



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년10월17일
(11) 등록번호 10-0767811
(24) 등록일자 2007년10월10일

(51) Int. Cl.

A61D 1/00 (2006.01) A61D 1/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0103893

(22) 출원일자 2006년10월25일

심사청구일자 2006년10월25일

(56) 선행기술조사문헌

JP60061503 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 3 항

(73) 특허권자

강원대학교산학협력단

강원 춘천시 효자동 192-1 강원대학교로 42

(72) 발명자

우홍명

강원 춘천시 석사동 현진에버빌 1차 103동 602호

(74) 대리인

김순용

심사관 : 김정태

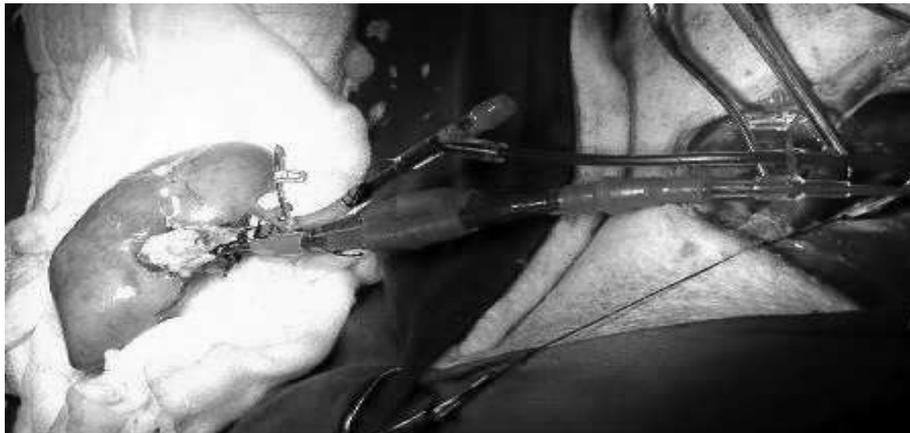
(54) 이식 장기의 체외 관류방법

(57) 요약

본 발명은 장기이식과정에서 발생하는 허혈/재관류 손상을 분석하는데 이용되는 체외 재관류 방법에 관한 것으로, 동물 실험에서 연구목적으로 적출한 장기를 이식할 경우 카테터를 사용하여 체외에서 대퇴 동맥과 정맥에 장기의 동맥과 정맥을 연결함으로써 복강절개와 혈관문합등의 복잡한 이식수술이 필요하지 않다.

따라서 이식결과에 영향을 미치는 수술적 요인을 배제할 수 있으며 장기이식 연구 분야에서 과제 중 하나인 전문 연구 인력과 고비용 문제를 해결할 수 있는 간단하면서 효율적인 재관류 방법을 제공할 수 있다.

대표도 - 도3



(56) 선행기술조사문헌
US4186253 B
US4666425 A

특허청구의 범위

청구항 1

이식하려는 실험동물의 장기를 적출하여 세척하고, 장기 보존액에 저온 보관하는 장기 이식 방법에 있어서, 상기 실험동물의 대퇴동맥과 정맥을 분리하는 단계; 및

적출한 장기의 동맥과 정맥을 대퇴 동맥과 정맥에 카테터를 이용하여 연결하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 실험동물내 이식 장기의 체외 관류방법

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이식하려는 장기는 신장, 간, 소장, 대장, 위, 췌장, 비장, 심장, 폐, 피부인 것을 특징으로 하는 실험동물내 이식 장기의 체외 관류방법

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 장기의 세척액으로는 0.9% NaCl 용액에 Heparine, Mannitol, NaHCO₃, KCl을 첨가하여 냉장 보관한 용액을 사용하는 것을 특징으로 하는 실험동물내 이식 장기의 체외 관류방법

