

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001504-01

제2형 당뇨 임상 선행 모델의 유효성 평가 시스템 개발
(Development of efficacy test system for Type 2 diabetic
mellitus antecedent model for clinical study)

인하대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “제2형 당뇨병 임상 선행 모델의 유효성 평가 시스템 개발” 과제(세부과제 “제2형 당뇨병 임상 선행 모델의 유효성평가 시스템 개발”, 협동과제 “제2형 당뇨병 임상 선행 모델의 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2012년 6월 일

주관연구기관명 : 인하대학교

주관연구책임자 : 이 운 규

연 구 원 : 이 수 찬

연 구 원 : 정 재 훈

연 구 원 : 김 동 화

연 구 원 : 장 혜 정

협동연구기관명 : 메디키네틱스(주)

협동연구책임자 : 이 명 섭

요 약 문

I. 제 목

제2형 당뇨병 임상 선행 모델의 유효성 평가 시스템 개발

II. 연구개발의 목적

- 제2형 당뇨병 임상선행 동물모델 개발
- 제2형 당뇨병 임상선행 모델에 대한 유효성평가 시스템 개발
- 제2형 당뇨병 임상선행 모델의 시장공급 및 비임상 위탁대행연구 서비스 수행

III. 연구개발 내용 및 범위

- 시장에서 요구하는 임상선행 모델조건에 부합하는 동물모델을 개발함: 제 2형 당뇨병 환자 증가추세에 따른 신규 치료 물질의 표적 탐색 및 평가, 기존 치료제의 재평가, 생물학적인 발생기전 연구에 대한 수요증가 대비.
- 제2형당뇨임상선행모델을 활용하여 효과적인 유효성평가시스템을 개발함: 임상 선행 연구, 시험, 평가에 사람과 해부학적, 생리학적, 유전학적으로 유사한 임상 선행 모델과 이를 이용한 효력평가의 필요성 및 중요성에 부응하고자 함.
- 제2형당뇨임상선행모델의 시장공급과 이를 활용한 유효성평가시스템의 서비스체계를 확립함: 참여기업에서 이미 상용화한 미니돼지 생산, 위탁 및 계약연구사업을 통하여 임상 선행 모델과 그 평가시스템을 시장에 공급함으로써 수입대체 및 수출 전략 품목으로 육성하고자 함.

IV. 연구개발결과

- 제2형 당뇨병 임상선행 동물모델 개발완료 및 관리, 분석체계 확립.
- 제2형 당뇨병 임상선행 모델에 대한 유효성평가 시스템 개발: 유효성평가에 필요한 모든 Documentation, Procedure 구축. 제2형 당뇨병에 대한 positive control 시스템 확립. 외과적 수술에 의한 치료법 확립
- 제2형 당뇨병 임상선행 모델의 시장공급 및 유효성평가 시스템 구축: 제2형 당뇨병 임상선행 모델의 비임상 위탁연구대행서비스를 통한 참여기업의 새로운 매출 분야 구축.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

기술적인 측면	경제 산업적 측면
<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 기존의 설치류 및 비설치류 실험동물에 비해 한 단계 진보된 개념의 임상 선행 모델을 참여기업의 미니돼지를 기반으로 개발 완료함. <input type="checkbox"/> 제 2형 당뇨병 임상 선행 모델과 이 모델을 이용한 유효성평가의 pilot study를 통하여 이 질병의 치료제 및 기능성 식품의 개발과 유효성 평가에 필요한 임상 선행 모델 생산 기술을 개발 완료함. <input type="checkbox"/> 수입산 임상 선행 모델을 국내 기술만으로 개발하여 수입대체 효과와 실험동물 분야의 기술적 도약을 가시화 함. <input type="checkbox"/> 논문, 특허 및 제품 (3P)의 분석에 의하면 제 2형 당뇨병 임상 선행 모델에 대한 국내 연구개발 전례가 없음. 본 연구를 통해 기존의 약화 계약연구의 저변을 확대시키고 고부가가치 사업화를 이룰 수 있는 기반기술을 확보함. 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 신약 및 기능성 식품의 전 임상 및 임상에 필요한 막대한 경제적 비용, 노력과 시간을 절감할 수 있고 시장에서 요구하는 상품성 있는 제품 개발에 기여하여 부가가치를 높일 수 있음. <input type="checkbox"/> 당뇨병 치료제 및 기능성 식품의 상품화에 필요한 전임상 및 임상 단계는 전체 기술 및 제품 개발에서 70%이상을 차지할 정도로 막대한 비중을 차지하고 있으며, 그 유효성을 보다 효과적이며 적절하게 사전에 탐색할 임상 선행 모델을 통하여 개발 비용 및 시간을 절감할 수 있음. <input type="checkbox"/> 유럽 등 선진국과 국내에서 이미 시행되고 있는 동물 보호 관련법 (동물보호법) 및 실험동물 대체법의 대안으로 임상 선행 모델을 개발하고 기존의 설치류 및 비설치류 공급 위주의 실험동물산업의 한계를 극복할 수 있음.
상품화 및 사업화 방법	
<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 제 2형 당뇨병 임상 선행 모델 개발 기술의 표준화를 통한 지식재산권 등록 및 국내외 유명학술지에 연구결과를 등재할 계획. <input type="checkbox"/> 또한 본 연구를 통해 개발된 제 2형 당뇨병 임상 선행 모델은 참여기업의 국내외 영업 및 마케팅 networks를 통하여 주로 약물 및 기능성 식품의 비임상 계약연구서비스로 매출 증진할 계획. <input type="checkbox"/> 외과적 수술법에 대한 발전된 컨셉 및 기술력 개발을 통해 부가가치 증대 계획. 	

SUMMARY

Diabetes mellitus (DM) encompasses a heterogeneous group of disorders with the common characteristic of elevated blood glucose, i.e., hyperglycemia, due to disruption in metabolism of carbohydrates, fat, and protein, resulting from impaired insulin secretion. Use of appropriate animal models for type II DM is important for understanding its pathogenesis, and development and testing of therapeutics for treatment of this disease. Among the entire animal models, pigs share the structure and function of the gastrointestinal tract, the development and morphology of the pancreas, and overall metabolic status with humans and have also demonstrated comparable pharmacokinetics of the compound via subcutaneous administration with humans; therefore, use of pigs might be a good alternative for replacement of rodents for use in diabetes research. Owing to their small size and ease of handling, even at full maturity, minipigs were found to be suitable for use in long-term studies. The pancreas of minipigs resembles the human pancreas in size, shape, and position. In addition, the amino acid sequences of insulin between pig and human differ only in a single residue.

STZ (streptozotocin) is a chemical that is particularly toxic to insulin-producing pancreatic β -cells in mammals. The treatment with STZ with nicotinamide (NIA), which modulates STZ-mediated β -cell destruction and reduces its severity, has been widely used for induction of type II DM in animal models, including mouse, rat, hamster, and Göttingen minipig. However, variability in establishment of STZ-mediated DM, including both type I DM and type II DM, has restricted development of a general protocol using STZ alone as well as STZ with NIA. Therefore, testing and optimization of procedures for induction of type II DM for the new line of animals is worthwhile. In this study, in order to establish a useful animal model for diabetes research, we performed induction of type II DM in Micropig[®], which differ from Göttingen minipigs. The Micropig[®] is a breed of laboratory swine developed and maintained until 2005 by the Medikinetics(MK) breeding program for biomedical research and nonclinical trials.

In this study, we have the following results.

1. We reported that the minipig model developed in this study can be used for testing of the efficacy of therapeutic agents for treatment of Type II diabetes mellitus.
2. We have checked the entire documentation and procedure for the service system of non-clinical efficacy test.
3. We confirmed that 1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride is a suitable positive control of the efficacy test system for the type 2 diabetic mellitus antecedent model.
4. We have tried and confirmed the duodenal bypass surgery as a therapeutic approach of type 2 diabetic mellitus with the model developed.
5. As a overall, we are ready to support the model developed into the industry of non-clinical evaluation process.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	6
Section 1. Objectives -----	6
Section 2. Rationale -----	6
1. Definition of diabetic mellitus -----	6
2. Diagnostic criteria of type 2 diabetic mellitus -----	7
3. Importance and disease incidence of type 2 diabetic mellitus -----	7
4. Importance of laboratory animal model for the drug development -----	8
5. Importance of the establishment of efficacy test -----	10
Chapter 2. Status of technology -----	11
Section 1. International status -----	11
Section 2. Domestic status -----	11
Chapter 3. Experimental results and discussion -----	12
Section 1. Establishment of efficacy test system -----	12
Section 2. Development & analysis of type 2 diabetic mellitus antecedent model -	15
Section 3. Efficacy test of type 2 diabetic mellitus antecedent model with drug -	17
Section 4. Efficacy test of type 2 diabetic mellitus antecedent model with surgical therapy -----	18
Chapter 4. Achievements and contributions -----	23
Section 1. Research objectives and points of evaluation -----	23
Section 2. Achievements and contributions -----	23
Chapter 5. Research outcomes and applications -----	24
Section 1. Research outcomes -----	24
Section 2. Applications of research outcomes -----	24
Chapter 6. Scientific and technical information obtained from international collaboration -	26
Chapter 7. References -----	27
Chapter 8. Supplements -----	30

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	6
제 1 절 연구개발의 목적 -----	6
제 2 절 연구개발의 필요성 -----	6
1. 당뇨병의 정의 -----	6
2. 당뇨병 진단기준 -----	7
3. 제 2형 당뇨의 중요성과 국내외 발병률 -----	7
4. 당뇨병 치료제와 치료제 유효성평가 시스템 확립을 위한 실험동물의 중요성 --	8
5. 유효성평가 시스템 확립의 중요성 -----	10
 제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	 11
제 1 절 국외 기술개발 현황 -----	11
제 2 절 국내 기술개발 현황 -----	11
 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 -----	 12
제 1 절 유효성평가 시스템의 확립 -----	12
제 2 절 제 2형 당뇨 임상 선행동물의 개발 및 분석 -----	15
제 3 절 약물을 통한 제 2형 당뇨 임상 선행동물의 유효성 평가 -----	17
제 4 절 외과적 수술을 통한 제 2형 당뇨 임상 선행동물의 유효성 평가 -----	18
 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	 23
제 1 절 연구목표 및 평가의 착안점 -----	23
제 2 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	23
 제 5 장 연구개발 성과 및 연구성과 활용계획 -----	 24
제 1 절 연구개발 성과 -----	24
제 2 절 성과활용 계획 -----	24
 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보 -----	 26
 제 7 장 참고문헌 -----	 27
 제 8 장 부록 -----	 30

제 1 장 연구개발과제의 개요

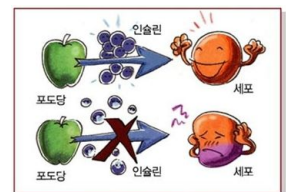
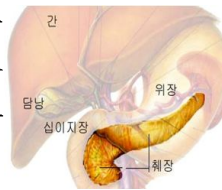
제 1 절 연구개발의 목적



제 2 절 연구개발의 필요성

1. 당뇨병의 정의

▷ Diabetes Mellitus (당뇨병)이라는 어원은 그리스말로 “당 (mellitus)이 낭비된다 (to run through)”는 뜻으로서 포도당이 열량으로 이용되지 못하고 소변으로 빠져나가 낭비된다는 것임.



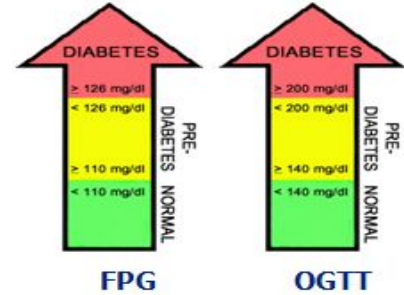
- ▷ 정의: 혈중 포도당이 세포 속으로 들어가지 못해 혈당이 비 정상적(고혈당)으로 올라가는 병
- ▷ 원인: 다른 질환이나 고혈압, 과식, 스트레스, 유전, 비만, 운동부족, 임신 등
- ▷ 증상: 점진적으로 나타나며 대부분 증상이 없는 경우가 많음

- 인슐린: 췌장에서 분비되어 영양분을 간, 근육, 지방조직에 저장하는 역할을 하는 호르몬.
- 제1형 당뇨병: 전체 당뇨병 대상자의 10%로 인슐린 분비가 거의 안 되는 상태. 인슐린 의존형 당뇨병으로서 보통 30세전에 급성발병.
- 제2형 당뇨병: 전체 당뇨병 대상자의 90%로 인슐린 분비도 부족하면서 인슐린 저항성을 동시에 가지고 있는 경우. 보통 성인 이후에 발병하며 제2형 당뇨병환자 90%이상이 비만임 (Georg and Ludvik, 2000; Nyholm *et al.*, 2000; Harris, 2004).

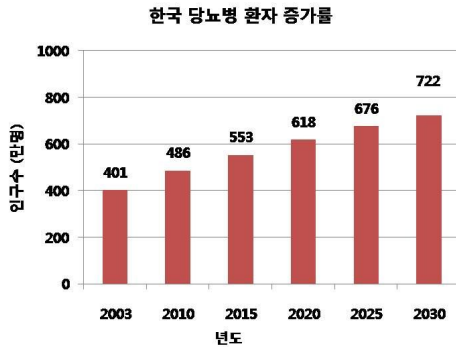
2. 당뇨병 진단기준

- ▷ 진단기준: 당부하시험전후의 혈당농도(mg/dl)
- ▷ 경구내당능시험(OGTT): 공복에 75g의 포도당을 경구투여하면서, 투여직전(공복), 투여 후 1시간째, 2시간째의 혈당을 측정하여 위 표 기준에 따라 진단
- ▷ IGT(impaired glucose tolerance): 향후 당뇨병이 될 확률 높음(내당능장애)
- ▷ IFG(impaired fasting glucose): FPG시험에서 비정상적 혈당을 보인 경우 [FPG: fasting plasma glucose]
- ▷ HbA1c(glycosylated hemoglobin): 지난 2~3개월의 glucose level의 척도로 쓰임(정상:6%이하, 당뇨병:7%이상)

시간	정상	IFG/IGT	NIDDM
공복	<109	110~125	126<
1시간	<180	200<	200<
2시간	<140	140~199	200<



3. 제2형 당뇨의 중요성과 국내·외 발병율



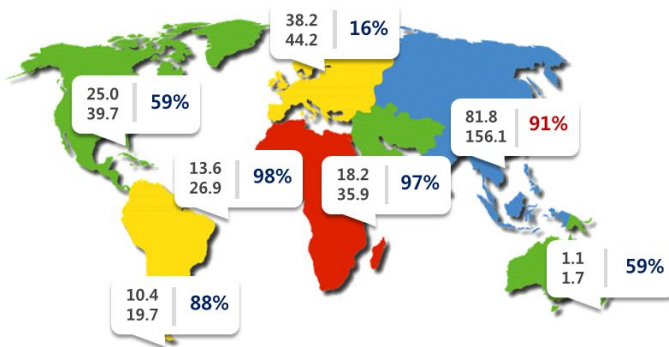
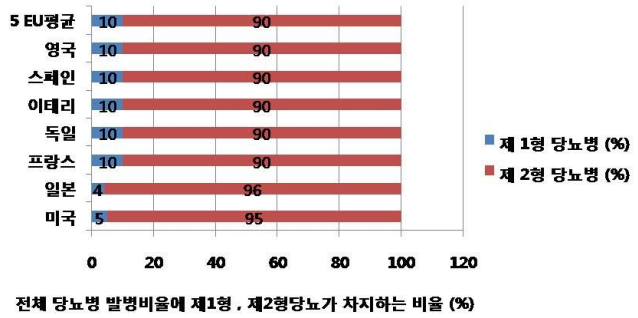
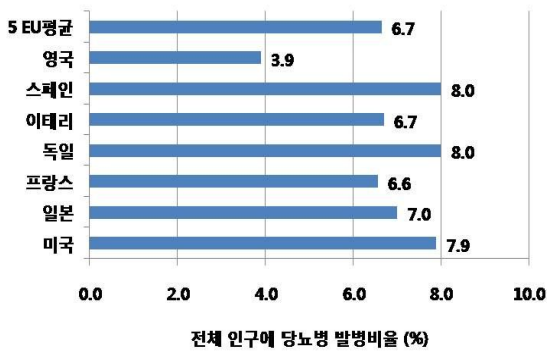
[각 나라별 증가율]

한국 5.1배(30년간), 인도네시아 3.8배(15년간),
 중국 3.4배(15년간), 타이 3.8배(30년간),
 인도 4배(20년간), 싱가포르 2.1배(7년간),
 대만 1.6배(10년간)

- 세계적으로 당뇨 등 대사증후군 질환이 환경변화와 부적절한 식생활로 인하여 급속도로 증가하고 있음.
- 비만과 당뇨병은 ‘당뇨대란’이라는 말이 나올 정도로 질환 자체의 규모가 크고, 그로 인한 많은 합병증을 동반하는 심각한 만성질환임.
- 당뇨병 치료목표는 병 진행을 정지시키는 것과 동시에 당뇨병에서 빈발하는 합병증의 발생 및 진전을 예방하는데 있음.
- 건강보험 심사 평가원에 따르면 국내 인구 중 당뇨발생 가능성이 높은 사람을 포함한 혈당 환자는 전 인구의 10%인 약 500만 명으로 추정되며, ‘당뇨예비군’인 대사증후군환자 500만 명을 합치면 1,000만 명이 당뇨병 위험에 처해 있는 실정임.
- 또한 아시아 각 국의 제2형 당뇨병 인구가 서양에 비해 증가속도가 높고, 젊은연령층에 발생하는 것으로 보고됨.
- 인슐린의 비의존성 당뇨 (제 2형 당뇨)에 의해 여러 합병증, 심혈관계 이상, 고지혈증, 압 등 다양한 만성질환의 원인이 되며 특히 당뇨병 환자에게 있어서 암 발생률은 비 당뇨병 환자에 비해 40%정도 높다고 보고 하였으며 한국을 포함한 아시아 지역의 당뇨병사망자가 연간 200만 명이 될 것이라고 보고하고 있음 (세계일보 2009년 8월 기사).
- 또한 이 기사에 의하면 2007년 전 세계적으로 2억4천만 명이던 당뇨 환자가 2025년에는 3

억8천만 명으로 급증하고, 그 중 60% 이상이 아시아 환자가 될 것으로 전망하였음.

