

기관고유연구사업 연차실적·계획서

연구분야(코드)	S-2	과제번호	1310170-Ⅱ		지원 프로그램			
과제성격(기초,응용,개발)	기초	실용화 대상여부	실용화	공개가능여부 (공개,비공개)				
연구과제명	흰쥐의 동소성 부분 간이식 모델을 활용한 작은 이식편 및 허혈-재관류 손상에 도움을 주는 약물에 관한 연구-Ⅱ							
과제책임자	소 속	간담채암연구과	직 위	장기이식실장				
	성 명	김성훈	전 공	외과				
세부과제	구분	세부과제명			세부과제책임자			
					성명	소속(직위)	전 공	
	1	흰쥐의 동소성 부분 간이식 모델을 활용한 작은 이식편 및 허혈-재관류 손상에 도움을 주는 약물에 관한 연구-Ⅰ			김성훈	장기이식실장	외과	
	2	흰쥐의 동소성 부분 간이식 모델을 활용한 작은 이식편 및 허혈-재관류 손상에 도움을 주는 약물에 관한 연구-Ⅱ			김성훈	장기이식실장	외과	
3	흰쥐의 동소성 부분 간이식 모델을 활용한 작은 이식편 및 허혈-재관류 손상에 도움을 주는 약물에 관한 연구-Ⅲ			김성훈	장기이식실장	외과		
총 연구기간	2013.01.01.~2015.12.31(총 3년)		참여연구원수 (단위: 명, MY)		11			
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립암센터	기업부담금			
	계	2013.01.01.~2015.12.31	232,000		소계	현금	현물	
	제1차	2013.01.01.~2013.12.31	80,000					
	제2차	2014.01.01.~2014.12.31	80,000					
	제3차	2015.01.01.~2015.12.31	72,000					
참여기업	명칭		전화		FAX			

기관고유연구사업관리규칙 제15조에 따라 본 사업을 성실히 수행하고자 연차실적·계획서를 제출합니다.

2014년 12월 29일
과제책임자 김성훈

(서명)

국립암센터원장 귀하

(첨부서류)

< 요약 문 >

<p>연구목표 (200자 이내)</p>	<p><최종목표> 작은 이식편 이용 부분 간이식에서 다양한 약물 투여로 인한 간재생 촉진과 이식시 발생할 수 있는 허혈-재관류 손상에 대한 mechanism을 규명하고, 손상을 줄일 수 있는 약제 연구</p> <p><당해연도목표></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 동소성 쥐 간이식 연구 기반확립과 시행으로 미세문합 기술 습득 및 임상에 적용 2. 작은 이식편 모델을 만들어 Stem cell factor, GM-CSF 등의 약물 투여 또는 수술적 조작하여 임상 변화를 관찰 						
<p>연구내용 및 방법 (500자 이내)</p>	<p>수술 전 24시간 물만 주고 금식을 시킨 뒤 절제. 기도삽관 또는 임프란액(2%)을 이용한 마취. 절개부위를 알코올로 소독하고 복부의 중앙 아래 부위에서부터 검상 연골 아래까지 절개. 공여쥐의 간은 구득후 100-200ml 정도의 4℃ 식염수가 있는 유리 비이커에 보관. 수여쥐의 전간을 적출한 후 공여쥐의 이식편을 간위 하대정맥(SH-IVC), 간문맥, 간아래 하대정맥(SH-IVC), 간동맥, 담도의 순으로 문합. 모든 조작이 끝나면 근육과 피부를 봉합하고 소독. 수술 직후 15 ml의 5% DW를 피하주사. 이식시 문합시간, 무간기, 전체간이식 시간을 기록하고 이식 후 1개월간 생존율과 유병률 및 합병증을 관찰하며 1개월간 생존한 쥐에 대해서는 실험동물을 희생하여 혈액 및 간 조직을 얻어 간기능 검사와 조직검사를 시행. 30% 동소성 간이식기술을 습득하여 Stem cell factor, GM-CSF를 투여한 실험그룹과 생리식염수만 투여한 대조그룹으로 나누어 간재생 및 간기능 검사를 시행한다.</p>						
<p>연구개발에 따른 기대성과</p>	<p><정량적 성과¹⁾></p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">SCI 논문 편수²⁾</th> <th style="width: 33%;">IF 합²⁾</th> <th style="width: 33%;">기타 성과³⁾</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>3</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 2014. 1. 1 ~ 12. 31 기간내에 현실적으로 달성가능한 성과 목표치를 기재 (논문의 경우 SSCI, SCI expanded, accepted까지 인정) 다만, 동 기간이후 발생하는 연구성과라도 기재하되 그 시점을 명시</p> <p>2) 권고안 : 사업계획 내 최소연구성과를 만족해야함</p> <p>3) 저서, 지식재산권(특허, 실용신안 등), 정부정책 반영건수 및 내용, 코호트 구축건수, 프로토콜 개발 건수, 환자등재수, 시스템 개발 내용 등 모든 연구성과를 구체적으로 기재</p> <p>정성적 성과</p>	SCI 논문 편수 ²⁾	IF 합 ²⁾	기타 성과 ³⁾	1	3	
SCI 논문 편수 ²⁾	IF 합 ²⁾	기타 성과 ³⁾					
1	3						

