 0.1중량%일 수 있다.
- [0037] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 동물의 혈관계 시각화 방법은 (b) 동물의 귀 말단, 코 말단 또는 간이 변색될 때까지 상기 염색 용액을 순환시켜 상기 동물의 혈관 및 주변 조직을 염색하는 단계를 포함한다.
- [0038] 본 명세서에서 “순환”은 체외 순환 및 체내 순환을 포함할 수 있으나, 효과적인 염색의 수행을 위하여는 체외 순환이 바람직하다.
- [0039] 염색 용액의 체외 순환을 위하여, 염색 용액은 동물의 우심방을 통하여 주입되고, 동물의 혈관계를 순환한 염색 용액은 동물의 우심실을 통하여 배출될 수 있다.
- [0040] 구체적으로, 염색 용액의 체외 순환을 위하여, 마취된 상태로 준비된 동물의 복부를 개방하여 고정하고, 동물의 우심방 및 우심실에 각각 관의 일 말단을 연결한다. 각 관의 타 말단을 체외 순환 기기에 각각 연결하여, 체외 순환 기기의 모터의 힘으로 염색 용액을 동물의 혈관계로 순환을 시킬 수 있다. 또는, 동물의 우심방에 연결된 관을 통해서 염색 용액을 공급하고, 동물의 우심실에 연결된 관을 통해서 단순히 동물의 혈관계의 순환을 마친 액체를 배출하도록 하되, 이러한 염색 용액의 순환은 동물의 자가 심장 박동에 의해 수행되도록 하는 것도 가능하다.
- [0041] 동일한 방법으로, 염색 용액을 동물의 좌심방을 통하여 주입하고, 동물의 혈관계를 순환한 염색 용액이 동물의 좌심실을 통하여 배출될 수 있도록 수행하는 것 또한 가능하다.
- [0042] 이러한 방법을 통하여 동물의 혈관 내에 존재하고 있던 혈액이 함께 배출될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 동물의 시각화 방법이 종료되는 때에, 동물체의 모든 혈액이 빠진 상태로 유지되므로, 종래의 방법으로 해부를 수행할 시에 발생하였던, 출혈에 의한 주변 조직의 착색을 방지할 수 있다. 이를 통하여, 관찰 대상인 혈관 구조를 주변 조직과 정확히 구별하여 확인할 수 있으므로, 동물 모델 중 혈관의 주행 및 병변에 대한 연구를 보다 용이하게 수행할 수 있도록 한다.
- [0043] 동물의 혈관 및 주변 조직을 염색하는 단계는 염색 용액에 의한 동물의 귀 말단, 코 말단, 안구 또는 간에 변색될 때까지 수행될 수 있다. 귀 말단, 코 말단, 안구는 동물체의 말단인 동시에 혈관의 비침을 쉽게 확인할 수 있는 부위로서, 이의 변색을 확인함으로써 동물체 전체의 혈관이 충분히 염색되었음을 유추할 수 있다.
- [0044] 염색 용액을 순환시킴으로써 동물의 혈관 및 주변 조직을 염색하는 단계는 1분 내지 10분 동안, 예컨대 5분 동

안 수행될 수 있다. 염색하는 단계가 1분 미만인 경우 염색제가 세포, 특히 살아있는 세포를 염색하기에 충분하지 않아 주변 조직과의 구별이 곤란하며, 10분을 초과하는 경우, 염색 대상이 혈관 뿐만 아니라 주변 조직까지 염색시켜 혈관과 주변 조직과의 구별을 어렵게 할 수 있다.

[0045] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 동물의 혈관계 시각화 방법은 (c) 동물의 혈관 및 주변 조직을 에오신 Y(Eosin Y) 시약으로 2차 염색하는 단계를 포함한다.

[0046] 본 명세서에서 에오신 Y 시약으로 2차 염색하는 단계는 염색제를 포함하는 염색 용액에 의한 염색과 동일하게, 체외 순환 방법으로 수행되거나, 또는 상기 염색 용액에 의해 염색된 혈관 및 주변 조직을 절단 후 에오신 Y 시약에 침지시킴으로써 수행될 수 있다. 에오신 Y 시약으로 추가적인 2차 염색을 수행함으로써, 혈관 뿐만 아니라 그 주변 구조를 보다 명확하게 확인할 수 있다.

