

|                                                                                   |                                                 |                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|  | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)              | (11) 공개번호 10-2017-0125708<br>(43) 공개일자 2017년11월15일 |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>A01K 67/027 (2006.01)                                    | (71) 출원인<br>고려대학교 산학협력단                         |                                                    |
| (52) CPC특허분류<br>A01K 67/027 (2013.01)<br>A01K 2227/105 (2013.01)                  | 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)                |                                                    |
| (21) 출원번호 10-2017-0047866                                                         | (72) 발명자<br>안기훈                                 |                                                    |
| (22) 출원일자 2017년04월13일<br>심사청구일자 2017년04월13일                                       | 서울특별시 강남구 삼성로 417, 제103동 1801호(대치동, 대치포스코더샵아파트) |                                                    |
| (30) 우선권주장<br>1020160055878 2016년05월06일 대한민국(KR)                                  | (74) 대리인<br>특허법인충현                              |                                                    |

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 조산 동물모델의 제조방법 및 이를 이용한 조산 동물모델

### (57) 요약

본 발명은 조산 동물모델의 제조방법 및 이를 이용한 조산 동물모델에 관한 것이다.

본 발명에 따른 조산 동물모델의 제조방법은 자궁경부 손상으로 인해 조산이 유도되는 원인 및 증상을 규명하는데 효과적으로 적용될 수 있는 조산 동물모델을 제공할 수 있다. 또한 조산이 유도되는 동물모델임에도 불구하고 조산까지 이르는 과정에서의 사망률은 높지 않으면서 수유가 현존하는 모델중 가장 높으며 원하는 시점에 조산됨으로써 조산의 원인 및 기전을 규명하는데 효과적으로 적용될 수 있다.

본 발명에 따른 조산 동물모델에서 태어나는 신생아는 사망률이 현저히 낮으면서 미성숙하므로 조산하는 신생아의 합병증의 연구에 효과적으로 적용될 수 있다.

**대 표 도** - 도1a



(52) CPC특허분류

A01K 2267/03 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A1002300

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 고려대학교

연구사업명 (구)신진연구지원사업

연구과제명 자궁경부결손 및 손상으로 인한 조산 동물모델의 구축과 그 유효성 확인을 위한 기초연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- 1) 포유동물의 질로 접근하여 자궁경부를 절제하는 단계;
- 2) 상기 절제하는 단계 후 포유동물을 회복시키는 단계;
- 3) 상기 회복된 포유동물을 임신시키는 단계; 및
- 4) 상기 3)단계 후에, 리포폴리사카라이드(LPS, lipopolysaccharide)를 자궁강내 또는 복강내에 주입하는 단계;를 포함하는 조산 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 1)단계는 자궁경부의 30-100 %를 절제하는 것을 특징으로 하는 조산 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 자궁강내에 주입은 자궁의 원위부 첫 번째와 두 번째 태낭 사이에 주입하는 것을 특징으로 하는 조산 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 리포폴리사카라이드는 포유동물개체당 20-500  $\mu\text{g}$ 을 주입하는 것을 특징으로 하는 조산 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 리포폴리사카라이드는 전체 임신 주기의 65-80 % 경과 후 주입하는 것을 특징으로 하는 조산 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 리포폴리사카라이드의 주입 후 10-30 시간 이내에 출산하는 것을 특징으로 하는 조산 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 2)단계의 회복은 5-30 일의 기간 동안 이루어지는 것을 특징으로 하는 조산 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 포유동물은 설치류 동물인 것을 특징으로 하는 조산 동물모델의 제조방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 제조방법에 의하여 제조된 조산 동물모델.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,

상기 동물모델은 리포폴리사카라이드의 주입 후 10-30 시간 이내에 출산하는 것을 특징으로 하는 조산 동물모델.

#### 청구항 11

제9항에 있어서,

상기 동물모델은 설치류 동물인 것을 특징으로 하는 조산 동물모델.

#### 청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 조산 동물모델에서 태어난 미성숙 신생아 동물모델.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 조산 동물모델의 제조방법 및 이를 이용한 조산 동물모델에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 조산이란 임신 기간을 기준으로 하여 임신 20 주를 지나 임신 37 주 이전의 분만을 말한다. 조산은 전체 임신 중 대략 12 %에서 발생하여 전세계적으로 신생아 유병율과 사망률의 가장 흔한 원인이 된다. 미국의 한 보고에 의하면 2005년 한해 2조 6000억 가량의 사회경제적 비용이 조산에 의하여 발생하였다.

[0003] 조산은 매우 다양한 요인들에 의해 발생하게 된다. 현재까지 알려진 조산의 가장 중요한 기전은 감염으로 알려져 있으나 조산의 유도기전에 이러한 염증반응이 항상 관여하는 것이 아니라는 점은 현재까지 명확한 예방과 치료법의 개발에 어려움을 주고 있다. 또한 조산의 원인이 무엇이든지 자궁경부성숙과 확장이 필연적으로 수반된다. 또한 임상적으로는 이전에 자궁경부 원추절제술이나 유산을 경험하여 자궁경부의 결손이나 손상이 있던 여성에서 조산 확률이 급격히 증가하게 된다.

[0004] 이렇듯 조산과 관련하여 자궁경부의 역할이 매우 중요하여 자궁경부의 구조나 조직에 손상이 가해진 경우에는 조산이 발생할 위험이 높기 때문에, 조산과 자궁경부의 관계를 철저히 규명하여 조산에 이르는 확률을 낮추기 위한 시도가 필요함에도 불구하고 이에 관한 연구는 많이 부족한 문제점이 있다.

[0005] 자궁경부는 자궁의 입구에 해당하는 해부학적 위치를 가지며 질과 연결되는데, 출산과 관련한 변화가 오기 전까지는 단단한 구조물이며, 조직학적으로는 콜라겐 I 및 II형, 엘라스틴, 프로테오글리칸으로 이루어진 세포외기질, 평활근 및 혈관의 세포들로 구성되는 섬유성 결합 조직이다. 이러한 자궁경부의 구조나 조직을 보다 면밀히 연구하고, 이러한 자궁경부와 조산의 관계를 규명하여 동물모델로 제공함으로써, 조산의 확률을 보다 낮출 필요성이 있다.

[0006] 한편, 기존 설치류를 이용한 조산 동물모델은 임신 15-17일째 리포폴리사카라이드(LPS, lipopolysaccharide)를 자궁경부 근처의 임신낭 두 개 사이에 주입하여 조산을 유도하는 동물모델이 있었는데, 이는 조산의 수율이 낮고 동물모델의 사망률이 지나치게 높아 동물모델로서 효과적으로 활용되기 어렵다는 문제점이 있었다.

[0007] 본 발명과 관련된 선행기술문헌으로는 Obstetrics & Gynecology Science, 38권10호 (1995), pp.1819-1828(비특허문헌 1)가 개시되어 있으며, 상기 비특허문헌 1에는 임신한 토끼의 자궁속으로 자궁경을 이용하여 세균을 주입한 후, 자궁내 감염에 의한 조산 유발 토끼 실험모델을 확립한 것으로, 실험방법이 복잡하고, 구매가격과 관리비용이 높을 뿐 아니라, 증상이 재현되기까지 매우 긴 기간이 소요되는 동물모델이라는 점에서 조산에 대한 매커니즘 연구와 치료법 연구에 제한이 있다.

### 선행기술문헌

## 비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. 윤보현 외, "토끼에서 자궁경을 통한 자궁경부내 세균주입후 조산유발 모델의 확립 및 이에 따른 양수내 감염양상", Obstetrics & Gynecology Science 38권 10호, pp. 1819-1828, 1995

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 자궁경부의 손상으로 인해 조산이 유발되는 상황을 적절하게 반영한 조산 동물모델의 제조방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0010] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 조산 동물모델의 제조방법은
- [0011] 1) 포유동물의 질로 접근하여 자궁경부를 절제하는 단계;
- [0012] 2) 상기 절제하는 단계 후 포유동물을 회복시키는 단계;
- [0013] 3) 상기 회복된 포유동물을 임신시키는 단계; 및
- [0014] 4) 상기 3)단계 후에, 리포폴리사카라이드(LPS, lipopolysaccharide)를 자궁강내 또는 복강내에 주입하는 단계;를 포함한다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 조산 동물모델은 상기 제조방법에 의하여 제조된 것이다.