		간이식 및 혈관수술에 가장 중요하고 필수적인 미세수술 기법 습득 -임상에 적용하여 효과를 입증함으로써 간이식 결과의 향상 -임상에서 문제되는 작은 이식편 문제 및 허혈-재관류 모델에서 이를 개선할 수 있는 약물을 발견하여 임상에 활용할 수 있는 기초 자료로 활용함.
색인어	국문	쥐, 간이식, 작은 이식편, 허혈-재관류 손상
	영문	rat, liver transplantation, small-for-size graft, ischemia-reperfusion injury

〈 연구 분야 〉

코드구분	중심분야		관련분야1		관련분야2		관련분야3		관련분야4	
	코드	비중	코드	비중	코드	비중	코드	비중	코드	비중
국가과학기술 표준분류(적용분야)	X02	100 %		%		%		%		%
국가과학기술 표준분류(연구분야)		%		%		%		%		%
6T 기술분류		%		%		%		%		%
NTRM 분류		%		%		%		%		%

- 『첨부_연구분야 분류코드』에서 본 과제와 가장 관련된다고 생각되는 최하위 분야코드를 입력
- 분야코드는 반드시 소분류 분야코드를 기재
- 중심분야는 필수 입력사항이며, 관련분야1과 관련분야2는 선택 입력
- 각각 분류표의 비중의 가로 합계는 100%가 되도록 작성

1. 당초 연구 목표 및 연차 점검의 주요 착안점

연구목표: 동소성 흰쥐 간이식 술기 습득 및 작은 이식편 모델을 확립하여 약제 투여

주요 착안점: 위에서 획득한 경험과 기술로 70%, 50%, 30%, 20%, 10% 부분 간이식을 시행하여 그 생존율과 합병증을 관찰하며 1개월간 생존한 쥐에 대해서는 실험동물을 희생하여 혈액 및 간 조직을 얻어 간장 기능 검사와 조직 검사를 시행.

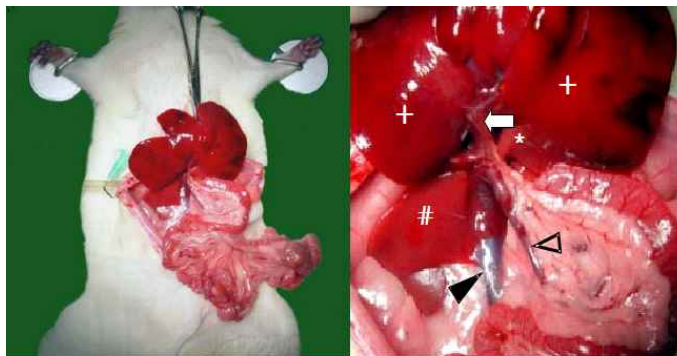
2. 연구범위 및 연구수행 방법

현재 동소성 쥐 간이식은 간이식후 면역학적 연구 및 장기 보존과 이식편 대사의 확립된 모델이다. 1973년 Lee등에 의한 쥐 간이식 기법 기술 이후 여러 연구자들에 의해 변경되어졌다. 현재 두 가지 기법이 있는데 동맥혈 공급이 없는 비동맥화 이식과 생리적인 동맥화 이식이다. 동맥화 이식 기법은 Lee등에 의해 처음 기술되었고 Engemann에 의해 변경되고 표준화 되었다. 비동맥화 이식 기법은 Kamada와 Calne에 의해 간문맥과 하대정맥의 문합에 polyethylene cuff를 이용하여 관례적인 봉합 기법을 대신함으로써 단순화 되어졌다. 동맥화 혹은 비동맥화 기법 모두 쥐에서 만족할만한 장기 생존율을 보인다. 그러나 생리적인 동맥화 기법이 간이식편의 보존된 조직학적인 양상을 띤다. 따라서 쥐 간이식편의 재동맥화의 필요성은 현재 거의 일반적으로 받아들여지고 있다. 이번 연구에 시행될 쥐 간이식 기법으로 모든 혈관문합에 미세 확대경을 써서 연구자의 손에 의한 봉합 기술을 이용하고 담도에는 stent문합을 이용하였다.

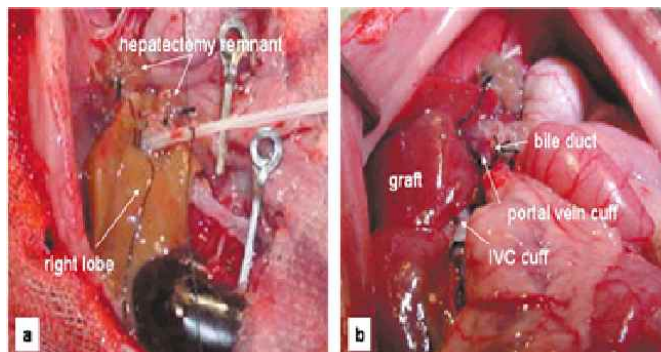
3. 연구수행 내용 및 결과

1) 동소성 쥐간이식 술기 확립 및 작은 이식편 모델 확립:

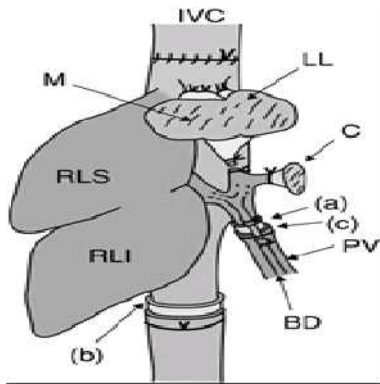
흰쥐에서 간장 이식방법: 수술 전 24시간 물만 주고 음식을 시킨 뒤 이소플루란 흡인마취(2%이소플루란 1mL/min 산소)를 이용한 마취. 절개부위를 알코올로 소독하고 복부의 중앙 아래 부위에서부터 검상 연골 아래까지 절개. 공여쥐의 간은 구득후 100-200ml 정도의 4℃ 식염수가 있는 유리 비이커에 보관. 수혜쥐의 전간을 적출한 후 공여쥐의 이식편을 간위대정맥, 간문맥, 간아래대정맥, 담도의 순으로 문합. 모든 조작이 끝나면 근육과 피부를 봉합하고 소독.



개복(좌), 간과 주변의 해부학적 사진(우)



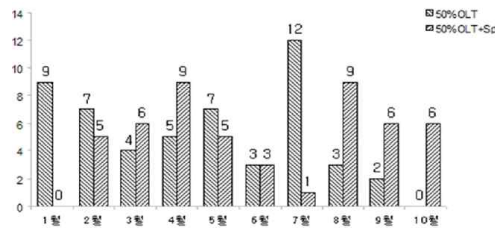
a. 공여쥐 간절제술후 20% 부분이식편을 구득전 찬식염수로 관류하고 있음
b. 이식편의 출혈이나 장 혈류정체없이 이식이 되어짐



20% 부분간이식 모식도

Completed 20% PLT. The reduced graft was composed of the superior portion (RLS) and inferior portion (RLI) of the right lobe, after resection of the caudate lobe (C), left lateral lobe(LL), and median lobe (M). Cuff extensions for portal vein (PV) and infrahepatic inferior vena cava (IVC) were cut off (a and b), and the stent of the bile duct (BD) was fixed with the cuff body for PV (c).

2015년1월~2015년10월 흰쥐 50% 간이식 모델 실험회수 및 각 군별 생존율

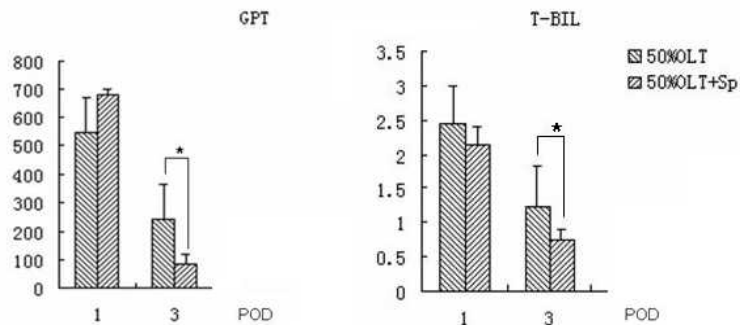


생존율 (%)

	1일	3일	5일	7일
50%OLT(n=52)	82	59	44	41
50%OLT+Sp(50)	85	69	56	56

2015년1월부터 10월 까지 총 102차례 간이식 수술 (50% 간이식 52차례; 50%간이식 및 비장절제술 52차례) 을 시행했다. 동소성 흰쥐 50% 간이식 모델 시행 시 공여 간 구득시간이 약 17-20분 소요되며, 수여 쥐의 무간 기간은 약 10분 정도 소요되었다. cold ischemic time은 약 35min 이며 50% 간이식 수술 전체소요시간은 약 50-60분 정도 소요되었다. 주요 사망원인으로는 담도 합병증에 의한 것으로 추정된다.

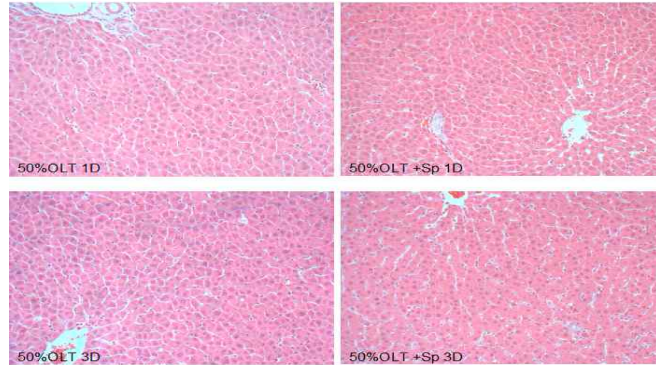
50%OLT군과 50%OLT+Sp군 간기능 비교



두 실험 군 수술 후 1,3일 GPT, T-BIL 비교결과, 수술 후 3일 50%OLT+Sp군의 혈청 농도가 50%OLT군에 비해 현저하게 낮았다.