[0047] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 동물의 혈관계 시각화 방법은 (d) 염색된 동물의 혈관 및 주변 조직의 광학 이미지를 획득하는 단계를 포함한다.

[0048] 본 명세서에서 “광학 이미지”는 당해 분야에서 명시야 관찰 시에 이용되는 카메라, 예를 들어, CCD 카메라 등에 의해 촬영된 사진 또는 동영상일 수 있다.

[0049] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 동물의 혈관계 시각화 방법은 (e) 상기 광학 이미지를 가공하는 단계를 포함한다.

[0050] 본 명세서에서 “광학 이미지를 가공” 하는 것은 당업자에 의해 일반적으로 사용되는 이미지 분석 프로그램을 프로토콜에 따라 사용함으로써 획득된 광학 이미지를 분석에 용이하도록 수정하는 것을 의미한다. 상기 수정은 광학 이미지 중의 일부 구성 추출 또는 삭제, 및 색상 및 명암의 변경 또는 반전을 포함할 수 있다. 이미지 분석 프로그램은, 예를 들어, 이미지 제이(Image J, <https://imagej.nih.gov>, 미국)를 사용할 수 있으나, 동일한 목적을 달성할 수 있는 것이라면, 이에 한정되지 않는다.

[0052] 이하 하나 이상의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다.

[0053] 실시예

[0054] 실시예 1. 실험 대상

[0055] 본 실시예의 수행을 위하여, 마우스(C57BL/6J, 10주령, 24.7~27.5g, n=3, DBL Co., 한국), 래트(F344, 11주령, 225.5~255.5g, n=3, Japan SLC, Inc., 일본), 모래귀(mongolian gerbils, Merionesunguiculatus, 10~11주령, 58.7~70.7g, n=3, 한림대학교 실험동물자원센터, 한국), 햄스터(Syrian, 8주령, 113.1~121.3g, n=3, Japan SLC, Inc., 일본) 및 기니피그(Hartley, 8주령, 422.1~426.7g, n=3, Japan SLC, Inc., 일본)를 포함하는 5종의 상이한 종류의 수컷 성체를 사용하였다.

[0056] 동물들은 표준 및 일정한 환경을 유지하는 시설에서 보관되었다(구체적으로, 온도: $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대 습도: $55 \pm 10\%$, 생체주기: 낮 12시간 및 밤 12시간). 정상적인 설치류 펠렛 사료(Cargill Agri Purina, 한국)와 물을 자율급식 하였다.

[0057] 실시예 2. 조직의 염색

[0058] 각 동물의 혈관을 염색하기 위하여, 트리판블루 시약(trypan blue, Cat. N. T6146, Sigma, 미국)을 사용하여 관류시켰다.

[0059] 구체적으로, 동물들을 3% 아이소플루란(isoflurane) 혼합 산소(RC2+ Anesthesia System, Lab Etc. inc. 미국)로 마취시킨 후, 식염수 및 트리판 블루 시약(마우스: 0.05중량%, 및 래트, 모래귀, 햄스터, 기니피그: 0.1중량%)을 관류 펌프 시스템을 통해 5분간 동물의 체내를 순환시켰다(도 1의 (a) 참조).

[0060] 동물의 귀 말단, 코 말단, 안구 및/또는 간에서 청색 염색이 관찰되면, 관류 과정을 종료하였다(도 1의 (b) 참조). 이후, 최소한의 고통으로 시술 끝에 동물들을 희생시켰다.

[0061] 고정 용액(4% 파라포름알데히드)을 사용하지 않았기 때문에, 조직은 보존되지 않고, 신선하였다. 그 결과, 혈관계를 진청색의 동맥계와 연청색의 정맥계로 구별할 수 있었다.

[0062] 실시예 3. 동물체의 두경부의 해부 및 관찰

[0063] 상기 실시예 2에서 염색을 마친 동물체에서, 코 끝에서 어깨 수준까지 피부를 제거한 후, 시편의 전체 윤곽을 검사하였다. 목 하부(inferior neck)의 지방 조직에서 턱 밑과 혀 밑의 땀샘을 제외한 나머지를 제거하였다.