- 세계 3대 시장 조사 기관인 데이터 모니터 (www. datamonitor. com)의 2007년 자료 의 하던 전체국민 중 당뇨병 환자 발생비율은 미국이 7.9%이며 일본은 7.0%로 보고하였음. 또 한, 프랑스 6.6%, 독일 8.0%, 이태리 6.7%, 스페인8.0%, 영국 3.9%로서 이들 5개 유럽연합 국가의 평균당뇨병발병비율은6.7%정도이며, 전체 당뇨병 발병 비율에 비해 제 2형 당뇨가 차지하는 비율은 90~95%로 분석하였음.



• 출처: Datamonitor, Stakeholder Insight: Type 2 Diabetes, 2007

2003 = 1억8천9백만 / 2025 = 3억2천4백만 [72%증가]

- Zimmet. P (2000)에 의하면 세계적으로 당뇨병은 평균 1995년에 비하면 2010년에 약 85%으로증가할 것이라고 보고 하였음.
- 따라서 당뇨병 치료제에 대한 시장은 대단히 크다고 할 것이며 성장속도또한 매우 빠름 (41억불, 20% 성장/년).
- 또한 임상 시, Parameter 및 1차 Clinical End Point들이 다른 질병보다 명확한특징을 가지고 있음(Glucose, Insulin, HbA1c).

4. 당뇨병 치료제와 치료제 유효성평가 시스템을 확립을 위한 실험동물의 중요성

- 성인병으로 알려진 제 2형 당뇨가 요즈음엔 청소년들에서도 발병하고 있어 치료제를 개발하기 위한 경쟁이심화되고 있음 (Rotella DP., 2004).
- 당뇨병의 지속에 의해 여러 합병증 유발과 결국 사망까지 초래하는 심각한 질환이지만 아

직까지 시판되어온 당뇨병 치료제는 심각한 부작용을 나타내는 경우가 많이 있음. 따라서 기존약물의 부작용을 보완하거나, 새로운 효능을 갖는 새로운 당뇨병 치료제의 개발이 시급한 실정임.

당뇨병 치료제: 경구 투여용

	종류	기능
Biguanide	metformin	
Thiazolidinedione	pioglitazone	PPAR γ 를 활성화
	rosiglitazone	PPAR γ 를 활성화
α -glucosidase 억제제		소장에서 탄수화물 흡수 지연
sulfonylureas		췌장의 β -세포에서의 인슐린 분비 촉진
non-sulfonylureas		췌장의 β -세포에서의 인슐린 분비 촉진

- 제 2형 당뇨병 치료제로 Biguanides에 속하는 pheformin과 metformin이 1957년부터 사용되기 시작하였으나 pheformin은 젖산과다증의 부작용을 나타내어 많은 나라에서 사용이 금지되었음 (Bailey CJ., 1992).
- Metformin은 제2형 당뇨병 치료제로 현재 세계적으로 가장 많이 사용되고 있으나 주요부작용이 소화기관에서 나타남.
- 현재 가장 많이 사용되고 있는 PPAR계 의약품의 경우는 시판중인 글리타존 (Glitazone) 계열 제품으로서 2002년 통계에 의하면 전 세계적으로 24억불 이상의 매출을 올린 것으로 보고되고 있으나 부작용의 개선이 절실히 요구되어 왔음. 또한, Thiazolidinediones, α -Glucosidase 억제제가 당뇨병 치료제로 사용되고 있으나 이 약들도 임상시험 결과 또한 여러 부작용이 보고되어 뛰어난 효능을 가진 새로운 치료제 개발을 위한 연구가 계속될 전망이다 .
- 이상과 같이 다양한 기능과 효능을 가진 치료제 개발에 있어 전임상에서 치료제에 대한 안전성과 유효성검사는 전체 신약개발과정에 있어 초기단계의성패를 좌우할 수 있는 대단히 중요한 단계라 할 것임.
- 지금까지는 전 임상 동물 모델로 db/db와 ob/ob mouse가 사용되어 왔으나 최근 당뇨병마우스모델의결함이일부밝혀지고 있어 약물 표적 연구에 필요한 새로운 연구 모델이 필요하게 되었음 (Vassilopoulos *et al.*, 2009).
- 마우스의 질환 모델수준은 사람과 생리 현상과는 많이 다르지만 지금까지 어쩔 수 없이 형질 전환 생쥐를 이용하여 당뇨병에 대한 발생원인, 신약 연구 등을 하고 있음.
- 통상, 정상의 생쥐가격이 수천원에 이르지만 당뇨병 모델 생쥐는 그 가격이 수만원에서 수십만원에 이를 정도로 고가의 가격임.
- 사람과 생리적으로 매우 유사한 돼지를 이용하여 당뇨병 실험 결과를 얻을 수 있다면 보다 효과적으로 임상에 적용할 수 있을 뿐만 아니라 그 과학적 가치를 인정 받을 수 있을 것임 (Miller and Ulrey, 1987; Barth *et al.*, 1990; Swindle and Smith., 1998).
- 그리고 질환 돼지 모델의 가격 또한 그에 준한 매우높은부가가치를 가질 것으로 예상됨.
- 제 2형 당뇨 미니돼지 모델 개발 연구는 바이오 장기연구라는 최종 목표점에 대한 과정상의 중간 산물이며 질환돼지모델개발연구사업 그 자체가 국부를 창출 할 수 있는 경제적

가치 매우 높은 연구 프로젝트가 될 것임.

- 현재 메디키네틱스(주)에서는 미니패지를 활용한 의·약학 계약연구서비스를 통하여 다양한 질병모델의 사업화에 성공하였고 (Lee PY *et al.*, 2010) 지속적인 연구개발을 통하여 부가가치가 높은 질병 모델을 개발하고 있음.

5. 유효성평가 시스템 확립의 중요성

[산업체연계부진원인]

기술이전/공동개발 참여 검토를 위한 근거자료 부족



- **질�효능**에 대한 전문적 평가 미비
- 시장성, 임상적용 가능성에 대한 검토 미비
- “**제품화단절**” 현상이 심각함

- BT/HT 기초연구성과의 **제품화연계**를 위해선 산업 체로의 기술이전이나 공동개발이 필수 임.
- 산업체 참여의 전제조건인 사업성과 기술적 성공가능성을 검토할 충분한 **근거자료부족**.
- 초기단계 **신속한의사결정지연**으로 시장가치 잠식에 따른 개발 포기 사례 발생.
- 국가 연구지원에서 초기 시제품발굴에서 비임상연구분야에 대한 **단절현상이심각**하며 특히 유효성평가 부분에선 산업화된 부분이 대단히 제한적임.
- 따라서 타겟 발굴부터 제품의 상용화에 있어 비임상 유효성평가 부분이 **현재 flow의 bottle-neck**임.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

- 유럽 및 미국에서 연구된 제 2형 당뇨 동물 모델은 현지에서 육종되어 보급된 미니돼지를 기반으로 연구되었으며, 이는 메디키네틱스(주)에서 생산 및 보급하고 있는 의·약학 연구용 미니돼지와는 **유전학적으로 계통이 다른 중형급** (성체 기준 40-50 Kg) 이상의 미니돼지로서 제법 및 제품의 규격과 활용이 상이함 (주로 독성 실험에 활용됨).
- 현재까지 미니돼지를 활용해서 제2형 당뇨모델로서 보고된 예로서는 **Yucatan** (Panepinto *et al.*, 1982; Korte *et al.*, 2005; Sebert *et al.*, 2005; McKnight *et al.*, 2012), **Sinclair** (Dixon *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001, Duncker *et al.*, 2012), **Gottingen** (Larsen *et al.*, 2003; Larsen and Rolin, 2004), **Yorkshire** (Askari *et al.*, 2002; Natarajan *et al.*, 2002; Eldor *et al.*, 2010, Koopmans *et al.*, 2011), **Lberian** (Torres-Roviral *et al.*, 2012) 등이 있음. 그러나, 이의 대부분은 기초적인 연구단계를 보고한 예에 한하며 이를 **상용화한 예는 아직 없는 상태임**.
- 외국에서 제2형 당뇨모델로서 상용화하여 사용되는 예로서는 약물치리에 의한 동물모델을 제작하는 방법 이외에도 유전적 변형을 통해 병변을 나타내는 생쥐나 랫트가 사용되고 있음. 이러한 예로서는 **ob/ob mouse** (C57BL/6J-ob/ob, mutated leptin), **db/db mouse** (C57BL/6J-db/db, mutated leptin receptor), **Zucker fatty rat** (Crl:ZUC-*Lepr*^{fa}, nonfunctional leptin receptor) 등이 사용되고 있음. 최근에는 high fat diet에 의해 당뇨병을 유발하는 **DIO 생쥐**가 보다 사람의 당뇨 병변과 유사성을 나타내어 그 효용성이 좋은 것으로 보고되고 있으나 제작비가 다른 동물모델에 비해 많이 든다는 단점이 있음.

제 2 절 국내 기술개발 현황

- 국내에서는 관련 기술의 개발 및 제품의 **상용화 예가 없으며** 관련 연구 또한 이루어지지 않고 있으나 **필요성에 대한 인식 및 저변이 서서히 증대되고** 있는 상황임.
- 제 2형 당뇨 동물 모델은 주로 mouse나 rat에서 만들어졌는데 **Streptozotocin(STZ)**과 **Nicotinamide(NIA)**를 병합 주사하여 insulin 분비 췌장 세포가 apoptosis, necrosis, T cell 공격에 의해 사멸되도록 유도를 하여 제작하였으며 국내에서도 이와 같은 방법을 이용하여 상용화에 이용하고 있음.
- 최근에는 **형질전환기법**을 활용하여 돼지모델을 제작하는 시도(Kim *et al.*, 2012)도 이루어지고 있으며, 이러한 기술적 발전에 있어서는 세계적인 수준에 근접한 것으로 판단이 됨.
- 현재까지 제 2형 당뇨 임상 선행 모델은 국내에서는 상용화된 예가 없음. 돼지모델과 관련하여서는 특히 바이오 의·약학 분야가 다른 학문 분야에 비해 **활발히 논문이 투고되고** 있는 실정임. 현재 이 분야에서 투고된 논문의 수는 1999년에 비해 약 2배정도 증가 추세임. 따라서 앞으로 **더욱 발전이 기대되는 연구 분야**임.
- 메디키네틱스(주)는 Nucatan 과 Gottingen 과는 다른 독자적인 breeding 프로그램을 통해 Micropig®라는 minipig brand를 개발하여 이를 실험동물 모델로서 상용화 하고 있음.
- 메디키네틱스(주)에서 개발하고자 하는 제 2형 당뇨 임상 선행 모델은 국내에서 육종 및 생산된 미니돼지로서 이미 상용화되어 해외로 수출되는 **성체 기준 20Kg이하의 소형급**으로 활용성이 보다 광범위하고 **사업화에 근접한 제품**이 되리라 기대됨.

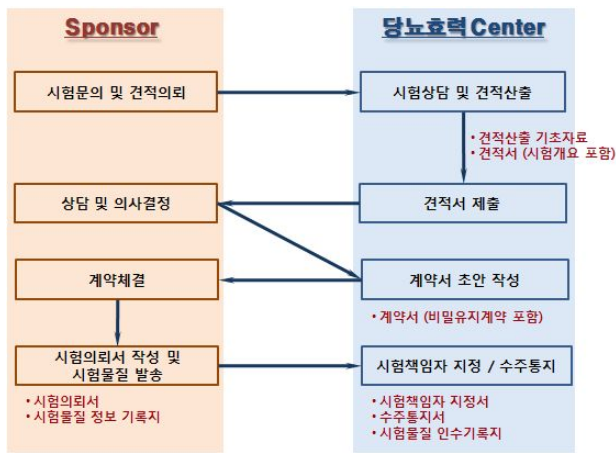
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 유효성평가 시스템의 확립 (1년차, 인하대학교)

제2형 당뇨 임상 선행 모델을 이용한 유효성평가 시스템을 구축하기 위하여 먼저 전체적인 유효성평가 시스템에 대한 진행절차 및 이에 필요한 서류들을 구분하여 이를 확립하였으며 이를 토대로 실제 동물모델을 이용한 simulation을 통해 이를 확인하였음.

1. 유효성평가 시스템에 대한 진행절차 및 필요서류 확립

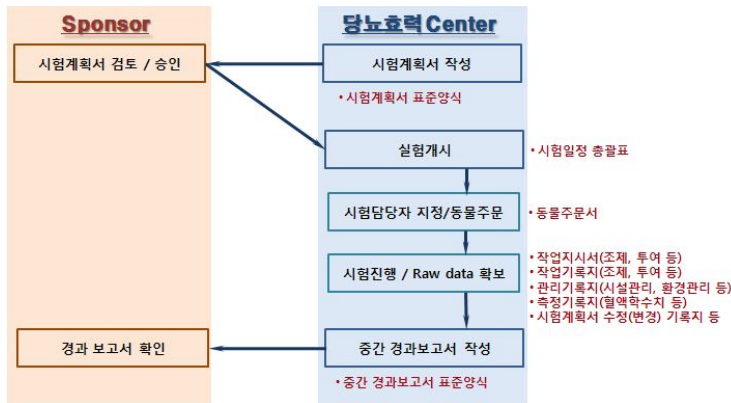
가. 제1단계 유효성 수탁시험업무 process: 시험수탁 및 준비단계



- 견적산출 기초자료: 견적금액 산출을 위한 표준 산정 표.
- 견적서: 간단한 시험개요 및 측정 항목 등이 포함되어 있는 것이 보다 효과적임[부록1].
- 계약서: 비밀유지 계약을 따로 할 수도 또는 내용을 포함 할 수도 있음.
- 시험의뢰서: 시험의뢰자의 의뢰 승인서류로 시험에 대한 세부적인 의뢰내용 및 의뢰자 서명이 필요.
- 시험물질 정보기록지: 의뢰한 시험에 사용할 시험물질에 대한 세부적인 자료(시험물질 성적서 첨부필요).
- 시험책임자 지정서: 내부적으로 시험책임자를 지정하는 서류.
- 수주통지서: 시험책임자에게 시험의뢰서를 바탕으로 시험의 세부 내역 및 계약내용을 정리하여 전달하는 서류.
- 시험물질 인수기록지: 시험물질 인수 시 시험물질의 양, 전달조건 및 방법 등을 명시한 인수확인을 위한 서류.