### 발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 조산 동물모델의 제조방법은 자궁경부의 손상으로 인해 조산이 유발되는 상황을 반영하고, 이를 효과적으로 적용할 수 있는 동물모델을 제공할 수 있다. 또한 조산의 시점을 제어 및 예측하는 것이 가능한 조산 동물모델을 제공할 수 있다. 이 조산 동물모델에서 태어난 미성숙한 신생아를 제공할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 따른 조산 동물모델은 기존의 모델보다 자궁경부의 외상, 파손, 손실과 관련된 조산에 있어 실제와 가까운 재현성을 가지며 실제 환자의 증상과 유사한 재현이 가능하여, 전임상 실험재료로 활용할 수 있다. 따라서 조산 연구에 크게 기여할 것으로 기대할 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명에 따른 조산동물모델은 조산에 대한 매커니즘 연구와 치료법 연구를 위한 생체시료 개발에 효과적으로 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 조산 동물모델에서 태어나는 신생아 역시 사망률이 낮으면서 미성숙하므로 조산하는 신생아의 합병증의 연구에 효과적으로 적용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 실시예 1의 자궁경부절제술을 실시한 사진이다.
- 도 2는 설치류의 자궁과 자궁경부의 해부학적 위치를 나타내는 그림이다.
- 도 3은 자궁경부의 손상 및 결손 모형을 나타내는 그림이다.
- 도 4는 실험예 2에서 실시예 1을 시행한 군들 중에서 D 군으로부터 적출된 자궁경부의 근위부(a)와 원위부(b)를 매슨 트리크롬(Masson trichrome)으로 염색한 후의 사진이다.
- 도 5는 실험예 6에서 실시예 1을 시행한 군(a)과 시행하지 않은 군(b)의 자궁경부 길이측정을 보여주는 사진이다.
- 도 6은 실험예 6에서 실시예 1을 시행하고 매슨 트리크롬(Masson trichrome)을 염색한 후의 사진이다.
- 도 7은 하기 실험예 7에서 RNA 및 단백질 발현 결과를 나타내는 것이다.
- 도 8은 하기 실험예 8에서 자궁강내에 리포폴리사카라이드를 병용 주입한 경우 각 군(A, B, C, D)의 출산 경과 시간을 도시한 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이에 본 발명자들은 조산에 이르는 과정에서의 사망률이 현저히 낮으면서 정확한 시점에 조산이 유도되는 조산 동물모델을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 조산 동물모델의 제조방법을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 구체적으로 본 발명에 따른 조산 동물모델의 제조방법은
- [0022] 1) 포유동물의 질로 접근하여 자궁경부를 절제하는 단계;
- [0023] 2) 상기 절제하는 단계 후 포유동물을 회복시키는 단계;
- [0024] 3) 상기 회복된 포유동물을 임신시키는 단계; 및
- [0025] 4) 상기 3)단계 후에, 리포폴리사카라이드(LPS, lipopolysaccharide)를 자궁강내 또는 복강내에 주입하는 단계;를 포함한다.
- [0026] 상기 조산 동물모델의 제조방법 중 상기 1)단계는 포유동물의 질로 접근하여 자궁경부를 절제하는 것이다. 이러한 1)단계는 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 바람직하게는 개복하여 자궁경부를 절제하는 것이 아닌 질 내부로 직접 접근하여 자궁경부를 절제하는 것일 수 있다. 또한 이러한 자궁경부의 절제는 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 절제용 나이프 등을 이용하는 것일 수 있으며, 질로 접근하기 위하여 바람직하게는 질 입구를 개방하는 것일 수 있다. 상기 질 입구의 개방은 질벽을 겹자로 단단히 고정하는 등의 방법을 이용하여 개방할 수 있다. 또한 이렇게 질 입구가 개방되어 시야확보를 하는 것이 자궁경부의 직접 절제를 가능하게 할 수 있어 바람직하다. 반면에 자궁경부를 본 발명과 같이 직접 절제하는 방식이 아닌 개복수술을 통해 절제하는 경우에는 사망률이 높을 수 있으며, 회복 기간도 장기간이 소요되어 바람직하지 않다. 그러므로 본 발명에서의 1)단계와 같은 방식으로 자궁경부를 직접 절제하여 동물모델을 제조하는 경우에는 사망률이 높지 않으면서 회복에 소요되는 시간도 단기간이어서 바람직하다. 한편, 본 발명과 같이 자궁경부를 절제하게 되면 자궁내 압력이 증가할 때 저항하는 힘이 감소되어 조산의 확률을 높일 수 있다.
- [0027] 또한 상기 1)단계에서 자궁경부를 절제하는 정도는 자궁경부의 30-100 %를 절제하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 60-100 %를 절제하는 것일 수 있다. 상기 자궁경부의 절제 정도가 30 % 미만인 경우에는 조산의 확률이 높지 않아 바람직하지 않다. 또한 60% 미만인 경우에는 각 개체에 따라 조산확률이 일률적이지 않다는 단점이 있으므로 바람직하지 않다.
- [0028] 한편, 상기 2)단계의 회복은 바람직하게는 5-30 일, 바람직하게는 15 내지 25일, 가장 바람직하게는 20-25일간의 기간 동안 이루어지는 것이 바람직한데, 상기 회복의 기간이 5 일 미만인 경우에는 손상후 복구 시간이 지나치게 짧아 임신의 확률이 낮아져 바람직하지 않으며, 15일 미만인 경우에는 임신율이 60% 까지 낮아지는 문제가 발생하며, 상기 회복의 기간이 25일, 최대 30 일을 초과하는 경우에는 동물모델의 제조가 장기간이 경과하여 효율성 측면에서 바람직하지 않다.
- [0029] 다음으로 4) 상기 3)단계 후에, 리포폴리사카라이드(LPS, lipopolysaccharide)를 자궁강내 또는 복강 내에 병용 주입할 수 있다.
- [0030] 이렇게 본 발명과 같이 자궁경부를 절제하고 임신 후 리포폴리사카라이드를 자궁강내 또는 복강 내에 주입하는 경우에는 예측가능한 시점에 조산을 유발할 수 있어 바람직하다. 특히 종래 기술에서는 자궁경부의 절제 없이 리포폴리사카라이드만을 과량으로 주입하였는데, 이 경우 태아의 사산의 확률이 2 배 이상 높아지는 문제가 발생하였다(이는 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 염증반응으로 사망한 것으로, 리포폴리사카라이드 투여가 조산 외에 다른 영향을 미치게 되는 문제를 확인함). 하지만 본 발명과 같이 자궁경부를 절제하고 나서 임신 중에 리포폴리사카라이드를 적정시기에 적정량 자궁강 또는 복강에 주입하는 경우 모체의 사망 및 태아의 사산의 확률은 현저하게 낮추면서 조산 성공률은 반대로 크게 높이는 효과를 달성함을 확인하였다. 또한, 조산이 발생하는 시점의 제어 및 예측이 가능한데, 구체적으로 리포폴리사카라이드의 주입 후 일정 시간 이내에 조산이 발생하게 되므로, 조산의 발생 시점을 제어 및 예측할 수 있다는 장점이 있다.
- [0031] 상기 리포폴리사카라이드는 자궁강내 주입이 바람직하고, 가장 바람직하게는 자궁의 원위부 첫 번째와 두 번째 태낭 사이에 주입하는 것이 본 발명의 조산 효과를 달성할 수 있어 바람직하다. 리포폴리사카라이드는 염증의 단계적 반응을 자극하는 대표적인 물질로 상기 위치 외에 다른 위치를 통해 LPS가 주입될 경우, 리포폴리사카

라이드의 주입량이 하기 조건에 부합하는데도 불구하고 전신 감염이 유발하게 되는 문제가 발생하게 된다.

[0032] 상기 리포폴리사카라이드는 동물개체당 20-500  $\mu\text{g}$ , 바람직하게는 50-150  $\mu\text{g}$ 을 주입하는 것이 바람직한데, 상기 리포폴리사카라이드의 양이 상기 하한치 미만인 경우에는 조산을 유도하기 어려워 바람직하지 않으며, 상기 리포폴리사카라이드의 양이 상기 상한치를 초과하는 경우에는 조산외에 다른 병증(염증반응)이 야기되는 문제가 발생하며, 이로 인해 태아 또는 산모의 사산 확률이 높아져 바람직하지 않다. 또한 상기 리포폴리사카라이드의 주입량은 동물 개체의 무게에 따라 적절히 조절하여 주입될 수 있다. 즉, 무게가 많이 나가는 개체는 상대적으로 많은 양을 주입하는 것이 바람직하다.

[0033] 또한 상기 리포폴리사카라이드는 전체 임신 주기의 65-80 % 경과 후 주입하는 것이 바람직한데, 상기 임신 주기가 65 % 미만인 시점에 주입하게 되면 사산 확률이 높아져 바람직하지 않으며, 상기 임신 주기가 80 %를 초과하는 시점에 주입하게 되면 조산이 유도될 확률이 현저히 줄어들어 바람직하지 않다. 예를 들어 임신 주기가 20-23일 경우 16일인 것이 바람직하다.

[0034] 상기 조건으로 리포폴리사카라이드를 주입하게 되면 10-96 시간 이내에 출산할 수 있으며, 바람직하게는 12-48 시간 이내에 출산한다. 즉, 본 발명은 리포폴리사카라이드 주입 시점을 통해 조산의 시점도 제어 및 예측할 수 있게 된다.

[0035] 한편, 상기 포유동물은 인간이 아닌 포유동물이라면 특별한 제한 없이 이에 해당할 수 있다. 또한 바람직하게는 설치류에 해당하는 동물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 쥐, 다람쥐, 햄스터, 기니피그, 비버, 두더지, 토끼, 개, 돼지, 소, 양, 영장류로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나가 이에 해당할 수 있다.

[0036] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### [0037] 실시예 1

[0038] 5-10 주경 Sprague-Dawley 랫트를 이용하여 마취 후 질 내부로 절제용 나이프를 이용하여 자궁경부를 절제하였다. 이때 질벽을 겹자로 단단히 잡아 질 입구를 열어 시야 확보를 하였으며, 그 후 돌출된 자궁경부를 원하는 비율만큼 나이프로 절제하였다. 하기 도 1a는 이러한 실시예 1의 자궁경부절제술을 촬영한 사진이다. 또한 하기 도 2는 설치류의 자궁과 자궁경부의 해부학적 위치를 나타내는 그림이다. 또한 하기 도 3은 자궁경부의 손상 및 결손 모형을 나타내는 그림이다.