[0064] 이 때, 안면 동맥(facial artery, FA) 및 경정맥(jugular vein, JV)을 확인하였고, 침샘 및 경정맥계를 제거하였다. 노출된 흉쇄유돌근(sternocleidomastoid muscle)을 제거하고, 하갑상선근(infra-thyroid muscle) 기저 경동맥(subjacent carotid artery)을 확인하였다. 하갑상선근 옆에서, 총경동맥(common carotid artery, CCA) 및 미주신경(vagus nerve, VN)을 확인하였다. 마지막으로, 전흉벽을 제거하여 쇄골하 혈관에서 발생한 척추동맥(vertebral artery, VA) 및 대동맥을 확인하였다.

[0065] **실시예 4. 횡단면 이미지의 확인**

[0066] 미래의 연구자를 위한 해부학 구조의 이해를 높이기 위해, 모든 종의 횡단면 형태를 획득하였다. 트리판블루 시약을 이용한 관류를 통해 달성된 혈관 염색 이외에, 주변 구조를 보다 잘 이해하기 위해 예오신 Y 시약(cat.N.E4009, Sigma, 미국)을 사용하여 염색을 수행하였다(도 1의 (c) 참조).

[0067] **실시예 5. 이미지 촬영**

[0068] 각 동물에서의 해부학적 구조의 이미지 촬영을 위하여, 모든 종에서 표준화된 접근법을 사용하였다. 5종의 동물의 두부 및 경부의 해부학적 구조를 비교하기 위하여, 정면, 측면, 경사면 등을 포함한 동일 시선에서 촬영한 이미지를 획득하였다. 또한, 경정맥(JV), 총경동맥(CCA), 내경동맥(internal carotid artery, ICA), 외경동맥(external carotid artery, ECA) 및 척추동맥(VA)의 기원의 정확한 위치 및 해부학적 구조를 문서화하였다. 보다 섬세한 구조를 검사하기 위해, 안과용 기구(8500 Castroviejo Caliper, Fisher, 미국)를 절제에 사용하였다. 가장 선명한 이미지를 획득하기 위해, 현미경의 대물 렌즈와 시편을 평행하게 배치 한 후(3차원적으로 관찰하고 구조의 정확한 길이 및 면적을 확인하기 위함) 캐논(Cannon) EOS 1100D 및 자이스(ZEISS) OPMI 1FC를 사용하여 이미지를 기록하였다(도 1의 (d) 참조). 그 후, 이미지 제이(Image J, <https://imagej.nih.gov>, 미국)를 사용하여 분석하였다(도 1의 (e) 참조).

[0069] 분석 결과, 하기 표 1에서와 같이, 마우스(도 2), 래트(도 3), 모래쥐(도 4), 햄스터(도 5) 및 기니피그(도 6) 각각에서의 하기 부위의 혈관의 해부학적 구조를 확인하였다.

표 1

[0070]

	마우스	래트	모래쥐	햄스터	기니피그
A	정면도	정면도 / 턱밑샘	정면도	정면도	정면도
B	귀밑샘	귀밑샘	귀밑샘	측면도	사시도
C	측면도	귀밑샘의 심엽 (부재)	침샘 제거 후 측면도	하비 동맥	하비 동맥
D	안면 신경으로의 공급 동맥	안면 신경으로의 공급 동맥	안면 신경으로의 공급 동맥	안면 신경으로의 공급 동맥	안면 신경으로의 공급 동맥
E	경정맥	경정맥	침샘	턱밑샘 및 혀밑샘	정면도 / 침샘
F	내 경부의 근육 조직	총 경동맥	내 경부의 근육 조직	내 경부의 근육 조직	경동맥계
G	총 경동맥	갑상선	총 경동맥	총 경동맥	갑상선 동맥
H	기관(trachea) 제거 후의 총 경동맥	대동맥 및 총 경동맥	설동맥	설동맥 및 설신경	갑상선 동맥 및 총 경동맥 분기점
I	안면 정맥	안면 정맥	사시도	사시도	외 경정맥
J	경동맥 분기	경정맥	경정맥	경정맥 분기	내 경정맥
K	심부 경동맥	총 경동맥	갑상선	갑상선 동맥	갑상선
L	뇌에 혈관계를 공급하는 전·후부	외 경동맥 및 내 경동맥	척추 동맥의 초기 부분	척추 동맥의 초기 부분	척추 동맥의 초기 부분