50%OLT군과 50%OLT+Sp군 간 조직학적 비교

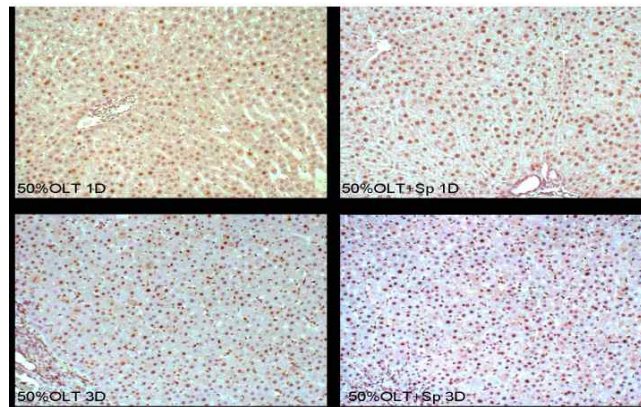
50%OLT군과 50%OLT+Sp군의 간 조직학 비교



두 실험 군 수술 후 1, 3일 간장 조직 검사에서는 현저한 차이가 보이지 않았다. 50%OLT:50% Orthotopic Liver Transplantation; Sp: Splenectomy; POD: postoperative day

50%OLT군과 50%OLT+Sp군 간장 조직내 PCNA 발현 비교

50%OLT군과 50%OLT+Sp군의 간세포 PCNA 발현 비교

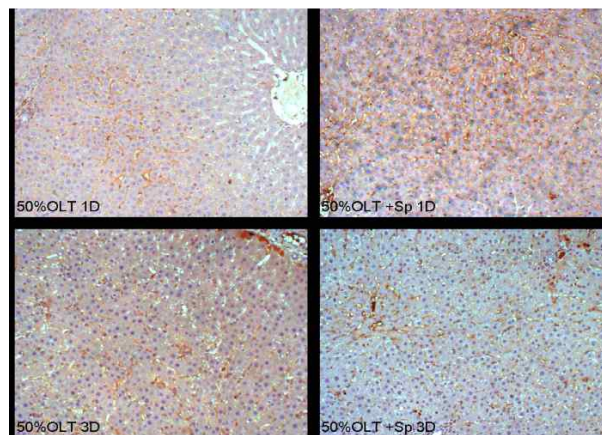


50%OLT: Orthotopic Liver Transplantation; Sp: Splenectomy

두 실험 군 수술 후 1,3일 간조직내 PCNA 발현 비교결과, 수술 후 1,3일 50%OLT+Sp군의 PCNA 발현이 50%OLT군에 비해 현저하게 높게 관찰됐다.

50%OLT군과 50%OLT+Sp군 간장 조직 내 F4/80(M-17)발현 비교

50%OLT군과 50%OLT+Sp군의 간조직 내 F4/80발현 비교



50%OLT: orthotopic liver transplantations; Sp: splenectomy

두 실험 군 수술 후 1,3일 간조직내 F4/80(M-17) 비교결과, 수술 후 1,3일 50%OLT+Sp군의 F4/80(M-17)발현이 50%OLT군에 비해 현저하게 높게 관찰됐다.

(F4/80 is considered as one of the most specific cell-surface markers for murine macrophages)

흰쥐를 이용한 90% 간장절제술 후 비장절제의 간장재생에 주는 영향

생체 부분 간이식은 간장해부학, 수술전후 환자 관리의 향상, 의료기기의 발달, 고효능 면역억제제 임상 이용 등으로 말기 간질환의 표준 치료법으로 간주되었다. 수술 후 공여자 혹은 수혜자의 합병증 중 제일 위험한 것은 급성 간기능 장애(acute liver failure ALF)이다. 그 발생원인은 다양하지만, 그중 하나로 간의 용적이 부족하여 대사 요구량을 충족시키지 못하는 small-for-size 이다. 문헌에 따르면 GRWR(graft to recipient weight ratio)비례가 0.8보다 낮으면 90일 생존가능성이 54% 보다 낮다고 보고 되었다. 그러나 small-for-size syndrome 메커니즘은 현재 명확히 밝혀져 있지 않으며 그에 관한 연구도 비교적 활발히 진행되지 않고 있다. 그 원인중의 하나로 흰쥐를 이용한 작은 용적의 이식편 모델 확립 혹은 90% 간절제 모델 확립 난이도에 있다고 생각된다.

비장은 포탈 시스템과 연결된 장기중의 하나이며, 면역체계에서 중요한 역할을 하고있다. 흰쥐 90%간절제술 후 비장절제술을 실행하면 수술 후 간장세포 재생촉진, 간기능 호전, 수술후 7일 생존율이 상승한다고 보도 되어 있다. 그 메커니즘으로는 문정맥 압력의 저하, 허혈-재관류 손상 완화, 염증 반응의 약화 등으로 추정된다. 최근 연구에서 비장절제술은 심장 허혈-재관류 손상을 완화시켰으며, 본 연구실은 비장절제술을 동시에 실행한 95%간절제술 후 7일 생존율은 (40%) 달하는 것으로 확인 됐으며, 그 주요 원인 중 하나는 단핵구 (monocyte)와 관련이 있는 것으로 추정된다.

