

316002-5

보안 과제( ), 일반 과제( ) / 공개( ), 비공개( ) 발간등록번호( )

수출전략기술개발사업 제 4 차 년도 최종보고서

11-1543000-003088-01

# 검역기술 고도화를 위한 스마트 탐지건 개발

최종보고서

2020. 05. 27.

주관연구기관 / 서울대학교  
협동연구기관 / 대구가톨릭대학교

검역기술  
고도화를  
위한  
스마트  
탐지건  
개발  
최종보고서

2020

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “ 검역기술 고도화를 위한 스마트 탐지건 개발” (개발기간 : 2016.02.~  
2019.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020 . 5 . 27 .

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자)

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교 산학협력단 (대표자)

위탁기관명 : 농림축산검역본부 인천공항지역본부 (대표자)

주관연구책임자 : 이병천

협동연구책임자 : 김태완

위탁기관책임자 : 우만수

\* 위탁기관인 농림축산검역본부 인천공항지역본부는 「검역기술고도화를 위한 스마트 탐지건 활용연구(p139~p170)」 위탁과제 참여

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의  
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	316002-5	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.02.28.- 2019.12.31	단 계 구 분	4/4
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	검역기술 고도화를 위한 스마트 탐지견 개발			
연구책임자	이 병 천	해당단계 참여연구원 수	총: 29명 내부: 23명 외부: 9명	해당단계 (4차년도) 연구개발비	정부:416,000천원 민간: 천원 계:416,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 132명 내부: 110명 외부: 22명	총 연구개발비	정부:1,748,000천원 민간: 천원 계:1,748,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 산학협력단 수의과대학 대구가톨릭대학교 산학협력단 의과대학			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 농림축산검역본부 인천공항 지역본부			연구책임자: 우만수	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

1. 본 연구를 통해 최초로 검역탐지견의 운동능과 집중력 분석을 위한 영상학적 행동학적 방법을 확립하였다.
2. 신품종 우수 검역탐지견 3종이상의 세포 banking과 체세포핵이식을 이용한 신품종 우수 검역탐지견 유래 복제견 6두를 생산하였다.
3. 형질전환 체세포핵이식을 이용한 운동능 향상 1) 근육 특이 PCK1 발현과 2) PPAR $\gamma$  발현 복제견 2종을 각각 생산하였다.
4. 근육 특이 PCK1 발현 복제견과 근육 특이 PPAR $\gamma$  발현 복제견의 분자생물학적 기법을 통해 안정적으로 유전자가 전이됨을 검증하였다.
5. 집중력 향상 HT3R 발현 복제견 1종을 생산하였다.
6. HTR 발현 복제견의 분자생물학적 기법을 통해 안정적으로 유전자가 전이됨을 검증하였다.
7. 신품종 우수 검역탐지견 유래 복제견의 생리학적 영상학적 정상성을 평가를 완료하였다.
8. 근육 특이 PCK1 발현 복제견과 근육 특이 PPAR $\gamma$  발현 복제견의 생리학적/영상학적 기법을 이용 정상성을 평가를 완료하였다.
9. 근육 특이 PCK1 발현 복제견의 영상학적 평가를 통한 골밀도, 근육량 및 근육성상을 분석하여 복제 우수 검역탐지견과 비교 분석하였다.
10. 행동학적 기법을 이용한 집중력 평가를 하여 신품종 우수 검역탐지견 유래 복제견과 근육 특이 PCK1 발현 복제견, PPAR $\gamma$  발현 복제견의 집중력을 비교 분석하였다.
11. 신품종 우수 검역 탐지견 유래 복제견은 탐지견 선발 과정을 통해 최종적으로 합격하여 탐지견으로 능력을 검증하였다.
12. 근육 특이 PCK1 발현 복제견의 탐지견 선발 과정을 통해 최종적으로 합격하여 검역 탐지견으로 능력을 검증받았다.

보고서 면수  
227

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>검역기술 고도화를 위해 신제품 우수 검역탐지견 세포를 기반으로 검역탐지견에게 필요한 자질인 <b>운동능 또는 집중력이 강화된 스마트 탐지견을 생산하는 것이다</b>. 또한 특정 유전자가 조절된 형질전환 복제견의 영상학적 분석을 이용한 운동능력 평가와 행동학적 분석을 이용한 집중력 평가를 실시하여, <b>최종적으로 검역기술의 고도화를 위해 검역현장에 적용하여 창의적 운용 검역체계를 구축하는 것이다</b>.</p>
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 본 연구를 통해 최초로 검역탐지견의 운동능과 집중력 분석을 위한 영상학적 행동학적 방법을 확립하였다.</li> <li>2. 신제품 우수 검역탐지견 3종이상의 세포 बैं킹과 체세포핵이식을 이용한 신제품 우수 검역탐지견 유래 복제견 6두를 생산하였다.</li> <li>3. 형질전환 체세포핵이식을 이용한 운동능 향상 1) 근육 특이 PCK1 발현과 2) PPAR<math>\gamma</math> 발현 복제견 2종을 각각 생산하였다.</li> <li>4. 근육 특이 PCK1 발현 복제견과 근육 특이 PPAR<math>\gamma</math> 발현 복제견의 분자생물학적 기법을 통해 안정적으로 유전자가 전이됨을 검증하였다.</li> <li>5. 집중력 향상 HT3R 발현 복제견 1종을 생산하였다.</li> <li>6. HTR 발현 복제견의 분자생물학적 기법을 통해 안정적으로 유전자가 전이됨을 검증하였다.</li> <li>7. 신제품 우수 검역탐지견 유래 복제견의 생리학적 영상학적 정상성을 평가를 완료하였다.</li> <li>8. 근육 특이 PCK1 발현 복제견과 근육 특이 PPAR<math>\gamma</math> 발현 복제견의 생리학적/영상학적 기법을 이용 정상성을 평가를 완료하였다.</li> <li>9. 근육 특이 PCK1 발현 복제견의 영상학적 평가를 통한 골밀도, 근육량 및 근육성상을 분석하여 복제 우수 검역탐지견과 비교 분석하였다.</li> <li>10. 행동학적 기법을 이용한 집중력 평가를 하여 신제품 우수 검역탐지견 유래 복제견과 근육 특이 PCK1 발현 복제견, PPAR<math>\gamma</math> 발현 복제견의 집중력을 비교 분석하였다.</li> <li>11. 신제품 우수 검역 탐지견 유래 복제견은 탐지견 선발 과정을 통해 최종적으로 합격하여 탐지견으로 능력을 검증하였다.</li> <li>12. 근육 특이 PCK1 발현 복제견의 탐지견 선발 과정을 통해 최종적으로 합격하여 검역 탐지견으로 능력을 검증받았다.</li> </ol>
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 형질전환 복제견 생산 시스템을 이용한 테러방지견 등 여타 국가 특수 목적견 생산이 기대된다.</li> <li>2. 스마트 탐지견의 현장 투입을 통한 연구 결과 실용화 및 현장애로의 해결이 가능할 것이다.</li> </ol>

	<p>3. 신제품 및 스마트 탐지견의 세포제조 Banking화 및 수출을 통한 산업화가 기대된다.</p> <p>4. 본 연구결과의 지적재산권확보 및 국내외 관련기업에 기술 실시가 가능할 것이다.</p> <p>5. 근육관련 질병 치료제 개발, 노화 억제 연구 및 행동장애 치료연구에 기초 자료로 활용이 가능할 것이다.</p> <p>6. 운동력 및 집중력에 대한 수의영상학적, 행동학적 평가 기법 개발 및 기준 제시가 가능할 것이다.</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	검역탐지견	체세포핵이식	형질전환	운동능	집중력
영문핵심어 (5개 이내)	quarantine detector dog	somatic cell nuclear transfer	transgenesis	exercise endurance	attention

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

제1장. 연구개발과제의 개요 .....	7
제2장. 연구수행 내용 및 결과 .....	20
제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	216
제4장. 연구결과의 활용 계획 등 .....	222
붙임. 참고 문헌 .....	225

# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 목적

### 가. 연구개발의 최종목표

본 연구개발의 목표는 신품종 우수 검역탐지견 세포를 기반으로 검역탐지견에게 필요한 자질인 운동능 또는 집중력이 강화된 스마트 탐지견을 생산하는 것이다. 특정 유전자가 조절된 형질전환 복제견은 영상학적 분석을 이용한 운동능력 평가와 행동학적 분석을 이용한 집중력 평가를 실시하여, 최종적으로 검역기술의 고도화를 위해 검역현장에 적용하여 창의적 운용 검역체계를 구축하는 것이다.



그림 1. 연구개발 과제의 개요

### 나. 연구개발 목표의 성격

- (1) 우수 복제 검역견의 실전배치 성공화 기술을 바탕으로 검역 현장에서의 추가 니즈(needs)를 적극적으로 반영하여 업그레이드된 기술력으로 스마트 탐지견을 개발하여 검역현장 적용을 목표로 하는 응용적·공익적 성격의 연구이다.
- (2) 스마트 탐지견의 개발은 개에서 세계 최초로 시도될 뿐 아니라 개체의 능력과 정상성에 대한 심도 깊은 과학적 분석이 필수적인 중장기적인 성격의 연구인 동시에 검증 기간 동



안 필요한 수요를 충족시킬 수 있도록 신제품 복제 검역탐지건을 공급하는 단기적인 성격도 갖는 연구이다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 가. 우수 복제 검역탐지건의 성공적 생산 및 실용화

#### (1) 체세포핵이식을 이용한 우수검역탐지건의 생산 및 다각적 지표 분석

(가) 검역탐지건이란 해외악성 가축전염병과 불법 동식물류의 국내 유입을 방지하기 위해 공·항만의 입국장, 특송화물, 국제우편물류센터 등에서 냄새를 맡아 불법으로 반입되는 휴대 축산/식물을 탐지해 내도록 고도로 훈련받은 특수견을 의미한다. 국내외에서 완벽한 검역 실시를 위해 많은 인력과 시설이 투입되고 있으나, 사람과 기계가 발견하기 어려운 검역물은 냄새를 통해 정확히 찾아내는 검역탐지건의 활용 필요성이 크게 증대되고 있다. 특히 해외에서는 탐지건의 적극적인 활용을 위해 정책적으로 검역탐지견 육성제도를 마련하여 증가하고 있는 수요를 충당하고 있다.

(나) 그러나 검역탐지견 생산을 위해 구입부터 선발까지 소요되는 인력, 노력, 비용의 투자에도 불구하고 선발 확률은 30%로 낮으며, 그 중 최상의 우수 자질을 가진 개체는 극소수에 불과하다. 또한 최상의 우수 자질을 가진 검역견간의 교배를 통해 생산된 검역탐지건의 선발율은 50%이하로 매우 낮다. 따라서 이러한 애로사항의 극복을 위하여 체세포핵이식을 이용하여 우수 검역탐지건을 복제 생산하여 우수형질을 보존 및 우수견을 생산하는 연구사업을 실시하였다.

(라) 우수검역탐지견 생산 연구 사업에서 4년간 총 20두의 우수검역탐지건을 생산하여 검역원에 공급하여 현장에 배치가 되었다. 이로써 우수검역견의 세포를 이용하는 체세포핵이식 탐지견 사업이 성공적으로 실용화되었다.

(마) 또한 행동학적, 유전학적, 영상학적 분석을 통해 우수한 검역탐지견 선발 지표를 개발하는 연구가 본 연구팀을 통해 수행되었으며 아래와 같은 지표들이 분석 되었다. 행동학적 우수성 지표는 우수 검역탐지건의 복제견과 비복제견에서 7 주령과 16 주령에 유견행동평가 실시한 결과 복제 검역탐지견은 행동에 행동학적 특징이 유지되고 있었던 반면 대조군인 비복제견의 경우 다른 양상을 나타내어, 복제견의 경우는 조기 행동평가가 유전 우수성을 위한 유의미한 지표로써 활용이 가능함을 검증했다.

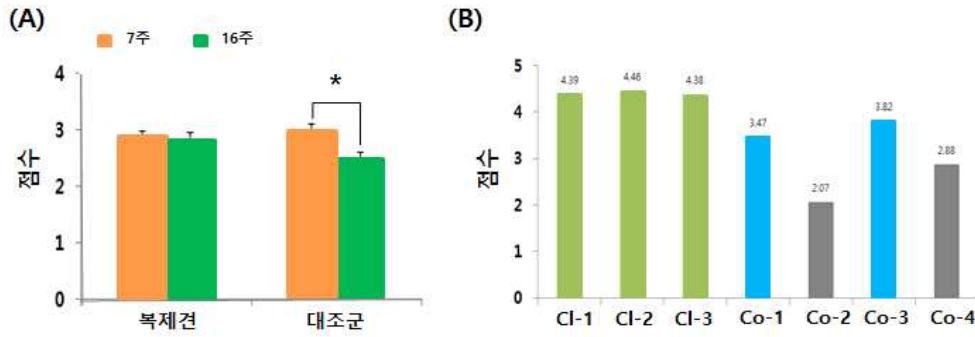


그림 2. 기억탐지건의 행동학적 분석 결과. (A) 연령에 따른 행동 일치성 분석. (B) 기억탐지건 선발테스트 결과 (CI-1 ~ CI-3, 복제건; Co-1 ~ Co-4; 비복제건).

(바) 우수 기억탐지건의 유전학적 지표 개발을 위한 SNP (단일염기다형성) 분석 결과, 일반 비글은 대부분 32번 염색체에서 hetero type (C/T)을 나타내는 SNP가 우수 기억 탐지건에서는 mutant type (C/C)을, 11번 염색체에서 hetero type (A/C)을 나타내는 SNP가 wild type (A/A)을 나타내는 빈도가 높았다.

(사) 후각관련 유전자의 SNP 분석 결과 우수 기억탐지건들은 일반 비글에 비해 C의 빈도가 6.5 배 많았으며, 유전자 염기서열 분석 시 동일 공여세포 유래의 체세포 핵이식 복제건 및 재복제건들의 염기서열이 모두 같았다.

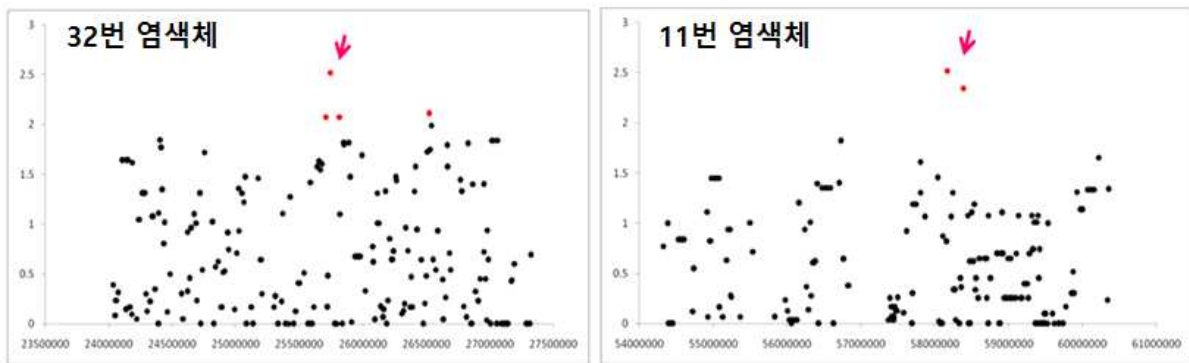


그림 3. 우수 기억탐지건 (●)과 일반 비글 (●)의 32번 염색체 (BICF2P1090057 genotype)와 11번 염색체 (BICF2P471203 genotype)에서의 SNP 분석 결과.

(아) 수의학 분야에서 첨단영상분야인 Functional magnetic resonance imaging (fMRI)를 이용한 후각연구를 위해 마취 방법을 확립, 기억물과 비기억물의 차이가 주로 후각영역보다는 인지, 기억의 영역에서 차이가 있음을 밝혀내어 기억탐지건에서의 우수성이 후각기능의 차이보다는 학습, 인지, 기억의 차이일 가능성을 제시하였다.

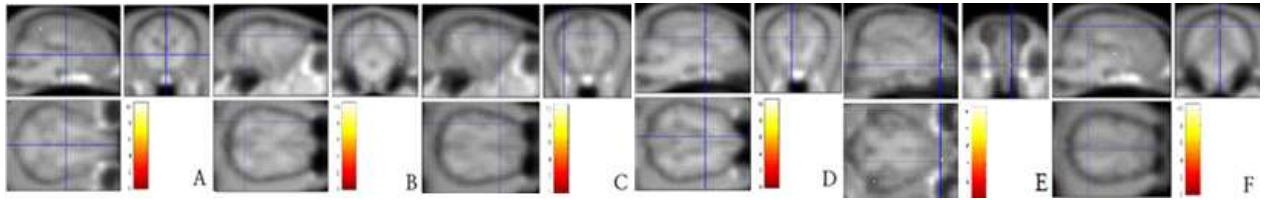


그림 4. 비검역물 대비 검역물에서 더 높은 활성화를 나타내는 부위의 fMRI 영상. 이 영역 들은 학습 및 인지능력에 관련한다고 알려져 있다. (A) Thalamus, (B) Cerebral white matter, (C) Cerebral white matter, (D) Cingulate cortex (anterior), (E) olfactory bulb, (F) occipital lobe.

(자) Volumetric MRI로 체중 대비 총 뇌용적 측정 시, 복제견 그룹 ( $05,155 \pm 1,061 \text{ mm}^3$ ) 이 비복제견 그룹 ( $77,306 \pm 850 \text{ mm}^3$ )에 비해 26% 컸고 ( $P < 0.05$ ), 특히 전두엽, 소뇌, 후각망울, 시상의 부피가 유의하게 컸는데, 이는 인의에서의 결과를 토대로 복제견의 인지 능력 및 후각 능력이 비복제견보다 우수할 가능성을 뒷받침한다.

표 1. 체중과 뇌의 용적 간 상관관계

	상관계수 (r)	
	체중	총 뇌용적
체중	1.00	0.79
총 뇌용적	0.79	1.00
전두엽	0.69	0.98
두정엽	0.75	0.99
측두엽	0.79	0.94
후두엽	0.80	0.95
소뇌	0.90	0.94
후각망울	0.81	0.79
이상엽	0.70	0.96
시상	0.90	0.94

표 2. 체중과 뇌의 총 용적이 통제된 부피 값과 공분산 분석 결과

	복제견 (mean ± SD)	비복제견 (mean ± SD)	p value
총 뇌용적	105,155 ± 1,061	77,306 ± 850	< 0.001
전두엽	15,130 ± 516	12,809 ± 370	0.017
두정엽	19,737 ± 679	18,171 ± 486	NS
측두엽	7,869 ± 3594	8,387 ± 426	NS
후두엽	5,185 ± 425	5,330 ± 305	NS
소뇌	6,915 ± 288	5,477 ± 401	0.049
후각망울	689 ± 41	461 ± 57	0.031
이상엽	228 ± 13	180 ± 9	NS
시상	1,453 ± 538	1,080 ± 43	< 0.001

(차) 결론적으로, 우수 검역탐지견과 이들의 체세포핵이식 탐지견들이 행동학적·유전학적·영상학적으로 유사한 특성을 나타낼 뿐 아니라 대조군과 다른 특성을 지닌다는 과학적 사실이 입증되었다. 또한, 세포 공여견의 우수한 자질 (학습, 인기, 기억)을 지닌 복제 검역탐지견이 대량공급 및 성공적으로 활용될 수 있었다.

(2) 우수 검역탐지견의 성공적인 실용화

(가) 체세포 핵이식 개 복제 분야에서 단순 복제 생산 기술도 중요하지만 기술을 응용하고 시장을 전망하는 안목과 새로운 개발 결과를 분석하여 연구 논문 등을 통해 과학적 근거를 제시하는 것도 중요하다. 본 연구팀에 의해 수행되었던 개 복제관련 논문 58편 중 “우수 검역탐지견의 복제생산 연구” 과제 수행을 통해 총 18 편의 연구 논문이 SCI 학술지에 게재된 만큼 충분한 과학적 검증을 통해 우수 탐지견의 복제견의 우수성을 입증하였다.

(나) 특수목적견의 경우 훈련에 소모되는 인력, 노력, 비용을 절감시키기 위해 복제를 하는 만큼 복제 특수목적견의 활용률이 매우 중요하다. “우수 검역탐지견의 복제생산 연구”는 최우수 탐지견 유래의 복제 및 재복제 견 총 20 마리를 농림축산검역본부 인천공항지역본부에 공급하였다.

(다) 우수 검역탐지견의 성공적인 실용화는 아래와 같이 언론의 주목을 받으며 대중들에게 알려짐으로써 검역에 대한 국민의 자긍심 및 중요성에 대한 인지도를 높였다.

- ‘마치’는 농림축산검역본부 인천공항지역본부 역대 최고의 검역탐지견 ‘데니’의 복제견으로 9개월의 훈련을 거쳐 공항에 배치되었고 아직 돌도 안됐지만 기존 탐지견보다 탐지율이 30% 이상 높다고 한다 (동아일보 2012. 12. 21.).

- 우수 검역탐지견 복제 생산 연구 사업을 통해 탄생한 복제 검역탐지견 14 마리가 전국 주요 공항과 항만 등 검역현장에서 큰 역할을 하고 있다. 우수탐지견의 복제가 유전자원을 보존하는데도 큰 도움을 줄 것이며 구제역 등 악성가축전염병과 목조건축물 등 문화재에 큰 피해를 주는 흰개미 등의 탐지도 가능하도록 검역탐지견의 활용범위를 넓혀갈 계획이다 (연합뉴스 2014. 07. 26.).

(라) 본 연구팀에 의해 수행된 “우수 검역탐지견의 복제생산 연구”는 복제 검역탐지견을 생산 후 전국 주요 공항만 등 검역현장에 성공적으로 실용화함으로써 우수 검역탐지견의 유전자원을 보존하는 동시에 국경 검역에서도 큰 효과를 보인 업적을 인정받아 2014년도 국가연구개발우수성과 100선 (미래창조과학부)에 선정되었다.



그림 5. “우수 검역탐지견의 복제 생산 연구”의 실용화. (A) 복제 검역탐지견 3두 (동아일보, 2012년 12월), (B) 2014년 미래창조과학부로부터 수여받은 국가연구개발우수성과 100선 상패.

## 나. 검역 환경의 변화

### (1) 해외 검역탐지견 운영 현황

(가) 국가 간 자유무역협정(FTA) 체결 등에 따른 교역의 확대에 의해 국가 간 물적·인적 교류가 기하급수적으로 팽창되고 있으며, 해외 여행객 급증, 특송화물의 급증으로 인해 국가 간 생물학적 위험물의 전파가 매우 빠르게 진행되고 있다. 우리나라 역시 이전에는 발생하지 않았던 메르스 등의 신종 전염병이 유입되었으며, 구제역과 같은 가축전염병, 고위험식물병해충 등 국내 생태계를 교란시킬 수 있는 불법반입 축산물의 유입의 기회가 가속화 되고 있는 실정이다.

(나) 인수공통감염병을 포함한 생물학적 위험물 유입의 위험을 인지한 여러 국가는 탐지견의 역할을 확대하여 위험물들을 적발할 수 있는 검역탐지견을 활용하여 왔다. 이 중 미국은 1984년 U.S. Department of Agriculture의 설립과 동시에 로스엔젤레스 국제공항에 식물·육류의 검역이 가능한 비글 검역견이 배치되는 것을 시작으로 2003년 약 75

두에서 현재는 116 두가 넘는 농산물 검역탐지견이 국경, 항공·유람선 터미널, 화물 창고 등의 장소에서 밀반입되는 농산물 검역을 담당하고 있다.

(다) 호주 역시 1991년 처음 검역탐지견을 도입한 이래로 각 공항 만에서 60 팀이 3,000~3,500 항목에 이르는 위험물의 유입을 차단하는 중요한 역할을 수행하고 있으며, 뉴질랜드 또한 39 개 팀에 이르는 검역탐지견 팀을 운용 중이다.

## (2) 국내 복제 검역탐지견 운영의 한계 및 문제점

(가) 신체적·정신적 한계로 인하여 복제 검역탐지견 1두의 운용 시간이 1회 50~60 분, 하루 7~8 시간 (일일 46편 항공기 탐지)로 제한되어 있으나, 2013년 이후 우수 복제 검역탐지견 15두의 현장 투입으로 탐지실적이 복제 검역탐지견 투입전에 비하여 급속도로 증가하였다.

(나) 그럼에도 불구하고 2012년부터 2015년까지의 탐지 현황을 보면, 인천공항에서 항공기의 총 입국편수와 국제우편 물류센터에서의 총 우편 건수가 4년 사이에 각각 123.5%, 551.2%로 빠르게 증가하고 있다. 우수 검역탐지견의 개체 수 확보를 통해 검역탐지견의 투입 역시 각각 113.6%, 376.4%로 크게 증가하였으나 검역물의 증가속도에 못 미칠뿐더러 그나마도 실제 입국되는 검역물 건 수 대비 약 12%, 35%에 불과한 상황이다.

(다) 또한 “우수 검역탐지견의 복제생산 연구”를 통해 국내 우수 검역탐지견 20두를 확보하였으나 기존 수입 동식물에 치중되었던 탐지의 영역이 재선충 등 국내 위해 생물까지 확대되고 있으며, 2017년 인천공항 제2청사 개청, 물동량 증가 등 업무 여건 변화에 대비한 예산, 인력 증원 및 새로운 개념의 탐지견의 확보 등 제반 인프라 보강이 필요한 환경으로 변하고 있다.

(라) 이러한 검역 환경의 변화에 대응하기 위해 우수한 개체 수 확보를 포함하여 질적으로 보다 향상된, 검역견의 신체적·정신적 한계를 개선한 새로운 탐지견의 개발이 시급하고 절실하며, 따라서 더 이상 우수한 개체 수 확보만으로는 역동적으로 변화하는 검역 현장에 대처하기에는 부족하다 할 수 있으며, 검역체계 고도화를 위해 복제견 생산 및 활용 연구는 “양보다 질”을 추구하는 방향으로 패러다임이 변화해야 한다.

## 다. 검역체계 고도화를 위한 스마트 탐지견 개발 연구의 필요성과 전망



그림 6. 검역탐지건의 선발을 위한 패러다임의 변화

- (가) 미국, 호주 등과 비교하여 열악한 국내 검역탐지견 운용 현황을 개선하기 위해서는 인력과 예산 확보 등 점진적이고 장기적인 대책마련과 함께 세계최고수준의 첨단 동물복제기술을 활용한 과학적 접근법이 필요하다.
- (나) 국내 검역탐지건의 초기 확보방안은 외부에서 우수한 종을 도입하고 번식에 의하여 탐지견을 확보하였다. 그러나 탐지견의 낮은 선발효율의 애로사항을 극복하기 위해 2015년에 종료된 “우수 검역탐지견 복제 생산 과제”를 통해 체세포핵이식을 통한 우수한검역탐지견을 양적으로 확보하였으며 선발 효율을 100%로 향상시켰다. 그럼에도 불구하고 검역환경의 급변과 검역견의 신체적인 한계로 인해 기존 우수 검역탐지견의 한계극복이 필요하게 되었다. 따라서 본 과제에서는 기존 우수검역탐지견의 신체적 능력의 한계 극복과 더불어 훈련과 탐지를 위해 필요한 자질로 밝혀진 집중력을 향상시킨 스마트 탐지견을 생산하고자 한다.
- (다) 마우스, 랫드에서 운동능 또는 집중력 관련 유전자 조절을 통해 그 능력을 향상시킨 연구 결과를 바탕으로, 개 체세포핵이식 기술과 유전자 조절기술의 융합을 통해 운동능/집중력이 향상된 스마트 탐지견을 생산하고자 한다.



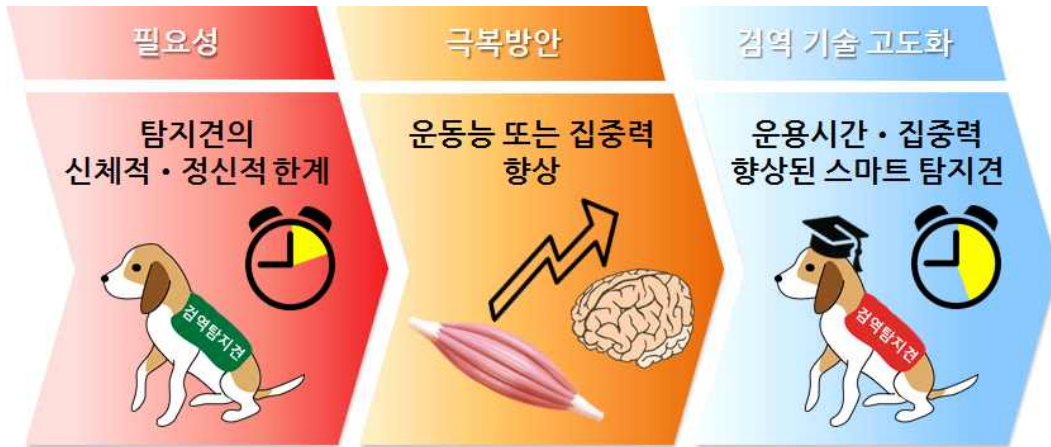


그림 7. 스마트 탐지견 개발 연구의 필요성과 전망

(라) 생산된 스마트 탐지견은 공공장소에서 공익을 목적으로 활용되므로 개체의 정상성과 일반 우수 탐지견보다 향상된 능력에 대한 과학적 검증은 필수적이며, 본 연구팀이 개발 및 보유한 영상학적 및 행동학적 방법등에 의해 분석하여 결과를 SCI 저널에 게재하여 증명하고자 한다.

(마) 능력이 검증된 스마트 탐지견은 재복제나 교배를 통해 대량생산 시스템 확립 가능성을 검증하여 과제 종료 이후에도 장기적이고 안정적인 공급을 통해 혁신적인 검역 선진국으로 거듭날 수 창의적 운용 검역체계 구축하고자 한다.

### 제 3 절 연구개발 범위

#### 가. [1차년도] 신제품 검역탐지견의 복제 (복제 탐지견) 생산 및 운동능·집중력 평가 기법 개발

##### (1) 신제품 검역 복제 탐지견 생산

- (가) 국내외 신제품 우수 검역탐지견 3종 이상 बैं킹(검역원의 선발평가에서 상위 10% 이내 성적을 획득한 개체 및 국내 활동영역에서 우수한 성적을 지닌 개체의 세포)
- (나) 우수 검역탐지견의 체세포 핵이식 복제 탐지견 2종 이상 생산 및 검역원 이송
- (다) 복제견 생산 효율 향상 기법 개발

##### (2) 개의 영상학적 방법 및 행동학적 방법을 이용한 운동능 평가 기법 개발

- (가) 개에서 CT에 의한 근육량의 영상학적 분석기법 개발
- (나) MRS/CEUS에 의한 근육성상의 영상학적 분석기법 개발
- (다) 개의 행동학적 방법을 이용한 운동능 평가 기법 개발



- (3) 개의 영상학적 방법 및 행동학적 방법을 이용한 집중력 평가 기법 개발
  - (가) 개에서 vMRI/고해상도 MRI에 의한 집중력 관련 뇌 분석법 개발
  - (나) 자견에서 보상물에 대한 집중력 분석을 위한 행동학적 기법 개발
- (4) 신제품 복제건의 검역탐지견으로의 자견 자질 평가
- (5) 운동능 조절 유전자 I 발현 (근육 특이 PCK1 발현) 세포주 확립
  - (가) 형질전환 세포주 제작에 적합한 세포주 및 유전자 전이 vector system의 선별
  - (나) 근육 특이 PCK1 발현 세포주 제작

**나. [2차년도] 운동능 조절 유전자 I 발현 (PCK1 발현) 복제견 생산 및 운동능 조절 유전자 II 발현 (PPAR $\gamma$  발현) 세포주 확립**

- (1) 운동능 조절 유전자 I 발현 (PCK1 발현) 복제견 생산
  - (가) 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 복제견 생산
  - (나) 근육 특이 PCK1 발현 복제견 생산 및 검역원 이송
  - (다) 근육 특이 PCK1 발현 복제자견에서 생리학적 정상성 분석: 예비실험을 통해 생산한 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 개체에서 8주령, 6개월령에 CBC를 실시
- (2) 신제품 검역 복제 탐지견 생산
  - (가) 신제품 체세포주 확립
  - (나) 신제품 우수 검역탐지견 세포를 이용하여 체세포 복제견 3두 생산
- (3) 1차년도 생산 신제품 복제건의 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성 평가
  - (가) 1차년도 생산 복제건의 X-ray를 이용한 해부학적 정상성 평가
  - (나) 1차년도 생산 복제건의 초음파를 이용한 해부학적 정상성 평가
  - (다) 1차년도 생산 복제건의 CT를 이용한 해부학적 정상성 평가
- (4) 1차년도 생산 신제품 복제건의 영상학적 및 행동학적 기법을 이용한 운동능 평가
  - (가) 일반 비글견 및 복제 탐지 자견/성견에서 CT를 이용한 근육량 분석
  - (나) 일반 비글견 및 복제 탐지 자견/성견에서 MRS에 의한 근육성상 분석
  - (다) 일반 비글견 및 복제 탐지 자견/성견에서 CT에 의한 골밀도 측정법 개발 및 분석
  - (라) 1차년도 생산 복제건의 행동학적 기법을 이용한 운동능 평가
- (5) 1차년도 생산 신제품 복제건의 영상학적 및 행동학적 기법을 이용한 집중력 평가
  - (가) 성견에서 vMRI/고해상도 MRI에 의한 집중력 관련 뇌 분석법 개발
  - (나) 1차년도 생산 복제건의 행동학적 기법을 이용한 자견/성견에서 보상물에 대한 집중력 평가

(6) 1차년도 생산 신품종 복제건의 검역원 검역 현장 적용 가능성 분석

(가) 1차년도 생산 복제건의 검역원 검역 현장 적용 가능성 분석

(나) 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 유건/자건 자질 행동 평가

(7) PCK1 발현 복제건의 유전학적 분석

(8) 근육 특이 PPAR $\gamma$  발현 세포주 제작

#### 다. [3차년도] 운동능 조절 유전자 II 발현 (PPAR $\gamma$ 발현) 복제건 생산 및 5-HT3R 발현 세포주 확립

(1) 근육 특이 PCK1 발현 복제건 생산

(가) 근육 특이 PCK1 발현 복제건 생산 및 이송

(나) 근육 특이 PCK1 발현 복제자건에서 생리학적 정상성 분석

(다) 근육 특이 PCK1 발현 성건의 번식학적 정상성 분석

(2) 근육 특이 PCK1 발현 성건의 영상의학적 정상성 평가

(가) X-ray를 이용한 해부학적 정상성 평가

(나) 초음파를 이용한 해부학적 정상성 평가

(다) CT를 이용한 해부학적 정상성 평가

(3) 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 운동능·집중력 평가

(가) 일반 복제건(복제 검역탐지건) / 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 근육량 분석

(나) 일반 복제건 / 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 근육성장 분석

(다) 일반 복제건 / 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 골밀도 분석

(라) 일반 복제건 / 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 대뇌 피질과 전두엽의 부피 측정값

(4) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건 생산

(가) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건 생산 및 이송

(나) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제 자건에서 생리학적 정상성 분석: 성장 시 연령 (1, 2, 4 개월령)에 따른 PPAR $\delta$  발현 복제건에서의 혈액학적 분석 평가

(5) 운동능 향상 복제건I·II의 행동학적 방법을 이용한 운동능 평가

(가) 트레드밀을 이용한 PCK1 발현 및 PPAR $\delta$  발현 복제건의 운동에 따른 심박수 평가

(6) 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 유건/자건 자질 행동 평가

(가) 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 탐지건 선발 테스트

(나) 스마트 탐지건으로의 근육 특이 PCK1 발현 복제건 검역 현장 적용 검증

- (7) 근육 특이 PCK1 발현 및 PPAR $\delta$  발현 복제건들의 유전학적 분석
  - (가) 근육 특이 PCK1 발현의 나이에 따른 유전자 발현량 추이를 유전학적으로 분석
  - (나) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건 유전학적 분석

- (8) 집중력 향상(5-HT3R) 세포주 개발 및 검증

**라. [4차년도] 집중력 향상(5-HT3R 발현) 복제건 생산 및 운동능 조절 유전자 발현 복제건 분석<sup>1)</sup>**

- (1) 5-HT3R 발현 복제건 생산 및 이송
- (2) 5-HT3R 발현 복제건의 정상성 분석
  - (가) 5-HT3R 발현 복제건의 생리학적 정상성 분석
  - (나) 5-HT3R 발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성 분석
  - (다) 5-HT3R 발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 집중력 관련 대뇌피질 및 전두엽 부피 분석
- (3) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건의 정상성 분석
  - (가) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건의 생리학적 정상성 분석: 6개월령과 1년령에 혈액 검사 실시
  - (나) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건의 번식학적 정상성 분석
- (4) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성 평가
  - (가) 심장의 구조적, 기능적 정상성을 초음파 검사를 통해 평가
  - (나) 복강 내 장기의 구조적 정상성을 초음파 검사를 통해 평가
  - (다) 근골격계의 구조적 정상성을 CT 및 방사선 촬영 검사를 통해 평가
- (5) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 운동능·집중력 평가
  - (가) 근육량의 정량적 평가
  - (나) 복제건의 대퇴부 근육량의 정량적 평가
  - (다) MRS를 이용하여 대퇴부 근육 대사물질의 정량적 평가 및 분석
  - (라) PPAR $\delta$  발현 복제건의 영상학적 방법을 이용한 집중력 분석
- (6) 운동능 향상 PCK1 및 PPAR $\delta$  발현 복제건의 운동능력 평가 및 분석: 운동능 향상 복제건의 평가를 위해 트레드밀 운동 또는 임무수행 전후 운동능을 다양한 방법으로 평가
- (7) 운동능 향상 복제건들의 검역탐지건 훈련 및 평가; 결과 없음
  - (가) 근육 특이 PCK1 발현 및 PPAR $\delta$  발현 복제건의 검역 현장 적응 평가

---

1) 4차년도 4월에 연구 중단됨

- (나) 5-HT3R 발현 복제건의 유전/자건에서 탐지건 자질의 행동학적 평가
- (다) 5-HT3R 발현 복제 자건에서 보상물에 대한 집중력을 행동학적으로 평가
- (라) 복제건의 탐지건 선발 테스트

(8) 5-HT3R 발현 복제건의 유전학적 분석

- (가) 5-HT3R 형질전환 세포주의 분자생물학적 분석 및 복제건 생산을 위한 제1세부과제로의 세포주 공급
- (나) 생산된 5-HT3R 발현 복제건의 genomic DNA PCR 분석
- (다) 생산된 5-HT3R 발현 복제건의 Southern blotting 분석

(9) 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 유전학적 분석: 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 유전학적 분석 및 나이에 따른 유전자 발현량 추이 분석

(10) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건의 유전학적 분석

- (가) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건 생산을 위한 제1세부과제로의 근육 특이적 PPAR $\delta$  발현 세포주 공급
- (나) 생산된 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건의 genomic DNA PCR과 Southern blotting 분석
- (다) 근육 조직에서의 PPAR $\delta$  유전자 발현에 대한 분자생물학적 분석

## 제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 추진전략, 추진체계 및 추진 일정

#### 1. 연구개발 추진전략

##### 가. 전문가 확보 및 컨소시엄 구성

- (1) 스마트 탐지견 개발 연구는 운동능/집중력이 향상된 형질전환 복제개를 생산할 수 있는 능력도 중요하지만, 생산된 개체의 생리학적·해부학적·번식학적 분석 연구를 수행할 수 있는 능력과 유전학적·행동학적·영상학적 분석 연구를 수행할 수 있는 능력 등 개발된 형질전환 복제개의 정상성과 능력에 대한 과학적인 검증이 반드시 수반되어야 한다. 따라서 스마트 탐지견 개발 연구의 주관 연구기관은 다수의 SCI 논문을 통해 전 세계적으로 과학적인 분석 능력을 기 입증 받은 기관이 되어야 할 필요가 있고, 그러한 분석 능력을 기반으로 스마트 탐지견 개발 연구를 주도해야만 한다. 따라서 본 연구팀은 스마트 탐지견 개발 연구를 위해 다음과 같이 컨소시엄을 구성하였다.
- (2) 운동능 또는 집중력이 향상된 스마트 검역탐지견을 생산, 분석, 실용화하기 위해서 **1) 체세포 핵이식 기법을 통한 형질전환 복제견 생산 기술과 생리학적·번식학적·영상학적 분석 기술을 가진 서울대학교를 주관 연구기관**으로 하여 **2) 형질전환 세포주 생산 기술과 복제배아 및 복제견의 유전자 분석 기술을 가진 대구가톨릭대학교 연구팀을 협동기관**으로 하는 한편, **3) 검역탐지견 훈련 기술과 행동 평가 기술을 보유하고 있으며 검역지견을 실제 운용하고 있는 농림축산검역본부 인천공항지역본부를 위탁연구기관**으로 연구를 시행하였다. 이처럼 각 해당 분야 기술보유기관이나 탐지견 운용경험이 있는 기관이 컨소시엄을 구성하여 스마트 탐지견의 생산부터 분석 및 검역고도화에 이르기까지 유기적인 개발체계를 구축하는 전략으로 추진하였다.

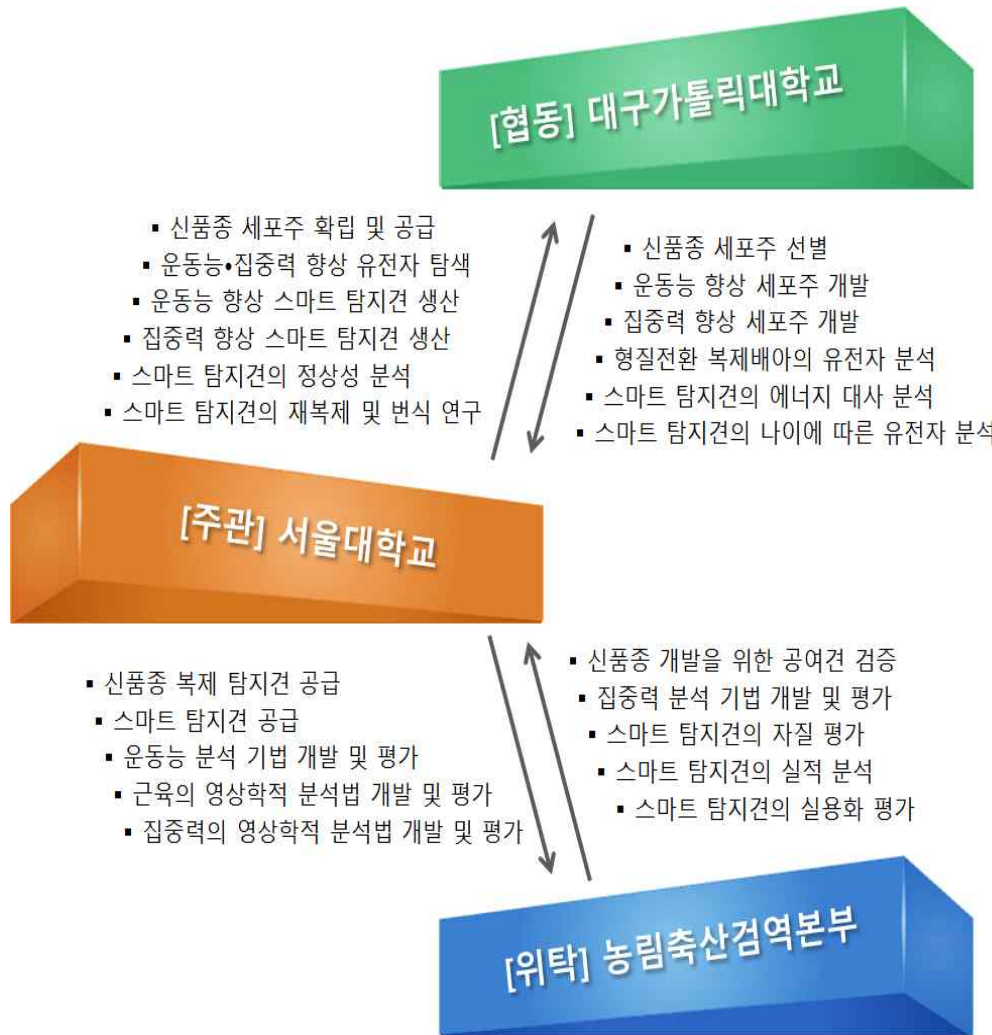


그림 8. 스마트 탐지건 개발 연구를 위한 컨소시엄

나. 본 연구과제의 수행을 위한 연구 전략

(1) 국내외 관련학술지의 문헌조사와 인터넷을 이용한 정보검색과 관련 분야 학술대회 참가를 통한 연구자와의 교류를 통해 최신 연구동향을 파악함으로써, 최종목표인 “집중력/운동능력이 기존의 탐지건보다 대부분의 평가에서 혹은 종합적인 평가에서 우수한 스마트 탐지건을 개발”에 필요한 가장 효율적인 접근 방법을 확보하였다.

(2) 스마트 탐지건 생산을 위해서는 연구개발에서 생산된 복제건을 평가하고 운용할 수 있는 농림축산검역본부 인천공항지역본부, 확립된 공여세포를 이용해 형질전환 세포주를 제작할 수 있는 대구 가톨릭 의과대학교, 개 복제 선행연구 성과를 보유한 서울대학교 간의 유기적 연구 전략을 통해 수행하였다.

(3) 본 과제의 수행에 필수적 요소이지만 본 연구팀에서 현재 보유하고 있지 않은 장비와 단

시간 내 확보가 어려운 훈련기술은 최적의 외부 인프라를 이용함으로써 최상의 결과 도출하였다.



그림 9. 스마트 탐지건 생산, 분석 및 활용을 위한 연구 전략

(가) 운동능 또는 집중력이 향상된 스마트 탐지건 생산 연구 전략

- ① 운동능 향상된 스마트 탐지건 생산을 위해 2가지의 유전자를 활용하고자 하며, 에너지대사를 증진시킬수 있는 PCK1과 PPAR $\delta$  유전자를 각각 근육 특이적으로 발현된 탐지건을 생산하여 일반 복제건을 대조군으로 하여 비교 분석하는 전략으로 계획
- ② 세 가지 타입의 PPAR (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$ ) 중 PPAR $\delta$ 가 골격근에 가장 많이 발현하고 근육 내 지질대사와 미토콘드리아 기능을 향상시켜서 에너지 생산을 높이고 근육 기능 향상과 관련된 근섬유 형태의 변화를 유도 (Manickam and Wahli, 2017, Biochimie)
- ③ 최근 연구에서는 PPAR $\delta$  유전자가 PGC-1 $\alpha$ 와 미토콘드리아의 정상 수준을 유지하는 역할을 할 뿐 아니라 고 운동 시 근육 내 미토콘드리아 향상에 필수적이라는 것이 밝혀짐 (Koh et al., 2017, Cell Metab)
- ④ PPAR $\delta$  유전자를 과발현 시킨 마우스의 경우 동일령 대조군 대비 제1형 근섬유의 발현이 증가하고 두 배 이상의 거리를 달릴 수 있었고 (Wang et al., 2004, PLoS Biol), 최근 연구 결과에서는 PPAR $\delta$ 가 glucose catabolism을 억제한 채로 대조군 대비 100분까지도 더 달릴 수 있음이 입증됨 (Fan et al., 2017, Cell Metab)
- ⑤ PPAR $\delta$  agonist가 근위축 치료제로써 특허가 등록되고 (US 9487493 B2), 근육량 향상이나 근력 향상 치료제로써 특허가 출원(US 20170305894 A1)되는 등 PPAR $\delta$ 의 근육 기능 증진 효과를 이용한 지적재산권 선점 노력이 지속되고 있음
- ⑥ 따라서 PPAR $\delta$ 를 근육 특이적으로 발현시킨 세포를 이용하여 운동능이 향상된 스마트 복제건을 생산하는 전략임
- ⑦ 집중력 향상 복제건의 생산을 위해 다양한 유전자를 고려하였으며 대상 유전자를 녹아웃시키거나 과발현시킨 형질전환 마우스에서의 집중력 및 인지능력 결과를 분석하여 집

중력 향상 등을 기대할 수 있는 유전자를 선정하였음. 집중력을 포함한 인지능력에는 세로토닌, 도파민, 노르에피네프린 등이 균형을 서로 조절하여 영향을 끼치기 때문에 해당되는 유전자 또는 유전자의 수용체를 선택

- ⑧ 세로토닌 수용체 과발현 마우스는 기억력 외에 집중력의 향상이 보고 (Harrel and Allan, 2003, Learning & Memory) 되었고 세로토닌 수용체 녹아웃 마우스는 집중력에 대한 영향은 분석하지 않았으며 Anxiety가 성별에 따라 상반되는 결과가 나타났음 (Bhatnagar et al., 2004, Behav Brain Res). 세로토닌 수용체 과발현 마우스의 집중력 향상 결과를 토대로 하였을 때 형질전환 개 생산시 동일한 세로토닌 수용체 과발현 마우스에서 집중력 향상을 기대
- ⑨ 도파민 유전자 과발현 마우스에서 과잉행동이 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 없으며 (Salahpour et al. 2008, PNAS), 도파민 전달체 녹아웃 마우스는 과잉행동장애가 보임 (Giros et al. 1996, Nature). 도파민 유전자 과발현 마우스는 과잉행동에 대한 평가만 진행되었으며 집중력에 대한 평가를 진행하지 않았기 때문에 녹아웃 마우스의 결과를 토대로 개에서 과잉행동 및 집중력 등에 영향을 끼칠 가능성을 제고
- ⑩ 노르에피네프린 유전자는  $\alpha$ -2 adrenoceptor agonist로 쓰이는 guanfacine과 clonidine이 랫트와 원숭이에서 집중력을 향상시킬 수 있다는 연구 결과 (Learn Mem; Sagvolden, 2006, Behav Brain Funct; Rama et al., 1996, Pharmacol Biochem Behav)로 이 유전자의 조절에 의한 집중력에 대한 영향 가능성이 제기되었음. 하지만  $\alpha$ -adrenergic 수용체 과발현 마우스의 경우 신경조직의 퇴화가 관찰되며 (Zuscik et al., 2000, Nature), adrenergic 수용체 녹아웃 마우스에서는 주의집중력에 큰 영향이 없었음 (Luhrs et al., 2016, Neuroscience). 따라서 노르에피네프린 유전자는 세로토닌이나 도파민 유전자에 비해서는 가능성 낮음
- ⑪ 니코틴은 특이적인 상황에서 랫의 지속적인 집중력을 향상시키는 것으로 발표함 (Mirza and Stolerman, Psychopharmacology, 1998). 니코틴 의존적인 동물의 경우에도 니코틴을 결핍시키면 지속적 집중력이 감소한다고 함 (Semenova, Stolerman & Markou, Pharmacol Biochem Behav, 2007). 흡연자 가운데 흡연이 집중하고 기억하는데 도움을 준다고 보고한 사례는 있음 (Wesnes & Warburton, Neuropsychobiology, 1983; Piper et al., J Consult Clin Psychol, 2004). 동물 연구에서도 니코틴이 집중력을 향상시키는 것은 흡연자들에서 보고된 바와 같은 결과이기는 하나 주어진 업무의 특성에 따라 집중력의 영향이 다르며 이러한 니코틴 결핍에 대한 집중력에 대한 영향은 연구 결과에 따라 일치성이 떨어짐 (Heishman et al. Exp Clin Psychopharmacol 1994; Kassel, Clin Psychol Rev, 1997). 이러한 연구결과를 바탕으로 할 때 니코틴 또한 세로토닌 수용체 또는 도파민에 비해 집중력에 영향을 끼칠 가능성 낮음
- ⑫ 따라서 우선 1차적으로 검토 가능한 유전자는 serotonin 수용체 유전자이고 두번째 고려대상 유전자는 도파민 유전자이며 접근 방식은 모두 과발현시킨 세포를 이용하여 스



마트 복제건을 생산하는 전략

유전자	과발현 마우스 표현형	억제된 마우스 표현형
5-HT <sub>2</sub> Receptor	기억력, 집중력의 향상	Anxiety가 성별에 비해 증가 또는 감소
Dopamine	과잉행동 (hyperactivity) 발가시 유의적 차이 없음	주의력 결핍 과잉행동장애와 비슷한 hyperactivity가 나타남
Adrenergic Receptor	뇌를 비롯한 신경 조직의 α-adrenergic 수용체를 발현하는 부위에서 시작된 신경 회로 관찰	수용체 subtype에 따른 주의력의 차이가 관찰되지 않고 대조군에 비해서도 유의적이지 않음
Nicotinic Receptor	충동성 (impulsivity)이 감소된 행동 관찰	전략적 집중력이 유의적으로 감소

그림 10. 집중력 향상 복제건 생산을 위한 전략

(나) 운동능 또는 집중력이 향상된 복제건의 정상성 및 운동능 또는 행동학적 분석전략

- ① 대조군 대비 형질전환복제건의 정상성 및 특성을 해부학적, 생리학적, 번식학적으로 분석하고, 목적 유전자의 과발현으로 개체의 운동능 또는 집중력이 향상된 경우 나이에 따라 이들 유전자의 발현을 모니터링하여 개체의 특성이 유지되는지에 대한 분석을 협동연구기관에서 매년 실시
- ② 다양한 영상장비(X-ray, 초음파, CT, MRS, MRI 등)를 이용하여 해부학적 정상성 및 특성을 분석하고, 혈액검사를 통해 생리학적 정상성 및 특성을 분석하고, 성견에 도달한 이후 기존 복제 탐지견과 비교 정액 검사를 통해 번식학적 정상성 및 특성을 분석.
- ③ 운동능 향상 복제건의 운동능을 평가하기 위하여 다음과 같은 국내외 연구동향을 바탕으로 개에서 트레드밀을 이용한 훈련방법을 확립하고, 대조군 대비 형질전환복제견에서 심박수의 변화를 분석하는 전략을 수립하였다.
- ④ 고온 환경에서 군견의 생리학적 적응 분석을 위해, 말리노이즈 군견을 실온에서 2-8 km 트레드밀 운동, 야외에서 3-10 km 러닝, 고온다습한 환경에서 10-20분 동안 야외 장애물 트레일 운동을 하였고, 고온다습한 환경에서 운동 시 HSP72 발현 증가를 보고 (Bruchim et al, 2014, J Appl Physiol (1985)).
- ⑤ 비글에서 트레드밀을 이용하여 개가 피로해질 때까지 운동을 시킨 뒤 운동 강도에 따라 젖산, 포도당, 심박수를 분석하여 개를 위한 컨디셔닝 프로그램의 처방 및 평가에 트레드밀 운동이 활용될 수 있음을 제시(Polyák et al, 2018, Rev Cardiovasc Med).
- ⑥ 유견의 자질평가, 자견/성견에서 보상물에 대한 행동학적 평가결과로 집중력을 평가한다. 일반 복제건을 대조군으로 하여 생산된 운동능 향상 복제견 2종과 집중력 향상 복제견 1종을 모두 분석하여 연령별 평균적인 행동학적 평가 결과를 수치화하여 상대적으로 비교할 예정임
- ⑦ 자견 (13주령)의 보상물에 대한 반응 평가는 검역탐지 훈련의 기본 원리인 “반응성”(보상을 받으려는 욕구, 집중도)의 기초를 이루는 보상물(먹이)에 대한 집중도를 평가함으

로써 향후 집중력 강화 탐지견과의 집중력, 훈련 성과에 미치는 영향 등을 평가할 수 있음. 훈련 보조물로 쓰이는 “먹이”에 대한 집중도를 각기 다른 환경, 위치에서 평가하여 점수로 수치화가 가능함

- ⑧ 성견 (6~7개월령)의 집중력 평가는 6~7개월령의 5-HT3R 발현 복제견에서 박스, 가방 탐지과정 중 탐지물에 대하여 집중하지 못하고 벗어나는 횟수를 측정하여 비교하고자 함. 1회 탐지 (박스 30개, 가방 10개)시 산만도 (회수)를 각기 측정하여 3명의 평균을 사용할 예정



그림 11. 13주령 자견의 집중력에 대한 행동평가 전략

(다) 운동능 또는 집중력이 향상된 스마트 탐지견 활용 전략

- ① 목적 유전자의 과발현으로 개체의 운동능 또는 집중력이 향상된 경우 나이에 따라 이들 유전자의 발현을 모니터링하여 개체의 특성이 유지되는지에 대한 분석을 협동연구기관에서 매년 실시
- ② 위탁연구기관에서는 운동능 또는 집중력이 향상된 형질전환 복제견의 훈련 종료 후 검역탐지견 선발 평가를 실시하여 스마트 탐지견의 합격률을 대조군 및 이전의 우수 검역탐지견의 평가 결과와 비교함으로써 일차적으로 스마트 탐지견의 효용성 검증
- ③ 또한, 위탁연구기관에서는 운동능 또는 집중력이 향상된 형질전환 복제견에서 환경 적응 목적의 현장 훈련 및 선발된 스마트 탐지견에서 공항 등의 현장 투입 이후에 도출된 탐지실적을 분석한다. 대조군 대비 불법 검역물 적발 건수, 운동능이나 집중력 정도 등에 대한 비교 분석을 하여 최종적으로 본 연구를 통해 개발된 스마트 탐지견의 검역체계 고도화를 위한 활용성에 대해 평가한다. 평가 후 최종 개발된 스마트 탐지견의 창의적 검역체계를 구축

## 2. 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원	
과 제 명	검역기술 고도화를 위한 스마트 탐지건 개발	주관연구책임자 이병천외 총 131명	

기관 별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 학	2	100
기 타	1	32

주관(1세부)-서울대학교 산학협력단
운동능/집중력 향상된 스마트 탐지건 개발 및 분석연구 이병천외 80명
담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>- PCK1, PPAR<math>\gamma</math>, 5-HT3R 발현 복제건 생산</li> <li>- PCK1, PPAR<math>\gamma</math>, 5-HT3R 발현 복제건의 생리학적 정상성 평가</li> <li>- PCK1, PPAR<math>\gamma</math>, 5-HT3R 발현 복제건의 변이학적 정상성 평가</li> <li>- PCK1, PPAR<math>\gamma</math>, 5-HT3R 발현 복제건의 해부학적 정상성 평가</li> <li>- 복제 탐지건의 영상학적 기법 이용 운동능, 근육량, 근육성장 분석</li> <li>- 복제 탐지건의 영상학적 기법 이용 집중력 평가</li> <li>- 복제 탐지건의 행동학적 기법 이용 운동능 평가</li> <li>- 복제 탐지건의 행동학적 기법 이용 집중력 평가</li> <li>- PCK1, PPAR<math>\gamma</math>, 5-HT3R 발현 복제건의 검역탐지건 훈련 및 평가</li> <li>- 복제 탐지건의 활용성 평가</li> </ul>

1협동-대구가톨릭대학교 산학협력단
운동능/집중력향상 유전자조절 세포 생산 및 분석연구 김태완외 18명
담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 근육 특이 PCK1 발현 세포주 제작 및 분석</li> <li>- 근육 특이 PCK1 발현 세포주 공급</li> <li>- 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 유전학적 분석</li> <li>- 근육 특이 PPAR<math>\gamma</math> 발현 세포주 제작 및 분석</li> <li>- 근육 특이 PPAR<math>\gamma</math> 발현 세포주 공급</li> <li>- 근육 특이 PPAR<math>\gamma</math> 발현 복제건의 유전학적 분석</li> <li>- 5-HT3R 발현 세포주 제작 및 분석</li> <li>- 5-HT3R 발현 세포주 공급</li> <li>- 5-HT3R 발현 복제건의 유전학적 분석</li> </ul>

위탁-농림축산검역본부 인천공항지역본부
검역기술고도화를 위한 스마트 탐지건의 활용 연구 우만수 외 31명
담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 신제품 복제 탐지건 훈련 및 선발</li> <li>- 복제 탐지건의 활용성 평가</li> <li>- PCK1, PPAR<math>\gamma</math>, 5-HT3R 발현 복제건 자건 훈련, 자질평가</li> <li>- PCK1, PPAR<math>\gamma</math>, 5-HT3R 발현 복제건의 집중력 평가</li> <li>- PCK1, PPAR<math>\gamma</math>, 5-HT3R 발현 복제건의 운동능 평가</li> </ul>

### 3. 연구개발 추진 일정

연차별 세부 연구 내용		월별 세부 연구 추진 일정											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 차 년 도	국내외 우수 검역탐지견 세포 banking												
	우수 검역탐지견의 체세포 핵이식 복제 탐지견 2종 이상 생산 및 검역원 이송												
	복제견 생산 효율 향상 기법 개발												
	개에서 운동능 평가를 위한 행동학적 기법 개발												
	개에서 CT에 의한 근육량의 영상학적 분석 기법 개발												
	MRS/CEUS에 의한 근육성상의 영상학적 분석기법 개발												
	개에서 vMRI/고해상도 MRI에 의한 집중력 관련 뇌 분석법 개발												
	형질전환 세포주 제작에 적합한 세포주 및 유전자 전이 vector system의 선별												
	근육 특이 PCK1 발현 세포주 제작												
	자견에서 보상물에 대한 집중력 분석을 위한 행동학적 기법 개발												
복제자견의 자견자질평가													
2 차 년 도	근육 특이 PPARα 발현 복제견 생산												
	신품종 우수 검역탐지견 세포를 이용하여 체세포 복제견 3두 생산												
	신품종 체세포주 확립												
	1차년도 생산 복제 탐지견의 행동학적 기법을 이용한 운동능 평가: 복제 자견/성견의 운동능 분석												
	1차년도 생산 복제 탐지견의 영상학적 기법을 이용한 운동능 평가												
	1차년도 생산 복제 탐지견의 행동학적 기법을 이용한 집중력 평가												
	1차년도 생산 복제 탐지견의 영상학적 기법을 이용한 집중력 평가												
	1차년도 생산 복제 탐지견의 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성 평가												
	근육 특이 PCK1 발현 복제견 생산 및 이송												
	근육 특이 PCK1 발현 복제자견에서 생리학적 정상성 분석												
	운동능 향상II (PPARγ발현) 세포주 제작												
	근육 특이 PCK1 발현 복제견 유전학적 분석												
복제 탐지견의 검역원 검역 현장 적용 가능성 분석													
근육 특이 PCK1 발현 복제견의 유전/자견 자질 행동 평가													
3 차 년 도	운동능 향상I (PCK1발현) 복제견 생산												
	PCK1 발현 복제자견에서 생리학적 정상성 분석												
	운동능 향상I (PCK1발현) 복제견의 영상학적 기법을 이용한 평가												
	일반 복제견 / 근육 특이 PCK1 발현 복제견의 대뇌 피질과 전두엽의 부피 측정값												
	PCK1 발현 성견의 영상의학적 정상성 평가												
	PCK1 발현 성견의 번식학적 정상성 분석												
	운동능 향상II (PPARδ발현) 복제견 생산												
PPARδ 발현 복제 자견에서 생리학적 정상성 분석													