[0072] **실시예 6. 통계 방법**

[0073] 각 종에 대하여, 크루스칼-왈리스 검정(Kruskal-Wallis Test)을 사용하여 총 경부의 크기에 대한 기관의 크기의 비율을 계산하였다(하기 표 2 참조). 만-휘트니 검정(Mann-Whitney test)을 사후 검사에도 적용하였다. 통계 분석을 SPSS 버전 21(SPSS IBM, 미국)을 사용하여 수행하였다. 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

표 2

평균 (표준편차)	마우스	랫	모래쥐	햄스터	기니피그
나이 (주령)	10	11	10~11	8~9	8
중량 (mg)	24.7~27.5	225.5~255.5	58.7~70.7	113.1~121.3	422.1~426.7
한계 하악 가지 폭 (cm)	0.047±0.047	0.033±0.033	0.043±0.043	0.043±0.043	0.041±0.0410
불가지 폭 (cm)	0.025±0.025	0.036±0.036	0.041±0.041	0.045±0.045	0.148±0.148
불 / 한계 하악의 비	0.556±0.556	1.138±0.138	0.964±0.964	1.064±0.064	3.373±0.373
(하부 하악 및 혀 면적) / 내 경부(%)	53.53±8.66	38.53±5.56	34.33±3.20	64.90±13.16	21.87±2.06
귀밑샘 면적 / 측 경부(%)	23.77±2.72	26.5±6.76	23.63±3.41	13.18±2.99	6.97±3.07
총 경동맥 (우 기원각)	54.23±32.05	70.65±15.05	40.31±13.80	88.77±17.77	67.38±21.32
총 경동맥 (좌 기원각)	110.63±4.78	129.57±23.14	86.66±22.82	117.89±1.57	141.20±19.23
경동맥의 각도 (° 내외)	39.96±8.71	28.99±6.27	53.99±4.82	34.22±3.51	28.30±2.96

[0076] 6.1. 경부 구조의 상대적 크기 비교

[0077] 5종의 동물에서 조직의 상대적 크기를 비교하기 위하여, ALTools(<http://www.altools.co.kr>)를 이용하여, 경부 구조(안면 신경, 혈관, 땀샘)의 평균값을 계산하였다(상기 표 2).

[0078] 6.2. 기관(organ) 상대적 크기 비교

[0079] 불(buccal) 및 한계 하악(marginal mandibular branch)의 폭을 계산하고, 폭 비율(불 / 한계 하악)을 계산하여 서로 비교하였다.

[0080] 각 종에는 신경 가지의 특이적인 패턴이 있음을 확인하였다(도 7의 A 내지 E 참조). 마우스에서는 한계 하악 가지가 보다 두꺼웠고, 불 가지는 다른 종에 비해 보다 얇았다(도 7의 B 참조).

[0081] 5종의 동물의 신경 폭의 평균값을 비교하였다(도 7의 F 참조). 기니피그의 불 가지는 다른 종에 비해 상대적으로 두꺼웠다($p = 0.021$). 대조적으로, 종 간의 한계 하악 가지 상의 유의한 차이는 없었다($p = 0.463$).

[0082] 또한, 불 폭 / 한계 하악 폭의 비율을 계산하고 비교하였다(도 7의 G 참조). 평균에 대한 최대 차이는 마우스의 한계 하악 가지 및 기니피그의 불 가지에서 나타났다($p = 0.015$). 마우스에는 안면 신경의 경부 가지가 없었다(도 7의 H 참조).

[0083] 이러한 차이는 각 종의 식이 습관과 각 종에 의해 설명된 알치(bruxism)의 상대적인 정도에 따른 것으로 생각되었다.