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <4> 본 발명은 장기 이식 연구에 이용되는 저온, 허혈/재관류 손상 여부를 분석하기에 최적인 체외 재관류 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 이식결과에 영향을 미치는 수술적 요인을 배제할 수 있으면서도 효율적인 체외 재관류 방법에 관한 것이다.
- <5> 종래의 장기이식과정에서 발생하는 기존의 자가이식에 의한 재관류 방법은 다양하게 이루어졌으며, 보다 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.
- <6> 1. 복강내 허혈/재관류 방법
- <7> 방법: 이 방법은 가장 간단한 방법으로 복강 내에서 장기를 적출하지 않고 동맥과 정맥을 결찰하는 방법으로 허혈을 유발하였다가 혈관 결찰을 제거하여 다시 재관류하는 방법으로 다양한 실험동물에서 많이 이용되고 있다.(Burne-Taney 등 (2005); Gulec 등 (2006); Qi 등 (2006))
- <8> 장점: 이는 장기의 적출, 이식 과정 없이 허혈손상 연구를 간편하게 하는 방법이다.
- <9> 문제점: 장기를 적출한 후 일정 시간동안 저온보존이 필요한 임상적 상황을 고려할 수 없어 저온 허혈 손상에 대한 연구가 불가능하다.
- <10> 2. 복강 내 동소이식 방법 (Orthotopic transplantation)
- <11> 방법: 이 방법은 1955년 Hume등이 장기를 적출한 동일한 부위에 이식하는 수술법으로 현재는 거의 사용하지 않고 있다..
- <12> 장점: 이 방법은 적출 후 저온 보존기간 동안의 허혈은 물론 동일한 부위의 이식으로 인해 임상적으로 가장 유사한 장점을 갖고 있다.
- <13> 문제점: 자가이식은 장기를 적출한 개체에 다시 이식을 하는 것이므로 동소 이식은 자가이식 모델이 불가능하다. 허혈손상에 대한 연구는 거부반응을 배제한 자가이식 모델을 이용해야함으로 복강 내 동종이식 방법은 동종 이식의 연구에만 국한되는 방법이며 임상적으로는 이용하지 않는다. 또한, 복강 내 혈관문합을 해야 함으로 전문 이식수술 기술이 필요하며 수술비용이 많이 든다.
- <14> 3. 복강내 이소성 이식 (Heterotopic transplantation)

- <15> 방법: 동소성이식과는 달리 장기를 적출한 곳이 아닌 다른 부위에 이식하는 방법이다. 1960년대 초부터 개발되었고 외장골 동, 정맥에 이식하는 방법이며 현재도 가장 널리 이용되고 있다.
- <16> 장점: 우측장골와는 S자 결장이 놓여있어 좌측과 달리 신장을 편안한 상태로 위치시킬 수 있다. 또한, 장골 동, 정맥이 좌측에 비해 깊지 않아 혈관문합에 유리하다.
- <17> 그리고 적출부위와 이식부위가 다르기 때문에 자가이식과 동종이식 방법 모두 가능하다. 이식 후 일정 기간 동안 장기의 기능을 임상적으로 평가하고자 할 때 사용된다.
- <18> 문제점: 복강내 동소성 이식과 같이 복강 내 혈관문합을 해야하므로 전문 이식수술 기술이 필요하며 수술비용이 많이 든다.
- <19> 상술한 바와 같이, 기존의 복강내 허혈 모델은 복강내에서 장기를 적출하지 않고 동, 정맥을 결찰하는 방법으로 허혈을 유발하였다. 이는 장기의 적출, 이식과정을 간편하게 하는 효과적인 방법이다.
- <20> 그러나 실제 임상에서는 장기를 적출한 후 일정시간동안 저온에 보존해야하는 과정을 필연적으로 거쳐야하는데 기존의 모델은 저온보존이 불가능한 단점이 있다.
- <21> 또한, 장기의 적출/이식 과정을 포함한 기존의 복강 내 이식방법은 복잡한 혈관 문합을 해야 하므로 전문 이식수술 기술이 필요하며 수술 비용도 많이 든다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <22> 이에 본 발명자는 저온시간을 연구 목적에 따라 다양하게 응용할 수 있으면서 이식 상황과 동일한 연구를 손쉽게 할 수 있음으로서 장기 이식 연구의 효율성을 높이기 위해
- <23> 첫째, 간단하면서도 효과적인 체외 재관류 부위를 선정하여 장기이식연구에 응용하고,
- <24> 둘째, 효과적인 체외 재관류를 위한 장기의 체외 연결방법을 개발하여 제공하고,
- <25> 셋째, 체외 재관류 시간동안 장기의 기능변화를 연구하기 위한 시료의 효과적인 채취방법을 제공하려는데 그 목적을 갖는다.