## 제 2 절 연구개발 방법 및 연구결과

### [1세부: 운동능/집중력 향상된 스마트 탐지견 개발 및 분석연구]

#### 1. 신제품 검역 복제 탐지견 생산

가. 국내외 신제품 우수 검역탐지견 3종 이상 बैं킹(검역원의 선발평가에서 상위 10% 이내 성적을 획득한 개체 및 국내 활동영역에서 우수한 성적을 지닌 개체의 세포)

##### (1) 연구방법

(가) 복제를 위한 우수 검역탐지견 3종 개체 선별

- ① 우수한 능력을 지닌 검역탐지견의 세포 확보는 검역탐지견 센터에서 보유중인 우수한 개체의 세포를 이용하여 확보
- ② 토요일개체와 월요일 개체의 복부 피부조직과, 서혜부 지방조직을 채취하여 세포주를 생산하는데 이용

(나) 국내 우수 검역탐지견 2종 체세포세포 बैं킹 실시

- ① 성체섬유아 체세포 확립을 위하여 우수 검역탐지견 대니의 복부 피부의 털을 제거한 후 일반적 외과 수술에 준해 알콜 스폰지와 베타딘으로 소독한 후 1cm \* 2cm의 크기로 조직을 절제하여 실험실로 운반
- ② 채취한 피부조직을 동일한 크기 (1cm \*1cm)로 각각 자르고 PBS에 3번 Washing후, 미세가위를 이용하여 조직을 잘게 자르고 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배양액에서 39℃, 5% CO2 95%에서 배양
- ③ 부착된 조직에서 뻗어나오는 세포들을 컨플루언시 (confluency)까지 계속하여 배양 후 체세포핵이식 전까지 동결 보관

(다) 국내 우수 검역탐지견 2종 지방줄기세포 बैं킹 실시

- ① 토요일과 월요일의 복부에서 5g의 피하지방을 각각 채취한후, 4% antibiotics를 포함한 멸균생리식염수 25 ml에 담가 흔들어 3회 세척하고 60 mm petridish에 1 ml의 1mg/ml collagenase와 함께 넣고 미세가위를 이용하여 조직을 세절함
- ② 그 후, 1 mg/ml collagenase (4ml/g)를 처리하여 60분간 37℃에서 교반시켜 조직을 분해하고, 100 $\mu$ m striner를 이용하여 분해 되지 않은 조직을 걸러낸후, 원심분리후, 상층액을 제거하고 세포를 회수함
- ③ 지방줄기세포 부착배지에 넣고 37℃, 5% CO2에서 배양하고, 세포들을 컨플루언시되면

동결 보관

(2) 연구결과

(가) 국내외 신품종 우수 검역탐지견 3종 이상 बैं킹

- ① 현재 활동 중인 우수 검역탐지견 토, 월의 체세포를 각각  $131 \times 10^6$ 개와  $236 \times 10^6$ 개를 बैं킹 하였으며, 지방유래 성체 줄기세포를 각각  $16.5 \times 10^6$ 개와  $13.2 \times 10^6$ 개의 세포 बैं킹

(나) 피부조직으로부터 체세포주 확립

- ① 우수 검역탐지견 월요일과 토요일의 복제 생산을 위하여 세포주를 확립하였다. 두 마리의 개체로부터 복부 피부조직을 회수하여, 세포주를 확립
- ② 확립된 세포는 0세대에서 위의 표과 같이 동결 보존

표 3. 우수 검역탐지견 체세포 बैं킹

	체세포 보관 현황		
	Passage	Concentration	Number (vial)
토	0	$2 \times 10^6$	10
	0	$3 \times 10^6$	5
	0	$2 \times 10^6$	34
	0	$2 \times 10^6$	10
월	0	$2 \times 10^6$	7
	0	$2 \times 10^6$	25
	0	$2 \times 10^6$	48
	0	$2 \times 10^6$	18
	0	$2 \times 10^6$	19
	0	$2 \times 10^6$	4
	0	$2 \times 10^6$	12
	0	$2 \times 10^6$	2

(다) 지방조직으로부터 지방줄기세포주 확립

- ① 월요일과 토요일의 지방조직 5g을 분리하여 약 1100만개의 지방줄기세포 회수
- ② (Passage No. 0) 월요일은 1320만개의 세포를 회수하였으며, 아래 표과 같이 동결 보존
- ③ (Passage No. 0) 일요일은 1650만개의 세포를 회수하였으며, 아래 표과 같이 동결 보존

표 4. 우수 검역탐지견 지방줄기세포 banking

	지방줄기세포 보관 현황		
	Passage	Concentration	Number (vial)
토	0	1.5 x10 <sup>6</sup>	3
	1	3 x10 <sup>6</sup>	4
월	0	1.2 x10 <sup>6</sup>	1
	1	3 x10 <sup>6</sup>	4

나. 우수 검역탐지견의 체세포핵이식 복제견 2종 이상 생산 및 검역원 이송

(1) 연구방법

- (가) 체세포 복제(SCNT)를 위하여 2 내지 6 계대의 공여 세포들을 사용함
- (가) 체세포 핵이식을 하기에 앞서, 세포들을 해동하고, 100% 컨플루언시가 될 때까지 배양한 후 약 3분 동안 트립신 처리하여 단일 층으로부터 분리시켜 공여 세포로 이용
- (나) 발정초기의 암캐를 선별하여 매일 요추피정맥에서 혈액을 채취 및 혈청 분리한 후 혈중프로게스테론 농도를 측정
- (다) 측정된 프로게스테론 농도를 기초로 배란일을 결정 후 배란 3일 후에전신 마취후 개복하여 난관내의 성숙 난자를 회수
- (라) 플라싱으로부터 회수된 체내 성숙 난자들은 38.5℃ 조건의 HEPES-buffered TCM-199 내에서 10분 이내에 실험실로 운반 하여 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 0.1% (v/v) 히알루로니다제 (hyaluronidase)에 침지 후, 미세 유리파이펫을 이용 난구세포 제거
- (마) 난자들을 5 ug/mL 핵스트 (Hoechst 33342)와 5 ug/mL 사이토칼라신 B가 첨가된 배지 내에서 미세조작기 (Nikon-Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 염색된 난자의 핵을 제거 후, 공여 체세포를 탈핵 난자의 위란강 (perivitelline)으로 하나의 공여세포를 주입
- (바) 상기 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM HEPES 및 0.05% (w/v) BSA를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 70-75V, 15 usec 지속시간으로 2 펄스를 가해 핵 공여세포와 난자세포질체의 융합실시
- (사) 융합된 수정란만을 선별하여 10 uM 칼슘 아이노포어 (calcium ionophore)와 1.9 mM 6-디메틸아미노푸린 (dimethylaminopurine)을 이용하여 활성화 유도 후, 자연배란 동기화가 된 대리모의 난관내로 탐켓 카테터를 이용하여 이식



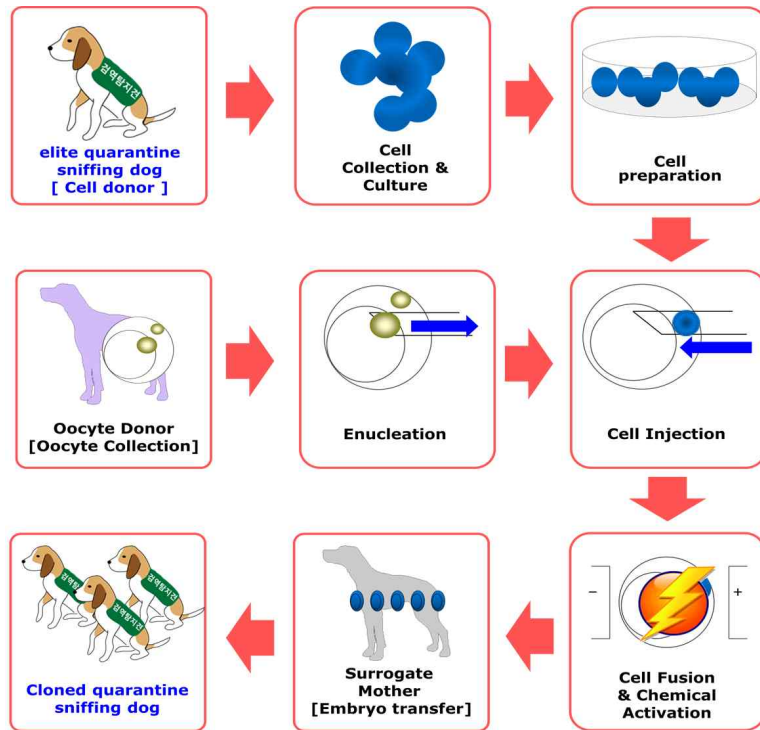


그림 12. 체세포핵이식 기법을 이용한 복제 탐지견 생산 방법

(2) 연구결과

(가) 확립된 토요일의 체세포를 이용하여 60개의 복제수정란을 5마리의 대리모에 이식하였고, 이식 후 약 30일째 초음파 임신 진단을 한 결과 아래 사진과 같이 2마리의 대리모가 임신

(나) 임신 60일째 제왕절개 통해 2마리의 대리모로부터 총 3마리의 토요일 복제견 생산



그림 12. 토요일 복제수정란 이식후 28일째 임신한 대리모의 복부 초음파 사진

(다) 확립된 월요일의 체세포를 이용하여 71개의 복제수정란을 7마리의 대리모에 이식하였고, 이식 후 약 30일째 초음파 임신 진단을 한 결과 1마리의 대리모가 임신

(라) 이식후 52일째 엑스레이 촬영을 하여 산자수를 확인한 결과 대리모에 한마리의 태아가 임신된 것을 확인하였으며, 임신 60일째 제왕절개 통해 1마리의 월요일 복제견을 생산

(마) 1차년도 신품종 복제견을 총 4두 생산하였으며, 2016년 9월27일 3두, 2016년 10월20일 1두를 검역탐지견 센터로 이송



그림 133. 월요일 복제수정란 이식후 52일째 임신한 대리모의 복부 엑스레이 사진

## 다. 복제견 생산 효율 향상 기법 개발

### (1) 연구방법

- (가) 혈청 프로그스테론의 농도 변화로 난자 공여건의 배란일을 예측한 후, 배란일로부터 3일 후 난자 공여건의 난관으로부터 성숙 난자 회수
- (나) Hyaluronidase 내에서 pipetting으로 난구세포를 제거한 뒤, 단위발생 또는 체세포 핵이식에 사용
- (다) 단위발생을 위하여, 10 uM calcium ionophore로 난자 활성화를 유도하고, 1.9 mM DMAP만 사용한 대조군과 1.9 mM DMAP에 10 uM rapamycin을 첨가한 처리군으로 post-activation을 실시한 후 체외 배양하여 발달을 분석
- (라) 체세포핵이식을 위하여, Hoechst로 염색한 핵을 미세조작으로 제거하고 공여세포를 주입 후 전기융합을 실시. 이후 단위발생 실험과 동일한 대조군과 처리군으로 활성화를 유도한 뒤 체외배양하여 발달을 분석
- (마) 대조군과 처리군으로 나누어 체세포핵이식 배아를 생산한 뒤 대리모에 이식. 이식 26일 이후에 초음파로 임신진단, 45일 이후에 방사선 촬영으로 임신진단을 실시한 뒤, 약 60일 째에 제왕절개 실시

### (2) 연구결과

- (가) 개 난자 또는 체세포핵이식 배아의 활성화 배지에 활성화가소화작용(autophagy)을 유

도하는 rapamycin의 첨가 유무에 따른 배아 발달을 분석 결과는 다음과 같음

표 5. 성숙난자의 활성화 시, 10 uM rapamycin이 첨가되지 않은 대조군과 첨가된 처리군에서 생산된 단위발생배아의 체외배양 결과

그룹	총 배아수	2cell (%)	4cell (%)	6-8cell (%)
대조군	15	12 (80.0)	11 (73.3)	7 (46.7)
처리군	17	14 (82.4)	13 (76.5)	12 (70.6)

(나) 위의 표와 같이 단위발생배아 33개 중 15개는 대조군, 17개는 처리군으로 활성화 후 체외배양을 실시하였고, 2 세포기까지의 발달이 대조군은 12개 (80.0%), 처리군은 14개 (82.4%)였고, 4 세포기까지의 발달이 대조군은 11개 (73.3%), 처리군은 13개 (76.5%)로 유의적인 차이가 없었음. 그러나 6-8 세포기까지의 발달이 대조군은 7개 (46.7%), 처리군은 12개 (70.6%)로 대조군에서 유의적으로 더 높은 발달이 이루어졌음

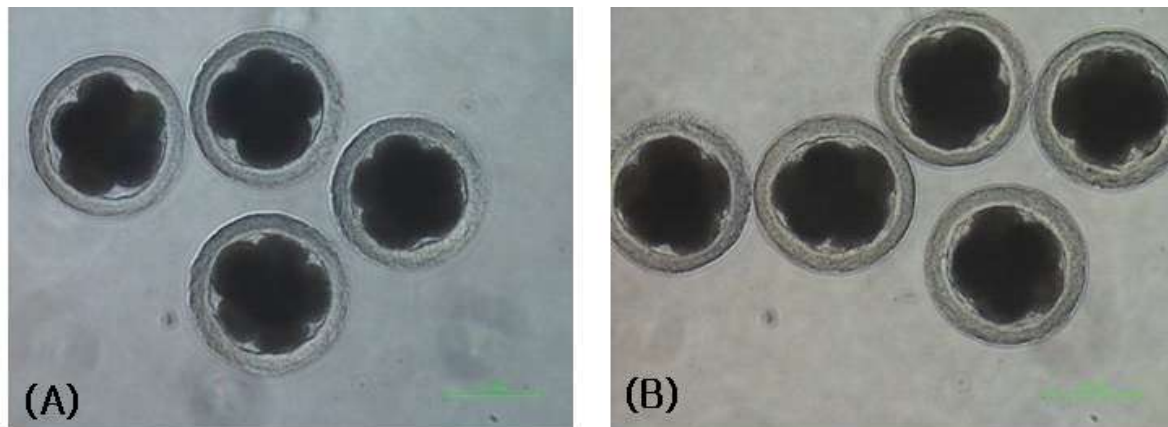


그림 14. 개 성숙난자의 활성화 시, 10 uM rapamycin이 첨가되지 않은 대조군 (A)과 첨가된 처리군 (B)에서 생산된 단위발생배아의 체외배양 발달 사진

(다) 체세포핵이식 복제 배아 11개 중 5개는 대조군, 6개는 처리군으로 활성화 후 체외배양을 실시하였고, 2 세포기까지의 발달이 대조군은 2개(40.0%), 처리군은 5개(83.3%)였음

(라) 4 세포기까지의 발달이 대조군은 0개 (0.0%), 처리군은 4개 (66.7%)로 처리군에서 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었음

표 6. 개 체세포핵이식 배아의 활성화 시, 10 uM rapamycin이 첨가되지 않은 대조군과 첨가된 처리군에서 생산된 단위발생배아의 체외배양 결과.

그룹	총 배아수	2cell (%)	4cell (%)	6-8cell (%)
대조군	5	2 (40.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
처리군	6	5 (83.3)	4 (66.7)	0 (0.0)

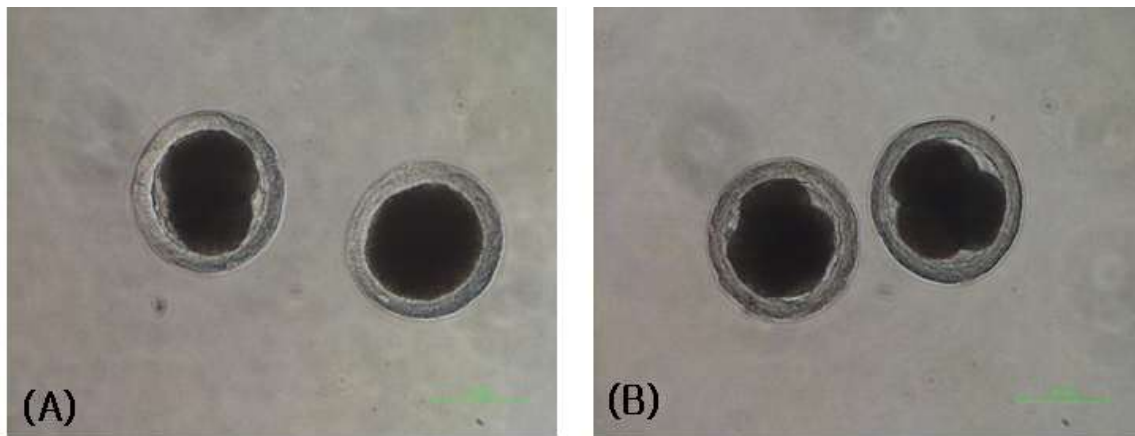


그림 15. 개 체세포핵이식 배아의 활성화 시, 10 uM rapamycin이 첨가되지 않은 대조군 (A)과 첨가된 처리군 (B)에서 생산된 단위발생배아의 체외배양 발달 사진

(마) 대조군과 처리군에서 각각 29개, 23개의 복제 배아를 생산하여 3두씩의 대리모에 이식을 실시. 대조군에서는 1마리의 대리모가 임신하여 1두의 복제견을 생산 (대리모 수 대비 임신효율 33.3%, 이식배아 수 대비 복제효율 3.4%). 처리군은 임신되지 않았음

표 7. 개 체세포핵이식 배아의 활성화 시, 10 uM rapamycin이 첨가되지 않은 대조군과 첨가된 처리군에서 생산된 단위발생배아의 체외배양 결과

그룹	대리모 ID	난자 상태	세포 계대 수	이식 배아 수	진단 결과
대조군	1	성숙	3	12	X
	2	성숙	4	8	X
	3	성숙	5	9	O
처리군	1	노화	4	5	대기
	2	성숙	5	6	대기
	3	성숙	3	12	대기

## 2. 개의 영상학적 방법 및 행동학적 방법을 이용한 운동능 평가 기법 개발

### 가. 개에서 CT에 의한 근육량의 영상학적 분석기법 개발

#### (1) 연구방법

- (가) CT 촬영 장소 및 장비는 건국대학교 부속동물병원 진료장비 이용
- (나) CT 장비 (GE LightSpeed Plus 4 Slice CT, GE Medical Systems, US)
- (다) 근육량 산출을 위한 CT촬영의 조건은 dorsal recumbency 자세, 촬영 시 대퇴부가 최대한 테이블과 평행이 되도록 함
- (라) Slice thickness 1.25mm
- (마) 정상 비글견 대퇴근육의 CT 촬영은 Medetomidine 0.03 mg/kg IM (Domitor®, Vetoquinol, Buckingham, UK)을 통해 주사마취 실시
- (바) 완전히 의식이 소실되면 개를 CT 테이블 위에 dorsal recumbency 자세로 눕힘
- (사) 대퇴부가 테이블에 최대한 평행이 되도록, 무릎관절이 굽혀지지 않도록 자세를 고정시킨 후 촬영
- (아) 촬영 후 의식이 돌아올 때까지 모니터링
- (자) CT 촬영 후 image를 각각 Femur에 Sagittal, Dorsal, Transverse 단면으로 재구성

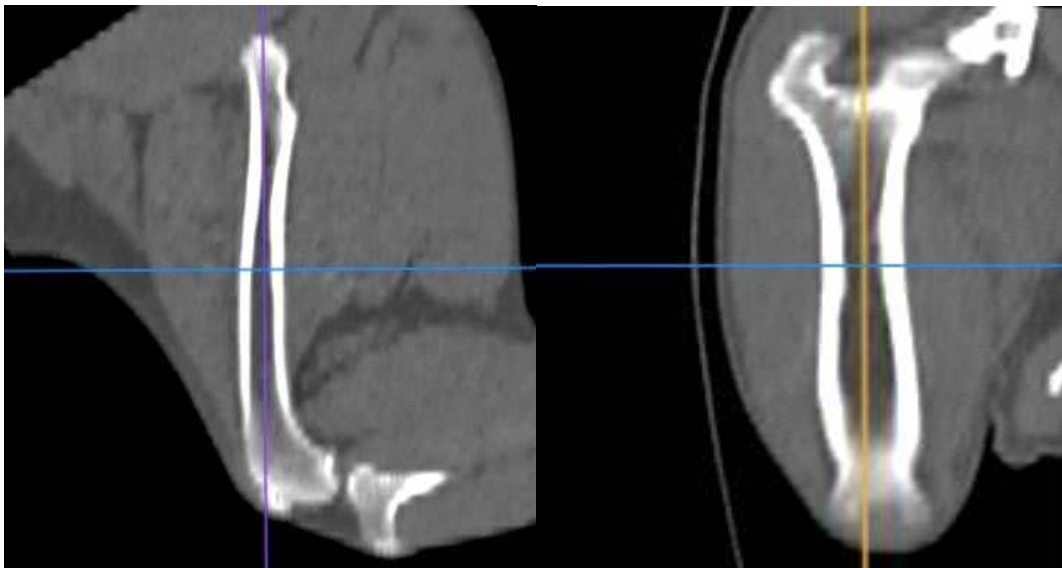


그림 16. Sagittal 단면으로 재구성

그림 17. Dorsal 단면으로 재구성

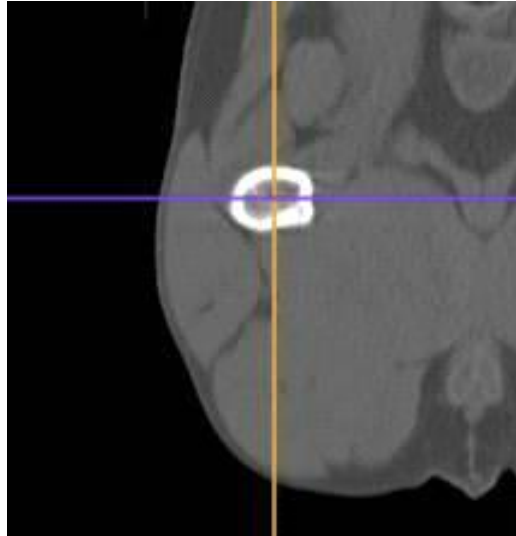


그림 18. Transverse 단면으로 재구성

- (차) 근육량 산출은 CT촬영 후 재구성된 단면 중 Transverse 단면 DICOM image 파일을 OsiriX 로 실행
- (카) 단면 image에서 양측 대퇴부 근육중 근육량 산출에는 오른쪽 대퇴부 근육을 활용
- (타) Transverse 단면 image마다 Closed Polygon tool을 활용하여 Regions of Interest (ROIs)를 설정



그림 19. 초록색 실선으로 ROI가 설정된 모습

- (파) Regions of interest (ROIs)의 설정은 Femur neck이 보이기 시작하는 단면부터 양쪽 Fabella가 모두 보이는 단면까지 실행

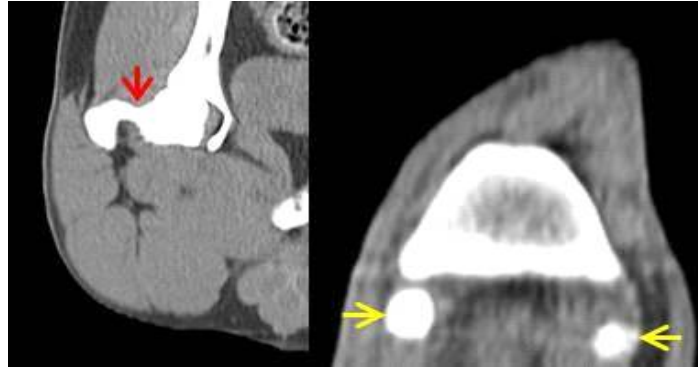


그림 20.

좌 : Femur neck(빨간색 화살표)

우 : 양쪽 Fabella(노란색 화살표)

(하) Femur neck부터 Fabella까지 모든 Transverse 단면 image에 ROI 설정이 완료되면 ROI volume으로 근육량

(2) 연구결과

(가) 국내외 학술연구지와 도서, 인터넷 검색을 통해 근육량 분석의 최신 연구 현황, 분석 기법 등에 대한 조사를 바탕으로 CT 단면 image를 프로그램 (OsiriX lite ver8.0.1, Pixmeo SARL, Switzerland)를 활용하여 근육량 산출

(나) CT 촬영 후 재구성 된 Slice 단면 image를 OsiriX 프로그램의 Closed Polygon tool을 활용하여 Regions of Interest(ROIs) 설정 및 근육량 산출

(다) 산출된 근육량은 추후 복제견과 일반 정상 비글견의 근육량 비교 평가에 활용 예정

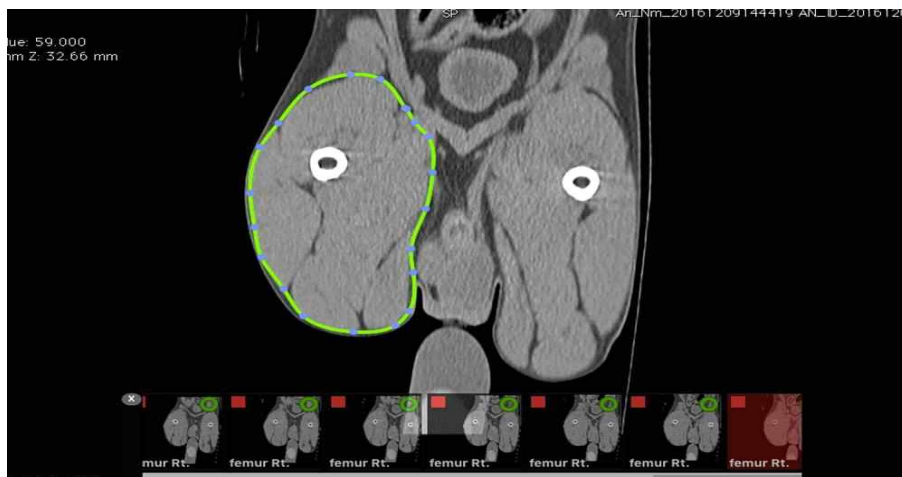


그림 21. 초록색 실선으로 ROIs가 설정된 모습



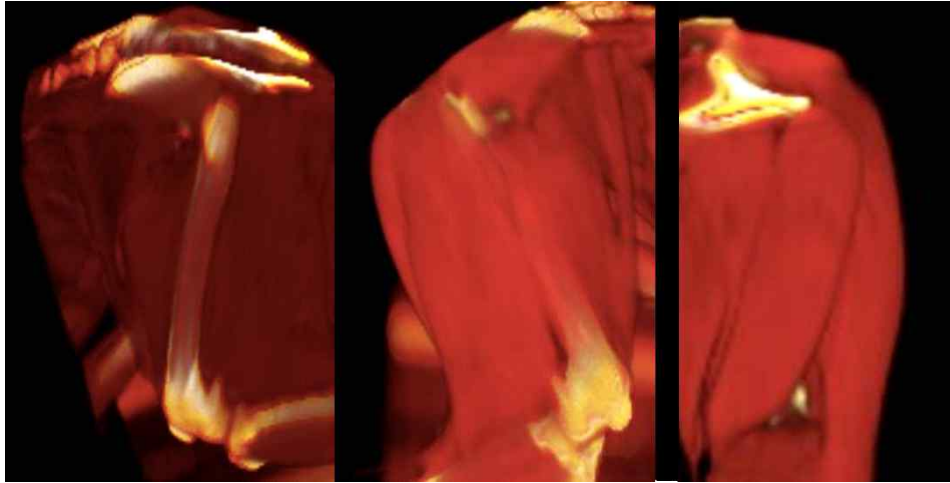


그림 22. 3D로 재구성된 근육 image

좌 : 대퇴부 외측에서 바라본 근육 3D image

중 : 대퇴부 앞쪽에서 바라본 근육 3D image

우 : 대퇴부 뒤쪽에서 바라본 근육 3D image



그림 23. 산출된 근육량

## 나. MRS에 의한 근육성상의 영상학적 분석기법 개발

### (1) 연구방법

- (가) 자기공명분광법이란 생체 내의 신진대사에 관여하는 물질들을 세포의 기능을 손상시키지 않고 비 침습적으로 분석할 수 있는 기법을 말함
- (나) 국내외 학술연구지와 도서, 인터넷 검색을 통해 근육 MRS 분석의 연구 현황, 활용가능성, 촬영조건 등에 대해 조사
- (다) MRS는 각각의 촬영 조건에 따라 다양한 스펙트럼이 도출될 수 있으므로 근육의 성분을 분석하기 위한 최적의 촬영 조건을 확립하기 위해 같은 비글건의 근육을 서로 다른 조건으로 촬영



	Coil	Voxel size	TE
1	몸통용	large	long
2	몸통용	large	short
3	몸통용	small	long
4	몸통용	small	short
5	무릎용	large	long
6	무릎용	large	short
7	무릎용	small	long
8	무릎용	small	short

그림 24. MRS 촬영 조건표

- (가) 좋은 spectrum의 판단기준은 주요 구성 물질 peak 구분의 용이성, baseline의 noise 정도, 다른 구성 물질 peak를 방해하는 lipid peak의 유무로 확립
- (나) 확립된 프로토콜로 정상 비글견 근육을 MRS 촬영을 위해, Butorphanol (0.2-0.6mg/kg, IM), 로 전마취후, Propofol (2.6-6.6mg/kg, IV)로 분마취 후 기도삽관, 마취 된 비글견을 MRI 테이블에 dorsal recumbency로 눕힘



그림 25. 비글견을 MRI 기기에 눕힌 모습

- (다) Isoflurane(1.5-2.5%, Inhalation)으로 마취유지후, 정립한 protocol 대로 MRS 촬영 실행하고, 결과 spectrum 분석

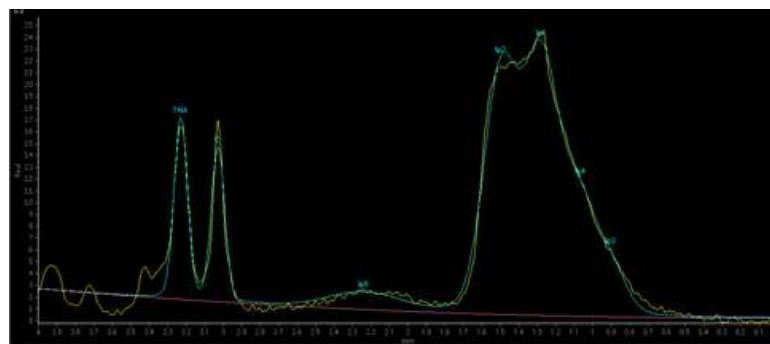


그림 26. 무릎용 / small voxel / short TE

(2) 연구결과

(가) MRS 촬영이 가능한 외부 기관 섭외 → 비용, imaging processing 가능 여부, 비글 촬영 가능 여부 등을 고려하여 한국기초과학지원연구원으로 결정

(나) Image parameter

- ① Coil : 촬영하고자 하는 신체 부위와 접촉하는 MRI 하위 부품으로 무선 주파수 신호를 방출함으로써 수소 양성자가 이 신호를 흡수하여 더 높은 에너지 상태로 이동하게 되어 영상의 질을 높이는 역할을 함
- ② Voxel : 3D 공간의 한 점을 정의한 일단의 그래픽 정보. MRS 분석을 할 부피를 뜻함
- ③ TE(echo time) : RF 펄스를 보낸 후 에코 신호의 최고점이 생성되기까지의 시간. TE가 짧으면 영상의 해상도는 증가하고 대조도는 낮아짐
- ④ 다음의 조건으로 MRS 촬영을 수행하여 최적의 스펙트럼이 나오는 조건을 프로토콜로 확립

	Coil	Voxel size	TE
1	몸통용	large	long
2	몸통용	large	short
3	몸통용	small	long
4	몸통용	small	short
5	무릎용	large	long
6	무릎용	large	short
7	무릎용	small	long
8	무릎용	small	short

그림 27. MRS 촬영 조건 표

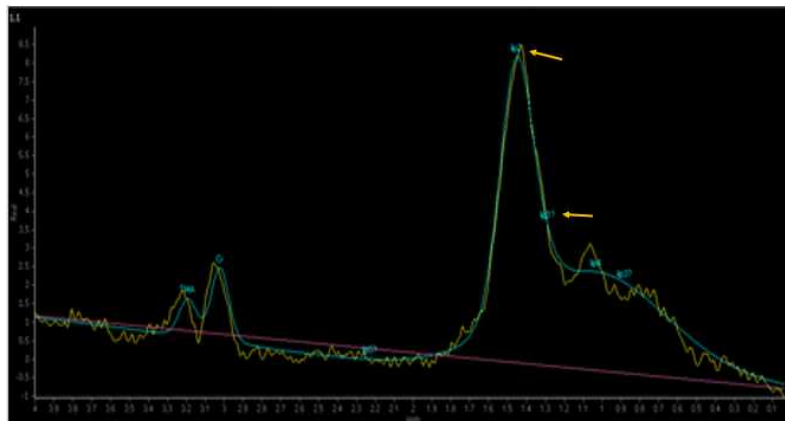


그림 28. 몸통용 / large voxel / long TE, lipid(화살표) 구분이 명확하지 않음

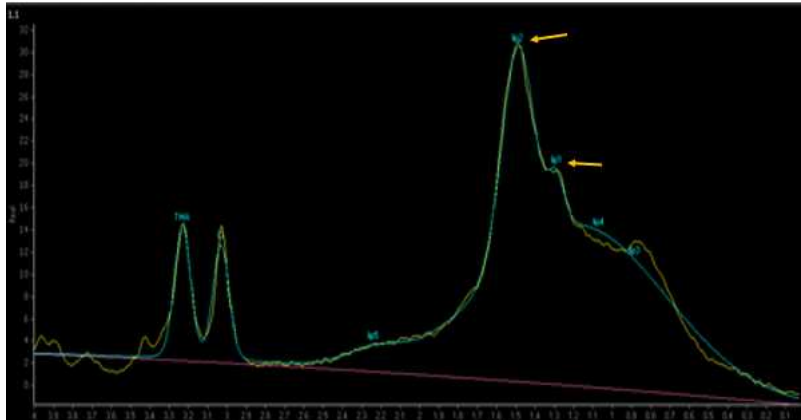


그림 29 몸통용 / large voxel / short TE, lipid(화살표)peck구분이 명확하지 않음

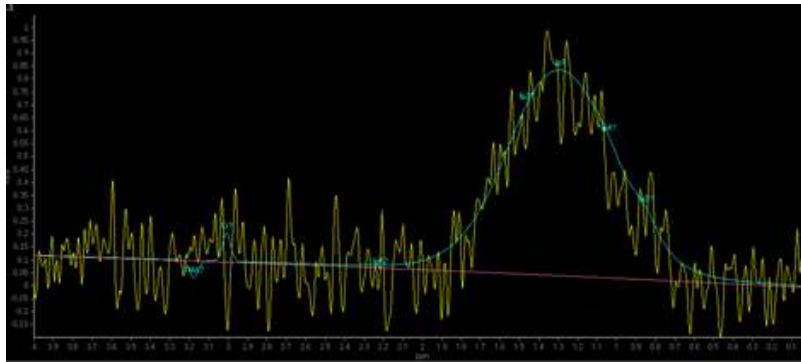


그림 30. 몸통용 / small voxel / long TE , baseline의 noise가 심함

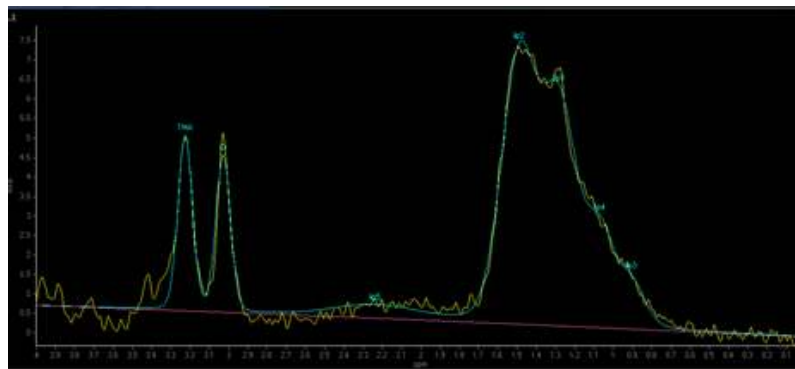


그림 31. 몸통용 / small voxel / short TE

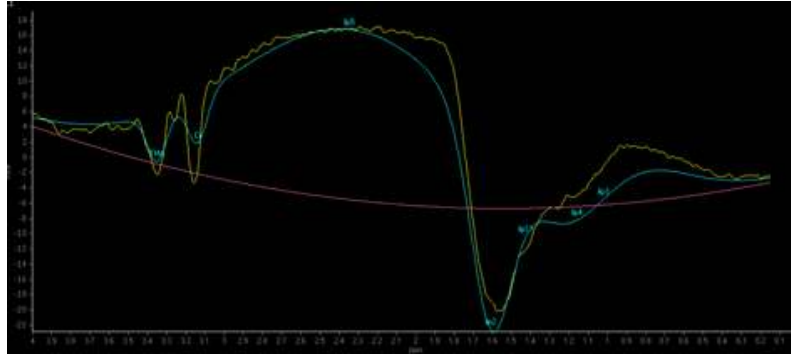


그림 32. 무릎용 / large voxel / long TE, baseline의 위상이 틀어짐

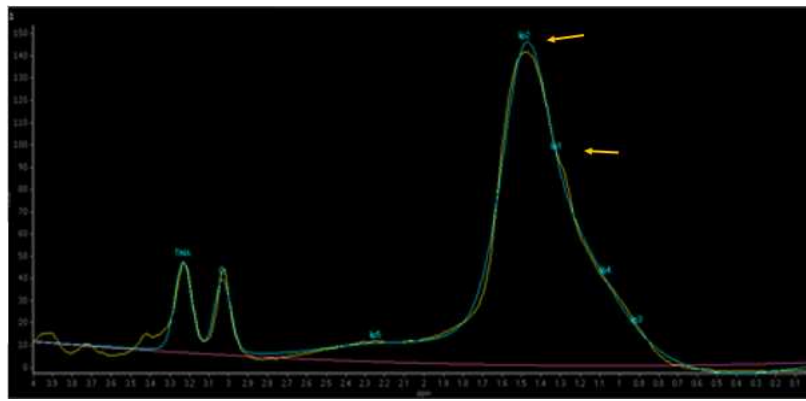


그림 33. 무릎용 / large voxel / short TE, lipid(화살표) 구분이 명확하지 않음

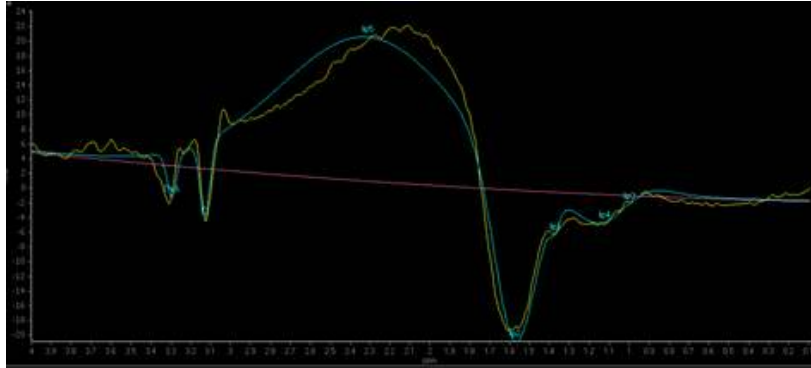


그림 34. 무릎용 / small voxel / long TE, baseline 위상이 틀어짐

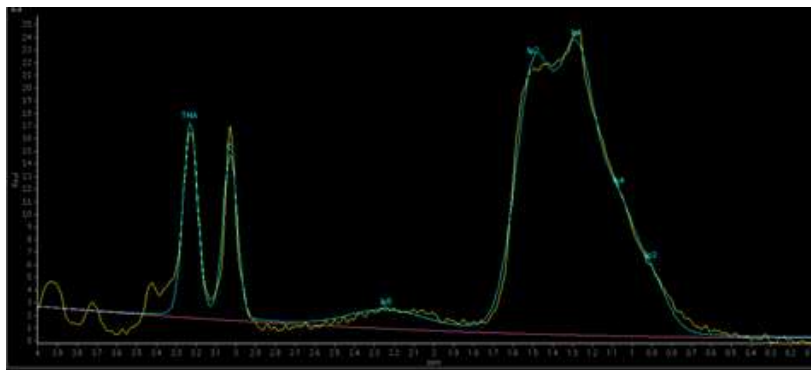


그림 35. 무릎용 / small voxel / short TE

(다) 좋은 spectrum의 판단기준의 확립

① 주요 구성 물질 peak 구분의 용이성

② baseline의 noise 정도

③ 다른 구성 물질 peak를 방해하는 lipid peak의 유무

→ 좋은 스펙트럼의 판단 기준에 positioning의 용이성, ROI 구역 설정의 용이성을 함께 고려하여 **무릎용 coil / small voxel / short TE 을 프로토콜로 선정**

(라) 수의학에서 MRS를 이용한 근육량 평가의 프로토콜이 확립되어 있지 않음

(마) 본 연구로 확립된 프로토콜로 차년도에 정상 비글견과 복제탐지 차견/성견의 근육 (Adductor m.)성상 비교에 활용 예정

#### 다. CEUS에 의한 근육성상의 영상학적 분석기법 개발

##### (1) 연구방법

(가) 관류는 조직기능과 활력에 중요한 요소로 조영 증강 초음파 검사를 이용하여 평가할 수 있는데 조영제를 혈관 내에 주입하면 초음파 신호가 증강되어 영상화되며 이를 이

용하여 정성적, 정량적인 관류평가 가능

- (나) 정상 및 진정된 비글견 대퇴 모음근에서 미세혈류 평가는 정상 및 진정 (Medetomidine, 3.0-5.5ug/kg, IM)된 비글견 대퇴부 내측 삭모, 대퇴동맥 확인 후 뒤쪽에 위치한 모음근의 종단면을 영상화, IV 로 조영제 (SonoVue, 1ml) 주입 후 식염수 (3ml, bolus injection) 주입, 주입 직 후부터 영상 데이터 저장 및 정성적 평가, 얻어진 데이터에 내장 소프트웨어를 이용하여 ROI 설정 후 TIC 그래프 획득 및 분석, 조영제의 양, ROI 깊이 및 면적, 초음파 장비에 변화를 두어 동일 실험 진행

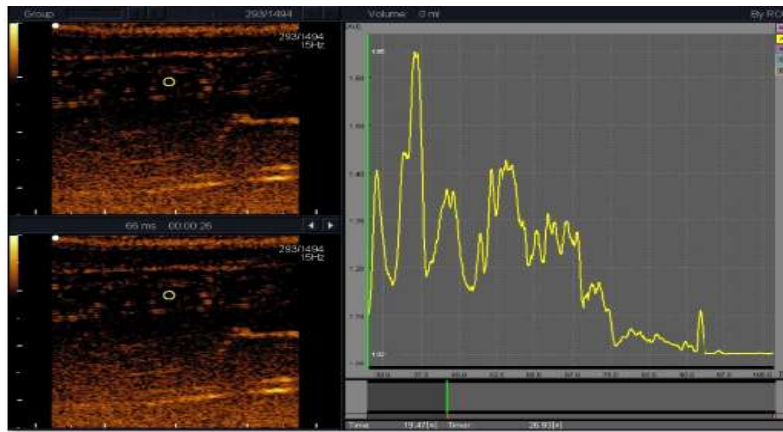


그림 36. 데이터에서 ROI 설정 후 얻어진 TIC 그래프

## (2) 연구결과

- (가) 초음파 장비 (PROSOUND F75, Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)와 초음파 조영제 (SonoVue, Bracco, Milan, Italy)를 이용하여 정상 비글견에서 근육의 미세혈류를 평가하고 초음파 장비에 내장된 소프트웨어(Contrast Echo Software)를 이용하여 시간에 따른 변화를 그래프화

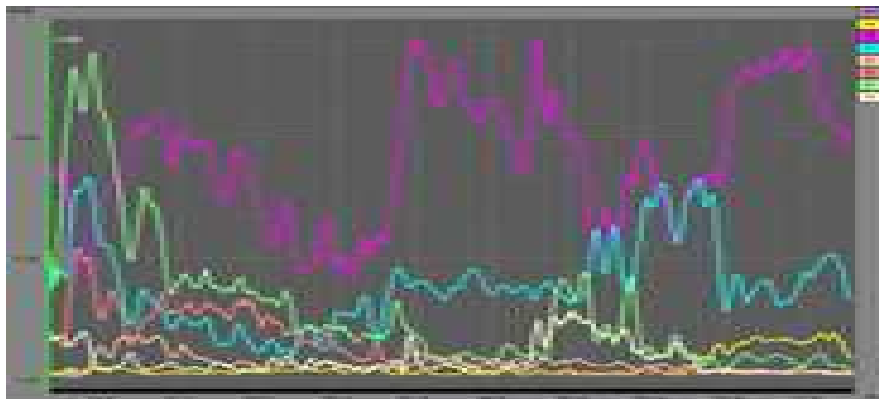


그림 37. 여러 깊이의 ROI(Region of Interest)에서 얻은 TIC(Time Intensity Curve)

- (나) 정상 비글견에서 조영제 양의 변화(0.5, 1, 2, 3, ml), ROI 크기(1, 2, 3, 4, 5 mm<sup>2</sup>) 및

깊이(0.5, 1, 1.5, 2 cm)에 차이를 두어도 예상 TIC 형태를 벗어났으며 동일한 조건의 실험에서 재현성이 부족함을 확인

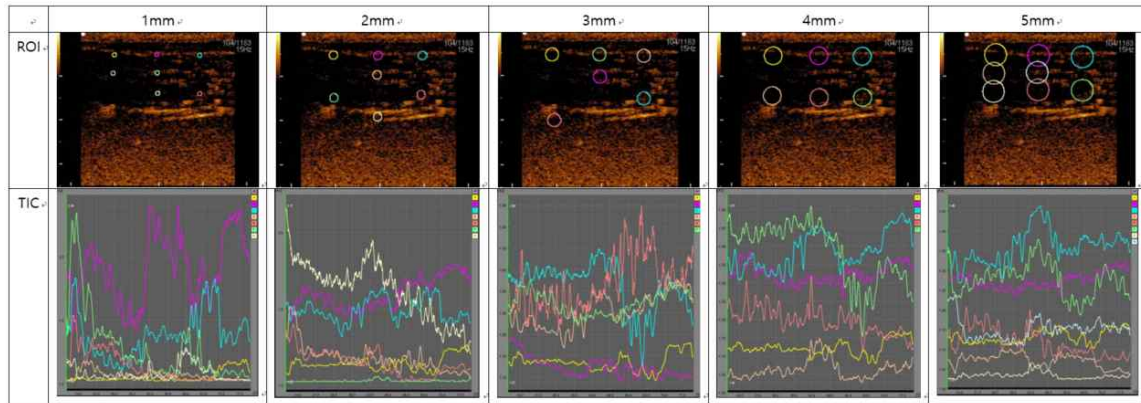


그림 38. 다양한 ROI 깊이 및 크기를 적용하여 얻은 TIC, 재현성이 부족한 것으로 판단된다.

- (다) 동일 부위의 정확한 영상을 얻기 위하여 진정(Domitor, Orion Co., Turku, Finland)된 정상 비글견에서 실시한 조영증강 초음파 검사 또한 재현성 부족함을 확인
- (라) 2가지의 또 다른 초음파 장비(a. Noblus , Hitachi Aloka Medical Ltd., Tokyo, Japan, b. Aloka alpha 7, Hitachi Aloka Medical Ltd., Tokyo, Japan)에 동일한 조건의 실험 적용하였으나 재현성 부족함을 확인

1. ALOKA F75	2. ALOKA Noblus	3. ALOKA Alpha7
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 건국대학교 동물병원 영상진단용 장비</li> <li>- 분석 가능한 measurement 다양</li> <li>- 예상했던 것보다 재현성 부족</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aloka F75 와 비슷한 정도의 재현성</li> <li>- 동영상 저장기능 불가능으로 인하여 TIC 분석에 어려움</li> <li>- 분석 가능한 measurement 부족</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aloka F75과 비슷한 정도의 재현성</li> <li>- 분석 가능한 measurement 부족</li> </ul>

그림 39. 실험에 사용 된 3가지의 초음파 장비

- (마) 결과적으로 실질장기에 비하여 혈류량이 많지 않아 조영제에 의한 영상화가 쉽지 않

으므로 정성적인 평가가 어렵고 미세한 움직임에도 TIC 그래프에 변화가 발생하여 정량적인 평가가 어렵다고 판단

**(바) 조영증강 초음파 검사를 이용한 근육 성상 분석문제를 보완하기 위하여 운동능을 평가할 수 있는 또 다른 영상학적 방법인 CT를 이용한 골밀도 평가 연구가 필요**

라. 개의 행동학적 방법을 이용한 운동능 평가 기법 개발

(1) 연구방법

- (가) 트레드밀에 익숙해질 때까지 2분 동안 핸들러와 함께 저속 (2 km/h)으로 적응훈련
- (나) 핸들러가 트레드밀 밖으로 이동하고 개체 혼자 트레드밀 위에서 1분 동안 저속 (4 km/h)으로 경보 (walking) 유지
- (다) 이후 1분 동안 고속 (8 km/h)으로 속보 (trotting) 유지
- (라) 이후 30초마다 0.2 km/h로 속도를 증가시키기
- (마) 개체가 트레드밀 위에서 떨어지기 전에 emergency 버튼을 이용하여 정지시킴
- (바) 트레드밀을 정지할 때까지의 거리와 시간을 측정

(2) 연구결과

- (가) 검역탐지견을 이용하여 트레드밀에서 저속 (2 km/h)으로 적응훈련 시, 핸들러의 걸음에 맞추어 조금씩 적응하는 모습을 보임
- (가) 저속 (4 km/h)으로 경보 (walking) 유지하는데 전혀 무리가 없음.
- (나) 고속 (8 km/h)으로 속보 (trotting)를 유지하자 호흡이 약간 가빠짐
- (다) 30초마다 0.2 km/h로 속도를 증가시키기 시작하자 호흡이 보다 가빠지며, 개체가 트레드밀 위에서 달리는 위치가 점차 뒤쪽으로 이동함
- (라) 약 1 분 뒤 개체가 트레드밀 밖으로 떨어지기 전에 emergency 버튼으로 트레드밀을 급정지

**3. 개의 영상학적 방법 및 행동학적 방법을 이용한 집중력 평가 기법**

가. 개에서 vMRI/고해상도 MRI에 의한 집중력 관련 뇌 분석법 개발

(1) 연구방법

- (가) 부피측정자기공명영상 (Volumetric MRI, vMRI)을 이용한 집중력 분석
  - ① MRI 촬영을 위해 한국기초과학지원연구원(오창)에서 가동중인 MRI 2기(Achieva 3.0T, 7.0T)를 이용하여 각각 정상 비글견의 뇌 영상 이미지 판독을 통해 연구에 적합한 고해상도 기기 선정하였으며, 7.0T로 선정(아래 그림)



② 실험 대상: 정상 비글견 5두

③ MRI를 통한 분석은 호흡마취 (Butorphanol (0.2-0.6mg/kg, IM), Propofol(6mg/kg, IV), Isoflurane(1.5-2.5%, Inhalation)를 통해 실시



그림 40. 자기공명영상 장치 (Philips Achieva 7T, Philips Healthcare, Cleveland, USA)

④ 비글견을 Sternal recumbency 자세로 보정한 뒤, 고해상도 자기 공명 영상장비 (Philips Achieva 7T, Philips Healthcare, Cleveland, USA) 를 통해 뇌 영상을 획득

⑤ 뇌 영역 평가는 인의에서 보고된 집중력과 관련된 뇌 영역을 선정. 인의 및 개에서 대뇌 피질은 신경세포의 집합으로 판단력, 집중력 및 지적 능력과 밀접한 상관관계가 있다고 알려져 있고(Delon-Martin et al. 2013. Neuroimage), 전두엽은 판단 및 인지를 담당한다고 알려져 있으므로(Driemeyer et al. 2008. Plos one)이 두 부위(대뇌 피질, 전두엽)를 선정

⑥ 3차원 리모델링 소프트웨어(itk-SNAP. 그림 29)를 이용하여 대뇌 피질, 전두엽의 부피를 측정

ITK-SNAP is a software application used to segment structures in 3D medical images. It is the product of a decade-long collaboration between Paul Yushkevich, Ph.D., of the [Penn Image Computing and Science Laboratory \(PICSL\)](#) at the University of Pennsylvania, and Guido Gerig, Ph.D., of the [Scientific Computing and Imaging Institute \(SCII\)](#) at the University of Utah, whose vision was to create a tool that would be dedicated to a specific function, segmentation, and would be easy to use and learn. ITK-SNAP is free, open-source, and multi-platform.

ITK-SNAP provides semi-automatic segmentation using active contour methods, as well as manual delineation and image navigation. In addition to these core functions, ITK-SNAP offers many supporting utilities. Some of the core advantages of ITK-SNAP include:

- Linked cursor for seamless 3D navigation
- Manual segmentation in three orthogonal planes at once
- A modern graphical user interface based on Qt
- Support for many different 3D image formats, including NIFTI and DICOM
- Support for concurrent, linked viewing, and segmentation of multiple images
- Support for color, multi-channel, and time-variant images
- 3D cut-plane tool for fast post-processing of segmentation results
- Extensive tutorial and video documentation



ITK-SNAP  
ation, and  
e design also  
development

al years, and is funded by the NIH grant R01 EB014346. Version  
ng with new features focused on multi-modality image support.

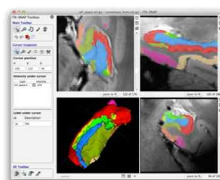
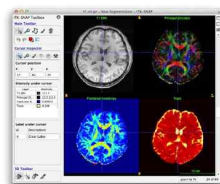


그림 41. itk-SNAP version 3.4(PICSL, UPenn, Penn, USA) : 임상적, 기초 과학적 연구를 위한 프로그램. 해부학적 영상 이미지를 삼차원 모델로 재구현하는 소프트웨어

(나) 피질 및 전두엽의 영역은 개의 해부 도보를 참고하여 수작업으로 정의

- ① 해부학적인 영역의 영상화 정도
- ② 목표 영역과 타 영역의 명확한 경계성
- ③ 해부학적 및 영상학적 지표 비교 등
- ④ 상기의 기준에 근거하여 대뇌 피질, 전두엽 및 타 영역과의 정확한 경계 설정이 요구됨

(2) 연구결과

(가) 앞서 선정된 기관 (한국기초과학지원연구원)에서 고해상도 MRI (Philips Achieva 7T, Philips Healthcare, Cleveland, USA)를 이용한 대뇌실질의 촬영

(나) 정상 비글견의 뇌 MRI 영상 분석

- ① 선정된 기기로 비글견의 뇌 영상 스캔
- ② 획득한 영상을 소프트웨어(itk-SNAP, PICSL, UPenn, Penn, USA)로 분석
- ③ 집중력 관련 영역으로 선정된 대뇌 피질(그림 49)과 전두엽(그림 50)의 부피 측정

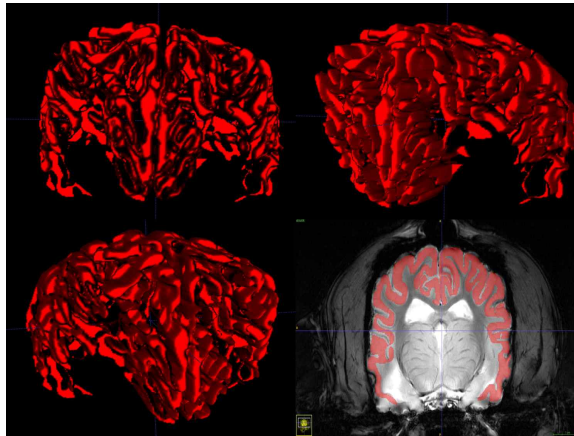


그림 42. 대뇌 피질

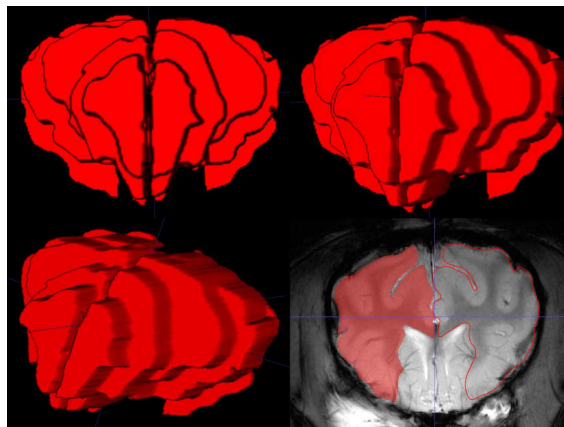


그림 43. 전두엽

(다) 분석 결과

뇌 영역	VOLUME(mm <sup>3</sup> )
대뇌 피질	1.982e + 0.4
전두엽	1.013e + 0.4

그림 44. 대뇌 피질 및 전두엽의 부피

(라) 의의

- ① MRI 영상 장비 확립 및 영상 획득
- ② 영상 분석 프로그램 및 분석법 확립
- ③ **확립된 영상 및 소프트웨어를 이용 하여 차년도 자건/성건 복제건의 대뇌 피질 및 전두엽의 부피를 측정**

#### 4. 2차년도 신제품 검역 복제 탐지건 추가 생산

가. 말리노이드 체세포주 추가 확립

(1) 연구방법

- (가) 새로운 신제품 섬유아 체세포 확립을 위하여 네덜란드에서 활동중인 특수목적 말리노이드 3살 수컷의 귀조직의 털을 제거한 후 일반적 외과 수술에 준해 알콜 스폰지와 베타딘으로 소독한 후 1cm \* 2cm의 크기로 조직을 절제하여 PBS로 3번 washing 하여 냉장 상태로 항공을 통해 실험실로 운반
- (나) 채취한 피부조직을 동일한 크기 (1cm \* 1cm)로 각각 자르고 PBS에 3번 Washing후, 미세가위를 이용하여 조직을 잘게 자르고 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배양액에서 39℃, 5% CO2 95%에서 배양
- (다) 부착된 조직에서 뻗어나오는 세포들을 컨플루언시 (confluency)까지 계속하여 배양 후 체세포핵이식 전까지 동결 보관

(2) 연구결과

- (가) 네덜란드에서 활동중인 특수목적건 말리노이드 3살 수컷의 조직을 네덜란드 현지를 방문하여 확보하였다. 항공을 통해 본 연구실로 조직을 이송하고 체세포를 분리, 세포주를 확립

동결일	계대수	바이러스수	세포농도
2017-06-13	0	1	$1 \times 10^6$
2017-06-15	0	2	$4.4 \times 10^5$
2017-06-24	0	1	$4 \times 10^5$
2017-06-24	0	2	$1 \times 10^6$

(가) 확립된 세포주의 경우 차년도에 위탁기관에 필요사항을 요청하여 세포제제의 소유권에 대한 협의를 진행하도록 할 예정

## 나. 2차년도 실험종 우수 검역탐지견 3두 추가 생산

### (1) 연구방법

#### (가) 체내 성숙 난자 회수

- ① 발정전기 출혈을 보이는 25-35kg 암캐의 요추피정맥에서 매일 또는 격일로 채혈을 실시하여 효소면역측정법으로 혈청 프로게스테론 농도(P4)를 측정
- ② P4가 6-10ng/ml에 도달한 때를 배란시기로 결정하고, 배란 후 약 72시간 후에 실험견을 xylazine과 ketamine 합제로 전마취를 유도한 뒤 isoflurane으로 마취를 유지한 채 dorsal recumbency로 보정



그림 45. 혈청프로게스테론 농도 측정에 사용된 Immolute 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Flanders, NJ).