[0084] 6.3. 침샘의 구조 비교

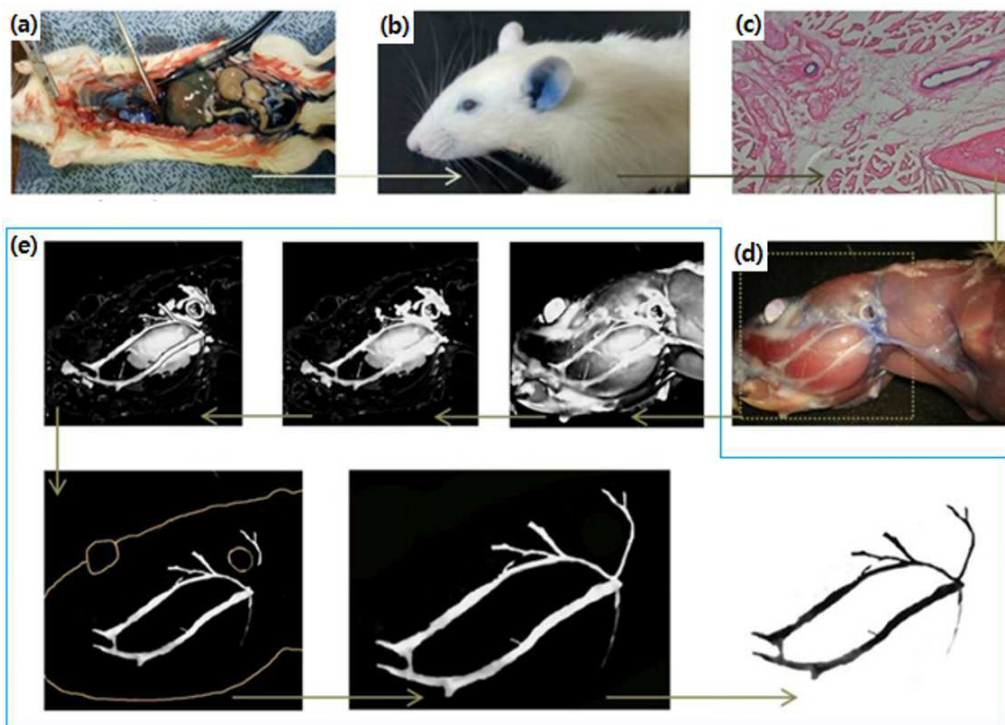
[0085] 기존의 평가 방법(기관 대 체중의 비율) 대신, 침샘의 크기 대 경부 면적의 비율을 비교하였다.

[0086] 정확성을 향상시키기 위해, 먼저 조직의 음성 이미지를 제작하였다(도 8의 A 내지 J 참조, 황색선은 면적 계산 선임). 면적의 상대비의 분석에서, 햄스터와 기니피그의 귀밑샘은 다른 종에 비해 상대적으로 작았다(기니피그가 가장 작았음)($p = 0.008$)(도 8의 K 참조). 대조적으로, 햄스터의 하부 하악 및 혀밑샘은 다른 종에 비해 유의적으로 컸다($p = 0.012$)(도 8의 L 참조). 햄스터는 가장 큰 불 주머니를 가지고 있었다.