#### [0039] 실시예 2

[0040] 한편 상기 실시예 1에 따라 자궁경부 절제 후, 3 주 뒤 수컷과 교미하여 임신한 설치류에서 임신 16 일째 우측 자궁의 원위부 첫 번째와 두 번째 태낭 사이에 리포폴리사카라이드(LPS, lipopolysaccharide) 100  $\mu\text{g}$  / NS 100  $\mu\text{L}$ 를 주입하였다. 질입구에 점액플러그가 발견된 날을 임신 1일째로 계산한다. 한편, 하기 도 1b는 이러한 실시예 2에 따른 리포폴리사카라이드를 주입하는 장면을 찍은 사진이다.

#### [0041] 비교예 1

[0042] 상기 실시예 1과는 달리 개복수술을 통하여 자궁경부를 절제하였다. 구체적으로는 마취를 위해 25 mg/kg 케타민(Ketamine)과 10 mg/kg 자일라진(Xylazine)을 복강 내 투여한 후 시행하였다. 그리고 하복부 정중절개로 복벽을 열고 자궁을 노출시켰다. 자궁을 들어올린 다음, 뒷질벽을 절개하여 자궁경부를 노출시킨다. 돌출된 자궁경부를 절제하고 질벽을 닫은 다음, 4-0 폴리글락틴(polyglactin) 910 (Vicryl; Ethicon, Seoul, Korea)으로 질벽을 봉합하였다. 근육, 근막 및 피부는 3-0 폴리글락틴(polyglactin) 910 (Vicryl)으로 봉합하였다.

#### [0043] 비교예 2

[0044] 상기 실시예 2와는 달리 자궁경부절제라는 수술적 절차 없이 자궁의 원위부 첫 번째와 두 번째 태낭사이에 리포폴리사카라이드를 주입하였다.

[0045] 수컷과 교미하여 임신한 설치류에서 임신 16 일째 우측 자궁의 원위부 첫 번째와 두 번째 태낭 사이에 리포폴리사카라이드(LPS, lipopolysaccharide) 50 ug / NS 100 uL를 주입하였다.

#### [0046] <실험예 1: 자궁경부손상의 조산 동물모델 형성을 위한 수술 방법의 평가>

[0047] 본 실험을 위하여 하나의 군은 상기 실시예 1 및 비교예 1의 방법으로 각각 자궁경부를 절제하였다. 그리고 일정 회복 기간 이후 두 군의 자궁경부의 해부학적 회복 및 합병증을 확인하였다.

#### [0048] 실험동물

[0049] 본 연구는 동물윤리위원회의 승인을 받았다(KUIACUC-2014-161). 10주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 랫트 45 마리를 한 군에 5 마리씩 무작위로 9 군으로 나누었다. 대조군인 A 군은 개복만 한 뒤 아무런 수술 없이 다시 복벽을 닫았고, B 군은 개복후 질을 절개하여 자궁경부를 노출시킨 뒤 자궁경부를 절제하고 다시 질을 닫은 다음 복벽을 닫았다(비교예 1). C 군은 질을 통하여 자궁경부를 제거하였다(실시예 1). A, B, C 군 각각 3일, 7일, 14일 후 자궁을 채취하고 몸무게를 재었다. 조직학적 검사를 위해 포르말린에 고정하였다.

#### [0050] 자궁경부절제술

[0051] 실시예 1 및 비교예 1에 따른 각각의 자궁경부절제수술은 기존의 방법에 따라 마취를 위해 25 mg/kg 케타민(Ketamine)과 10 mg/kg 자일라진(Xylazine)을 복강내 투여한 후 시행하였다.

#### [0052] 폐사율

[0053] 수술후 안전성을 확인하기 위해 사망여부를 기록하여 폐사율을 계산할 수 있도록 하였다.

#### [0054] 통계분석

[0055] 자료값은 평균  $\pm$  표준편차 또는 표준오차로 표현하였다. 군간의 전체적인 차이를 보기 위한 통계분석은 일원배치분산분석을 이용하며 각 군간의 차이를 보기 위해 터키(Tukey)법으로 계산하였다. P 값은 0.05 미만을 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

#### [0056] 결과

[0057] 상기 실험의 결과는 하기 표 1과 같다. 표 1을 살펴보면 수술 당시 A, B 및 C 군 사이의 몸무게의 차이는 발견되지 않았으나, 회복하는 시간이 3일인 경우 개복수술한 B군의 몸무게가 다른 군에 비해 유의하게 작음을 확인할 수 있다. 그러나 이러한 몸무게 차이는 회복시간이 7일, 14일인 경우 점점 줄어들었으며, 회복기간이 14일 이상인 경우에는 개복수술을 한 B군과 개복수술을 하지 않은 C군의 몸무게 차이가 거의 없음을 확인하였다.

[0058] 실시예 1에 따른 수술 방법은 비교예 1에 따른 개복수술에 비해 수술시간이 1/3 이하인 것으로 확인되었다. 또한 실시예 1의 경우 비교예 1에 따른 개복수술에 비해 수술 후 사망률이 1/2 이었다. 따라서 비교예 1에 따른 개복수술에 비해 실시예 1에 따른 모델형성이 다양한 장점을 가지는 것으로 판단된다.

표 1

|             | A-3<br>(n=5)    | B-3<br>(n=5)     | C-3<br>(n=5)    | A-7<br>(n=5)    | B-7<br>(n=5)    | C-7<br>(n=5)    | A-14<br>(n=5)    | B-14<br>(n=5)    | C-14<br>(n=5)   | P      |
|-------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|--------|
| 무게(g)<br>0주 | 199.3 $\pm$ 3.9 | 196.9 $\pm$ 8.1  | 194.5 $\pm$ 5.5 | 204.7 $\pm$ 5.4 | 197.6 $\pm$ 7.8 | 195.6 $\pm$ 4.3 | 204.9 $\pm$ 8.9  | 197.9 $\pm$ 9.7  | 199.5 $\pm$ 4.8 | 0.227  |
| 검사시간(분)     | 202.9 $\pm$ 5.8 | 193.6 $\pm$ 10.6 | 207.0 $\pm$ 3.5 | 218.6 $\pm$ 9.6 | 211.6 $\pm$ 4.5 | 225.0 $\pm$ 4.8 | 237.4 $\pm$ 17.1 | 245.5 $\pm$ 15.7 | 232.6 $\pm$ 7.8 | <0.001 |
| 수술시간(분)     |                 | 26.0 $\pm$ 1.6   | 8.0 $\pm$ 0.7   |                 | 27.2 $\pm$ 1.9  | 8.2 $\pm$ 0.8   |                  | 26.2 $\pm$ 1.3   | 8.0 $\pm$ 0.7   | <0.001 |
| 치사율(%)      | 0               | 40.0             | 20.0            | 0               | 20.0            | 0               | 0                | 20.0             | 20.0            | 0.141  |

#### [0060] <실험예 2: 실시예 1에 따른 자궁경부결손 및 손상의 정도에 대한 평가>

[0061] 실시예 1에 따른 수술로 자궁경부를 절제하는 것이 비교예 1에 따른 개복수술에 비해 안전하고 효율적이므로 실시예 1과 같은 수술로 향후의 실험을 진행하기로 결정하고 10주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 랫트를 이용하여 마취 후 군 별로 자궁경부의 1/3, 1/2, 2/3을 절제하여 보고 일정 회복기간 이후 두 군의 자궁경부의 해부학적 회복 및 합병증을 확인하였다.

[0062] 실험동물

[0063] 본 연구는 동물윤리위원회의 승인을 받았다(KUIACUC-2014-161). 10 주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 랫트 40 마리를 한 군에 5 마리씩 무작위로 8 군으로 나눈다. A 군은 대조군으로 마취와 자궁경부절제를 시행하지 않고, B 군은 질식수술로 자궁경부를 1/3 제거, C 군은 질식수술로 자궁경부를 1/2 제거, D 군은 질식수술로 자궁경부를 2/3 제거한다. A, B, C, D 군 각각 7일, 14일 후 자궁을 채취하고 몸무게를 잰다. 조직학적 검사를 위해 포르말린에 고정하였다.

[0064] 자궁경부절제술(질식수술)

[0065] 실시예 1에 따른 자궁경부절제수술은 기존의 방법에 따라 마취를 위해 25 mg/kg 케타민(Ketamine)과 10 mg/kg 자일라진(Xylazine)을 복강내 투여한 후 시행한다. 질로 접근하여 돌출된 자궁경부를 절제하였다(하기 도 1a 참조).

[0066] 근육-콜라겐 비율측정을 위한 매슨 트리크롬(Masson trichrome) 조직화학염색

[0067] 하기 도 4a 및 4b와 같이 매슨 트리크롬 염색 후에 정량적인 분석을 위해 각 샘플당 3 개의 절편을 이용하여 200 배율의 현미경으로 각 절편당 세 구획을 무작위로 골라 근육과 콜라겐의 염색부위의 넓이(smm)를 측정하고 근육-콜라겐 비율을 계산하였다. 이때 상기 도 4의 샘플은 실험예 2에서 실시예 1을 시행한 군들 중에서 D 군으로부터 적출된 자궁경부이다.

[0068] 결과

[0069] 본 실험의 결과는 하기 표 2에 정리되어있다. 표 2에 각 군은 '해당하는 군-회복기간(일)'로 표기하여 나타내었으며, 예를 들어 회복기간이 14 일이고, 자궁경부 1/2 절제한 C 군은 'C-14'로 표기하였다. 자궁경부 말단부위의 근육-콜라겐 비율은 군간에 큰 차이를 보이지 않았다.