90% 간절제 모델은 small-for-size syndrome 메커니즘의 연구, 면역억제제의 small-for-size 간재생에 관한 연구에 적합하다고 생각된다. 90% 간절제술 후 5일까지 급성 간기능 장애 증상(고빌리루빈증, 난치성 복수, 응고장애)이 나타난다. 문헌에서 90% 간절제 모델 확립 방법과 생존율(20%-100%)은 다양하다. 현재 본 실험실은 morioka D 등의 방법을 참고하여 약간의 개량을 거쳐 흰쥐를 이용한 90% 간절제 후 7일 간 생존율은 100%에 달한다.

본 연구는 90% 간장 절제 모델을 이용하여 비장제거의 작은 간 재생에 미치는 영향과 그 메커니즘을 연구하여 앞으로 작은 간 이식편 수술 후 급성 간장 기능 장애 발생 방지 방법을 연구하려 한다.

(1) 연구 내용

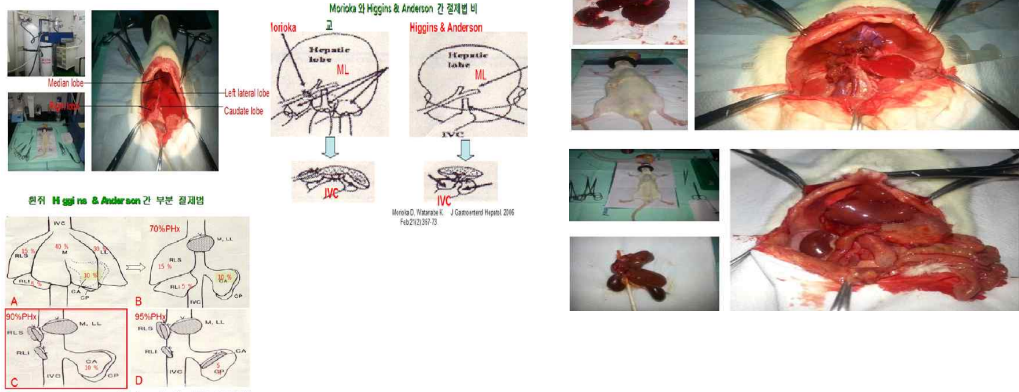
-목표: 흰쥐를 이용한 90% 간장 절제술 후 비장절제의 간장 재생에 주는 영향을 관찰하고 그 메커니즘의 해명.

(2) 연구 대상자: 7wks 흰쥐를 이용한 동물 실험

(3) 연구 방법

1) 90%간 절제방법(90% Partial hepatectomy 90%PHx): 수술 전 24시간 물만 주고 금식을 시킨 뒤 아이프란액(2%, 1L/Min O₂) 이용한 마취. 절개부위를 알코올로 소독하고 특골 하 0.5cm ,길이 약 6 cm 횡행 절개. 단시간에 걸쳐 간을 주위 조직으로부터 유리한다. 간 우엽, 중엽 공

급 문정맥을 결찰한다. 간을 적출하기 전에 three transfixing sutures를 이용하여 우, 중 간엽의 간정맥을 결찰한다. 간 좌엽, 중엽, 우엽을 차례로 적출한다. 간 caudate lobe 만 남긴다. 모든 조작이 끝나면 근육과 피부를 봉합하고 소독한다. 실험군은 수술이 끝난 즉시, 비장 절제를 진행한다. 각 군



별 수술 후 24시간(n=5마리)(n=5마리) ,72시간(n=5마리)에 혈청과 간장 조직을 구득한다.

2) 효과 판정 방법

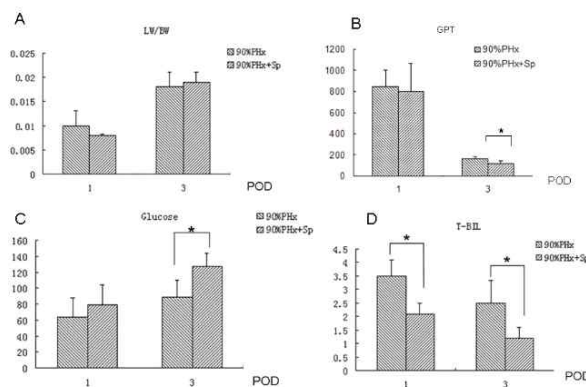
3) 간장기능 검사에서 혈청 glutamic pyruvate transaminase (GPT), Total bilirubin(T-BIL),Glucose 농도를 측정하여 간세포 손상 정도를, 광학현미경 검사를 하여 간장 조직학적 변화를 관찰하며, 간 재생 정도를 확인하는 방법으로, 증식세포핵항원지수(PCNA INDEX),CD68,F4/80 발현(IHC), 간장 조직 내 세포의 apoptosis(TUNEL) 상황, 혈청 IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 농도 측정(ELISA방법) .