- ④ 술부를 삭모 및 소독하고 배꼽에서 2cm 이하 지점부터 약 8-10cm 정도 정중선을 절개한 뒤, 자궁을 견인하여 현수인대 (suspensory ligament)를 고정함으로써 난소를 노출

- ⑤ 난관 opening 부분에 flushing needle을 삽입 후 봉합사로 고정된 뒤 자궁난관 접합 부위부터 반대 방향으로 혈관 카테터를 삽입

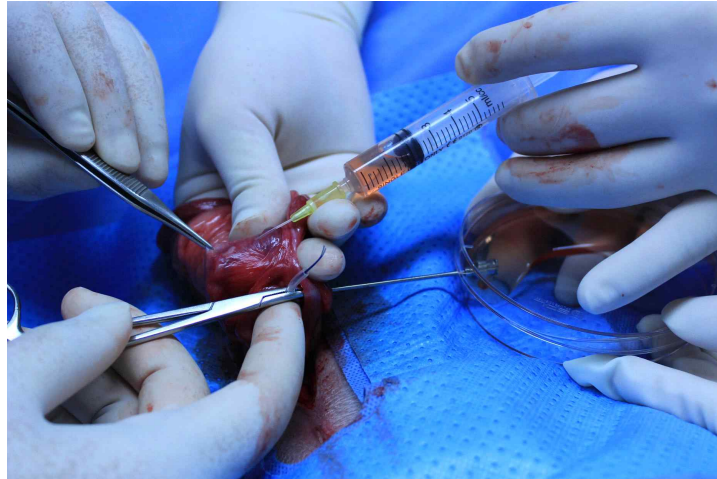


그림 46. 체내 성숙 난자를 회수하기 위한 수술 사진

- ⑥ 카테터에 주사기를 연결시키고 TCM based HEPES buffered media를 주입한 뒤, 난관 관류액을 Petri dish에 채취 후 관류액과 함께 회수된 난자를 실험실로 이송

(나) 신제품 우수 검역탐지견 세포를 이용한 체세포핵이식 개 생산

- ① Hyaluronidase에서 gentle pipetting을 통해 난구세포 제거 후, 제1극체와 위란강너비 (Perivitelline space)로 난자의 성숙 정도를 판단 후, 성숙 난자를 선별하여 체세포 핵이식에 사용
- ② Hoechst로 제1극체와 핵을 염색한 뒤, 미세조작기로 염색된 물질을 확인하여 탈핵 실시
- ③ 신제품 우수 검역탐지견 세포를 체세포핵이식 당일에 confluency가 되도록 배양하여 세포주기를 G0/G1로 동기화시킨 뒤, 실험 직전에 트립신 처리하여 단일 세포로 분리
- ④ 미세조작기로 모양이 균등한 신제품 우수 검역탐지견 유래의 단일 세포를 선별하여 선택한 뒤 탈핵된 난자의 위란강 내에 1개씩 주입

표 8. 본 연구에 사용된 신제품 우수 검역탐지견 개체 정보 및 확립한 세포 종류

개체 ID	성별	세포 종류
토	수컷	섬유아세포
수성	수컷	지방줄기세포
앤드	수컷	섬유아세포

- ⑤ 전기자극을 이용하여 주입한 세포와 난자의 세포질막의 융합을 실시한 뒤, 융합이 확인된 난자-세포 융합체를 선별하여 Calcium ionophore로 활성화 실시
- ⑥ 활성화가 끝난 복제배아를 Tomcat 카테터의 끝에 loading 한 뒤 자연발정으로 난자공여견과 배란주기가 동기화된 대리모의 난관에 주입
- ⑦ 이식일로부터 26일째 이후에 초음파로 대리모 복부 스크리닝으로 임신진단 실시하고, 임신이 확인된 개체는 45일째 이후에 X-ray를 이용하여 태아수 확인
- ⑧ 약 52일 경부터 하루 1-2회 채혈을 실시 후 P4 감소 추이를 분석함과 동시에 초음파로 태아의 심박수를 모니터링하여 자연분만 또는 제왕절개를 결정
- ⑨ 60일 전후로 P4가 1 이하로 떨어지거나 태아의 심박수가 분당 180~200회 이하로 감소하면 제왕절제 실시

(2) 연구결과

(가) 체세포 핵이식을 실시하였고, 초음파를 이용한 임신진단 결과 “앤드” 복제란을 이식한 대리모 3두에서 임신이 확인되어 총 3두의 “복제 앤드”를 생산

표 9. “토” 섬유아세포를 이용한 복제 검역탐지견 생산 결과

대리모ID	공여세포 계대수	이식복제 수	진단결과
토F-A	P-2	11	Failed
토F-B	P-3	14	Failed
토F-C	P-5	6	Failed
토F-D	P-6	7	Failed
토F-E	P-5	24	Failed

표 10. “수성” 지방줄기세포를 이용한 복제 검역탐지견 생산 결과

대리모ID	공여세포 계대수	이식복제 수	진단결과
수성A-A	P-3	13	Failed
수성A-B	P-3	9	Failed

표 11. “앤드” 섬유아세포를 이용한 복제 검역탐지견 생산 결과

대리모ID	공여세포 계대수	이식복제 수	진단결과
앤드F-A	P-1	13	Failed
앤드F-B	P-3	9	Pregnant (1 fetus)
앤드F-C	P-4	15	Pregnant (1 fetus)
앤드F-D	P-5	10	Failed
앤드F-E	P-6	7	Pregnant (1 fetus)

## 5. 1차년도 생산 신제품 중 복제견의 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성 평가

가. 1차년도 생산 복제견의 X-ray를 이용한 해부학적 정상성 평가

### (1) 연구방법

(가) 방사선 촬영 장치(TITAN 2000, COMED MEDICAL SYSTEMS, Korea)를 이용하여 동, 서, 남, 북의 방사선 촬영 검사를 진행(하단 그림 참고)

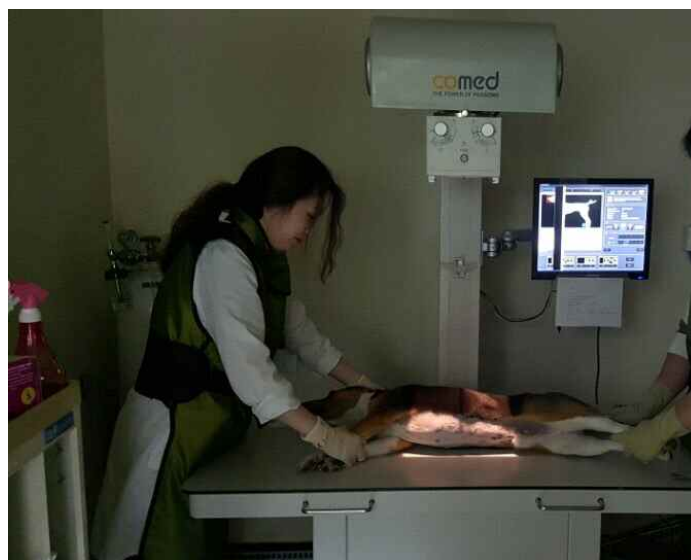


그림 47. 방사선 촬영 검사 진행 모습



- (나) 방사선 촬영은 흉부와 복부의 복배상, 우측횡와상 및 척추, 사지 근골격계 평가를 위한 자세로 촬영됨
- (다) 방사선 촬영 데이터 평가 및 측정에는 Radiant DICOM Viewer(version 4.0.3.16415, Medixant) 소프트웨어를 사용
- (라) 골격계의 정상적인 성장 여부 평가를 위해 Growth and hematologic characteristics of cloned dogs derived from adult somatic cell nuclear transfer(Park et al., 2010, Cell Rerogram)를 참고하여 두개골, 요추, 골반뼈를 측정
- (마) 두개골의 경우 DV view에서 위쪽 턱뼈의 정중앙 끝부터 external occipital protuberance의 끝 부분까지의 거리, 양측 zygomatic arch 사이의 거리, 양측 측두골 사이의 거리를 각각 SK1, SK2, SK3으로 지정하여 측정함(하단 그림 참조)

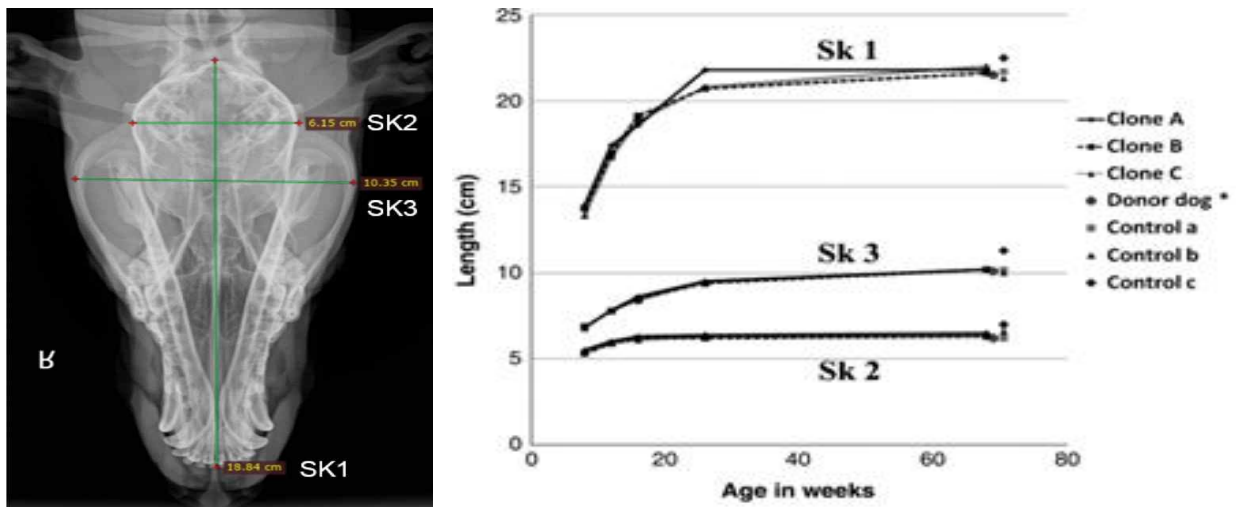


그림 48. 두개골에서 SK1, SK2, SK3을 측정한 모습(좌)와 그 정상값(우)

- (바) 요추의 경우 right lateral view에서 추체의 배쪽 cranial end plate부터 caudal end plate까지의 거리, 등쪽 cranial and plate부터 caudal end plate 까지의 거리, caudal end plate의 배쪽 끝부터 등쪽 끝까지의 거리를 각각 LL, UL, PH로 지정하여 측정(하단 그림 참조)



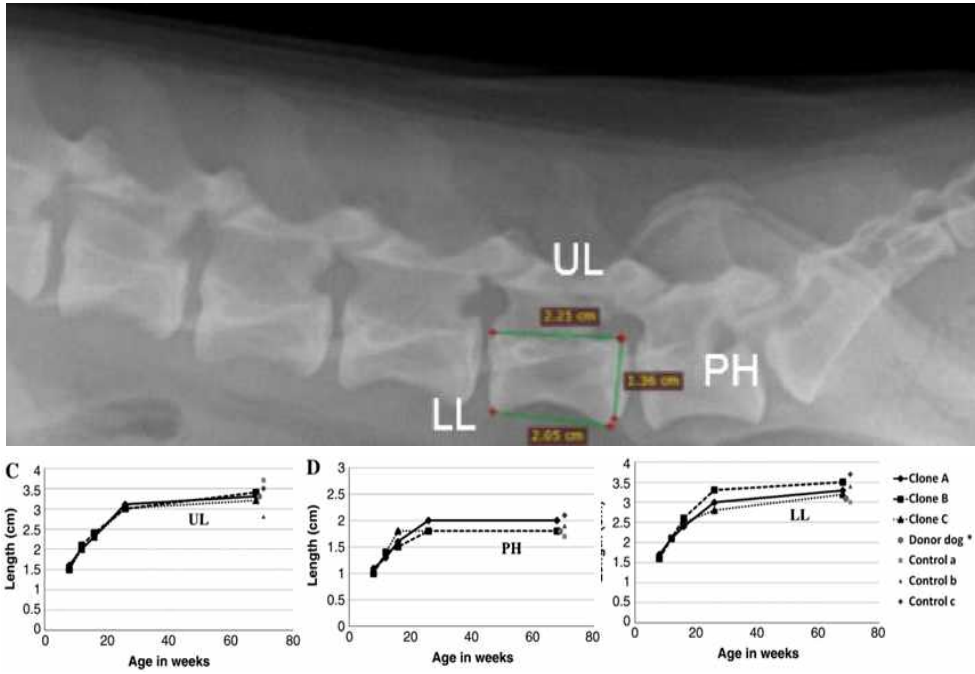


그림 49. 요추에서 UL, LL, PH를 측정 한 모습과(상) 그 정상값(하)

(사) 골반뼈의 경우 VD view에서 iliac crest의 끝부분부터 ischium의 끝부분까지의 거리, 양측 ischiatic tuberosity 사이의 거리를 각각 Pe1, Pe2로 지정하여 측정(하단 그림 참조)

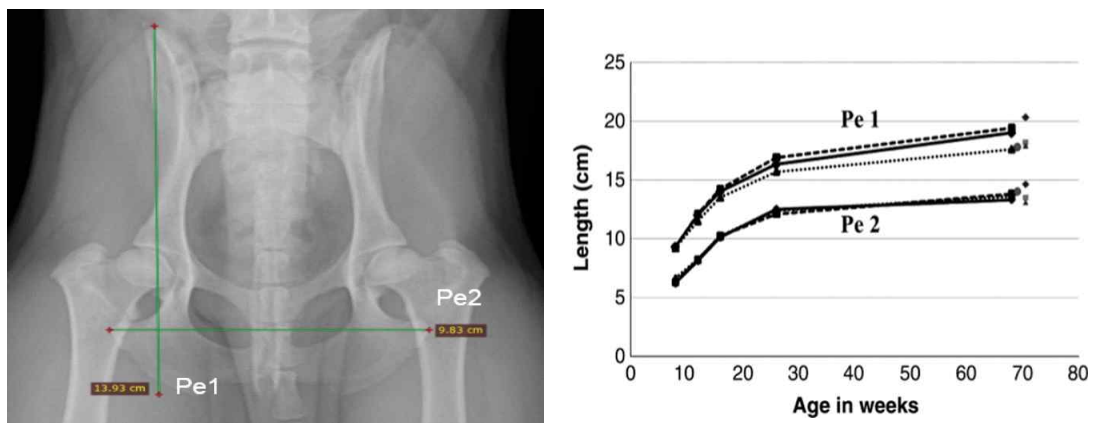


그림 50. 골반에서 Pe1, Pe2를 측정 한 모습과(상) 그 정상값(하)

## (2) 연구결과

(가) 흉복부 및 사지 골격의 방사선 촬영 결과 복을 제외한 동, 서, 남에게서 이상소견 관찰되지 않음(하단 첫 번째, 두 번째, 세 번째 그림 참조)



그림 51. 흉부  
방사선 촬영 검사



그림 52. 복부 방사선 촬영 검사



그림 53. 전지(좌)와 후지(우) 방사선 촬영 검사

- (나) 흉복부 및 사지 골격의 방사선 촬영 결과 복의 경추에서 이상소견 확인됨
- (다) - 뒷머리뼈와 환추 사이의 결합 소견 확인됨(하단 그림 참조)
- (라) 축추의 추체와 가시돌기 사이의 불유합 소견 확인됨(하단 첫 번째, 두 번째, 세 번째 그림 참조)
- (마) 일곱 번째 경추에 늑골과 유사한 구조물이 존재하는 것이 확인됨(하단 첫 번째, 두 번째, 세 번째 그림 참조)



그림 54. 복의 후두골과 경추 방사선 촬영 검사



그림 55. 북의 후두골과 경추 방사선 촬영 검사



그림 56. 북의 후두골과 경추 방사선 촬영 검사

(가) Growth and hematologic characteristics of cloned dogs derived from adult somatic cell nuclear transfer(Park JE et al., 2010) 논문을 참고하여 두개골, 요추, 골반의 측정결과 동, 서, 남, 북 모두 정상 결과값으로 판단(하단 표 참조)

표 12. 복제견의 두개골, 요추, 골반의 측정 지표 결과값

Part		동	서	남	북
Skull	SK1	18.64	17.69	18.58	16.65
	SK2	6.15	6.01	6.11	6.25
	SK3	10.35	10.43	10.7	10.51
Lumbar	UL	2.21	2.23	2.09	2.08
	PH	1.36	1.43	1.5	1.52
	LL	2.05	1.96	1.92	1.94
Pelvic bone	Pe1	13.19	13.64	13.93	14.33
	Pe2	10.04	9.93	9.83	9.93

나. 1차년도 생산 복제견의 초음파를 이용한 해부학적 정상성 평가

(가) 복부 초음파 검사

- ① 초음파 검사 장치(Prosound 75®; Hitachi-Aloca Medical, Ltd., Tokyo, Japan) 사용하여 dorsal recumbency 자세에서 주요 복강장기를 검사

(가) 심장 초음파 검사

- ① 초음파 검사 장치(Prosound 75®; Hitachi-Aloca Medical, Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 right/left lateral recumbency에서 심장을 검사(하단 그림 참조)



그림 57. 심장 초음파 검사 모습

- ② Right parasternal long axis 5 chamber view에서 M-mode를 통해 Teichholz 측정(하단 그림 참조)

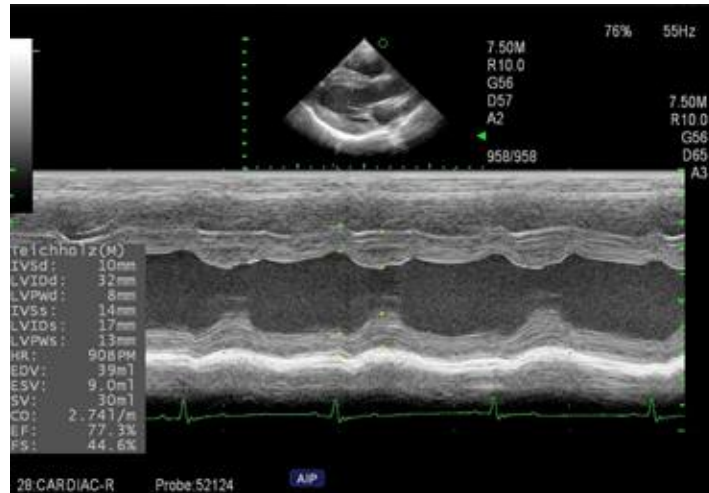


그림 58. Teichholz 측정 예시

- ③ Right parasternal short axis view에서 대동맥과 좌심방의 직경 비율을 측정(하단 그림 참조)

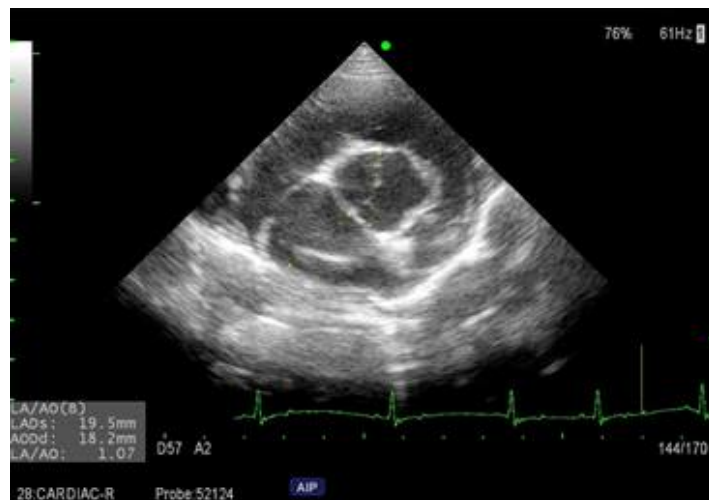


그림 59. LA/AO ratio 측정 예시

- ④ Right parasternal short axis view에서 폐동맥 유출로에 도플러 검사를 수행, RVOT flow를 측정(하단 그림 참조)

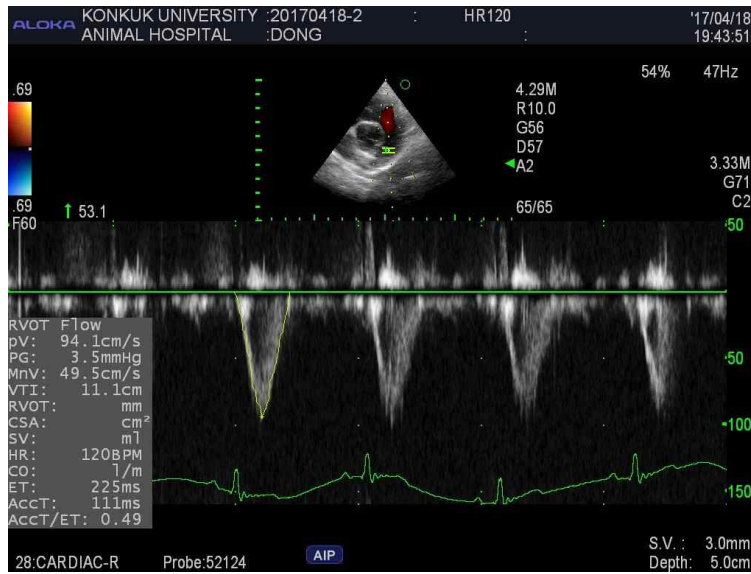


그림 60. RVOT flow의 측정 예시

- ⑤ Left apical 4 chamber view에서 mitral valve level에서 도플러 검사를 수행하여 mitral flow를 측정(하단 그림 참조)

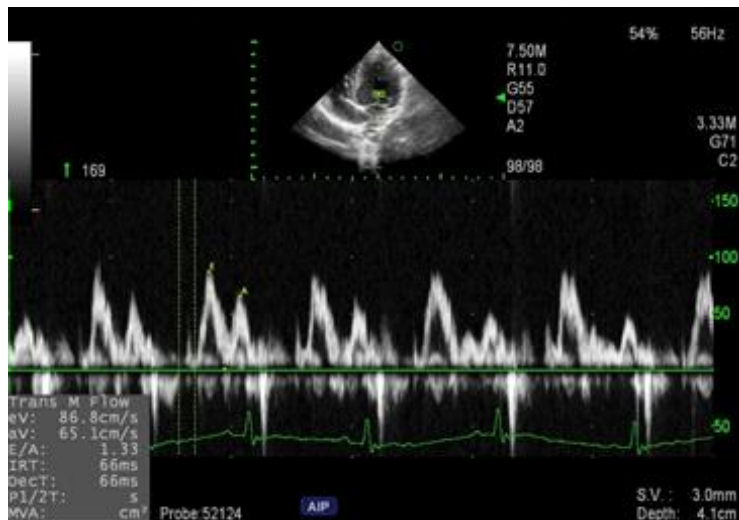


그림 61. Mitral flow의 측정 예시

- ⑥ Left apical 4 chamber view에서 mitral annulus 부위에 도플러 검사를 통해 TDI를 측정(하단 그림 참조)

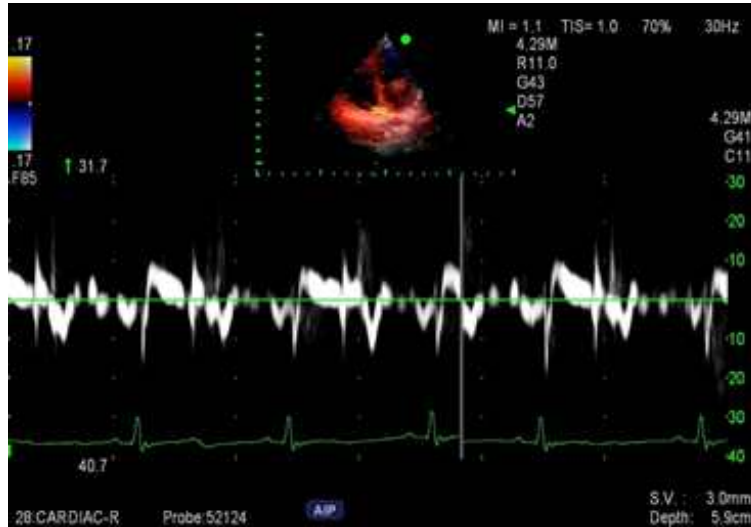


그림 62. TDI의 측정 예시

## (2) 연구결과

### (가) 복부 초음파 검사 결과

- ① Dorsal recumbency 자세에서 간담도계, 비장, 비뇨생식기계 등 주요 장기의 초음파 검사를 실시
- ② 동과 서의 우측 잠복고환 소견(하단 첫 번째, 두 번째 그림 참조) 외에 **동, 서, 남, 북의 다른 주요장기의 초음파 검사상의 이상소견은 관찰되지 않음**(하단 세 번째, 네 번째 그림 참조)
- ③ 잠복고환의 경우 발생 부위의 차이(양측 혹은 편측(좌/우))가 있더라도 유전적인 영향이 있을 수 있음(공여세포견)

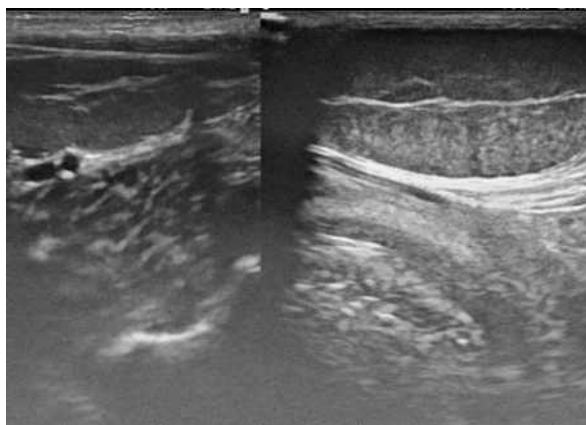


그림 63. 동의 우측 잠복고환 초음파 검사



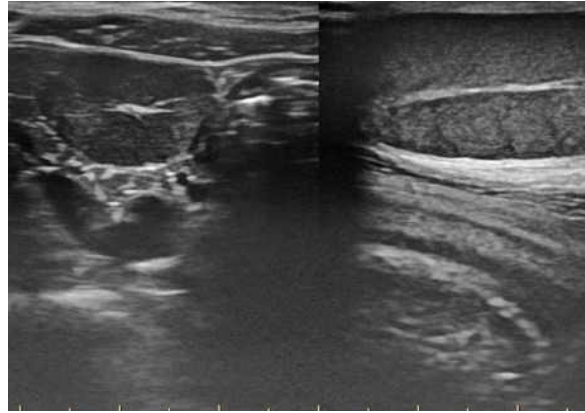


그림 64. 서의 우측 잠복고환 초음파 검사



그림 65. 복제건의 간담도계 초음파 검사



그림 66. 복제건의 신장 초음파 검사

(나) 심장 초음파 검사 결과

- ① Right parasternal long axis 5 chamber view의 M-mode에서 Teichholz 측정 결과 동, 서, 남, 북의 모든 결과값이 정상범위 안에 있는 것으로 판단(하단 표 참조)

표 13. Teichholz 측정 결과값

Teichholz	동	서	남	북
IVSd(mm)	8.3	8.7	8.0	7.0
LVIDd(mm)	32.0	32.0	34.0	32.7
LVPWd(mm)	8.3	8.7	8.5	9.3
IVSs(mm)	10.0	10.7	11.0	10.3
LVIDs(mm)	21.7	20.3	21.0	18.7
LVPWs(mm)	12.7	12.3	12.5	13.3
EDV(ml)	40.3	39.0	47.0	42.7
ESV(ml)	15.3	58.3	14.5	10.5
EF(%)	61.5	66.2	69.0	75.3
FS(%)	32.1	35.8	37.6	42.9

② Right parasternal short axis view에서 LA/AO ratio 측정 결과 동, 서, 남, 북의 모든 결과값이 정상범위 안에 있는 것으로 판단(하단 표 참조)

	동	서	남	북
LA/AO	1.1	1.0	1.2	0.9

표 14. LA/AO ratio 측정 결과값

③ Right parasternal short axis view에서 RVOT flow 측정 결과 동, 서, 남, 북의 모든 결과값이 정상범위 안에 있는 것으로 판단(하단 표 참조)

표 15. RVOT flow 측정 결과값

	동	서	남	북
pV	95.8	109.3	101.2	96.6
AT/ET	0.5	0.5	0.5	0.5

④ Left apical 4 chamber view에서 mitral flow, TDI 측정 결과 동, 서, 남, 북의 모든 결과값이 정상범위 안에 있는 것으로 판단(하단 표 참조)

표 16. Mitral flow 및 TDI 측정 결과값

	동	서	남	북
Mitral flow				
E/A	1.7	1.8	2.6	1.8
TDI				
E/E'	8.5	8.4	9.2	7.9

- ⑤ 심장의 2D 평가상 선천성 심질환 및 구조적 이상소견은 동, 서, 남, 북 모두 관찰되지 않음
- ⑥ Color Doppler 검사 상 심장혈류의 역류현상은 동, 서, 남, 북 모두 관찰되지 않음
- ⑦ 심장의 수축기/이완기 기능 검사 상 동, 서, 남, 북 모두 이상소견 관찰되지 않음
- ⑧ 결과: 동, 서, 남, 북의 심장은 모두 정상인 것으로 판단

다. 1차년도 생산 복제견의 CT를 이용한 해부학적 정상성 평가

(1) 연구방법

- (가) 마취유도를 위해 부토포관주(Butophan Injection 1mg/ml, Butorphanol tartrate, 명문제약)과 프로바이브주(Provide Inj. 1%, Propofol, 명문제약)을 각각 0.02mg/kg IM, 0.6ml/kg IV로 처치하였고 이후 아이프란액(Ifran Liq., Isoflurane, 하나제약)으로 호흡마취 유지
- (나) CT 촬영은 CT scanner(Light-speed Plus®, GE Healthcare, Amersham, UK)를 통해 진행됨(하단 그림 참조)

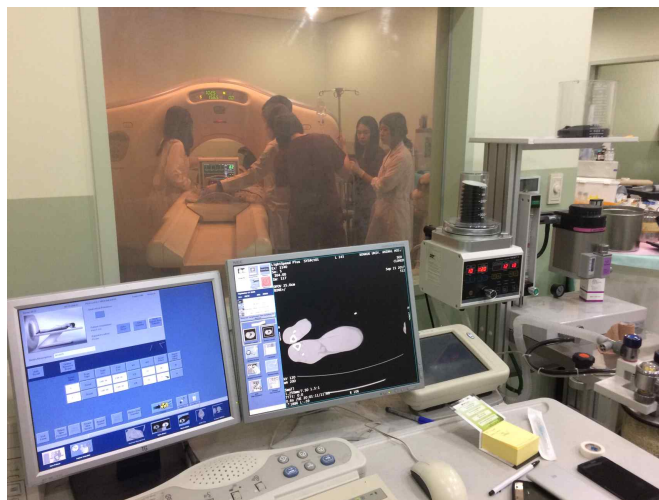


그림 67. CT 촬영 검사 진행 모습

(다) CT 촬영은 대퇴부의 근육량 평가 및 요추와 대퇴골의 골밀도 평가를 위한 촬영이 먼저 실시된 후, 전체적인 검사를 위해 조영제 주입 전, 조영제 주입 후를 나누어 실시

(2) 연구결과

(가) 해부학적 정상성을 평가하기 위해 CT 촬영을 진행

(나) 검사 결과 이전 복제견에서 발생한 간담도계의 기형은 동, 서, 남, 북에서는 발생하지 않은 것으로 판단(하단 그림 참조)

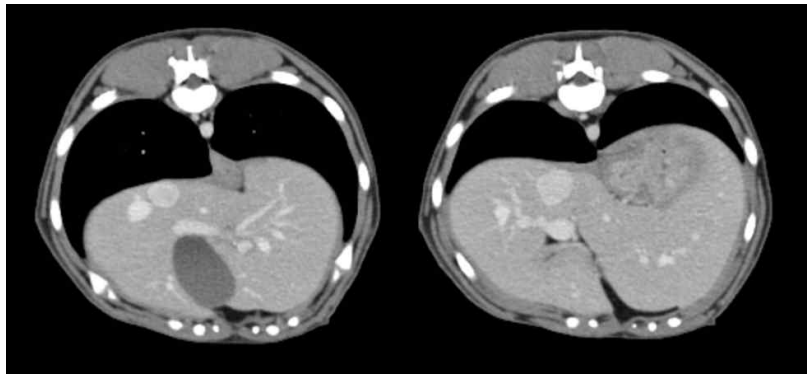


그림 68. 복제견 간담도계의 CT 촬영

(다) 동과 서의 CT 촬영 결과 초음파 검사상의 소견과 동일하게 우측 잠복고환 존재함이 확인(하단 그림 참조)



그림 69. 복제견 우측 잠복고환의 CT 촬영 영상

(라) 북의 CT 촬영 결과 방사선 촬영 검사상의 소견과 동일하게 후두골과 환추 사이의 결합 및 일곱 번째 요추에 늑골과 유사한 구조물의 존재, 축추의 추체와 가시돌기 사이의 불유합이 확인(하단 그림 참조)

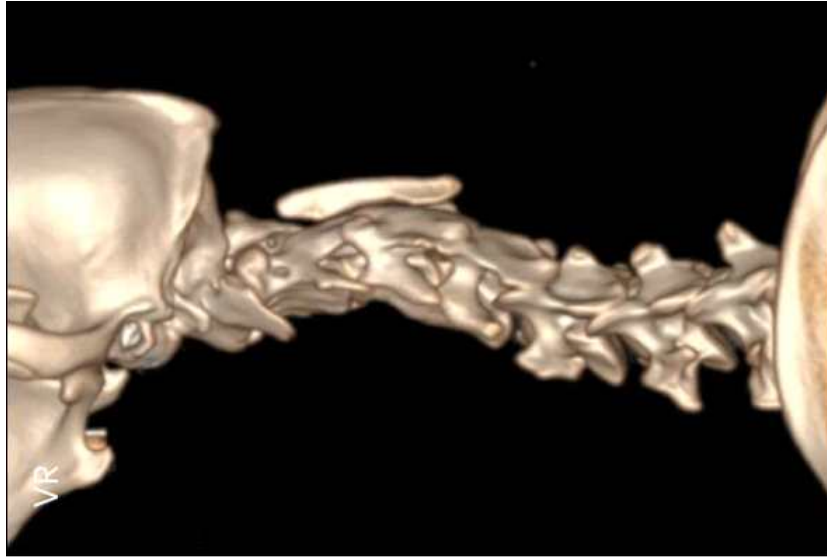


그림 70. 복의 CT 촬영 영상에서 후두골 및 경추의 기형을 VR하여 가시화한 모습

## 6. 1차년도 생산 신제품 복제건의 영상학적 및 행동학적 기법을 이용한 운동능 평가

### 가. 일반 비글견 및 복제 탐지 자견/성견에서 CT를 이용한 근육량 분석

#### (1) 연구방법

(가) 호흡마취를 실시한 후 CT scanning 실시

(나) 촬영 후 얻어진 이미지를 Osirix(lite ver.9.0, Pixmeo SARL, Switzerland) 소프트웨어를 통해 근육량의 측정

(다) ROI의 설정은 가로단면 영상에서 근육의 경계부위를 따라 설정하였으며(하단 첫 번째 그림 참조), 그 범위는 대퇴경부가 보이는 시점부터 양측 종자골인 fabella가 보이는 단면까지로 설정 됨(하단 두 번째 그림 참조)

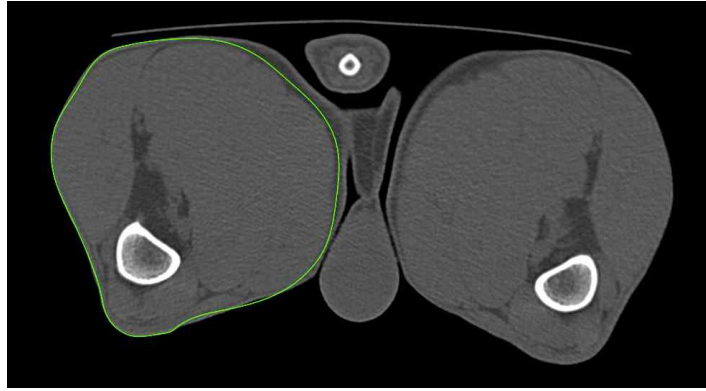


그림 71. ROI가 설정된 복제견의 대퇴부 근육의 CT 가로단면 영상

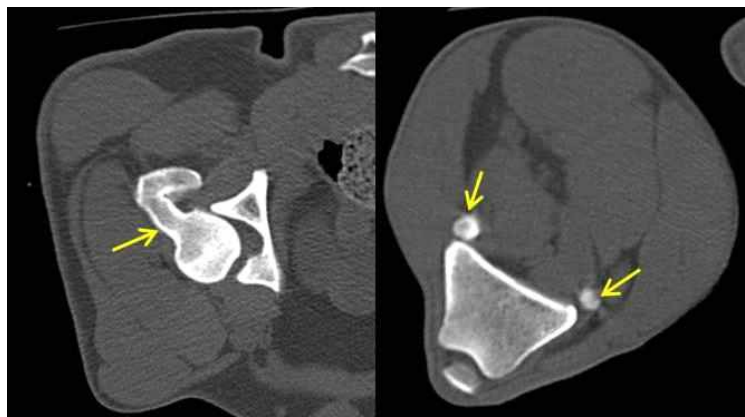


그림 72. 대퇴골두와 대퇴골 목이 보이는 단면부터 양측 fabella가 보이는 단면까지 근육량 ROI 설정

(2) 연구결과

(가) 복제견의 후지를 CT 촬영을 실시한 후 얻어진 이미지를 OsiriX 소프트웨어를 활용하여 근육량을 계산

(나) 복제견의 근육량 및 대퇴골의 직경 평균값(하단 표 참조)

표 17. 복제견의 근육량 및 대퇴골의 직경 평균값

	우측 근육량(cm <sup>3</sup> )	좌측 근육량(cm <sup>3</sup> )
동	555.0695	566.7477
서	553.9777	563.3815
남	558.2850	558.8555

(다) 복제건의 대퇴골 중간지점 직경 평균값(하단 표 참조)

표 18. 복제건의 대퇴골 중간지점 직경 평균값

Femur Diameter (cm)		
동	Rt	1.23
	Lt	1.23
서	Rt	1.27
	Lt	1.27
남	Rt	1.36
	Lt	1.32

(라) 근육량/대퇴골 직경의 비율 결과값(하단 표 참조)

표 19. 복제건의 근육량/대퇴골 직경의 비율 결과값

	우측	좌측
동	451.27	460.77
서	436.20	443.60
남	410.50	423.37

(마) 대퇴부 근육량 결과와 함께 volume rendering을 수행, 대퇴부 근육을 시각화함(하단 그림 참조)

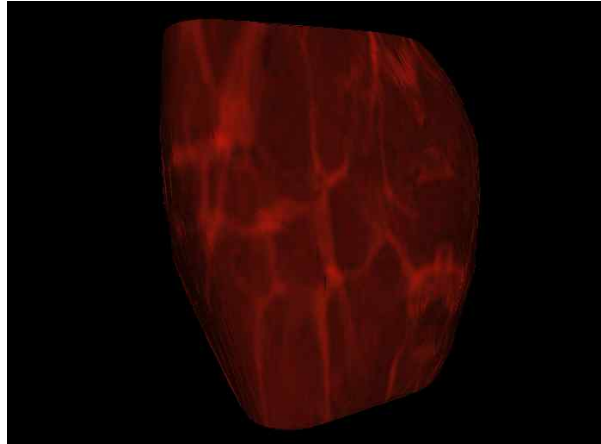


그림 73. 복제견의 대퇴부 근육을 VR로 시각화한 모습

(바) 확립된 측정값 및 소프트웨어를 이용하여 차년도 스마트 복제견의 대퇴부 근육량 및 대퇴골 직경과 그 들 사이의 비율을 측정, 비교 예정

나. 일반 비글견 및 복제 탐지 자견/성견에서 MRS에 의한 근육성상 분석

(1) 연구방법

- (가) 한국기초과학지원연구원(오창)에서 MRI 촬영 장비(Philps Achieva 3.0T, Philps Healthcare, Cleveland, USA)를 사용하여 촬영을 진행
- (나) 마취유도를 위해 부토판주(Butophan Injection 1mg/ml, Butorphanol tartrate, 명문제약)과 프로바이브주(Provive Inj. 1%, Propofol, 명문제약)을 각각 0.02mg/kg IM, 0.6ml/kg IV로 처치하였고 이후 아이프란액(Ifran Liq., Isoflurane, 하나제약)으로 호흡마취 유지
- (다) 마취된 비글견은 sternal recumbency 자세로 코일의 중심부에 대퇴부의 중간 지점이 오도록 고정하고(하단 첫 번째 그림 참조) 모음근(adductor muscle)에 voxel을 설정하여 MRS 촬영을 진행(하단 두 번째 그림 참조)





그림 74. MRS 촬영 검사 진행 모습

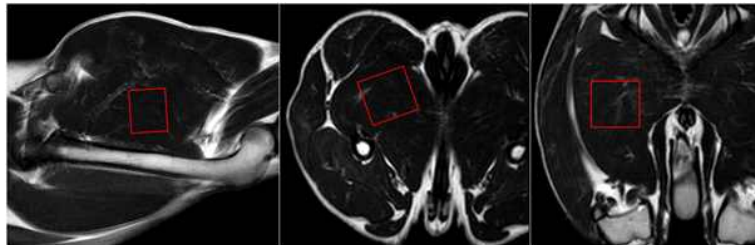


그림 75. 복제건 모음근(adductor muscle)에 voxel을 설정한 모습

(라) 최적의 촬영 조건 확립을 위해(하단 첫 번째 그림 참조) MRS criteria 설정을 subjective spectral contour와 SNR(signal to noise ratio) 항목으로 나누어 평가하고(하단 첫 번째 표 참조), 그에 따른 MRS score를 획득하여(하단 두 번째 표 참조) 최종적으로 Protocol C(Knee coil/Large voxel/Short TE) 조건으로 촬영(하단 두 번째 그림 참조)

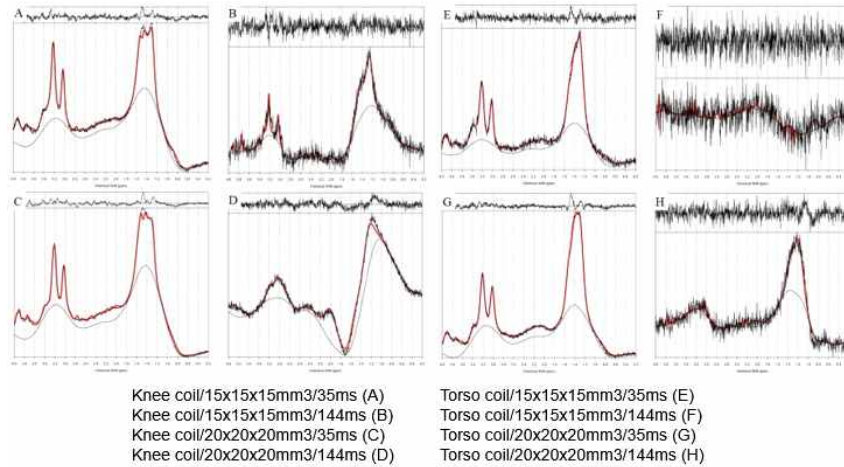


그림 76. 복제건들의 MRS 촬영 결과 스펙트럼

표 20. 복제건의 MRS criteria

Score	Subjective spectral contour	SNR
1	No distinct metabolite peak, heavy baseline noise	1 – 15.8
2	Indistinct major metabolite peaks, much baseline noise	15.8 – 30.6
3	Distinct major metabolite peaks, moderate baseline noise,	30.6 – 45.4
4	Distinct major metabolite peaks, some distinct minor metabolite peak, mild baseline noise	45.4 – 60.2
5	Distinct major and minor metabolite peaks, little baseline noise	60.2 – 75.0

표 21. 복제건의 MRS score 결과값

	Mean subjective spectral contour score	Mean SNR score	Total score
Protocol A	4.72 ± 0.38	3.20 ± 0.45	7.8 ± 0.84
Protocol B	2.30 ± 1.03	1.00 ± 0.00	3.2 ± 0.84
Protocol C	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	10.0 ± 0.00
Protocol D	2.84 ± 1.12	1.00 ± 0.00	4.0 ± 1.00
Protocol E	3.71 ± 1.22	1.20 ± 0.45	5.0 ± 0.71
Protocol F	1.56 ± 0.88	1.00 ± 0.00	2.6 ± 0.89
Protocol G	4.40 ± 0.60	2.00 ± 0.71	6.4 ± 1.52
Protocol H	2.15 ± 0.71	1.00 ± 0.00	3.2 ± 0.45

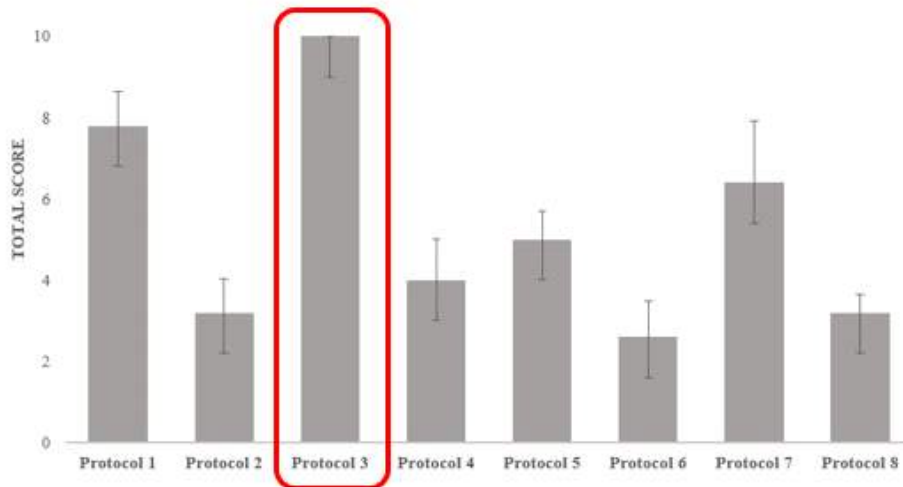


그림 77. MRS score 결과, 최종적으로 Protocol C 조건을 선택

(마) 촬영 종료 후 비글견의 마취 회복 시점까지 모니터링 실시

(바) MRS 촬영으로 획득한 데이터는 TARQUIN(version 4.3.10, Birmingham, UK) 소프트웨어를 사용하여 분석 실시

(2) 연구결과

(가) 복제 탐지견 대퇴근육의 MRS 촬영을 진행

(나) 획득한 영상은 TARQUIN(version 4.3.10, Birmingham, UK) 소프트웨어를 사용하여 분석, MRS criteria에 따라 평가

(다) 복제 탐지견의 모음근(Adductor muscle)의 근육 정상 스펙트럼의 결과(하단 표 및 첫 번째, 두 번째, 세 번째 그림 참조)

표 22. 복제견 동, 서, 남 모음근의 MRS 촬영 결과

	동	서	남
Ala:Cr	1.26	5.31	7.38
Asp:Cr	11.25	8.39	6.19
Cr:Cr	3.22	2.11	3.26
GABA:Cr	0	0	0
GPC:Cr	20.5	14.42	18.9
Glc:Cr	5.49	3.33	6.3
Gln:Cr	4.08	3.19	2.03
Glth:Cr	5.46	6.20	8.69
Glu:Cr	4.45	6.92	7.01
Ins:Cr	0	0	0
Lac:Cr	2.36	2.34	3.21
Lip09:Cr	1.43	1.75	2.9
Lip13b:Cr	10.3	-	-
Lip20:Cr	3.81	3.34	5.29
MM09:Cr	0	0	0
MM12:Cr	-	-	0.37
MM14:Cr	4.7	4.46	14
MM17:Cr	0	0	0
MM20:Cr	1.09	1.23	1.43
NAA:Cr	1.06	0	0
NAAG:Cr	1.33	0.28	0
PCh:Cr	3.82	0	2.07
PCr:Cr	3.89	1.57	3.04
Scyllo:Cr	2.61	0	0
Tau:Cr	13.3	9.29	8.42
TNAA:Cr	4.18	0.71	0
TCho:Cr	54.3	50.09	48.1
TCr:Cr	40.7	30.80	38
Glx:Cr	5.94	7.82	9.6
TLM09:Cr	7.04	5.79	11.4
TLM13:Cr	38.7	18.98	72.2

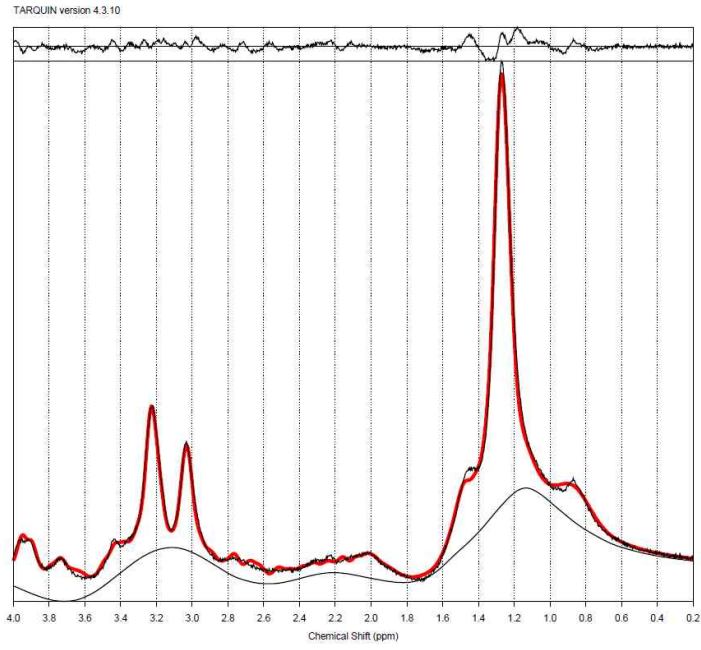


그림 78. 복제견 동의 MRS 촬영 결과 스펙트럼

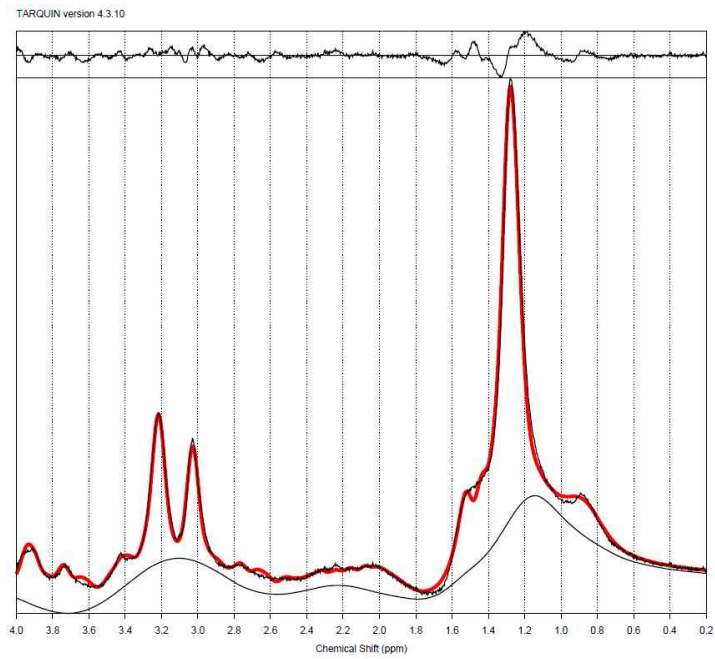


그림 79. 복제견 서의 MRS 촬영 결과 스펙트럼

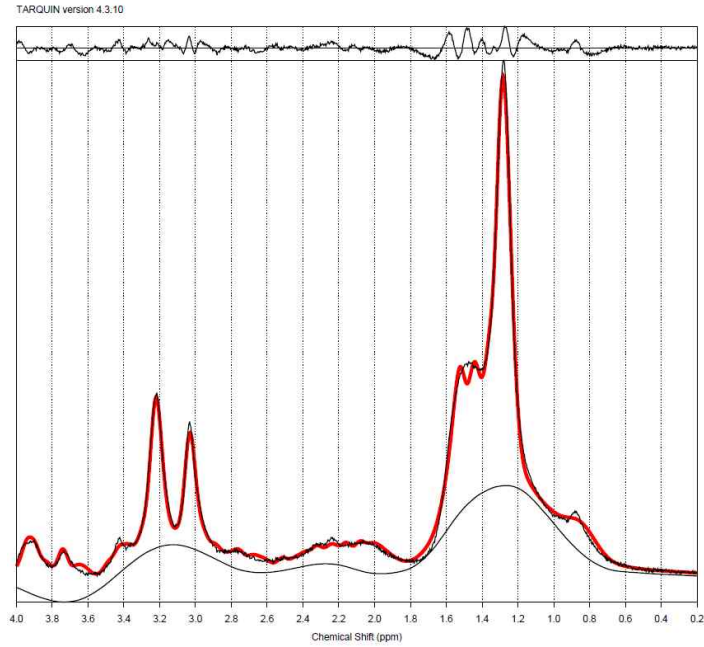


그림 80. 복제견 남의 MRS 촬영 결과 스펙트럼

(라) 복제 탐지견의 MRS score(하단 표 참조)

표 23. 복제견의 MRS score

	Subjective spectral contour	SNR (Signal to noise ratio)
동	5	5
서	5	5
남	5	5

다. 일반 비글견 및 복제 탐지 자견/성견에서 CT에 의한 골밀도 측정법 개발 및 분석

(1) 연구방법

(가) 마취유도를 위해 부토판주(Butophan Injection 1mg/ml, Butorphanol tartrate, 명문제약)과 프로바이브주(Provide Inj. 1%, Propofol, 명문제약)을 각각 0.02mg/kg IM, 0.6ml/kg IV로 처치하였고 이후 아이프란액(Ifran Liq., Isoflurane, 하나제약)으로 호흡마취 유지

(가) QCT phantom(QRM-BDC/3, QRM GmbH®, Moehrendorf, Germany)를 CT table에 설치 후, 복제견의 대퇴부와 요추부위를 phantom 위에 올려 두 번에 걸쳐 CT를 촬영

(나) CT 촬영을 통해 얻은 삼단면 영상을 3Dslicer(version 4.6.2 r25516, National Alliance for medical Image Computing) 소프트웨어를 사용하여 골밀도를 측정

- (다) QCT phantom의 CT water, 100HA, 200HA 지점에 ROI를 설정(하단 첫 번째 그림 참조)
- (라) ROI의 설정은 일반견을 대상으로 확립한 골밀도 측정 방법과 동일하게(하단 첫 번째 그림 참조) 시상단면과 가로단면 영상을 참고하여 요추의 경우 가로돌기의 기시부가 보이는 단면에서의 추체를, 대퇴골의 경우 대퇴경부와 근위 1/3, 원위 1/3 부위를 지정(하단 두 번째, 세 번째 그림 참조)

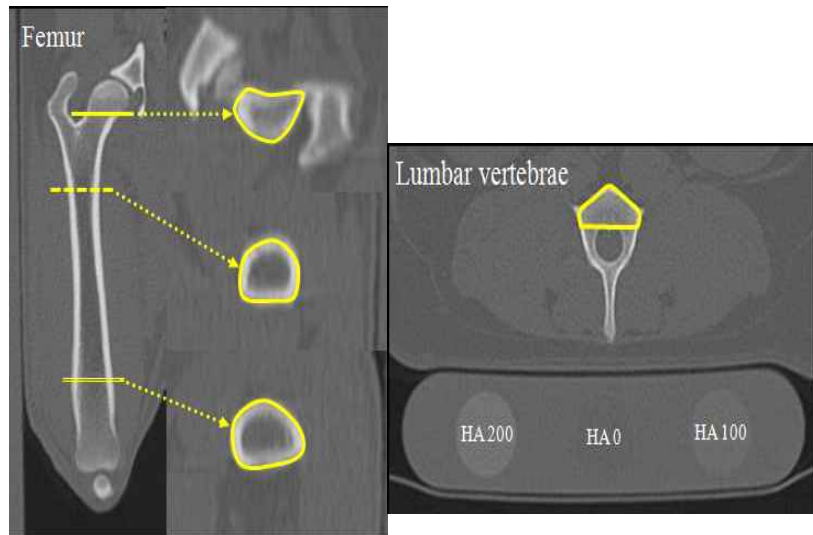


그림 81. 복제견 대퇴골과 요추 골밀도 측정 ROI 설정 예시

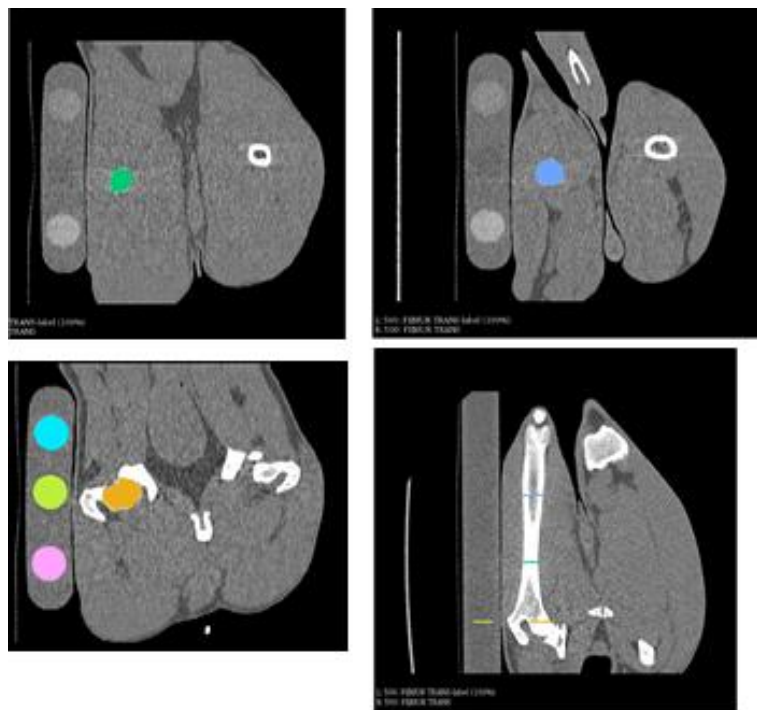


그림 82. 복제견 대퇴골 골밀도 측정 시상단면과 가로단면 영상



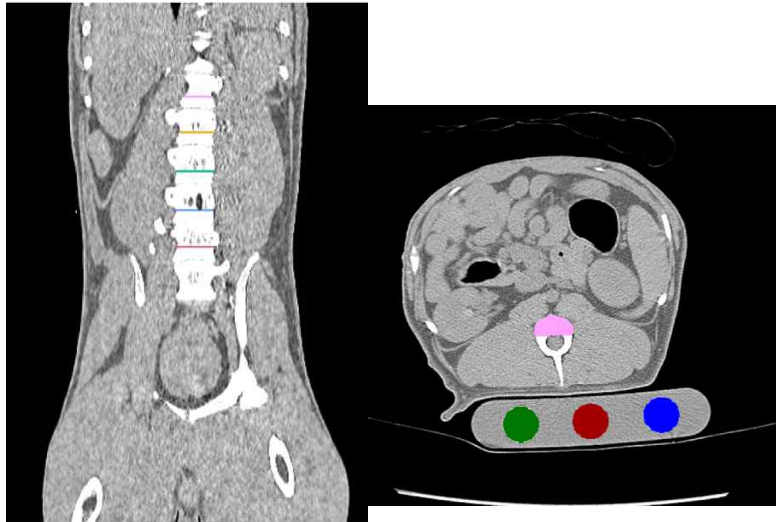


그림 83. 복제견 요추 골밀도 측정 시상단면과 가로단면 영상

(마) 설정된 각각의 ROI의 평균 HU 값을 측정

(바) CT water, 100HA, 200HA 지점에서 측정된 HU값을 사용하여 그래프와 추세식을 생성하여 요추 및 대퇴골의 ROI에서 측정된 HU 값을 대입, HA 값을 산출

(2) 연구결과

(가) QCT(Quantitative Computed Tomography)를 이용하여 수질과 피질의 골밀도 측정

(나) 요추(L2-L6의 추체)와 대퇴골(대퇴경부, 근위 1/3지점, 원위 1/3지점)을 ROI로 설정

(다) 복제견 동, 서, 남의 요추(하단 첫 번째 표 참조) 및 대퇴골(하단 두 번째 표 참조)의 골밀도 측정값

표 24. 복제견 동, 서, 남 요추의 골밀도 값

	복제견(동) 골밀도(HA/cm <sup>3</sup> )	복제견(서) 골밀도(HA/cm <sup>3</sup> )	복제견(남) 골밀도(HA/cm <sup>3</sup> )
2번요추	419.897	407.538	430.086
3번요추	438.717	392.632	423.949
4번요추	472.072	392.929	435.956
5번요추	464.915	404.158	449.546
6번요추	454.317	378.873	483.608



표 25. 복제견 동, 서, 남 대퇴골의 골밀도 값

	복제견(동) 골밀도(HA/cm <sup>3</sup> )	복제견(서) 골밀도(HA/cm <sup>3</sup> )	복제견(남) 골밀도(HA/cm <sup>3</sup> )
대퇴경부	604.123	664.280	578.854
근위 1/3지점	765.447	684.711	701.378
원위 1/3지점	546.024	571.357	448.245

**(라) 확립된 측정값 및 소프트웨어를 이용하여 차년도 스마트 복제견의 요추 및 대퇴골의 골밀도를 측정, 비교할 예정**

라. 1차년도 생산 복제견의 행동학적 기법을 이용한 운동능 평가

(1) 연구방법

(가) 저속 (4 km/h)과 중속 (8 km/h)에서의 트레드밀 적응 훈련

- ① 검역탐지견, 일반 비글 등 다수의 개체를 한 마리씩 트레드밀 위에 올라가도록 한 뒤에 천천히 걸을 수 있는 속도 (2 km/h)에서 10초~30초 가량 적응 유도
- ② 개체의 적응 속도에 따라 매 10~30초마다 0.5 km/h 씩 증가시키면서 4 km/h까지 도달한 뒤 3분 이상 유지하며 트레드밀 운동에 안정적으로 적응할 수 있도록 유도
- ③ 개체의 적응 속도에 따라 매 10~30초마다 0.5 km/h 씩 증가시키면서 8 km/h까지 도달한 뒤 5분 이상 유지하며 트레드밀 운동에 안정적으로 적응할 수 있도록 유도

(나) 체온, 심박수, 호흡수, SpO<sub>2</sub>, 혈액화학적 변화 분석측정

- ① 8 km/h의 속도로 운동을 실시하였고, 운동 전 (Pre), 운동 후 15분째 (Exercise, 15 m), 운동 후 30분째 (Exercise, 30m), 운동 중단 후 10분째 (Post-exercise, 10m), 운동 중단 후 20분째 (Post-exercise, 20m), 운동 중단 후 30분째 (Post-exercise, 30m)에 직장체온 (T), 심박수 (HR), 호흡수 (RR), SpO<sub>2</sub>를 측정
- ② 혈액화학적 변화를 분석하기 위해 위와 같은 시간에 경정맥에서 약 2ml의 혈액을 채취한 뒤, COR (cortisol), ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase), TBIL (total bilirubin), GGT (gamma-glutamyl transferase), Lipase, TC (total cholesterol), GLU (glucose), ALB (albumin), TP (total protein), TG (triglyceride) 값을 분석

(2) 연구결과

(가) 다수의 개체를 이용한 예비실험 결과, 4 km/h 이내의 저속 운동 시 개체에 따라 트레

드밀 위에서 운동 중 집중력 저하를 나타내는 경우가 있어서 실험 결과 도출에 어려움이 있었음.

(나) 따라서 8 km/h의 속도로 운동을 실시하였고, 운동 전 (Pre), 운동 후 15분째 (Exercise, 15 m), 운동 후 30분째 (Exercise, 30m), 운동 중단 후 10분째 (Post-exercise, 10m), 운동 중단 후 20분째 (Post-exercise, 20m), 운동 중단 후 30분째 (Post-exercise, 30m)에 직장체온(T), 심박수 (HR), 호흡수 (RR), SpO<sub>2</sub>를 측정하였고, 혈액화학적 변화를 분석.