표 2

|                 | A-7<br>(n=5) | B-7<br>(n=5)  | C-7<br>(n=5)   | D-7<br>(n=5)  | A-14<br>(n=5) | B-14<br>(n=5)  | C-14<br>(n=5)  | D-14<br>(n=5) | P     |
|-----------------|--------------|---------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|---------------|-------|
| 무게(g)<br>0 주    | 212±5.8      | 215.6<br>±5.6 | 190.5<br>±39.1 | 212.3<br>±6.7 | 206.6<br>±4.9 | 216.9<br>±5.0  | 216.8<br>±5.4  | 214.9<br>±7.8 | 0.133 |
| 근육-콜라겐<br>비율(%) | 98.8<br>±5.5 | 98.2<br>±73.9 | 85.7<br>±51.9  | 52.5<br>±19.9 | 66.3<br>±49.1 | 103.5<br>±46.1 | 106.8<br>±97.3 | 33.4<br>±4.7  | 0.529 |

[0071] <실험예 3: 실시예 1에 따른 자궁경부절손 및 손상 후 수컷과의 교접 전 회복기간에 대한 평가>

[0072] 10주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 랫트를 이용하여 자궁경부손상절제 수술 후 7일, 14일, 28일의 회복기간 군을 나누어 교접 후 임신율을 확인하였다. 10주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 랫트의 일반적인 임신율은 79-81% 정도이다.

[0073] 실험동물

[0074] 본 연구는 동물윤리위원회의 승인을 받았다(KUIACUC-2014-161). 10 주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 랫트 27 마리를 한 군에 3마리씩 무작위로 9군으로 나눈다. 대조군인 A 군은 아무런 마취와 수술 없는 군이고, B 군은 질식수술로 자궁경부를 1/2 제거, C 군은 질식수술로 자궁경부를 전절제한다. A, B, C 군 각각 수술시행 7일, 14일, 28일 후 수컷과 교미를 시작하고 임신이 될 때까지 기다린다.

[0075] 출산과 신생아 관련 변수

[0076] 임신이 된 것이 몸무게 및 행동변화, 복부변화로 관찰되면 개별관리하고 출산시 수술로부터의 날짜를 계산하고,

신생아의 마리수, 체중, 길이를 측정한다.

[0077] 결과

[0078] 실험의 결과는 하기 표 3에 정리되어 있다. A, B, C 군 모두 높은 임신율을 보였다. B, C군은 A군에 비해서는 낮은 수치를 보였으나 통계학적으로 유의하지는 않았다. 따라서 이 모델이 조산을 보기 위해 필연적으로 요구되는 임신에 합당한 모델임을 확인할 수 있었다. 표 3에 각 군은 '해당하는 군-회복기간(주)'로 표기하여 나타내었으며, 예를 들어 회복기간이 2 주인 자궁경부절제술 후 1/2 절제한 B 군은 'B-2'로 표기하였다.

[0079] 자궁경부절제술 후 회복의 기간을 가진 후 수컷과의 교미의 시간을 시작점으로 하지 않고 출산할 때까지의 기간만을 계산한 결과 당연히도 회복 후 1, 2, 4주가 될수록 자궁경부절제술 후 출산까지의 기간이 길어짐을 확인할 수 있었다.(P = 0.002) 랫드의 임신기간이 약 20-22일임을 가정할 때 대부분의 군에서 자궁경부절제술 후 약 3주 후 수컷과 교미를 하고 임신이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

[0080] 자궁경부절제술 후 회복기간과 관계없이 신생아의 수는 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 당연히도 회복기간을 길게 주었을 때 신생아의 몸무게와 키는 증가하였다.(몸무게 P = 0.026, 키 P = 0.037)

**표 3**

[0081]

|                 | A-1<br>(n=3) | B-1<br>(n=3) | C-1<br>(n=3) | A-2<br>(n=3) | B-2<br>(n=3) | C-2<br>(n=3) | A-4<br>(n=3) | B-4<br>(n=3) | C-4<br>(n=3) | P     |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| 검사시간에 따른 무게(g)  | 222.4±8.3    | 222.3±6.7    | 227.9±5.2    | 223.7±1.5    | 225.2±3.6    | 226.0±7.4    | 225.2±3.6    | 223.9±8.3    | 225.3±6.2    | 0.972 |
| 수술 후 출생까지 기간(일) | 41.0±8.7     | 46.0±15.5    | 38.0±7.9     | 60.7±11.0    | 56.0±1.4     | 74.0±2.8     | 69.7±2.5     | 65.7±0.6     | 67.0         | 0.002 |
| 임신험률(%)         | 100          | 100          | 100          | 100          | 66.7         | 100          | 100          | 100          | 50           |       |
| 신생아의 수          | 14.7±2.1     | 14.0±1.0     | 15.3±1.2     | 14.3±0.6     | 10.0±5.7     | 10.0±5.7     | 13.0±2.0     | 12.3±3.5     | 19.0         | 0.212 |
| 신생아의 무게(g)      | 6.3±0.4      | 6.2±1.0      | 6.6±0.2      | 6.1±0.2      | 6.9±0.9      | 8.2±0.3      | 7.7±0.4      | 7.4±1.1      | 5.79         | 0.026 |
| 신생아의 키(cm)      | 6.5±0.1      | 6.6±0.4      | 6.7±0.1      | 6.1±0.3      | 6.6±0.4      | 7.4±0.3      | 6.9±0.2      | 6.8±0.5      | 6.33         | 0.037 |

[0082] **<실험예 4: 실시예 2에 따른 자궁경부결손 및 손상 동물모델의 임신기간에 대한 평가>**

[0083] 실시예 1과 같이 자궁경부손상절제 수술 후 3 주의 회복기간 후 수컷과 교접 후 임신율과 임신기간을 확인한다. 특히 실시예 2와 같이 리포폴리사카라이드를 주입한 경우 임신기간에 대해 보다 구체적으로 평가하는 실험을 진행하였다.

[0084] 실험동물

[0085] 본 연구는 동물윤리위원회의 승인을 받았다(KUIACUC-2015-117). 5주령 Sprague-Dawley 랫트 암컷 45 마리를 무작위로 6군으로 나눈다. 대조군인 A 군은 아무런 마취와 수술 없는 군이고, B 군은 실시예 1로 자궁경부를 전절제한 군, C 군은 우측 자궁 첫 번째와 두 번째 임신낭 사이에 리포폴리사카라이드 50  $\mu$ g 주입(C 군은 비교예 2), E 군은 자궁경부절제와 함께 리포폴리사카라이드 50  $\mu$ g 주입한 군(E 군은 실시예 2)이다. 각 군은 수술시행 21일 후 수컷과 교미를 시작하고 임신이 될 때까지 기다린다. 상기 실험에서 자궁경부절제 후 회복기간에 따른 임신율을 조사한 바 있고 회복이 1-2주로 짧은 경우 임신율이 현저히 떨어지고 3주 이상에서는 큰 차이가 없음을 확인한 바 있어 회복기간을 최소로 한 21일로 하게 되었다.

[0086] 자궁경부절제술

[0087] 자궁경부절제술은 하기 도 1과 같이 시행하였으며 마취를 위해 이소플루란(isoflurane)을 이용하여 호흡마취를 시행하였다.

[0088] 임신기간 측정

[0089] 교미 후 질입구에 플러그가 확인되는 경우 1 일째로 계산하여 출산까지의 기간을 산정하였다.

[0090] 통계분석

[0091] 자료값은 평균  $\pm$  표준편차 또는 표준오차로 표현하였다. 군간의 전체적인 차이를 보기 위한 통계분석은 일원배치분산분석을 이용하며 각 군간의 차이를 보기 위해 터키(Tukey)법으로 계산하였다. P 값은 0.05 미만을 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

[0092] 결과

[0093] 본 실험의 결과는 하기 표 4와 같다. 각 군간의 임신기간이 다른지 통계분석을 실시하였을 때 자궁경부절제와 함께 리포폴리사카라이드를 투여하였을 때 그리고 리포폴리사카라이드를 투여하였을 때 조산이 되는 것을 확인할 수 있었다. 자궁경부절제와 함께 리포폴리사카라이드를 투여한 경우 리포폴리사카라이드 단독으로 투여한 경우에 비해 임신기간이 더욱 빠른 것으로 확인된다. 리포폴리사카라이드가 투여된 경우(비교예 2) 자궁내 임신낭의 수가 감소하고 태아의 몸무게 및 키가 감소하였고 태아사망이 증가하였다. 자궁경부를 절제한 경우 유의하게 임신한 자궁내 임신낭의 수 및 태아의 수가 감소하는 것을 확인할 수 있었지만 태아의 몸무게 및 키가 줄어드는 것은 아니었다.