(4) 연구결과

1) 혈청 간기능 검사

수술 후 간 기능을 확인하는 방법으로 각 군은 수술 후 24시간, 48시간,72시간에 하대정맥에서 혈액을 채취하여 혈청 GPT, GOT농도, T-BIL, Glucose 농도를 측정한다. 혈액은 혈청 분리 시험관(6 ml SST Vacutainer, Becton Dickinson)에서 응고시킨 후, 2500 rpm에서15분간 원심 분리하여 상층 혈청을 취하여 생화학 자동 분석기를 이용하여 측정한다.

90%PHx군과 90%PHx+Sp군 간기능 비교



90%PHx: 90%Partial Hepatectomy; Sp:Splenectomy; POD: postoperate day

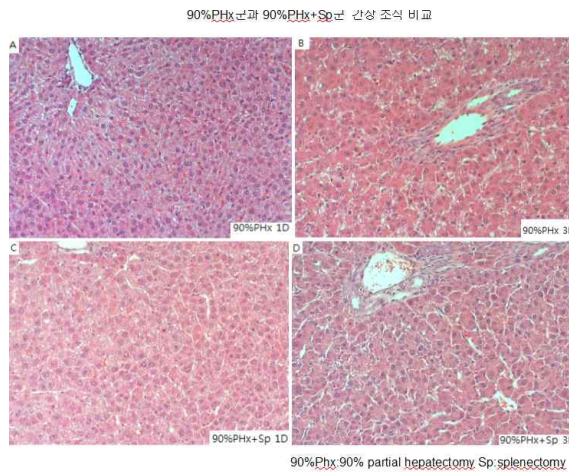
흰쥐 90%PHx후 혈청 GPT, T-BIL농도는 급격히 상승하여 수술 후 24시간에 절정에 달한다. 비

장절제술을 시행한 90%PHx+Sp군과 90%PHx군을 비교한 결과, 혈청 GPT, Glucose농도는 수술 후 3일 두군 간에 차이가 보이며, 혈청 T-BIL농도는 수술 후 1일,3일 모두 현저한 차이가 보인다.

2) 간 조직학 변화

광학현미경 표본제작

수술 후 24시간,48시간,72시간에 적출한 간 조직을 10% 포르말린(pH 7.4)에서 고정시킨 뒤, 수세로써 조직 내에 남아있는 포르말린을 제거한다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작한다. 이렇게 준비된 파라핀 블록을 회전형 박절기(microtome)를 사용하여 7~8 μ m 두께로 자른 뒤 60°C 오븐에서 15분간 파라핀을 녹인다. 슬라이드 위에 놓고 xylene과 무수알코올에서 농도 상승 순으로 알코올에 담가 탈파라핀 과정을 거쳐 수돗물에 세척한다. Hematoxylin과

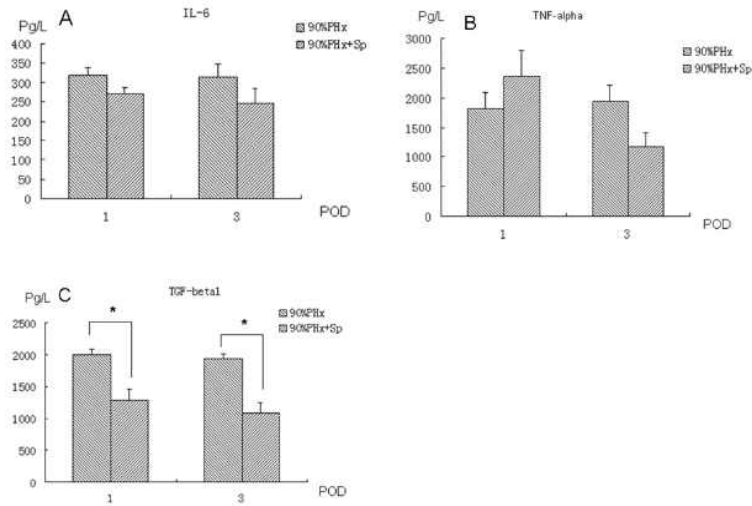


eosin으로 이중 염색한 후 광학현미경으로 관찰한다.

90%PHx 후1일,3일 간장 세포 내의 담즙 침체(cholestasis)가 현저했다. 비장 절제술을 시행한 실험 군(90%PHx+Sp군)은 대조군(90%PHx군)과 비교하여 1일 ,3일 간장 세포 담즙 침체(cholestasis) 현저하게 호전 되었다. A: 90%PHx 1D; B: 90%PHx+3D; C: 90%PHx+ 1D; D: 90%PHx+Sp 3D