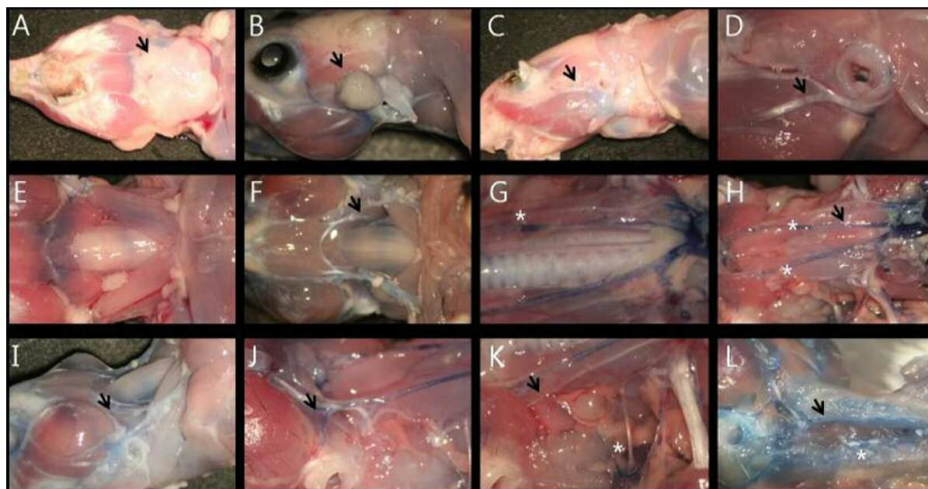
- [0087] 본 분석에 의하면, 구강 점막의 면적은 하부 하악 및 혀밑샘의 면적과 상관 관계가 있는 것으로 나타났으나, 귀밑샘은 그렇지 않았다. 대부분의 타액은 귀밑샘에 의해 생성되므로, 타액 생성과 구강 점막 크기 간에는 직접적인 상관 관계가 없는 것으로 생각되었다.
- [0088] **6.4. 경동맥 구조의 비교**
- [0089] 죽상 동맥 경화증과 허혈증의 연구에 가장 적합한 동물 모델을 결정하기 위해, 혈관의 기원으로부터 상이한 혈관의 각도를 측정하였다.
- [0090] 이를 위해, 본 실시예에서는 광학 이미지에서 경부 혈관 이미지를 추출하고, 분기 각도를 계산하여 서로 비교했다(도 9의 A 내지 E, H 및 L 참조). 동물 각 종에 대한 공급 및 가지 동맥 사이의 각도를 측정하였다(도 9의 F 참조).
- [0091] 대동맥으로부터의 총경동맥의 기원은 큰 표준편차의 결과로서 유의하게 다르지 않았으나($p = 0.192$)(도 9의 G 참조), 햄스터는 경부의 양쪽 각각에 대하여 거의 직각을 보였다(도 9의 G 참조).
- [0092] 분석 결과, 상기 해부학적 발견을 바탕으로, 특히 대측 대조군이 필요한 경우, 일방성 죽상 경화증 또는 허혈증에 대한 연구를 위한 동물 모델로서 햄스터가 최적일 것으로 생각되었다.
- [0093] 5종의 동물에서, 공통적인 경동맥 분기와의 관련성을 확인하였다(도 9의 H 내지 L 참조). 모든 종 중에서, 모래 쥐가 가장 가장 넓은 각도를 보였다($p = 0.033$)(도 9의 M 참조).
- [0095] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