표 4

[0094]

|             | A<br>대조군<br>(n=15) | B<br>자궁경부절제<br>(n=6) | C<br>LPS 주입<br>(n=14) | E<br>자궁경부절제+LPS<br>주입<br>(n=3) | P      |
|-------------|--------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------------|--------|
| 교미시 몸 무게(g) | 205.6 $\pm$ 10.3   | 220.0 $\pm$ 15.2     | 215.5 $\pm$ 10.9      | 226.3 $\pm$ 0.8                | 0.296  |
| 임신 기간(일)    | 19.5 $\pm$ 0.6     | 19.0 $\pm$ 1.0       | 18.2 $\pm$ 1.6        | 17.0 $\pm$ 0                   | 0.034  |
| 신생아 수       | 13.3 $\pm$ 1.6     | 9.7 $\pm$ 4.6        | 10.6 $\pm$ 3.8        | 4.0 $\pm$ 2.0                  | <0.001 |
| 왼쪽 임신낭의 수   | 11.4 $\pm$ 3.9     | 7.3 $\pm$ 3.6        | 9.4 $\pm$ 3.0         | 4.0 $\pm$ 2.0                  | 0.031  |
| 오른쪽 임신낭의 수  | 7.9 $\pm$ 1.6      | 4.3 $\pm$ 1.9        | 6.7 $\pm$ 1.8         | 2.0 $\pm$ 2.0                  | <0.001 |
| 신생아 무게(g)   | 3.5 $\pm$ 2.9      | 3.8 $\pm$ 2.4        | 4.5 $\pm$ 2.7         | 1.3 $\pm$ 2.0                  | 0.823  |
| 신생아 키(cm)   | 3.4 $\pm$ 3.0      | 4.6 $\pm$ 2.9        | 4.6 $\pm$ 2.3         | 1.7 $\pm$ 2.0                  | 0.0809 |

[0095] <실험예 5 : 자궁경부절제의 정도에 따른 임신기간의 평가>

[0096] 본 실험에 따라 자궁경부절제 정도(0~100%)에 따라, 제조된 동물모델의 출산시간을 측정한 실험으로, 구체적으로 5주령 C57BL/6 암컷을 무작위로 5마리씩 군으로 나눈다. 대조군 A군은 아무런 마취와 수술하지 않은 군이고, B 군은 질식수술로 자궁경부를 1/2 절제(50%)한 군이며, C 군은 질식수술로 자궁경부를 전절제(100%)한 군이다. 각 군은 자궁경부절제수술 시행 21일 후, 수컷과 교미를 시작하고 임신이 될 때까지 기다렸다. 교미 후 점액플러그가 질입구에 관찰된 날을 1 일째로 계산하여 출산까지의 기간을 계산하여 임신기간을 산출하여 표 5에 나타내었다. 각 군에서의 임신기간은 통계학적 방법을 이용하여 비교하였다.

[0097] 자궁경부절제술(질식수술)

[0098] 실시예 1에 따른 자궁경부절제수술은 기존의 방법에 따라 2%에서 4%의 이소플루란을 이용한 호흡마취하에 시행한다. 질로 접근하여 돌출된 자궁경부를 각 군에 따라 절제하였다.

[0099] 결과

[0100] 자궁경부절제의 정도와 관계없이 대조군과 임신기간에 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

표 5

[0101]

|         | 대조군            | 자궁경부 1/2절제     | 자궁경부 전절제       | P     |
|---------|----------------|----------------|----------------|-------|
| 임신기간(일) | 19.5 $\pm$ 0.6 | 20.3 $\pm$ 0.5 | 19.9 $\pm$ 0.7 | 0.089 |

[0102] <실험예 6: 자궁경부절제 및 손상 동물모델에서 출산 전과 출산 후의 자궁경부 특성의 비교>

[0103] 5주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 또는 C57BL/6 암컷을 이용하여 일주일간 적응기간을 가진 뒤 자궁경부 손상절제 수술 후 3주의 회복기간 후 수컷과 교접 후 임신한 개체만을 대상으로 임신 15 일, 19 일, 출산 직후 자궁경부를 채취하여 특성을 비교한다.

[0104] 실험동물

[0105] 본 연구는 동물윤리위원회의 승인을 받았다(KUIACUC-2015-117). 5 주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 또는 C57BL/6 암컷을 무작위로 4군으로 나눈다. 대조군인 A 군은 아무런 마취와 수술 없는 군이고, B 군은 질식수술로 자궁경부를 전절제한 군, C 군은 우측 자궁 첫 번째와 두 번째 임신낭 사이에 리포폴리사카라이드 50  $\mu$ g 주입(C 군은 비교예 2), D 군은 자궁경부절제와 함께 리포폴리사카라이드 50  $\mu$ g 주입한 군이다(D 군은 실시예 2). 각 군은 수술시행 21 일 후 수컷과 교미를 시작하고 임신이 될 때까지 기다린다. 자궁경부절제후 회복기간에 따른 임신율을 조사한 바 있고 회복이 1-2주로 짧은 경우 임신율이 현저히 떨어지고 3주 이상에서는 큰 차이가 없음을 확인한 바 있어 회복기간을 최소로 한 21 일로 하게 되었다. 임신중, 출산후 각 군간의 자궁경부의 변화의 차이를 관찰하기 위해 하기 다음 표 6과 같은 실험디자인을 하였다. LPS 주입은 임신 후 16일 째에 주입하였다.

표 6

|      | A 대조군 | B 자궁경부 절제 | C LPS 주입 | D 자궁경부 절제+LPS 주입 |
|------|-------|-----------|----------|------------------|
| 15일  | 3     | 3         | -        | -                |
| 19일  | 3     | 3         | 3        | 3                |
| 출산직후 | 3     | 3         | 3        | 3                |

[0107] 자궁경부절제술

[0108] 자궁경부절제수술을 시행하였으며 이소플루란(isoflurane)을 이용하여 호흡마취를 시행하였다.

[0109] 자궁경부길이관찰을 위한 H&E 조직화학염색

[0110] H&E 염색 후에 정량적인 분석을 위해 각 샘플당 3 개의 절편을 이용하여 200 배율의 현미경으로 각 절편당 세 구획을 무작위로 골라 자궁경부길이를 측정하고 평균을 계산하였다. 하기 도 5a 및 5b는 자궁경부절제술을 받지 않은 군(a)과 받은 군(b)의 자궁경부 길이측정을 보여주는 사진이다.

[0111] 근육-콜라겐 비율측정을 위한 매슨 트리크롬(Masson trichrome) 조직화학염색

[0112] 하기 도 6a 및 6b와 같이 매슨 트리크롬 염색 후에 정량적인 분석을 위해 각 샘플당 3개의 절편을 이용하여 200 배율의 현미경으로 각 절편당 세 구획을 무작위로 골라 근육과 콜라겐의 염색부위의 넓이(smm)를 측정하고 근육-콜라겐 비율을 계산하였다.

[0113] 결과

[0114] 결과는 하기 표 7과 표 8에 정리되어 있다. 예측한 바와 같이 자궁경부를 절제한 후 임신한 군에서 시료채취 당시의 자궁경부길이 역시 짧은 것으로 나타났고, 이는 자궁경부와 함께 LPS를 투여한 군에서도 마찬가지로 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 결과를 보였다. 이러한 짧은 자궁경부 길이는 임신 15 일째군, 임신 19 일째군, 출산후 시기에 각각 군 별 비교한 결과 임신 15 일, 임신 19 일째는 유의한 차이가 없었으나 출산 후에 그 변화가 유의함을 확인할 수 있었다. 자궁경부의 수술 당시 잘라낸 자궁경부의 무게는 유의한 차이가 없음을 확인하였다. 근육-콜라겐 비율은 흥미로운 결과를 보였는데, 자궁경부를 근위부, 중간, 원위부로 나누어 분석한 결과 임신 전후를 비교하였을 때 LPS 을 투여하였을 때 자궁경부 원위부의 근육-콜라겐 비율이 감소함을 확인할 수 있었다. 그러나 자궁경부를 절제한 군에서 근육-콜라겐 비율이 대조군에 비해 변화가 보이지는 않았다(하기 표 7 및 표 8). 표 7은 출산직후 채취한 각 군의 자궁경부의 조직학적 검사결과를 나타낸 것이다.

표 7

|            | A 대조군 (n=15)     | B 자궁경부절제 (n=6)   | C LPS (n=14)     | E 자궁경부절제+LPS (n=3) | P     |
|------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|-------|
| 교시미 몸무게(g) | 205.6 $\pm$ 10.3 | 220.0 $\pm$ 15.2 | 215.5 $\pm$ 10.9 | 226.3 $\pm$ 0.8    | 0.296 |

|                              |                  |                    |                    |                    |       |
|------------------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| 절단된 자궁경부 무게( $\mu\text{g}$ ) | -                | 13.3 $\pm$ 5.2     | -                  | 16.7 $\pm$ 5.8     | 0.092 |
| 자궁경부길이( $\mu\text{m}$ )      | 2110 $\pm$ 582.4 | 1490.5 $\pm$ 472.5 | 2454.8 $\pm$ 513.0 | 1876.0 $\pm$ 503.0 | 0.004 |
| 근육-콜라겐 비율(근위부)(%)            | 0.9 $\pm$ 0.5    | 0.8 $\pm$ 0.6      | 0.6 $\pm$ 0.3      | 1.3 $\pm$ 0.6      | 0.037 |
| 근육-콜라겐 비율(중간)(%)             | 0.9 $\pm$ 0.7    | 0.7 $\pm$ 0.4      | 0.5 $\pm$ 0.2      | 1.0 $\pm$ 0.7      | 0.229 |
| 근육-콜라겐 비율(원위부)(%)            | 0.8 $\pm$ 0.5    | 0.7 $\pm$ 0.4      | 0.4 $\pm$ 0.2      | 1.1 $\pm$ 0.6      | 0.269 |