**(다) 본 실험을 통해 확립된 방법으로 근육 특이 PCK1 발현 복제개 생산 후 자견과 성견 시기에 운동능 분석을 실시**

표 26. 1년령 대조군에서 운동에 따른 체온, 심박수, 호흡수, SpO<sub>2</sub>의 변화

	Pre	Exercise		Post-exercise		
		15m	30m	10m	20m	30m
T(°C)	38.9	39.6	39.7	39.2	39.3	38.9
HR(/m)	105	113	119	117	108	105
RR(/m)	48	48	123	45	42	45
SpO <sub>2</sub>	86	87	90	88	88	86

표 27. 1년령 대조군에서 운동에 따른 체온, 심박수, 호흡수, SpO<sub>2</sub>의 변화

	Pre	Exercise		Post-exercise		
		15m	30m	10m	20m	30m
Cor(ug/dL)	2	4	5	8	5	3
ALT(U/L)	38	38	37	39	38	39
AST(U/L)	34	32	31	34	34	63
ALP(U/L)	36	37	38	38	37	37
TBIL(mg/dl)	0	0	0	0	0	0
GGT(U/L)	1	3	5	5	4	4
Lipase(U/L)	125	216	243	214	217	262
TC(mg/dL)	227	225	226	226	228	221
GLU(mg/dL)	104	113	107	110	111	116
ALB(g/dL)	4	4	4	4	4	4
TP(g/dL)	7	7	7	7	7	7
TG(mg/dL)	53	45	40	43	32	37

## 8. 1차년도 생산 신제품 복제건의 영상학적 및 행동학적 기법을 이용한 집중력 평가

가. 성견에서 vMRI/고해상도 MRI에 의한 집중력 관련 뇌 분석법 개발

### (1) 연구방법

- (가) MRI 촬영을 위해 한국기초과학지원연구원(오창)에서 가동중인 MRI(Achieva 7.0T)를 이용하여 복제탐지견의 뇌 스캔을 실시함
- (나) 실험 대상: 복제 탐지견(비글종) 3두
- (다) MRI 촬영을 위한 마취는 medetomidine hydrochloride(Medetomidine hydrochloride, Domitor®, PfizerInc, Korea)를 통해 실시함
- (라) 비글견을 sternal recumbency 자세로 보정한 뒤, 고해상도 자기 공명 영상장비(Philips Achieva 7T, Philips Healthcare, Cleveland, USA)를 통해 뇌 영상을 획득함(하단 그림 참조)
- (마) 사용된 코일은 인의용 무릎 코일을 사용



그림 84. MRI 촬영 검사 진행 모습

- (바) 뇌 영역 평가는 인의에서 보고된 집중력과 관련된 뇌 영역인 대뇌 피질과 전두엽을



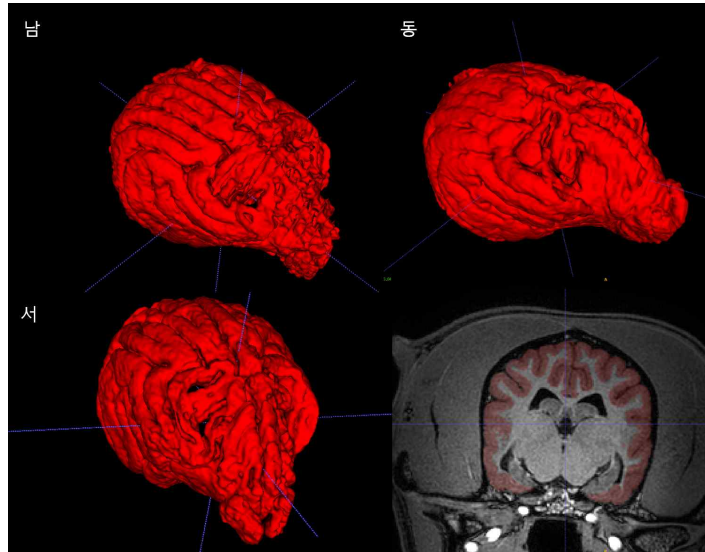


그림 86. 복제견 대뇌피질 부피측정의 예시

(카) 판단 및 인지를 담당하는 전두엽(frontal lobe)의 부피를 정상적으로 측정(하단 그림 참조)

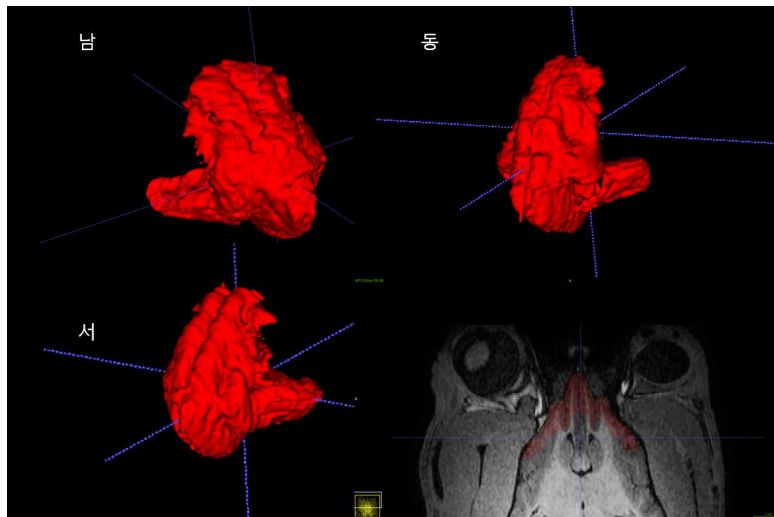


그림 87. 복제견 전두엽 부피측정의 예시

## (2) 연구결과

(가) 고해상도 7T MRI를 사용하여 brain MRI를 촬영

(나) 복제 탐지견의 뇌 MRI 영상 분석

(다) 고해상도 MRI로 탐지견의 뇌 영상 스캔

(라) 획득한 영상을 소프트웨어(itk-SNAP, PICSL, Upenn, Penn, USA)를 사용, 복제견의 대뇌 피질(하단 첫 번째 그림 참조)과 전두엽(하단 두 번째 그림 참조)의 부피 측정 및 시각화

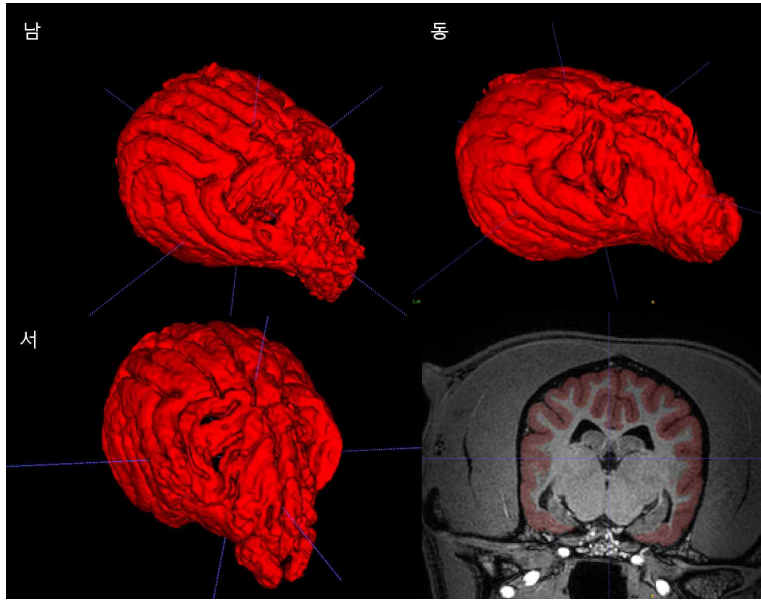


그림 88. 복제건 대뇌피질 부피측정의 예시

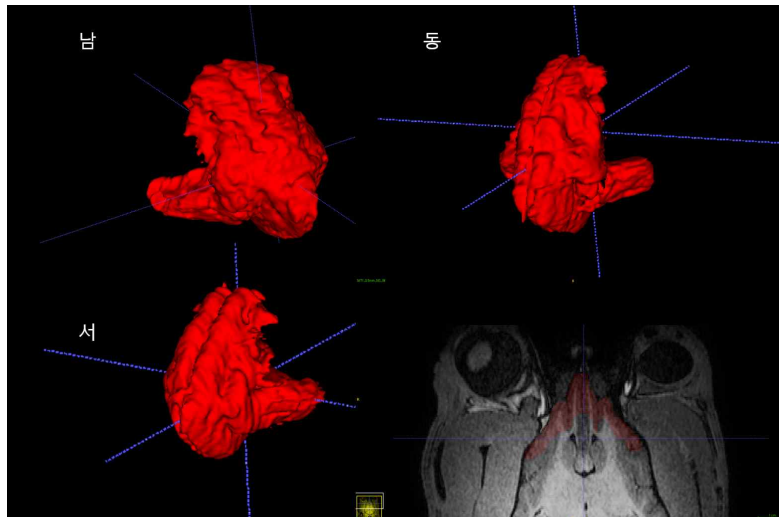


그림 89. 복제건 전두엽 부피측정의 예시

(마) 결과(하단 표 참조)

표 28. 복제견 대뇌 피질과 전두엽의 부피 측정값

	대뇌 피질의 부피(mm3)	전두엽의 부피(mm3)
동	38,480	7,174
서	39,140	7,083
남	41,010	7,907
평균	39,540	7,118

(바) 확립된 측정값 및 소프트웨어를 이용하여 차년도 스마트 복제견의 대뇌 피질 및 전두엽의 부피를 측정, 비교하기 위한 데이터 확보

## 7. 운동능 향상I (근육 특이 PCK1 발현) 복제견 생산

가. 근육 특이 PCK1 발현 복제견 생산 및 이송

### (1) 연구방법

- (가) 혈청 프로게스테론의 농도 변화로 난자 공여견의 배란일을 예측
- (나) 난자 공여견의 난관으로부터 성숙 난자를 회수 및 난구세포를 제거한 후, micropipet 을 이용하여 제 1 극체 및 성숙난자의 핵 제거
- (다) 1혈동에서 생산된 세포(근육 특이 PCK1 발현 세포)를 이용하여 탈핵된 난자에 주입
- (라) 공여세포가 주입된 난자의 전기자극에 의한 융합 및 난자의 활성화 유도
- (마) 발정동기화된 대리모의 난관내 이식후, 30일째 초음파를 이용한 임신 진단 실시
- (바) 수정란 이식후 60일째 임신한 대리모의 제왕절개를 통한 형질전환복제견의 생산

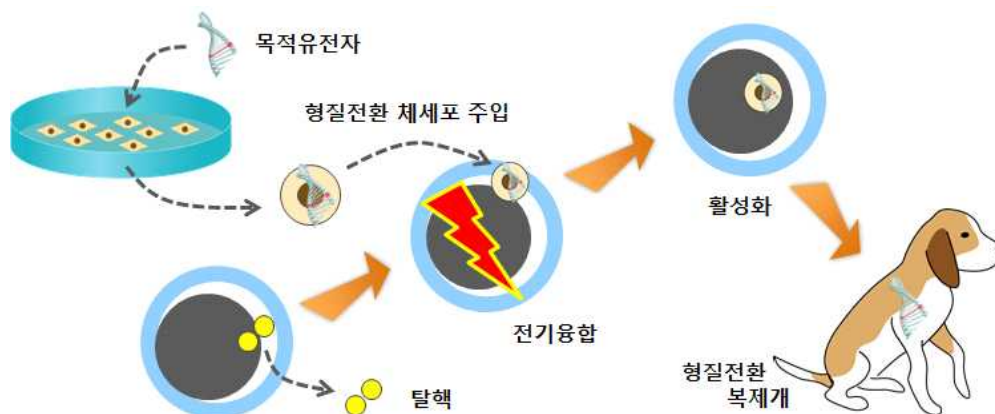


그림 90. 체세포 핵이식 기술을 이용한 근육 특이 PCK1 생산 과정



(2) 연구결과

(가) 우수 검역탐지건 “토” 와 “수성” 공여 세포를 이용한 근육 특이 PCK1 발현 복제건 생산

- ① 1협동에서 확립한 근육 특이 PCK1 발현 세포주를 이용하여 체세포 핵이식을 실시 후 대리모에 이식을 실시하였으나 모두 임신이 되지 않았음

표 29. “토” 섬유아세포를 이용한 근육 특이 PCK1 발현 형질전환복제건 생산 결과

대리모ID	공여세포 계대수	이식복제 수	진단결과
토F/PCK1-A	P-2	8	Failed
토F/PCK1-B	P-3	8	Failed
토F/PCK1-C	P-3	7	Failed

표 30. “토” 섬유아세포를 이용한 근육 특이 PCK1 발현 형질전환복제건 생산 결과

대리모ID	공여세포 계대수	이식복제 수	진단결과
토A/PCK1-A	P-5	8	Failed
토A/PCK1-B	P-5	7	Failed
토A/PCK1-C	P-6	15	Failed
토A/PCK1-D	P-6	8	Failed
토A/PCK1-E	P-5	16	Failed
토A/PCK1-F	P-6	20	Failed
토A/PCK1-G	P-7	13	Failed
토A/PCK1-H	P-6	11	Failed
토A/PCK1-I	P-6	11	Failed



표 31. “수정” 섬유아세포를 이용한 근육 특이 PCK1 발현 형질전환복제건 생산 결과

대리모ID	공여세포 계대수	이식복제 수	진단결과
수정F/PCK1-A	P-4,5	6	Failed
수정F/PCK1-B	P-3	21	Failed
수정F/PCK1-C	P-4	13	Failed
수정F/PCK1-D	P-4	13	Failed
수정F/PCK1-E	P-6	7	Failed
수정F/PCK1-F	P-5	4	Failed

(나) 형질전환백터의 가용성 확인을 위한 태아섬유아세포를 이용한 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 복제건 생산: 예비실험

- ① 예비실험으로써 태아 섬유아세포를 이용한 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 복제건 3주를 생산함. 본 실험을 통해 개에서 근육 특이 외래유전자 발현 형질전환복제건 생산 가능성을 확인

표 32. 태아섬유아세포를 이용한 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 형질전환복제건 생산 결과

대리모ID	공여세포 계대수	이식복제 수	진단결과
태아F/PPAR $\alpha$ -A	P-4,6	17	Failed
태아F/PPAR $\alpha$ -B	P-5	13	Failed
태아F/PPAR $\alpha$ -C	P-5	9	Pregnant (1 fetus)
태아F/PPAR $\alpha$ -D	P-5	12	Pregnant (1 fetus)
태아F/PPAR $\alpha$ -E	P-4,5	11	Failed
태아F/PPAR $\alpha$ -F	P-5	8	Pregnant (1 fetus)
태아F/PPAR $\alpha$ -G	P-6	17	Failed
태아F/PPAR $\alpha$ -H	P-3	11	Failed

(다) “앤드” 세포주를 이용한 근육 특이 PCK1 발현 복제건 생산

- ① 복제 검역탐지건 생산에 성공한 “앤드” 세포주를 이용하여 근육 특이 PCK1 발현 세포주를 확립한 뒤, 이 세포주를 사용하여 체세포핵이식 복제란을 생산 후 대리모에 이식함으로써 근육 특이 PCK1 발현 복제건을 생산
- ② 생산된 복제건은 6주령에 1차백신 접종 후 검역탐지건센터에 이송

표 33. “앤드” MSC를 이용한 근육 특이 PCK1 발현 복제건 생산 결과

대리모ID	공여세포 계대수	이식복제란 수	진단결과
AND MSC/PCK1-A	P-5	9	Success
AND MSC/PCK1-B	P-6	18	Success (Abortion)
AND MSC/PCK1-C	P-7	18	Failed
AND MSC/PCK1-D	P-7	18	Failed
AND MSC/PCK1-E	P-6	18	Failed
AND MSC/PCK1-F	P-6	10	Failed
AND MSC/PCK1-G	P-6	9	Failed
AND MSC/PCK1-H	P-6	11	Failed
AND MSC/PCK1-I	P-6	17	Failed

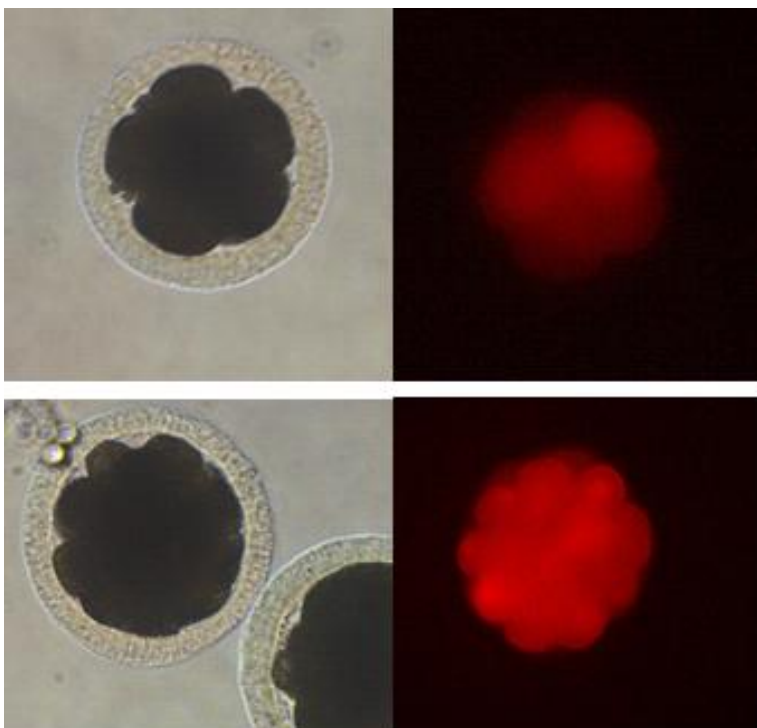


그림 91. 근육 특이 PCK1 발현 형질전환세포를 이용해 생산한 개 체세포핵이식 복제란에서 RFP의 발현 확인

## 8. 근육 특이 PCK1 발현 복제건 (자견과 성견시기)에서 생리학적 정상성 분석

가. 근육 특이 PCK1 발현 복제자건의 생리학적 정상성 분석을 위한 기초자료 확보

### (1) 연구방법

- (가) 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 복제건의 2주, 4주, 6주, 8주, 4개월령으로 시기를 세분하여 TPR, CBC, serum chemistry 등의 방법을 사용 하여 혈청화학 검사를 실시하여 근육 특이 PCK1 발현 복제건에 대한 기초자료를 확보
- (나) 형질전환복제건이 8주령, 6개월령에 도달하였을 때 경정맥에서 2ml의 혈액을 채취하여 일반 혈액 검사 (CBC, complete blood cell count)와 혈청 검사 (serum chemistry) 실시
- (다) 일반 혈액 검사를 통해 WBC, RBC, Hb, HCT, PLT 값을 분석
- (라) 혈청 검사를 통해 ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase), TBIL (total bilirubin), GGT (gamma-glutamyl transferase), Lipase, BUN, CREA (creatinine), Ca (calcium), IP (inorganic phosphorus), TC (total cholesterol), GLU (glucose), ALB (albumin), TP (total protein), TG (triglyceride) 값을 분석
- (마) 이 때, 최소 3두의 동일령 비형질전환복제건을 대조군으로 사용하여 두 그룹간 CBC 및 serum chemistry 검사 결과를 비교

### (2) 연구결과

- (가) 예비실험을 통해 생산한 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 개체에서 8주령, 6개월령에 CBC를 실시하였고, 동일령 대조군과 비교하였을 때 8주령 형질전환복제건에서 RBC, Hb, HCT가 높았으나 6개월령에는 두 그룹 간 유의차가 없었음.

표 34. 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 복제건의 8주령 CBC 결과

	대조군	복제건
WBC (/uL)	20283.3 $\pm$ 3849.4	10276.7 $\pm$ 971.6
RBC (104/uL)	459.3 $\pm$ 12.3a	552.7 $\pm$ 18.4b
Hb (g/dl)	10.9 $\pm$ 0.3a	12.7 $\pm$ 0.6b
HCT (%)	33.4 $\pm$ 1.0a	38.7 $\pm$ 2.1b
PLT (104/uL)	38.6 $\pm$ 0.8	45.8 $\pm$ 1.8

<sup>ab</sup>는 통계적인 유의차를 나타냄 (P < 0.05).

표 35. 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 복제건의 6개월령 CBC 결과

	대조군	복제건
WBC (/uL)	11400.0 $\pm$ 220.6	10853.3 $\pm$ 661.4
RBC (104/uL)	671.5 $\pm$ 25.3	761.0 $\pm$ 52.6
Hb (g/dl)	14.7 $\pm$ 0.4	16.9 $\pm$ 1.2
HCT (%)	43.7 $\pm$ 1.2	49.4 $\pm$ 3.6
PLT (104/uL)	37.5 $\pm$ 5.4	24.7 $\pm$ 6.6

(나) 예비실험을 통해 생산한 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 개체에서 8주령, 6개월령에 CBC를 실시하였고, 동일령 대조군과 비교하였을 때 8주령 형질전환복제건에서 BUN, Ca, Triglyceride가 높았으나 Total cholesterol은 유의적으로 낮았음. 6개월령 형질전환복제건은 대조군 대비 ALP가 유의적으로 낮은 값을 나타냈으며, 나머지 검사 항목에서는 모두 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았음.

표 36. 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 복제건의 8주령 혈청화학분석 결과

	대조군	복제건
ALT (U/L)	22.3 $\pm$ 2.7	25.8 $\pm$ 0.7
AST (U/L)	31.7 $\pm$ 0.9	26.0 $\pm$ 2.0
ALP (U/L)	161.3 $\pm$ 4.3	176.7 $\pm$ 13.8
TBIL (mg/dl)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
GGT (U/L)	6.0 $\pm$ 1.7	1.5 $\pm$ 0.3
Lipase (U/L)	109.0 $\pm$ 47.2	136.5 $\pm$ 63.0
BUN (mg/dL)	18.5 $\pm$ 0.8a	7.2 $\pm$ 0.3b
CREA (mg/dL)	0.6 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0
Ca (mg/dL)	13.3 $\pm$ 0.2a	12.4 $\pm$ 0.2b
IP (mg/dL)	9.5 $\pm$ 0.3	8.4 $\pm$ 0.3
TC (mg/dL)	218.8 $\pm$ 5.2a	266.7 $\pm$ 6.2b
GLU (mg/dL)	138.2 $\pm$ 2.2	135.3 $\pm$ 10.3
ALB (g/dL)	3.0 $\pm$ 0.0	3.1 $\pm$ 0.1
TP (g/dL)	5.2 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.1
TG (mg/dL)	112.7 $\pm$ 7.2a	47.7 $\pm$ 2.8b

<sup>a,b</sup>는 통계적인 유의차를 나타냄 (P < 0.05).

표 37. 근육 특이 PPAR $\alpha$  발현 복제건의 6개월령 혈청화학분석 결과

	대조군	복제건
ALT (U/L)	36.0 $\pm$ 12.3	30.7 $\pm$ 1.5
AST (U/L)	40.5 $\pm$ 6.0	35.0 $\pm$ 4.2
ALP (U/L)	123.8 $\pm$ 3.5a	161.3 $\pm$ 5.8b
TBIL (mg/dl)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
GGT (U/L)	-1.3 $\pm$ 4.8	0.0 $\pm$ 4.4
Lipase (U/L)	279.0 $\pm$ 15.4	276.0 $\pm$ 25.1
BUN (mg/dL)	18.1 $\pm$ 3.7	17.9 $\pm$ 1.3
CREA (mg/dL)	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Ca (mg/dL)	12.0 $\pm$ 0.1	12.4 $\pm$ 0.3
IP (mg/dL)	6.8 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.3
TC (mg/dL)	203.8 $\pm$ 16.4	216.0 $\pm$ 9.1
GLU (mg/dL)	118.5 $\pm$ 2.3	106.0 $\pm$ 2.3
ALB (g/dL)	3.6 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.1
TP (g/dL)	6.3 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.2
TG (mg/dL)	49.5 $\pm$ 6.2	58.0 $\pm$ 15.3

(다) 예비실험을 통해 개에서 근육 특이 프로모터를 사용하였을 때 8주령 (2개월령)에서는 생리학적 변화가 대조군과 다른 차이를 나타내었던 반면, 6개월령에서는 대조군과 유사한 값을 나타낼 정도로 적응한 것을 확인

(라) 현재 근육 특이 PCK 발현 체세포핵이식 복제란은 추가 이식을 실시하여 형질전환복제건을 생산할 예정이며, 예비실험을 통해 확립한 검사방법을 이용하여 보다 세분화된 시기 (1개월령, 2개월령, 4개월령, 6개월령)에 혈청화학적 특성을 분석할 예정

#### 나. 근육 특이 PCK1 발현 복제자건에서 생리학적 정상성 분석

##### (1) 연구방법

(가) 근육 특이 PCK1 발현 복제건과 대조군 (외래유전자가 삽입되지 않았으며 유전적 back-ground가 동일한 공여세포를 사용해서 생산된 동일령의 복제건)에서 혈액검사를 함으로써 side-effect 존재 및 생리학적 특성의 추이를 파악하여 기초자료를 확보

(나) 1, 2, 4, 6개월령에 일반 혈액 검사 (complete blood cell count) 및 혈청화학 분석

(ALT, AST, ALP, GGT, Total bilirubin, lipase, BUN, creatinine, calcium, phosphate, total cholesterol, glucose, albumin, total protein, triglyceride) 실시. 이후, 9, 12개월령에 혈청화학 분석 실시

(2) 연구결과

(가) 대조군과 근육 특이 PCK1 발현 복제건에서 1, 2, 4, 6개월령일 때 일반 혈액 검사 및 혈청화학 분석을 실시하였고, 이후 9, 12개월령에 혈청화학 분석을 추가로 실시

표 38. 1개월령 근육 특이 PCK1 발현 복제건과 대조군(control)에서의 혈액분석 결과

	Control	PCK1
ALT (U/L)	18	30
AST (U/L)	17	24
ALP (U/L)	188	179
Lipase (U/L)	26	436
TG (mg/dL)	55	50
GLU (mg/dL)	150	136
BUN (mg/dL)	6.5	7.7
CREA (mg/dL)	0.35	0.42
TC (mg/dL)	205	176
ALB (g/dL)	3.01	2.73
TP (g/dL)	4.89	4.5
WBC (/uL)	12970	13510
RBC (104/uL)	436	429
Hb (g/dl)	10.5	10.8
HCT (%)	34.3	35.4
PLT (104/uL)	18.7	32.3

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobins; HCT, hematocrit; PLT, platelet

표 39. 2개월령 근육 특이 PCK1 발현 복제건과 대조군(control)에서의 혈액분석 결과

	Control	PCK1
ALT (U/L)	24.2 ± 2.0	25
AST (U/L)	30.8 ± 1.1	19
ALP (U/L)	171.2 ± 2.8	175
Lipase (U/L)	116.4 ± 52.5	712
TG (mg/dL)	4.0 ± 1.5	116
GLU (mg/dL)	138.6 ± 4.8	130
BUN (mg/dL)	13.7 ± 3.0	8.4
CREA (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.41
TC (mg/dL)	223.6 ± 8.8	281
ALB (g/dL)	3.1 ± 0.0	3.26
TP (g/dL)	5.2 ± 0.1	5.2
WBC (/uL)	18695 ± 3985	13490
RBC (104/uL)	460.5 ± 8.5	517
Hb (g/dl)	10.6 ± 0.2	12.4
HCT (%)	33.5 ± 0.2	38.7
PLT (104/uL)	37.1 ± 2.3	42.9

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobins; HCT, hematocrit; PLT, platelet



표 40. 4개월령 근육 특이 PCK1 발현 복제건과 대조군(control)에서의 혈액분석 결과

	Control	PCK1
ALT (U/L)	33.3 ± 1.7	35
AST (U/L)	32.3 ± 1.6	47
ALP (U/L)	165.2 ± 7.2	190
Lipase (U/L)	124.3 ± 105.3	23
TG (mg/dL)	60.2 ± 8.6	69
GLU (mg/dL)	133.0 ± 2.4	137
BUN (mg/dL)	10.0 ± 1.1	11.2
CREA (mg/dL)	0.5 ± 0.0	1.52
TC (mg/dL)	254.3 ± 8.9	242
ALB (g/dL)	3.5 ± 0.1	3.49
TP (g/dL)	5.9 ± 0.2	5.7
WBC (/uL)	11410	14170
RBC (104/uL)	584	534
Hb (g/dl)	13.3	12.5
HCT (%)	39.5	36
PLT (104/uL)	42	48.9

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobins; HCT, hematocrit; PLT, platelet

표 41. 6개월령 근육 특이 PCK1 발현 복제건과 대조군(control)에서의 혈액분석 결과

	Control	PCK1
ALT (U/L)	31.0 ± 0.0	32
AST (U/L)	26.5 ± 1.5	25
ALP (U/L)	110.5 ± 2.5	156
Lipase (U/L)	244 ± 228	13
TG (mg/dL)	64.5 ± 27.5	122
GLU (mg/dL)	119.5 ± 12.5	123
BUN (mg/dL)	9.7 ± 0.9	8.5
CREA (mg/dL)	0.7 ± 0.0	0.6
TC (mg/dL)	270.5 ± 19.5	270
ALB (g/dL)	3.9 ± 0.4	3.8
TP (g/dL)	6.6 ± 0.6	6.8
WBC (/uL)	10350 ± 900	12010
RBC (104/uL)	657.5 ± 32.5	618
Hb (g/dl)	15.2 ± 0.8	14
HCT (%)	43.9 ± 2.2	41
PLT (104/uL)	32.1 ± 1.7	34.9

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobins; HCT, hematocrit; PLT, platelet

표 42. 9개월령 근육 특이 PCK1 발현 복제건과 대조군(control)에서의 혈액분석 결과

	Control	PCK1
ALT (U/L)	34.0 ± 5.1	52
AST (U/L)	26.7 ± 2.3	47
ALP (U/L)	95.7 ± 2.4	86
Lipase (U/L)	25.0 ± 8.6	258
TG (mg/dL)	90.0 ± 9.5	59
GLU (mg/dL)	96.0 ± 2.5	109
BUN (mg/dL)	13.5 ± 0.4	9
CREA (mg/dL)	0.8 ± 0.0	0.8
TC (mg/dL)	271.0 ± 8.7	234
ALB (g/dL)	4.2 ± 0.1	4.8
TP (g/dL)	7.2 ± 0.2	8.2

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride

표 43. 12개월령 근육 특이 PCK1 발현 복제건과 대조군(control)에서의 혈액분석 결과

	Control	PCK1
ALT (U/L)	32.0 ± 4.0	73
AST (U/L)	27.5 ± 2.5	43
ALP (U/L)	63.0 ± 1.0	106
TG (mg/dL)	34.0 ± 0.0	7.0
GLU (mg/dL)	69.0 ± 4.0	74
BUN (mg/dL)	11.1 ± 0.6	14.7
CREA (mg/dL)	0.8 ± 0.0	0.8
ALB (g/dL)	3.9 ± 0.2	4.0
TP (g/dL)	6.7 ± 0.3	7.0

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride

## 9. 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 번식학적 정상성 분석

가. 1년령의 대조군에서 computer assisted sperm analyzer(CASA)를 이용하여 번식학적 정상성분석을 통한 기초자료 확보

### (1) 연구방법

- (가) 1살령의 일반 복제 검역견과 근육 특이 PCK1 발현 복제견에서 수지마찰요법으로 채취한 정액 샘플을 15ml 튜브에 옮긴 후 37도를 유지
- (나) 채취한 정액 샘플은 바로 Makler's chamber에 10ul를 올리기
- (다) 37도 온도를 유지시키면서, 100배 암시야 현미경 하에서 초점 맞춘 뒤, CASA software로 정자의 운동성 분석
- (라) 정확한 정자의 농도를 측정하기 위하여 Makler's chamber로 정자 수 측정

### (2) 연구결과

- (가) 동일 연령의 대조군의 생식세포 검사
  - ① 약 1년령의 대조군에서 computer assisted sperm analyzer (CASA)를 이용하여 번식학적 정상성을 1회 분석하였고, 근육 특이 PCK1 발현 복제견에서도 1년령이 되는 시점에 분석
  - ② 대조군에서 Progressive motility의 값이 낮게 측정되어 추가적으로 정액을 채취하고자 하였으나 1두에서 고환염이 관찰되어 고환염 치료 후에 번식학적 정상성 재분석 필요

표 44. CASA를 이용한 대조군에서 정자세포의 운동성 분석 결과

Parameter	Control
Conc ( $10^6/ml$ )	115.0 $\pm$ 15.0
Motility (%)	72.5 $\pm$ 1.1
Progressive motility (%)	14.2 $\pm$ 0.0
Linearity (%)	27.1 $\pm$ 0.4
Straightness (%)	46.0 $\pm$ 0.2
VCL ( $\mu m/s$ )	85.3 $\pm$ 0.8
VSL ( $\mu m/s$ )	17.7 $\pm$ 4.1
VAP ( $\mu m/s$ )	43.0 $\pm$ 0.3
ALH (%)	4.6 $\pm$ 0.2

VCL, curvilinear velocity; VSL, straight- line velocity; VAP, average path velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement

(나) 1살의 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 생식세포 검사

- ① 근육 특이 PCK1 발현 복제건에 1년령일 때 대조군에서와 마찬가지로 방법으로 번식학적 검사를 실시하였으나, 사정에 실패하여 6개월 뒤 정상성 재분석 필요

## 10. 근육 특이 PCK1 발현 성견의 영상학적 정상성 평가

가. X-ray를 이용한 해부학적 정상성 평가

### (1) 연구방법

- (가) 복제탐지건을 대조군(일반 복제탐지건)과 운동능 향상 복제탐지건(PCK1, PPAR $\delta$ ) 두 군으로 나누어 6개월령이 되었을 때에 진행
- (나) 방사선 촬영 장치(TITAN 2000, COMED MEDICAL SYSTEMS, Korea)를 이용하여 방사선 촬영 검사를 진행
- (다) 흉부와 복부의 복배, 우측횡와 자세로 촬영
- (라) Radiant DICOM Viewer(version 4.0.3.16415, Medixant) 소프트웨어를 사용하여 촬영 데이터 평가 및 측정
- (마) 골격계의 정상적인 성장 여부 평가를 위해 Growth and hematologic characteristics of cloned dogs derived from adult somatic cell nuclear transfer(Park JE et al., 2010)를 참고하여 두개골, 요추, 골반뼈를 측정

### (2) 연구결과

- (가) 흉복부 및 두개골, 요추, 골반의 방사선 촬영 결과 해, 달, 우주에게서 이상소견 관찰되지 않음(하단 첫 번째, 두 번째, 세 번째 네 번째, 다섯 번째 그림 참조)



그림 92. 흉부 방사선 촬영 검사



그림 93. 복부 방사선 촬영 검사



그림 94. 두개골 방사선 촬영 검사

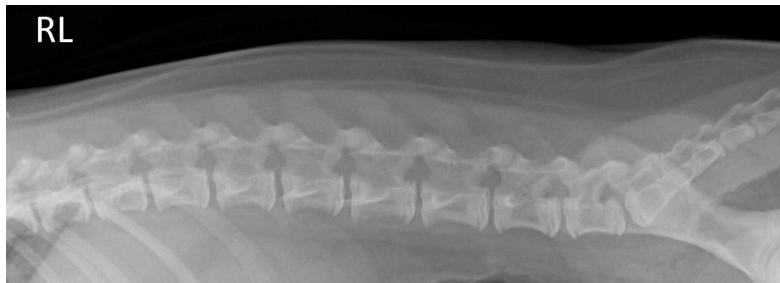


그림 95. 요추 방사선 촬영 검사

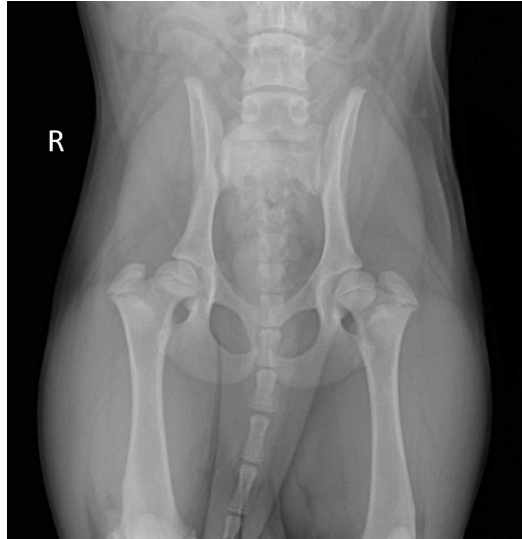


그림 96. 골반 방사선 촬영 검사

(나) Growth and hematologic characteristics of cloned dogs derived from adult somatic cell nuclear transfer(Park JE et al., 2010) 논문을 참고하여 두개골, 요추, 골반의 측정결과 해, 달, 우주 모두 정상 결과값으로 판단(하단 표 참조)

(다) PCK1 발현 복제견(우주)과 일반 복제견(동, 서, 남, 해, 달) 사이의 측정값에는 차이가 없는 것으로 판단되나, 실험군의 수가 부족하여 통계적 분석 불가

#### 나. 초음파를 이용한 해부학적 정상성 평가

##### (1) 연구방법

##### (가) 복부초음파 검사

- ① 복강전반의 해부학적 정상성을 평가하며, 그 외 장기 별 특이사항은 아래와 같이 평가함
- ② 간담도계 및 췌장
  - ✓ 담낭의 경우, 벽 부종 및 담관 확장 여부 확인
  - ✓ 간의 경우, 실질 에코 이상여부 및 간비대증, 소간증 여부 확인
  - ✓ 췌장의 경우, 실질의 에코 및 크기 확인
- ③ 비뇨기계 및 부신
  - ✓ 신장의 경우, 양측 신장의 크기 및 피질, 수질의 에코 확인
  - ✓ 요관의 경우, 확장여부를 확인
  - ✓ 부신의 경우, 크기를 확인
- ④ 생식기계
  - ✓ 고환의 경우, 양측 고환의 존재 및 하강 여부 확인
- ⑤ 소화기계



✓ 소화기계의 경우, 위, 십이지장, 소장, 결장, 직장의 염증성 변화 여부 확인

⑥ 면역장기

✓ 비장의 경우, 실질의 에코 이상 및 비장비대 여부 확인

✓ 림프절의 경우, 예상되는 해부학적 위치에서의 존재 여부 확인 및 실질과 크기 이상 여부 확인

(나) 심장초음파 검사

① 복제탐지건을 대조군(일반 복제탐지건)과 운동능 향상 복제탐지건(PCK1, PPAR $\delta$ ) 두 군으로 나누어 6개월령이 되었을 때에 진행

② 초음파(Prosound 75 $\text{\textcircled{R}}$ ; Hitachi-Aloca Medical, Ltd., Tokyo, Japan) 검사 장치를 이용하여 심장의 정상성을 평가

③ 자세 : Right/left lateral recumbency

④ Right parasternal long axis 5 chamber view에서 M-mode를 통해 Teichholz 측정

⑤ Right parasternal short axis view에서 대동맥과 좌심방의 직경 비율을 측정

⑥ Right parasternal short axis view에서 폐동맥 유출로에 도플러 검사를 수행, RVOT flow를 측정

⑦ Left apical 4 chamber view에서 mitral valve level에서 도플러 검사를 수행하여 mitral flow를 측정

⑧ Left apical 4 chamber view에서 mitral annulus 부위에 도플러 검사를 통해 TDI를 측정

(2) 연구결과

(가) 복부 초음파 검사

① Dorsal recumbency 자세에서 간담도계, 비장, 비뇨생식기계 등 주요 장기의 초음파 검사를 실시

② 달의 우측 잠복고환 소견(하단 첫 번째 그림 참조) 외에 해, 달, 우주의 다른 주요장기의 초음파 검사상의 이상소견은 관찰되지 않음(하단 두 번째, 세 번째 그림 참조)

③ 잠복고환의 경우 발생 부위의 차이(양측 혹은 편측(좌/우))가 있더라도 유전적인 영향이 있을 수 있음(공여세포견)

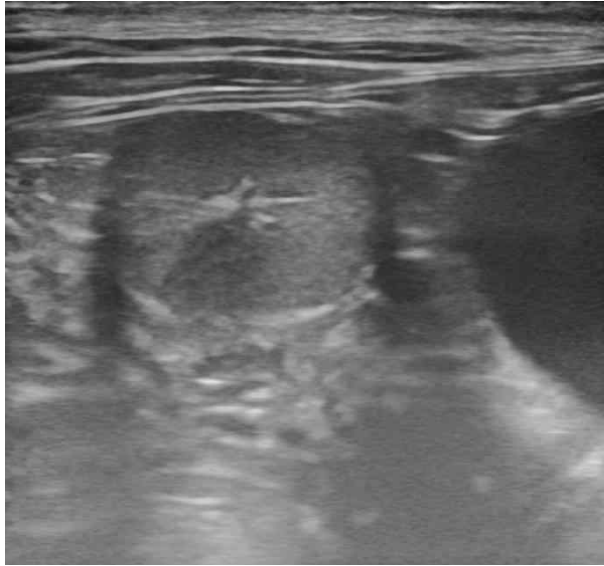


그림 97. 달의 우측 잠복고환 초음파 검사 영상

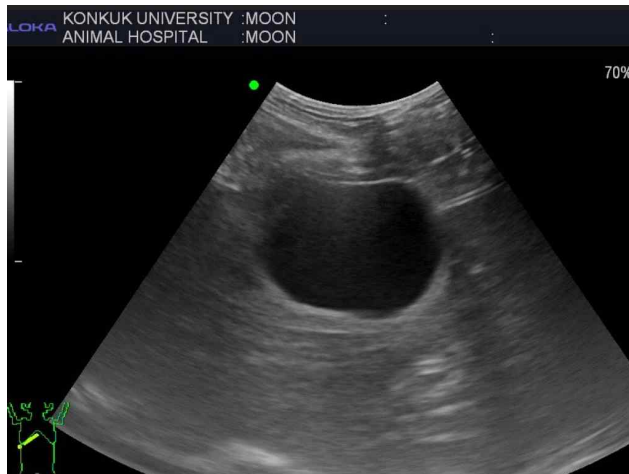


그림 98. 복제건의 간담도계 초음파 검사 영상



그림 99. 복제견의 신장 초음파 검사

(나) 심장초음파 검사

- ① Right parasternal long axis 5 chamber view의 M-mode에서 Teichholz 측정 결과 해, 달, 우주의 모든 결과값이 정상범위 안에 있는 것으로 판단(하단 표 참조)
- ② PCK1 발현 복제견(우주)와 일반 복제견 사이의 심장기능비교 결과 차이가 없는 것으로 판단되나, 실험군의 부족으로 통계적 분석이 불가

표 45. Teichholz 측정 결과값

Teichholz	해	달	우주
IVSd(mm)	10	7	8
LVIDd(mm)	27	26	26
LVPWd(mm)	10	8	11
IVSs(mm)	13	10	13
LVIDs(mm)	17	15	14
LVPWs(mm)	13	14	12
EDV(ml)	26	24	26
ESV(ml)	8	6.2	4.7
EF(%)	75.6	79.6	81.6
FS(%)	37.6	41.2	48.4

- ③ Right parasternal short axis view에서 LA/AO ratio 측정 결과 해, 달, 우주의 모든 결과값이 정상범위 안에 있는 것으로 판단(하단 표 참조)

표 46. LA/AO ratio 측정 결과값

	해	달	우주
LA/AO	1.13	1.01	1.02

- ④ Right parasternal short axis view에서 RVOT flow 측정 결과 해, 달, 우주의 모든 결과값이 정상범위 안에 있는 것으로 판단(하단 표 참조)

표 47. RVOT flow 측정 결과값

	해	달	우주
pV	96.1	147.6	108.2
AT/ET	0.41	0.39	0.46

- ⑤ Left apical 4 chamber view에서 mitral flow, TDI 측정 결과 해, 달, 우주의 모든 결과값이 정상범위 안에 있는 것으로 판단(하단 표 참조)

표 48. Mitral flow 및 TDI 측정 결과값

	해	달	우주
Mitral flow			
E/A	1.61	1.83	1.67
TDI			
E/E'	8.92	11.87	8.89

- ⑥ 심장의 2D 평가상 선천성 심질환 및 구조적 이상소견은 해, 달, 우주 모두 관찰되지 않음.
- ⑦ Color Doppler 검사 상 심장혈류의 역류현상은 해, 달, 우주 모두 관찰되지 않음.
- ⑧ 심장의 수축기/이완기 기능 검사 상 해, 달, 우주 모두 이상소견 관찰되지 않음.
- ⑨ **결과: 해, 달, 우주의 심장은 모두 정상인 것으로 판단**

#### 다. CT를 이용한 해부학적 정상성 평가

##### (1) 연구방법

- (가) 복제탐지견을 대조군(일반 복제탐지견)과 운동능 향상 복제탐지견(PCK1, PPARδ) 두 군으로 나누어 12개월령이 되었을 때에 진행
- (나) 마취유도를 위해 부토판주(Butophan Injection 1mg/ml, Butorphanol tartrate, 명문제약)과 프로바이브주(Provive Inj. 1%, Propofol, 명문제약)을 각각 0.02mg/kg IM,

0.6ml/kg IV로 처치하고 이후 아이프란액(Ifran Liq., Isoflurane, 하나제약)으로 호흡마취 유지

(다) 자세 : sternal recumbency

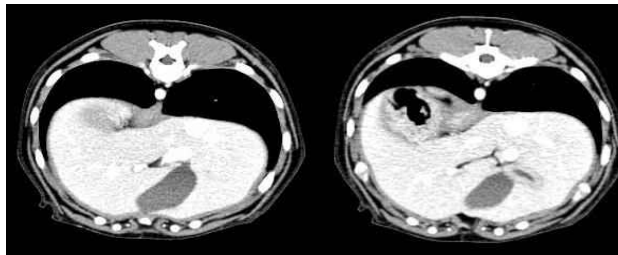
(라) 조영제 주입 전·후를 나누어 촬영

(마) CT 촬영을 통해 얻은 영상을 통하여 해부학적 정상성을 평가

(2) 연구결과

(가) 해부학적 정상성을 평가하기 위해 CT 촬영을 진행함

(나) 검사 결과 해, 달, 우주에서 간담조계가 정상인 것으로 판단(하단 그림 참조)



(다) 달의 CT 촬영 결과 초음파 검사상의 소견과 동일하게 우측 잠복고환 존재 확인(하단 그림 참조)

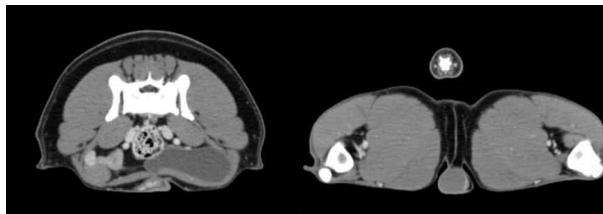




그림 102. 북의 CT 촬영 영상에서 후두골 및 경추의 기형을 VR하여 가시화한 모습



그림 103. 헤의 CT 촬영 영상에서 후두골 및 경추의 정상성을 VR하여 가시화한 모습



그림 104. 달의 CT 촬영 영상에서 후두골 및 경추의 정상성을 VR하여 가시화한 모습

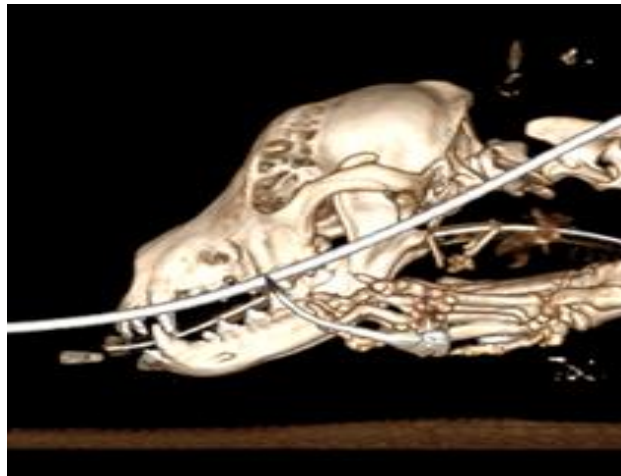


그림 105. 우주의 CT 촬영 영상에서 후두골 및 경추의 정상성을 VR하여 가시화한 모습

## 11. 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 운동능 · 집중력 평가

### 가. 일반 복제건 / 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 근육량 분석

#### (1) 연구방법

(가) 복제탐지건을 대조군(일반 복제탐지건)과 근육 특이 PCK1 발현 복제건 두 군으로 나누어 12개월령이 되었을 때에 진행

(나) 마취유도를 위해 부토판주(Butophan Injection 1mg/ml, Butorphanol tartrate, 명문제약)과 프로바이브주(Provive Inj. 1%, Propofol, 명문제약)을 각각 0.02mg/kg IM, 0.6ml/kg IV로 처치하였고 이후 아이프란액(Ifran Liq., Isoflurane, 하나제약)으로 호흡

마취 유지

(다) CT촬영 실시 후 Transverse image로 재구성

(라) OsiriX(OsiriX lite ver9.0, Pixmeo SARL, Switzerland) 소프트웨어를 활용하여 근육량 결과 값 산출 및 volume rendering 수행

(2) 연구결과

(가) 복제건의 후지를 CT 촬영을 실시한 후 얻어진 이미지를 MIMICS Materialise 소프트웨어를 활용하여 근육량을 계산

(나) 이전 소프트웨어(OsiriX)와 달리, MIMICS Materialise 에서는 대퇴부의 피부, 지방, 뼈를 제외한 순수한 근육의 부피만을 구할 수 있음

**(다) 분석결과 일반 복제건 (해, 달), PCK1 발현 복제건 (우주)의 근육량이 이전 2차년도 생산 일반 복제건 (동, 서, 남)보다 감소한 것으로 나타나나, 이는 지방, 피부, 뼈의 부피가 제외되었기 때문으로 판단**

(라) MIMICS Materialise 소프트웨어를 사용하여 동, 서, 남의 근육량 재평가 필요

표 49. 복제건의 근육량

	우측 근육량(cm <sup>3</sup> )	좌측 근육량(cm <sup>3</sup> )
동	555.0695	566.7477
서	553.9777	563.3815
남	558.2850	558.8555
해	498.2843	517.6340
달	492.3681	483.9954
우주	446.4083	479.6004

(마) 복제건의 대퇴골 중간지점 직경 평균값(하단 표 참조)



표 50. 복제건의 대퇴골 중간지점 직경 평균값

Femur Diameter (cm)		
해	Rt	1.70
	Lt	1.63
달	Rt	1.74
	Lt	1.82
우주	Rt	1.59
	Lt	1.44

(바) 근육량/대퇴골 직경의 비율 결과값(하단 표 참조)

표 51. 복제건의 근육량/대퇴골 직경의 비율 결과값

	우측	좌측
해	293.10	317.56
달	282.97	265.93
우주	280.75	333.05

(사) 두 소프트웨어(OsiriX, MIMICS Materialise) volume rendering 결과 비교(하단 그림 참조)

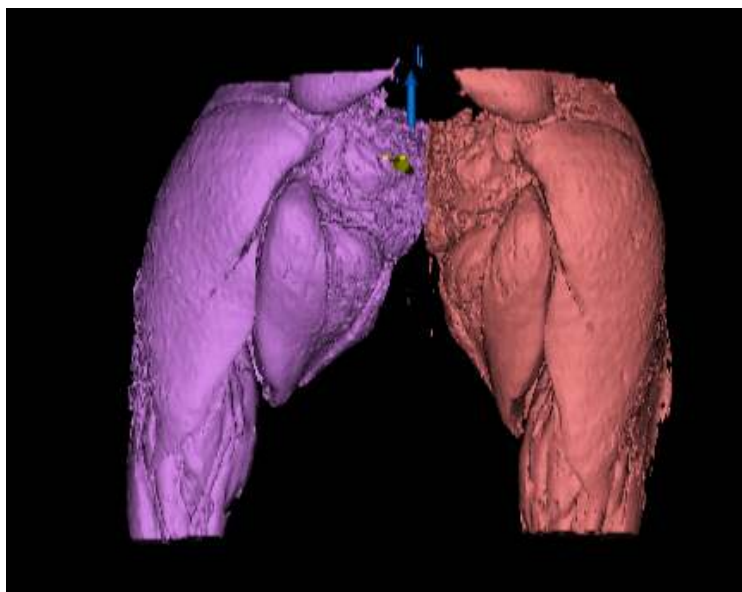


그림 106. MIMICS Materialise를 이용한 근육량 평가

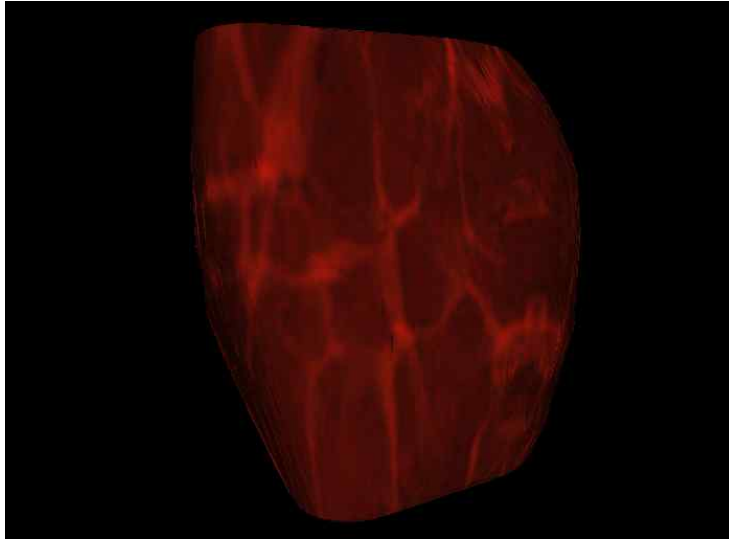


그림 107. OsiriX를 이용한 근육량 평가

(아) 근육량의 절대값은 우주가 해, 달보다 적은 것으로 나타나나, 대퇴골 직경과의 비율은 큰 차이 없거나 더 높은 것을 보여주며 이후 추가적인 실험을 통해 통계적 유의성 평가 필요

나. 일반 복제견 / 근육 특이 PCK1 발현 복제견의 근육성장 분석

(1) 연구방법

- (가) 복제탐지견을 대조군(일반 복제탐지견)과 근육 특이 PCK1 발현 복제견을 12개월령이 되었을 때에 진행
- (나) 마취유도를 위해 부토판주(Butophan Injection 1mg/ml, Butorphanol tartrate, 명문제약)과 프로바이브주(Provive Inj. 1%, Propofol, 명문제약)을 각각 0.02mg/kg IM, 0.6ml/kg IV로 처치하고 이후 아이프란액(Ifran Liq., Isoflurane, 하나제약)으로 호흡마취 유지
- (다) 무릎용 coil에 스마트 복제견을 positioning 시키고 large voxel size (20mm x 20mm)로 뒷다리의 모음근(Adductor m.)에 ROI 그림
- (라) Short TE(37ms)로 MRS 촬영

(2) 연구결과

- (가) 복제 탐지견 대퇴근육의 MRS 촬영을 진행
- (나) 획득한 영상은 TARQUIN(version 4.3.10, Birmingham, UK) 소프트웨어를 사용하여 분석, MRS criteria에 따라 평가
- (다) 복제 탐지견의 모음근(Adductor muscle)의 근육 성장 스펙트럼의 결과(하단 표 및 첫

번째, 두 번째, 세 번째 그림 참조)

표 52. 복제견 동, 서, 남 모음근의 MRS 촬영 결과

	동	서	남
Ala:Cr	0.590654	2.440945	2.852113
Asp:Cr	3.439252	2.952756	1.725352
Cr:Cr	1	1	1
GABA:Cr	0	0	0
GPC:Cr	0.842991	0.850394	0.739437
Glc:Cr	0.623364	0.373228	0.493662
Gln:Cr	0.86729	0.714173	0.264085
Glth:Cr	0.324299	0.338583	0.371127
Glu:Cr	0.373832	0.565354	0.760563
Ins:Cr	0	0	0
Lac:Cr	0.7486	1.16535	1.76056
Lip09:Cr	2.570093	2.094488	1.598592
Lip20:Cr	1.33645	1.33858	1.46479
MM09:Cr	0	0	0
MM17:Cr	0	0	0
MM20:Cr	0.134579	0.262992	0.66831
NAA:Cr	0.069252	0	0
NAAG:Cr	0.091402	0.024961	0
PCh:Cr	0.12523	0	0.06169
PCr:Cr	1.130841	0.765354	0.838028
Scyllo:Cr	0.041402	0	0
Tau:Cr	1.719626	1.291339	0.978873
TNAA:Cr	0.160748	0.024961	0
TCho:Cr	0.971963	0.850394	0.802817
TCr:Cr	2.130841	1.771654	1.84507
Glx:Cr	1.242991	1.275591	1.021127
TLM09:Cr	2.570093	2.094488	1.598592
TLM13:Cr	23.5514	18.97638	18.87324
TLM20:Cr	1.476636	1.598425	2.133803

표 53. 복제건 해, 달, 우주 모음근의 MRS 촬영 결과

	해	달	우주
Ala:Cr	2.53463	1.61	2.28
Asp:Cr	0.765811	1.61	1.87
Cr:Cr	1	1	1
GABA:Cr	0	0	0
GPC:Cr	0.583113	0.63	0.24
Glc:Cr	0.551045	0.872	0.264
Gln:Cr	1.000515	0.84	0.141
Glth:Cr	0.251672	0	0.356
Glu:Cr	3.064577	0.731	0.369
Ins:Cr	0	0	0
Lac:Cr	0.93318	0	2.3
Lip13b:Cr	17.74347	22.3	13.4
Lip20:Cr	2.58341	2.65	2.72
MM09:Cr	0	0	0
MM17:Cr	0	0	0
MM20:Cr	8.132649	0.43	0.929
NAA:Cr	0	0	0
NAAG:Cr	0	0.0654	0
PCh:Cr	0	0.128	0.273
PCr:Cr	1.075382	0.762	0.404
Scyllo:Cr	0	0.0282	0.00477
Tau:Cr	1.047401	0.641	0.458
TNAA:Cr	0	0.0654	0
TCho:Cr	0.583113	0.757	0.513
TCr:Cr	2.075382	1.76	1.4
Glx:Cr	4.065093	1.57	0.51
TLM09:Cr	3.953779	3.01	2.44
TLM13:Cr	17.74347	33.1	30.5
TLM20:Cr	10.71606	3.08	3.65

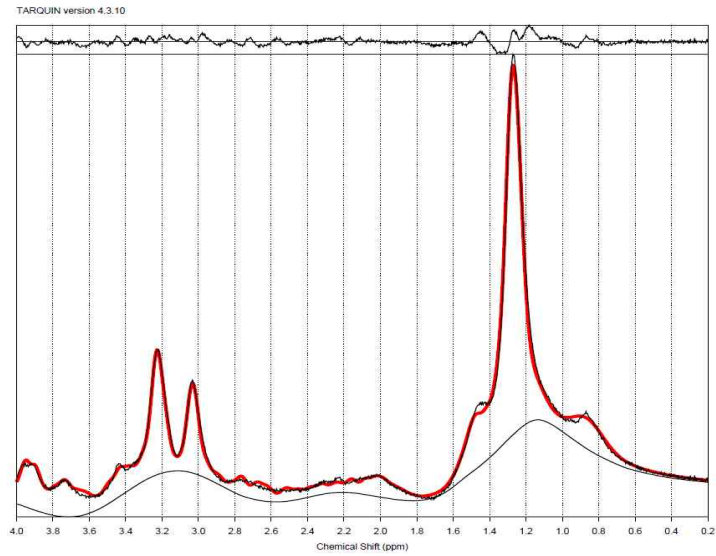


그림 108. 복제견 동의 MRS 촬영 결과 스펙트럼

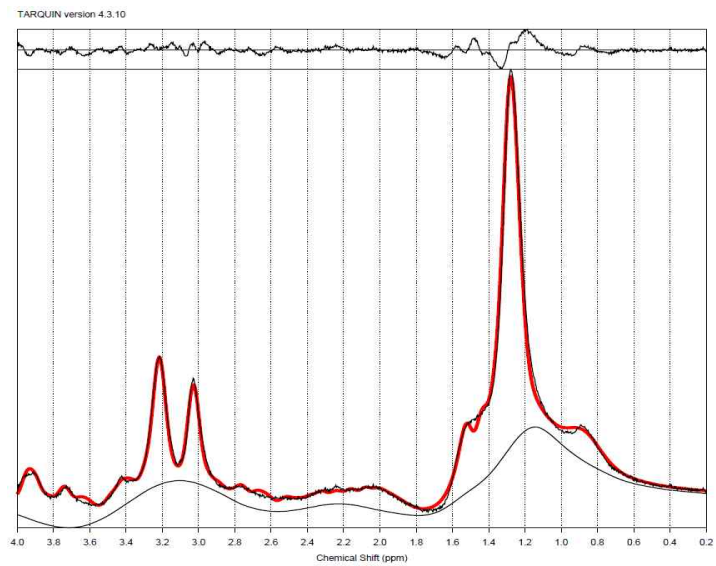


그림 109. 복제견 서의 MRS 촬영 결과 스펙트럼

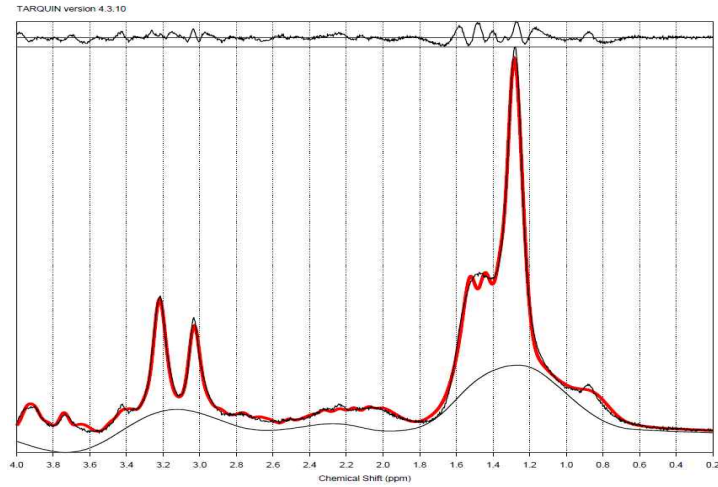


그림 110. 복제견 남의 MRS 촬영 결과 스펙트럼

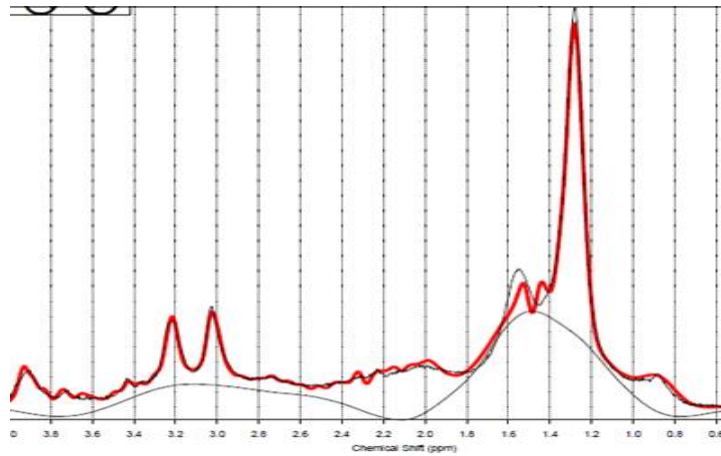


그림 111. 복제견 해의 MRS 촬영 결과 스펙트럼

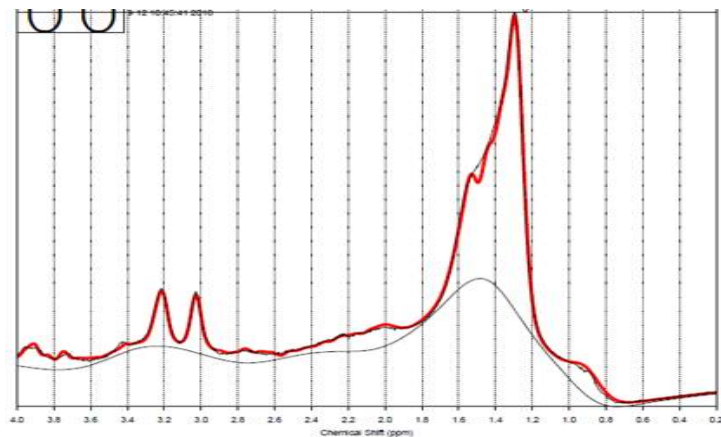


그림 112. 복제견 우주의 MRS 촬영 결과 스펙트럼

(라) (동/서/남)군과 (해/달)군의 스펙트럼을 비교했을시, Lipid13b 물질을 제외하고는 비슷한 양상을 나타냄

- (마) 근육 특이 PCK1 발현 복제건인 우주의 스펙트럼이 일반 복제건인 (동/서/남/해/달)군의 스펙트럼보다 전반적으로 metabolite 물질들의 절대적인 농도 수치들이 높게 확인
- (바) 근육 내 metabolite값들을 Creatinine 물질로 나눈 상대적 metabolite/Cr의 값들을 비교했을시, 일부의 metabolite/Cr 값들만이 우주에서 더 높게 확인
- (사) 이러한 근육 내 metabolite 물질들의 농도값과 근육량과의 상관관계는 추후 분석이 필요하다.