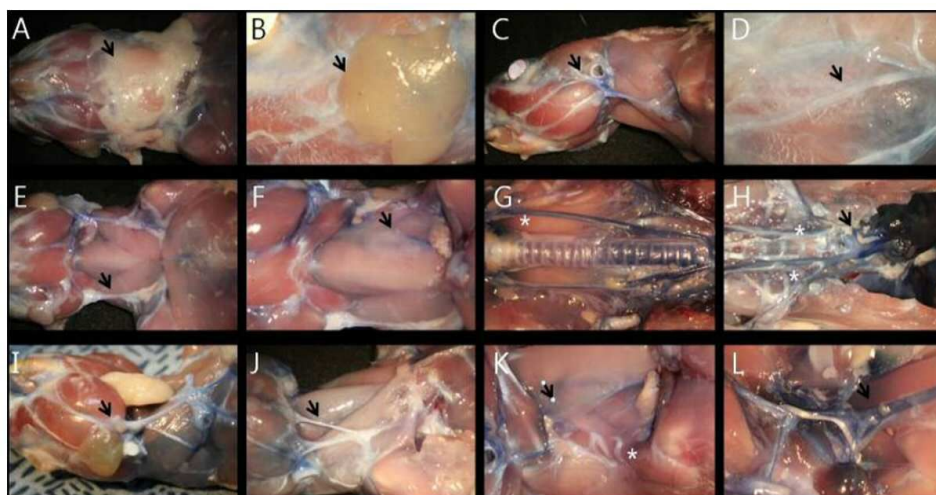
도면1



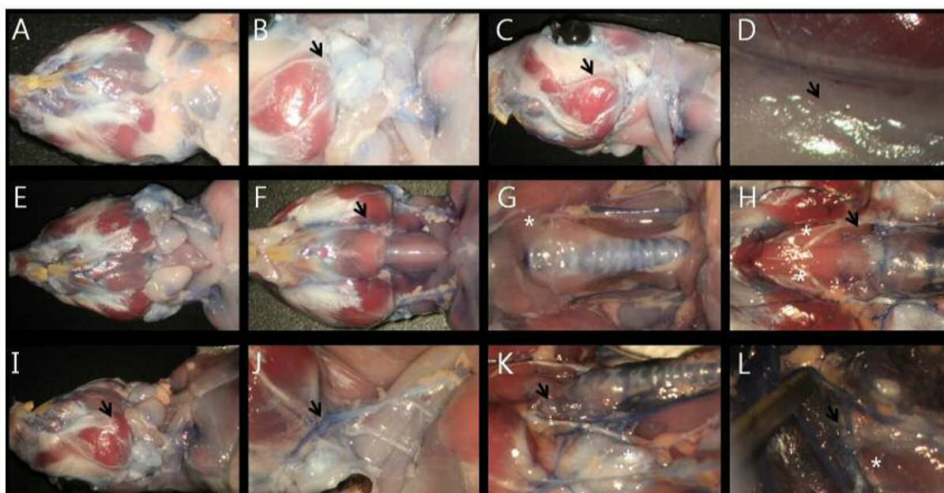
도면2



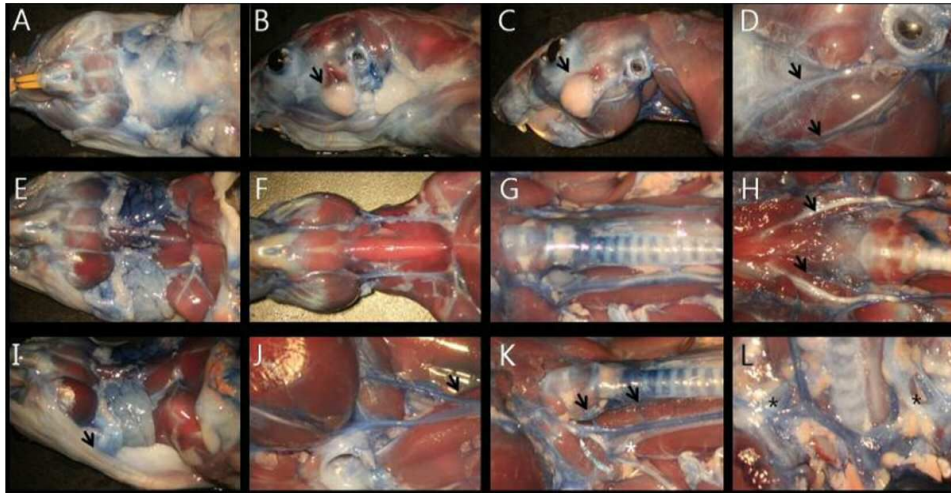
도면3