표 8

[0116]

|                          | A : 대조군(n=15)      |                  |                    | P     |
|--------------------------|--------------------|------------------|--------------------|-------|
|                          | 임신 15 일째           | 임신 19 일째         | 출산 후(postpartum)   |       |
| 자궁경부 길이( $\mu\text{m}$ ) | 1647.0 $\pm$ 475.5 | 1923 $\pm$ 620.5 | 2508.9 $\pm$ 347.4 | 0.028 |
| 근육-콜라겐 비율(근위부)(%)        | 1.0 $\pm$ 0.5      | 1.1 $\pm$ 0.6    | 0.8 $\pm$ 0.4      | 0.446 |
| 근육-콜라겐 비율(중간)(%)         | 1.0 $\pm$ 0.3      | 0.9 $\pm$ 0.4    | 0.8 $\pm$ 1.0      | 0.93  |
| 근육-콜라겐 비율(원위부)(%)        | 0.8 $\pm$ 0.3      | 0.9 $\pm$ 0.7    | 0.6 $\pm$ 0.6      | 0.64  |

표 9

[0117]

|                          | B : 자궁경부절제(n=6) |          |                    | P     |
|--------------------------|-----------------|----------|--------------------|-------|
|                          | 임신 15 일째        | 임신 19 일째 | 출산 후(postpartum)   |       |
| 자궁경부 길이( $\mu\text{m}$ ) | 1398            | 2111     | 1226.5 $\pm$ 369.8 | 0.452 |
| 근육-콜라겐 비율(근위부)(%)        | 0.6             | 1.6      | 0.5 $\pm$ 0.3      | 0.269 |
| 근육-콜라겐 비율(중간)(%)         | 1.1             | 1.1      | 0.4 $\pm$ 0.2      | 0.21  |
| 근육-콜라겐 비율(원위부)(%)        | 0.5             | 1.2      | 0.5 $\pm$ 0.3      | 0.455 |

표 10

[0118]

|                          | C : LPS(n=14)      |                    | P     |
|--------------------------|--------------------|--------------------|-------|
|                          | 임신 19 일째           | 출산 후(postpartum)   |       |
| 자궁경부 길이( $\mu\text{m}$ ) | 2381.8 $\pm$ 545.2 | 2417.3 $\pm$ 518.5 | 0.655 |
| 근육-콜라겐 비율(근위부)(%)        | 0.8 $\pm$ 0.5      | 0.4 $\pm$ 0.1      | 0.062 |
| 근육-콜라겐 비율(중간)(%)         | 0.6 $\pm$ 0.2      | 0.4 $\pm$ 0.1      | 0.062 |
| 근육-콜라겐 비율(원위부)(%)        | 0.6 $\pm$ 0.2      | 0.4 $\pm$ 0.1      | 0.022 |

[0119]

<실험예 7 : 실시예 2에 따른 자궁경부절제 및 손상 동물모델에서 임신과 출산 후의 자궁경부의 세포외기질, 염증 특성의 비교>

[0120]

5주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 혹은 C57BL/6을 이용하여 일주일간 적응기간을 가진 뒤 자궁경부손상절제 수술 후 3주의 회복기간 후 수컷과 교접 후 임신한 개체만을 대상으로 임신19일, 출산후 자궁경부를 채취하

여 특성을 비교한다.

#### [0121] 실험동물

[0122] 본 연구는 동물윤리위원회의 승인을 받았다(KUIACUC-2015-117). 5주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 또는 C57BL/6 암컷을 무작위로 4군으로 나눈다. 대조군인 A 군은 아무런 마취와 수술 없는 군이고, B 군은 질식수술로 자궁경부를 전절제한 군(실시에 1), C 군은 우측 자궁 첫 번째와 두 번째 임신낭 사이에 리포폴리사카라이드 50  $\mu$ g 주입(비교예 2), D 군은 자궁경부절제와 함께 리포폴리사카라이드 50  $\mu$ g 주입한 군(실시에 2)이다. 각 군은 수술시행 21일 후 수컷과 교미를 시작하고 임신이 될 때까지 기다린다. 자궁경부절제후 회복기간에 따른 임신율을 조사한 바 있고 회복이 1-2주로 짧은 경우 임신율이 현저히 떨어지고 3주 이상에서는 큰 차이가 없음을 확인한 바 있어 회복기간을 최소로 한 21일로 하게 되었다. 임신중, 출산후 각 군간의 자궁경부의 변화의 차이를 관찰하기 위해 다음 표 11과 같은 실험디자인을 하였다.

표 11

|      | A 대조군 | B 자궁경부 절제 | C LPS 주입 | D 자궁경부 절제 + LPS 주입 |
|------|-------|-----------|----------|--------------------|
| 19일  | 6     | 6         | 6        | 6                  |
| 출산직후 | 6     | 6         | 6        | 6                  |

#### [0124] 자궁경부절제술

[0125] 자궁경부절제수술을 시행하였으며 이소플루란(isoflurane)을 이용하여 호흡마취를 시행하였다.

#### [0126] 세포외기질, 염증, 내분비학적 변화 관찰

[0127] Col2A1, ADAMTS4, C3, Itgam, CD34의 발현을 관찰하였다. 모든 물질은 q-PCR 및 Western blot 을 통해 발현을 확인하였다.

#### [0128] 결과

[0129] 이의 결과는 하기 도 7a 및 도 7b를 통해 나타내었다. 임신 19 일째에는 C3가 자궁경부절제시 RNA와 단백질의 발현증가(도 7a의 lane 5), 리포폴리사카라이드 투여군(도 7a의 lane 6, 7)에서 RNA 발현증가, 단백질 발현의 감소를 관찰할 수 있었고, Col2 의 경우 자궁경부절제시 RNA 발현증가와 단백질의 발현감소(도 7a의 lane 5), 리포폴리사카라이드 투여군에서 RNA와 단백질발현(도 7a의 lane 6, 7)이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0130] 분만 후에는 ADAMTS4가 자궁경부절제시 RNA와 단백질의 발현증가(도 7b의 lane 4), 리포폴리사카라이드를 투여하였을 때 RNA 발현이 증가, 단백질 발현은 감소하였다(도 7b의 lane 6-10). 자궁경부절제와 리포폴리사카라이드 동시 시행한 경우 RNA와 단백질의 발현이 증가하였다(도 7b의 lane 5). CD11b(Itgam)의 경우 자궁경부절제시 RNA와 단백질의 발현증가(도 7b의 lane 4), 리포폴리사카라이드를 투여하였을 때 RNA 발현이 증가, 단백질발현 감소하였다(도 7b의 lane 6-10). 자궁경부절제와 리포폴리사카라이드 동시 시행한 경우 RNA 발현증가, 단백질의 발현이 감소하였다(도 7b의 lane 5). CD34는 자궁경부절제시 RNA 발현증가, 리포폴리사카라이드를 투여하였을 때 RNA 발현이 증가하였다. 자궁경부절제와 리포폴리사카라이드를 동시에 시행한 경우 RNA 발현이 증가하였다. 그러나 단백질의 발현은 검출되지 않았다.

#### [0131] <실험예 8 : 자궁경부절제 후 자궁강내에 리포폴리사카라이드를 주입한 경우 출산 경과 시간 측정>

[0132] 본 실험은 자궁경부절제 후 리포폴리사카라이드를 주입한 동물모델의 출산 시간을 비교 측정한 실험이다. 일반적으로 설치류는 20-23 일이 분만시기이므로, 이 시기 이전에 출산한 경우 조산된 것으로서 유의한 결과를 본 것으로 볼 수 있다.

#### [0133] 실험동물

[0134] 본 연구는 동물윤리위원회의 승인을 받았다(KUIACUC-2014-161). 10주령 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 랫트 40 마리를 한 군에 5 마리씩 무작위로 4 군으로 나누었다. 대조군인 A 군은 개복만 한 뒤 아무런 수술 없이 다시 복벽을 닫았고, B 군은 질식수술로 자궁경부를 전절제한 군, C 군은 우측 자궁 첫 번째와 두 번째 임신낭 사이에 리포폴리사카라이드 50 주입(C 군은 비교예 2), D 군은 자궁경부절제와 함께 리포폴리사카라이드 50 주

입한 군이다(D 군은 실시예 2). A, B, C, D군은 수술시행 21일 후 수컷과 교미를 시작하고 임신이 될 때까지 기다린 후, 임신 후 출산까지의 기간(임신기간)을 측정하여 도 8에 나타내었다. 이때 LPS 주입은 임신 후 16일째에 주입하였다.

[0135] 임신기간 측정

[0136] 교미 후 질입구에 플러그가 확인되는 경우 1 일째로 계산하여 출산까지의 기간을 산정하였다.

[0137] 자궁경부절제술

[0138] 자궁경부절제술은 앞선 실험예 5의 자궁경부절제술에 따라 도 3과 같이 시행하였으며 마취를 위해 이소플루란(isoflurane)을 이용하여 호흡마취를 시행하였다.

[0139] 결과

[0140] 하기 도 8은 이의 결과를 나타낸 것인데, 이러한 도 8에서 볼 수 있듯이 다른 군과는 달리 D 군에서 16일 리포폴리사카라이드 주입 이후 24 시간 이내에 모두 분만이 이루어지는 것을 확인할 수 있다.