#### 다. 일반 복제건 / 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 골밀도 분석

##### (1) 연구방법

- (가) 마취유도를 위해 부토판주(Butophan Injection 1mg/ml, Butorphanol tartrate, 명문제약)과 프로바이브주(Provide Inj. 1%, Propofol, 명문제약)을 각각 0.02mg/kg IM, 0.6ml/kg IV로 처치하였고 이후 아이프란액(Ifran Liq., Isoflurane, 하나제약)으로 호흡마취 유지
- (나) QCT phantom(QRM-BDC/3, QRM GmbH®, Moehrendorf, Germany)를 CT table에 설치 후, 복제건의 대퇴부와 요추부위를 phantom 위에 올려 두 번에 걸쳐 CT를 촬영
- (다) CT 촬영을 통해 얻은 삼단면 영상을 3Dslicer(version 4.6.2 r25516, National Alliance for medical Image Computing) 소프트웨어를 사용하여 골밀도를 측정
- (라) QCT phantom의 CT water, 100HA, 200HA 지점에 ROI를 설정
- (마) ROI의 설정은 일반건을 대상으로 확립한 골밀도 측정 방법과 동일하게 시상단면과 가로단면 영상을 참고하여 요추의 경우 가로돌기의 기시부가 보이는 단면에서의 추체를, 대퇴골의 경우 대퇴경부와 근위 1/3, 원위 1/3 부위를 지정

##### (2) 연구결과

- (가) 근육 특이 PCK1 발현 복제건(우주) 및 일반복제건(해, 달) CT에 의한 골밀도 측정 및 분석 : 골밀도 분석법의 재현성, 일반 복제 탐지건과 운동능 향상 복제 탐지건에서 골밀도 값의 차이를 비교, 분석
- (나) QCT(Quantitative Computed Tomography)를 이용하여 수질과 피질의 골밀도 측정함.
- (다) 요추(L2-L6의 추체)와 대퇴골(대퇴경부, 근위 1/3지점, 원위 1/3지점)을 ROI로 설정함.
- (라) 근육 특이 PCK1 발현 복제건(우주) 및 일반복제건(해, 달)의 요추(표 1) 및 대퇴골(표 2)의 골밀도 측정
- (마) PCK1 발현 복제건(우주) 및 일반복제건(동, 서, 남, 해, 달)의 요추 골밀도의 단순 비교 결과 PCK1 발현 복제건의 골밀도가 15% 낮은 것이 확인
- (바) PCK1 발현 복제건(우주) 및 일반복제건(동, 서, 남, 해, 달)의 대퇴골 골밀도의 단순 비교 결과 대퇴경부에서 24%의 골밀도 증가가 확인되며 대퇴근위 1/3지점에서 22%의 골밀도 감소, 대퇴원위 1/3 지점에서 10%의 골밀도 감소가 확인

표 54. 복제건 해, 달, 우주 요추의 골밀도 값(단위: HA/cm<sup>3</sup>)

	2번 요추	3번 요추	4번 요추	5번 요추	6번 요추
해	518.959	531.218	529.349	528.359	528.547
달	378.136	554.326	552.634	569.052	578.452
우주	463.867	329.482	349.534	336.660	348.343

표 55. 복제건 해, 달, 우주 대퇴골의 골밀도 값((단위: HA/cm<sup>3</sup>)

	대퇴경부	근위 1/3지점	원위 1/3지점
해	744.917	569.517	472.106
달	780.066	565.518	517.383
우주	756.731	550.689	434.885

표 56. 복제건 동, 서, 남, 해, 달, 우주 요추의 골밀도 값 비교(단위: HA/cm<sup>3</sup>)

	2번 요추	3번 요추	4번 요추	5번 요추	6번 요추
동	419.897	438.717	472.072	464.915	454.317
서	407.538	392.632	392.929	404.158	378.873
남	430.086	423.949	435.956	449.546	483.608
해	518.959	531.218	529.349	528.359	528.547
달	378.136	554.326	552.634	569.052	578.452
우주	463.867	329.482	349.534	336.660	348.343



표 57. 복제견 동, 서, 남, 해, 달, 우주 대퇴골의 골밀도 값 비교

	대퇴경부	근위 1/3지점	원위 1/3지점
동	604.123	765.447	546.024
서	664.280	684.711	571.357
남	578.854	701.378	448.245
해	744.917	569.517	472.106
달	780.066	565.518	517.383
우주	756.731	550.689	434.885

라. 일반 복제견 / 근육 특이 PCK1 발현 복제견의 대뇌 피질과 전두엽의 부피 측정 값

(1) 연구방법

(가) MRI촬영 실시(Philips Achieva ® 7T , Philips Healthcare, Cleveland, USA)

(나) itk-SNAP version 3.4(PICSL, UPenn, Penn, USA)를 활용하여 대뇌 피질, 전두엽의 부피 측정

(다) 일반 복제견 / 근육 특이 PCK1 발현 복제견의 부피 값 비교 분석

(2) 연구결과

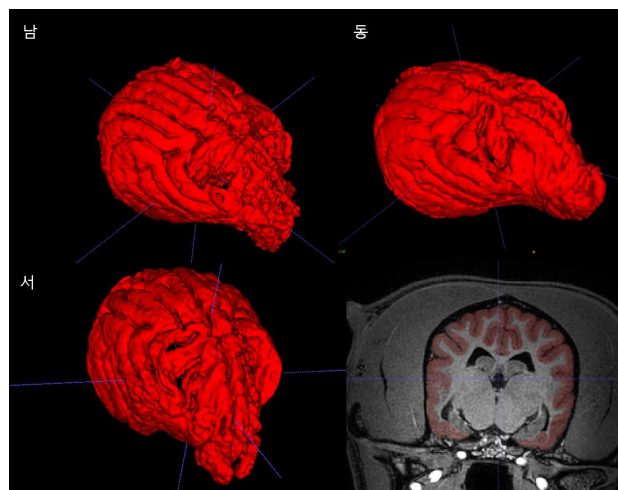


그림 113. 복제견 대뇌피질 부피측정

(가) 결과: 기기 불용에 의한 부득이한 사유로, 3T MRI를 이용하여 뇌 촬영 하였으나 전두엽의 정확한 부피측정 어려운 상황

표 58. 복제견 대뇌 피질과 전두엽의 부피 측정값

	대뇌 피질의 부피(mm3)	전두엽의 부피(mm3)
동	38,480	7,174
서	39,140	7,083
남	41,010	7,907
해	39,776	-
달	38,744	-
우주	-	-

## 12. 운동능 향상II (PPARδ 발현) 복제견 생산

### 가. PPARδ 발현 복제견 생산 및 이송

#### (1) 연구방법

- (가) 혈청 프로게스테론의 농도 변화로 난자 공여견의 배란일을 예측
- (나) 난자 공여견의 난관으로부터 성숙 난자를 회수 및 난구세포를 제거한 후, micropipet 을 이용하여 제 1 극체 및 성숙난자의 핵 제거
- (다) 1협동에서 생산된 세포 (PPARδ 발현 복제견 세포)를 이용하여 탈핵된 난자에 주입
- (라) 공여세포가 주입된 난자의 전기자극에 의한 융합 및 난자의 활성화 유도
- (마) 발정 동기화된 대리모의 난관 내 이식 후, 30일째 초음파를 이용한 임신 진단 실시
- (바) 수정란 이식 후 60일째 임신한 대리모의 제왕절개를 통한 형질전환복제견의 생산

#### (2) 연구결과

- (가) 복제 검역탐지견 생산에 성공한 “앤드” 세포주를 이용하여 근육 특이 PPARδ 발현 세포주를 확립한 뒤, 이 세포주를 사용하여 체세포핵이식 복제란을 생산 후 대리모에 이식함으로써 **근육 특이 PPARδ 발현 복제견을 생산하는데 성공**
- (나) 생산된 복제견은 6주령에 1차백신 접종 후 검역탐지견센터에 이송

표 59. “엔드” MSC를 이용한 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건 생산 결과

대리모ID	공여세포 계대수	이식복제란 수	진단결과
AND MSC/PPAR $\delta$ -A	P-5	9	Failed
AND MSC/PPAR $\delta$ -B	P-5	8	Failed
AND MSC/PPAR $\delta$ -C	P-4	11	Failed
AND MSC/PPAR $\delta$ -D	P-5	11	Failed
AND MSC/PPAR $\delta$ -E	P-5	12	Failed
AND MSC/PPAR $\delta$ -F	P-5	12	Failed
AND MSC/PPAR $\delta$ -G	P-4	16	Success (Abortion)
AND MSC/PPAR $\delta$ -H	P-5	10	Failed
AND MSC/PPAR $\delta$ -I	P-5	11	Success (Abnormal)
AND MSC/PPAR $\delta$ -J	P-4	12	Success



그림 114. 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 형질전환복제란을 이식했던 대리모에서의 초음파 진단 결과. 왼쪽부터 순서대로 AND MSC/PPAR $\delta$ -G, I, J의 초음파 사진

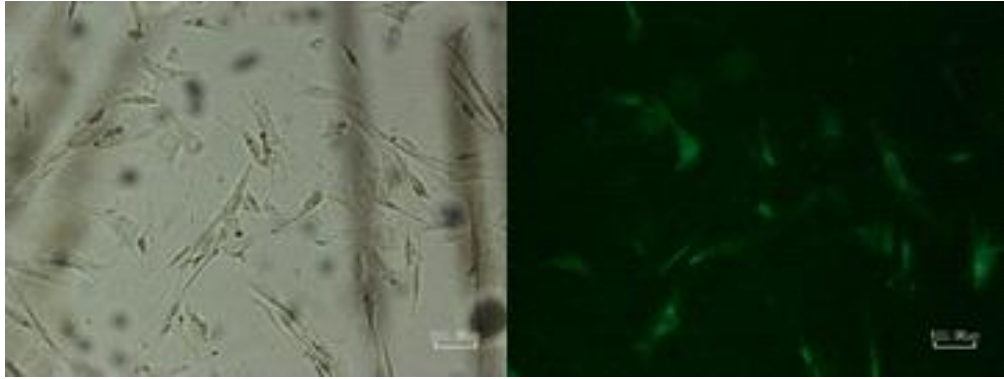


그림 115. 근육 특이 PPAR $\delta$  형질전환세포에서 GFP의 발현 확인



그림 116. 근육 특이 PPAR $\delta$  형질전환세포를 이용해 생산한 체세포핵이식 복제견 1두와 앞다리 피부에서 GFP의 발현 확인

표 60. 1개월령 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건과 대조군에서의 혈액분석 결과

	Control	PPAR $\delta$
ALT (U/L)	18	21
AST (U/L)	17	20
ALP (U/L)	188	210
Lipase (U/L)	26	11
TG (mg/dL)	55	38
GLU (mg/dL)	150	162
BUN (mg/dL)	6.5	6.1
CREA (mg/dL)	0.35	0.3
TC (mg/dL)	205	195
ALB (g/dL)	3.01	2.7
TP (g/dL)	4.89	4.26
WBC (/uL)	12970	16850
RBC (104/uL)	436	419
Hb (g/dl)	10.5	10.3
HCT (%)	34.3	32.7
PLT (104/uL)	18.7	39.1

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobins; HCT, hematocrit; PLT, platelet

표 61. 2개월령 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건과 대조군에서의 혈액분석 결과

	Control	PPAR $\delta$
ALT (U/L)	24.2 $\pm$ 2.0	18
AST (U/L)	30.8 $\pm$ 1.1	35
ALP (U/L)	171.2 $\pm$ 2.8	191
Lipase (U/L)	116.4 $\pm$ 52.5	293
TG (mg/dL)	4.0 $\pm$ 1.5	75
GLU (mg/dL)	138.6 $\pm$ 4.8	134
BUN (mg/dL)	13.7 $\pm$ 3.0	11.5
CREA (mg/dL)	0.5 $\pm$ 0.1	0.4
TC (mg/dL)	223.6 $\pm$ 8.8	238
ALB (g/dL)	3.1 $\pm$ 0.0	3.32
TP (g/dL)	5.2 $\pm$ 0.1	5.34
WBC (/uL)	18695 $\pm$ 3985	13400
RBC (104/uL)	460.5 $\pm$ 8.5	498
Hb (g/dl)	10.6 $\pm$ 0.2	12
HCT (%)	33.5 $\pm$ 0.2	35.4
PLT (104/uL)	37.1 $\pm$ 2.3	43.1

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobins; HCT, hematocrit; PLT, platelet

표 62. 4개월령 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건과 대조군에서의 혈액분석 결과

	Control	PPAR $\delta$
ALT (U/L)	33.3 $\pm$ 1.7	25
AST (U/L)	32.3 $\pm$ 1.6	34
ALP (U/L)	165.2 $\pm$ 7.2	150
Lipase (U/L)	124.3 $\pm$ 105.3	71
TG (mg/dL)	60.2 $\pm$ 8.6	203
GLU (mg/dL)	133.0 $\pm$ 2.4	114
BUN (mg/dL)	10.0 $\pm$ 1.1	11.5
CREA (mg/dL)	0.5 $\pm$ 0.0	0.5
TC (mg/dL)	254.3 $\pm$ 8.9	298
ALB (g/dL)	3.5 $\pm$ 0.1	3.5
TP (g/dL)	5.9 $\pm$ 0.2	6.11
WBC (/uL)	11410	16810
RBC (104/uL)	584	539
Hb (g/dl)	13.3	12.9
HCT (%)	39.5	37.7
PLT (104/uL)	42	43.8

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobins; HCT, hematocrit; PLT, platelet

### 13. 운동능 향상 복제건I·II의 행동학적 방법을 이용한 운동능 평가

가. 트레드밀을 이용한 근육 특이 PCK1 발현 및 PPAR $\delta$  발현 복제건의 운동에 따른 심박수 평가

#### (1) 연구방법

- (가) 개에서 점증운동부하검사를 실시한 결과, 운동강도 증가에 따라 심박수가 유의미하게 증가하는 변화를 확인한 선행연구를 참고하여(Radin et al., 2015, Vet Res Commun), 운동의 강도를 점진적으로 증가하는 형태의 운동 프로그램을 실시
- (나) 앞선 선행연구에서 낮은 조건으로 인해 산만하거나, 주변을 경계하는 모습 등을 확인했다는 보고를 참고하여(Ferasin et al., 2007, J Comp Physiol B), 효과적인 운동 진행을 위해 본 운동 전 공간, 장비, 인력, 운동 프로그램에 대한 적응 훈련을 실시

- (다) 본 운동은 2주 동안 주당 2회, 각 20분을 실시하였으며 속도와 경사도를 운동강도를 변화시키는 변인으로 구성
- (라) Round(R)1(4km/0%/5min) → R2(4.4km/2%/5min) → R3(4.2km/1%/5min) → R4(4.2km/1%/5min) → Recovery HR(운동종료 후 1분 후 심박수 측정)
- (마) 심박수는 1초 단위로 측정하여 각 (R)의 평균을 분석

(2) 연구결과

- (가) PCK1 발현 및 PPARδ 발현 복제건의 트레드밀을 이용한 운동에 따른 심박수의 변화를 관찰
- (나) 본 실험은 기초 실험으로 4차년도 운동능을 실제로 평가하기전 운동 조건을 확립하기 위하여 실시
- (다) 일반복제건 (해, 달, 별)을 동일연령의 대조군으로 하여 트레드밀 운동을 실시하였으며, PCK1 발현(우주) 및 PPARδ 발현(은하) 복제건도 동일한 실험을 실시
- (라) 결과는 아래 그림과 같으며, 대조군에 비하여 운동구간 및 휴식구간에서 높은 심박수를 보임
- (마) 현재 기초실험결과로 통계적인 정확한 비교는 어려우나, 대조군에 비하여 운동능 향상 복제건들이 평균적으로 높은 심박수를 유지하고 있음을 확인

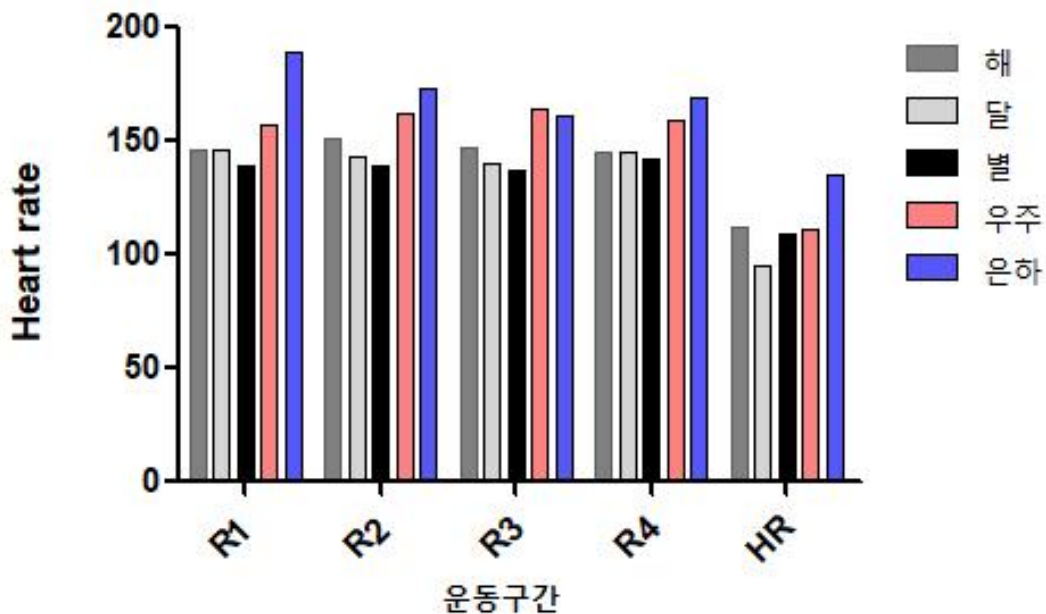


그림 117. 트레드밀을 이용한 일반 복제건들과 운동능 향상 복제건들의 심박수 변화 관찰



## 14. 운동능 향상II (PPAR $\delta$ 발현) 복제 성견 정상성 분석

### 가. PPAR $\delta$ 발현 복제건의 생리학적 정상성 분석

#### (1) 연구방법

(가) 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건과 대조군 (외래유전자가 삽입되지 않았으며 유전적 background가 동일한 공여세포를 사용해서 생산된 동일령의 복제건)에서 혈액검사를 함으로써 side-effect 존재 및 생리학적 특성의 추이를 파악하여 기초자료를 확보

(나) 1, 2, 4개월령에 일반 혈액 검사 (complete blood cell count) 및 혈청화학 분석 (ALT, AST, ALP, GGT, Total bilirubin, lipase, BUN, creatinine, calcium, phosphate, total cholesterol, glucose, albumin, total protein, triglyceride) 실시. 이후, 6, 9개월령에 혈청화학 분석 추가 실시

#### (2) 연구결과

(가) 대조군과 근육 특이 PCK1 발현 복제건에서 1, 2, 4, 6개월령일 때 일반 혈액 검사 및 혈청화학 분석을 실시하였고, 이후 9, 12개월령에 혈청화학 분석을 추가로 실시

(나) 1, 2, 4개월령에 생리학적 분석 결과 대조군과 유사한 결과를 보임

표 63. 1개월령 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건과 대조군에서의 혈액분석 결과

	Control	PPAR $\delta$
ALT (U/L)	18	21
AST (U/L)	17	20
ALP (U/L)	188	210
Lipase (U/L)	26	11
TG (mg/dL)	55	38
GLU (mg/dL)	150	162
BUN (mg/dL)	6.5	6.1
CREA (mg/dL)	0.35	0.3
TC (mg/dL)	205	195
ALB (g/dL)	3.01	2.7
TP (g/dL)	4.89	4.26
WBC (/uL)	12970	16850
RBC (104/uL)	436	419
Hb (g/dl)	10.5	10.3
HCT (%)	34.3	32.7
PLT (104/uL)	18.7	39.1

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobins; HCT, hematocrit; PLT, platelet

표 64. 2개월령 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 억제조건과 대조군에서의 혈액분석 결과

	Control	PPAR $\delta$
ALT (U/L)	24.2 $\pm$ 2.0	18
AST (U/L)	30.8 $\pm$ 1.1	35
ALP (U/L)	171.2 $\pm$ 2.8	191
Lipase (U/L)	116.4 $\pm$ 52.5	293
TG (mg/dL)	4.0 $\pm$ 1.5	75
GLU (mg/dL)	138.6 $\pm$ 4.8	134
BUN (mg/dL)	13.7 $\pm$ 3.0	11.5
CREA (mg/dL)	0.5 $\pm$ 0.1	0.4
TC (mg/dL)	223.6 $\pm$ 8.8	238
ALB (g/dL)	3.1 $\pm$ 0.0	3.32
TP (g/dL)	5.2 $\pm$ 0.1	5.34
WBC (/uL)	18695 $\pm$ 3985	13400
RBC (10 <sup>4</sup> /uL)	460.5 $\pm$ 8.5	498
Hb (g/dl)	10.6 $\pm$ 0.2	12
HCT (%)	33.5 $\pm$ 0.2	35.4
PLT (10 <sup>4</sup> /uL)	37.1 $\pm$ 2.3	43.1

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobins; HCT, hematocrit; PLT, platelet

표 65. 4개월령 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 억제조건과 대조군에서의 혈액분석 결과

	Control	PPAR $\delta$
ALT (U/L)	33.3 $\pm$ 1.7	25
AST (U/L)	32.3 $\pm$ 1.6	34
ALP (U/L)	165.2 $\pm$ 7.2	150
Lipase (U/L)	124.3 $\pm$ 105.3	71
TG (mg/dL)	60.2 $\pm$ 8.6	203
GLU (mg/dL)	133.0 $\pm$ 2.4	114
BUN (mg/dL)	10.0 $\pm$ 1.1	11.5
CREA (mg/dL)	0.5 $\pm$ 0.0	0.5
TC (mg/dL)	254.3 $\pm$ 8.9	298
ALB (g/dL)	3.5 $\pm$ 0.1	3.5
TP (g/dL)	5.9 $\pm$ 0.2	6.11
WBC (/uL)	11410	16810
RBC (10 <sup>4</sup> /uL)	584	539
Hb (g/dl)	13.3	12.9
HCT (%)	39.5	37.7
PLT (10 <sup>4</sup> /uL)	42	43.8

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; Hb, hemoglobins; HCT, hematocrit; PLT, platelet

표 66. 6개월령 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건과 대조군에서의 혈액분석 결과

	Control	PPAR $\delta$
ALT (U/L)	36.5 $\pm$ 5.4	38
AST (U/L)	34.5 $\pm$ 3.7	24
ALP (U/L)	167.1 $\pm$ 32.4	30
Lipase (U/L)	200.5 $\pm$ 51.7	29
TG (mg/dL)	40.9 $\pm$ 7.2	37
GLU (mg/dL)	112.1 $\pm$ 5.5	71
BUN (mg/dL)	16.9 $\pm$ 2.4	13.5
CREA (mg/dL)	0.7 $\pm$ 0.0	1.6
TC (mg/dL)	169.5 $\pm$ 15.3	199
ALB (g/dL)	3.6 $\pm$ 0.1	3.9
TP (g/dL)	4.8 $\pm$ 0.2	6.9

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride

표 67. 9개월령 근육 특이 PPAR $\delta$  발현 복제건과 대조군에서의 혈액분석 결과

	Control	PPAR $\delta$
ALT (U/L)	34.0 $\pm$ 5.1	38
AST (U/L)	26.7 $\pm$ 2.3	24
ALP (U/L)	95.7 $\pm$ 2.4	30
Lipase (U/L)	25.0 $\pm$ 8.6	29
GLU (mg/dL)	96.0 $\pm$ 2.5	71
BUN (mg/dL)	13.5 $\pm$ 0.4	13.5
CREA (mg/dL)	0.8 $\pm$ 0.0	1.6
TC (mg/dL)	271.0 $\pm$ 8.7	199
ALB (g/dL)	4.2 $\pm$ 0.1	3.9
TP (g/dL)	7.2 $\pm$ 0.2	6.9

\* ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine; TC, total cholesterol; GLU, glucose; ALB, albumin; TP, total protein; TG, triglyceride

## 나. PPAR $\delta$ 발현 복제건의 변식학적 정상성 분석

### (1) 연구방법

- (가) PPAR $\delta$  발현 복제건이 1년령에 도달하였을 때, 수지마찰요법으로 재복제건에서 채취한 정액 샘플을 15ml 튜브에 옮긴 후 37도를 유지
- (나) 채취한 정액 샘플은 바로 Makler's chamber에 10ul를 올리기
- (다) 37도 온도를 유지시키면서, 100배 암시야 현미경 하에서 초점 맞춘 뒤, CASA software로 정자의 운동성 분석
- (라) 정확한 정자의 농도를 측정하기 위하여 Makler's chamber로 정자 수 측정

### (2) 연구결과

- (가) 1년령에 도달하는 2019년 5월 이전에 연구 중단

## 15. PPAR $\delta$ 발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성 평가

### 가. 심장의 구조적, 기능적 정상성을 초음파 검사를 통해 평가

#### (1) 연구방법

- (가) Right parasternal long axis 5 chamber view에서 M-mode를 통해 Teichholz 측정
- (나) Right parasternal short axis view에서 대동맥과 좌심방의 직경 비율을 측정
- (다) Right parasternal short axis view에서 폐동맥 유출로에 도플러 검사를 수행, RVOT flow를 측정
- (라) Left apical 4 chamber view에서 mitral valve level에서 도플러 검사를 수행하여 mitral flow를 측정
- (마) Left apical 4 chamber view에서 mitral annulus 부위에 도플러 검사를 통해 TDI를 측정

#### (2) 연구결과

- (가) 막주위형 심실중격결손 (peri-membranous ventricular septal defect) 확인됨
  - ① 결손부위를 통한 단락혈류파형 (peak velocity: 5.4m/s) 및 폐순환 대 전신순환 비 ( $Q_p/Q_s < 1.3$ )에 근거하여 경증의 심실중격결손으로 판단
  - ② 심장의 수축기 및 이완기능의 장애 확인되지 않으나, 경증의 심실중격결손의 경우 생후 1-2년령 사이 자연치유 되는 경우가 있으므로 마취과정이 필요한 실험의 유예 추천되며, 2년령에 재검사를 통해 심실중격결손의 자연 치유 검사를 실시 예정

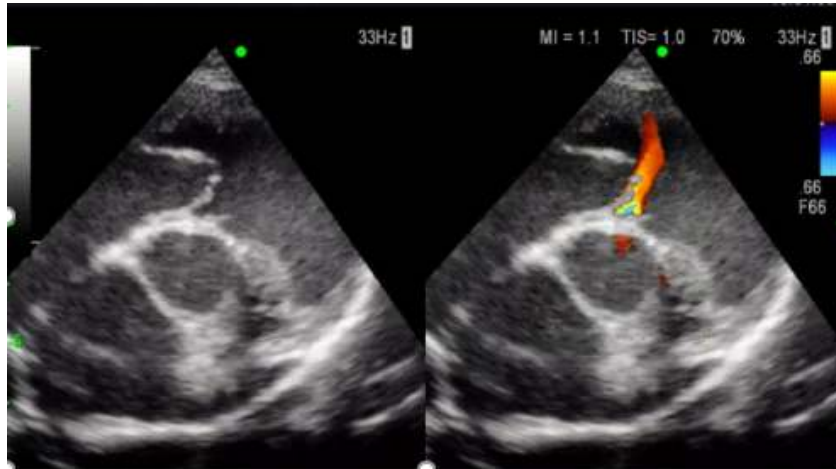


그림 118. Right parasternal short axis view에서 확인된 심실중격결손에 의한 단락과형

(나) 그 외 심기능 지표 아래와 같으며, 수축기 및 이완기능의 장애 확인되지 않음

IVSd (mm)	7
LVIDd (mm)	30
LVPWd (mm)	9
IVSs (mm)	10
LVIDs (mm)	18
LVPWs (mm)	15
EF (%)	73.6
FS (%)	41.1
LVOT flow (m/s)	1.55
Trans-M E (m/s)	0.62
Trans-M A (m/s)	0.54
Trans-M E:A	1.13
RVOT flow (m/s)	0.9
MR	None
TR (m/s)	1.9

나. 복강 내 장기의 구조적 정상성을 초음파 검사를 통해 평가

(1) 연구방법

(가) 복강전반의 해부학적 정상성을 평가하며, 그 외 장기별 특이사항은 아래와 같이 평가함

(나) 간담도계 및 췌장

- ① 담낭의 경우, 벽 부종 및 담관 확장 여부 확인
- ② 간의 경우, 실질 에코 이상여부 및 간비대증, 소간증 여부 확인
- ③ 췌장의 경우, 실질의 에코 및 크기 확인

(다) 비뇨기계 및 부신

- ① 신장의 경우, 양측 신장의 크기 및 피질, 수질의 에코 확인
- ② 요관의 경우, 확장여부를 확인
- ③ 부신의 경우, 크기를 확인

(라) 생식기계에서 고환의 경우, 양측 고환의 존재 및 하강 여부 확인

(마) 소화기계의 경우, 위, 십이지장, 고장, 결장, 직장의 염증성 변화 여부 확인

(바) 면역장기

- ① 비장의 경우, 실질의 에코 이상 및 비장비대 여부 확인
- ② 림프절의 경우, 예상되는 해부학적 위치에서의 존재 여부 확인 및 실질과 크기 이상 여부 확인

(2) 연구결과

(가) 검사결과 초음파학적 이상소견 확인되지 않음

다. 근골격계의 구조적 정상성을 CT 및 방사선 촬영 검사를 통해 평가

(1) 연구방법

(가) 방사선촬영

- ① 골격계의 정상적인 성장 여부 평가를 위해 Growth and hematologic characteristics of cloned dogs derived from adult somatic cell nuclear transfer(Park et al., 2010)를 참고하여 두개골, 요추, 골반뼈를 측정
- ② 두개골의 경우 DV view에서 위쪽 턱뼈의 정중앙 끝부터 external occipital protuberance의 끝 부분까지의 거리, 양측 zygomatic arch 사이의 거리, 양측 측두골 사이의 거리를 각각 SK1, SK2, SK3으로 지정하여 측정함(하단 그림 참조)
- ③ 요추의 경우 right lateral view에서 추체의 배쪽 cranial end plate부터 caudal end plate까지의 거리, 등쪽 cranial and plate부터 caudal end plate까지의 거리, caudal end plate의 배쪽 끝부터 등쪽 끝까지의 거리를 각각 LL, UL, PH로 지정하여 측정(하단 그림 참조)
- ④ 골반뼈의 경우 VD view에서 iliac crest의 끝부분부터 ischium의 끝부분까지의 거리, 양측 ischiatic tuberosity 사이의 거리를 각각 Pe1, Pe2로 지정하여 측정(하단 그림 참조)



(나) CT 촬영

- ① 마취유도를 위해 부토판주(Butophan Injection 1mg/ml, Butorphanol tartrate, 명문제약)과 프로바이브주(Provive Inj. 1%, Propofol, 명문제약)을 각각 0.02mg/kg IM, 0.6ml/kg IV로 처치하였고 이후 아이프란액(Ifran Liq., Isoflurane, 하나제약)으로 호흡마취 유지
- ② CT 촬영은 대퇴부의 근육량 평가 및 요추와 대퇴골의 골밀도 평가를 위한 촬영이 먼저 실시된 후, 전체적인 검사를 위해 조영제 주입 전, 조영제 주입 후를 나누어 실시

(2) 연구결과

- (가) 방사선촬영 검사 상 은하의 근골격계 구조적 정상성은 확립되었으나, 심장 선천적 기형으로 인한 마취부담으로 CT 검사는 2년령 심실중격 결손 검사후 상태를 확인후 검사 진행 결정

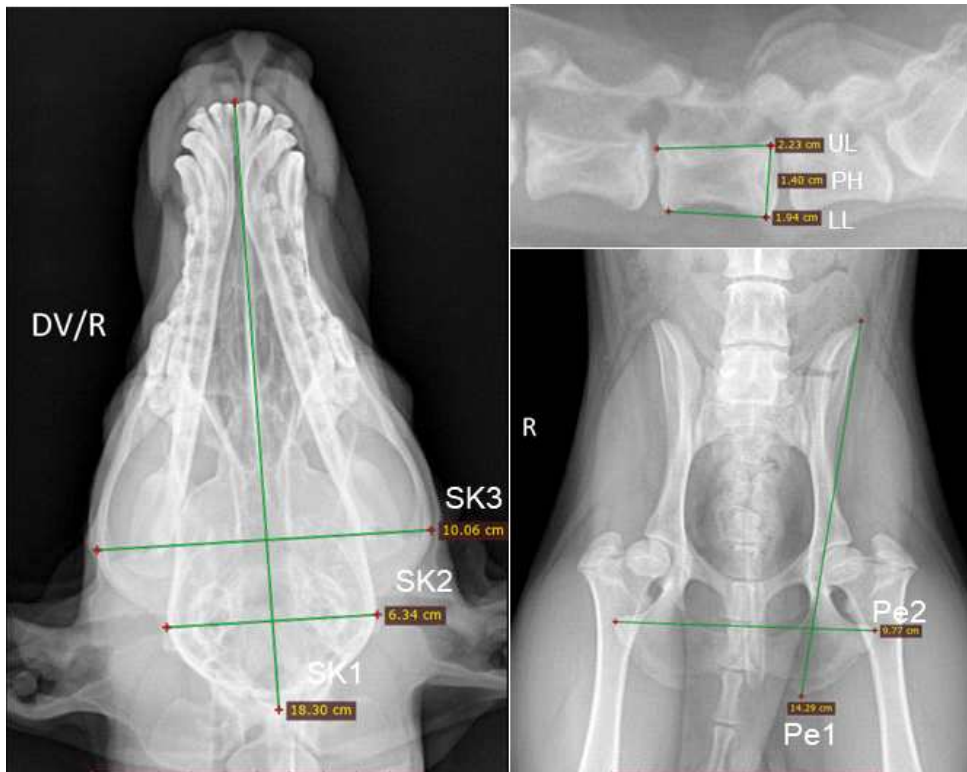


그림 119. PPARδ 발현 복제견의 방사선학적 근골격계 정상성

16. PPARδ 발현 복제견의 영상학적 기법을 이용한 운동능 · 집중력 평가

가. 근육량의 정량적 평가

(1) 연구방법

(가) 호흡마취를 실시한 후 CT scanning 실시

(나) 촬영 후 얻어진 이미지를 MIMICS Materialise(Mimics Reaserch 21.0.0.406, Technologielaan 15, Belgium)소프트웨어를 통해 근육량의 측정

(다) ROI의 설정은 가로단면 영상에서 근육의 경계부위를 따라 설정하였으며, 그 범위는 대퇴경부가 보이는 시점부터 양측 종자골인 fabella가 보이는 단면까지로 설정

(라) 설정된 ROI 내부의 근육을 소프트웨어가 자동 측정

(마) ROI 설정의 종료 후 근육량 측정을 수행 이후 결과를 volume rendering하여 시각화

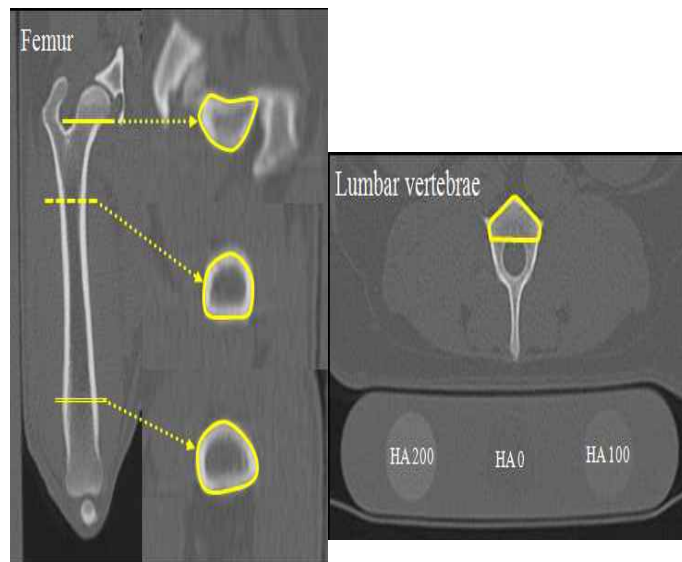


그림 120. 복제견 대퇴골과 요추 골밀도 측정 ROI 설정 예시

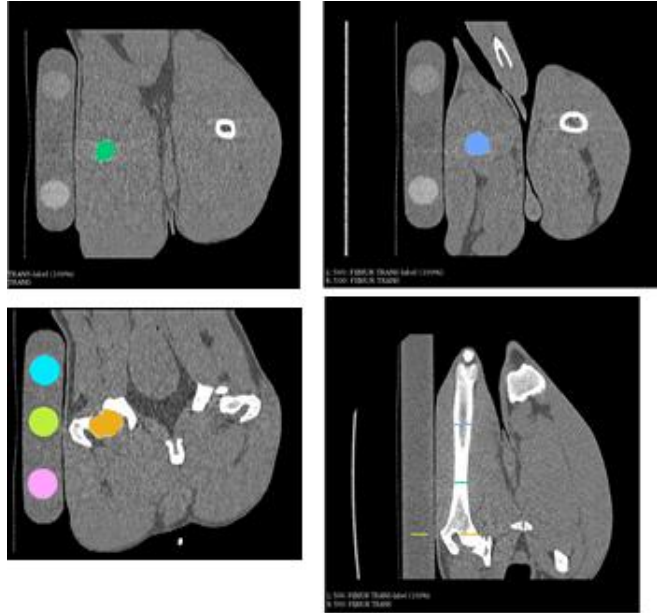


그림 121. 복제견 대퇴골 골밀도 측정 시상단면  
과 가로단면 영상

## (2) 연구결과

(가) 심장 선천적 기형으로 인한 마취부담으로 2년령 심실중격 결손 검사후 상태를 확인후  
검사 진행 결정

## 나. MRS를 이용하여 대퇴부 근육 대사물질의 정량적 평가 및 분석

### (1) 연구방법

(가) 비글견을 Butorphanol 0.2mg/kg, IM(부도판주사 1mg/mL, 명문제약), Propofol 6mg/kg,  
IV(프로바이브주1%, 명문제약)을 이용하여 마취 유도 후 기관 삽관하여 Isoflurane 1.5-2.5%,  
Inhalation(아이프란액, 하나제약)으로 마취 유지

(나) 마취된 비글견은 sternal recumbency 자세로 코일의 중심부에 대퇴부의 중간 지점이  
오도록 고정

(다) MRS 촬영 후 비글견의 의식이 돌아올 때까지 모니터링 실시

(라) 비글견의 대퇴부 근육 중 모음근(adductor m.)에 voxel을 설정하여 MRS 촬영을 진행

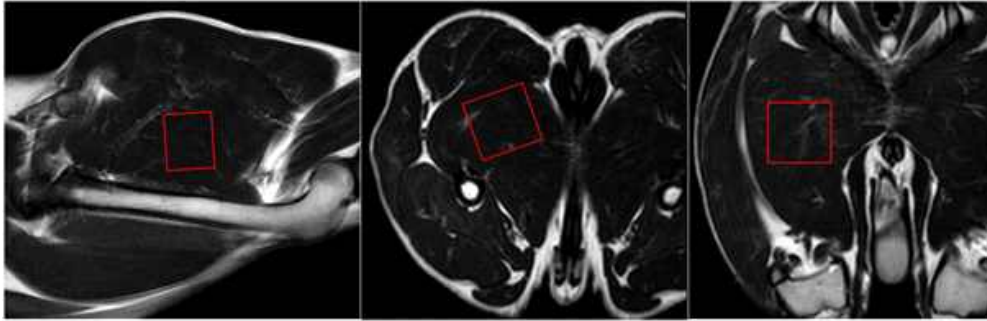


그림 122. 모음근(adductor m.)에 설정된 voxel

(2) 연구결과

(가) 심장 선천적 기형으로 인한 마취부담으로 2년령 심실중격 결손 검사후 상태를 확인후  
검사 진행 결정

다. 근육 특이 PPARδ 발현 복제건의 영상학적 방법을 이용한 집중력 분석

(1) 연구방법

(가) 인의 및 개에서 판단력, 집중력 및 지적능력과 밀접한 상관관계가 있다고 알려져 있는  
대뇌피질 및 전두엽 용적의 정량적 측정

(나) 부피측정은 3차원 리모델링 소프트웨어 (itk-SNAP version 3.6, PICSL, UPenn, Penn,  
USA)를 이용하여 수행하였으며, 피질 및 전두엽 영역을 개 해부 도보를 통해 정의하  
여 분석

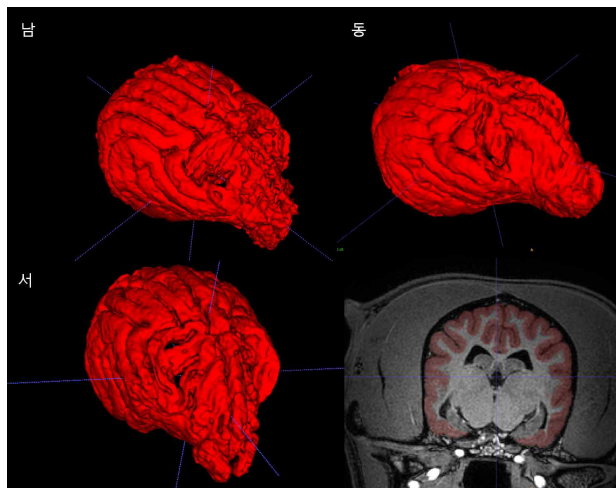


그림 123. 대뇌피질 부피측정의 예시

(2) 연구결과

(가) 심장 선천적 기형으로 인한 마취부담으로 2년령 심실중격 결손 검사 후 상태를 확인하  
여 진행

## 17. 집중력 향상(5-HT3R 발현) 복제건 생산

### 가. 집중력 향상(5-HT3R 발현) 복제건 생산 및 이송

#### (1) 연구방법

- (가) 혈청 프로게스테론의 농도 변화로 난자 공여건의 배란일을 예측
- (나) 난자 공여건의 난관으로부터 성숙 난자를 회수 및 난구세포를 제거한 후, micropipet 을 이용하여 제 1 극채 및 성숙난자의 핵 제거
- (다) 1협동에서 생산된 세포 (5-HT3R 발현 복제건 세포)를 이용하여 탈핵된 난자에 주입
- (라) 공여세포가 주입된 난자의 전기자극에 의한 융합 및 난자의 활성화 유도
- (마) 발정 동기화된 대리모의 난관 내 이식 후, 30일째 초음파를 이용한 임신 진단 실시
- (바) 수정란 이식 후 60일째 임신한 대리모의 제왕절개를 통한 형질전환복제건의 생산

#### (2) 연구결과

(가) 집중력 향상 유전자 5-HT3R 발현 세포를 이용하여 체세포핵이식 복제란을 생산 후 대리모에 이식하여 5-HT3R 발현 복제건을 생산하는데 성공

- (나) 생산된 복제건은 6주령에 1차백신 접종 후 검역탐지건센터에 이송

표 68. HT3R 발현 복제건 생산 결과

대리모ID	공여세포 계대수	이식복제란 수	진단결과
OB2FB/HT3R-RFP-A	P-5	9	Failed
OB2FB/HT3R-RFP-B	P-5	8	Success
OB2FB/HT3R-RFP-C	P-4	11	Failed
OB2FB/HT3R-RFP-D	P-5	13	Failed
OB2FB/HT3R-RFP-E	P-5	10	Failed
OB2FB/HT3R-RFP-F	P-5	19	Failed

## [1세부위탁: 검역기술고도화를 위한 스마트 탐지건의 활용연구]

### 1. 자견에서 보상물에 대한 집중력 분석을 위한 행동학적 기법 개발

(1) 연구방법

- (가) 검역탐지견 훈련 및 평가 방법 검토
- (나) 집중력 관련 평가 항목 추출
- (다) 관련 논문 검토(호주, 미국 탐지견 평가 방법 참고)
- (라) Definition of concentration (Refer : Australian breeding Program)
- (마) 검역탐지견 평가 중 탐지 과정과 관련된 항목 사용(13주, 최종)
- (바) 훈련 과정 중 Distracion 측정(6개월)

(2) 연구결과

(가) 보상물 (먹이) 집중도 평가 방법 활용

- ④ 복제견의 집중도를 평가하기 위해 13주령 수행하는 자견자질평가 항목 중 보상먹이 자극에 대한 반응을 평가
- ⑤ 8개의 보상먹이에 대한 반응을 불량, 부족, 보통, 우수, 매우우수 등 5개의 항목으로 반응을 관찰하여 각 항목별로 0-1점, 1-2점, 2-3점, 3-4점, 4-5점의 점수를 부여
- ⑥ 손에 있는 먹이, 바닥에 있는 먹이, 수하물 바닥에 있는 먹이, 높은곳에 있는 먹이, 벨트에 있는 동안, 케로셀 주변에 있는 먹이, 기타상태 등으로 평가를 수행

(나) 훈련과정 중 집중도 평가 방법 개발

- ① 6개월령의 개체에서 각 훈련 과정(벽면, 박스, 수하물) 훈련 과정 중 Distraction 정도를 평가

(다) 선발평가시의 집중도 평가방법 활용

- ① 최종 평가시에 전체 탐지 과정에 대한 탐지 의욕, 민감성, 관심성, 적극성 평가를

## 2. 신제품 복제견의 검역탐지견으로의 자견 자질 평가

### 가. 복제견자견의 자견 자질 평가

(1) 연구방법

(가) 체중변화 모니터링

- ① 복제견의 체중 변화를 서울대학교 수의과대학에서 인계받은 이후로 일정한 간격으로 체중을 측정하여 관찰
- ② 복제자견이 정상적인 체중증가 곡선을 나타내는지를 평가하고 성견으로 도달시의 성체 체중이 검역탐지견으로서의 자질에도 중요한 지표이기에 탐지견으로서의 활용 가능성을 추측 가능

(나) 자건 자질평가

- ① 핸들러 3인에 의해 각 복제건에 대해서 인천공항 여객청사(CIQ)에서 수행
- ② 보상먹이 자극에 대한 반응 (8항목), 환경적응성 (16항목), 사회성 (7항목), 보행상태 (5항목), 장애물에 대한 반응 (4항목)을 평가
- ③ 총 40개의 항목을 평가하며 단위별 점수가 3점(120)점 미만의 점수 획득시 검역탐지건으로서의 자질 미달

(2) 연구결과

(가) 복제건의 체중 변화

- ① 연령의 증가에 따라 복제건의 체중의 변화를 측정함으로써 성장 발달의 정상성 평가 수행
- ② **복제건 모두 정상적으로 체중 증가**
- ③ ‘복’의 경우 가장 늦게 생산한 복제자건으로 인계당시의 체중은 다른 개체와 유사하며 정상적으로 성장 진행 중

표 69. 복제자건 4두의 체중변화

날짜	동 (kg)	서 (kg)	남 (kg)	복 (kg)
9.29	2.4	2.4		
10.6	2.6	2.6		
10.13	3.4	3.1	2.9	
10.20	4	3.85	3.3	2.42
10.27	5	5.1	4.2	2.9
11.3	6.3	5.9	5.1	3.6
11.10	6.8	6.7	5.8	4.07
11.17	7.28	7.3	6.5	4.54
11.24	7.62	7.62	7.4	5.46
12.1	8.2	7.85	8	5.82
12.7	8.86	7.9	8.1	6

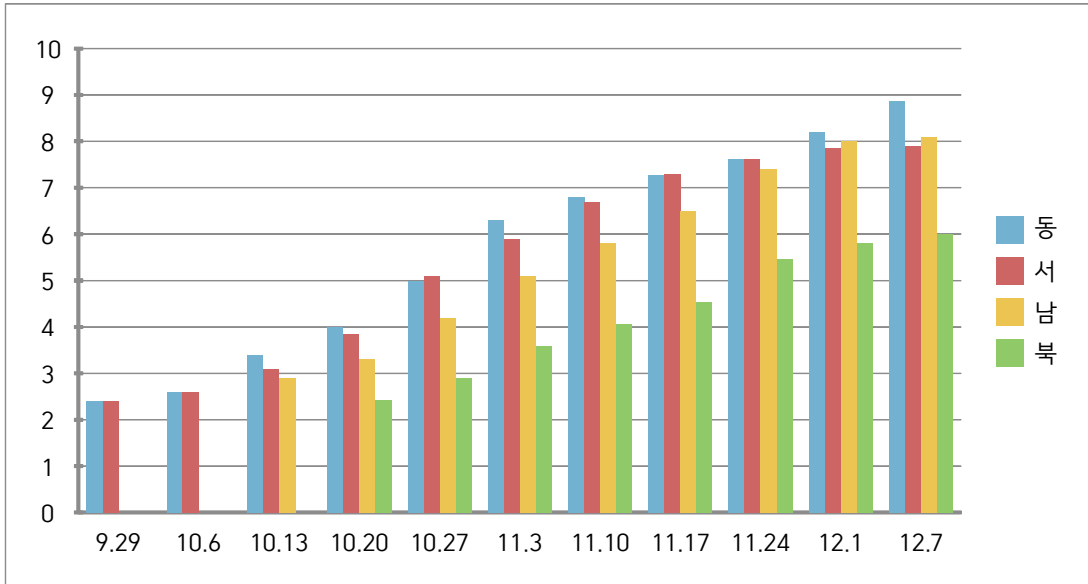


그림 124. 복제자건 4두의 체중변화

(나) 복제건의 자건 자질평가

- ① 13주령에 다다른 개체 3두를 대상으로 자건 자질 평가를 수행
- ② 자질 평가결과 점수 단원별 점수가 3점(120)이상의 경우 합격
- ③ 복제건 3두 모두 합격 평가결과 획득
- ④ 총 40가지 항목을 3명의 handler가 분석한 결과 3두 모두 3.9(150)점 이상을 획득

표 70. 복제건의 자건자질평가 세부 사항

구분		건 명		
		동	서	남
평가자	평가자1	4.52(181)	4.05(164)	4.88(195)
	평가자2	4.52(181)	4.02(163)	4.84(194)
	평가자3	4.32(172)	3.85(154)	4.60(185)
평가 점수		4.45(178.00)	3.97(159.33)	4.77(191.33)
평가 결과		합격	합격	합격





## 2. 복제건의 탐지건 자질평가

〔붙임 2〕

### 탐지건 자질 평가

○ 평가자  
 - 소속 : 농림축산검역본부 인명안전지원과 특수감시과 탐지전반과  
 - 직급 :  
 - 직명 :

○ 평가일자 : 2016.11.29  
 ○ 평가장소 : 인명안전 지원과  
 ○ 평가 대상 건 기호 :

구 분	내 용	비 고
- 점 수	90	
- 등 급	비중	
- 부 점	90	
- 평균점수	94.03	
- 배 점	9.0	

○ 평가방법 설명

○ 평가자는 여러 가지 사항 및 상황에 대한 반응을 읽고 선택  
 ○ 평가자는 여러 반응에 대한 반응, 점수를 해당한 순서에 표시  
 ○ 각 부분에 맞나면 해당된 된 부분에 평균점수를 기록  
 ○ 각 항목별 점수가 보통(2) 이상인 경우 해당된 경우에 "합격"

○ 탐지건 자질 평가표(40점형식)

구 분	비 고	점수	비 고	점수	비 고	점수	비 고	점수	비 고	
1. 소견서 작성(10점)	1.1. 소견서 작성 여부	0	1.2. 소견서 작성 내용	0	1.3. 소견서 작성 형식	0	1.4. 소견서 작성 시기	0	1.5. 소견서 작성 장소	0
2. 소견서 내용(10점)	2.1. 소견서 내용 정확성	0	2.2. 소견서 내용 상세성	0	2.3. 소견서 내용 구체성	0	2.4. 소견서 내용 적절성	0	2.5. 소견서 내용 타당성	0
3. 소견서 전달(10점)	3.1. 소견서 전달 여부	0	3.2. 소견서 전달 시기	0	3.3. 소견서 전달 장소	0	3.4. 소견서 전달 방법	0	3.5. 소견서 전달 대상	0
4. 소견서 보관(10점)	4.1. 소견서 보관 여부	0	4.2. 소견서 보관 시기	0	4.3. 소견서 보관 장소	0	4.4. 소견서 보관 방법	0	4.5. 소견서 보관 대상	0

### '동' 복제건의 자질평가

〔붙임 2〕

### 탐지건 자질 평가

○ 평가자  
 - 소속 : 농림축산검역본부 인명안전지원과 특수감시과 탐지전반과  
 - 직급 :  
 - 직명 :

○ 평가일자 : 2016.11.29  
 ○ 평가장소 : 인명안전 지원과  
 ○ 평가 대상 건 기호 :

구 분	내 용	비 고
- 점 수	90	
- 등 급	비중	
- 부 점	90	
- 평균점수	94.03	
- 배 점	9.0	

○ 평가방법 설명

○ 평가자는 여러 가지 사항 및 상황에 대한 반응을 읽고 선택  
 ○ 평가자는 여러 반응에 대한 반응, 점수를 해당한 순서에 표시  
 ○ 각 부분에 맞나면 해당된 된 부분에 평균점수를 기록  
 ○ 각 항목별 점수가 보통(2) 이상인 경우 해당된 경우에 "합격"

○ 탐지건 자질 평가표(40점형식)

구 분	비 고	점수	비 고	점수	비 고	점수	비 고	점수	비 고	
1. 소견서 작성(10점)	1.1. 소견서 작성 여부	0	1.2. 소견서 작성 내용	0	1.3. 소견서 작성 형식	0	1.4. 소견서 작성 시기	0	1.5. 소견서 작성 장소	0
2. 소견서 내용(10점)	2.1. 소견서 내용 정확성	0	2.2. 소견서 내용 상세성	0	2.3. 소견서 내용 구체성	0	2.4. 소견서 내용 적절성	0	2.5. 소견서 내용 타당성	0
3. 소견서 전달(10점)	3.1. 소견서 전달 여부	0	3.2. 소견서 전달 시기	0	3.3. 소견서 전달 장소	0	3.4. 소견서 전달 방법	0	3.5. 소견서 전달 대상	0
4. 소견서 보관(10점)	4.1. 소견서 보관 여부	0	4.2. 소견서 보관 시기	0	4.3. 소견서 보관 장소	0	4.4. 소견서 보관 방법	0	4.5. 소견서 보관 대상	0

### '서' 복제건의 자질평가

〔붙임 2〕

### 탐지건 자질 평가

○ 평가자  
 - 소속 : 농림축산검역본부 인명안전지원과 특수감시과 탐지전반과  
 - 직급 :  
 - 직명 :

○ 평가일자 : 2016.11.29  
 ○ 평가장소 : 인명안전 지원과  
 ○ 평가 대상 건 기호 :

구 분	내 용	비 고
- 점 수	90	
- 등 급	비중	
- 부 점	90	
- 평균점수	94.03	
- 배 점	9.0	

○ 평가방법 설명

○ 평가자는 여러 가지 사항 및 상황에 대한 반응을 읽고 선택  
 ○ 평가자는 여러 반응에 대한 반응, 점수를 해당한 순서에 표시  
 ○ 각 부분에 맞나면 해당된 된 부분에 평균점수를 기록  
 ○ 각 항목별 점수가 보통(2) 이상인 경우 해당된 경우에 "합격"

○ 탐지건 자질 평가표(40점형식)

구 분	비 고	점수	비 고	점수	비 고	점수	비 고	점수	비 고	
1. 소견서 작성(10점)	1.1. 소견서 작성 여부	0	1.2. 소견서 작성 내용	0	1.3. 소견서 작성 형식	0	1.4. 소견서 작성 시기	0	1.5. 소견서 작성 장소	0
2. 소견서 내용(10점)	2.1. 소견서 내용 정확성	0	2.2. 소견서 내용 상세성	0	2.3. 소견서 내용 구체성	0	2.4. 소견서 내용 적절성	0	2.5. 소견서 내용 타당성	0
3. 소견서 전달(10점)	3.1. 소견서 전달 여부	0	3.2. 소견서 전달 시기	0	3.3. 소견서 전달 장소	0	3.4. 소견서 전달 방법	0	3.5. 소견서 전달 대상	0
4. 소견서 보관(10점)	4.1. 소견서 보관 여부	0	4.2. 소견서 보관 시기	0	4.3. 소견서 보관 장소	0	4.4. 소견서 보관 방법	0	4.5. 소견서 보관 대상	0

### '남' 복제건의 자질평가

# 복제건의 탐지견 자질평가

(붙임 3)

## 탐지견 자질 평가

- 평가자
  - 소속 : 농림축산검역본부 인천공항지하본부 특수검역과 탐지견센터
  - 직급 :
  - 성명 :
- 평가일자 : 2016.11.20
- 평가장소 : 인천공항 입국당
- 평가 대상 견 기록 :

구분	내 용	비 고
- 견명		
- 품종	믹스	
- 성명	남	
- 생년월일	16.03.15	
- 체중	7.5	

### 평가방법 설명

- 평가자는 여러 가지 자극 및 상황에 대한 반응을 읽고 선택
- 평가자는 견의 반응에 대한 반응, 점수를 해당견의 숫자에 표시
- 각 부분이 끝나면 해당견 번 공간에 해당점수를 기록
- 각 단행렬 점수가 보통(3) 이상의 점수 획득할 경우에 "합격"

### ○ 탐지견 개별 평가표(60행씩)

구분	행동 상황	부동	동행	조동	진동	정지	비고
1. 초상견사 초상견사출발 행동 (10행씩)	초상견사 출동						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
2. 복합견사 복합견사출발 행동 (10행씩)	복합견사 출동						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
3. 시계열 시계열 (10행씩)	시계열 출동						
	시계열 도착						
	시계열 대기						
	시계열 출발						
	시계열 도착						
	시계열 대기						
	시계열 출발						
	시계열 도착						
	시계열 대기						
	시계열 출발						
4. 초상견사 시계열 (10행씩)	초상견사 출동						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
5. 복합견사 시계열 (10행씩)	복합견사 출동						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						

## '동' 복제건의 자질평가

(붙임 3)

## 탐지견 자질 평가

- 평가자
  - 소속 : 농림축산검역본부 인천공항지하본부 특수검역과 탐지견센터
  - 직급 :
  - 성명 :
- 평가일자 : 2016.11.20
- 평가장소 : 인천공항 입국당
- 평가 대상 견 기록 :

구분	내 용	비 고
- 견명	동	
- 품종	믹스	
- 성명	남	
- 생년월일	16.03.15	
- 체중	7.5	

### 평가방법 설명

- 평가자는 여러 가지 자극 및 상황에 대한 반응을 읽고 선택
- 평가자는 견의 반응에 대한 반응, 점수를 해당견의 숫자에 표시
- 각 부분이 끝나면 해당견 번 공간에 해당점수를 기록
- 각 단행렬 점수가 보통(3) 이상의 점수 획득할 경우에 "합격"

### ○ 탐지견 개별 평가표(60행씩)

구분	행동 상황	부동	동행	조동	진동	정지	비고
1. 초상견사 초상견사출발 행동 (10행씩)	초상견사 출동						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
2. 복합견사 복합견사출발 행동 (10행씩)	복합견사 출동						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
3. 시계열 시계열 (10행씩)	시계열 출동						
	시계열 도착						
	시계열 대기						
	시계열 출발						
	시계열 도착						
	시계열 대기						
	시계열 출발						
	시계열 도착						
	시계열 대기						
	시계열 출발						
4. 초상견사 시계열 (10행씩)	초상견사 출동						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
5. 복합견사 시계열 (10행씩)	복합견사 출동						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						

## '서' 복제건의 자질평가

(붙임 3)

## 탐지견 자질 평가

- 평가자
  - 소속 : 농림축산검역본부 인천공항지하본부 특수검역과 탐지견센터
  - 직급 :
  - 성명 :
- 평가일자 : 2016.11.20
- 평가장소 : 인천공항 입국당
- 평가 대상 견 기록 :

구분	내 용	비 고
- 견명	서	
- 품종	믹스	
- 성명	남	
- 생년월일	16.03.15	
- 체중	7.5	

### 평가방법 설명

- 평가자는 여러 가지 자극 및 상황에 대한 반응을 읽고 선택
- 평가자는 견의 반응에 대한 반응, 점수를 해당견의 숫자에 표시
- 각 부분이 끝나면 해당견 번 공간에 해당점수를 기록
- 각 단행렬 점수가 보통(3) 이상의 점수 획득할 경우에 "합격"

### ○ 탐지견 개별 평가표(60행씩)

구분	행동 상황	부동	동행	조동	진동	정지	비고
1. 초상견사 초상견사출발 행동 (10행씩)	초상견사 출동						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
2. 복합견사 복합견사출발 행동 (10행씩)	복합견사 출동						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
3. 시계열 시계열 (10행씩)	시계열 출동						
	시계열 도착						
	시계열 대기						
	시계열 출발						
	시계열 도착						
	시계열 대기						
	시계열 출발						
	시계열 도착						
	시계열 대기						
	시계열 출발						
4. 초상견사 시계열 (10행씩)	초상견사 출동						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
	초상견사 도착						
	초상견사 대기						
	초상견사 출발						
5. 복합견사 시계열 (10행씩)	복합견사 출동						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						
	복합견사 도착						
	복합견사 대기						
	복합견사 출발						

## '남' 복제건의 자질평가

### 3. 1차년도 생산 복제건의 행동학적 기법을 이용한 자견/성견에서 보상물에 대한 집중력 평가

#### 가. 자견에서 보상물에 대한 집중력 평가

##### (1) 연구방법

(가) 검역탐지견 훈련 전(13주령)에 자견이 가지고 있는 보상물(먹이)에 대한 집중도를 평가

(나) 검역탐지견센터와 현장에서 보상물이 주어지는 환경을 각기 다르게 하여 집중도를 평가함

① 핸들러의 손, 바닥, 수하물 바닥, 높은 곳, 수하물 벨트, 혼잡한 케로셀 주위, 혼잡한 환경(긴장상태), 장애물 등이 존재하는 그외 상황으로 나누어 실시하여 보상물을 주저 없이 획득하는 정도를 평가

② 점수 1점, 2점, 3점, 4점, 5점 척도를 적용

\* 1점 : 보상물을 획득 못하고 핸들러에 집중하지 못함

\* 2점 : 보상물을 획득 못하지만 핸들러에 집중하려고 함

\* 3점 : 주저하며 보상물을 획득함(환경에 산만해짐)

\* 4점 : 보상물을 획득하지만 즉각적이지 않음

\* 5점 : 보상물에 지속적으로 집중, 획득

③ 평가 : 평가자 3명의 결과를 취합하여 평균점을 사용

##### (2) 연구결과

(가) 복제견 자견 보상물 집중력 평가 분석 결과

① 2차년도 생산 복제견 중 3두

② 1두(북)는 평가 시기에 건강 (장염) 문제 발생, 평가 미실시

③ “동”, “남” : 매우 우수, “서” : 우수

④ 복제견 3두 모두 평균 4.5의 먹이 보상물에 대한 우수한 집중력을 보임

구분	동	서	남
핸들러 손	5	3	5
바닥	5	4.7	5
수하물바닥	4	5	4.7
높은곳	4.7	4.3	4.7
벨트	5	3.7	4.7
케로셀 주위	5	4	5
긴장상태	4	4	4.3
기타	4	4	5

나. 훈련장에서 박스 및 가방 탐지 과정 중 산만도(Distraction) 평가

(1) 연구방법

(가) 목적취와 반응 관계(목적취를 탐지하면 앉는 반응)를 습득한 시기인 6-7개월령에 박스 와 가방을 사용한 탐지 훈련 중 산만한 정도를 측정하여 탐지 과정에 대한 집중도 평가

- ① 산만도 : 탐지 과정 중 탐지물을 건너뛰는 행동, 탐지물에서 벗어난 행동(탐지물이 아닌 주변에 관심) 회수

(나) 박스 탐지

- ① 박스 10개씩 3열로 배치(총 90개 탐지)
- ② Target 1ro 은닉, 반응시 보상 실시

(다) 가방 탐지

- ① 박스 탐지 후 바로 연이어 탐지가 가능한 동선에 배치
- ② 가방 10개를 3회 탐지(30개)



<박스 탐지 평가 배열>





<가방 탐지 평가 배열>

(라) 평가자 : 3명

(마) 평가 방법 : 1회 탐지(박스 30개, 가방 10개) 시 산만도(회수)를 각기 측정하여 3명의 평균을 사용

① 회수가 증가함에 따라 산만도의 증가 추이 측정 가능

(2) 연구결과

(가) 박스 탐지

① Target 1개 은닉, 10개씩 3열을 총 3번 탐지(90개) 후 Distraction 회수 측정

② 핸들러 1명 탐지, 평가자 3명 평균 사용

③ 결과: 동(평균 2.7회), 서(5.6회), 남(1.9회)의 낮은 산만도를 보임으로 높은 집중력을 지님을 확인. 북의 경우 7.1로 높은 산만도를 보임

구분	1회	2회	3회
동	2	2.3	4
서	5.6	4.6	6.7
남	2.3	1.3	2.3
북	7	7	7.3

(나) 가방 탐지

① 박스 탐지 후 바로 연이어 가방 10개 3회 탐지(30개)

② 평가 방법은 박스탐지와 동일

③ 결과: 동(평균 1.2회), 서(3.5회), 남(1.7회), 북(2.4)의 낮은 산만도를 보임으로 매우 높은 집중력을 지님을 확인

구분	1회	2회	3회
동	0.3	1.7	1.7
서	2.3	3.7	4.7
남	2	2	1.3
북	2.3	3	2

#### 4. 1차년도 생산 신제품 복제건의 검역원 검역 현장 적용 가능성 분석

##### 가. 1차년도 생산 복제건의 검역원 검역 현장 적용 가능성 분석

###### (1) 연구방법

(가) 평가일자 : (10.18 4두 실시)

(나) 평가대상 : 복제건 4두

(다) 평가장소 : 인천공항 여객청사(CIQ)

(라) 평가요소 : 탐지건의 의욕적인 부분

- ① (매우우수, 우수); 환경에 전혀 영향을 받지 않고, 빠르고 정확한 탐지를 하면서 탐지요원의 도움을 필요로 하지 않는 경우
- ② (보통); 적극적인 탐지를 하면서 일반적으로 주위환경에 영향을 받고 탐지요원이 의욕을 북돋움에 의해 관심이 돌아오고 정확한 탐지를 할 수 있는 경우
- ③ (부족); 대체적으로 적극적인 탐지를 하지 않고, 기분을 달래려는 것을 많이 볼 수 있음, 탐지요원이 충분한 의욕을 북돋아 주지 않으면, 정확한 탐지를 할 수 없는 경우

(마) 탐지건의 반응적인 부분: 민감성, 관심성, 적극성의 3가지로 나눔

###### ① 민감성

- 매우우수, 우수; 냄새의 식별능력이 완벽하고 목적물 냄새를 맡았을 때 현저하고 기민한 동작을 보이고 망설임 없이 즉시 냄새의 근원지를 추적하려고 하는 경우
- 보통; 냄새의 식별능력이 뛰어나고 목적물 냄새를 맡았을 때 기민한 움직임을 보이고 냄새의 근원지를 추적할 열의를 보이는 경우
- 부족; 냄새의 식별능력이 부족하고 목적물 냄새를 맡았을 때의 반응이 둔하다

###### ② 관심성

- 매우우수, 우수; 목적물 냄새를 맡은 후 망설임 없이 완벽하게 냄새의 근원지를 탐지한다. 숨겨진 장소에서 떨어지는 일이 전혀 없고, 탐지요원의 충고 등이 필요 없다
- 보통; 목적물 냄새를 맡은 후 적극적으로 냄새의 근원지를 탐지하려 한다. 숨겨진 장소까지는 탐지요원의 충고를 필요 할 때가 있지만 탐지했을 때는 그 장소를 떠나려

하지 않는다.