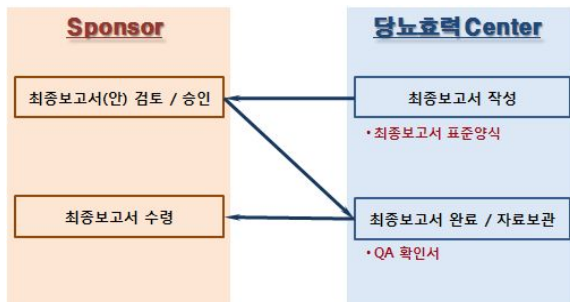
나. 제2단계 유효성 수탁시험업무 process: 시험진행단계

- 시험계획서: 시험의 일정 방법 등 모든 사항이 포함된 서류로 시험책임자 및 운영책임자의 서명 필요.
- 시험일정 총괄 표: 현재 회사에서 진행되어지고 있는 모든 시험일정을 한눈에 볼 수 있도록 정리한 표.



- 동물주문서: 시험에 필요한 동물을 주문하기 위한 서류로 시험 담당자가 작성하고 시험책임자가 승인.
- 작업지시서: 조제지시서, 투여지시서, 각종 항목 측정 지시서, 각각의 실험 내용에 대한 상세한 설명이 포함된 지시서(시험책임자 작성).
- 작업기록지: 조제, 투여 등 각종 실험 진행시 수행결과를 직접 기록할 수 있도록 한 서류 (시험담당자 및 책임자의 서명 확인이 필요).
- 관리기록지: 동물실험실 온,습도 관리 및 환경관리를 위한 각종 조치에 대한 실제 기록(온습도 기록지, 청소기록지, 소독 기록지 등; 실험실 관리 담당자가 작성하여 시험책임자의 확인이 필요).
- 측정기록지: 기계적인 측정이나 효력 측정을 위한 Biomarker 측정 시 모든 기기로부터의 출력물이나 raw data는 기록되어야 함 (시험책임자 최종승인).
- 시험계획서 수정(변경) 기록지: 시험 진행 중 시험계획서의 내용과 다르게 시험을 진행하였거나 해야 할 경우 수정(변경)사항을 기록하여 시험책임자가 작성하여 의뢰자의 최종 승인을 받아야 하는 서류.

다. 제3단계 유효성 수탁시험업무 process: 시험종료단계



- 최종보고서: 모든 시험결과를 토대로 한 최종 결과 보고서 (시험책임자 및 운영책임자의 확인)[부록2].
- QA확인서: QAU를 운영하고자 할 경우 각 시험 단계별 QAU의 점검 결과를 토대로 QAU 책임자 명의의 QA 확인서를 보고서에 첨부.

✓ 이상과 같이 당뇨에 대한 의약품 및 의료식품 신약에 대한 전임상 효력시험 수행의 절차와 이에 수반된 서식에 대한 개념을 정립하였으며 이를 바탕으로 각 process를 확립하였고 이에 수반된 서식 자료를 모두 완성하였음.

2. 유효성평가 시스템에 대한 Simulation

- 확립된 유효성평가 진행절차와 각종서류에 준하여 실제 당뇨를 위한 신약에 대한 유효성평가를 시뮬레이션 하였음.
- 시험제목: Streptozotocin(STZ)을 이용한 SD Rat의 당뇨 모델 확립시험.
- 시험목적: 본 시험은 수컷 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 Streptozotocin(STZ)을 2일 간격으로 2회 투여 (40mg/kg/injection)하여 당뇨 모델 확립 및 항당뇨 시험을 위한 필요 군 구성 확립을 위해 실시하였음.
- [시험군]

구분	STZ 투여용량 (mg/kg)	동물구분	동물수
G1	0	정상동물	30
G2	80	당뇨유발	300

- [시험결과 및 고찰]
 - ▷ 사망여부 및 입사증상: 시험기간 동안 정상군(G1)에서는 사망 또는 빈사동물이 발생되지 않았으나, STZ 투여군(G2)에서는 투여 후 2주차에 일부 개체가 사망하였다. STZ를 투여 한 모든 개체에서 투여 후 1주차부터 정상군(G1)에 비해 다식 및 다뇨 현상을 관찰할 수 있었음.
 - ▷ 체중변화: 시험기간 동안 정상대조군(G1)에서는 정상적인 체중 및 체중증가가 관찰되었으나, STZ 투여군(G2)은 정상대조군에 비해 체중이 감소하였음.
 - ▷ 혈당변화: 시험 기간동안 STZ 투여군(G2)은 투여 후 1주차에 혈중 당의 농도가 250 mg/dL 이상인 고혈당 개체의 발생비율은 약 27%였으며, 2주차에는 약 19.3%가 증가하여 총 46.3%의 고혈당 개체가 관찰 되었음.
 - ▷ 당뇨신약을 위한 시험군 구성: 본 시험조건 하에서 당뇨를 유발시킨 수컷 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 Streptozotocin(STZ)을 2일 간격으로 2회 복강 투여(40 mg/kg/injection)한 결과, 투여 후 2주차까지 혈중 당의 농도가 250 mg/dL 이상인 고혈당 개체의 발생비율은 총 46.3%로, STZ를 투여 한 300마리 중 139마리의 고혈당 개체가 발생하였음.
 - ▷ 상기의 시험결과를 바탕으로 다음과 같이 시험군을 구성할 수 있음.

구분	시험물질	투여용량 (mg/kg/day)	동물구분	부검시점	동물수
G1	부형제	0	정상동물	8주	8
				12주	8
G2			당뇨유발	8주	8
				12주	8
G3	양성대조물질	TBD		8주	8
				12주	9
G4	시험물질1	TBD		8주	8
				12주	9
G5		TBD		8주	8
				12주	9
G6	시험물질2	TBD		8주	8
				12주	9
G7		TBD		8주	8
				12주	9

✓ 당뇨모델에 대한 효력시험의 시뮬레이션 결과는 모든 데이터를 종합하여 “최종보고서” 형태로 정리를 하였음[부록2]

제 2 절 제2형 당뇨 임상 선행동물의 개발 및 분석 (1년차, 메디키네틱스)

전체적인 당뇨유발과정에 대해선 “Larsen MO, et al. Measurement of insulin secretory capacity and glucose tolerance to predict pancreatic β -cell mass in vivo in the nicotinamide/streptozotocin gottingen minipig, a model of moderate insulin deficiency and diabetes. 2003”을 참고하였음.

1. 제 2형 당뇨모델의 유도 및 관리

- 체성장이 완료된 6개월령 이상, 체중 20kg이하의 수컷 미니돼지 중에서 건강한 개체를 당뇨 유도모델 제작을 위한 실험군으로 선발하였음. 정상 판정을 위하여 혈당계로 급이 전 혈당을 측정하여 혈당이 80mg/dL 이하인 개체를 실험군으로 선발하여 격리하였음.
- 선발 및 사양 관리, 실험 중에 실험에 부적합한 경우에는 조속히 제외시켰음.
- 선발된 개체는 실험시설에 1주일 이상 적응시키고 유도 모델 실험군 3두에 STZ(125 mg/kg; Sigma S-0130; Sigma-Aldrich)와 NIA(67 mg/kg ; Sigma N-3376; Sigma Aldrich)를 각각 주사하고 사료 급이 전과 섭취 후 2시간에 각각 혈당을 측정하여 당뇨 유발 유무를 2주 동안 관찰하여 제 2형 당뇨 모델의 임상증상을 확인하였음 [그림 1].

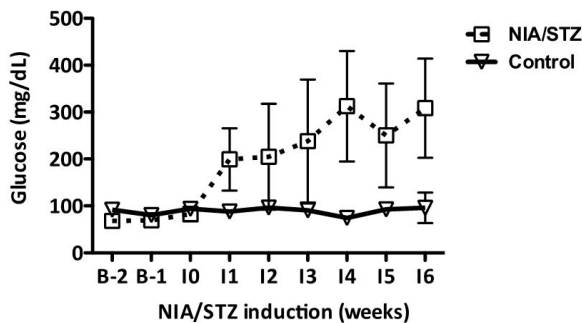


그림 1. Blood glucose levels of fasting Micro-pigs were checked before feeding using Accu-Chek®

- 최초 유도 후 90%에서 고혈당이 확인되었으며 고혈당 임상 증상의 지속 유무(공복 혈당 110mg/dL 이상)를 주당 2회 이상 계측하여 지속성을 확인하였음.
- 체중은 선발 시와 실험 종료 전 각각 전자 체중계로 측정하였으나 유의적인 차이는 없었음.
- 당뇨 모델의 사양 관리 중 당뇨로 인한 합병증 유발 유무에 관리의 초점을 두고 임상 증상과 신체 변화를 지속적으로 관찰 및 확인하였음.
- 당뇨 모델의 실험 관리 기간이 2개월 미만으로 건강에 위대한 심각한 합병증 (심장마비, 말초혈관 혈행장애로 인한 말단 조직 괴사, 당뇨, 체중의 급격한 감소등)은 대부분의 당뇨 모델에서 관찰되지 않았으나 일부의 경우에는 당뇨로 주의 깊은 사양관리를 실시하였음.

2. 당뇨 모델의 바이오마커 분석

- 당뇨 모델의 바이오마커 분석을 위하여 고혈당 임상 증상이 2주 이상 지속되는 모델군과 정상 대조군의 혈청을 인슐린 분석을 위하여 정기적으로 수집하였음.
- 내당능 검사를 위하여 당뇨 발현이 확인된 개체군과 대조군에 Mixed meal (25g의 미니돼지 사료에 2g/kg의 glucose이 첨가되어 있는 사료)을 고혈당 확인 후 1주에 급이하고 급이

전과 급이 후 30, 60, 90, 120, 150, 180분에 채혈하여 혈당[그림 2], 혈중 Insulin을 측정[그림 3]하고 분석함.

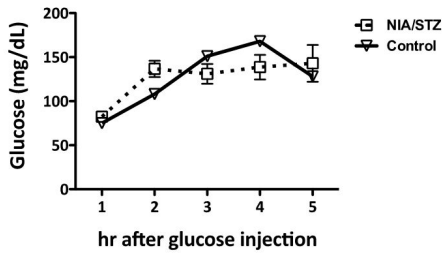


그림 2. OGTT (Oral glucose tolerance test) analysis.

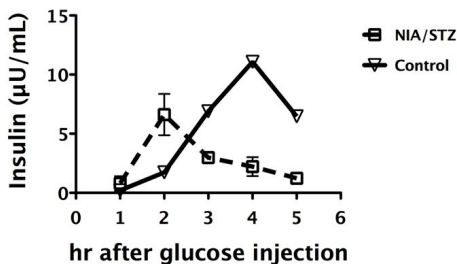


그림 3. Serum insulin levels of fasting Micro-pigs were checked before feeding using ELISA

- 실험 종료 후 대조군과 실험군의 췌장 조직병리학적 분석을 위하여 각각의 췌장을 perfusion하고 적출하여 10% formalin 용액에 넣어 고정한 후 다양한 조직 염색(H&E 염색, 면역염색 등)을 실시하였음.
- 바이오마커의 최종 분석 결과는 논문을 통하여 공개될 예정이나 혈당과 인슐린의 변동 추이는 일치하였으며 특히 췌장 분석 결과 당뇨 모델의 췌도세포의 위축 및 사멸이 확인되어 병리학적 바이오마커도 임상 증상과 일치함을 확인하였음 [그림 4].

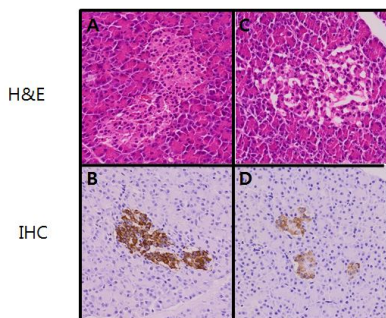


그림 4. Immunohistochemistry (IHC) of pancreas using insulin antibody.

✓ 이상에서와 같이 약물을 이용한 제2형 임상선행 모델동물의 생산은 혈당이나 인슐린 분비를 통해 그리고 최종적으로 췌장세포의 부분적 파괴를 통해 효과적으로 제작되었음을 확인 할 수 있었음.

제 3 절 약물을 통한 제2형 당뇨 임상 선행동물의 유효성 평가 (2년차, 공동수행)

약물을 통한 제 2형 임상선행 동물의 유효성을 평가하기 위해 제 2형 당뇨 치료제로서 가장 많이 사용되고 있는 Metformin (1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride, Sigma-aldrich [D150959])를 positive control의 개념으로서 평가를 수행하였음

- 제 2형 임상선행 모델동물에 관한 모든 유도 및 관리는 제 2절의 내용과 동일함.
- 멧포민을 처리하지 않은 군에서는 혈당이 계속해서 높게 유지되는데 반해 멧포민을 처리한 군에서는 정상군에서와 마찬가지로 혈당이 낮게 유지되는 것을 확인하였음 [그림 5]

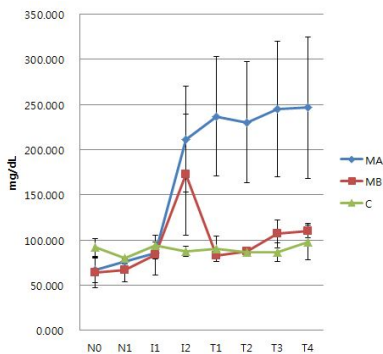


그림 5. Blood glucose levels of fasting Micro-pigs with or without Metformin were checked using Accu-Chek®

- insulin에 대한 면역염색 조직분석결과 당뇨유발군 (그림 6A, 6B)에서 모두 췌장세포가 부분적으로 파괴된 것을 확인 할 수 있었으며 이러한 췌장세포는 멧포민 비처리군(그림 6C)나 처리군(그림 6D)에서 파괴된 췌장세포의 회복에 대해선 별다른 차이점을 발견할 수 없었음.
- 이는 멧포민이 제 2형 당뇨의 치료제로서 널리 사용되어 혈당을 낮추기는 하나 이러한 작용이 파괴된 췌장세포를 복원함으로써 기능하는 것은 아닌 것으로 사료됨.

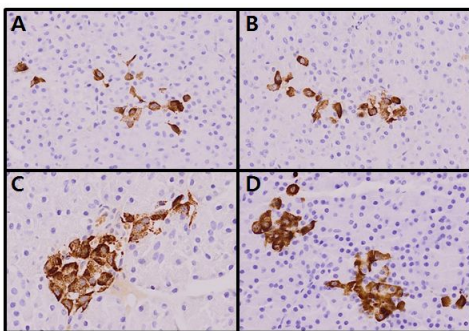


그림 6. Immunohistochemistry (IHC) of pancreas using insulin antibody.

✓ 이상에서와 같이 신약에 대한 제 2형 당뇨 효력시험을 수행하는 데 있어 positive control로서 사용될 수 있는 멧포민에 대한 유효성평가의 protocol를 완성하였음.

제 4 절 외과적 수술을 통한 제2형 당뇨 임상 선행동물의 유효성 평가 (2년차, 공동수행)

1. 수술법에 의한 당뇨병 치료의 이해

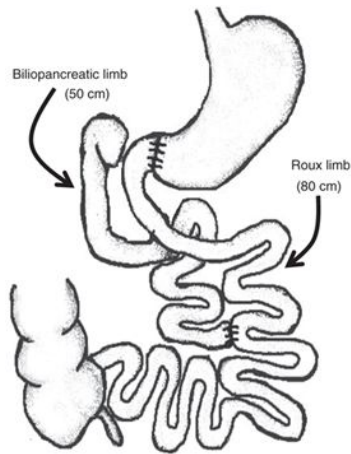


그림 7. Schematic procedure of duodenal bypass surgery

- 병적 비만환자의 경우에 복강경을 이용한 비만수술을 통해 체중감소와 더불어, 2형 당뇨병과 같은 대사질환 증후군이 동시에 좋아진다는 연구 결과가 있음 (Vidal *et al.*, 2007; Gan *et al.*, 2007).
- 그러나, 몇몇의 연구에서선 병적 비만이 아니 환자에서도 비만수술을 통해 당뇨병이 호전되는 결과가 보고되었음 (Depaula *et al.*, 2008; Scopinaro *et al.*, 2007).
- 이러한 보고를 기반으로 제 2형 당뇨병이 있는 환자에서 위우회술과 같은 비만 수술을 기존의 적응증 (BMI 35이상)보다 비만도가 더 낮은 환자들을 대상으로 2형 당뇨병의 호전을 목표로 하여 적용하고자 하는 움직임이 있었고 이를 적용하기 위해 많은 연구들이 진행되고 있음.
- Rubino 등 (2006)은 제 2형 당뇨병 동물 모델인 Goto-Kakizaki(GK) rat에서 십이지장-공장우회술을 시행하여 혈당이 호전되는 것을 처음으로 보고하였음.
- 현재까지 미니돼지를 현재까지 미니돼지를 포함한 돼지에서 이러한 수술적 접근의 의한 제 2형 당뇨의 치료효과에 대해선 보고된 바가 없음.
- 따라서, 본 실험의 목적은 연구를 통해 확립된 제 2형 임상선행 동물모델을 대상으로 기존에 사람에게 적용되었던 십이지장-공장우회술 (duodenal exclusion bypass surgery, 그림 7)을 수행하여 그 효과를 증명하고자 함.