90%PHx군과 90%PHx+Sp군 혈청TNF-alpha,IL-6.TGF-beta1 농도 비교

90%PHx군과 90%PHx+Sp군 혈청 TNF-alpha,IL-6,TGF-beta1 비교

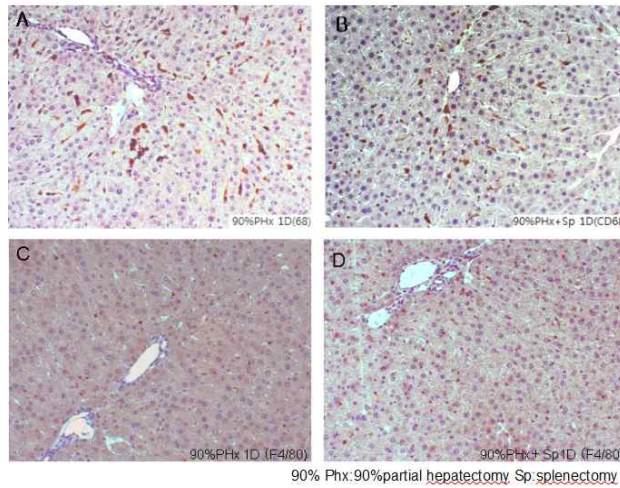


90%Phx: 90%partial Hepatectomy; Sp: splenectomy POD: postoperate day

양군 간 혈청TNF-alpha농도, 혈청IL-6농도는 차이가 보이지 않았다. 혈청 TGF-beta1농도는 90%PHx군의 농도가 90%PHx+Sp농도에 비해 현저하게 높았다.

90%PHx군과 90%PHx+Sp군 CD68,F4/80 발현 비교

90%PHx군과 90%PHx+Sp군 CD68,F4/80 발현 비교

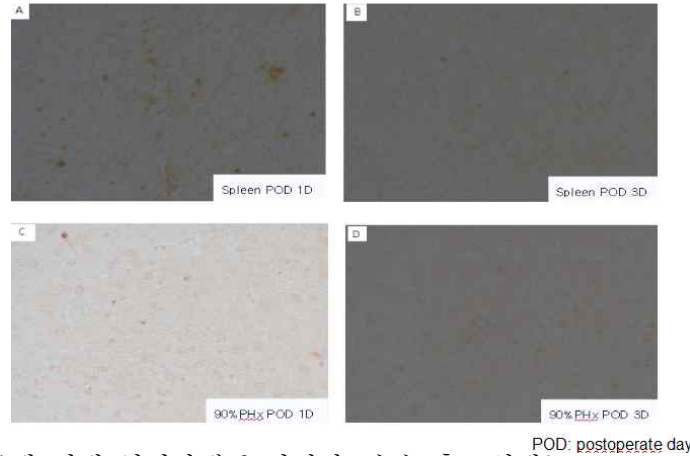


90%PHx 수술 후1일 간장 조직 내 CD68 발현 세포(쿠퍼세포)는 90%PHx+Sp군에 비해 현저하게 높았지만, 반대로 F4/80 발현은 실험 군에서 높게 발현 되었다. 수술 후 3일에는 양군 간에 차이가 보이지 않았다.

90%PHx군과 90%PHx+Sp군 간장조직 Apoptosis 비교

90%PHx 수술 후 1일 간장 조직, 비장 조직 apoptosis 세포 개수는 90%PHx+Sp군(간장 조직

90%PHx군과 90%PHx+Sp군 간장조직 Apoptosis 비교



거의 관찰되지 않음)에 비해 현저하게 높았지만, 수술 후 3일에는 apoptosis시스가 거의 관찰되지 않았다.

결론:

비장절재는 작은 간(small-for-size) 간장 기능을 호전 시킨다. 간장 세포 증식, 비장절제술에 의한 간장 쿠퍼세포의 감소(SOD 등)와 monocyte의 증가로 인한 혈관형성 촉진 등 매커니즘에 의존 한다고 생각된다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	지널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Living Donors Ages 60 and Older in Right lobe Living Donor Liver Transplantation.	김성훈 (제1/교신)	Transplantation (3.535)	2014 in press	국외 SCI	없음
Successful living-donor liver transplantation between septuagenarians.	김성훈 (제1/교신)	Am J Transplant (6.19)	2014 Oct 20. doi: 10.1111/ajt.13020. [Epub ahead of print]	국외 SCI	없음
Prognostic Significance of Preoperative Peripheral Blood Monocyte Ratio in Patients with Hepatocellular Carcinoma.	김성훈 (교신)	World J Surg. (2.348)	2014 Sep;38(9):237-85. doi: 10.1007/s00268-014-2545-8	국외 SCI	없음
Pretransplant absolute monocyte count in peripheral blood predicts	김성훈 (교신)	Hepatobiliar	2014 Jun;13(3):250	국외 SCI	없음

posttransplant tumor prognosis in patients undergoing liver transplantation for hepatocellular carcinoma		y Pancreat Dis Int. (1.167)	-8.		
Graft-to-recipient weight ratio lower to 0.7% is safe without portal pressure modulation in right-lobe living donor liver transplantation with favorable conditions.	김성훈 (교신)	Hepatobiliary Pancreat Dis Int. (1.167)	2014 Feb;13(1):18-24.	국외 SCI	없음
ABO incompatible living donor liver transplantation without graft local infusion and splenectomy.	김성훈 (교신)	HPB (2.05)	2014 Sep;16(9):807-13. doi:10.1111/hpb.12215. Epub 2014 Jan 28.	국외 SCI	없음

- 1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동
- 2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등
- 3) 지원과제번호(Acknowledgement)
 - 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분	특허명	출원인	출원국	출원번호

※구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

목 표	달성도(%)	내 요
동소성 쥐간이식 술기 습득 및 작은 이식편 모델을 확립	100%	

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
술기 습득	현재 간이식 술기는 완전 습득.