- 부족; 목적물 냄새를 맡은 후 냄새의 근원지를 탐지하려는 행동이 결여되어 있고, 탐지요원의 충고 등이나 유도 없이 숨겨진 장소까지 도달 할 수 없다.

③ 적극성(공격성) Active Dog

※ 냄새의 근원지에서 발을 긁거나 또는 물어뜯거나 해서 그 장소를 적극적으로 공격하는 것이다.

- 매우우수, 우수; 목적물이 숨겨진 장소에 대하여 망설임 없이 즉시 미친 듯한 강한 공격이 나오는 경우 탐지요원의 부추김을 필요로 하는 일이 없고 또 공격을 멈추는 일이 일절 없다.
- 보통; 목적물이 숨겨진 장소에 대하여 적극적인 공격을 보인다. 탐지요원의 부추김은 다소 필요하지만 주저함이 없고, 대상물에서 떨어지려는 일이 없다.
- 부족; 공격함에 있어 탐지요원의 부추김이 필요하다. 또 공격 시에 기분을 달래는 것이 나타나므로 공격 중에 그만뒀 버리는 일도 볼 수 있다

(1) 연구결과

(가) 복제견 체중변화 그래프: 복제견들모두 나이에 따라 다른 체중 변화를 보였으나 최종적으로 유사한 체중을 보여주었으며 정상적으로 증가

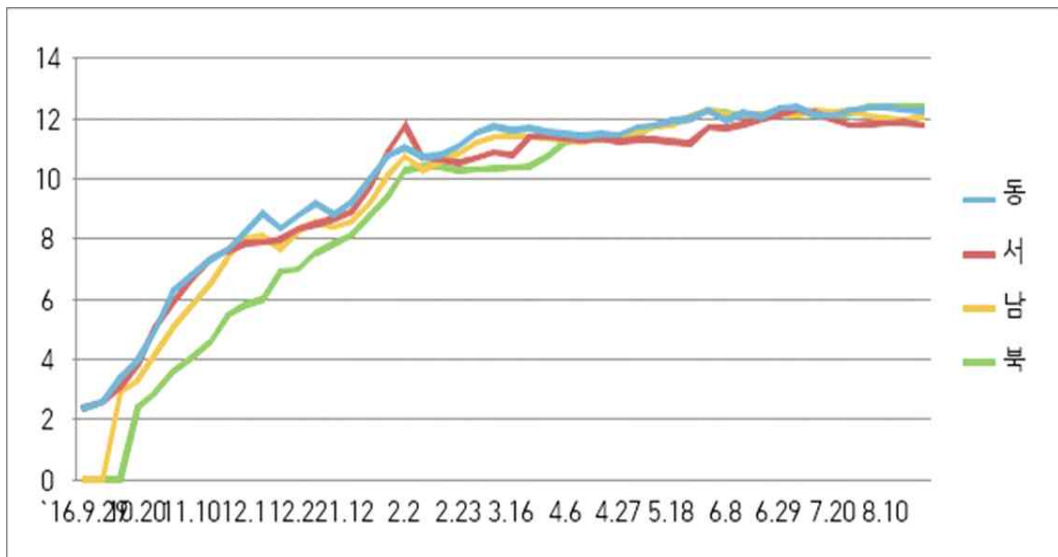


그림 128. 복제 검역견의 생후 체중 변화 추이

(나) 탐지견 최종 선발 평가결과: 신품중 복제견 모두 탐지견 최종선발에 합격



표 71. 복제 검역탐지견 최종평가 점수

구분		견 명			
		동	서	남	북
평가자	평가자1	90	95	85	80
	평가자2	90	95	85	80
	평가자3	90	90	90	85
평가 점수		90.00	93.33	86.67	81.67
평가 결과		합격	합격	합격	합격

※ 평가결과 점수 60미만의 경우 불합격

(가) 탐지견 자질 평가결과 세부내용

### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구 분	탐지요원	검역탐지견 및 성별	생년월일	품 중	평가일자
	교관	동, ♂	`16.8.15	비글	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			검역탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	90
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	
<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)		
탐지요원 (100점)	* 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점 )				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 전상대 파악 미흡				100
	<input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 출의 취급이 부적절하여 탐지 시 방해물 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령어 사용 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 베껴고 탐지 함				
	<input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응을 보일 때의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들링의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함				
	<input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족				
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 만점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					총 점
평가자 의견	* 탐지견이 짚은 잔류물이 떨어져 냄새에 대한 민감한 반응이 좋음				90

### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구 분	탐지요원	검역탐지견 및 성별	생년월일	종 종	평가일자
	교관	서, ♂	`16.8.15	비달	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			검역탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	95
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input type="checkbox"/> 우수(15)	<input type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	
<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)		
탐지요원 (100점)	• 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점 )				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 견상태 파악 미흡				100
	<input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 줄의 취급이 부적절하여 탐지 시 방해물 중				
	<input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령어 사용 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 태먹고 탐지 함				
	<input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응을 보일 때의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들링의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함				
	<input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족				
<input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족					
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 만점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					총 점
평가자 의견	• 감지의욕이 적고 집중력이 떨어져서 목적물에 대한 적극적인 반응이 없음				95

### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구 분	탐지요원	검역탐지견 및 성별	생년월일	품 종	평가일자
	교관	남, ♀	`16.8.25	비글	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			검역탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	85
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	
<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)		
탐지요원 (100점)	* 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점 )				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 전상태 파악 미흡 <input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함 <input type="checkbox"/> 견 줄의 취급이 부적절하여 탐지 시 방해물 줌 <input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령어 사용 부족 <input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줌 <input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 빼먹고 탐지 함 <input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응을 보일 때의 적절한 대처능력 부족 <input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들링의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함 <input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족 <input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족				100
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 만점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					총 점
평가자 의견	* 탐지견의 반응이 우수하여 목적물에 대한 반응이 양호함 있음				85

### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구 분	탐지요원	검역탐지견 및 성별	생년월일	품 종	평가일자
	교관	복, ♂	'16.9.9	비글	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			검역탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input checked="" type="checkbox"/> 보통(10)	
	<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	
탐지요원 (100점)	• 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점 )				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 건상태 파악 미흡				
	<input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 출의 위급이 부적절하여 탐지 시 방해물 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령이 사용 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 빠르고 탐지 함				
	<input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응을 보일 때의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들링의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함				
	<input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족				
<input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족					
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 단점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					
평가자 의견	• 탐지대응이 좋으며 목적물에 대한 적정인 환각이 있음, 대하 번영의 환각이 있음				

### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구 분	탐지요원	검역탐지견 및 성별	생년월일	품 종	평가일자
	교관	동 . ♂	` 16.8.15	비글	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			검역탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	
	<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	90
탐지요원 (100점)	* 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점 )				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 견상태 파악 미흡				
	<input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 중의 취급이 부적절하여 탐지 시 방해됨				
	<input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령어 사용 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 빼먹고 탐지 함				
	<input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응을 보일 때의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들링의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함				
	<input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족				
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 만점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					총 점
평가자 의견	* 성적이 높고 찬성적응력이 뛰어나다.				90

[별지 제7호 서식]

### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구분	탐지요원	검역탐지견 및 성별	생년월일	품종	평가일자
	교관	서, ♂	'16.8.15	비글	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			검역탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input type="checkbox"/> 우수(15)	<input type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	
	<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	
탐지요원 (100점)	* 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점)				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 견상태 파악 미흡				
	<input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 줄의 취급이 부적절하여 탐지 시 방해됨				
	<input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령어 사용 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 비껴고 탐지 함				
	<input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응은 보일 때의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들링의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함				
	<input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족				
<input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족					
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 만점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					총 점
평가자 의견	* 경주원이 매우 반응 및 도전적이 뛰어나.				95

### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구 분	탐지요원	검역탐지견 및 성별	생년월일	품 종	평가일자
	교관	남, ♂	`16.8.25	비글	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			검역탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	85
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	
<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)		
탐지요원 (100점)	◦ 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점 )				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 견상태 파악 미흡				100
	<input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 줄의 취급이 부적절하여 탐지 시 방해물 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령어 사용 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 비리코 탐지 함				
	<input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응을 보일 때의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들링의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함				
	<input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족				
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 만점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					충 점
평가자 의견	◦ 지속적 현장 증거경험 필요.				85



### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구 분	탐지요원	검역탐지견 및 상병	생년월일	종 종	평가일자
	교관	동, 조	`16.8.15	비급	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			검역탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	
	<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	
탐지요원 (100점)	◦ 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점 )				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 견상태 파악 미흡				
	<input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 줄의 취급이 부적절하여 탐지 시 방해물 중				
	<input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령이 사용 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 빼먹고 탐지 함				
	<input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응을 보일 때의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들러의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함				
	<input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족				
<input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족					
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 만점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					총 점
평가자 의견	◦ <u>탐지의욕 적절치</u> 우수, <u>현장검역업무</u> 에 대한 <u>적응성</u> 필요				90

### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구 분	탐지요원	검역탐지견 및 성별	생년월일	품 종	평가일자
	교관	서, ♂	`16.8.15	비글	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			검역탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	90
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	
<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)		
탐지요원 (100점)	◦ 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점 )				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 건상태 파악 미흡				100
	<input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 줄의 위급이 부적절하여 탐지 시 방해물 중				
	<input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령어 사용 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 빼먹고 탐지 함				
	<input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응을 보일 때의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들링의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함				
	<input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족				
<input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족					
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 만점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					총 점
평가자 의견	◦ 탐지의욕이 강하며, 검역탐지견에 대한 눈빛도가 우수				90

[별지 제7호 서식]

### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구 분	탐지요원	검역탐지견 및 성별	생년월일	품 종	평가일자
	교관	남, ♂	'16.8.25	비글	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			검역탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	
	<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	90
탐지요원 (100점)	* 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점 )				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 견상태 파악 미흡				100
	<input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 줄의 위급이 부적절하여 탐지 시 방해물 줄				
	<input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령이 사용 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줄				
	<input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 테벽고 탐지 함				
	<input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응을 보일 때의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들링의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함				
	<input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족				
<input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족					
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 만점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					총 점
평가자 의견	* 탐지의욕은 적상이 주수. 현행 검역분야에 대한 적응성 필요				90

[별지 제7호 서식]

### 탐지요원 및 검역탐지견 평가표

구 분	탐지요원	검역탐지견 및 성별	생년월일	품 종	평가일자
	교관	복, ♂	16.9.9	비글	10.18
탐지장소	인천국제공항 CIQ				
분야	평가 항목				
탐지견 (100점)	탐지의욕(40점)	목적물에 대한 반응(60점)			85
		민감성	관심성	적극성	
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(40)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	<input type="checkbox"/> 매우우수(20)	
	<input type="checkbox"/> 우수(35)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(15)	
	<input type="checkbox"/> 보통(30)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	<input type="checkbox"/> 보통(10)	
	<input type="checkbox"/> 부족(25)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	<input type="checkbox"/> 부족(5)	
탐지요원 (100점)	* 해당란에 <input type="checkbox"/> 또는 <input checked="" type="checkbox"/> 표시(탐지요원 평가 <input checked="" type="checkbox"/> 는 감점 )				탐지요원 점수
	<input type="checkbox"/> 탐지견 핸들러의 자세 및 탐지견의 의욕 등 건상태 파악 미흡				100
	<input type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 줄의 휘급이 부적절하여 탐지 시 방해물 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지 시 적절한 명령어 사용 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 승객에게 거부감을 줌				
	<input type="checkbox"/> 탐지대상 물품을 빼먹고 탐지 함				
	<input type="checkbox"/> 비목적물에 대한 반응을 보일 때의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지활동 시 핸들링의 미숙으로 탐지견이 흥미를 갖지 못함				
	<input type="checkbox"/> 탐지견의 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족				
	<input type="checkbox"/> 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족				
평가기준	① 탐지견, 탐지요원 평가는 각 100점을 만점으로 한다. ② 평가 결과 각 분야 중 만점의 60%(60점) 미만이면 부적합으로 판정한다.				
평가자					총 점
평가자 의견	" 지목된 현상 성격 명칭 필요"				85

## 5. 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 검역탐지견 훈련 및 평가

### (1) 연구방법

(가) 근육 특이 PCK1 발현 또는 PPAR $\delta$  발현 복제건의 유견/자견 자질 행동 평가

- ① 6-8주령 유견에서의 자질 행동평가를 위한 Volhard test의 적용
- ② 10개 항목 (사회적 친화도, 따르기, 구속, 사회적 우위성, 거상우위성, 회수능력, 촉각 민감성, 청각 민감성, 시각 민감성, 안정성)의 행동 평가



그림 129. 복제 검역탐지견의 유견 자질평가를 위한 방법

(나) 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 탐지견 선발 테스트 및 검역현장 적용 검증

- ① 13주령의 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 자견에서 보상먹이 자극에 대한 반응 (손에 있는 먹이, 바닥에 있는 먹이, 수하물 바닥에 있는 먹이, 높은 곳에 있는 먹이, 벨트에 있는 동안의 먹이, 케로셀 주변의 먹이, 긴장상태일 때의 먹이, 기타 이외의 먹이 등 8개 항목)의 평가
- ② 13주령의 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 환경 적응성 (수하물, 케로셀, 출입문, 생소한 새로운 지역, 목소리에 의한 칭찬반응, 촉각 자극, 소리 자극, 소음, 소란스런 목소리, 생소한 개, 고양이 소리, 용기 또는 크레이트에 대한 적응, 가죽 끈에 대한 적응, 사람에 의한 갑작스런 이동, 발 및 꼬리조작상태, 우산에 대한 반응, 낙하 수하물에 대한 반응, 기타 상태의 환경 적응성 등 16개 항목) 평가
- ③ 13주령의 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 사회성 (어린이 또는 성인, 소 그룹의 사람들, 핸들러와의 일대 일 반응, 쾌활성, 복종성, 기타 등 7개 항목) 평가
- ④ 13주령의 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 보행상태 (움직이는 컨베이어 벨트, 계단, 타일, 철망 및 기타 상태 등 5개 항목)

- ⑤ 13주령의 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 장애물에 대한 반응 (수하물, 카트, 자연장애물 및 기타 등 4개 항목)평가 등 총 40개 항목 평가를 통한 검역탐지건으로서의 적격심사 및 행동평가 수행
- ⑥ 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 유건/자건 자질에 대한 상대적 비교를 위해 2차년도 복제 검역탐지건과의 결과 비교 및 통계학적 분석 실시

(2) 연구결과

(가) 운동능 향상(PCK1 발현) 복제건 유건평가 결과

- ① 처음 시도한 근육 특이 PCK1 발현 복제건으로 건강상태 점검을 위해 생산처에서 11주 까지 양육, 검사를 실시하여 검역탐지건센터에서 유건평가 시기인 6~7주를 경과하여 인수. PCK1 발현 복제건에 대한 유건평가 불가

(나) 탐지건 자질평가 결과(우주)

- ① 총 40가지 항목을 3명의 handler가 분석한 결과 4.2(164.3)점 이상을 획득 합격

표 70. 복제건의 자건자질평가 세부 사항

구분		건 명
		우주
평가자	평가자1	4.18(164.0)
	평가자2	4.0(160.0)
	평가자3	4.26(169.0)
평가 점수		4.2(164.3)
평가 결과		합격

○ 탐지견 자질 평가표(우수)

구분	평가 항목	평가자1	평가자2	평가자3
○ 보상역이 자극에 대한 반응 (8항목)	○ 손에 있는 먹이	3	3	4
	○ 바닥에 있는 먹이	3	3	4
	○ 수하물 바닥에 있는 먹이	4	3	4
	○ 높은곳에 있는 먹이	4	4	4
	○ 벨트에 있는 동안	4	4	4
	○ 켈류질 주머니	5	4	4
	○ 긴장상태	4	3	4
	○ 기타	4	3	4
	○ 평균 :	3.88	3.58	4.00
○ 항목평균 :	3.75			
○ 환경 적응 (16항목)	○ 수하물 소리	4	4	4
	○ 켈류질	4	4	4
	○ 출입문	4	4	4
	○ 생소한 새로운 지역	3	4	4
	○ 목소리에 의한 칭찬 반응	4	5	5
	○ 출라 자극	4	4	5
	○ 소리 자극	4	4	5
	○ 소음, 소란스런 목소리	4	4	4
	○ 생소한 개, 고양이	3	4	4
	○ 용기, 크레이프	4	4	4
	○ 가죽끈, 목걸이	5	5	5
	○ 손에 의한 압박스런 이동	4	5	4
	○ 발 및 꼬리 조작상태	4	5	5
	○ 우산에 대한 반응	4	4	4
	○ 낙하수하물에 대한 반응	4	4	4
	○ 기타	4	4	4
○ 평균 :	3.94	4.25	4.31	
○ 항목평균 :	4.17			
○ 사회성 (7항목)	○ 어린이	4	4	4
	○ 성인	5	4	4
	○ 소그룹	4	3	4
	○ 1대1(one on one)	5	4	4
	○ 群體성	5	4	4
	○ 복종성	4	4	4
	○ 기타	4	4	4
	○ 평균 :	4.43	3.86	4.00
○ 항목평균 :	4.1			
○ 보행상태 (5항목)	○ 움직이던 컨베이어 벨트	5	4	4
	○ 계단	5	4	4
	○ 타일	4	4	4
	○ 철망	4	4	4
	○ 기타	4	4	4
	○ 평균 :	4.40	4.00	4.00
○ 항목평균 :	4.1			
○ 장애물예 대한반응 (4항목)	○ 수하물	4	5	5
	○ 카트	5	5	5
	○ 자연장애물	4	4	5
	○ 기타	4	4	5
	○ 평균 :	4.25	4.50	5.00
○ 항목평균 :	4.6			

(나) 먹이보상에 대한 집중력 평가 결과(13주령)

구분	우주
핸들러 손	3.3
바닥	3.3
수하물바닥	3.7
높은곳	4.0
벨트	4.0
케로셀 주위	4.3
긴장상태	3.7
기타	3.7

(다) 박스 및 가방 탐지 과정 중 Distraction 평가(6~7개월령)

① 박스탐지 평가결과 평균 1.26회로 매우 낮은 산만도를 보였으며, 신폼중 4두에 비해서도 매우 높은 집중력을 지님을 확인

구분	1회	2회	3회
우주	2.2	0.8	0.8

① 가방탐지 평가결과 평균 0.9회로 매우 낮은 산만도를 보였으며, 신폼중 4두에 비해서도 매우 높은 집중력을 지님을 확인

구분	1회	2회	3회
우주	2.1	0.4	0.4

나. 스마트 탐지견으로의 근육 특이 PCK1 발현 복제건 검역 현장 적용 검증

(1) 연구방법

(가) 검역현장 적용 가능성을 파악하기 위해 인계 이후 정상적 발달 평가

(나) 정기 월례회의 참석을 통한 복제 탐지견의 탐지 행동 및 현장 적응력의 보고 수행

(다) 훈련 외의 탐지견 행동 평가 등을 통한 현장적용 가능성 심사

(2) 연구결과

(가) 현재 인천공항 현장적용훈련 적응 중이며, 적응훈련 종료 후 2019년 현장적용 검증 예정이었으나 과제 중단으로 진행 불가



## 6. 근육 특이 PPAR $\gamma$ 발현 복제건의 유전/자전 자질 행동 평가

### (1) 연구방법

(가) 근육 특이 PPAR $\gamma$  발현 또는 PPAR $\delta$  발현 복제건의 유전/자전 자질 행동 평가

- ① 6-8주령 유견에서의 자질 행동평가를 위한 Volhard test의 적용
- ② 10개 항목 (사회적 친화도, 따르기, 구속, 사회적 우위성, 거상우위성, 회수능력, 촉각 민감성, 청각 민감성, 시각 민감성, 안정성)의 행동 평가



그림 130. 복제 검역탐지견의 유전 자질평가를 위한 방법

### (2) 연구결과

(가) Volhard Test(7주령평가) : 특수목적견에 적합한 2 타입을 보임

구분		결과
사회적친화도	Pack drive	1
따르기		1
사회적우위성		1
유형	1	
구속	Defense drive	1
거상우위성		2
유형	2	
회수능력	Prey drive	3
촉각민감성		5
청각민감성		3
시각민감성		2
유형	3	
최종결과	2	

(나) 탐지견 자질평가 결과(은하)

① 총 40가지 항목을 3명의 handler가 분석한 결과 평균 4.1(164)점의 높은 점수로 합격

표 70. 복제견의 자견자질평가 세부 사항

구분		견 명
		은하
A	평가자1	3.96(159.0)
	평가자2	4.57(184.0)
B	평가자1	3.89(154.0)
	평가자2	3.98(160.0)
평가 점수		4.1(164)
평가 결과		합격

※ 평가자 인력 부족으로 2회 평가 실시

○ 탐지견 자질 평가표(은하)

구 분	평가 항목	평가자1	평가자2	평가자3	평가자4
○ 보상먹이 자극에 대한 반응 (8항목)	○ 손에 있는 먹이	4	5	4	4
	○ 바닥에 있는 먹이	4	4	4	4
	○ 수하물 바닥에 있는 먹이	4	5	4	4
	○ 높은곳에 있는 먹이	4	5	3	3
	○ 벨트에 있는 동안	4	5	4	4
	○ 케로셀 주변	4	4	4	4
	○ 긴장상태	4	5	4	4
	○ 기타	4	5	4	4
	○ 평균 :	4.00	4.75	3.88	3.88
	○ 항목평균 :	4.13			
○ 환경 적응 (16항목)	○ 수하물 수레	4	5	4	5
	○ 케로셀	4	5	4	5
	○ 출입문	4	4	4	4
	○ 생소한 새로운 지역	4	5	3	4
	○ 목소리에 의한 칭찬 반응	4	5	4	4
	○ 촉각 자극	4	4	4	4
	○ 소리 자극	4	4	4	4
	○ 소음, 소란스런 목소리	4	4	3	3
	○ 생소한 개, 고양이	4	4	3	4
	○ 용기, 크레이트	4	5	4	4
	○ 가죽끈, 목걸이	4	5	4	4
	○ 손에 의한 갑작스런 이동	4	5	4	4
	○ 발 및 꼬리 조작상태	4	5	4	4
	○ 우산에 대한 반응	4	5	4	4
	○ 낙하수하물에 대한 반응	4	4	3	4
	○ 기타	4	5	4	4
	○ 평균 :	4.00	4.63	3.75	4.06
○ 항목평균 :	4.11				
○ 사회성 (7항목)	○ 어린이	4	4	4	4
	○ 성인	4	4	4	4
	○ 소그룹	4	4	4	4
	○ 1대1(one on one)	4	5	4	4
	○ 쾌활성	4	5	4	5
	○ 복종성	4	5	4	4
	○ 기타	4	5	4	4
	○ 평균 :	4.00	4.57	4.00	4.14
	○ 항목평균 :	4.18			
○ 보행상태 (5항목)	○ 움직이는 컨베이어 벨트	4	5	4	4
	○ 계단	3	4	3	3
	○ 타일	4	4	4	4
	○ 철망	4	4	4	4
	○ 기타	4	5	4	4
	○ 평균 :	3.80	4.40	3.80	3.80
	○ 항목평균 :	3.95			
○ 장애물에 대한반응 (4항목)	○ 수하물	4	5	4	4
	○ 카트	4	5	4	4
	○ 자연장애물	4	4	4	4
	○ 기타	4	4	4	4
	○ 평균 :	4.00	4.50	4.00	4.00
	○ 항목평균 :	4.13			

(다) 먹이보상에 대한 집중력 평가 결과(13주령): 4.2로 우수한 집중력을 지님

구분	은하
핸들러 손	4.3
바닥	4.0
수하물바닥	4.3
높은곳	3.8
벨트	4.3
케로셀 주위	4.0
긴장상태	4.3
기타	4.3

## 7. 종합결과

가. 복제견 6두는 최종선발 평가를 통해 자질 능력이 검증되었으나, 스마트 복제 탐지견의 능력검증은 일반견과의 비교, 검역탐지견 자격 요건 기준을 통과한 다수의 복제견 개체로 일정 기간 이상 객관적인 검증이 더 필요할 것으로 판단된다.

복제견 동의 경우 최종선발 이후 일정 기간(2년령) 탐지 활동 중 질병(오른쪽 뒷다리의 미약한 파행, 간질 등)이 발견되어 수의사 소견\*에 따라 활동을 중지하고 치료견으로 분류되었으며, 일부 복제견에서 질병 및 선천적인 심장 기형 등이 발견되어 검역탐지견으로 수행이 불가능한 것을 확인하였다.

\* 수의사소견 : 특발성간질, 뒷 발목 관절의 퇴행성 관절염, 골연골증 혹은 아탈구.

검역탐지견의 자격 요건에 가장 기본 자질은 건강이며, 향후 체세포 공여견에 대한 과학적 정밀 검사, 유전적인 질병 유무, 건강, 성품 등의 기준이 마련되어야 한다고 판단된다.

## [1협동: 운동능/집중력향상 유전자조절 세포 생산 및 분석연구]

### 1. 운동능 향상 유전자 I (PCK1 유전자) 발현 세포주 제작

가. 형질전환 세포주 제작에 적합한 세포주 및 유전자 전이 vector system의 선별

(1) 연구방법

- (가) 형질전환 세포주 제작에 있어서 적합한 세포주와 유전자 전이 vector system을 선별하기 위하여 먼저 GFP 표지 유전자가 도입된 lentivirus vector와 PiggyBac vector를 재조합 실시
- (나) 기존의 형질전환 복제건 생산 연구에서 사용된 세포주인 성체섬유아세포(fibroblast)와 지방줄기세포(Adipose-derived stem cell, ASC)를 대상으로 각 vector system을 도입하여 표지 유전자인 GFP의 발현 양상을 형광현미경 관찰 방법을 이용하여 비교 분석 실시

(2) 연구결과

- (가) 형질전환 세포주 제작을 위한 GFP 표지 유전자가 도입된 lentivirus vector와 PiggyBac vector의 cloning.

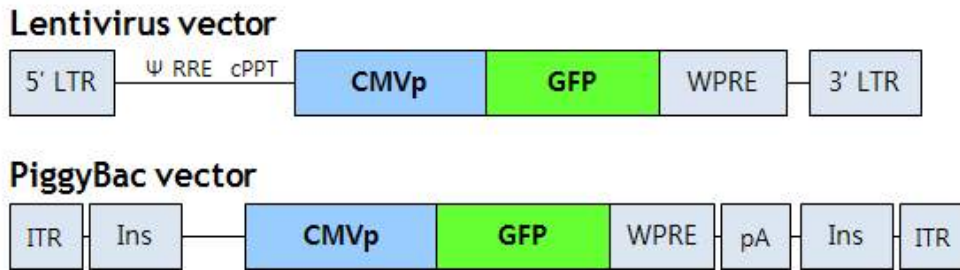


그림 131. 유전자 전이 vector system

- (나) 구축한 각각의 vector를 성체섬유아세포와 지방줄기세포에 도입하여 GFP 유전자의 발현 양상을 비교 분석한 결과, 형질전환 복제건 생산에 사용할 세포주로는 성체섬유아세포에 비해서 지방줄기세포가 보다 적합한 것으로 판단

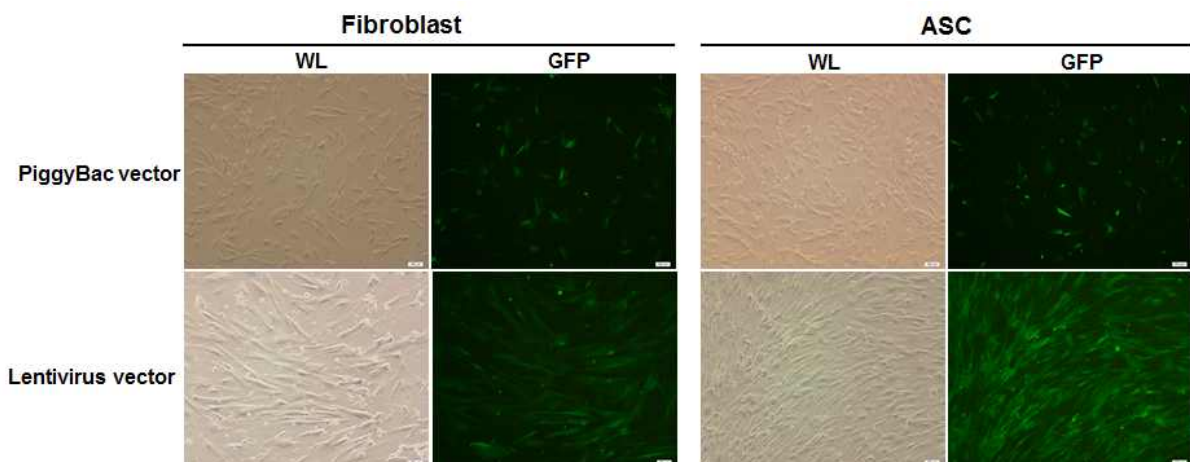


그림 132. PiggyBac vector와 lentivirus vector를 성체섬유아세포(fibroblast)와 지방줄기세포(ASC)에 도입한 후 GFP 유전자의 발현 양상 확인

(다) 또한, 형질전환 복제건 생산에 사용할 유전자 전이 vector system으로는 lentivirus vector와 PiggyBac vector가 모두 사용 가능한 것으로 확인

나. 근육 특이적인 PCK1 유전자 발현 세포주의 제작

(1) 연구방법

- (가) 근육 특이적 promoter인  $\alpha$ -skeletal muscle actin promoter (ACTA promoter)와 myoglobin promoter (Mb promoter)의 합성
- (나) 각 promoter의 조절 하에 GFP 표지 유전자를 도입한 PiggyBac vector 구축
- (다) 구축한 각각의 vector를 mouse myoblast 세포인 C2C12에 도입하여 GFP 유전자의 근육 특이적 발현에 대한 *in vitro* 검정 실시
- (라) 근육 특이적 promoter의 조절 하에 PCK1 유전자를 도입한 PiggyBac vector cloning.
- (마) 구축한 vector를 표적세포에 도입한 후 도입한 유전자에 대한 분자생물학적 분석 실시

(2) 연구결과

- (가) 근육 특이적 promoter인 ACTA promoter (2,372 bp)와 Mb promoter (511 bp)의 합성 완료
- (나) 각 promoter의 조절 하에 GFP 표지 유전자를 도입한 PiggyBac vector 구축

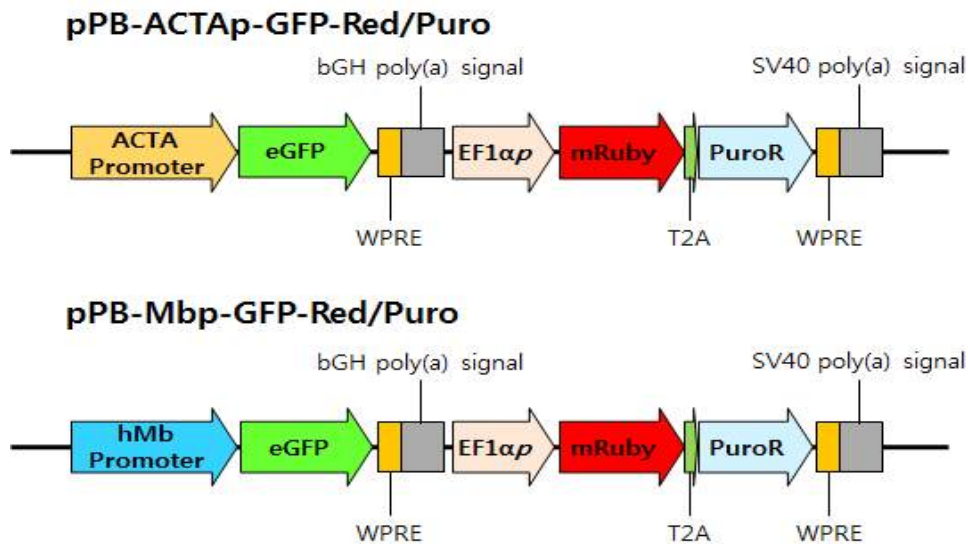


그림 133. 근육 특이적 promoter와 GFP 표지 유전자를 도입한 PiggyBac vector의 구조

- (가) 근육 특이적 promoter인 ACTA promoter와 Mb promoter의 세포 특이적 활성 확인을 위하여 각 vector를 다양한 표적세포에 도입한 후 GFP 표지 유전자의 발현 양

상 비교 결과, 두 promoter 모두 근육세포인 C2C12 세포에서 가장 강한 발현을 나타내는 것으로 확인

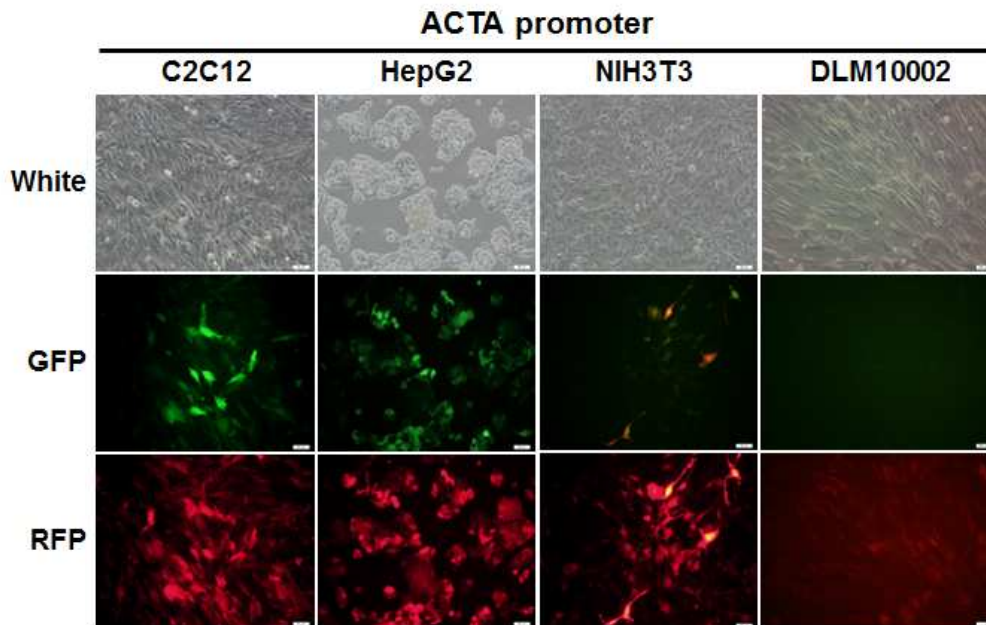


그림 134. ACTA promoter의 조절 하에 세포 특이적 유전자 활성화 확인

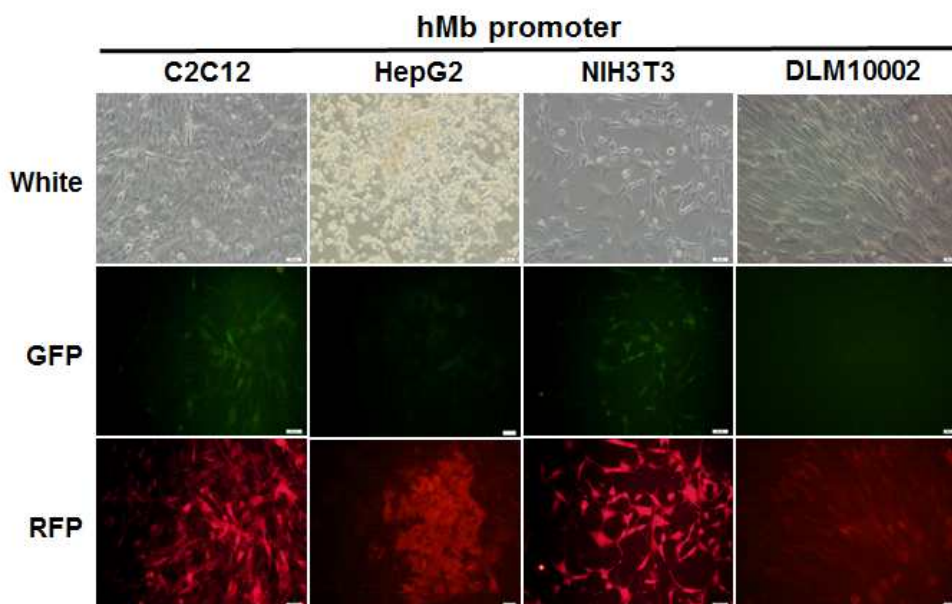


그림 135. hMb promoter의 조절 하에 세포 특이적 유전자 활성화 확인

(나) pPB-ACTAp-GFP-Red/Puro vector를 C2C12에 도입하여 GFP 유전자의 근육 특이적 발현에 대한 *in vitro* 검정을 시행한 결과, mouse myoblast cell line인 C2C12이 myotube 형태로 분화됨에 따라 ACTA promoter 조절 하의 GFP 유전자의



발현이 비례적으로 강해지는 것으로 확인

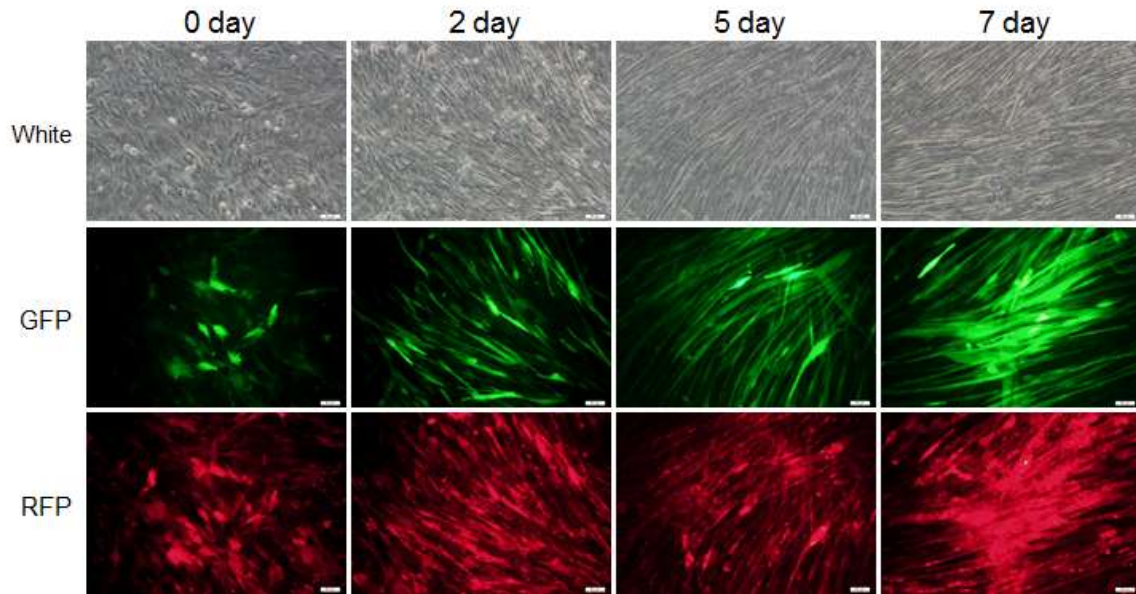


그림 136. 근육세포의 분화 유도에 따른 ACTA promoter의 활성 확인

(다) C2C12 세포의 분화 유도 조건에 따른 각 근육 특이적 promoter 조절 하의 GFP 유전자의 발현은 horse serum의 농도가 낮을수록, 즉 분화가 강하게 유도될수록 발현이 강해지는 양상을 보임

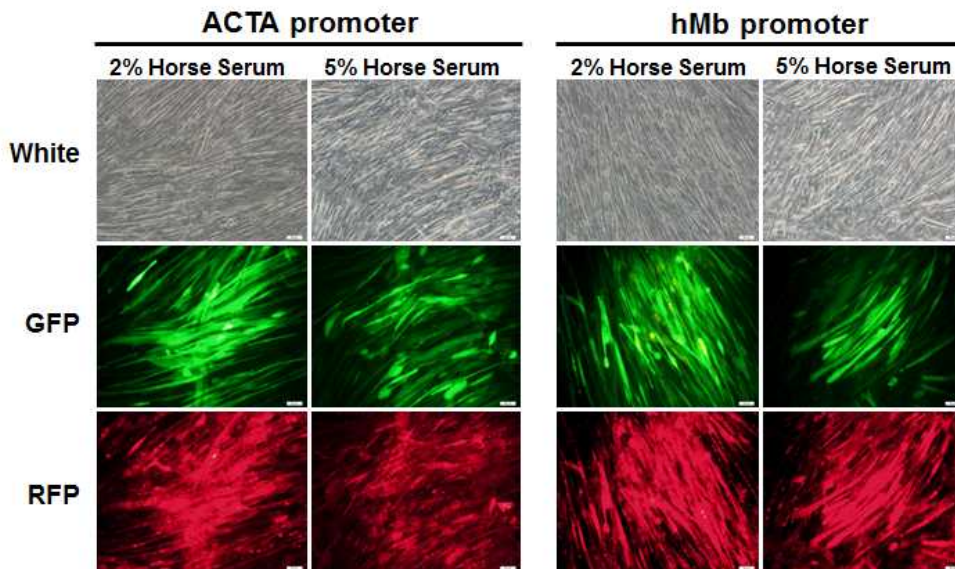


그림 137. C2C12 세포의 분화 유도 조건에 따른 각 근육 특이적 promoter 조절 하의 GFP 유전자의 발현 양상 분석

(라) PCK1 유전자(1,896 bp)의 합성 완료



(마) 근육 특이적 promoter의 조절 하에 PCK1 유전자를 도입한 PiggyBac vector의 cloning 완료

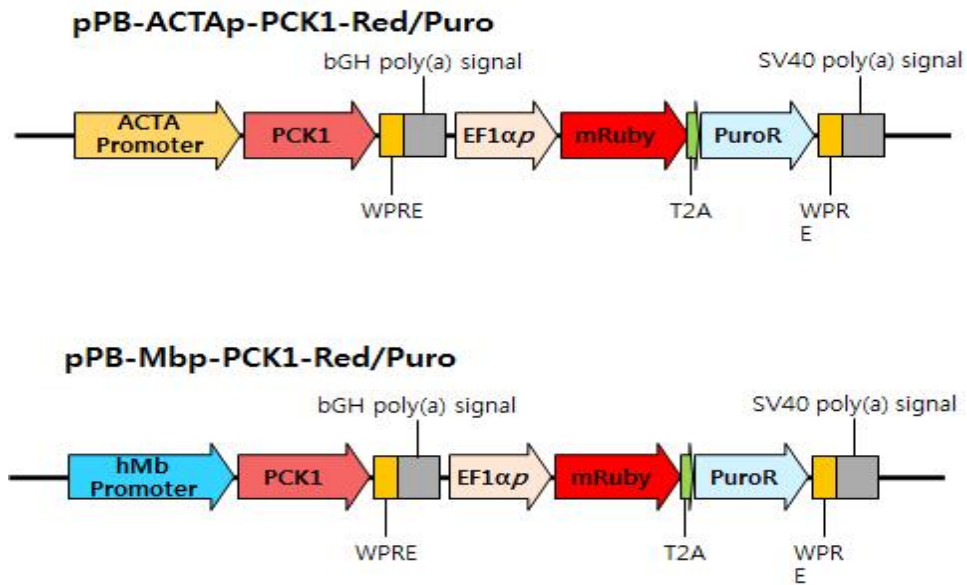


그림 138. 근육 특이적 promoter의 조절 하에 PCK1 유전자를 도입한 PiggyBac vector의 구조

(바) 구축한 vector를 지방줄기세포에 도입한 후 분자생물학적 분석을 실시한 결과, RT-PCR에서 각 vector가 genome 내로 도입되었음을 확인하였으며 표지 유전자인 mRuby의 발현을 형광 현미경 하에서 관찰

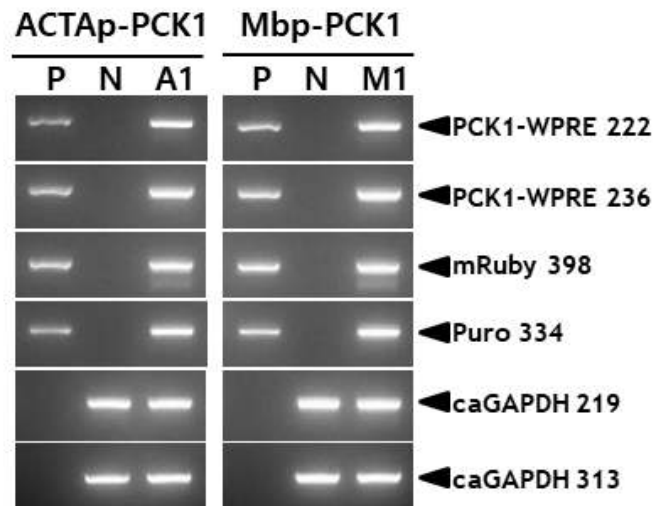


그림 139. 각 vector가 전이된 지방줄기세포에서의 RT-PCR 분석

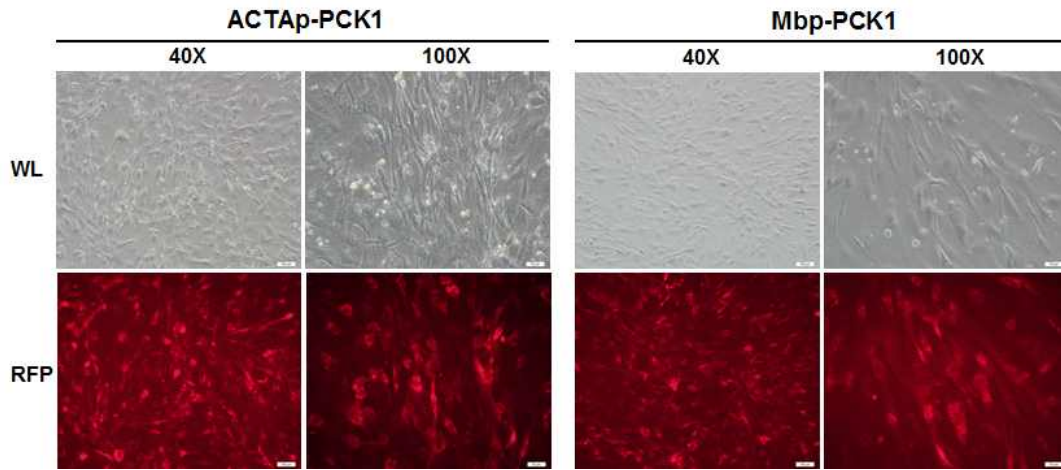


그림 140. 각 vector가 전이된 지방줄기세포에서 mRuby 유전자의 발현 양상 확인

## 2. 운동능 향상 유전자 I (PCK1 유전자) 발현 형질전환 복제건의 생산에 사용하기 위한 형질전환 세포주 제작 및 PCK1 유전자 발현 복제건의 분자생물학적 분석을 위한 예비 실험

가. 근육 특이 PCK1 형질전환 복제건 생산에 사용하기 위한 PCK1 형질전환 세포주의 제작 및 분자생물학적 분석

### (1) 연구방법

(가) 근육 특이적 promoter의 활성 확인 평가

(나) PiggyBac vector의 전이 효율이 상대적으로 높은 핵이식용 세포주 선별

(다) 제1세부과제에서 공급받은 지방줄기세포에 pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector를 도입하여 세포주를 구축한 후 분자생물학적 검정을 실시하였으며, vector의 전이 및 발현이 확인된 세포주는 동결한 후 형질전환 복제건 생산을 위하여 제1세부과제로 공급

(라) 근육 특이적 PCK1 발현 복제건에 대한 분자생물학적 분석 실시를 위해 제1세부과제에서 보유 중인 PPAR $\alpha$  발현 복제건을 대상으로 한 예비 실험 실시

(마) 그 일환으로 PPAR $\alpha$  발현 복제건의 피부조직으로부터 genomic DNA를 분리하여 PPAR $\alpha$  유전자 및 copGFP, 그리고 WPRE 서열에 대한 primer로 PCR을 실시

(바) 각 형질전환 복제건의 genomic DNA를 BamH I 제한효소로 one cut하여 PPAR $\alpha$  유전자에 대한 probe로 hybridization 반응 후, 전이된 외래 유전자의 copy 수를 확인

(사) 이상의 실험에서 구축한 분자생물학적 분석 방법은 차후 PCK1 형질전환 복제건의 분자생물학적 분석에 적용

(2) 연구결과

- (가) PCK1 발현 복제건 생산이 아직 진행 중이므로 본 협동과제에서는 복제건 생산에 사용된 세포주 생산 및 분자생물학적 검정과 공급
- (나) 운동능이 향상된 형질전환 복제건 생산에 사용하기 위한 근육 특이적 promoter의 활성을 확인하기 위하여 각 promoter 조절 하에 GFP 유전자가 도입된 PiggyBac vector를 지방줄기세포의 도입한 후 *in vitro* assay 실시.
- (다) pPB-ACTAp-GFP-Red/Puro와 pPB-Mbp-GFP-Red/Puro vector를 지방줄기세포에 도입하여 *in vitro* 검정을 실시한 결과, RT-PCR에서는 세포 genome 내로의 각 vector의 전이를 확인하였으며, 형광 현미경을 이용한 세포 관찰에서는 근육 특이적 promoter의 조절 하에 도입된 GFP 유전자 발현이 EF1a promoter 조절 하에 도입된 mRuby 유전자의 발현에 비해 약한것으로 확인됨. 이는 ACTA promoter와 myoglobin promoter가 근육조직 특이적으로 유전자의 발현을 국한시키기 때문인 것으로 사료

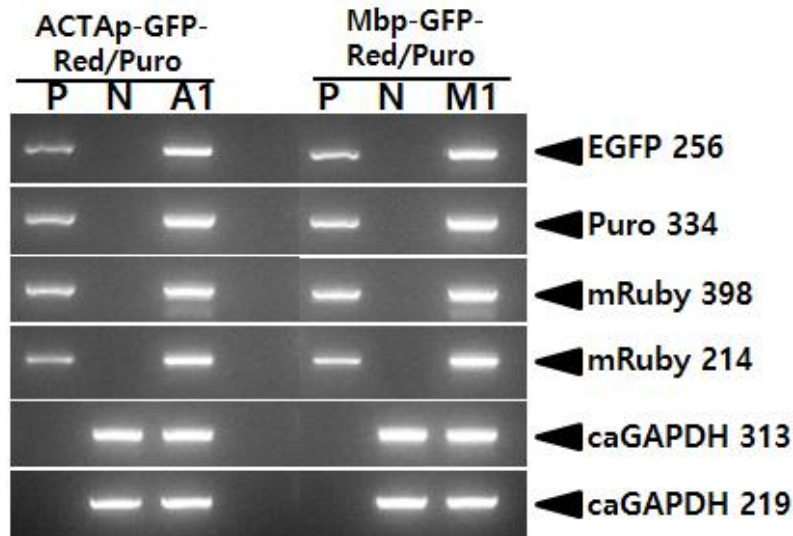


그림 141. 각 vector가 도입된 지방줄기세포의 RT-PCR 분석

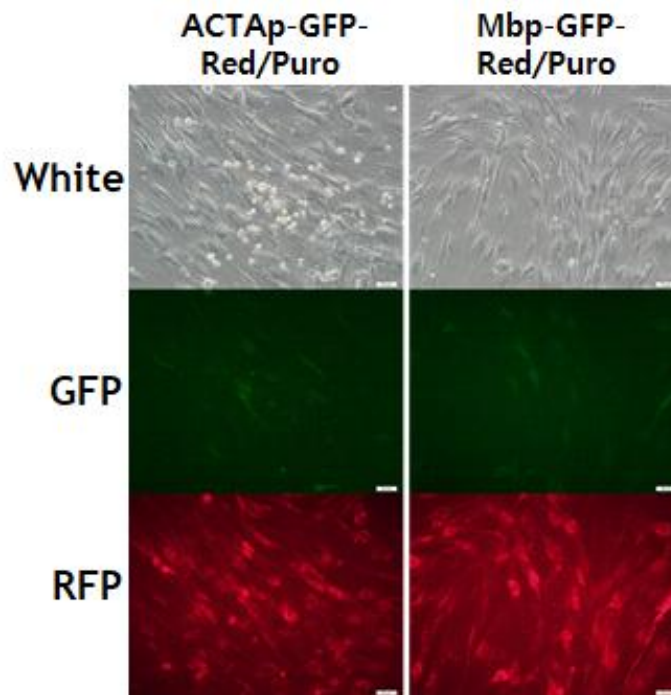


그림 142. 각 vector가 도입된 지방줄기세포의 녹색 형광 단백질 유전자와 적색 형광 단백질 유전자의 발현 관찰

(가) 근육 특이적으로 PCK1 유전자가 발현되는 세포주 생산 및 분자생물학적 검정을 실시하기 위하여 pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector를 구축

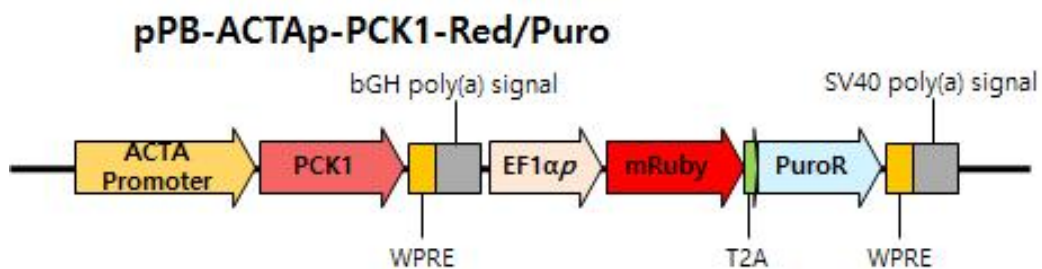


그림 143. 근육 특이적 promoter 조절 하에 PCK1 유전자가 도입된 PiggyBac vector의 구조

(나) pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector를 성체섬유아세포와 지방줄기세포에 도입한 후 분자생물학적 분석 실시한 결과, RT-PCR에서 vector가 genome 내로 도입되었음이 확인되었으며 표지 유전자인 mRuby의 발현을 형광 현미경 하에서 확인

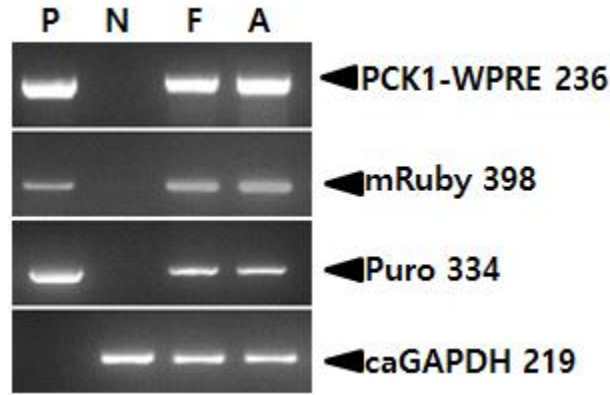


그림 144. pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector가 도입된 성체섬유아세포(F)와 지방줄기세포(A)의 RT-PCR 분석