2. 미니돼지에 대한 OGTT 측정

- 제 2형 당뇨 임상선행 동물에 대한 제작 및 관리는 제 2절에 기술된 내용에 준하여 수행되었음.
- 정상 미니돼지에서의 OGTT, 인슐린 및 당화혈색소 데이터
 - ▷ 사용된 미니돼지 6두에 대한 OGTT를 240분까지 측정해본 결과, glucose 섭취 후 30분에서

가장 높은 혈당을 나타내었으며 대략 2시간 이후에 정상치로 돌아옴을 확인하였음 [그림 8, 표 1]

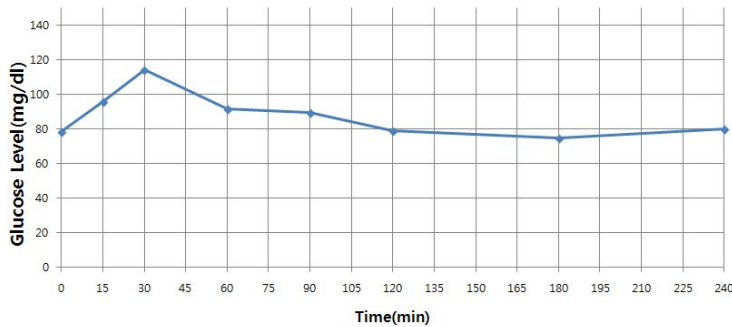


그림 8. OGTT (Oral glucose tolerance test) analysis.

[표 1] OGTT data

시간(m)	0	15	30	60	90	120	180	240
혈당	81	103.9	111.6	88.2	86.7	78.1	71.2	77.9
SD	6.39	6.25	15.3	20.8	16.6	13.7	12.1	11.6

- ▷ 동일한 미니돼지의 혈액을 통해 인슐린에 대한 분비능을 확인해 본 결과, 혈당의 변화와 마찬가지로 glucose 주입 후 30분에서 인슐린이 최대치에 도달하였으며, 이는 2시간이 경과되면 정상치로 내려옴을 확인 할 수 있었음 [표 2].

[표 2] Serum insulin levels during OGTT

시간(m)	0	15	30	60	90	120	180	240
insulin	0.0867	0.17	0.243	0.199	0.181	0.084	0.085	0.095
SD	0.045	0.081	0.113	0.053	0.087	0.025	0.032	0.053

- ▷ 사용된 6마리의 미니돼지에 대한 당화혈색소(HbA1C)는 0.88로서 개체간 변이는 크지 않았음 [표 3].

돼지번호	DL-1	DL-2	DL-3	DL-4	DL-5	DL-6	평균	SD
HbA1C(%)	1	0.8	0.8	1.1	0.9	0.7	0.88	0.15

3. STZ/NIA 약물 주입 후 수술전 OGTT Data

- 수술처리를 하기 전에 유발된 당뇨모델에 대해 OGTT를 실시하여 비수술처리군과 수술처리군에 대한 군구성의 자료로 활용하였음.
- 그림 9와 그림 10에서 보는 바와 같이 각각의 OGTT에 대한 데이터를 중심으로 서로 유의

적인 차이가 없도록 비수술군과 수술군을 나누었음 [표 4].

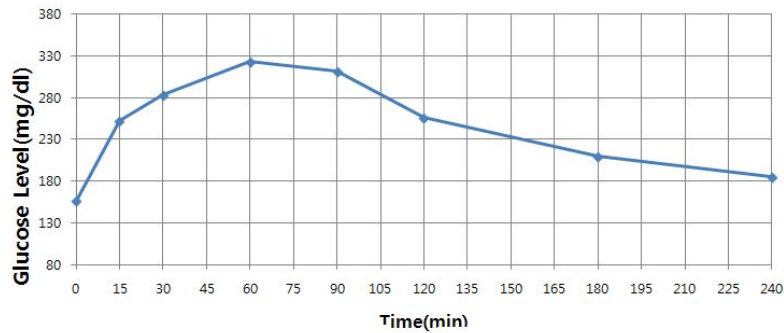


그림 9. OTGG data before surgical therapy

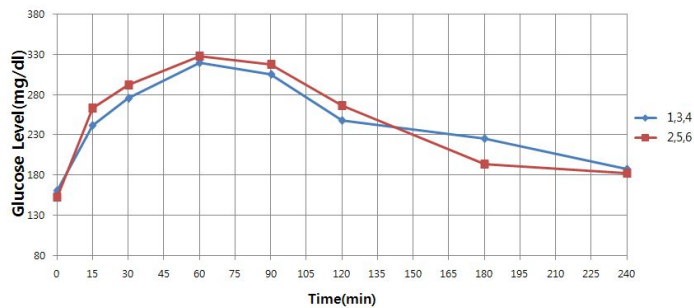


그림 10. Grouping based on OGTT data

[표 4] 군구성에 활용된 OTGG data

	Time (min)	0	15	30	60	90	120	180	240
비수술치리군	DL-1	130	172.5	201	230	236	252	188	163
	DL-3	191.5	288	358.5	449	404.5	329	246	221.5
	DL-4	162	263.5	266	280.5	275.5	161.5	243	178.5
	평균	161.2	241.3	275.2	319.3	305.3	247.5	225.7	187.7
	SD	30.8	60.9	79.1	114.7	88.1	83.4	32.7	30.3
수술치리군	DL-2	154.5	304.5	330	360	371.5	295	234.5	206
	DL-5	157.5	235.5	292.5	352	320	245.5	181.5	174.5
	DL-6	145	249.5	254.5	271.5	262.5	257.5	164.5	165.5
	평균	152.3	263.2	292.3	327.8	318	266	193.5	182
	SD	6.5	36.4	37.7	48.9	54.5	25.8	36.5	21.3

4. Duodenal bypass surgery

- 본 연구에서 수행된 모든 수술적 접근 및 절차는 인하대병원 외과전문의인 허윤석교수의 지휘아래 수행되었음.
- 허윤석교수는 제 2형 당뇨병환자를 대상으로 한 수술치치와 관련된 많은 임상경험이 있음.
- 수술의 전 과정에 대한 대략적인 진행은 그림 11과 같음.

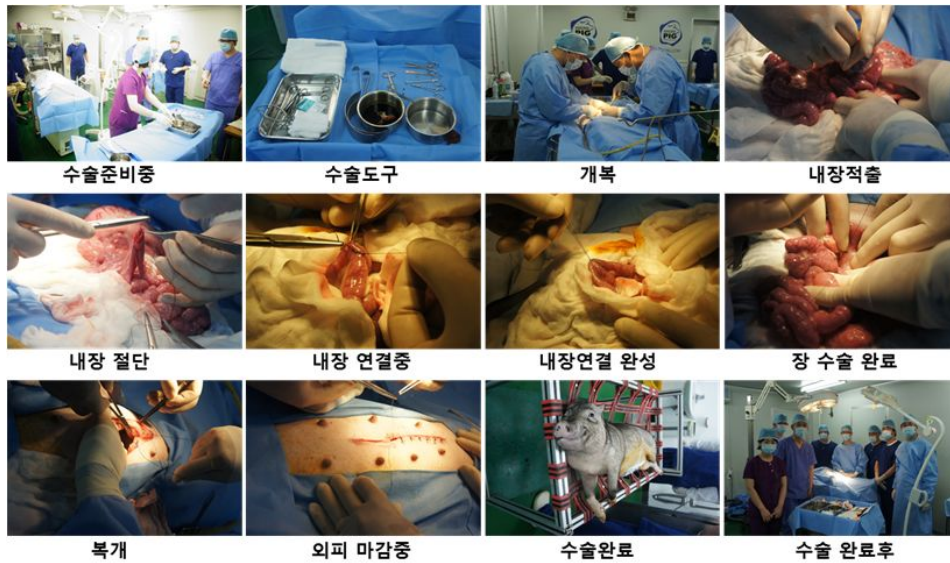


그림 11. Duodenal bypass surgery에 대한 진행과정

5. 수술에 따른 혈당 및 췌장조직 검사

- 약물투여 전후와 수술처리 전후에 이르는 모든 기간에 대해 혈당을 체크한 결과는 그림 12, 표 5와 같음.
- 수술처리군에서 수술 후 혈당이 낮아지는 경향을 보였으나, 시도한 마리수가 적어(3마리) 통계적 유의성은 낮았음.

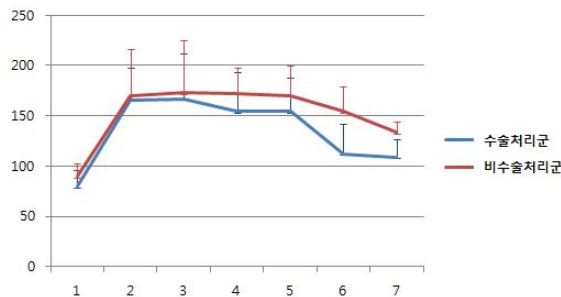


그림 12. Blood glucose levels of fasting Micro-pigs with or without duodenal bypass surgery

[표 5] 약물투여 전후와 수술처리 전후과정을 통한 혈당수치의 변화

	Day	0	7	14	21	28	+3	+10
비수술처리군	DL-1	78	172	160	170	162	112	120
	DL-3	94	209	222	167	191.5	137	108
	DL-4	68	116	119	125	130	88	99
	평균	80	165.7	167	154	161.2	112.3	109
	SD	13.1	46.8	519	25.1	30.8	24.5	10.5
수술처리군	DL-2	105	190	214	198	154.5	173	147
	DL-5	73	172	180	192	157.5	170	140
	DL-6	91	137	125	127	145	120	113
	평균	89.6	170	173	172.3	152.3	154.3	133.3
	SD	16.04	32.04	44.9	39.4	30.3	29.7	17.9

- 각각의 개체에 대해 수술처리 후 10일이 경과한 후에 조직검사를 수행하였음[그림 13].
- 정상돼지에서는 췌장세포에서 인슐린의 분비를 확인 할 수 있었으나 약물투여에 의해 비수술처리군과 수술처리군 모두에서 췌장세포가 부분적 파괴가 된 것을 확인할 수 있었음.
- 이러한 췌장세포의 부분파괴는 수술처리에 의해 단시간에 회복되지는 않는 것으로 사료됨.

(A) 정상돼지 (B) 비수술처리군 (C) 수술처리군

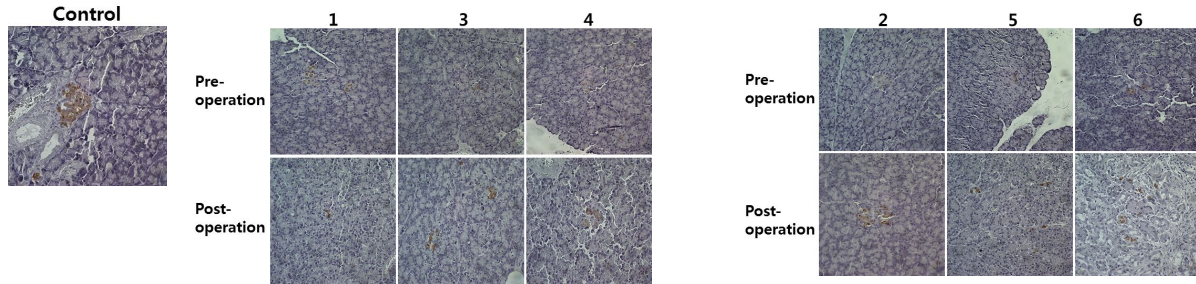


그림 13. Immunohistochemistry (IHC) of pancreas using insulin antibody.

√ 이상에서와 같이 본 연구를 통해 제 2형 당뇨 임상선행 모델을 이용한 수술처치법에 대해 국내외에서 처음으로 시도를 하였음. 비록 통계적 유의성은 낮았으나 수술처치군에서 혈당이 낮아지는 효과를 관찰한 것은 수술처치법에 대한 전체적인 procedure 와 protocol의 확립과 더불어 중요한 성과라고 판단됨. 향후 보다 중장기적인 연구를 통해 이 부분에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 생각됨.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표 및 평가의 착안점

구분 (연도)	연구목표	평가착안점	달성도 (%)
1차 연도 (2010)	유효성평가 시스템 확립	유효성평가 시스템에 대한 procedure/protocol 확립 여부	100
	제 2형 당뇨모델을 이용한 유효성평가 시스템 확립	제 2형 당뇨모델을 이용한 유효성평가 수행여부	100
	당뇨 모델의 유도	제 2형 당뇨모델의 개발 및 확립 여부	100
	당뇨 모델의 분석	제 2형 당뇨모델에 대한 분석 여부	100
2차 연도 (2011)	신약을 통한 제2형 당뇨 유효성평가	신약을 통한 제 2형 당뇨 유효성평가 수행 여부	100
	외과적수술을 통한 유효성평가 시스템 확립	외과적 수술을 통한 유효성평가 시스템 확립 여부	100
	제 2형 임상선행 모델의 생산 표준화	생산 Standard Operation Procedure 확립 여부	100
	제 2형 임상선행 모델의 관리 표준화	관리 Standard Operation Procedure 확립 여부	100
최종 평가	제 2형 당뇨 임상선행 모델의 개발, 공급 및 유효성평가 수행	시장에 제 2형 당뇨 임상선행동물이 공급가능여부와 의 료제품에 대한 유효성평가 수행 여부	100

제 2 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 본 연구과제는 기존의 실험동물보다 진보된 개념의 임상 선행 모델을 참여기업의 미니돼지로 단기간 내에 개발하였으며 제 2형 당뇨 임상 선행 모델과 이 모델을 이용한 유효성평가의 pilot study를 통하여 이 질병의 치료제 및 기능성 식품의 개발과 유효성 평가에 필요한 임상 선행 모델 생산 기술을 개발하였음.
- 국내 기술만으로 개발하여 수입대체 효과와 실험동물 분야의 기술적 도약을 가시화하였으며 기존 의·약학 계약연구의 저변을 확대시키고 고부가가치 사업화를 이룰 수 있는 기반 기술을 확보할 수 있게 되었음.
- 신약 및 의료용 제품의 비임상 및 임상에 필요한 막대한 경제적 비용, 노력과 시간을 절감할 수 있고 시장에서 요구하는 상품성 있는 제품 개발에 기여하여 부가가치를 높일 수 있게 되었음.
- 당뇨 관련 약물 및 의료용 제품의 상품화에 필요한 비임상 및 임상 단계는 전체 기술 및 제품 개발에서 70%이상을 차지할 정도로 막대한 비중을 차지하고 있으며, 그 유효성을 보다 효과적이며 적절하게 사전에 탐색할 임상 선행 모델을 통하여 개발 비용 및 시간을 절감할 수 있게 되었음.
- 유럽 등 선진국과 국내에서 이미 시행되고 있는 반려동물 보호 관련법 (동물보호법) 및 실험동물 대체법의 대안으로 임상 선행 모델을 개발하고 기존 실험동물 위주의 실험동물산업의 한계를 극복할 수 있게 되었음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 논문

- Lee MS, Song KD, Yang HJ, Solis CD, Kim SH, Lee WK. Development of minipig model of type II diabetes mellitus. Laboratory Animal Research 2012: 28(3), 205-208.
- Yang HJ, Song KD, Lee MS, Solis CD, Lee SC, Jung JH, Kim JM, Park IS, Lee WK. Surgical therapy of deo bypass in type II diabetes mellitus minipig model (manuscript in preparation).

2. 학술발표

- Lee, M.S., Kim, S.H. and Lee, W.K. Development of type II diabetic mellitus animal model with mini-pig. Translational Research in Microbiology and Biotechnology. Gyeongju, Republic of Korea, June 23-24, 2011(Poster# M22).
- Lee, M.S., Lee, S.C., Jung, J.H., Kim, JM, Kim, S.H. and Lee, W.K. Application of Mini-pig As a Type II Diabetic Mellitus Animal Model. 51st Annual Meeting & ToxExpo™ [SOT]. San Francisco, USA. March 11-15, 2012 (Abstract Final ID: 2742, Poster Board#:151).