발명의 구성 및 작용

- <26> 본 발명에 의하면,
- <27> 이식하려는 실험동물의 장기를 적출하여 세척하고, 장기 보존액에 저온 보관하는 장기 이식 방법에 있어서,
- <28> 상기 실험동물의 대퇴동맥과 정맥을 분리하는 단계; 및
- <29> 적출한 장기의 동맥과 정맥을 대퇴 동맥과 정맥에 카테터를 이용하여 연결하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 실험동물내 이식 장기의 체외 관류방법이 제공된다.
- <30> 이하, 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다.
- <31> 본 발명에서 이식 대상은 장기이식 연구에 이용되는 저온, 허혈/재관류 손상을 분석할 수 있는 실험동물의 신장이다. 이때 실험동물로는 이에 한정하는 것은 아니나 돼지를 사용하는 것이 좋다.
- <32> 상기 장기를 적출한 다음 세척한다. 이때 사용하는 세척액으로는 통상 입수가 가능한 0.9% NaCl 용액 1리터에 Heparine(1000U/ml) 5ml, Mannitol(25%) 15ml, NaHCO₃(8.4%) 7.5ml, KCl(2mEq/ml) 10ml를 첨가하여 냉장 보관한 용액을 사용하는 것이 좋다.
- <33>
- <34> 세척후에는 장기 보존액내에서 저온 보관한다. 이때 사용가능한 장기의 보존액으로는 University of Wisconsin Solution(이하, 'UW 용액'이라 한다)이나 HTK 용액 그외에 Uro-Collines 용액 등 다양한 보조액을 사용하는 것이 좋다. 또한, 저온이란 장기 이식분야에서 약4℃ 온도를 의미한다. 이같은 저온에서 보존시간은 24시간 혹은 48시간등 연구 목적에 따라 다양하게 응용가능한 것이다.
- <35>
- <36> 이때 장기 보존액으로서 UW 용액을 사용할 경우에는 상기 세척액에 Glutathion 0.922g/L, Heparin

5000U/L, Dexamethasone 16mg/L를 첨가하여 냉장 보관한 용액을 사용하는 것이 좋다.

- <37> 그런 다음 실험동물의 대퇴동맥과 정맥을 분리한다. 그리고, 장기 보존액내에 보관시킨 적출장기의 동맥과 정맥을 대퇴 동맥과 정맥에 각각 카테터를 이용하여 연결시킨다.
- <38> 상술한 바와 같이 본 발명의 이식방법을 적용할 수 있는 적용처로는 신장에 한정하는 것이 아니라, 동맥과 정맥을 갖는 모든 장기들에 적용가능하다. 구체적인 예로는 복강 장기로서 간, 소장, 대장, 위, 췌장, 비장과 흉강 장기로서 심장과 폐, 나아가 피부까지 다양하다.
- <39> 이뿐 아니라 장기의 전체 적출 이외에 장기의 부분 적출이 가능한 경우에도 체외 관류가 가능하다. 그 예로서 폐의 분엽절체 후 재관류, 해당 동,정맥을 포함한 내장의 부분절체후 재관류, 및 자가 피부이식 부위의 재관류 등을 들 수 있다.
- <40> 앞서 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 실험동물의 대퇴 동맥과 정맥을 이용함으로써, 장기이식 연구에 이용되는 저온, 허혈/재관류 손상을 분석 할 수 있는 최적의 체외 재관류 방법을 제공할 수 있다.
- <41> <실시예>
- <42> 상술한 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하려는 의미일 뿐, 본 발명을 이에 한정하려는 것은 아니다.
- <43> 실시예 1-돼지 신장의 자가이식 부위로서 돼지 대퇴 동,정맥의 적합성 분석
- <44> 신장은 평균 동맥혈압이 75-95mmHg 범위에서 효과적인 기능을 유지한다(Hosgood S, 2006 참조).
- <45> 실험동물로서 일반돼지 6마리를 대상으로 실험하였다. 일반적인 방법으로 마취를 실시하고 배와 자세로 고정하였다. 그런 다음 돼지의 대퇴 동맥과 정맥압, 복강 대동맥 및 후대 정맥압, 외장골 동맥과 정맥압을 측정하여 서로 비교하였다.
- <46> 이어서 대퇴부를 절개하여 대퇴 동,정맥을 노출시키고 결찰하였다.
- <47> 대퇴 동, 정맥을 부분 절개하여 침습적 혈압측정기(IBP)의 카테터를 원위에서 복강내로 삽입하였다. 조영제를 준비하고 fluoroscopy를 이용하여 카테터의 삽입위치를 확인하였다.
- <48> 이때 측정부위는 다음과 같다.
- <49> - 대퇴 동맥압(개발된 체외관류부위): 카테터를 삽입하고 바로 측정하였다.
- <50> - 외장골 동맥압(이소성 신장이식부위): 카테터에 조영제를 투입하면서 복강내에서 분지된 지점의 동,정맥압을 측정하였다.
- <51> - 신장 동맥압 : 신장 동맥을 통해 카테터를 삽입하고 신장 동맥의 혈압을 측정하였다.
- <52> 그 결과를 하기표 1에 정리하였다.