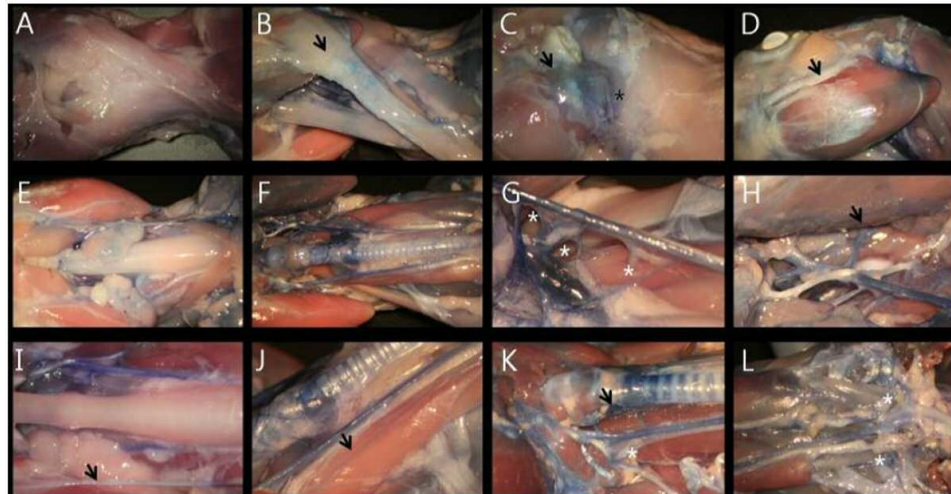
도면4



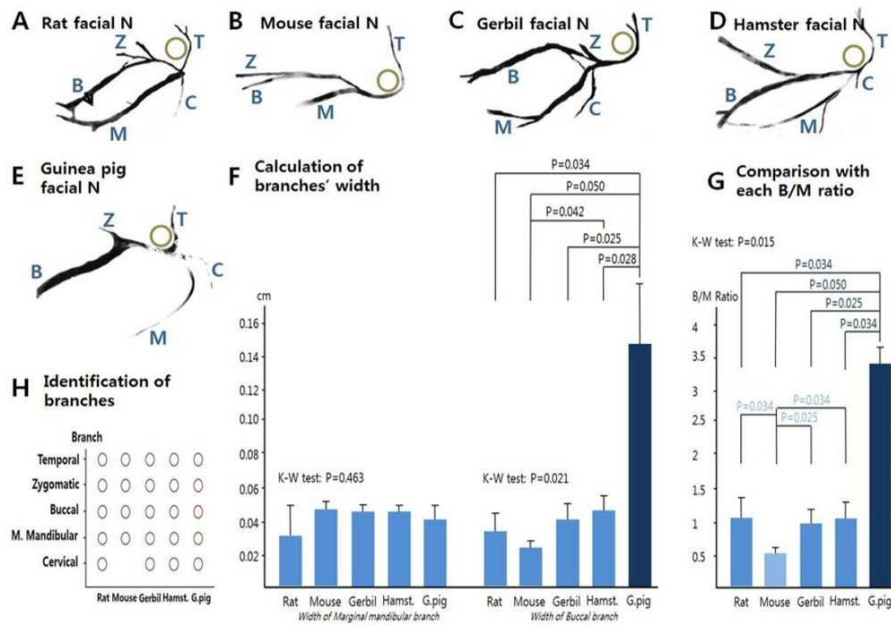
도면5



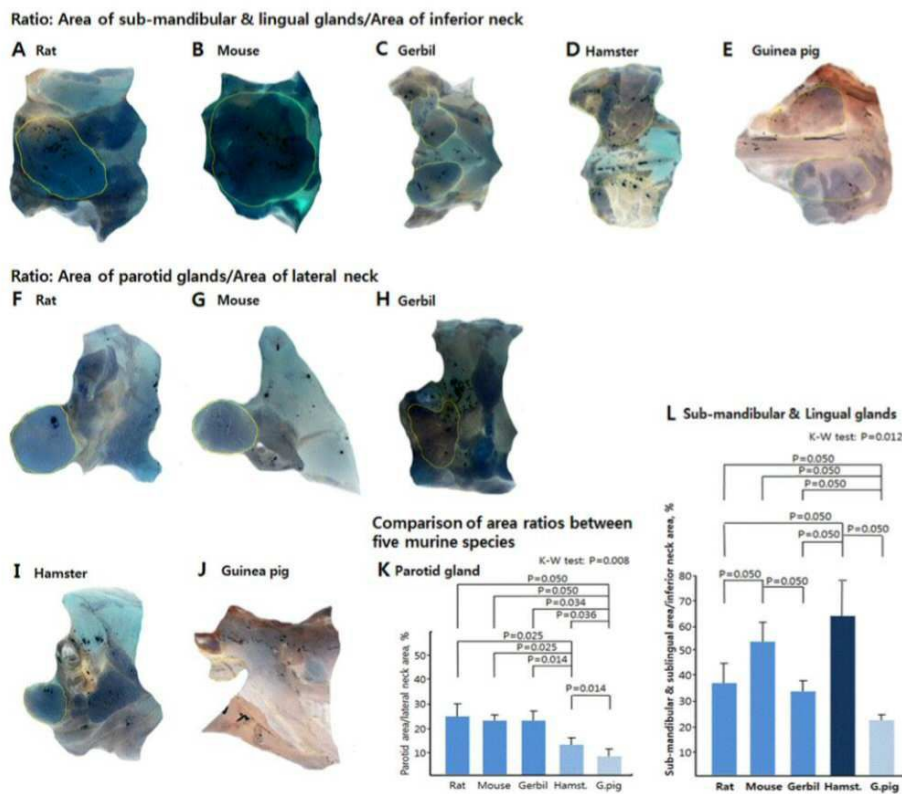
도면6



도면7



도면8



도면9