3. 특허

구분	등록번호	제목	등록일	등록자	법인등록번호
특허	2011-02-42-0430호	제 2형 당뇨 임상선행모델 생산기술	2011.4.20	메디키네틱스(주)	159114-0054727

제 2 절 성과활용 계획

1. 성과활용 실적

- 개발된 제 2형 당뇨 임상선행모델 생산 기술을 활용하여 협동과제 연구기관의 비임상 계약 연구서비스 사업 플랫폼에 따라 H 제약의 신약 개발을 위한 비임상 계약연구서비스를 2012년도에 수행하여 pilot study 매출을 기록하였음.
- 구체적으로는 제 2형 당뇨 모델을 활용한 Pharmacodynamics(약동학) study를 소규모로 수행하였으며 추가시험을 진행 중임.

2. 성과활용 계획

가. 기술적인 측면

- 핵심기술인 제 2형 당뇨 임상선행모델의 생산 표준화 및 계약생산 기술을 통하여 다양한 비임상 시험 분야의 임상 2상(유효성 시험)을 목표로 한 비임상모델을 생산하고 개발된 유효성 평가시스템을 활용하여 다양한 비임상 계약연구서비스를 수행하고자 함.

- 질병 모델을 활용한 신규 비임상 계약연구서비스 모델 시스템을 확립하여 신규 매출과 기존 연구서비스 분야(pharmacokinetics: 약력학 및 의료용제품 유효성 시험)에의 적용을 통하여 고부가가치 사업 모델에 활용하고자 함.

나. 경제·산업적 측면

- 제약 및 의료용 제품 등 다양한 분야의 비임상 시험에 필요한 제2형 당뇨모델을 활용하여 관련 비임상모델의 공급 또는 당뇨 관련 비임상 계약연구서비스로 시장을 확대하고 이를 통한 유관 영농법인에 대한 위탁 사육 물량의 증가로 영농법인의 소득 증대에 기여하고 농림수산물산업의 발전에 기여하고자 함.
- 신약 및 기능성 식품의 전 임상 및 임상에 필요한 막대한 경제적 비용, 노력과 시간을 절감할 수 있고 시장에서 요구하는 상품성 있는 제품 개발에 기여하여 부가가치를 높일 수 있는 방향으로 활용하고자 함.
- 당뇨 치료제 및 기능성 식품의 상품화에 필요한 전 임상 및 임상 단계는 전체 기술 및 제품 개발에서 70%이상을 차지할 정도로 막대한 비중을 차지하고 있으며, 그 유효성을 보다 효과적이며 적절하게 사전에 탐색할 임상 선행 모델을 통하여 개발 비용 및 시간을 절감하는데 기여하고자 함.

다. 상품화 및 사업화 방법

- 제 2형 당뇨 임상 선행 모델의 개발 기술의 표준화를 통한 지식재산권 등록 및 국내외 유명학술지에 연구결과를 등재할 계획임.
- 또한, 본 연구를 통해 개발된 제 2형 당뇨 임상 선행 모델은 참여기업의 국내외 영업 및 마케팅 networks를 통하여 주로 약물 및 기능성 식품의 efficacy test에 사용되며 pilot study를 통하여 제품으로서의 유효성이 확인되면 계약생산 후 공급할 계획임.
- 외과적 수술법에 대한 발전된 컨셉 및 기술력 개발은 향후 당뇨병의 치료로서 새로운 영역을 개척할 수 있는 사업분야로서 이 부분의 상품화에 주력하고자 함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 지난 2년의 연구기간동안 제2형 당뇨병에 대한 많은 정보들을 알 수 있었음. 이러한 정보들을 종합해 보면 **첫 번째**, 당뇨병, 특히 제 2형 당뇨병, 이 사람이 가지고 있는 질병 중에서 그 수가 제일로 많고 지속적으로 증가하고 있다는 것. **두 번째**, 당뇨병은 그 병 자체도 위중하지만 합병증이 더 무서운 병이란 것. **세 번째**, 많은 치료제가 나와 있음에도 근본적으로 병인을 치료해 주지 못할뿐더러 부작용이 많다는 것으로 요약할 수 있음.

- 이러한 정황을 바탕으로 당뇨병과 치료에 대한 한 가지 방법적 접근으로서 “수술치료법”이 최근에 더욱 주목을 받고 있다고 판단됨. 그 예로서 최근(2012년 4월)에 The New England Journal of Medicine에 나란히 소개된 두 편의 수술법관련 논문을 소개하고자 함.

Bariatric Surgery versus Conventional Medical Therapy for Type 2 Diabetes

Gerludrue Mingrone, M.D., Simona Panunzi, Ph.D., Andrea De Gaetano, M.D., Ph.D., Caterina Guidone, M.D., Amerigo Iaconelli, M.D., Laura Leccesi, M.D., Giuseppe Nanni, M.D., Alfons Pomp, M.D., Marco Castagneto, M.D., Giovanni Ghrilanda, M.D., and Francesco Rubino, M.D.

ABSTRACT

BACKGROUND

Roux-en-Y gastric bypass and biliopancreatic diversion can markedly ameliorate diabetes in morbidly obese patients, often resulting in disease remission. Prospective, randomized trials comparing these procedures with medical therapy for the treatment of diabetes are needed.

METHODS

In this single-center, nonblinded, randomized, controlled trial, 60 patients between the ages of 30 and 60 years with a body-mass index (BMI, the weight in kilograms divided by the square of the height in meters) of 35 or more, a history of at least 5 years of diabetes, and a glycated hemoglobin level of 7.0% or more were randomly assigned to receive conventional medical therapy or undergo either gastric bypass or biliopancreatic diversion. The primary end point was the rate of diabetes remission at 2 years (defined as a fasting glucose level of <100 mg per deciliter [5.6 mmol per liter] and a glycated hemoglobin level of <6.5% in the absence of pharmacologic therapy).

RESULTS

At 2 years, diabetes remission had occurred in no patients in the medical-therapy group versus 75% in the gastric-bypass group and 95% in the biliopancreatic-diversion group ($P<0.001$ for both comparisons). Age, sex, baseline BMI, duration of diabetes, and weight changes were not significant predictors of diabetes remission at 2 years or of improvement in glycemia at 1 and 3 months. At 2 years, the average baseline glycated hemoglobin level (8.65±1.45%) had decreased in all groups, but patients in the two surgical groups had the greatest degree of improvement (average glycated hemoglobin levels, 7.69±0.57% in the medical-therapy group, 6.35±1.42% in the gastric-bypass group, and 4.95±0.49% in the biliopancreatic-diversion group).

CONCLUSIONS

In severely obese patients with type 2 diabetes, bariatric surgery resulted in better glucose control than did medical therapy. Preoperative BMI and weight loss did not predict the improvement in hyperglycemia after these procedures. (Funded by Catholic University of Rome; ClinicalTrials.gov number, NCT00888836.)

From the Departments of Internal Medicine (G.M., C.G., A.I., L.L., G.G.) and Surgery (G.N., M.C., F.R.), Università Cattolica S. Cuore, and National Research Council of Italy—Institute of Systems Analysis and Computer Science (IASI), BioMatLab (S.P., A.D.G.)—both in Rome; and the Section of Gastrointestinal Metabolic Surgery, Weill Medical College of Cornell University, New York Presbyterian Hospital, New York (A.P., F.R.). Address reprint requests to Dr. Mingrone at the Department of Internal Medicine, Università Cattolica S. Cuore, Largo A. Gemelli 8, 00168 Rome, Italy, or at gmingrone@rm.juniccatt.it.

This article (10.1056/NEJMoa1200111) was published on March 26, 2012, at NEJM.org.
N Engl J Med 2012;366:1577-85.
Copyright © 2012 Massachusetts Medical Society.

Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy in Obese Patients with Diabetes

Philip R. Schauer, M.D., Sangeeta R. Kashyap, M.D., Kathy Wolski, M.P.H., Stacy A. Brethauer, M.D., John P. Kirwan, Ph.D., Claire E. Pothier, M.P.H., Susan Thomas, R.N., Beth Aboud, R.N., Steven E. Nissen, M.D., and Deepak L. Bhatt, M.D., M.P.H.

ABSTRACT

BACKGROUND

Observational studies have shown improvement in patients with type 2 diabetes mellitus after bariatric surgery.

METHODS

In this randomized, nonblinded, single-center trial, we evaluated the efficacy of intensive medical therapy alone versus medical therapy plus Roux-en-Y gastric bypass or sleeve gastrectomy in 150 obese patients with uncontrolled type 2 diabetes. The mean (±SD) age of the patients was 49±8 years, and 66% were women. The average glycated hemoglobin level was 9.2±1.5%. The primary end point was the proportion of patients with a glycated hemoglobin level of 6.0% or less 12 months after treatment.

RESULTS

Of the 150 patients, 93% completed 12 months of follow-up. The proportion of patients with the primary end point was 12% (5 of 41 patients) in the medical-therapy group versus 42% (21 of 50 patients) in the gastric-bypass group ($P=0.002$) and 37% (18 of 49 patients) in the sleeve-gastrectomy group ($P=0.008$). Glycemic control improved in all three groups, with a mean glycated hemoglobin level of 7.5±1.8% in the medical-therapy group, 6.4±0.9% in the gastric-bypass group ($P<0.001$), and 6.6±1.0% in the sleeve-gastrectomy group ($P=0.005$). Weight loss was greater in the gastric-bypass group and sleeve-gastrectomy group (−29.4±9.0 kg and −25.1±8.5 kg, respectively) than in the medical-therapy group (−5.4±8.0 kg) ($P<0.001$ for both comparisons). The use of drugs to lower glucose, lipid, and blood-pressure levels decreased significantly after both surgical procedures but increased in patients receiving medical therapy only. The index for homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) improved significantly after bariatric surgery. Four patients underwent reoperation. There were no deaths or life-threatening complications.

CONCLUSIONS

In obese patients with uncontrolled type 2 diabetes, 12 months of medical therapy plus bariatric surgery achieved glycemic control in significantly more patients than medical therapy alone. Further study will be necessary to assess the durability of these results. (Funded by Ethicon Endo-Surgery and others; ClinicalTrials.gov number, NCT00432809.)

From the Bariatric and Metabolic Institute (P.R.S., S.A.B., S.T., B.A.), the Endocrinology Institute (S.R.K.), the Cleveland Clinic Coordinating Center for Clinical Research (K.W., C.E.P.), the Heart and Vascular Institute (S.E.N.), and the Lerner Research Institute (J.P.K.), Cleveland Clinic, Cleveland; and the Veterans Affairs Boston Healthcare System, Brigham and Women's Hospital, and Harvard Medical School—all in Boston (D.L.E.). Address reprint requests to Dr. Schauer at the Bariatric and Metabolic Institute, Cleveland Clinic M61, 9500 Euclid Ave., Cleveland, OH 44195, or at schaup@ccf.org.

This article (10.1056/NEJMoa1200225) was published on March 26, 2012, and updated on April 26, 2012, at NEJM.org.

N Engl J Med 2012;366:1567-76.
Copyright © 2012 Massachusetts Medical Society.

- 이 두 편의 논문에서는 모두 제2형 당뇨병환자군을 대상으로 약물치료군보다는 수술치료법을 병행한 경우에서 치료효과가 좋았다는 결론을 도출해 내고 있음.
- 또한, 향후 이러한 수술법에 대한 보다 면밀한 연구가 필요하다고 주장하고 있음.
- 이는 본 연구에서 개발된 제 2형 임상전행 모델과 같은 동물모델이 향후 이 분야의 발전에 있어 보다 많은 역할을 수행할 수 있음을 보여주는 예가 될 수 있음.

제 7 장 참고문헌

1. Askari B, Carroll MA, Capparelli M, Kramer F, Gerrity RG, Bomfeldt KE. Oleate and linoleate enhance the growth-promoting effects of insulin-like growth factor-I through a phospholipase D-dependent pathway in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 277:36338-36344, 2002.
2. Bailey CJ. Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* 15:755-772, 1992.
3. Barth CA, Pfeuffer M, Scholtissek J. Animal models for the study of lipid metabolism, with particular reference to the Göttingen minipig. *Advances in Animal Physiology and Animal Nutrition* S20:39-49, 1990.
4. Depaula AL, Macedo AL, Rassi N, Machado CA, Schraibman V, Silva LQ, Halpern A. Laparoscopic treatment of type 2 diabetes mellitus for patients with a body mass index less than 35. *Surg Endosc* 22:702-16, 2008.
5. Dixon JL, Stoops JD, Parker JL, Laughlin MH, Weisman GA, Sturek M. Dyslipidemia and vascular dysfunction in diabetic pigs fed an atherogenic diet. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 19:2981-2992, 1999.
6. Duncker DJ, Danser AH, van der Giessen WJ. Coronary microvascular dysfunction in a porcine model of early atherosclerosis and diabetes. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 302:H85-94, 2012.
7. Eldor R, Kidron M, Greenberg-Shushiav Y, Arbit E. Novel glucagon-like peptide-1 analog delivered orally reduces postprandial glucose excursions in porcine and canine models. *J Diabetex Sci Technol* 4:1516-1523, 2010.
8. Gan SS, Talbot ML, Jorgensen JO. Efficacy of surgery in the management of obesity-related type 2 diabetes mellitus. *ANZ J Surg* 77(11):958-62, 2007.
9. Georg P, Ludvik B. Lipids and Diabetes. *J Clin Basic Cardiol* 3: 159-162, 2000.
10. Harris MI. Definition and classification of diabetes mellitus and the criteria for diagnosis. In *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*, Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. p457-467, 2004.
11. Kim YK, Lee GS, Jung EM, Hyun SH, Hwang WS, Jeung EB. Generation of fibroblasts overexpression liver-specific PEPCK in a miniature pig model of human type 2 diabetes mellitus. *Mol Med Report* 6:45-50, 2012.
12. Koopmans SJ, Dekker R, Ackermans MT, Sauerwein HP, Serlie MJ, van Beusekom HM, van den Heuvel M, van der Giessen WJ. Dietary saturated fat/cholesterol, but not unsaturated fat or starch, induces C-reactive protein associated early atherosclerosis and ectopic fat deposition in diabeto pigs. *Cardiovasc Diabet* 10: 64, 2011.
13. Korte FS, Mokolke EA, Sturek M, McDonald KS. Exercise improves impaired ventricular function and alterations of cardiac myofibrillar proteins in diabetic dyslipidemic pigs. *J Appl Physiol* 98:461-470, 2005.

14. Larsen MO, Gotfredsen CF, Wilken M, Carr RD, Porksen N, Rolin B. Loss of beta - cell mass leads to a reduction of pulse mass with normal periodicity, regularity and entrainment of pulsatile insulin secretion in Gottingen minipigs. *Diabetologia* 46:195-202, 2003.
15. Larsen MO, Rolin B. Use of the Gottingen minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research. *ILAR J* 45:303-313, 2004.
16. Lee PY, Park SG, Kim EY, Lee MS, Chung SJ, Lee SC, Yu DY, Bae KH. Proteomic analysis of pancreata from minipigs treated with streptozotocin as a type I diabetes models. *J Microbiol Biotechnol* 20(4):817-820, 2010.
17. McKnight LL, Myrie SB, Mackay DS, Brunton JA, Bertolo RF. Glucose tolerance is affected by sisceral adiposity and sex, but not birth weight, in Yucatan miniature pigs. *Appl Physiol Nutr Metab.* 37:106-114, 2012.
18. Miller ER, Ullrey DE. The pig as a model for human nutrition. *Annu Rev Nutr* 7:361-382, 1987.
19. Mingrone G, Panunzi S, Gaetano AD, Guidone C, Laconelli A, Leccesi L, Nanni G, Pomp A, Castagneto M, Ghirlanda G, Rubino F. Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *New Eng J Med* 366:1577-1585, 2012.
20. Natarajan R, Gerrity RG, Gu JL, Lanting L, Thomas L, Nadler JL. Role of 12-lipoxygenase and oxidant stress in hyperglycaemia-induced acceleration of arteriosclerosis in a diabetic pig model. *Diabetologia* 45:125-133, 2002.
21. Nyholm B, Porksen N, Juhl CB, Gravholt CH, Butler PC, Weeke J, Veldhuis S, Pincus S, Schimtz O. Assessment of insulin secretion in relatives of patients with type2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: evidence of early beta-cell dysfunction. *Metabolism* 49: 896-905, 2000.
22. Panepinto LM, Phillips RW, Westmoreland NW, Cleek JL. Influence of genetics and diet on the development of diabetes in Yucatan miniature swine. *J Nutr* 112:2307-2313.
23. Roberts TM, Sturek M, Dixon JL, Hardin CD. Alterations in the oxidative metabolic profile in vascular smooth muscle from hyperlipidemic and diabetic swine. *Mol Cell Biochem* 217:99-106, 2001.
24. Rotella DP. Novel "second-generation" approaches for the control of type 2 diabetes. *J Med Chem* 47:4111-4112, 2004.
25. Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, Castagneto M, Marescaux J. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 244(5):741-9, 2006.
26. Sebert SP, Lecannu G, Sene S, Hucteau S, Chetiveaux M, Ouguerram K, Champ MM. Obesity induced during sexual maturation is linked to LDD-triacylglycerols in Yucatan miniature swine. *Br J Nutr* 94:282-289, 2005.
27. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, Brethauer SA, Kirwan JP, Pothier CE, Thomas U, Abood B, Nissen SE, Bhatt DL. Bariatric Surgery versus intensive medical therapy in

- obese patients with diabetes. *New Eng J Med.* 366:1567–1576, 2012.
28. Scopinaro N, Papadia F, Marinari G, Camerini G, Adami G. Long-term control of type 2 diabetes mellitus and the other major components of the metabolic syndrome after biliopancreatic diversion in patients with BMI <35 kg/m². *Obes Surg* 17(2):185–92, 2007.
 29. Swindle MM, Smith AC: Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand J Lab Anim Sci* 25:11–21, 1998.
 30. Torres-Roviral L, Astis S, Caro A, Lopez-Bote C, Ovilo C, Pallares P, Perez-Solana ML, Sanchez-Sanchez R, Gonzalez-Bulnes A. Diet-induced swine model with obesity/leptin resistance for the study of metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Scientific World Journal* 2012:510149, 2012.
 31. Vassilopoulos S, Eesk C, Hoshino S, Funke BH, Chen CY, Plocik AM, Wright WE, Kucherlapati R, Brodsky FM. A role for the CHC22 clathrin heavy-chain isoform in human glucose metabolism. *Science* 324:1192–1196, 2009.
 32. Vidal J, Ibarzabal A, Nicolau J, Vidov M, Delgado S, Martinez G, Balust J, Morinigo R, Lacy A. Short-term effects of sleeve gastrectomy on type 2 diabetes mellitus in severely obese subjects. *Obes Surg* 17(8):1069–74, 2007.
 33. Zimmet P. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the Doomsday scenario be averted? *J Intern Med* 247:301–310, 2000.