【표 1】

<53> 돼지의 신장동맥과 대퇴동맥의 혈압.

| | 신장 동맥 | | | 대퇴 동맥 | | |
|------|-------|------|--------|-------|------|--------|
| | 수축기압 | 확장기압 | 평균 동맥압 | 수축기압 | 확장기압 | 평균 동맥압 |
| 1 | 81 | 43 | 57 | 82 | 43 | 57 |
| 2 | 80 | 41 | 57 | 80 | 41 | 57 |
| 3 | 83 | 47 | 62 | 83 | 41 | 60 |
| 4 | 80 | 41 | 60 | 85 | 47 | 62 |
| 평균 | 81 | 43 | 59 | 82.5 | 41 | 56.5 |
| 표준편차 | 1.41 | 2.83 | 2.45 | 2.08 | 2.94 | 1.73 |

- <54> 실시예 2-대퇴 동,정맥 재관류 동물모델의 검증
- <55> 대퇴 동,정맥 재관류 동물모델이 신장의 저온 보관 허혈과 재관류 손상 분석에 적합한지 알아보기 위

해 6두를 24시간 저온보관 후 재관류 실험을 실시하였다.

<56> 신장 적출 및 세척

<57> 이식을 위한 장기 세척액을 제조하였다. 즉, 세척액으로는 수술 전에 0.9% NaCl 용액 1리터에 Heparine(1000U/ml) 5ml, Mannitol(25%) 15ml, NaHCO₃(8.4%) 7.5ml, KCl(2mEq/ml) 10ml를 첨가하여 냉장 보관 하였다. 저온 보관이 필요한 경우는 사용할 보존액으로 세척을 실시하였다.

<58> 이때 사용가능한 보존액으로서 UW 용액과 HTH 용액의 조성을 하기표 2로서 나타내었다.

【표 2】

<59>

| Component | UW(mmol/L) | HTK(mmol/L) |
|---------------------|------------|-------------|
| Na | 30 | 15 |
| K | 120 | 9 |
| pH | 7.4 | 7.1 |
| Lactobionate | 100 | - |
| Glutathione | 3 | - |
| Raffinose | 30 | - |
| Hydroxyethyl starch | 5 gm% | - |
| Adenosine | 5 | - |
| Histidine | - | 180 |
| Tryptophan | - | 2 |
| Ketoglutarate | - | 1 |
| Mannitol | - | 30 |

<60> 그런 다음 상기 실시예 1과 마찬가지로 통상의 방법에 따라 마취하여 신장 적출을 실시하였다.

<61> 적출한 신장의 동맥을 통해 적당한 크기의 카테터를 삽입하고, 수액 세트를 약 90 cm 높이로 설치하고 카테터를 통해 세척액을 관류하여 신장을 flushing함으로써 혈액을 제거하였다.

<62>

<63> 적출이 완료되면 donor의 출혈여부를 확인한 다음 복벽을 봉합하였다.

<64> 한편, 대퇴 동,정맥 부위의 체외 재관류 효과를 분석한 방법은 다음과 같다.

<65>

<66> 저온보존시간은 24시간, 48 시간등 다양하게 응용할 수 있으며 각각 다음과 같이 보존한다.

<67> 저온 보관 (Cold Storage)은 적출된 신장을 랩 스폰지에 싸서 신장 보관용 상자에 넣고 신장의 약 20-30배 부피의 보존액을 추가하여 4℃에 냉장 보관한다. 모든 실험군은 기존의 신장이식에 많이 이용되고 있는 UW 용액에 신장을 보관한다.

<68> 나아가, 대퇴 동,정맥 재관류 (reperfusion)실험 모델로서, 상기 실시예 1에서 기술한 방법을 반복하여 한쪽 신장이 적출된 동일한 돼지로부터 마취후 반대쪽 신장을 절제하였다.

<69> 그런 다음 대퇴 동정맥을 분리한 다음, 적출된 신장의 동맥과 정맥을 분리된 대퇴 동, 정맥에 컨넥터를 이용하여 연결하고 혈액을 흐르게 하였다. 신장을 연결하여 혈액을 재관류하기 전까지는 랩 스폰지에 싸고 격리하여 신장의 온도가 상승되는 것을 방지하기 위해 얼음 슬러시에 넣어 4℃를 유지하였다.

<70> 신장을 카테터로 연결한 다음 대퇴정맥, 동맥 순서로 차단하였던 혈액을 신장으로 흐르게 한다. 재관류 3시간 동안 매 30분마다 혈압을 측정하였다.