[0141] <실험예 9 : 자궁경부절제 후 추가되는 리포폴리사카라이드 용량에 따른 임신기간의 평가>

[0142] 5주령 C57BL/6 암컷을 무작위로 3군(각 군당 5 마리씩)으로 나눈다. 대조군인 A 군은 우측 자궁 첫 번째와 두 번째 임신낭 사이에 생리식염수를 주입한 군이고, B 군은 자궁경부 전절제와 함께 리포폴리사카라이드 50  $\mu\text{g}$  주입한 군, C 군은 자궁경부 전절제와 함께 리포폴리사카라이드 100  $\mu\text{g}$  주입한 군이다. 각 군은 자궁경부절제술 시행 21일 후 수컷과 교미를 시작하고 임신이 될 때까지 기다린다.

[0143] 교미후 점액플러그가 질입구에 관찰된 날을 day 1로 계산하여 출산한 날짜를 계산하여 임신기간을 산출한다. 각 군에서의 임신기간을 통계학적 방법을 이용하여 비교한다.

[0144] 결과

[0145] 임신기간의 차이는 다음 표 12과 같다. 표 12에 나타난 바와 같이, 자궁경부전절제와 함께 LPS 100  $\mu\text{g}$  을 투여하였을 때 대조군에 비해 유의하게 임신기간이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다. 자궁경부전절제와 함께 LPS 50  $\mu\text{g}$  을 투여하였을 때는 대조군에 비해 임신기간이 줄어드는 경향은 보이나 통계학적으로 유의하지 않으며, 각 개체별에 따라 차이가 발생하는 것을 확인할 수 있다.

[0146] 나아가, 200  $\mu\text{g}$  이상으로 LPS가 병용 처리될 경우, 태아 및 산모의 사산율과 유산율이 높아 통계가 용이하지 않았으며, 500  $\mu\text{g}$  이상부터는 거의 측정이 불가하였다.

**표 12**

[0147]

|         | A : 대조군<br>(n=5) | B : 자궁경부<br>전절제 + LPS<br>50 $\mu\text{g}$ | C : 자궁경부<br>전절제 + LPS<br>100 $\mu\text{g}$ | P     |
|---------|------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|-------|
| 임신기간(일) | 19.3 $\pm$ 0.5   | 17.3 $\pm$ 1.6                            | 16.4 $\pm$ 0.5                             | 0.022 |

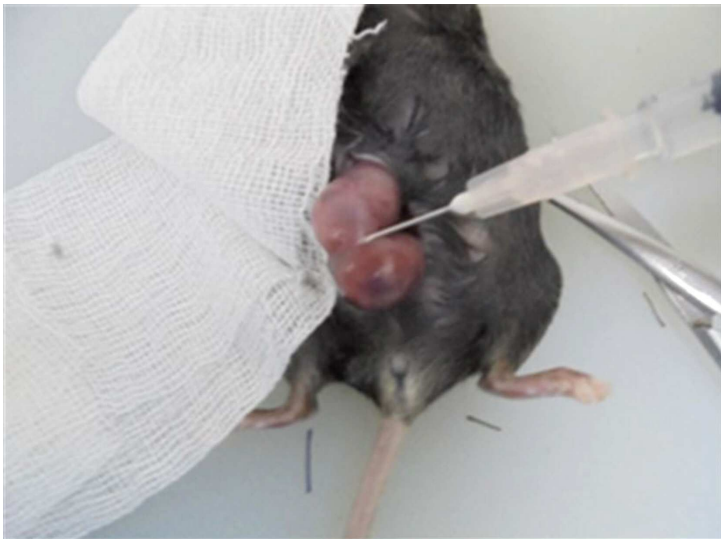
[0148] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