[부록2]

최종보고서(안)

Streptozotocin (STZ)을 이용한
SD Rat의 당뇨 모델 확립 시험

시험번호: IHDB2011-001

발생유전체학실, 특성화교실
인하대학교 의학전문대학원

www.inha.ac.kr TEL 032-890-1182 FAX 032-890-1199 E-mail wkleee@inha.ac.kr

The BEST Partner for Your Successful Drug Development

시험에 대한 진술서

시험제목: Streptozotocin (STZ)을 이용한 SD Rat의 당뇨 모델 확립 시험

시험번호: IHDB2011-001

최종보고서에 기술된 시험의 절차와 결과는 시험계획서에 규정된 내용과 시험기관의 표준작업수순서를 준수하여 시험책임자의 책임 하에 수행되었다. 단, 시험물질 관련 정보는 시험의뢰자가 제공한 정보를 근거로 작성하였으며 조제물의 균질성, 농도 및 안정성 분석은 본 시험기관에서 실시하지 않았다.

시험기관: 인하대학교 의학전문대학원 특성화교실 발생유전체학실

(우)400-712, 인천광역시 중구 신흥동3가 7-241, 정석빌딩 A동 8층
TEL 032-890-1182, FAX 032-890-1199

시험책임자: 이운규 _____ 2011년 4월 30일

시험기관책임자: 김연성 _____ 2011년 4월 30일

목 차

시험에 대한 진술서	2
1. 요약	5
2. 시험개요	7
2.1 시험제목	7
2.2 시험목적	7
2.3 시험기준	7
2.4 시험의뢰자	7
2.5 시험일정	7
3. 시험물질 및 대조물질	7
3.1 당뇨유발물질	7
3.2 당뇨유발물질 부형제	7
4. 시험동물 및 사육관리	8
5. 시험방법	8
5.1 당뇨유발물질 조제	8
5.2 투여경로 및 선정근거	9
5.3 시험군 구성 및 투여용량	9
6. 관찰항목	9
6.1 사망여부	9
6.2 임상증상 관찰	9
6.3 체중측정	10
6.4 혈당측정	10
7. 통계처리	10
8. 시험결과	10
8.1 사망여부 및 임상증상	10
8.2 체중변화	10
8.3 혈당변화	10

9. 고찰 및 결론	10
10. 참고문헌	11
12. TABLES	12
Table1. Mortality in Male Rats(Group Summary)	13
Table2. Body Weight Changes in Male Rats(Group Summary)	14
Table3. Incidence of High Blood Glucose Level in Male Rats(Group Summary)	15
13. APPENDICES	16
Appendix1. Clinical Observations in Male Rats(Individual)	17
Appendix2. Body Weight Changes in Male Rats(Individual)	23
Appendix3. Blood Glucose Level Changes in Male Rats(Individual)	29

1. 요약

본 시험은 수컷 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 Streptozotocin(STZ)을 2일 간격으로 2회 투여 (40 mg/kg/injection)하여 당뇨 모델 확립 및 항당뇨 시험을 위한 필요 군 구성 확립을 위해 실시하였다.

시험동물은 Sprague-Dawley 계통의 랫드를 사용하였으며, STZ 투여 후 2주간의 시험기간 중에 사망여부 및 임상증상 관찰, 체중 측정을 실시하였다. 혈당측정은 STZ 투여 후 1주 및 2주에 각각 1회씩 실시하였다.

시험군은 정상동물군(G1, n=30), STZ 투여군(G2, n=300)의 총 2군으로 구성하였으며, 총 330마리를 사용하였다.

이와 같이 시험한 결과는 다음과 같다.

사망여부 및 임상증상

시험기간 동안 정상군(G1)에서는 사망 또는 빈사동물이 관찰되지 않았으나, STZ 투여군(G2)에서는 투여 후 2주차에 일부 개체가 사망하였다. STZ를 투여 한 모든 개체에서 투여 후 1주차부터 정상군(G1)에 비해 다식 및 다뇨 현상을 관찰할 수 있었다.

체중변화

시험기간 동안 정상대조군(G1)에서는 정상적인 체중 및 체중증가가 관찰되었으나, STZ 투여군(G2)은 정상대조군에 비해 체중이 감소하였다.

혈당변화

시험기간 동안 STZ 투여군(G2)은 투여 후 1주차에 혈중 당의 농도가 250 mg/dL 이상인 고혈당 개체의 발생비율은 약 27 %였으며, 2주차에는 약 19.3 %가 증가하여 총 46.3 %의 고혈당 개체가 관찰되었다.

본 시험조건 하에서 당뇨를 유발시킨 수컷 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 Streptozotocin (STZ)을 2일 간격으로 2회 복강 투여(40 mg/kg/injection)한 결과, 투여 후 2주차까지 혈중 당의 농도가 250 mg/dL 이상인 고혈당 개체의 발생비율은 총 46.3 %로, STZ를 투여 한 300마리 중 139마리의 고혈당 개체가 발생하였다. 상기의 시험결과를 바탕으로 다음과 같이 시험군을 구성할 수 있었다.

구분	시험물질	투여용량 (mg/kg/day)	동물구분	부검시점	동물수
G1	부형제	0	정상동물	8주	8
				12주	8
G2			당뇨유발	8주	8
				12주	8
G3	양성대조물질	TBD		8주	8
				12주	9

G4	시험물질1	TBD	8주	8
G5		TBD	12주	9
G6	시험물질2	TBD	8주	8
G7		TBD	12주	9

(TBD: To be determined)

2. 시험개요

2.1 시험제목

Streptozotocin (STZ)을 이용한 SD Rat의 당뇨 모델 확립 시험

2.2 시험목적

본 시험은 수컷 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 Streptozotocin(STZ) 을 2일 간격으로 2회 투여 (40 mg/kg/injection)하여 당뇨 모델 확립 및 항당뇨 시험을 위한 필요 군 구성 확립을 위해 실시하였다.

2.3 시험기준

본 시험은 별도의 시험기준 없이 시험의뢰자와 협의하여 작성한 시험계획서에 따라 실시하였다.

2.4 시험의뢰자

인하대학교 의과대학/ 이운규 / TEL: 032-890-1182, FAX: 032-890-1199

/ E-mail: wklee@inha.ac.kr / 주소: 인천광역시 중구 신흥동3가 7-241 정석빌딩 A동 8층

2.5 시험일정

시험개시일	:	2010년	12월	10일
동물입수일	:	2010년	12월	27일
Streptozotocin 1차 투여	:	2011년	1월	5일
Streptozotocin 2차 투여	:	2011년	1월	7일
혈당측정일	:	2011년	1월	12일 ~ 1월 19일
군분리일	:	2011년	1월	19일
시험종료일	:	2011년	4월	19일
시험종료일	:	2011년	4월	30일

3. 시험물질 및 대조물질

3.1 당뇨유발물질

3.1.1	명칭:	Streptozotocin (STZ)
3.1.2	공급원:	Sigma
3.1.3	Lot No.:	06M1598V
3.1.4	외관 및 색상:	White powder
3.1.5	보관조건:	냉동 보관(-20 ℃)
3.1.6	취급 시 주의사항:	빛에 민감하기 때문에 청량, 조제 및 투여 시 차광한다.

3.2 당뇨유발물질 부형제

3.2.1	명칭:	0.01 M Sodium Citrate (pH 4.5) Buffer
3.2.2	공급원:	Sigma
3.2.3	외관 및 색상:	무색의 투명한 액체
3.2.4	보관조건:	냉장 보관(0 ~ 2 ℃)
3.2.5	취급 시 주의사항:	특이사항 없음

4. 시험동물 및 사육관리

코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리406)에서 약6주령의 건강한 수컷 랫드 [Rat / Sprague-Dawley (specific pathogen free animal)] 330마리를 공급 받았으며, 군 구성에는 243마리를 사용하였다.

동물 입수 직후 임시개체표시(꼬리표시법)를 함과 동시에 외형적 이상 유무를 확인하고 개체 별 체중을 측정 한 후 제1생명과학연구실 Rat방에서 7일간의 검역 및 순화기간을 가졌다. 순화기간 중에 1일 1회 일반증상을 관찰하고 사육관리는 시험기간 중의 사육관리와 동일하게 하였다. 검역 및 순화기간 종료일에 개체 별 체중을 측정하였으며, 이때의 체중을 기초로 하여 검역 및 순화기간 중 체중증가 및 일반증상에 이상이 없는 건강한 동물을 선발하여 각 군의 평균 체중이 가능한 한 균등하도록 무작위로 배치하여 시험군을 구성하였다.

동물은 인하대학교 의학전문대학원 제1생명과학연구실 RAT방에서 사육하였으며, 시험기간 중 동물실 환경은 온도 20~24 ℃, 습도 40~60 %, 환기횟수 시간 당 최소 10회 및 12시간 자동조명 (조명 08:00~20:00, 조도 150~300 Lux)으로 유지하였으며, 시험의 결과에 영향을 줄 만한 환경요인은 없었던 것으로 판단되었다. 시험 중인 동물은 폴리카보네이트 재질 사육상자 [220 Wx300 Dx180 H(mm)]를 이용하여 순화기간에는 2마리씩 수용하였으며, 순화종료 후 투여기간 동안에는 시험기간 중의 임상관찰 등을 위하여 1마리씩 수용하였다.

순화기간 및 투여기간 동안의 사육관리는 사육상자 바닥에 방사선조사 된 깔짚(Comfort Bedding, (주)계룡과학)을 깔아 분, 뇨를 처리하고, 주 3회 깔짚을 교환하였다. 물병은 주 1회 멸균된 새것으로 교환하였다. 사료는 실험동물용 방사선조사 고품사료(Purina Rodent Chow 38057)를 자유섭취 시켰으며, 음수는 상수도수를 역삼투압 필터하여 물병을 통해 자유섭취 시켰다. 사료에 대하여는 사료 구입 시 첨부된 로트별 분석성적서를 통하여 일반성분의 조성과 오염물질 유무를 확인하였고, 물에 대해서는 중앙생명과학 연구원(경기도 남양주시 별내면 청학리 215-4)에 ” 먹는물 수질기준

및 검사 등에 관한 규칙”에서 정한 바에 따라 분석을 의뢰하여 시험의 결과에 영향을 미치지 않는 것을 확인하고 사용하였다.

시험기간 중 동물의 개체식별은 케이지에 개체식별카드를 부착하고, 카드에 시험번호, 시험군, 동물번호 및 성별을 표시하여 구분하였다.

5. 시험방법

5.1 당뇨유발물질 조제

5.1.1 조제방법 및 빈도: 15 mL tube에 Streptozotocin (STZ)을 400 mg씩 칭량하고, 매 투여 시 15 mL tube 1개에 0.01M Sodium Citrate buffer (pH 4.5)를 섞어 최종 volume 10 mL로 적정하였다. STZ가 완전히 용해되도록 vortexing을 약 7분 정도 시행하였다. 칭량한 STZ, Citrate buffer 및 조제물(STZ+buffer)은 Ice Pack을 사용하여 투여종료 시까지 냉장상태를 유지하였다.

5.1.2 조제물 분석: 조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 본 시험기관에서 별도로 실시하지 않았다.

5.2 투여경로 및 선정근거

당뇨유발물질인 Streptozotocin (STZ)의 참고문헌을 참조하여 복강으로 투여하였다.

5.3 시험군 구성 및 투여용량

5.3.1 시험군

구분	STZ 투여용량 (mg/kg)	동물구분	동물수
G1	0	정상동물	30
G2	80	당뇨유발	300

5.3.2 투여용량 선정근거: 당뇨유발물질인 Streptozotocin (STZ)의 참고문헌을 참조하여 선정하였다.

5.3.3 투여기간 및 방법: Streptozotocin (STZ)을 0.01 M Citrate buffer (pH4.5)에 녹여 24시간 간격으로 복강에 2회 투여(40 mg/kg/injection)하였다. 매 투여 전 하룻밤(약 16시간) 절식하였으며, 1차 투여 전 하룻밤 절식 후 투여직전 체중을 측정하였다. 투여개시 당일을 시험 1일(Day 1)로 정의하였다.

6. 관찰항목

6.1 사망여부

모든 동물에 대하여 시험기간 중 1일 2회, 사망동물 및 빈사동물 발생여부를 관찰하였다. 특히, 투여 개시일 당일은 좀 더 세심하게 관찰하였다. 주말 및 공휴일은 오전 1회 관찰로 대신하였다.

6.2 임상증상 관찰

모든 동물에 대하여 시험기간 중 1일 1회 (투여 후 1시간 내외) 사육상자 바깥에서 세밀하게 관찰하였고, 관찰된 임상증상은 종류, 정도, 증상 시작날짜 및 시간, 진행 정도 및 상태변화 등을 개체 별로 임상증상관찰기록지에 기록하였다.

6.3 체중측정

동물 입수 시, 당뇨 유도 시 및 군 분리 시에 개체별 체중을 측정하였다.

6.4 혈당측정

모든 동물에 대하여 STZ 투여 후 1주 및 2주에 미정맥에서 채혈하여 혈당측정기(Accu-CHEK Performa, Roche)로 혈당을 측정하였다. 혈당측정 전일 하룻밤 (약 16시간) 절식하였다.

7. 통계처리

모든 시험결과는 평균과 표준편차로 나타내었다.

8. 시험결과

8.1 사망여부 및 임상증상

시험기간 동안 정상군(G1)에서는 사망 또는 빈사동물이 관찰되지 않았으나, STZ 투여군(G2)에서는 투여 후 2주차에 일부 개체가 사망하였다. STZ를 투여 한 모든 개체에서 투여 후 1주차부터 정상군(G1)에 비해 다음, 다식 및 다뇨 현상을 관찰할 수 있었다.

8.2 체중변화

시험기간 동안 정상대조군(G1)에서는 정상적인 체중 및 체중증가가 관찰되었으나, STZ 투여군(G2)은 정상대조군에 비해 체중이 감소하였다.

8.3 혈당변화

시험기간 동안 STZ 투여군(G2)은 투여 후 1주차에 혈중 당의 농도가 250 mg/dL 이상인 고혈당 개체의 발생비율은 약 27 %였으며, 2주차에는 약 19.3 %가 증가하여 총 46.3 %의 고혈당 개체가 관찰되었다.

9. 고찰 및 결론

본 시험조건 하에서 당뇨를 유발시킨 수컷 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 Streptozotocin (STZ)을 2일 간격으로 2회 복강 투여(40 mg/kg/injection)한 결과, 투여 후 2주차까지 혈중 당의 농도가 250 mg/dL 이상인 고혈당 개체의 발생비율은 총 46.3 %로, STZ를 투여 한 300마리 중 139마리의 고혈당 개체가 발생하였다. 상기의 시험결과를 바탕으로 다음과 같이 시험군을 구성할 수 있었다.