<71> 따라서, 본 발명에 따른 적출 장기의 체외 재관류 방법은 생체의 복강 절개와 혈관문합이라는 복잡한 이식수술을 요구하지 않으며, 더 나아가 이식 결과에 영향을 미치는 수술적 요인을 배제함으로써 장기 이식 분야의 해결 과제 중의 하나인 전문 연구인력과 고-비용 문제를 해결할 수 있는 간단하면서도 효율적인 방법임을

확인할 수 있었다.

발명의 효과

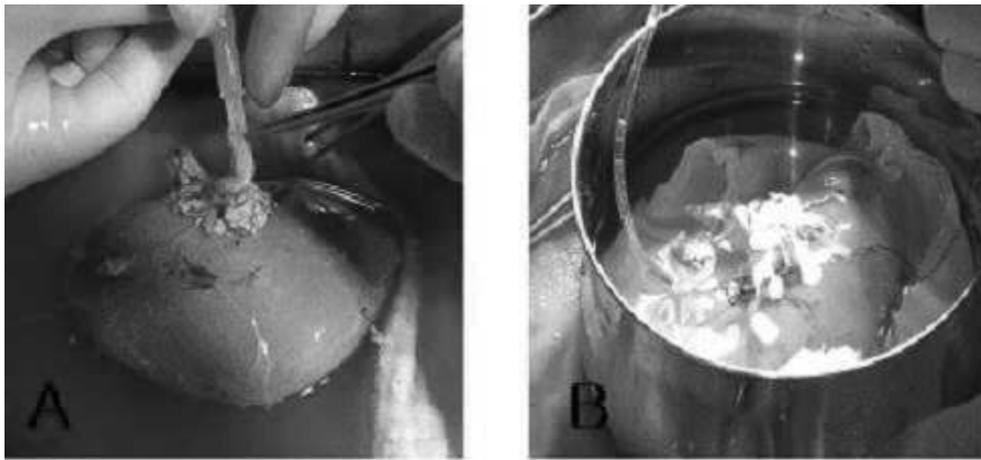
- <72> 상술한 바와 같이, 본 발명의 관류방법에 따르면, 동물실험 연구 경비를 획기적으로 줄일 수 있으며, 이식 수술에 의한 외과적 요인을 배제할 수 있도록 대퇴 동·정맥을 이용한 재관류 모델을 개발함으로써 장기 이식의 전문기술 없이도 허혈손상에 대한 연구가 가능하게 된다. 더 나아가 이식상황과 동일한 방법이므로 연구 결과의 신뢰도 또한 높게 된다.
- <73> 한편, 본 발명의 관류방법은 장기이식 분야 및 바이오산업과 밀접한 관련이 있는 축산 생명공학분야의 기술개발로 이어져 관련 산업의 활성화와 소득증대를 통해 생활수준을 향상시킬 수 있는 계기가 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

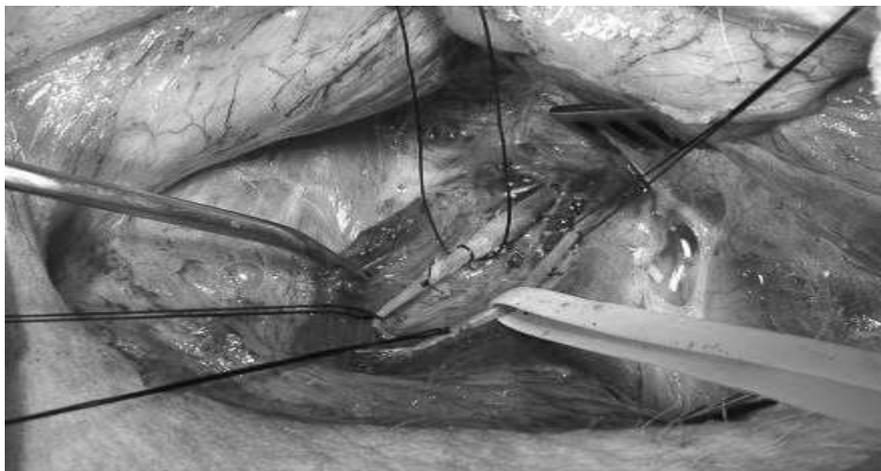
- <1> 도 1은 적출한 신장을 체외 재관류 전에 세척하고(A) 장기 보존액에 저온 보관하는(B) 사진이고,
- <2> 도 2는 적출한 장기를 체외에서 재관류하기 위해 대퇴동맥과 정맥을 분리한 사진이고, 그리고
- <3> 도 3은 적출한 신장의 동맥과 정맥을 대퇴 동맥과 정맥에 카테터를 이용하여 연결하여 체외에서 신장에 혈액을 재관류시키는 사진이다.

도면

도면1



도면2



도면3