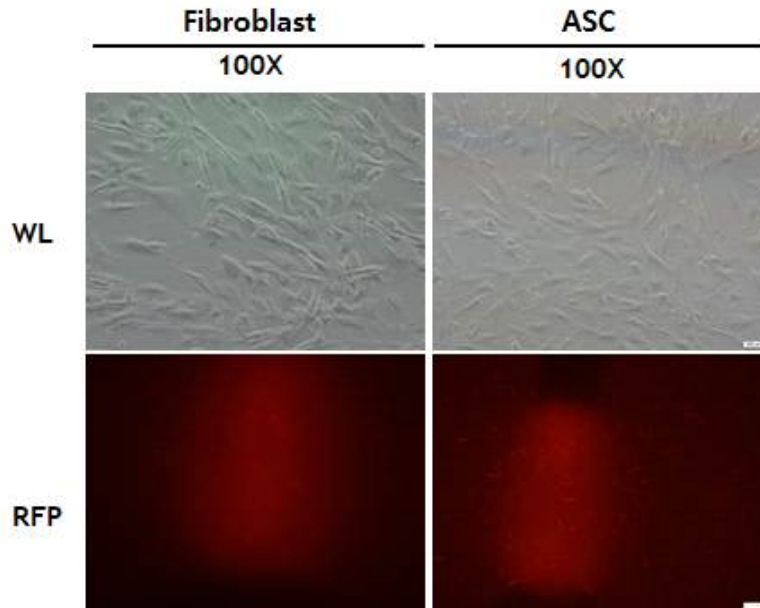


그림 145. pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector가 도입된 성체섬유아세포(fibroblast)와 지방줄기세포(ASC)의 표지유전자인 적색 형광 단백질 발현 양상 확인

(바) 두 세포 중에서 지방줄기세포에서 적색 형광 단백질의 발현이 확인되는 세포 수가 더 많은 것으로 나타남. 따라서 형질전환 복제건 생산에 사용할 세포주로는 성체섬유아세포보다 지방줄기세포가 적합한 것으로 판단

(사) 제1세부과제에서 공급받은 지방줄기세포에 pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector를 도입하여 세포주를 구축한 후 분자생물학적 검정을 실시하였으며, vector의 전이 및 발현이 확인된 세포주는 동결한 후 형질전환 복제건 생산을 위하여 제1세부과제로 공급 완료

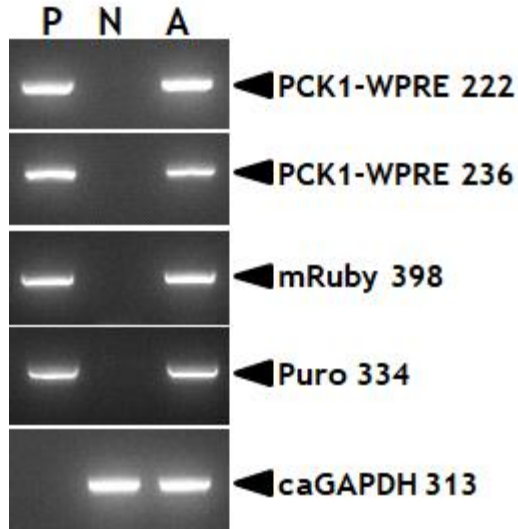


그림 146. pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector가 도입된 지방줄기세포(A)의 RT-PCR 분석

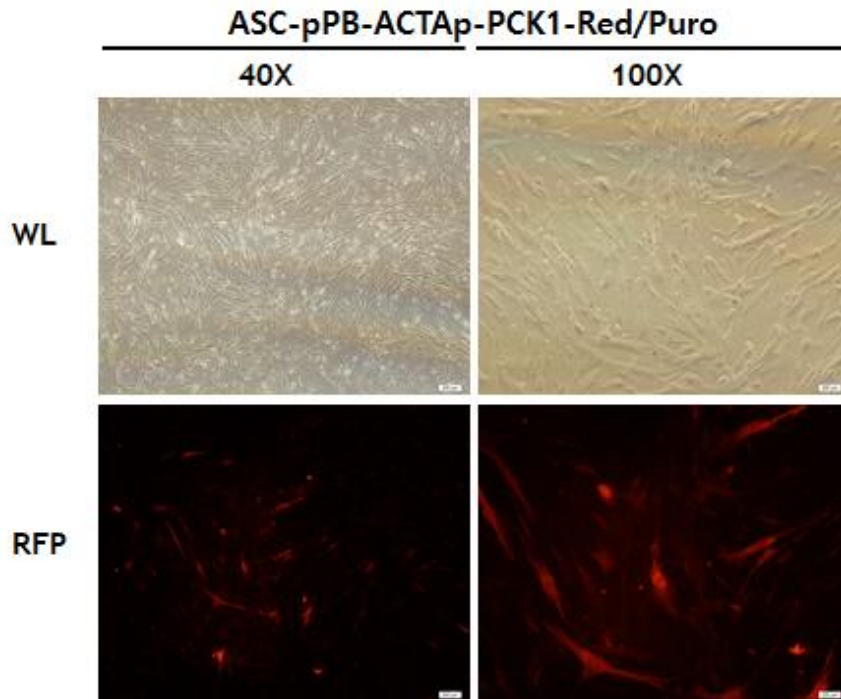


그림 147. pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector가 도입된 지방 줄기세포의 표지유전자인 적색 형광 단백질 발현 양상 확인

나. 근육 특이 PCK1 형질전환 복제건의 분자생물학적 분석을 위한 예비 실험

(1) 연구방법

- (가) 근육 특이적 PCK1 발현 복제건에 대한 분자생물학적 분석 실시를 위하여 제1세부과 제에서 보유 중인 PPAR $\alpha$  발현 복제건을 대상으로 한 예비 실험 실시
- (나) 그 일환으로 PPAR $\alpha$  발현 복제건의 피부조직으로부터 genomic DNA를 분리하여



PPAR $\alpha$  유전자 및 copGFP, 그리고 WPRE 서열에 대한 primer로 PCR을 실시

(다) 각 형질전환 복제건의 genomic DNA를 BamHI 제한효소로 one cut하여서 PPAR $\alpha$  유전자에 대한 probe로 hybridization 반응을 실시하여 전이된 외래 유전자의 copy 수를 확인

(라) 이상의 실험에서 구축한 분자생물학적 분석 방법은 차후 PCK1 형질전환 복제건의 분자생물학적 분석에 적용 함

(2) 연구결과

(가) 근육 특이적인 PCK1 유전자 발현 복제건의 효율적인 분자생물학적 분석을 위하여 제 1세부과제에서 보유 중인 PPAR $\alpha$  발현 형질전환 복제건을 대상으로 예비 실험 실시

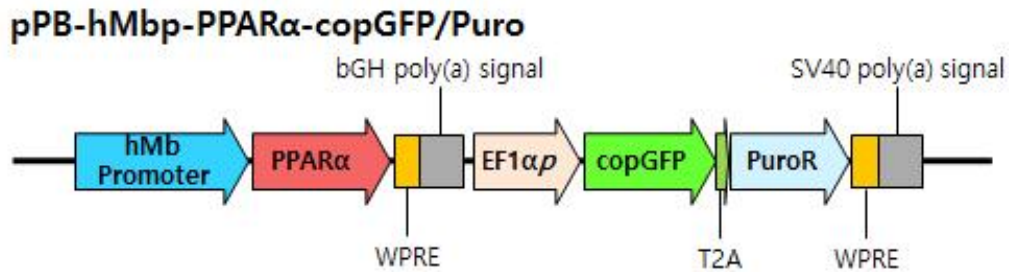


그림 148. 근육 특이적 promoter 조절 하에 PPAR $\alpha$  유전자가 도입된 PiggyBac vector의 구조

(나) 그 일환으로 PPAR $\alpha$  발현 형질전환 복제건의 피부조직으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR을 실시함. 그 결과 모든 실험건에서 PPAR $\alpha$  유전자 및 copGFP, 그리고 WPRE 서열의 도입이 확인

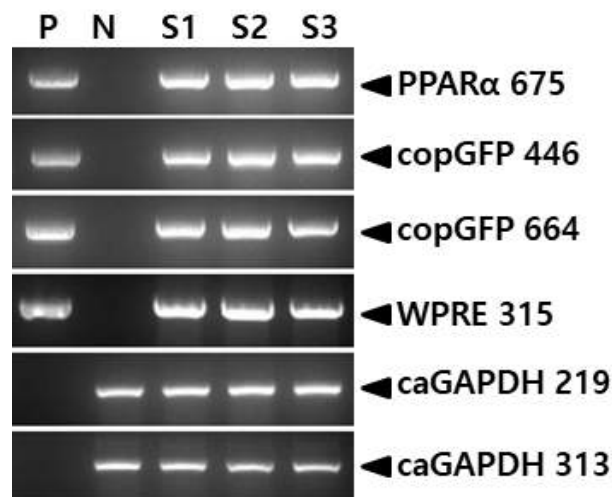


그림 149. pPB-hMbp-PPAR $\alpha$ -copGFP/Puro vector가 도입된 형질전환 복제건의 genomic DNA PCR 분석

(다) 각 형질전환 복제건의 genomic DNA를 이용하여 Southern blotting을 실시하여 전이된 외래 유전자의 copy 수를 확인. 각 genomic DNA를 BamH I 제한효소로 one cut하여서 PPAR $\alpha$  유전자에 대한 probe로 hybridization 반응을 실시하였음. 그 결과, 세 마리 복제건 모두 3 copy 이상의 PPAR $\alpha$  유전자의 도입을 검증

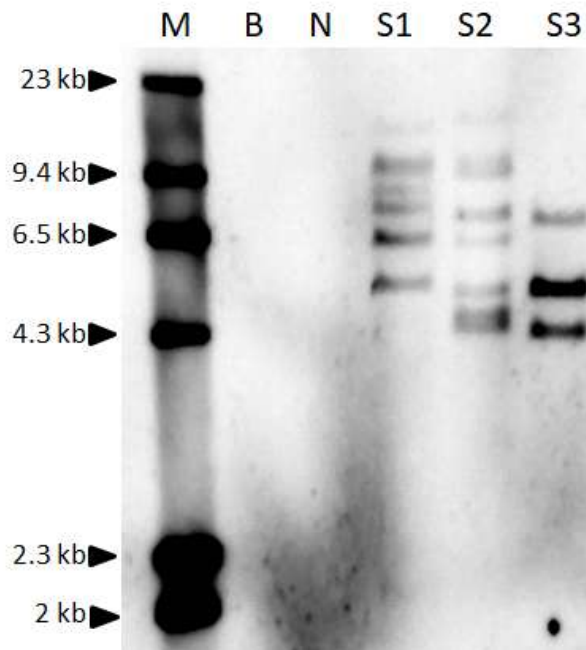


그림 150. pPB-hMbp-PPAR $\alpha$ -copGFP/Puro 형질전환 복제건의 Southern blotting 분석

(다) 이상의 실험 과정은 차후 PCK1 형질전환 복제건의 분자생물학적 분석에 대한 예비 실험으로, 차후 실험 방법적인 면에서 적용될 수 있을 것으로 사료

### 3. 운동능 향상 유전자 II (PPAR 유전자) 발현 세포주의 제작

#### (1) 연구방법

(가) 운동능이 향상된 검역건 생산을 위한 체세포 핵이식에 사용하기 위한 세포주를 확보하기 위하여 canine PPAR $\gamma$  (1,518 bp)와 PPAR $\delta$  (1,326 bp) 유전자를 각각 합성

(가) 합성한 각 유전자를 근육 특이적 promoter인  $\alpha$ -skeletal muscle actin promoter 조절하에 도입한 PiggyBac vector를 구축하였으며 표지유전자로서 mRuby와 copGFP 유전자를 vector 상에 cloning 실시

(나) 구축한 vector를 지방줄기세포에 도입한 후 RT-PCR 방법으로 각 vector가 genome 내로 도입되었음을 확인하였으며 표지 유전자인 mRuby와 copGFP 유전자의 발현을



형광현미경 하에서 확인

(다) 구축한 각 세포주들은 5 passage 이하의 세포만을 대상으로 제1세부과제에 공급

(2) 연구결과

(가) 운동능이 향상된 검역견 생산을 위한 1,518 bp의 canine peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )와 1,326 bp의 peroxisome proliferator activated receptor delta (PPAR $\delta$ ) 유전자의 합성.

(나) 근육 특이적 promoter인 ACTA promoter 조절 하에 PPAR $\gamma$ 과 PPAR $\delta$  유전자를 각각 도입한 PiggyBac vector의 cloning.

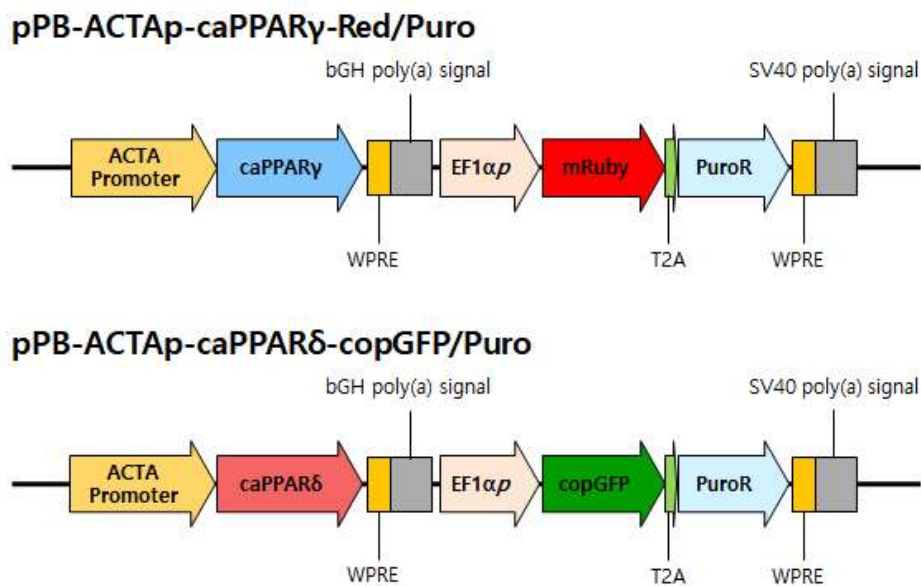


그림 151. PPAR $\gamma$ 와 PPAR $\delta$  유전자가 도입된 PiggyBac vector 구조

(다) 구축한 vector를 지방줄기세포에 도입한 후 분자생물학적 분석을 실시한 결과, RT-PCR에서 각 vector가 genome 내로 도입되었음이 확인되었으며 표지 유전자인 mRuby와 copGFP 유전자의 발현을 형광 현미경 하에서 확인

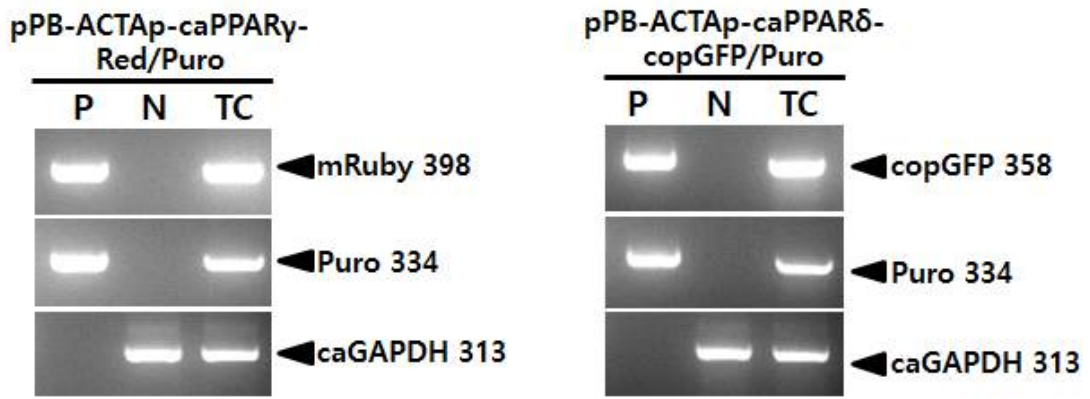


그림 152. 각 vector가 도입된 지방줄기세포(TC)의 RT-PCR 분석

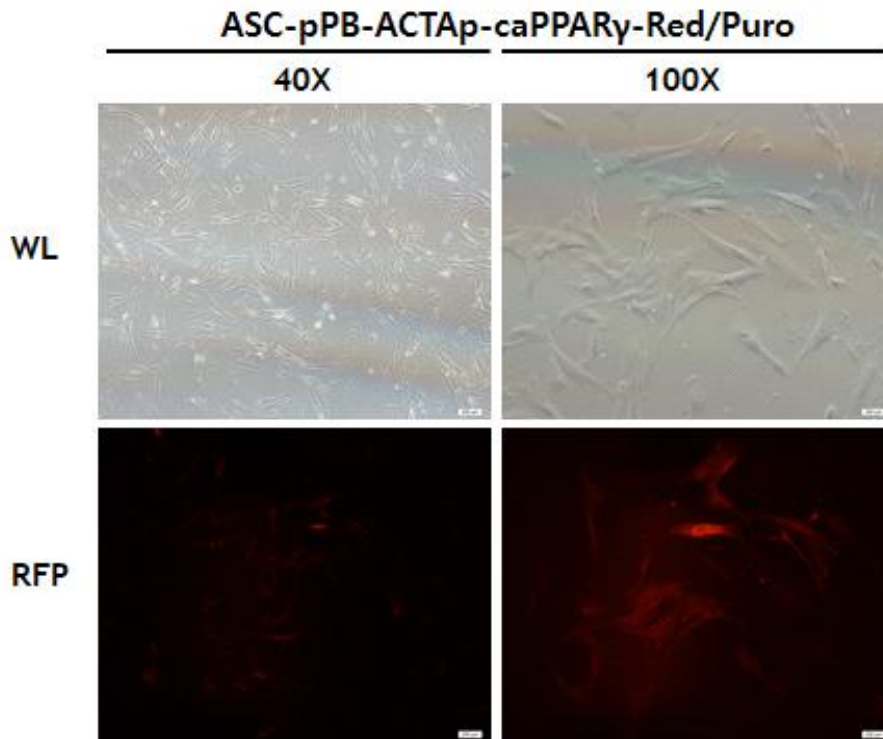


그림 153. pPB-ACTAp-caPPAR $\gamma$ -Red/Puro vector가 도입된 지방 줄기세포에서의 mRuby 유전자의 발현 관찰

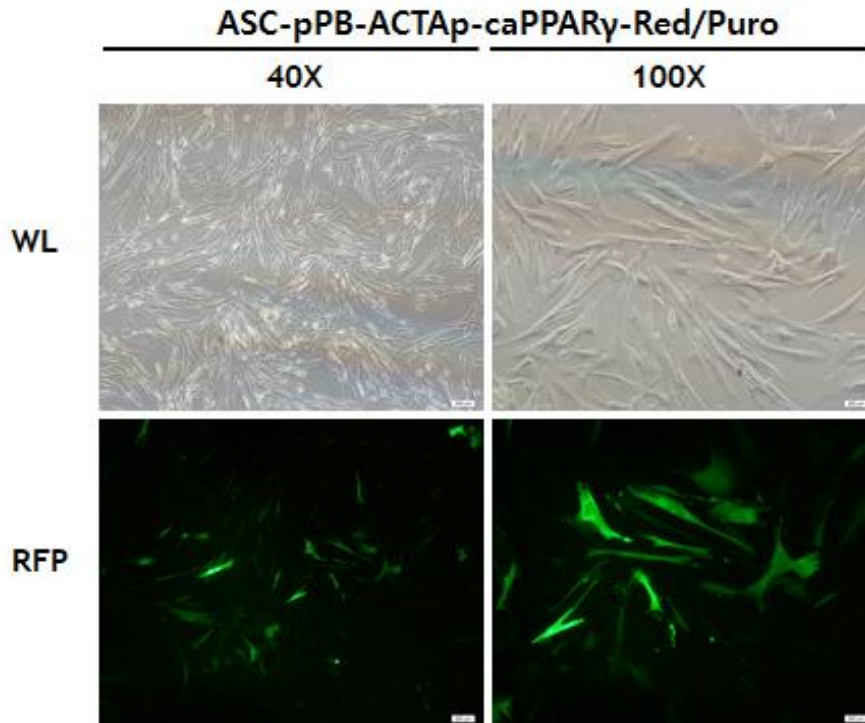


그림 154. pPB-ACTAp-caPPAR $\gamma$  $\delta$ -copGFP/Puro vector가 도입된 지방줄기세포에서의 copGFP 유전자의 발현 관찰

(라) 구축한 PPAR $\gamma$ 와 PPAR $\delta$  유전자가 도입된 각 세포주를 동결하여 제1세부과제에 공급

4. 근육 특이적 PCK1 유전자 발현 복제건의 분자생물학적 분석

가. 근육 특이적 PCK1 유전자 발현 복제건의 분자생물학적 분석

(1) 연구방법

- (가) 제1세부과제에서 생산한 PCK1 유전자 발현 복제건과 대리모건, 외래 유전자가 전이되지 않은 대조군 복제건의 genomic DNA를 공급받아서 genomic DNA PCR 실시
- (나) PCK1 유전자 발현 복제건과 대조군 복제건의 피부조직으로부터 섬유아세포를 일차배양하여 genomic DNA를 분리한 후 도입된 외래 유전자에 대한 primer로 PCR 실시
- (다) 형질전환 복제건에서 외래 유전자의 전이 여부와 전이된 외래 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 Southern blotting을 실시함. PCK1 유전자 발현 복제건과 대조군 복제건의 genomic DNA를 HindIII 또는 Nde I 과 Hpa I 제한효소로 two cut하거나 BglII 제한효소로 one cut하여서 ACTA promoter와 mRuby 유전자에 대한 probe로 각각 hybridization 반응 실시

(라) 정확한 copy 수 도입을 확인하기 위하여 다른 종류의 제한효소인 Mfe I 을 처리하여 mRuby 유전자에 대한 probe로 Southern blotting 분석을 재실시

(2) 연구결과

(가) 제1세부과제로부터 PCK1 발현 복제건과 복제시 대리모건, 유전자가 전이되지 않은 복제건의 genomic DNA를 공급받아서 PCR을 실시하여 형질전환 복제건에서만 PCK1 유전자의 전이를 확인

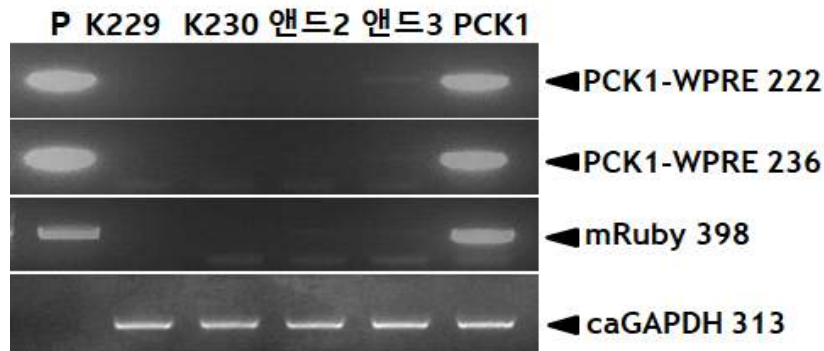


그림 155. 대리모건(K229, K230), 유전자가 전이되지 않은 복제건(앤드2, 앤드3), 근육 특이 PCK1 발현 복제건(PCK1)의 genomic DNA PCR 분석

(나) PCK1 발현 복제건과 일반 복제건의 피부로부터 섬유아세포를 일차배양하여 genomic DNA를 분리하고 여러 종류의 primer로 PCR을 실시. 그 결과 PCK1 발현 복제건에서만 도입된 vector 상의 ACTA promoter, PCK1, WPRE, mRuby와 Puromycin resistant 유전자에 대한 전이 검증

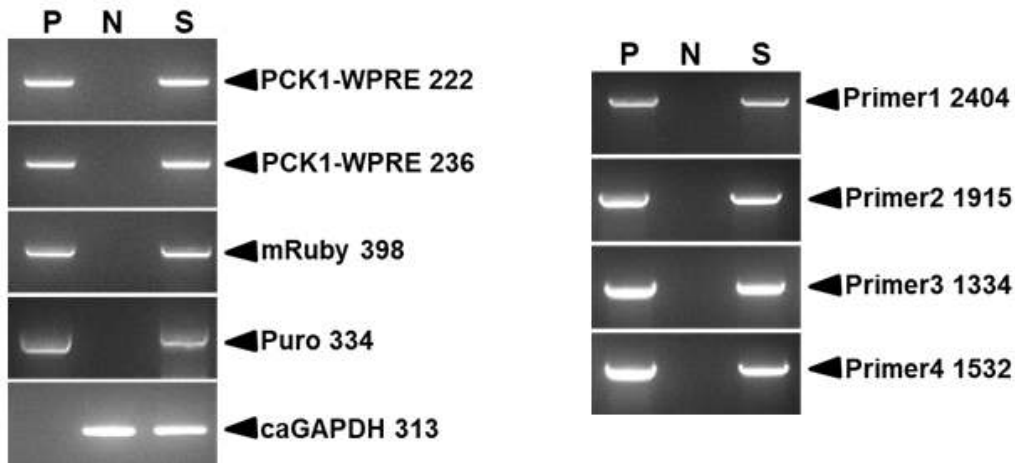
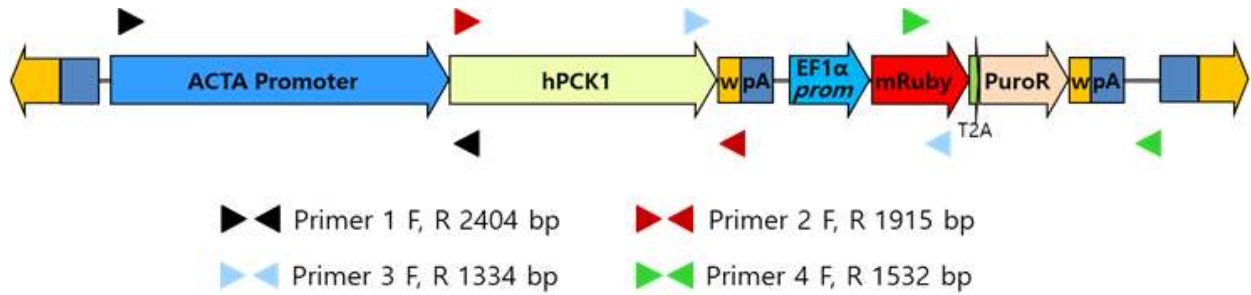


그림 156. 외래 유전자가 전이되지 않은 일반 복제건(N)과 근육 특이 PCK1 발현 복제건(S)의 피부로부터 일차배양한 섬유아세포에서의 genomic DNA PCR 분석

(다) 일반 복제건과 PCK1 발현 복제건의 genomic DNA를 이용하여 Southern blotting을 실시하여 외래 유전자의 전이 여부를 확인. 각 genomic DNA를 HindIII 또는 Nde I 과 Hpa I 제한효소로 two cut하여서 ACTA promoter와 mRuby 유전자에 대한 probe로 각각 hybridization 반응을 실시. 그 결과, **PCK1 발현 복제건에서만 도입된 vector 상의 외래 유전자의 도입이 확인**

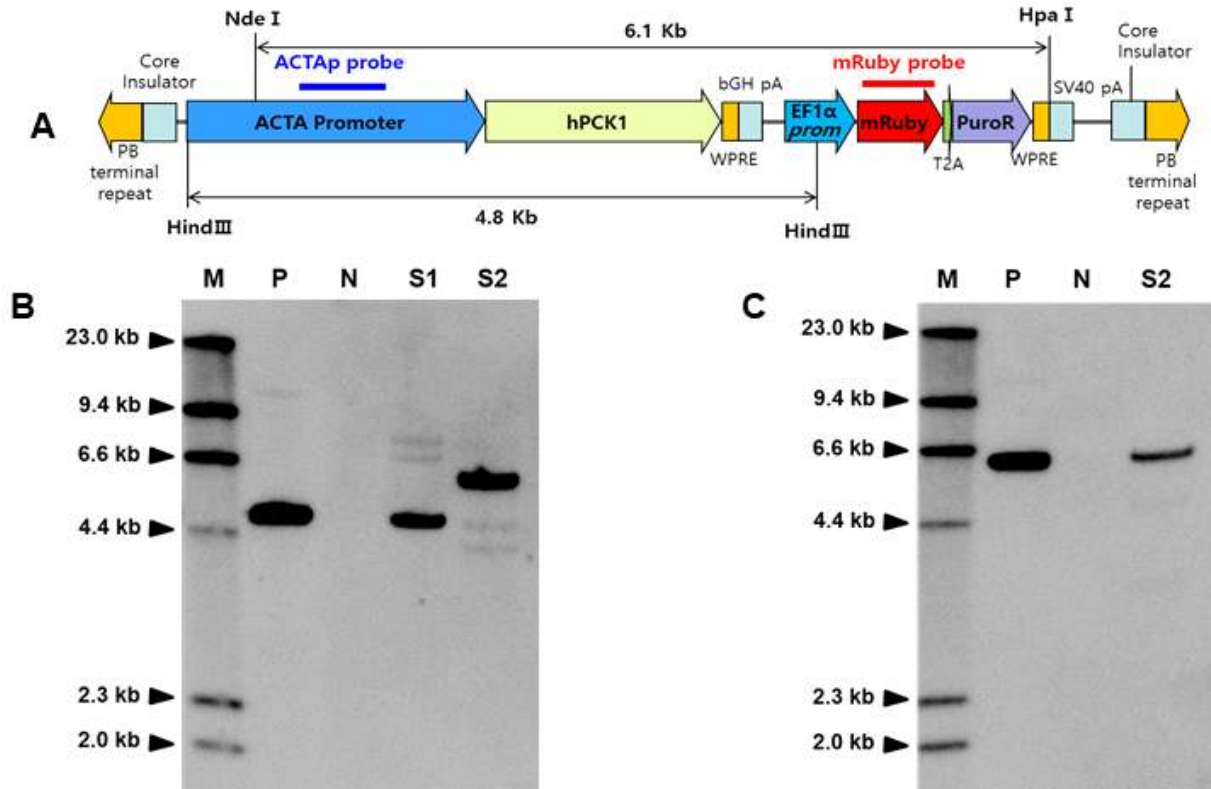


그림 157. 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 Southern blotting 분석(2 cut). A : Southern blotting에 사용한 제한효소 및 probe를 표시한 pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector의 구조; B : Probe : ACTA promoter probe, M : Size marker, P : pPB-ACTAp-hPCK1-Red/Puro (1 ng) / HindIII, N : 일반 복제건, skin fibroblast cell (25  $\mu$ g) / HindIII, S1 : PCK1 발현 복제건, skin fibroblast cell (25  $\mu$ g) / HindIII, S2 : PCK1 발현 복제건, skin fibroblast cell (25  $\mu$ g) / Nde I, Hpa I; C : Probe : mRuby probe, M : Size marker, P : pPB-ACTAp-hPCK1-Red/Puro (1 ng) / Nde I, Hpa I, N : 일반 복제건, skin fibroblast cell (25  $\mu$ g) / Nde I, Hpa I, S2 : PCK1 발현 복제건, skin fibroblast cell (25  $\mu$ g) / Nde I, Hpa I

(가) 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 genomic DNA를 이용하여 Southern blotting을 실시하여 전이된 유전자의 copy 수를 확인하고자 하였음. 각 genomic DNA를 BglIII 제한 효소로 one cut하여서 ACTA promoter와 mRuby 유전자에 대한 probe로 각각 hybridization 반응을 실시하였음. 그 결과, 근육 특이 PCK1 발현 복제건에서 10 copy 내외의 PCK1 유전자의 도입을 확인



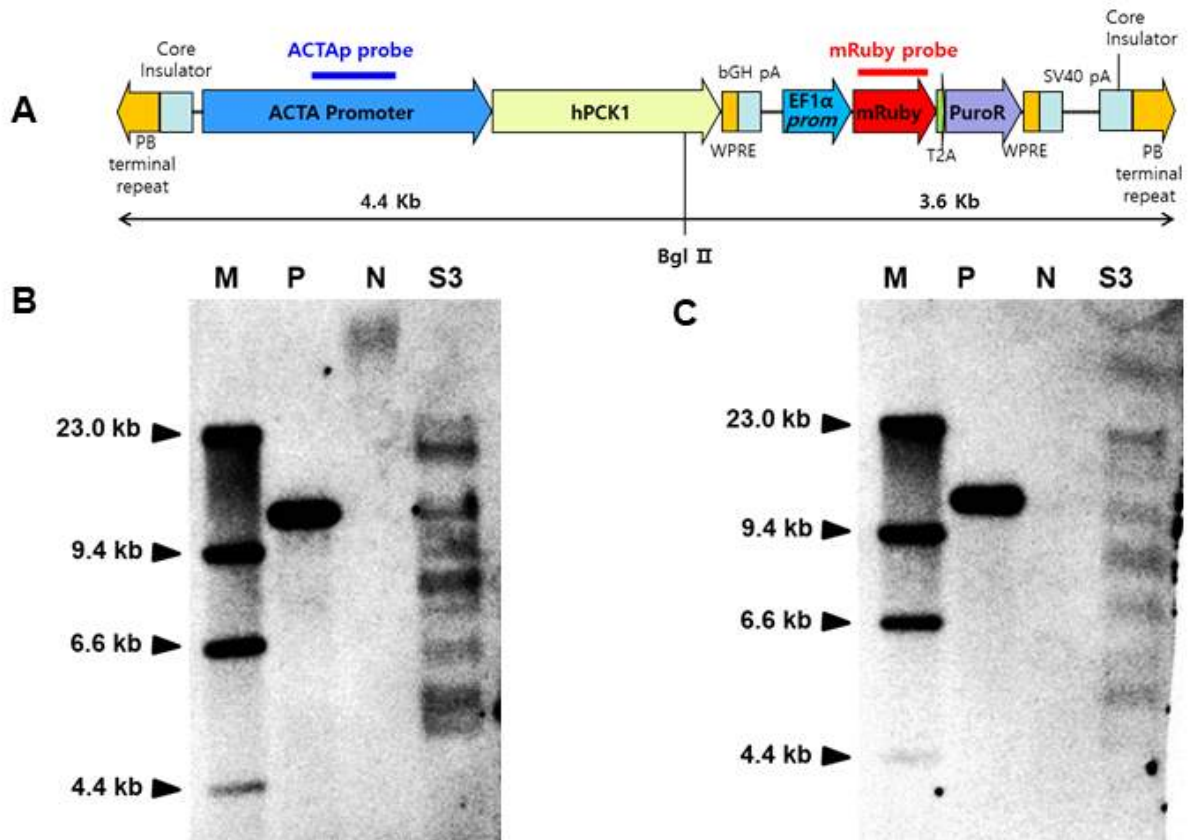


그림 158. 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 Southern blotting 분석(1 cut). A : Southern blotting에 사용한 제한효소 및 probe를 표시한 pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector의 구조; B : Probe : ACTA promoter probe, M : Size marker, P : pPB-ACTAp-hPCK1-Red/Puro (1 ng) / BglII, N : 일반 복제건, skin fibroblast cell (25  $\mu$ g) / BglII, S3 : PCK1 발현 복제건, skin fibroblast cell (25  $\mu$ g) / BglII; C : Probe : mRuby probe, 각 sample은 B 실험과 동일함

(나) 보다 정확한 copy 수를 확인하기 위하여 다른 종류의 제한효소인 Mfe I 을 처리하여 Southern blotting 분석을 재 실시하였음. mRuby 유전자에 대한 probe로 각각 hybridization 반응을 실시한 결과, 약 10 ~ 12 copy가 도입된 것으로 확인

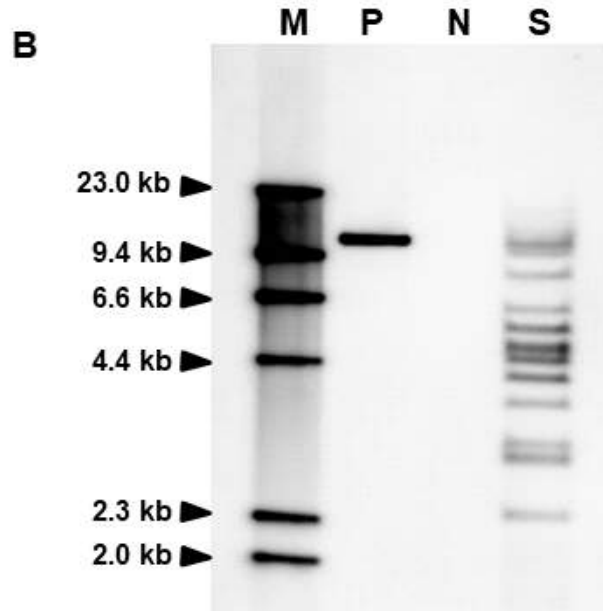
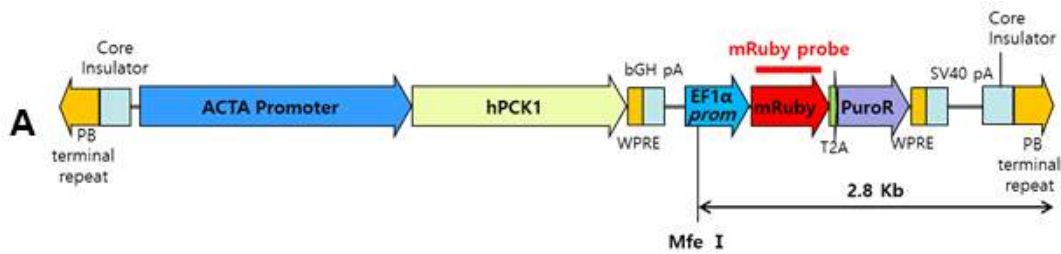


그림 159. 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 Southern blotting 분석(1 cut). A : Southern blotting에 사용한 제한효소 및 probe를 표시한 pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector의 구조; B : Probe : mRuby probe, M : Size marker, P : pPB-ACTAp-hPCK1-Red/Puro (1 ng) / Mfe I, N : 일반 복제건, skin fibroblast cell (25  $\mu$ g) / Mfe I, S : PCK1 발현 복제건, skin fibroblast cell (25  $\mu$ g) / Mfe I

나. 근육 특이 PCK1 형질전환 복제건의 나이에 따른 PCK1 유전자 발현량 추이를 유전학적으로 분석

(1) 연구방법

- (가) PCK1 형질전환 복제건의 나이에 따른 발현량 추이를 분석하고자 하였으나 아직 복제건의 성장이 충분하지 않은 관계로 본 연구에서는 효율적인 PCK1 유전자의 발현 분석 방법 확립에 주안점을 두고 진행
- (나) 먼저 근육 특이적인 PCK1 형질전환 복제건의 각 조직에 따른 발현 양상을 살펴보기 위하여 근육과 피부조직으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR을 실시
- (다) ACTA promoter에 의한 PCK1의 근육 특이적인 발현 가능성을 확인하기 위하여



pPB-CTAp-PCK1-Red/Puro vector가 도입된 C2C12 세포의 분화를 유도하여 분화 전과 후의 세포에서 분리한 단백질을 이용하여 western blotting을 실시

- (라) PCK1 유전자의 효율적인 분자생물학적 발현 분석 방법을 확립하기 위하여 ACTA promoter 대신 CMV promoter를 도입한 pPB-CMVp-PCK1-Red/Puro vector를 표적 세포로서 보편적으로 사용되고 있는 293과 NIH3T3 세포, 그리고 복제건으로부터 일차배양한 섬유아세포에 도입한 후 RT-PCR과 Western blotting, 그리고 형광현미경 관찰을 실시

## (2) 연구결과

- (가) 제1세부과제로부터 유전자가 전이되지 않은 복제건과 근육 특이 PCK1 발현 형질전환 복제건의 근육과 피부로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR을 실시한 결과 형질전환 복제건의 근육과 피부에서만 PCK1 유전자, mRuby, puromycin 저항성 유전자의 전이가 확인됨. 또한 피부에 비해서 근육에서의 DNA 증폭이 더 잘 일어난 것으로 보임.

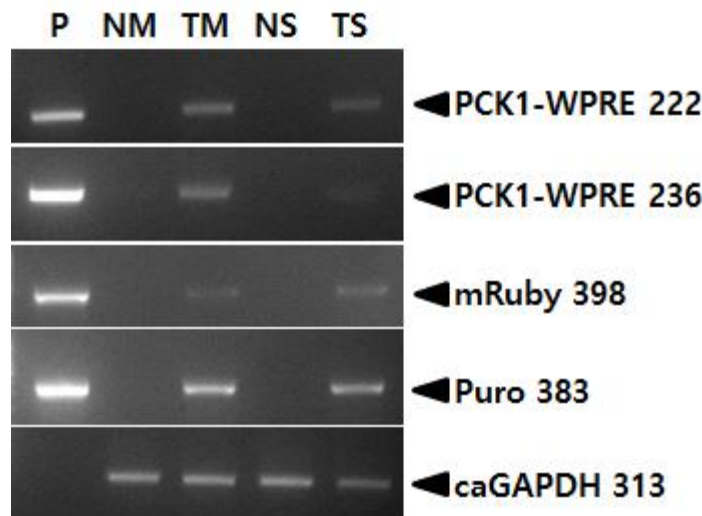


그림 160. 외래 유전자가 전이되지 않은 일반 복제건의 근육(NM)과 피부(NS), 그리고 PCK1 발현 형질전환 복제건의 근육(TM)과 피부(TS)로부터 분리한 genomic DNA를 이용한 PCR 분석

- (나) ACTA promoter에 의한 PCK1의 근육 특이적인 발현 가능성을 확인하기 위하여 pPB-CTAp-PCK1-Red/Puro vector를 C2C12 세포에 도입한 후 이 세포의 분화를 유도한 결과, mouse myoblast cell line인 C2C12이 myotube 형태로 분화된 경우에 ACTA promoter의 조절 하의 PCK1 유전자 발현이 우세한 것으로 나타남.

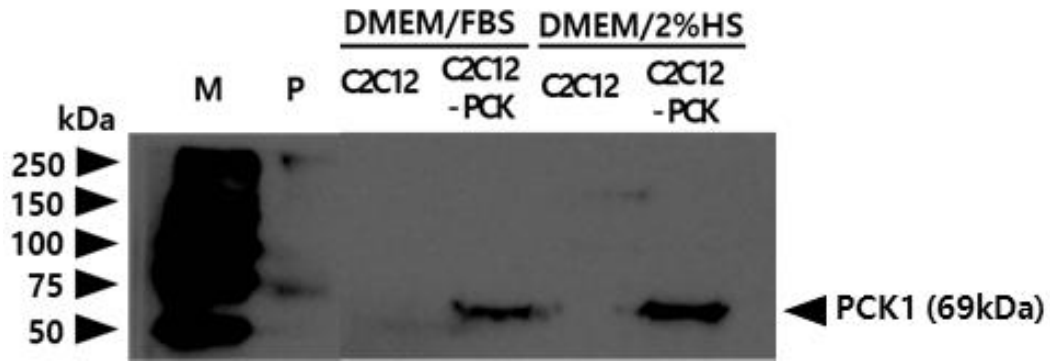


그림 161. Western blotting 방법을 이용한 C2C12 세포의 분화 유도 조건에 따른 각 근육 특이적 promoter 조절 하의 PCK1 유전자의 발현 분석

(다) 복제건 유래 세포주에서 PCK1 유전자의 발현 양상을 분석하였음. 복제건 유래의 체세포인 태아 섬유아세포(141BF4)와 지방유래줄기세포(DLM170001)에 pPB-ACTAp-PCK1-Red/ Puro vector를 도입하여 각 유전자의 전이 여부를 RT-PCR 방법으로 확인하였음. 세포의 정상적인 전사 여부를 확인하기 위한 GAPDH 유전자의 증폭이 모든 세포주에서 확인된 데 비해서 PCK1이나 mRuby 유전자 등은 vector가 도입된 세포주에서만 확인이 되었음.

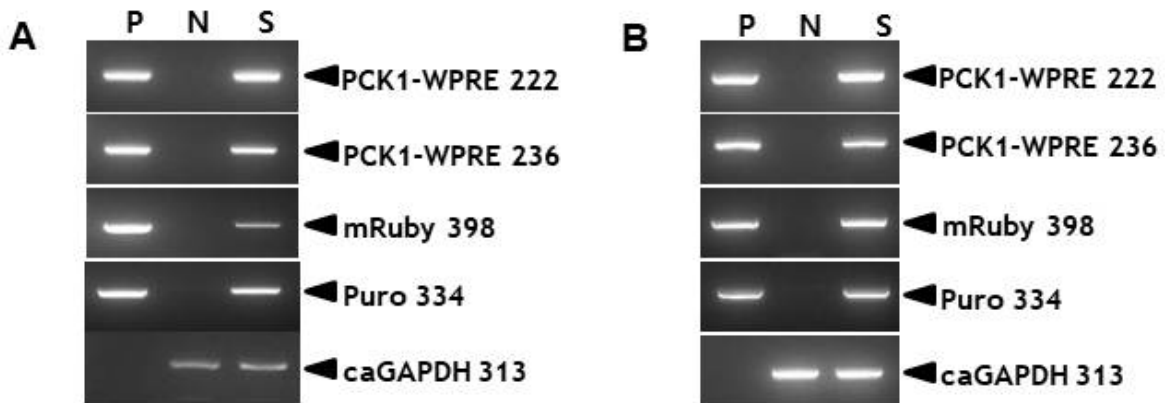


그림 162. pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector를 도입한 복제건 유래 세포주인 141BF4-pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro (A-S)와 DLM170001-pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro (B-S)에서의 RT-PCR 분석

(라) PCK1 유전자가 도입된 복제건 유래 세포주에서의 PCK1 단백질 발현 양상을 확인하고자 Western blotting을 실시하였음. Vector가 전이된 세포주에서만 약 69 kDa의 PCK1 단백질이 확인되었음.

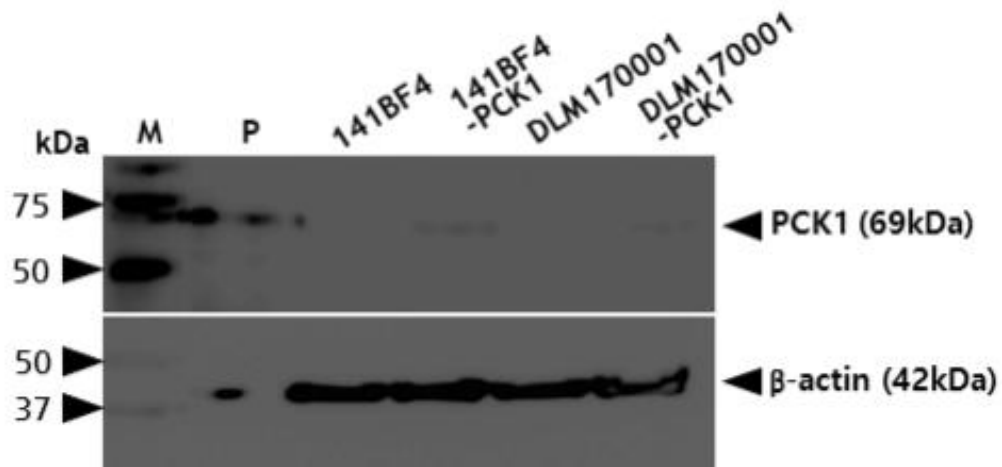


그림 163. pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro vector를 도입한 복제건 유래 세포주인 141BF4-pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro (141BF4-PCK1)와 DLM170001-pPB-ACTAp-PCK1-Red/Puro (DLM170001-PCK1)에서의 Western blotting 분석

(마) PCK1 유전자의 효율적인 분자생물학적 발현 분석 방법을 확립하기 위하여 ACTA promoter 대신 CMV promoter를 도입한 pPB-CMVp-PCK1-Red/Puro vector를 복제건에서 일차배양한 섬유아세포인 BF2012A와 표적세포로서 보편적으로 사용되고 있는 293과 NIH3T3 세포에 도입한 후 RT-PCR과 Western blotting을 실시함. 그 결과, vector가 도입된 세포주에서만 각 유전자의 전사 및 발현이 확인되었으며 특히 293 세포에서 PCK1의 발현이 더 강하게 일어나는 것을 확인할 수 있었음.

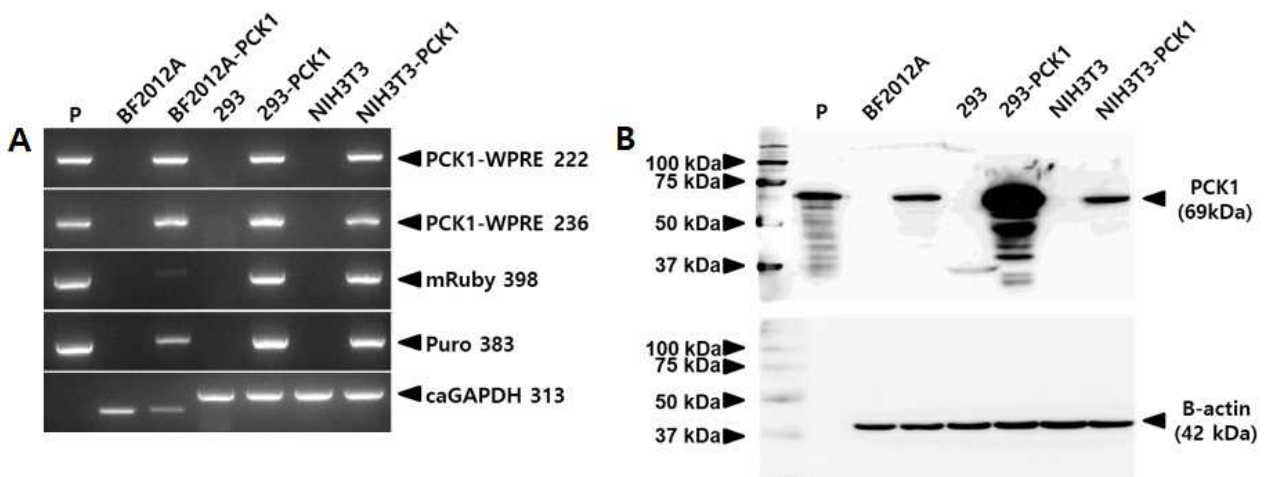


그림 164. pPB-CMVp-PCK1-Red/Puro vector를 도입한 세포주에서의 분자생물학적 분석. A, 각 세포주에 대한 RT-PCR 분석; B, 각 세포주에 대한 Western blotting 분석

(바) 위의 세포들을 형광 현미경하에서 관찰하여 각 세포에서 표지 유전자인 mRuby 유전자의 발현을 확인

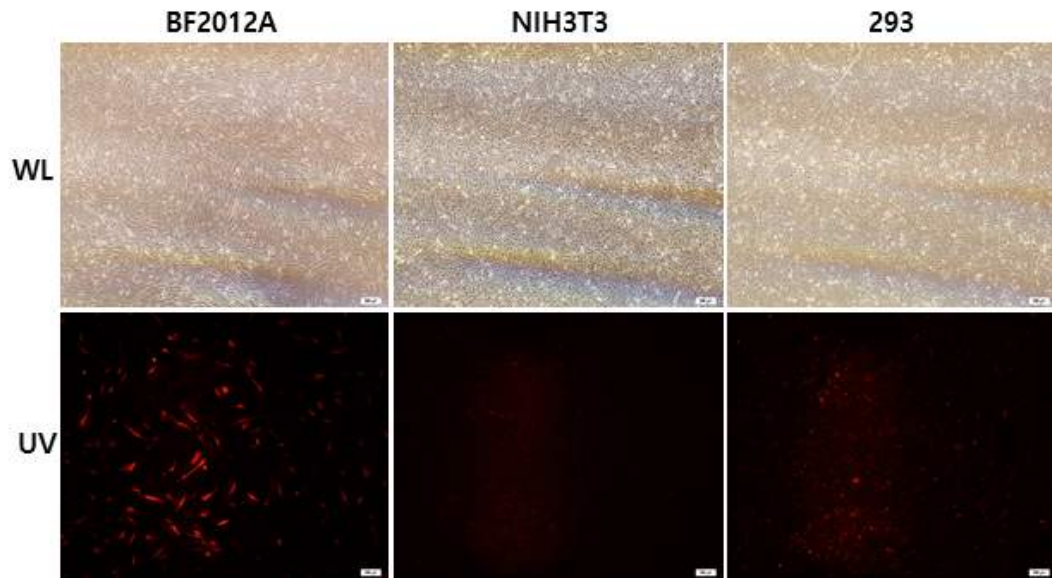


그림 165. pPB-CMVp-PCK1-Red/Puro vector를 도입한 각각의 세포주에서 형광 현미경을 이용한 mRuby 유전자의 발현 관찰

## 5. PPAR $\delta$ 유전자 발현 복제건의 분자생물학적 분석

가. PPAR $\delta$  발현 복제건 생산을 위한 제1세부과제로의 근육 특이적 PPAR $\delta$  발현 세포주 공급

### (1) 연구방법

- (가) 제1세부과제로부터 공급받은 지방줄기세포에 pPB-ACTAp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro vector를 도입하여 세포주를 구축한 후 RT-PCR과 형광 현미경 관찰을 통한 분자생물학적 검정을 실시
- (나) Vector의 전이 및 발현이 확인된 세포주는 동결한 후 형질전환 복제건 생산을 위하여 제1세부과제로 공급
- (다) 제1세부과제로부터 공급받은 또 다른 종류의 지방줄기세포에 전자의 실험과 동일한 방법으로 vector를 도입한 후 *in vitro* 검정을 실시하고 확립한 세포주는 제1세부과제로 공급
- (라) PPAR $\delta$  유전자의 발현 분석의 효율성을 높이기 위하여 조직 특이적인 promoter 대신 유전자의 지속적인 발현을 나타내는 promoter인 CMV promoter를 도입한 piggyBac vector를 재조합하여 복제건 유래의 일차배양한 섬유아세포에 도입한 후 분자생물학적 분석 실시

(2) 연구결과

(가) 제1세부과제에서 공급받은 지방줄기세포에 pPB-ACTAp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro vector를 도입하여 세포주를 구축한 후 분자생물학적 검정을 실시하였으며, vector의 전이 및 발현이 확인된 세포주는 동결한 후 형질전환 복제건 생산을 위하여 제1세부과제로 공급

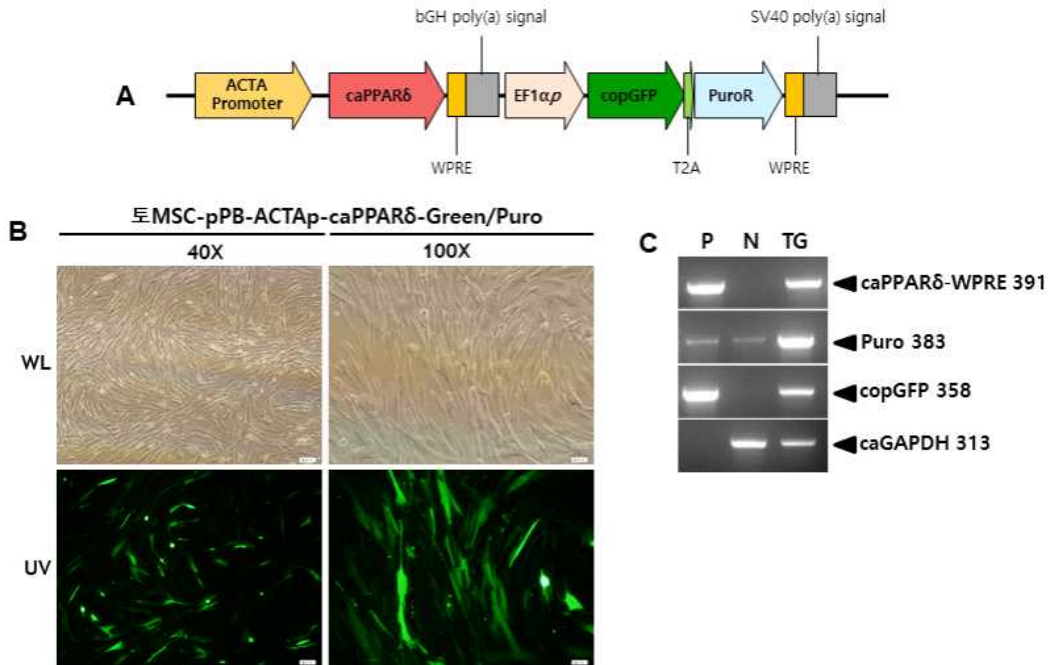


그림 166. pPB-ACTAp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro vector가 도입된 지방줄기세포의 분자생물학적 분석. A, pPB-ACTAp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro vector의 구조; B, 각 세포주에 대한 형광 현미경 관찰; C, 각 세포주에 대한 RT-PCR 분석

(나) 제1세부과제에서 공급한 다른 종류의 지방줄기세포를 이용하여 전자와 마찬가지로 세포주를 구축한 후 분자생물학적 검정 후 제1세부과제로 공급

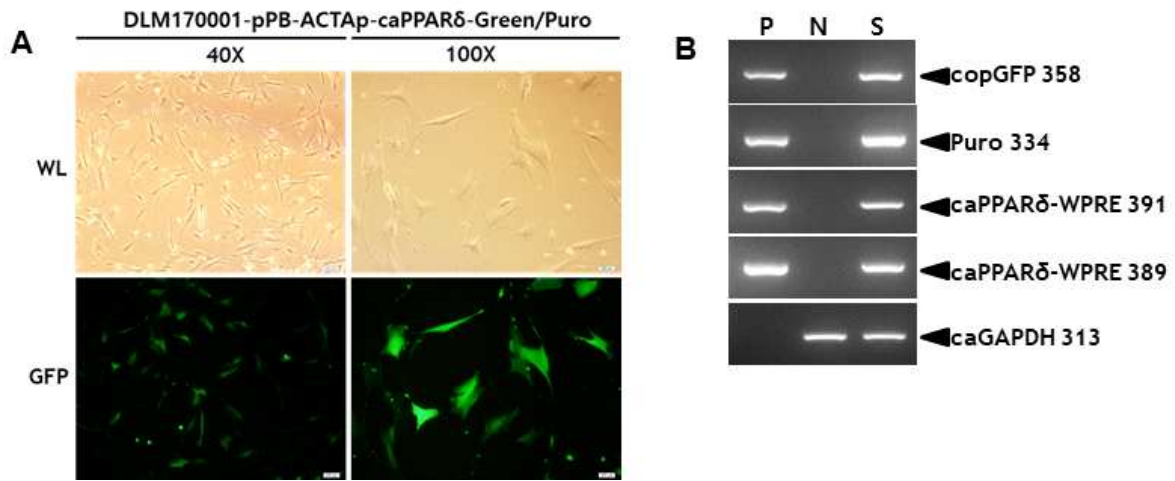


그림 167. pPB-ACTAp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro vector가 도입된 지방줄기세포의 분자생물학적 분석. A, 각 세포주에 대한 형광 현미경 관찰; B, 각 세포주에 대한 RT-PCR 분석

(다) 조직 특이적인 promoter 대신 유전자의 지속적인 발현을 나타내는 promoter인 CMV promoter 조절 하에 PPAR $\delta$  유전자를 도입한 piggyBac vector를 재조합하여 복제건 유래의 일차배양한 섬유아세포에 도입한 후 분자생물학적 분석을 실시한 결과 외래 유전자의 전이 및 발현이 정상적으로 일어나는 것을 확인

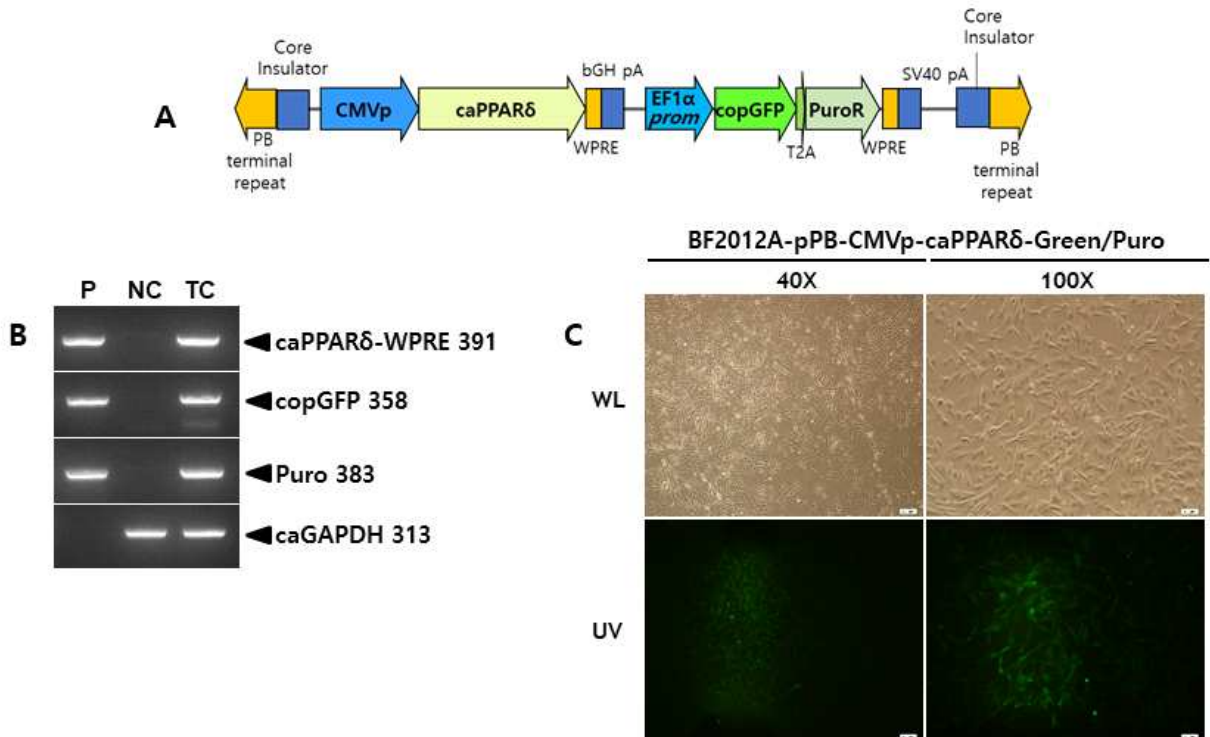


그림 168. pPB-CMVp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro vector가 도입된 복제건 유래의 일차배양한 섬유아세포의 분자생물학적 분석. A, pPB-ACTAp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro vector의 구조; B, 각 세포주에 대한 RT-PCR 분석; C, 각 세포주에 대한 형광 현미경 관찰



나. 생산된 근육 특이적 PPAR $\delta$  유전자 발현 복제건의 genomic DNA PCR과 Southern blotting 분석

(1) 연구방법

- (가) 제1세부과제에서 공급받은 대조건과 형질전환건의 혈액으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR과 Southern blotting을 실시
- (나) PPAR $\delta$  유전자 발현 복제건과 외래 유전자가 전이되지 않은 대조구 복제건의 genomic DNA를 분리하여 표지 유전자인 copGFP와 puromycin 저항성 유전자, 그리고 PPAR $\delta$  유전자에 대한 primer를 사용한 genomic DNA PCR 실시
- (다) PPAR $\delta$  유전자 발현 복제건과 대조구 복제건의 genomic DNA를 EcoR I 과 Hpa I 제한효소로 two cut하거나 Mfe I 제한효소로 one cut하여서 copGFP 유전자에 대한 probe로 hybridization 반응 실시

(2) 연구결과

- (가) PPAR $\delta$  발현 복제건의 분자생물학적 분석 실시. 제1세부과제에서 공급받은 대조건과 형질전환건의 혈액으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR과 Southern blotting을 실시. 결과, PCR에서는 전이된 vector의 여러 유전자에 대한 증폭이 정상적으로 이루어진 것을 확인하였으며 vector의 결실이 일어나지 않은 것으로 판단

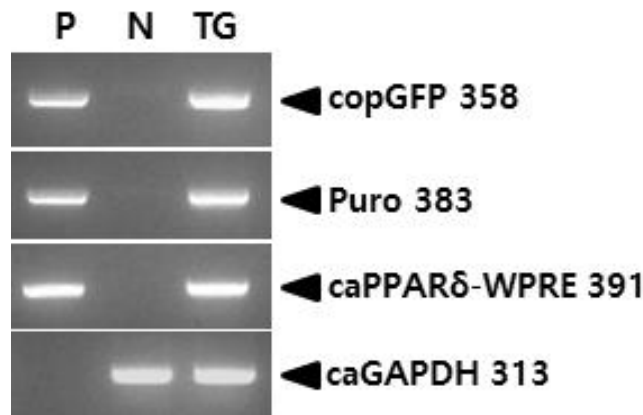


그림 169. 유전자가 전이되지 않은 복제건과 PPAR $\delta$  발현 복제건의 혈액에서의 genomic DNA PCR 분석

- (나) 일반 복제건과 PPAR $\delta$  발현 복제건의 genomic DNA를 이용하여 Southern blotting을 실시하여 외래 유전자의 전이 여부를 확인하기 위해, 각 genomic DNA를 EcoR I 과 Hpa I 제한효소로 two cut하여서 copGFP 유전자에 대한 probe로 hybridization 반응을 실시하였음. 그 결과, PPAR $\delta$  발현 복제건에서만 도입된 vector 상의 외래 유전자의 도입이 확인되었음.