구분	시험물질	투여용량 (mg/kg/day)	동물구분	부검시점	동물수
G1	부형제	0	정상동물	8주	8
				12주	8
G2			당뇨유발	8주	8
				12주	8
G3	양성대조물질	TBD		8주	8
				12주	9
G4	시험물질1	TBD		8주	8
				12주	9
G6		TBD		8주	8
				12주	9
G7	시험물질2	TBD		8주	8
				12주	9
G8		TBD		8주	8
				12주	9

(TBD: To be determined)

10. 참고문헌

- 1) Juei-Tang Cheng et al. (2006). Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. DIABETES. Vol 55. pp 819~825.
- 2) Michelle McGUIRE et al. (1999). The influence of streptozotocin diabetes and metformin on erythrocyte volume and on the membrane potential and the contractile characteristics of the extensor digitorum longus and soleus muscles in rats. Experimental Physiology. Vol 84. pp 1051~1058
- 3) Jayesh B et al. (2006). Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sciences. Vol 78. pp 2615~2624.
- 4) Omotayo et al. (2010). Antioxidant protective effect of glibenclamide and metformin in combination with honey in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. Int. J. Mol. Sci. Vol 11. pp 2056~2066.

12. TABLES

(Group Summary)

Table 1. Mortality in Male Rats (Group Summary)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	No. of animals	Mortality		
			Number of Deaths		
			Week 1	Week 2	Mortality (%)
G1	0	30	0	0	0/30 (0)
G2	80	300	0	2	2/300 (0.67)

G1: Normal; G2: Diabetes

(END)

Table 2. Body Weight Changes in Male Rats (Group Summary)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)		Body Weight Changes (g)	
			Week 1	Week 2
G1	0	Mean	241.7	286.7
		SD	12.7	12.7
		N	30	30
G2	80	Mean	201.0	209.9
		SD	8.6	36.8
		N	300	298

G1: Normal; G2: Diabetes

N: Number of animals; SD: Standard deviation

(END)

Table 3. Incidence of High Blood Glucose Level in Male Rats (Group Summary)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	No. of animals	High Blood Glucose Level (> 250 mg/dL)		
			Number of Incidence		
			Week 1	Week 2	High Blood Glucose Level (%)
G1	0	30	0	0	0/30 (0)
G2	80	300	81	58	139/300 (46.3)

G1: Normal; G2: Diabetes

(END)

13. APPENDICES

(Individual)

Appendix 1. Clinical Observations in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Clinical Observations	
			Week 1	Week 2
G1 Normal	0	M1	N	N
		M2	N	N
		M3	N	N
		M4	N	N
		M5	N	N
		M6	N	N
		M7	N	N
		M8	N	N
		M9	N	N
		M10	N	N
		M11	N	N
		M12	N	N
		M13	N	N
		M14	N	N
		M15	N	N
		M16	N	N
		M17	N	N
		M18	N	N
		M19	N	N
		M20	N	N
		M21	N	N
		M22	N	N
		M23	N	N
		M24	N	N
		M25	N	N
		M26	N	N
		M27	N	N
		M28	N	N
		M29	N	N
		M30	N	N

N: Appears Normal

(CONTINUED)

Appendix 1. Clinical Observations in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Clinical Observations		Animal No.	Clinical Observations	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM31	N	N	TM61	N	N
		TM32	N	N	TM62	N	N
		TM33	N	N	TM63	N	N
		TM34	N	N	TM64	N	N
		TM35	N	N	TM65	N	N
		TM36	N	N	TM66	N	N
		TM37	N	N	TM67	N	N
		TM38	N	N	TM68	N	N
		TM39	N	N	TM69	N	N
		TM40	N	N	TM70	N	N
		TM41	N	N	TM71	N	N
		TM42	N	N	TM72	N	N
		TM43	N	N	TM73	N	N
		TM44	N	N	TM74	N	N
		TM45	N	N	TM75	N	N
		TM46	N	N	TM76	N	N
		TM47	N	N	TM77	N	N
		TM48	N	N	TM78	N	N
		TM49	N	N	TM79	N	N
		TM50	N	N	TM80	N	N
		TM51	N	N	TM81	N	N
		TM52	N	N	TM82	N	N
		TM53	N	N	TM83	N	N
		TM54	N	N	TM84	N	N
		TM55	N	N	TM85	N	N
		TM56	N	N	TM86	N	N
		TM57	N	N	TM87	N	N
		TM58	N	N	TM88	N	N
		TM59	N	N	TM89	N	N
		TM60	N	N	TM90	N	N

N: Appears Normal

(CONTINUED)

Appendix 1. Clinical Observations in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Clinical Observations		Animal No.	Clinical Observations	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM91	N	N	TM121	N	N
		TM92	N	N	TM122	N	N
		TM93	N	N	TM123	N	N
		TM94	N	N	TM124	N	N
		TM95	N	N	TM125	N	N
		TM96	N	N	TM126	N	N
		TM97	N	N	TM127	N	N
		TM98	N	N	TM128	N	N
		TM99	N	N	TM129	N	N
		TM100	N	N	TM130	N	N
		TM101	N	N	TM131	N	N
		TM102	N	N	TM132	N	N
		TM103	N	N	TM133	N	N
		TM104	N	N	TM134	N	N
		TM105	N	N	TM135	N	N
		TM106	N	N	TM136	N	N
		TM107	N	N	TM137	N	N
		TM108	N	N	TM138	N	N
		TM109	N	N	TM139	N	N
		TM110	N	N	TM140	N	N
TM111	N	N	TM141	N	N		
TM112	N	N	TM142	N	N		
TM113	N	N	TM143	N	N		
TM114	N	N	TM144	N	N		
TM115	N	N	TM145	N	N		
TM116	N	N	TM146	N	N		
TM117	N	N	TM147	N	N		
TM118	N	N	TM148	N	N		
TM119	N	N	TM149	N	N		
TM120	N	N	TM150	N	N		

N: Appears Normal

(CONTINUED)

Appendix 1. Clinical Observations in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Clinical Observations		Animal No.	Clinical Observations	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM151	N	N	TM181	N	N
		TM152	N	N	TM182	N	N
		TM153	N	N	TM183	N	N
		TM154	N	N	TM184	N	N
		TM155	N	N	TM185	N	N
		TM156	N	N	TM186	N	N
		TM157	N	N	TM187	N	N
		TM158	N	N	TM188	N	N
		TM159	N	N	TM189	N	N
		TM160	N	N	TM190	N	N
		TM161	N	N	TM191	N	N
		TM162	N	N	TM192	N	N
		TM163	N	N	TM193	N	N
		TM164	N	N	TM194	N	N
		TM165	N	N	TM195	N	N
		TM166	N	N	TM196	N	N
		TM167	N	N	TM197	N	N
		TM168	N	N	TM198	N	N
		TM169	N	N	TM199	N	N
		TM170	N	N	TM200	N	N
		TM171	N	N	TM201	N	N
TM172	N	N	TM202	N	N		
TM173	N	N	TM203	N	N		
TM174	N	N	TM204	N	N		
TM175	N	N	TM205	N	N		
TM176	N	N	TM206	N	N		
TM177	N	N	TM207	N	N		
TM178	N	N	TM208	N	N		
TM179	N	N	TM209	N	N		
TM180	N	N	TM210	N	N		

N: Appears Normal

(CONTINUED)

Appendix 1. Clinical Observations in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Clinical Observations		Animal No.	Clinical Observations	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM211	N	N	TM241	N	N
		TM212	N	N	TM242	N	N
		TM213	N	N	TM243	N	N
		TM214	N	N	TM244	N	N
		TM215	N	N	TM245	N	N
		TM216	N	N	TM246	N	N
		TM217	N	N	TM247	N	N
		TM218	N	N	TM248	N	N
		TM219	N	N	TM249	N	N
		TM220	N	N	TM250	N	N
		TM221	N	N	TM251	N	N
		TM222	N	N	TM252	N	N
		TM223	N	N	TM253	N	N
		TM224	N	N	TM254	N	N
		TM225	N	N	TM255	N	N
		TM226	N	N	TM256	N	N
		TM227	N	N	TM257	N	N
		TM228	N	N	TM258	N	N
		TM229	N	N	TM259	N	N
		TM230	N	N	TM260	N	N
TM231	N	N	TM261	N	N		
TM232	N	N	TM262	N	N		
TM233	N	N	TM263	N	N		
TM234	N	N	TM264	N	N		
TM235	N	N	TM265	N	N		
TM236	N	N	TM266	N	N		
TM237	N	N	TM267	N	N		
TM238	N	N	TM268	N	N		
TM239	N	N	TM269	N	N		
TM240	N	N	TM270	N	N		

N: Appears Normal

(CONTINUED)

Appendix 1. Clinical Observations in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Clinical Observations		Animal No.	Clinical Observations	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM271	N	D	TM301	N	N
		TM272	N	D	TM302	N	N
		TM273	N	N	TM303	N	N
		TM274	N	N	TM304	N	N
		TM275	N	N	TM305	N	N
		TM276	N	N	TM306	N	N
		TM277	N	N	TM307	N	N
		TM278	N	N	TM308	N	N
		TM279	N	N	TM309	N	N
		TM280	N	N	TM310	N	N
		TM281	N	N	TM311	N	N
		TM282	N	N	TM312	N	N
		TM283	N	N	TM313	N	N
		TM284	N	N	TM314	N	N
		TM285	N	N	TM315	N	N
		TM286	N	N	TM316	N	N
		TM287	N	N	TM317	N	N
		TM288	N	N	TM318	N	N
		TM289	N	N	TM319	N	N
		TM290	N	N	TM320	N	N
		TM291	N	N	TM321	N	N
		TM292	N	N	TM322	N	N
		TM293	N	N	TM323	N	N
		TM294	N	N	TM324	N	N
		TM295	N	N	TM325	N	N
		TM296	N	N	TM326	N	N
		TM297	N	N	TM327	N	N
		TM298	N	N	TM328	N	N
		TM299	N	N	TM329	N	N
		TM300	N	N	TM330	N	N

N: Appears Normal, D: Death

(END)

Appendix 2. Body Weight Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Body Changes (g)	
			Week 1	Week 2
G1 Normal	0	M1	246.7	291.7
		M2	268.1	313.1
		M3	251.4	296.4
		M4	246.6	291.6
		M5	250.4	295.4
		M6	247.3	292.3
		M7	244.9	289.9
		M8	254.5	299.5
		M9	225	270.0
		M10	239.3	284.3
		M11	248.1	293.1
		M12	222.2	267.2
		M13	243.8	288.8
		M14	256.6	301.6
		M15	263.5	308.5
		M16	251	296.0
		M17	235.5	280.5
		M18	223	268.0
		M19	240.4	285.4
		M20	249.3	294.3
		M21	240.8	285.8
		M22	238.4	283.4
		M23	246.9	291.9
		M24	231.3	276.3
		M25	215.3	260.3
		M26	246.7	291.7
		M27	226	271.0
		M28	243.3	288.3
		M29	220.8	265.8
		M30	233.2	278.2

(CONTINUED)

Appendix 2. Body Weight Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Body Changes (g)		Animal No.	Body Changes (g)	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM31	191.2	159.8	TM61	185.4	198.0
		TM32	186.4	182.6	TM62	199.3	191.5
		TM33	205.6	164.7	TM63	204.8	190.7
		TM34	196.1	231.1	TM64	196.6	187.1
		TM35	202.6	173.8	TM65	198.2	206.8
		TM36	198.8	197.1	TM66	208.8	192.5
		TM37	193.5	192.3	TM67	198.7	197.9
		TM38	198.5	309.5	TM68	202.8	234.1
		TM39	209.4	264.3	TM69	195.7	218.5
		TM40	196.9	152.9	TM70	191.6	170.3
		TM41	204.1	173.3	TM71	198.6	165.5
		TM42	200.2	190.0	TM72	207.1	199.4
		TM43	189.5	181.4	TM73	201.4	240.6
		TM44	204.8	179.2	TM74	204.8	213.5
		TM45	202.0	180.8	TM75	199.3	237.3
		TM46	198.6	172.3	TM76	202.6	230.6
		TM47	209.6	220.7	TM77	203.5	292.1
		TM48	207.9	191.7	TM78	207.5	221.5
		TM49	109.6	163.1	TM79	204.0	246.6
		TM50	196.8	175.8	TM80	204.5	182.6
		TM51	195.1	213.7	TM81	197.6	265.8
		TM52	199.0	162.4	TM82	205.8	186.2
		TM53	196.9	197.0	TM83	207.9	231.4
		TM54	208.1	204.5	TM84	184.4	176.6
		TM55	196.2	199.5	TM85	206.1	256.6
		TM56	197.8	231.0	TM86	197.6	291.1
		TM57	187.6	236.1	TM87	196.2	225.8
		TM58	195.1	173.8	TM88	195.6	170.3
		TM59	197.1	197.1	TM89	200.2	165.5
		TM60	199.9	192.3	TM90	195.5	199.4

N: Appears Normal

(CONTINUED)

Appendix 2. Body Weight Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Body Changes (g)		Animal No.	Body Changes (g)	
			Week 1	Week 2			Week 1
G2 Diabetes	80	TM91	213.9	214.2	TM121	199.8	174.1
		TM92	189.0	157.1	TM122	198.2	158.2
		TM93	203.5	187.5	TM123	218.2	158.8
		TM94	200.7	175.8	TM124	212.5	172.3
		TM95	202.2	221.0	TM125	207.2	192.4
		TM96	197.4	192.5	TM126	206.2	155.0
		TM97	191.9	190.1	TM127	194.1	246.6
		TM98	200.7	273.3	TM128	209.5	228.1
		TM99	198.0	282.8	TM129	213.7	297.6
		TM100	205.6	173.1	TM130	199.8	187.3
		TM101	202.2	174.2	TM131	206.8	180.2
		TM102	194.1	190.7	TM132	195.7	185.7
		TM103	191.7	200.5	TM133	210.3	147.3
		TM104	205.9	213.2	TM134	199.3	184.9
		TM105	202.4	188.1	TM135	215.8	304.5
		TM106	203.9	218.8	TM136	202.4	197.6
		TM107	200.2	200.7	TM137	207.2	204.5
		TM108	193.7	298.2	TM138	199.8	332.0
		TM109	193.4	169.5	TM139	209.6	180.1
		TM110	197.8	154.7	TM140	198.6	173.7
TM111	198.9	145.5	TM141	211.4	206.1		
TM112	196.7	204.2	TM142	205.4	208.3		
TM113	203.4	198.6	TM143	212.1	203.7		
TM114	209.2	189.8	TM144	199.8	227.5		
TM115	191.1	214.4	TM145	214.7	218.4		
TM116	205.4	231.4	TM146	204.9	266.5		
TM117	201.6	285.2	TM147	206.8	266.3		
TM118	206.3	173.1	TM148	201.2	187.3		
TM119	208.4	174.2	TM149	208.4	180.2		
TM120	203.4	190.7	TM150	204.5	185.7		

N: Appears Normal

(CONTINUED)

Appendix 2. Body Weight Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Body Changes (g)		Animal No.	Body Changes (g)	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM151	205.9	199.6	TM181	203.0	171.6
		TM152	188.6	207.6	TM182	209.4	243.6
		TM153	212.3	208.3	TM183	200.0	177.9
		TM154	205.9	181.6	TM184	206.8	184.6
		TM155	211.1	233.6	TM185	199.4	186.5
		TM156	195.1	201.8	TM186	205.3	194.0
		TM157	210.4	252.4	TM187	199.5	278.6
		TM158	203.9	242.4	TM188	196.4	215.1
		TM159	205.7	195.4	TM189	185.6	246.1
		TM160	196.4	208.6	TM190	193.8	193.5
		TM161	206.9	190.8	TM191	202.6	259.7
		TM162	197.9	174.4	TM192	209.7	174.3
		TM163	208.0	202.2	TM193	189.9	181.2
		TM164	194.5	214.1	TM194	198.5	186.0
		TM165	214.4	174.9	TM195	198.3	188.1
		TM166	195.8	236.9	TM196	203.7	253.9
		TM167	215.6	266.5	TM197	196.7	211.4
		TM168	204.7	312.0	TM198	204.7	268.5
		TM169	211.9	204.9	TM199	200.9	199.8
		TM170	196.7	194.2	TM200	200.0	233.3
		TM171	202.7	214.1	TM201	187.9	216.1
		TM172	218.0	201.4	TM202	204.9	194.2
		TM173	208.2	208.9	TM203	199.9	181.2
		TM174	216.7	205.2	TM204	210.1	219.7
		TM175	198.1	188.6	TM205	198.3	258.6
		TM176	216.9	257.3	TM206	208.0	266.2
		TM177	204.7	301.2	TM207	194.1	285.0
		TM178	206.2	184.6	TM208	215.2	208.6
		TM179	193.9	186.5	TM209	200.1	190.8
		TM180	217.1	194.0	TM210	207.2	174.4