5. 연구수행에 따른 문제점 및 개선방향

연구원 확보 어려움

임상 일정 외에 동물실험 시간 확보.

6. 중요 연구변경 사항

없음

연구 방법

연구 기간 : 3년

참여 기관 : Single institute (NCC), single center (Liver cancer center)

모집 인원 : 본기관내 연구인력 (5-7명 예정)

(2) 연구 대상자

흰쥐를 이용한 동물 실험.

(3) 연구 방법

2013.1-2015.12

-내용: 다양한 소용적이식편이용 부분간이식 시행 후 stem cell factor, 및 GM-CSF 등의 약제를 투여하여 간재생 정도를 관찰한다.

1) 연구 방법:

위에서 획득한 경험과 기술로 70%, 50%, 30%, 20%, 10% 부분 간이식을 시행하여 그 생존율과 합병증을 관찰하며 1개월간 생존한 쥐에 대해서는 실험동물을 희생하여 혈액 및 간 조직을 얻어 간 기능 검사와 조직검사를 시행.

2)효과 판정 방법

간 기능검사에서 혈청 ALT와 총 빌리루빈을 측정하여 간세포 손상 정도를, 혈청 ALP를 측정하여 담도 손상 정도를 평가할 것임. 간 재생 정도를 확인하는 방법으로 간 재생 지수, 증식세포핵항원 지수, 혈청 TNF- α 와 IL-6를 측정할 것임. 광학현미경 검사를 하여 유사분열지수, 동양정맥확장정도 및 지방변성 정도를 관찰

(1) 혈청 간 기능 검사

수술 후 간 기능을 확인하는 방법으로 각 군은 수술 직후, 1시간, 24시간, 48시간에 대장맥에서 혈액을 채취하여 혈청 Alanine aminotransferase(ALT) 활성도, total bilirubin농도, glucose 농도를 측정한다. 혈액은 혈청 분리 시험관(6 ml SST Vacutainer, Becton Dickinson)에서 응고시킨 후, 2500 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 생화학 자동 분석기를 이용하여 측정한다.

(2) 재생된 간의 무게의 측정

혈역학적 변화를 측정하고, 조직 및 혈액을 얻은 후 백서를 희생하여 간의 무게를 측정한다. Sham 수술군은 수술 직후, 수술 후 1시간, 24시간, 48시간에 간 전체 무게와 대망엽의 무게를 측정한다. 대조군과 실험군은 수술하여 얻은 90% 절제간의 무게를 측정하고, 수술 직후, 수술 후 1시간, 24시간, 48시간에 대망엽을 얻어 재생된 무게를 측정한다. 90% 간 절제 후 잔존 대망엽의 재생은 다음과 같이 정한다. 전체 간무게는 정중엽과 좌엽이 68%, 우엽이 24%, 그리고 대망엽이 8%로 일정한 비율을 유지한다는 가정하에 계산한다(Eguchi 등, 1996). 처음 수술 시 제거한 간의 무게를 이용하여 수술 당시 대망엽의 무게(RLo)를 추정한다. 백서를 희생하여 대망엽의 무게(RLs)를 측정한 후 처음 계산된 무게와의 차이를 백분율로 나타낸다.

$$R(\%) = 100 \times (RLs - RLo) / RLo$$

(3) 광학현미경 표본제작

수술 후 24시간, 48시간에 적출한 간 조직을 10% 포르말린(pH 7.4)에서 고정시킨 뒤, 수세로 썬 조직내에 남아있는 포르말린을 제거한다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작한다. 이렇게 준비된 파라핀 블록을 회전형 박절기(microtome)를 사용하여 4~5 μ m 두께로 자른 뒤 60°C 오븐에서 15분간 파라핀을 녹인다. 슬라이드 위에 놓고 xylene과 무수알코올에서 농도 상승 순으로 알코올에 담가 탈파라핀 과정을 거쳐 수돗물에 세척한다. Hematoxylin과 eosin으로 이중 염색한 후 광학현미경으로 관찰한다.

1) 동양정맥 확장

100배 검경 하에서 동양정맥의 확장이 가장 저명한 곳을 선택한다. 이를 400배 검경 하에서 연속적으로 3-5개의 영상을 얻어, 동양정맥의 최장경을 영상분석장치(Image analyzer, AnalySiS ver. 3.0)를 이용하여 측정한다. 측정에 이용된 평균 동양정맥의 개수는 130-150개로 한다. 측정된 동양정맥을 3등급까지로 구분한다. 1등급은 < 8 pixel, 2등급은 8-10 pixel, 3등급은 > 10 pixel으로 정한다.

2) 지방 변성의 정도

전체 변성 정도를 %로 측정하여, 지방 변성이 없는 0등급, 1-30%는 1등급, 31-60%는 2등급, >60%는 3등급으로 정한다.