도면

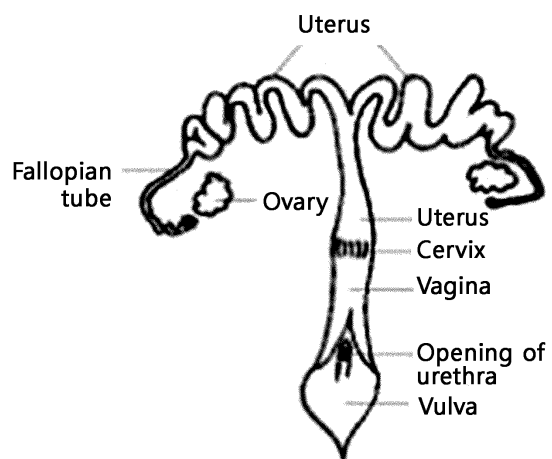
도면1a



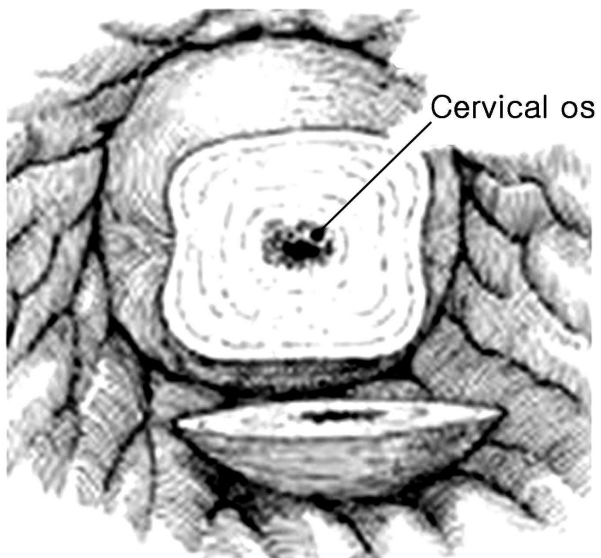
도면1b



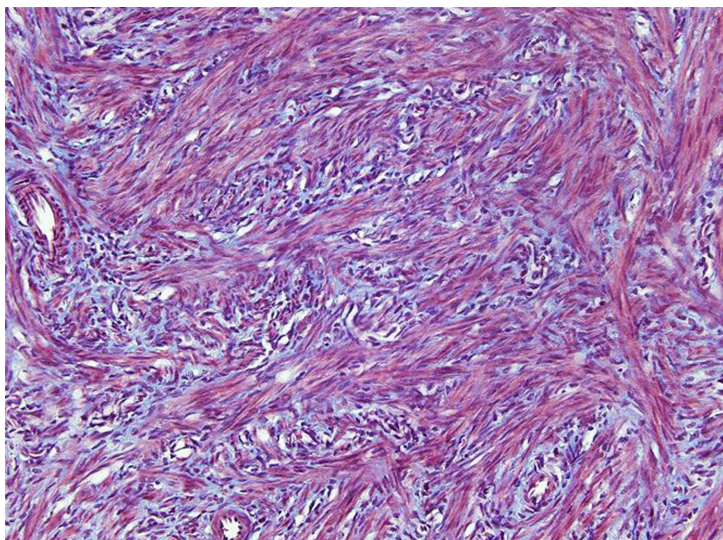
도면2



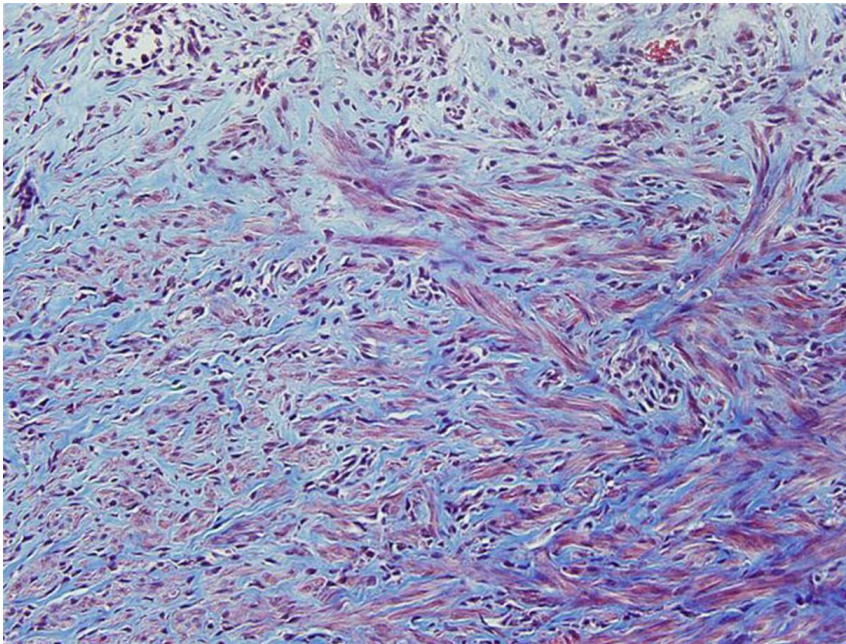
도면3



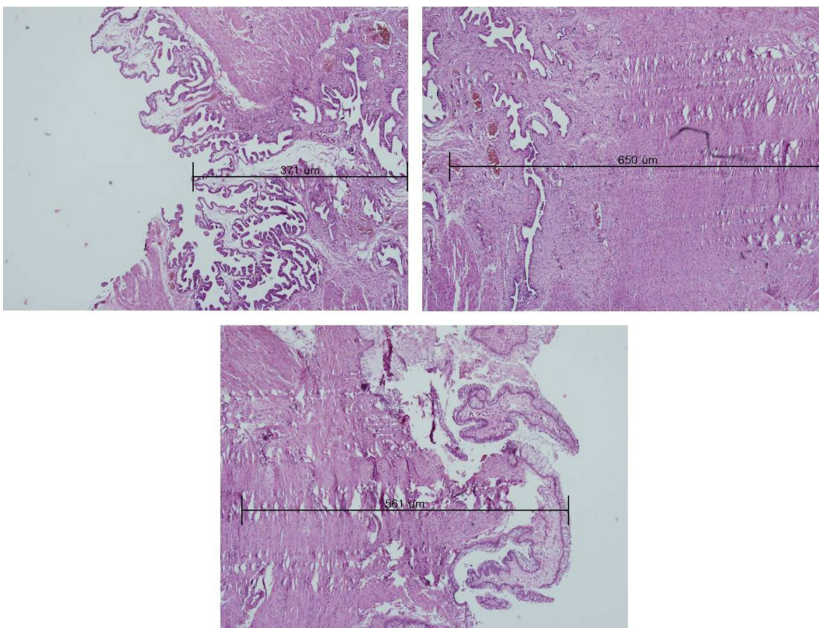
도면4a



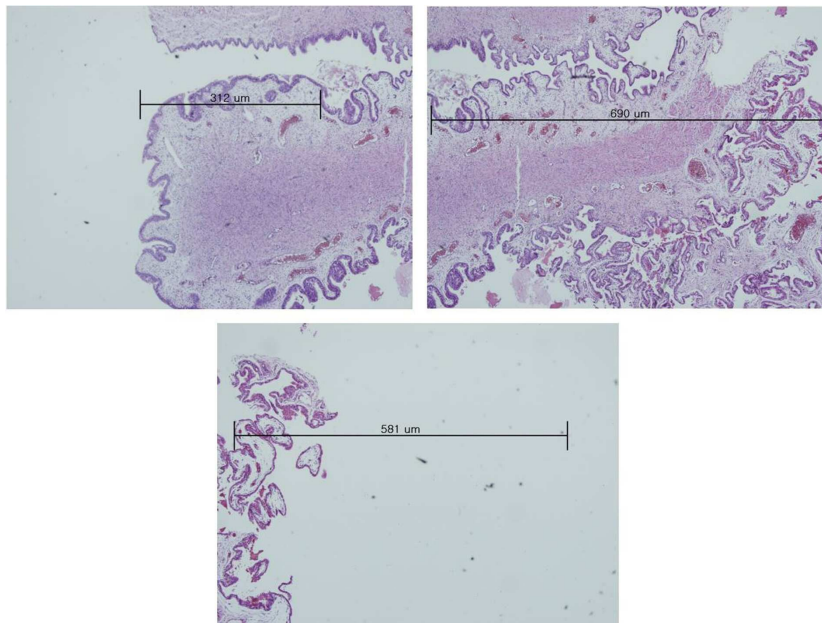
도면4b



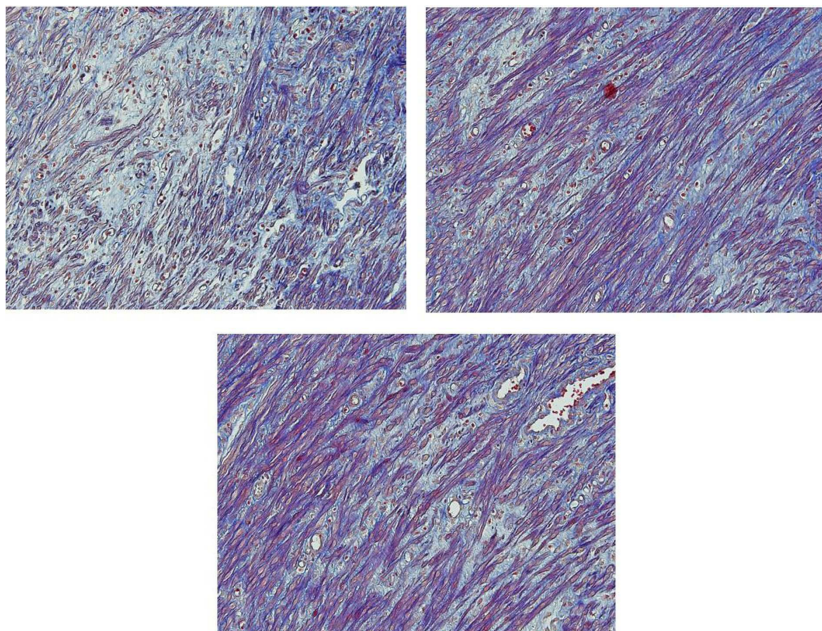
도면5a



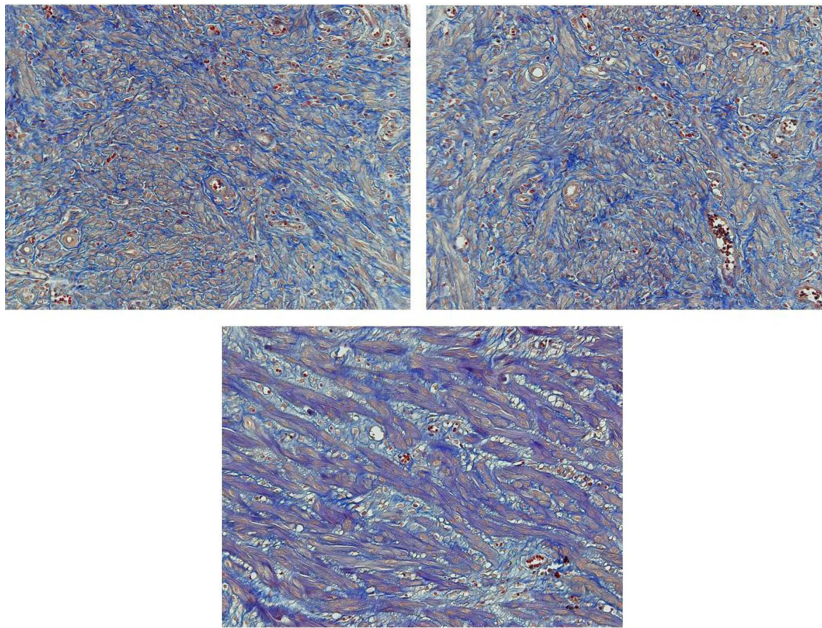
도면5b



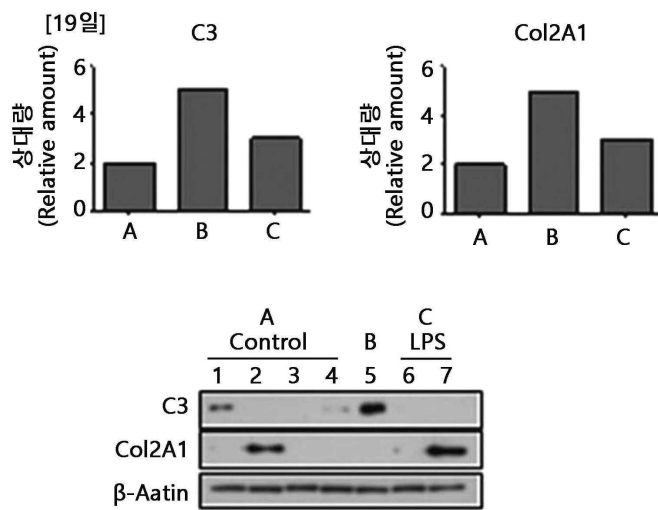
도면6a



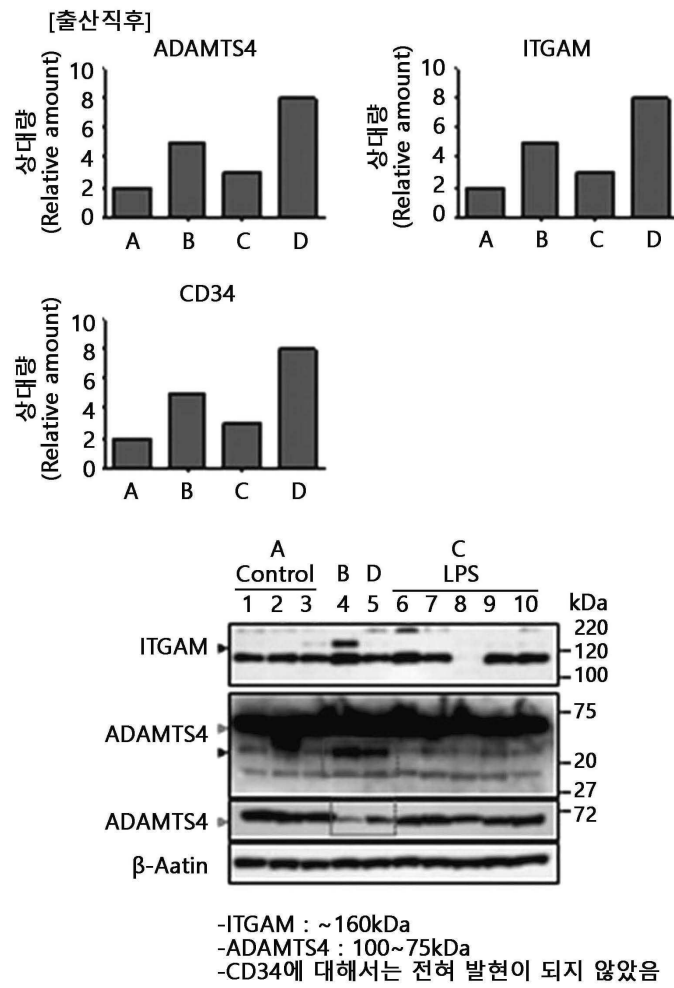
도면6b



도면7a



도면7b



도면8