N: Appears Normal

(CONTINUED)

Appendix 2. Body Weight Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Body Changes (g)		Animal No.	Body Changes (g)	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM211	203.5	202.5	TM241	187.4	170.6
		TM212	205.0	167.3	TM242	199.8	165.0
		TM213	202.9	174.4	TM243	214.3	170.9
		TM214	202.8	178.2	TM244	194.1	180.8
		TM215	197.2	166.2	TM245	204.1	202.4
		TM216	217.8	176.1	TM246	202.1	193.2
		TM217	206.9	227.2	TM247	213.4	275.5
		TM218	207.3	223.7	TM248	196.7	283.1
		TM219	196.1	260.3	TM249	212.7	269.4
		TM220	201.9	148.1	TM250	201.7	181.2
		TM221	202.5	235.8	TM251	205.3	190.5
		TM222	197.6	166.1	TM252	198.3	180.4
		TM223	194.3	199.3	TM253	193.7	191.1
		TM224	200.7	206.0	TM254	195.0	213.0
		TM225	190.9	185.5	TM255	195.6	202.4
		TM226	202.4	215.1	TM256	204.5	210.3
		TM227	195.3	216.9	TM257	202.9	223.0
		TM228	200.2	275.3	TM258	204.2	274.5
		TM229	203.0	184.2	TM259	191.1	206.7
		TM230	194.9	186.9	TM260	197.9	238.0
		TM231	197.0	172.3	TM261	203.9	224.6
		TM232	203.2	181.1	TM262	199.4	204.8
		TM233	189.8	248.7	TM263	202.1	240.1
		TM234	197.2	214.2	TM264	195.3	194.1
		TM235	208.5	266.9	TM265	201.8	220.3
		TM236	197.4	249.7	TM266	195.5	229.7
		TM237	216.1	278.5	TM267	191.1	294.2
		TM238	191.7	260.3	TM268	205.2	190.5
		TM239	210.5	148.1	TM269	198.0	180.4
		TM240	190.0	235.8	TM270	202.4	191.1

(CONTINUED)

Appendix 2. Body Weight Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Body Changes (g)		Animal No.	Body Changes (g)	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM271	188.9	Death	TM301	211.9	199.6
		TM272	203.1	Death	TM302	203.4	207.6
		TM273	194.3	177.9	TM303	211.6	208.3
		TM274	203.7	184.6	TM304	199.3	181.6
		TM275	194.6	186.5	TM305	207.8	233.6
		TM276	207.7	194.0	TM306	202.8	201.8
		TM277	195.5	278.6	TM307	205.6	252.4
		TM278	205.5	215.1	TM308	195.2	242.4
		TM279	194.9	246.1	TM309	193.2	195.4
		TM280	203.6	193.5	TM310	191.8	208.6
		TM281	196.7	259.7	TM311	193.0	190.8
		TM282	198.8	174.3	TM312	208.7	174.4
		TM283	193.5	181.2	TM313	197.9	202.2
		TM284	193.5	186.0	TM314	194.8	214.1
		TM285	199.7	188.1	TM315	200.7	174.9
		TM286	203.9	253.9	TM316	199.6	236.9
		TM287	200.8	211.4	TM317	194.9	266.5
		TM288	197.2	268.5	TM318	200.0	312.0
		TM289	202.0	199.8	TM319	201.3	204.9
		TM290	212.9	233.3	TM320	191.3	194.2
		TM291	192.9	216.1	TM321	198.5	214.1
		TM292	209.0	194.2	TM322	198.0	201.4
		TM293	204.4	181.2	TM323	205.6	208.9
		TM294	202.8	219.7	TM324	197.3	205.2
		TM295	195.0	258.6	TM325	193.4	188.6
		TM296	210.6	266.2	TM326	194.1	257.3
		TM297	192.6	285.0	TM327	204.4	301.2
		TM298	200.2	184.6	TM328	197.8	190.8
		TM299	211.5	186.5	TM329	206.5	174.4
		TM300	204.6	194.0	TM330	204.5	202.2

N: Appears Normal

(END)

Appendix 3. Blood Glucose Level Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)	
			Week 1	Week 2
G1 Normal	0	M1	89	74
		M2	74	94
		M3	93	94
		M4	75	100
		M5	73	90
		M6	93	84
		M7	78	115
		M8	76	104
		M9	100	93
		M10	75	93
		M11	78	95
		M12	85	92
		M13	82	102
		M14	87	94
		M15	74	84
		M16	71	87
		M17	79	89
		M18	92	89
		M19	82	88
		M20	94	84
		M21	71	82
		M22	71	70
		M23	68	91
		M24	88	92
		M25	84	85
		M26	70	87
		M27	78	74
		M28	75	92
		M29	81	93
		M30	72	87

(CONTINUED)

Appendix 3. Blood Glucose Level Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)		Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM31	444	251	TM61	237	502
		TM32	439	586	TM62	334	531
		TM33	244	322	TM63	99	297
		TM34	371	276	TM64	340	529
		TM35	211	536	TM65	359	336
		TM36	433	598	TM66	93	539
		TM37	93	79	TM67	285	525
		TM38	68	202	TM68	315	477
		TM39	81	79	TM69	297	478
		TM40	448	483	TM70	77	76
		TM41	97	514	TM71	85	176
		TM42	556	469	TM72	137	262
		TM43	340	482	TM73	93	85
		TM44	179	544	TM74	85	103
		TM45	220	521	TM75	80	147
		TM46	79	427	TM76	100	125
		TM47	86	248	TM77	114	425
		TM48	76	126	TM78	132	228
		TM49	69	88	TM79	73	180
		TM50	76	276	TM80	97	97
		TM51	151	342	TM81	92	148
		TM52	130	536	TM82	402	477
		TM53	371	522	TM83	126	333
		TM54	86	334	TM84	262	360
		TM55	150	424	TM85	273	338
		TM56	91	354	TM86	144	309
		TM57	100	433	TM87	95	431
		TM58	133	326	TM88	97	250
		TM59	488	514	TM89	68	85
		TM60	187	524	TM90	80	66

(CONTINUED)

Appendix 3. Blood Glucose Level Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)		Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM91	164	375	TM121	484	402
		TM92	112	319	TM122	301	89
		TM93	136	120	TM123	342	425
		TM94	191	377	TM124	243	433
		TM95	74	90	TM125	565	84
		TM96	74	80	TM126	237	103
		TM97	74	91	TM127	190	360
		TM98	68	78	TM128	88	79
		TM99	71	91	TM129	82	79
		TM100	63	87	TM130	71	76
		TM101	256	301	TM131	376	424
		TM102	155	330	TM132	491	353
		TM103	67	89	TM133	415	402
		TM104	80	99	TM134	112	124
		TM105	67	74	TM135	146	93
		TM106	78	70	TM136	134	147
		TM107	336	395	TM137	77	65
		TM108	120	345	TM138	296	573
		TM109	66	77	TM139	104	65
		TM110	63	80	TM140	68	78
TM111	97	81	TM141	94	248		
TM112	320	396	TM142	95	76		
TM113	238	232	TM143	153	181		
TM114	380	485	TM144	65	82		
TM115	370	478	TM145	95	82		
TM116	63	74	TM146	71	66		
TM117	75	76	TM147	167	122		
TM118	318	315	TM148	426	267		
TM119	296	394	TM149	141	73		
TM120	416	247	TM150	334	444		

(CONTINUED)

Appendix 3. Blood Glucose Level Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)		Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM151	72	78	TM181	375	600
		TM152	70	69	TM182	70	94
		TM153	170	118	TM183	159	287
		TM154	255	88	TM184	74	72
		TM155	71	77	TM185	113	264
		TM156	92	83	TM186	99	171
		TM157	211	250	TM187	405	505
		TM158	65	84	TM188	572	383
		TM159	84	116	TM189	288	591
		TM160	162	269	TM190	67	71
		TM161	95	98	TM191	120	269
		TM162	102	84	TM192	69	79
		TM163	61	73	TM193	110	289
		TM164	57	76	TM194	429	600
		TM165	104	76	TM195	198	218
		TM166	262	422	TM196	101	513
		TM167	71	82	TM197	76	90
		TM168	100	121	TM198	71	82
		TM169	115	101	TM199	83	84
		TM170	67	92	TM200	126	242
		TM171	382	545	TM201	423	574
		TM172	83	252	TM202	156	239
		TM173	85	505	TM203	78	109
		TM174	76	105	TM204	425	360
		TM175	79	92	TM205	361	464
		TM176	77	140	TM206	132	595
		TM177	189	72	TM207	96	105
		TM178	77	84	TM208	210	181
		TM179	100	87	TM209	62	72
		TM180	301	271	TM210	239	467

(CONTINUED)

Appendix 3. Blood Glucose Level Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)		Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM211	244	102	TM241	80	62
		TM212	108	127	TM242	78	95
		TM213	299	400	TM243	125	354
		TM214	433	467	TM244	83	600
		TM215	137	411	TM245	77	85
		TM216	104	288	TM246	89	78
		TM217	437	503	TM247	80	522
		TM218	84	86	TM248	69	349
		TM219	87	437	TM249	75	93
		TM220	297	460	TM250	90	80
		TM221	179	277	TM251	157	235
		TM222	184	323	TM252	138	78
		TM223	334	514	TM253	442	384
		TM224	159	160	TM254	499	366
		TM225	76	318	TM255	225	95
		TM226	109	315	TM256	79	436
		TM227	336	600	TM257	347	359
		TM228	286	503	TM258	70	122
		TM229	355	310	TM259	368	405
		TM230	405	418	TM260	65	90
		TM231	307	400	TM261	77	68
		TM232	78	103	TM262	66	69
		TM233	263	430	TM263	442	435
		TM234	128	421	TM264	80	76
TM235	69	157	TM265	114	153		
TM236	234	280	TM266	440	308		
TM237	282	383	TM267	72	123		
TM238	94	136	TM268	529	369		
TM239	144	334	TM269	301	268		
TM240	403	513	TM270	340	419		

(CONTINUED)

Appendix 3. Blood Glucose Level Changes in Male Rats (Individual)

Group/ Treatment	Dose Level (mg/kg)	Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)		Animal No.	Blood Glucose Level Changes (mg/dL)	
			Week 1	Week 2		Week 1	Week 2
G2 Diabetes	80	TM271	313	Death	TM301	66	93
		TM272	408	Death	TM302	79	84
		TM273	350	417	TM303	78	180
		TM274	118	67	TM304	63	116
		TM275	98	161	TM305	72	86
		TM276	122	158	TM306	69	96
		TM277	75	75	TM307	72	99
		TM278	59	72	TM308	76	74
		TM279	80	77	TM309	115	596
		TM280	76	71	TM310	112	101
		TM281	65	74	TM311	116	108
		TM282	194	404	TM312	162	130
		TM283	313	387	TM313	265	542
		TM284	56	169	TM314	89	86
		TM285	228	83	TM315	430	473
		TM286	191	295	TM316	323	251
		TM287	114	79	TM317	72	129
		TM288	383	288	TM318	226	572
		TM289	95	90	TM319	143	302
		TM290	132	79	TM320	517	577
		TM291	103	539	TM321	79	122
		TM292	190	260	TM322	91	84
		TM293	80	231	TM323	252	209
		TM294	73	145	TM324	273	237
		TM295	67	85	TM325	64	112
		TM296	59	69	TM326	246	349
		TM297	76	249	TM327	107	81
		TM298	72	89	TM328	65	89
		TM299	137	516	TM329	85	81
		TM300	70	123	TM330	140	73

(END)

STANDARD OPERATING PROCEDURE

Medikinetics Co, Ltd
<http://www.spfpig.com>

SOP#. RT-012

Issue: 2010. 10. 01

Revised: 2011. 04. 15.

Page 1 of 2

INDUCTION OF MILD DIABETES IN MICROPIGS BY STREPTOZOTOCIN AND NICOTINAMIDE

I. PURPOSE

Induction of a mild type of insulin-dependent diabetes mellitus with the use of nicotinamide (NIA) and streptozotocin (STZ) injections has been proven achievable in micropigs. This SOP provides practical guidelines and standard procedure for inducing mild diabetes in micropigs by NIA-STZ injection with some characteristics similar to type 2 diabetes.

A good indication of an induced mild diabetes in micropigs is characterized by reduced β -cell mass and disturbed residual insulin secretion leading to a modest hyperglycemia during an oral glucose tolerance test (OGTT).

II. SCOPE and RESPONSIBILITY

This standard operating procedure (SOP) shall be used when conducting studies or using micropig as animal model involving with chemical induction resulting tomild diabetes.

Prior to initiation of this procedure, the PWG-IACUC shall have reviewed and approved all animal use and study protocols involved. The herd supervisor and trained animal personnel under the supervision of the clinical or in-house veterinarian will be responsible for the conduct of this SOP. Protocols for proper care and use/handling of animals, as well as health and safety in the laboratory shall be reviewed first before the conduct of the procedures.

Applicably, protocols for proper care and use/handling of animals, as well as health and safety in the laboratory shall also be reviewed.

III. MATERIALS

- Streptozotocin (Sigma)
- Nicotinamide (Sigma)
- Sodium citrate buffer pH 4.7 or 4.5
- Normal saline solution (0.9%)
- Glucose solution (for emergency)
- Insulin (for emergency)
- Blood glucose tester/analyzer (in mg/dL)
- Syringes/needles

IV. PROCEDURE

A. Selection and animal preparation

1. Select male, 20-25 kg BW, 6 months to 1 year of age (avoid females to prevent influence of estrous cycle on glucose tolerance)
2. Allow 1-2 weeks of acclimatization and stabilization
 - a. Single-cage housing
 - b. Controlled environment (optimum conditions)
 - c. Once daily feeding (~ 300 - 400 grams)
 - d. *Ad libitum* fresh drinking water
 - e. 12-12h light-dark cycle

3. Measure (before induction) daily blood glucose level using portable blood glucose tester/analyzer.
 - a. Collect tiny amounts of blood using sterile punctures on the marginal ear vein.
 - b. Measure before feeding and 1 hour after feeding.

B. Nicotinamide administration

1. Prepare NIA dose of 67mg/kg per animal.
2. Dissolve in sterile normal saline solution at rate 300 mg/ml.
3. Inject I.V. 15 minutes before STZ injection

C. Induction: STZ injection

1. 2-dose STZ Injection method (2-day injection, 1 week interval)
 - a. Fast animal at least 12 hours.
 - b. Dissolve STZ in sodium citrate buffer at the rate **62.5 mg/ml** (for immediate use; do not store)
 - c. Day 1 injection: Inject **55 mg/kg STZ** slow I.V. for 1-2 minutes
 - d. Day 7 injection: Inject **50 mg/kg STZ** slow I.V. for 1-2 minutes
 - e. Monitor blood glucose level daily post-injection for about 2 weeks (vomiting usually occur post-injection)
 - f. Observe signs of hyperglycemia/glucosuria
 1. above 200 mg/dL blood glucose level
 2. frequent water drinking
 3. frequent urination
 4. urine dry splashes appear sticky on floor
2. 1-dose STZ Injection method (one-time injection)
 - a. Inject **100 – 150 mg/kg STZ** (dissolved in sodium citrate buffer at 62.5 mg/ml) slow I.V. for 1-2 minutes
 - b. Follow similar procedure above.

V. REFERENCES

1. Swindle, M.M. 1998. Surgery, Anesthesia, and Experimental Techniques in Swine
2. NRC 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals
3. Larsen MO and Rolin B. 2004. Use of the Göttingen minipig as a model of diabetes with special focus on type 1 diabetes research. *ILAR Journal* 45 (3): 303-313.
4. Larsen MO, Wilken M, Gotfredsen CF, Carr RD, Svendsen O and Rolin B. 2002. Mild streptozotocin diabetes in the Göttingen minipig. A novel model of moderate insulin deficiency and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1342-E1351.
5. Olsen AK, Bladbjerg EM, Marckmann P, Larsen LF and Hansen AK. 2002. The Göttingen minipig as a model for postprandial hyperlipidemia in man: experimental observations. *Laboratory Animals* 36: 438-444.

Documentation	Name	Title/Position	Signature	Date
Authored by	C.D. Solis	Veterinarian/Assoc. Mgr.		
Approved by	M.S. Lee	R&D / IACUC Chair		

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.