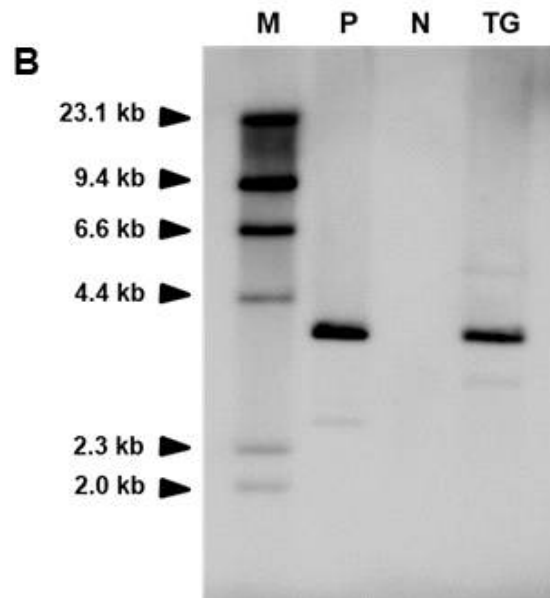
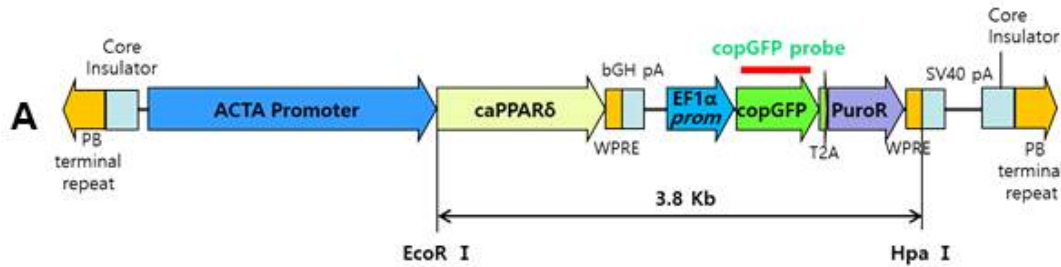


그림 170. PPAR $\delta$  발현 복제건의 Southern blotting 분석(2 cut). A : Southern blotting에 사용한 제한효소 및 probe를 표시한 pPB-ACTAp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro vector의 구조, B : Probe : copGFP probe, M : Size marker, P : pPB-ACTAp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro (1 ng) / EcoR I, Hpa I, N : 일반 복제건 혈액 genomic DNA (5  $\mu$ g) / EcoR I, Hpa I, TG : PPAR $\delta$  발현 복제건 혈액 genomic DNA (5  $\mu$ g) / EcoR I, Hpa I

(다) PPAR $\delta$  발현 복제건의 genomic DNA를 이용하여 Southern blotting을 실시하여 전이된 유전자의 copy 수를 확인. 각 genomic DNA를 Mfe I 제한효소로 one cut하여서 copGFP 유전자에 대한 probe로 hybridization 반응 실시. 결과, **PPAR $\delta$  발현 복제건에서 10 copy 이상의 PPAR $\delta$  유전자의 도입을 확인**



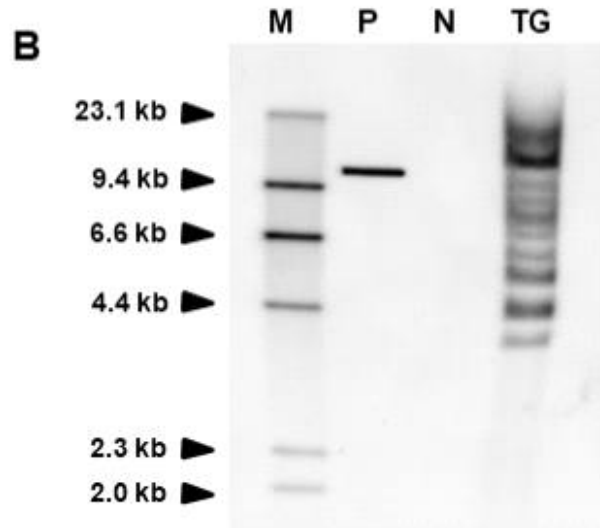
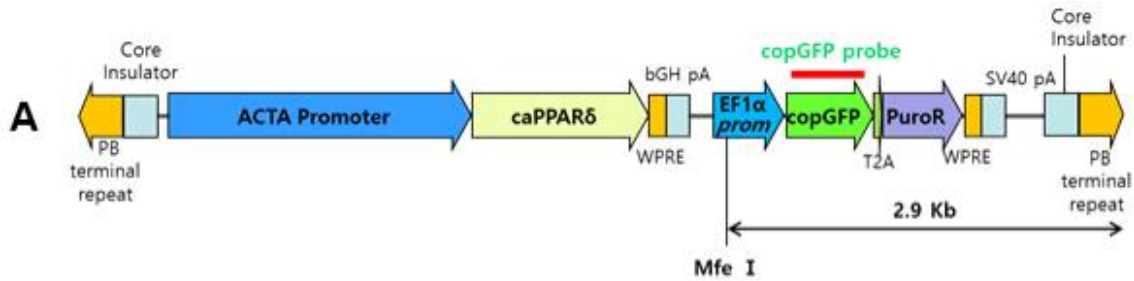


그림 171. PPAR $\delta$  발현 복제건의 Southern blotting 분석(1 cut). A : Southern blotting에 사용한 제한효소 및 probe를 표시한 pPB-ACTAp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro vector의 구조, B : Probe : copGFP probe, M : Size marker, P : pPB-ACTAp-caPPAR $\delta$ -Green/Puro (1 ng) / Mfe I, N : 일반 복제건 혈액 genomic DNA (30  $\mu$ g) / Mfe I, TG : PPAR $\delta$  발현 복제건 혈액 genomic DNA (30 $\mu$ g) / Mfe I

## 다. 근육 조직에서의 PPAR $\delta$ 유전자 발현에 대한 분자생물학적 분석

### (1) 연구방법

- (가) PPAR $\delta$  발현 복제건의 근육조직에서의 단백질 수준에서의 분자생물학적 분석을 실시하기 위한 예비 실험으로 일반 복제건의 근육조직으로부터 전단백질을 분리하여  $\beta$ -actin primary antibody로 Western blotting을 실시함.
- (나) PPAR $\delta$  발현 복제건과 대조건의 근육과 피부 조직을 제1세부과제에서 공급 받아서 genomic DNA와 전단백질을 분리한 후 genomic DNA PCR과 Western blotting을 실시하였음.
- (다) Genomic DNA PCR은 PPAR $\delta$ -WPRE, copGFP와 puromycin 저항성 유전자, 그리고 negative control 유전자인 GAPDH에 대한 primer를 사용하여 실시하였음.
- (라) Western blotting 실험은 PPAR $\delta$  primary antibody와 Rabbit IgG HRP secondary

antibody를 사용하였으며 대조구로  $\beta$ -actin primary antibody와 Goat Anti mouse IgG HRP secondary antibody를 사용하였음.

(2) 연구결과

(가) 일반 복제건의 근육조직으로부터 전단백질을 분리하여  $\beta$ -actin primary antibody로 Western blotting을 실시한 결과, 모든 복제건의 근육조직에서 42 kDa의  $\beta$ -actin 단백질을 확인하였음.

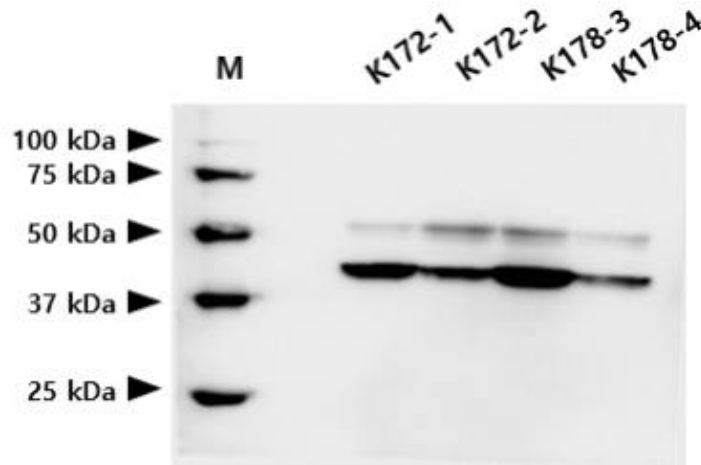


그림 172. 일반 복제건 근육조직에서의  $\beta$ -actin 단백질에 대한 Western blotting 분석

(나) PPAR $\delta$  발현 복제건과 대조건의 근육과 피부 조직으로부터 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR을 실시한 결과 PPAR $\delta$  발현 복제건에서만 PPAR $\delta$ , WPRE, copGFP와 puromycin 저항성 유전자에 대한 증폭이 확인되었음.

(다) Western blotting 실험에서는 PPAR $\delta$  발현 복제건과 대조건의 근육과 피부 조직 모두에서  $\beta$ -actin 단백질이 확인된 데 비해 PPAR $\delta$  단백질은 PPAR $\delta$  발현 복제건의 근육과 피부에서만 확인되었으며 특히 근육조직에서 비교적 발현이 우세한 것으로 나타남.

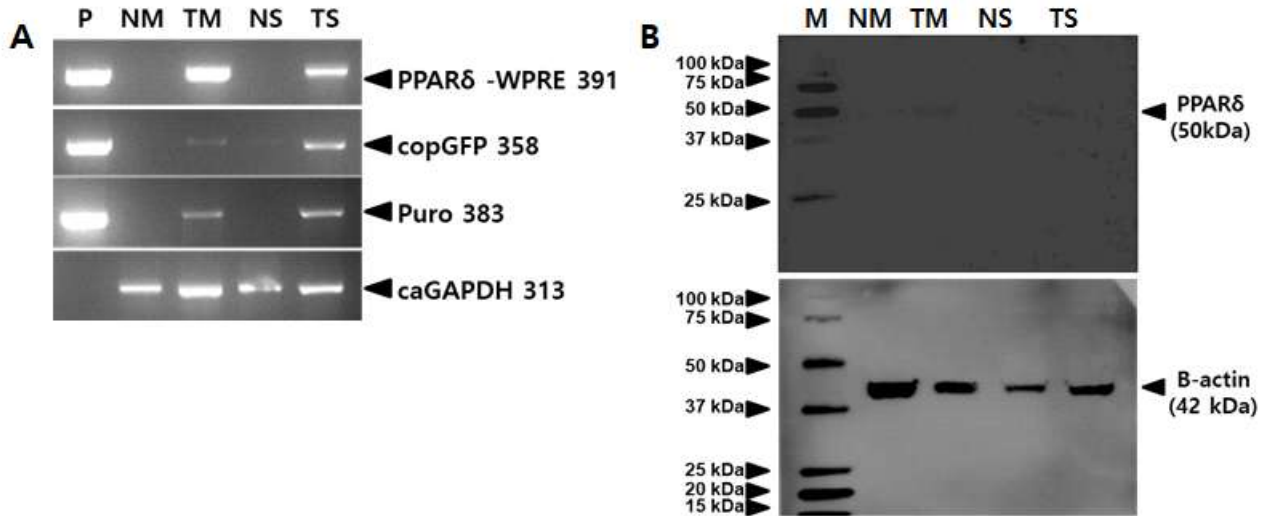


그림 173. PPAR $\delta$  발현 복제건의 분자생물학적 분석. A : 대조건의 근육(NM)과 피부 조직(NS), PPAR $\delta$  발현 복제건의 근육(TM)과 피부 조직(TS)에서의 RT-PCR, B : 대조건의 근육(NM)과 피부 조직(NS), PPAR $\delta$  발현 복제건의 근육(TM)과 피부 조직(TS)에서의 PPAR $\delta$ 와  $\beta$ -actin 단백질에 대한 Western blotting 분석

## 6. 집중력 향상 유전자 (5-HT3R 유전자) 발현 세포주 제작

가. 5-HT3R 형질전환 세포주의 구축 및 5-HT3R 형질전환 복제건 생산을 위한 제1세부과제로의 세포주 공급

### (1) 연구방법

- (가) 집중력 향상 유전자인 5-HT3R 유전자 합성.
- (나) CMV promoter 조절 하에 5-HT3R 유전자를 도입한 PiggyBac vector의 구축.
- (다) 구축한 vector를 지방줄기세포와 293 세포에 도입하여 5-HT3R 발현 세포주 확립.
- (라) 확립된 형질전환 세포주의 RT-PCR과 형광 현미경 관찰을 통한 분자생물학적 분석 및 집중력 향상 복제건 생산을 위한 제1세부과제로의 세포주 공급.
- (마) 신경조직 특이적 5-HT3R 유전자의 발현을 위한 PiggyBac vector의 구축.
- (바) 구축한 vector를 지방줄기세포에 도입한 후 *in vitro* 검정 실시.

### (2) 연구결과

- (가) 집중력이 향상된 검역건 생산을 위한 개의 5-hydroxytryptamine receptor 3A (5-HT3R 또는 HTR3A) 유전자를 확보하기 위하여 NCBI Reference Sequence No. NM\_001048119.1, DQ483094.1를 참조하여 1,452 bp의 5-HT3R 유전자 합성함.
- (나) CMV promoter 조절 하에 5-HT3R 유전자를 도입한 PiggyBac vector인

pPB-CMVp-5-HT3R-Red/ Puro cloning.

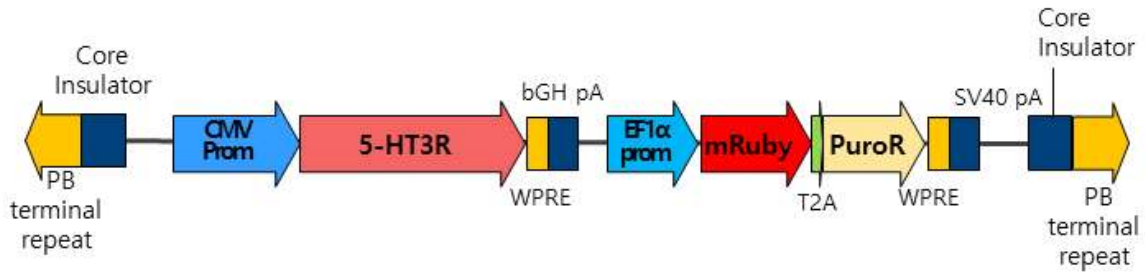


그림 174. CMV promoter 조절 하에 5-HT3R 유전자가 도입된 PiggyBac vector의 구조

- (다) pPB-CMVp-5-HT3R-Red/Puro vector를 293 세포와 제1세부과제에서 공급받은 지방줄기세포(OB2FC)에 도입하여 puromycin이 첨가된 배양액으로 선별하여 유전자가 도입된 세포주를 구축함.
- (라) 구축한 각 세포주에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하고 형광현미경으로 mRuby 유전자의 발현을 확인함.

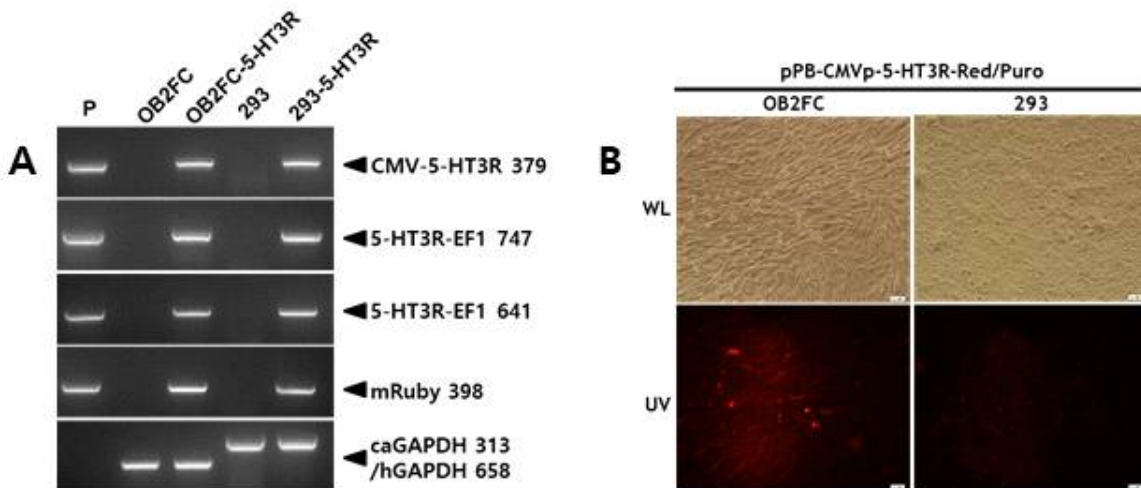


그림 175. pPB-CMVp-5-HT3R-Red/Puro vector를 도입한 293 세포와 복제건 유래 지방줄기세포주(OB2FC)에서의 분자생물학적 분석. A, 각 세포주에 대한 RT-PCR 분석; B, pPB-CMVp-5-HT3R-Red/Puro vector를 도입한 293 세포와 지방줄기세포에서의 mRuby 유전자의 발현 관찰

- (마) 분자생물학적인 분석이 완료된 지방줄기세포는 동결보존한 후 제1세부과제 요청 시 공급하고자 함.
- (사) 5-HT3R 유전자의 신경조직 특이적 발현을 위한 PiggyBac vector를 구축하기 위하여 Synapsin promoter의 조절 하에 5-HT3R 유전자를 도입한 PiggyBac vector를 재조합함.

(아) 구축한 vector를 복제건 유래 지방줄기세포(OB2FB)에 도입하여 세포주를 구축한 후 RT-PCR과 mRuby 유전자의 발현 확인을 위한 형광현미경 관찰 실시.

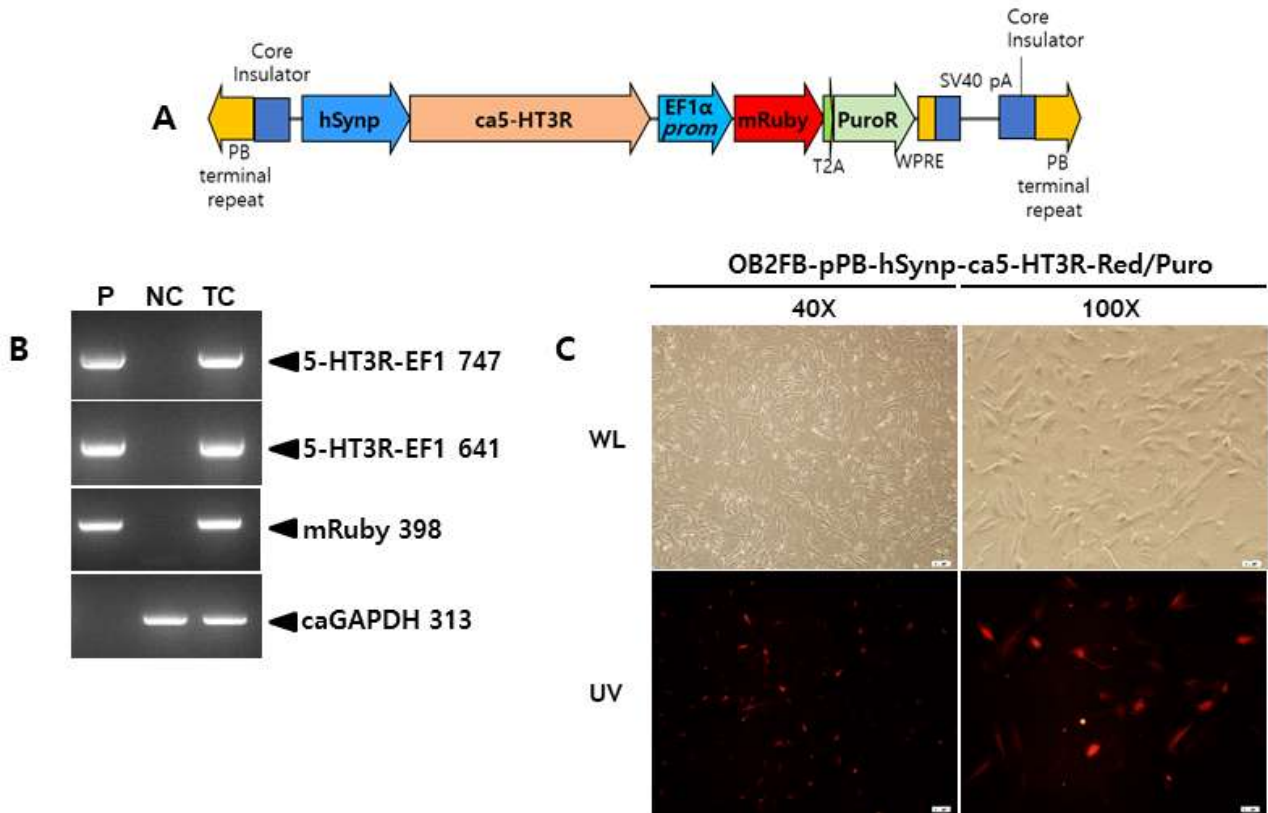


그림 176. pPB-Synp-5-HT3R-Red/Puro vector를 도입한 복제건 유래 지방줄기세포주 (OB2FB)에서의 분자생물학적 분석. A, pPB-Synp-5-HT3R-Red/Puro vector의 구조; B, 각 세포주에 대한 RT-PCR 분석; C, pPB-Synp-5-HT3R-Red/Puro vector를 도입한 지방줄기세포에서의 mRuby 유전자의 발현 관찰

## 7. 5-HT3R 발현 복제건의 유전학적 분석

가. 생산된 5-HT3R 발현 복제건의 genomic DNA PCR과 Southern blotting 분석

### (1) 연구방법

- (가) 제1세부과제에서 공급받은 대조건과 5-HT3R 형질전환건의 혈액으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR과 Southern blotting을 실시하였음
- (나) 5-HT3R 유전자 발현 복제건과 외래 유전자가 전이되지 않은 대조구 복제건의 genomic DNA를 분리한 후 표지 유전자인 mRuby와 5-HT3R 유전자, 그리고 negative control인 GAPDH 유전자에 대한 primer를 사용하여 genomic DNA PCR 실험

시

(다) Southern blotting 실험 5-HT3R 유전자 발현 복제건과 대조구 복제건의 genomic DNA를 Stu I 제한효소로 two cut하거나 Kpn I 제한효소로 one cut하여서 mRuby 유전자에 대한 probe로 hybridization 반응을 실시하였음

(2) 연구결과

(가) 제1세부과제에서 공급받은 대조건과 5-HT3R 형질전환건의 혈액으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR을 실시하였음. 그 결과, 전이된 vector의 여러 유전자에 대한 증폭이 정상적으로 이루어진 것을 확인하였음.

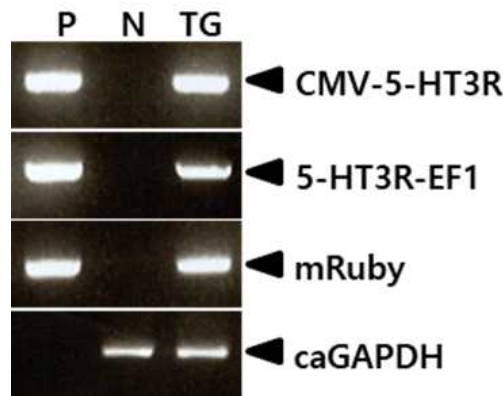


그림 177. 유전자가 전이되지 않은 복제건(N)과 5-HT3R 발현 복제건(TG)의 혈액에서의 genomic DNA PCR 분석

(나) 일반 복제건과 5-HT3R 발현 복제건의 genomic DNA를 이용하여 Southern blotting 을 실시하여 외래 유전자의 전이 여부와 전이된 유전자의 copy 수를 확인하고자 하였 음. 각각의 genomic DNA를 Kpn I 제한효소로 two cut하거나 Stu I 제한효소로 one cut하여서 mRuby 유전자에 대한 probe로 hybridization 반응을 실시한 결과, 5-HT3R 발현 복제건에서만 도입된 vector 상의 외래 유전자의 도입이 확인되었고 9 copy의 5-HT3R 유전자가 도입되었음을 확인

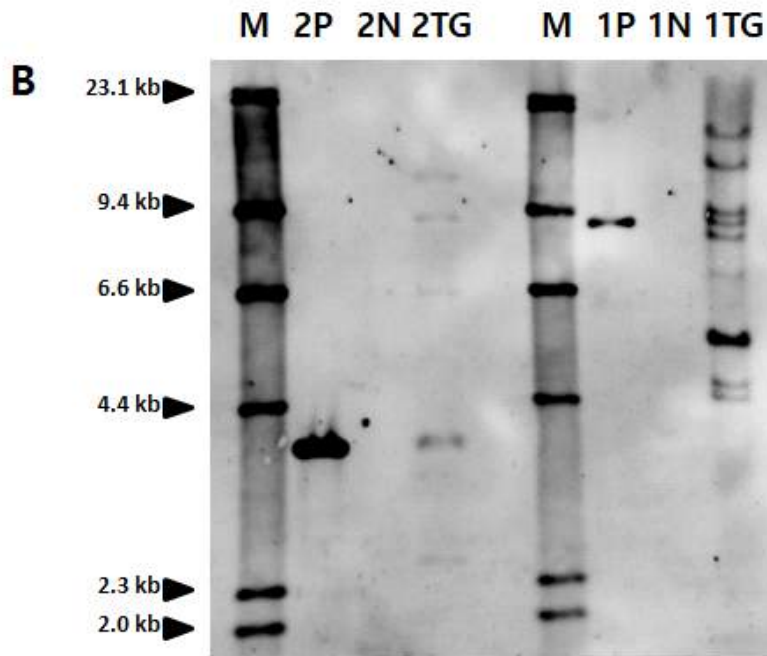
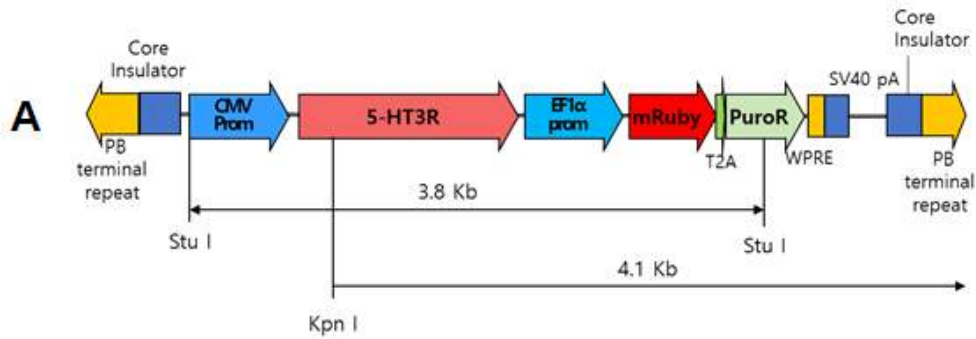


그림 178. 5-HT3R 발현 복제건의 Southern blotting 분석. A; Southern blotting에 사용한 제한효소 및 probe를 표시한 pPB-CMVp-5-HT3R-Red/Puro vector의 구조, B; Probe : mRuby probe, M : Size marker, 2P : pPB-CMVp-5-HT3R-Red/Puro (1 ng) / Stu I, 2N : 일반 복제건 혈액 genomic DNA (5  $\mu$ g) / Stu I, 2TG : 5-HT3R 발현 복제건 혈액 genomic DNA (5  $\mu$ g) / Stu I, 1P : pPB-CMVp-5-HT3R-Red/Puro (1 ng) / Kpn I, 1N : 일반 복제건 혈액 genomic DNA (5  $\mu$ g) / Kpn I, 1TG : 5-HT3R 발현 복제건 혈액 genomic DNA (5  $\mu$ g) / Kpn I

#### 나. 생산된 5-HT3R 형질전환 복제건의 quantitative real-time PCR 분석

##### (1) 연구방법

- (가) 제1세부과제에서 공급받은 대조건과 5-HT3R 형질전환 복제건의 혈액으로부터 RNA를 분리한 후 quantitative real-time PCR을 실시하여 5-HT3R 유전자의 발현을 분석하고자 하였음



(나) *GAPDH* 유전자의 Ct 값을 reference로 정하고 5-HT3R 유전자의 Ct 값을 target으로 정한 뒤  $2^{-\Delta\Delta CT}$  방법을 사용하여 5-HT3R 유전자의 발현 여부를 확인하였음

(2) 연구결과

(가) 제1세부과제에서 공급받은 대조건과 5-HT3R 형질전환 복제건의 혈액으로부터 RNA를 분리하여 quantitative real-time PCR을 실시하여 5-HT3R 유전자의 발현 수치를 *GAPDH* reference gene의 Ct 값을 이용하여 보정한 다음 분석한 결과 대조건에서는 발현 값이 나타나지 않은 데 비해 형질전환 복제건에서는 매우 높은 발현 값을 나타내는 것을 확인하였음.

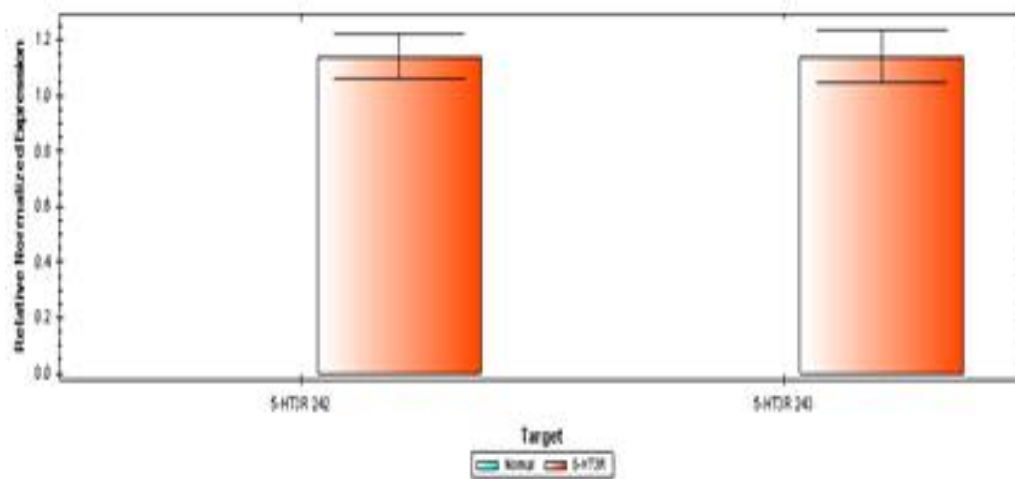


그림 179. 대조건과 5-HT3R 형질전환 복제건의 quantitative real-time PCR 분석



### 제 3 절 연구과제의 성과

#### 가. 지식재산권

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	근육 특이적 피옥시좀 증식체 활성화 수용체 델타 (PPAR-delta) 과발현 형질전환 개 생산	대한민국	서울대학교 산학협력단	2018.10.31	10-2018-0131499				
발명특허	근육 특이적 PCK1 과발현 형질전환 개 생산	대한민국	서울대학교 산학협력단	2018.10.31	10-2018-0131498				
발명특허	근육 특이적 피옥시좀 증식체 활성화 수용체 알파(PPARα) 과발현 형질전환 개 생산	대한민국	서울대학교 산학협력단	2017.11.01	10-2017-0144640				

#### 나. 국내외 논문 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation	Biochemical and biophysical research communications	E. M. N. Setyawan	479(4)	United States	Elsevier	SCI	2016-10-30	0006-291X
2	Learning, memory and exploratory	Journal of Veterinary	Chi Won Shin	17(4)	Republic of Korea	Korean	SCI	2016-12-	1976-555X

	similarities in genetically identical cloned dogs	Science			Korea	Society of Veterinary Science		30	
3	Oocyte maturation-related gene expression in the canine oviduct, cumulus cells, and oocytes and effect of co-culture with oviduct cells on in vitro maturation of oocytes.	J Assist Reprod Genet.	Seok Hee Lee	34(7)	Germany	Springer	SCI	2017-04-06	1058-0468
4	Clinical assessment after human adipose stem cell transplantation into dogs	Journal of veterinary science	Seok Hee Lee	19(3)	Republic of Korea	Korean Society of Veterinary Science	SCI	2018-05-31	1229-845X
5	Dog cloning-no longer science fiction	Reproduction in domestic animals : Zuchthygiene	Seok Hee Lee	53(S3)	United Kingdom	Wiley	SCI	2018-11-25	0936-6768
6	Health and temperaments of cloned working dogs	Journal of veterinary science	Min Jung Kim	19(5)	Republic of Korea	Korean Society of Veterinary Science	SCI	2018-09-30	1229-845X
7	Quantitative computed tomographic evaluation of bone mineral density in	The Journal of Veterinary Medical Science	Danbee Kwon	80	Japan	J-STAGE	SCI	2018-02-06	0916-7250

	beagle dogs: comparison with dual-energy x-ray absorptiometry as a gold standard								
8	Suberoylanilide hydroxamic acid during in vitro culture improves development of dog-pig interspecies cloned embryos but not dog cloned embryos	Journal of Reproduction and Development	Min Jung Kim	64	Japan	J-ST AGE	SCIE	2018 -04- 26	0916-8 818
9	Interaction of the EGFR signaling pathway with porcine cumulus oocyte complexes and oviduct cells in a coculture system	Journal of cellular physiology	Seok Hee Lee	234( 4)	Unite d States	Wiley	SCI	2019 -04- 30	0021-9 541
10	Birth of clones of the world's first cloned dog	Scientific reports	Min Jung Kim	7	Unite d Kingdo m	Nature Resear ch Journa l	SCI	2017 -11- 10	2045-2 322
11	Effect of co-culture canine cumulus and oviduct cells with porcine oocytes during maturation and subsequent embryo development of parthenotes in vitro	Theriogenolo gy	Seok Hee Lee	106	Netherl ands	Elsevi er	SCI	2018 -01- 15	0093-6 91X
12	The promise of dog cloning	Reprod Fertil Dev	Hyun Ju Oh	30	Austral ia	CSIRO	SCI	2017 -12- 04	1031-3 613
13	Clinical Assessment of Intravenous Endothelial Progenitor Cell	Cell transplantatio n	Lee SH	28(7)	United States	SAGE	SCI	2019 -07- 28	

	Transplantation in Dogs								
--	-------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

다. 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2016년도 한국 임상수의학회 춘계학술대회	Erif Maha Nugraha Setyawan	2016년 5월 21일	강원대학교	대한민국
2	18th ICAR (International Congress on Animal Reproduction)	Byeong Chun Lee	2016년 6월 26일-30일	투르	프랑스
3	2017 Conference of the international embryo technology society	Erif Maha Nugraha Setyawan	2017년 1월 14일-17일	오스틴	미국
4	2017 International Congress of Gynaecology and Obstetrics	Kihae Ra	2017년 5월 25일-27일	프라하 엠베서더 호텔	체코
5	2017 World Congress of Reproductive Biology	Min Jung Kim	2017년 9월 27일-29일	오키나와 컨벤션 센터	일본
6	2017 World Congress of Reproductive Biology	Seok Hee Lee	2017년 9월 27일-29일	오키나와 컨벤션 센터	일본
7	2017년도 춘계 한국수의임상학회	권단비	2017년 5월 20일	서울대학교	대한민국
8	2017년도 추계 한국수의임상학회	김별	2017년 10월 21일	서울대학교	대한민국
9	44th International embryo transfer society annual conference	Hyun Ju Oh	2018년 1월 13일-16일	방콕	태국
10	44th International embryo transfer society annual conference	Min Jung Kim	2018년 1월 13일-16일	방콕	태국
11	44th International embryo transfer society annual conference	Seok Hee Lee	2018년 1월 13일-16일	방콕	태국
12	2018 International society for extracellular vesicles	Seok Hee Lee	2018년 5월 2일-6일	바르셀로나	스페인

13	2018 European veterinary society for small animal reproduction,	Min Jung Kim	2018년 6월 22일-23일	베니스	이탈리아
14	2018 European veterinary society for small animal reproduction,	Kihae Ra	2018년 6월 22일-23일	베니스	이탈리아
15	3rd molecular biology of ageing meeting	Kihae Ra	2019년 10월 10일-12일	호로닝언	네덜란드

라. 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	학위취득	2018	1	5			2	4	6					
2	학위취득	2020	2				2		2					

## 제 4 절 연구과제 결과 총정리

본 과제의 최종 연구 결과는 다음과 같다. 총 3년 5개월 동안 신품종 우수 검역탐지견과 운동능/집중력이 향상된 스마트 탐지견을 생산하기 위하여 체세포핵이식으로 총 9마리의 복제견을 생산하였으며, 신품종 우수 검역탐지견 유래 복제견 6두와 형질전환복제견 3두를 생산하였다. 최종적으로 9두 중 7마리가 선발테스트를 통과하였으며, 2두는 연구과제의 중단으로 테스트를 실시하지 못하였다. 이를 통해 신품종 3종, 운동능 향상 2종, 집중력 향상 1종의 복제견을 생산하고 분석하였다.

1. 개에서 운동능과 집중력을 비침습적으로 분석을 위한 방법을 확립하였다. 대퇴근육 MRS 이용 근육성장분석기법과 CT 이용 골밀도와 근육량 분석을 위한 영상학적 기법을 확립하였으며, vMRI/고해상도 MRI를 이용한 개의 집중력을 분석기법을 개발하였다. 트레드밀을 이용한 점증운동부하검사를 통한 운동능력 분석기법을 확립하였다. 또한, 검역탐지견의 훈련과정을 응용한 보상물, 박스 박지, 가방 탐지 집중력 분석기법을 개발하였다.
2. 국내 신품종 우수 검역탐지견 4종과 국외 신품종 우수 검역탐지견 1종의 체세포를 성공적으로 확보하였다. 이를 이용하여 총 6두의 신품종 우수 검역탐지견 유래 복제견을 생산하였으며, 생리학적 영상학적 정상성 분석을 완료하였으며, 유전, 자건 자질평가를 거쳐 최종 탐지견 선발 테스트에서 평균 87점 이상의 높은 점수로 합격하여 검역탐지견으로써 성공적인 검증을 마쳤다. 따라서 본 연구를 통하여 3종의 신품종 우수 검역탐지견 6두를 확립하

였다.

3. 본 연구팀은 운동능 향상 I 복제건 개발을 위해 근육 특이 PCK1 발현 복제건을 생산하였다. 본 연구에서는 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 유전학적, 생리학적, 영상학적, 행동학적 분석을 하였으며, 유전학적 검사에서 안정적으로 PCK 1 유전자가 전이된 것을 확인하였다. 또한, PCK1 유전자의 10-12 copy의 안정적인 도입과 단백질의 발현을 확인하였다. 생리학적 분석 결과에서는 일반 복제건(1차년도 신품종 우수 검역탐지견 유래 복제건)과 유사한 결과를 관찰하였다. 영상학적 정상성 분석 결과에서 근육 특이 PCK 1 발현 복제건은 모든검사에서 정상임을 확인하였다. 골밀도 분석에서는 PCK1 발현 복제건이 일반복제건(1차년도 신품종 우수 검역탐지견 유래 복제건)들에 비해 대퇴경부에서 24% 골밀도가 높음을 확인하였다. CT 이용 근육량 분석: 일반 복제건, PCK1 발현 복제건의 근육량이 이전 1차년도 생산 일반 복제건 보다 낮았으나, 지방, 피부, 뼈의 부피가 분석시 제외되었기 때문이며 실제 감소한 것은 아닌 것으로 확인하였다. 또한, 대퇴근육 MRS 이용한 근육성상분석에서는 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 스펙트럼이 일반 복제건들의 스펙트럼보다 전반적으로 metabolite 물질들의 절대적인 농도 수치들이 높아 차이를 관찰하였다. 행동학적 분석에서 트레드밀을 이용한 점증운동부하검사에서 일반 복제건에 비하여 PCK 1 발현 복제건이 평균적으로 높은 심박수를 유지하고 있음을 확인하였다. 검역탐지견 자질 평가는 높은 점수로 합격하였고, 자견 보상물 집중력 평가에서도 3.75로 높은 집중력을 보였다. 7개월령 박스탐지와 가방탐지과정중 산만도 평가에서는 각각 1.23회와 1.1회로 매우낮은 결과가 관찰되어 일반 복제건에 비하여 높은 집중력을 보여주었다.

4. 운동능 향상 II 복제건 개발을 위해 근육 특이 PPAR $\gamma$  발현 복제건을 생산하였다. 본 연구에서는 근육 특이 PPAR $\gamma$  발현 복제건의 유전학적, 생리학적, 영상학적, 행동학적 분석을 하였으며, 유전학적 검사에서 안정적으로 PPAR $\gamma$  유전자가 전이된 것을 확인하였다. 또한, PPAR $\gamma$  유전자의 10 copy 이상 도입되었으며 피부와 근육에서 단백질이 우세하게 발현되는 것을 확인하였다. 생리학적 분석 결과에서는 일반 복제건과 유사한 결과를 보여주었다. 그러나 X-ray, CT, 초음파를 이용 정상성 평가에서 PPAR $\gamma$  발현건의 심장초음파에서 미약한 심실중격결손이 관찰되었으나 수축과 이완을 하는 심장 기능은 정상임을 확인하였으며 검역탐지견으로 활동하는 데 임상적으로 문제가 없음을 확인하였다. 이외 두개골, 요추, 골반, 그리고 간담도계와 신장을 X-ray와 초음파를 이용하여 모두 정상임을 검증하였다. CT를 이용한 골밀도, 근육량, 근육성상등의 분석은 심장 막주위형 심실중격결손을 보임으로 마취부담으로 2년령 심실중격 결손 검사 결과 확인 후 CT 검사를 진행하는 것으로 계획하였으나 4차년도 상반기 연구가 중단되어 추가 진행은 하지 못했다. 행동학적 분석에서 트레드밀을 이용한 점증운동부하검사에서 일반 복제건에 비하여 PCK1 발현 복제건과 동일하게 PPAR $\gamma$  발현 복제건에서도 평균적으로 높은 심박수를 유지하고 있음을 확인하였

다. 검역탐지견 자질 평가는 165.5의 높은 점수로 합격하였고, 자견 보상물 집중력 평가는 4.2로 높은 결과가 관찰되어 일반 복제견에 비하여 높은 집중력을 보여주었다.

5. 집중력 향상 복제견 개발을 위해 5-HR3R 발현 복제견을 생산하였다. 본 결과보고서는 5-HR3R 발현 복제견의 유전학적, 생리학적, 영상학적, 행동학적 분석 중 유전학적 분석만 시행하였으며, 나머지 연구들은 연구과제의 중단으로 인하여 진행하지 못하였다. 유전학적 검사에서 안정적으로 PPAR $\gamma$  유전자가 전이된 것을 확인하였으며, Southern blotting을 실시하여 9copy 수의 PPAR $\gamma$  유전자가 도입된 것을 검증하였다. 또한, quantitative real-time PCR을 이용하여 일반 복제견과 5-HT3R 발현 복제견간의 5-HT3R 유전자의 발현량을 비교하였으며, 5-HT3R 발현 복제견에서 높은 발현 값을 나타내는 것을 확인하였다.
6. 따라서 최종적으로 본 과제에서는 운동능/집중력 향상 복제견들은 성공적으로 생산되었다. 신품종 복제견과 근육 특이 PCK1 발현 복제견은 검역탐지견선발을 성공적으로 합격하여 검역탐지견으로 가능성을 검증받았다. 또한, 본 연구에서 확립된 영상학적/행동학적 분석 방법을 이용하여 운동능과 집중력을 분석하여 복제 우수검역탐지견과 비교를 실시하여 보다 우수한 능력을 지니고 있음을 확인하였다. 또한, 본 연구에서 생산되어진 형질전환복제견 3종은 모두 유전학적 분석 결과 외래 유전자들이 안정적으로 전이된 것을 확인하여 성공적으로 형질전환이 됨을 검증하였다. 하지만 실험의 조기 중단으로 인해 PPAR $\gamma$  발현 복제견과 5-HT3R 발현 복제견의 충분한 과학적 임상학적 기능적인 평가와 정상적인 평가 및 번식학적 정상성 평가가 진행되지 못하였으며, 시스템이 허락한다면 추가적인 분석을 통해 이들을 분석하고 평가하는 것이 필요할 것으로 판단되어 진다. 결론적으로 체세포핵이식을 통해 생산된 신품종 우수 검역탐지견뿐만 아니라 PCK1 발 복제견은 검역기술 고도화를 위한 스마트 탐지견으로의 가치는 충분하다고 판단된다.

## 7. 결과 총정리

복제견	유전학적 분석 결과	영상학적 분석 결과	행동학적 분석 결과
신품종 우수 검역탐지견 유래 복제견	6두의 신품종 우수검역탐지견 유래 복제견을 생산	X-ray, CT, 초음파를 이용 정상성 평가: 두개골, 요추, 골반에서 해부학적 정상성을 확인하였으며, 간담도계, 신장, 심장의 초음파 검사상에도 모두 정상으로 판단	자견 자질평가: 150점 이상을 획득 우수한 검역탐지견으로의 자질을 지님을 검증
			자견 보상물 집중력 평가: 평균 4.5의 먹이 보상물에 대한 우수한 집중력을 보임
		CT 이용 골밀도 분석: 요추와 대퇴골의 골밀도를 분석하여 운	박스탐지 과정 중 산만도 평가 (6~7개월령): 1.9~5.6회의 낮은

		<p>동능 평가를 위한 자료 수집</p> <p>CT 이용 근육량 분석: 복제건의 대퇴부 근육량 및 대퇴골 직경과 그 둘 사이의 비율을 측정하여 운동능 평가를 위한 자료 수집</p> <p>대퇴근육 MRS 이용 근육성상 분석: 근육성상 분석 기법을 확립하고 신포종 우수검역탐지건의 대퇴근육을 성공적으로 분석 운동능 평가를 위한 자료 수집</p> <p>vMRI/고해상도 MRI이용 집중력 분석: 대뇌 피질 및 전두엽의 부피를 측정하여 집중력 분석 위한 자료 수집</p>	<p>산만도를 보임으로 높은 집중력을 지님을 확인</p> <p>가방탐지 과정 중 산만도 평가 (6~7개월령): 1.2~3.6회의 낮은 산만도를 보임으로 높은 집중력을 지님을 확인</p> <p>점중운동부하검사를 이용 운동능 평가: 트레드밀을 이용한 점중운동부하검사를 통해 신포종 우수검역탐지건의 심박수를 평가하여 점중운동부하검사 프로토콜을 확립</p> <p>최종선발: 신포종 복제건 모두 탐지건 최종평가 결과 합격</p>
<p>운동능 조절 유전자 I 발현 (PCK1 발현) 복제건</p>	<p>근육 특이 PCK1 발현 복제건 1 두를 생산</p>	<p>X-ray, CT, 초음파를 이용 정상성 평가: 두개골, 요추, 골반의 해부학적 정상성을 확인하였으며 동일연령 일반 복제건(2차년도 생산 신포종 복제건)과 차이를 보이지 않음</p> <p>간담도계, 신장, 심장의 초음파 검사도 정상이며, 동일연령 일반 복제건과 차이가 없는 것으로 판단</p>	<p>자건 자질평가: 총 40가지 항목을 3명의 handler가 분석한 결과 164점 이상을 획득 합격</p> <p>자건 보상물 집중력 평가: 평균 3.75로 높은 집중력을 보임</p>
	<p>PCR을 실시하여 형질전환 복제건의 genomic DNA에서만 PCK1 유전자의 전이 확인</p>	<p>CT 이용 골밀도 분석: PCK1 발현 복제건 및 일반복제건의 대퇴골 골밀도의 단순 비교 결과 대퇴경부에서 24%의 골밀도 증가가 확인</p>	<p>박스탐지 과정 중 산만도 평가 (6~7개월령): 평균 1.23회로 매우 낮은 산만도를 보였으며, 일반 복제건에 비해서도 매우 높은 집중력을 지님을 확인</p>
	<p>Southern blotting을 실시하여 10 ~ 12 copy가 도입 copy 내외의 PCK1 유전자의 도입을 검증</p>	<p>CT 이용 근육량 분석: 일반 복제건, PCK1 발현 복제건 (우주)의 근육량이 이전 1차년도 생산 일반 복제건 (동, 서, 남)보다 낮으나, 지방, 피부, 뼈의 부피가 분석시 제외되었기 때문이며 실제 감소한 것은 아님</p>	<p>가방탐지 과정 중 산만도 평가 (6~7개월령): 평균 1.1회로 매우 낮은 산만도를 보였으며, 일반 복제건에 비해 매우 높은 집중력을 지님을 확인</p>
	<p>Western blotting을 실시하여 형질전환 세포주에서만 약 69 kDa의 PCK1 단백질이 발현 확인</p>	<p>대퇴근육 MRS 이용 근육성상 분석: 근육 특이 PCK1 발현 복제건의 스펙트럼이 일반 복제건들의 스펙트럼보다 전반적으로 metabolite 물질들의 절대적인 농도 수치들이 높게 확인</p>	<p>점중운동부하검사를 이용 운동능 평가: 운동능 항상 복제건은 일반 복제건에 비해 정상범위 내에서 높은 심박수를 보였음. 이는 동일한 운동을 실시한 대조군보다 더 많은 유산소성 대사가 이루어진 것으로 사료</p>
	<p>생리학적 정상성 분석 결과 혈액, 혈청학적 수치에서 일반 복제건과 차이가 없이 정상임을</p>		<p>최종선발: 탐지건 최종 평가 결과 90점으로 합격</p>



<p>운동능 조절 유전자 II 발현 (PPAR<math>\gamma</math> 발현) 복제건</p>	<p>확인 근육 특이 PPAR<math>\alpha</math> 발현복제개 생산 근육 특이 PPAR<math>\delta</math> 발현복제개 생산 PCR을 실시하여 형질전환 복제건의 genomic DNA에서만 PPAR<math>\delta</math> 유전자의 전이 검증 Southern blotting을 실시하여 10copy 이상의 PPAR<math>\delta</math> 유전자의 도입을 검증 Western blotting 실험에서는 PPAR<math>\delta</math> 단백질은 PPAR<math>\delta</math> 발현 복제건의 근육과 피부에서만 확인되었으며 특히 근육조직에서 비교적 발현이 우세 검증 생리학적 정상성 분석 결과 혈액, 혈청학적 수치에서 일반 복제건과 차이가 없이 정상임을 확인</p>	<p>X-ray, 초음파를 이용 정상성 평가: 두개골, 요추, 골반에서 해부학적 정상성을 확인하였으며, 간담도계, 신장 초음파 검사 정상 확인 심장 초음파에서 막주위형 심실 중격결손 확인되었으나 수축기 및 이완 기능 정상 확인 2살령에 심장 초음파 통해 심실 중격결손의 자연치유 여부 검사 실시 CT 이용 골밀도, 근육량, 근육 정상등의 분석은 심장 막주위형 심실중격결손으로 인한 마취부담으로 2년령 심실중격 결손 검사 결과 확인 후 CT 검사 진행</p>	<p>자건 자질평가: 항목평가 평균 4.1(164)의 높은 점수로 합격 자건 보상물 집중력 평가: 평균 4.2의 먹이 보상물에 대한 우수한 집중력을 보임 박스탑지 과정 중 산만도 평가 (6~7개월령): 평균 1.26회로 매우 낮은 산만도를 보였으며, 일반 복제건에 비해서도 매우 높은 집중력을 지님을 확인 점중운동부하검사를 이용 운동능 평가: 운동능 향상 복제건은 일반 복제건에 비해 정상범위 내에서 높은 심박수를 보였음. 이는 동일한 운동을 실시한 대조군보다 더 많은 유산소성 대사가 이루어진 것으로 사료</p>
<p>5-HT3R 발현 복제건</p>	<p>5-HT3R 발현 복제건 생산 PCR을 실시하여 형질전환 복제건의 genomic DNA에서만 5-HT3R 유전자의 전이 검증 Southern blotting을 실시하여 외래 유전자의 전이 여부와 전이된 유전자의 9copy 수를 확인 일반 복제건과 5-HT3R 발현 복제건의 real-time PCR 분석 결과 형질전환 복제건에서는 5-HT3R 유전자가 매우 높은 발현 값을 나타내는 것을 확인</p>	<p>2019년 5월 과제 중단으로 실험 실시 불가</p>	<p>2019년 5월 과제 중단으로 실험 실시 불가</p>

### 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 1. 최종 목표

검역기술 고도화를 위해 신제품 우수 검역탐지견 세포를 기반으로 검역탐지견에게 필요한 자질인 운동능 또는 집중력이 강화된 스마트 탐지견을 생산하는 것이다. 또한, 특정 유전자가 조절된 형질전환 복제견의 영상학적 분석을 이용한 운동능력 평가와 행동학적 분석을 이용한 집중력 평가를 실시하여, 최종적으로 검역기술의 고도화를 위해 검역현장에 적용하여 창의적 운용 검역체계를 구축하는 것이다. 이를 위하여 첫 번째는 형질전환 체세포핵이식을 이용한 운동능 향상 1) 근육 특이 PCK1 발현 복제견과 2) PPAR $\gamma$  발현 복제견 2종을 생산하였으며, 두 번째로 집중력 향상 HT3R 발현 복제견 1종을 생산하였다. 생산된 3종의 복제견의 genome 상에서 외래유전자들의 도입을 100% 검증하였으며, 비침습적 방법을 개발하여 운동능과 집중력을 검증하였으며, 검역탐지견으로의 능력도 함께 평가하였다.

#### 2. 목표 달성도

구분	세부 연구의 목표	가중치 (%)	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
1차년도 (2016)	신제품 복제 탐지견 유래 복제견 생산	30	○ 복제견 4두 생산으로 100% 달성 ○ 활성화가소화작용 (autophagy)을 유도하는 rapamycin을 이용한 단위발생 향상 기법 개발로 100% 달성	100
	운동능 향상I(PCK1발현) 세포주 생산	20	○ 형질전환 세포주 제작에 적합한 표적세포주 및 유전자 전이 vector system 선별로 100% 달성 ○ 근육 특이적 PCK1 유전자 발현을 위한 형질전환 세포주 2종 생산으로 100% 달성	100
	운동능 분석 기법 개발	25	○ 운동능 평가를 위해 트레드밀 평가방법을 확립으로 100% 달성 ○ 근육량의 영상학적 분석을 위한 CT를 이용한 방법 개발로 100% 달성 ○ MRS/CEUS에 의한 근육성상의 영상학적 분석기법 개발로 100% 달성	100
	집중력 분석 기법 개발	25	○ 자견에서 보상물에 대한 집중력 분석을 위한 행동학적 평가의 개발로 100% 달성 ○ 개에서 vMRI/고해상도 MRI에 의한 집중력 관련 뇌 분석법 개발로 100% 달성	100
<b>※ 1차 년도 달성도</b> 1차 년도 주요 목표인 <u>신제품 복제 탐지견의 생산을 완전하게 수행 완료</u> 하였다.				

	비침습적 기법인 영상학적 행동학적 방법을 이용하여 집중력과 운동능을 분석하기 위한 방법을 확립하였으며, 이를 1~4차 년도동안 생산되어진 복제건의 분석에 적용하였다. 개의 행동학적 분석 프로토콜은 논문으로 게재되었으며, 차 년도 운동능 향상 복제건을 생산하기 위한 세포주의 구축 등을 완료하여 <b>평가의 착안점 및 기준을 100% 달성</b> 하였다.			
2차년도 (2017)	신품종 복제 탐지건의 운동능/집중력 평가	20	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 트레이드밀을 활용한 운동능 평가 기법 확립으로 100% 달성</li> <li>○ 다양한 영상학적 기법을 활용하여 정상성 평가 100% 달성</li> <li>○ 근육량 측정의 경우 성공적으로 100% 달성</li> <li>○ MRS를 이용한 운동능 평가의 100% 수행</li> <li>○ 개에 적합한 집중력 평가를 위한 행동학적 방법 확립으로 100% 달성</li> <li>○ vMRI/고해상도 MRI를 이용한 평가 기준 마련으로 100% 달성</li> <li>○ 1차년도 생산된 복제건 4두 모두 최종선발됨으로 100% 달성</li> </ul>	100
	운동능 향상(PPAR $\alpha$ ) 복제건 생산	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 당해연도 PCK1 발현을 대체하여 PPAR<math>\alpha</math> 발현건 4두를 생산하여, 향후 생산할 형질 전환개체에 대한 안전성과 가능성을 성공적으로 평가함으로 100% 달성</li> <li>○ 신품종 우수 검역탐지건 유래 복제건 3두의 생산으로 100% 달성</li> <li>○ 근육 특이 PPAR<math>\alpha</math> 발현 복제건의 TPR, CBC, serum chemistry를 성공적으로 수행</li> </ul>	100
	운동능 향상II(PPAR $\gamma$ 발현) 세포주 개발	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 근육 특이적 PPAR<math>\gamma</math> 및 PPAR<math>\delta</math> 세포주 2종 생산으로 100% 달성</li> </ul>	100
<p><b>※ 2차년도 달성도</b></p> <p>2차년도 주요목표인 PCK1 발현을 대체하여 <b>PPAR<math>\alpha</math> 발현건 4두를 생산하여, 향후 생산할 형질전환개체에 대한 안전성과 가능성을 성공적으로 평가</b>하였다. 1차년도 생산한 신품종 복제 탐지건의 운동능과 집중력을 본 과제에서 기도출된 영상학적 행동학적 방법을 이용하여 분석하였 분석 방법을 검증하였으며, 1차년도 생산 일반 복제건 모두 최종선발되어 검역현장에 성공적으로 투입되었다. 또한, <b>근육 특이 PPAR<math>\alpha</math> 발현 복제건의 유전자 검증을 완료하여 생산기술을 국내 특허로 출원</b>하였다. 차 년도 운동능 향상 복제건을 생산하기 위한 세포주의 구축을 확립하여 <b>2차년도 평가의 착안점 및 기준을 100% 달성</b>하였다.</p>				
3차년도 (2018)	운동능 향상I (PCK1발현) 복제건 생산 및 유전학적 분석	25	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 운동능 향상I (PCK1발현) 복제란 생산 후 복제란에서 RFP의 발현 확인한 뒤, 근육 특이 PCK1 발현 복제건을 생산하였고 해당 개체를 검역탐지건에 이송함으로써 100% 달성</li> <li>○ PCK1 발현 복제건의 분자생물학적인 분석을 100% 성공적으로 실시함</li> </ul>	100

		○ PCK1 발현 복제건의 생리학적 분석 100% 성공적으로 실시함	
2차년도 생산 복제 탐지건과 PCK1 발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성/운동능/집중력 평가	20	○ 2차년도 생산된 일반 복제건(해,달)과 PCK1 발현 복제건(우주)의 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성 평가는 100% 달성 ○ 일반 복제건(해,달)과 PCK1 발현 복제건(우주)의 영상학적 기법을 이용한 운동능 평가는 100% 달성됨 ○ 일반 복제건(해, 달)의 MRI 촬영 및 대뇌 피질 측정은 100% 완료됨 ○ PCK1 발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 대뇌 피질과 전두엽의 집중력 평가를 위한 촬영 100% 달성 ○ 일반 복제건과 PCK1 발현 복제건의 행동학적 기법을 이용한 운동능 평가는 100% 달성됨	100
운동능 향상II (PPARδ발현) 복제건 생산 및 유전학적 분석	25	○ PPARδ 발현 복제란 생산 후 복제란에서 GFP의 발현 확인한 뒤, 근육 특이 PPARδ 발현 복제건을 생산하였고 해당 개체를 검역탐지건에 이송함으로써 100% 달성 ○ PPARδ 발현 복제건의 분자생물학적인 분석을 100% 성공적으로 실시함 ○ PPARδ 발현 복제건의 행동학적 기법을 이용한 운동능 평가는 100% 달성됨	100
집중력 향상(5-HT3R발현) 세포주 개발 및 검증 분석	20	○ 집중력이 향상된 형질전환 검역탐지건의 생산에 사용하기 위한 HT3R 유전자가 도입된 지방줄기세포주를 100% 확립하고 분자생물학적 분석을 실시함	100
운동능 향상I(PCK1발현) 복제건 검역원 검역 현장 적용 가능성 분석	10	○ 최종평가까지 100% 완료, 현재 인천공항에서 현장 적응훈련 수행중. 향후 현장 적응훈련 완료 후 현장 적용 가능성 분석예정(2019년이후)	100
<p><b>※ 3차 년도 달성도</b>  3차년도는 주요 목표인 <b>운동능 향상I (PCK1발현) 복제건과 운동능 향상II (PPARδ발현) 복제건을 성공적으로 생산하여 주요성과를 달성</b>하였다. 2차년도 생산 복제 탐지건과 PCK1 발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성/운동능/집중력 평가를 실시하여 운동능과 집중력을 비교 분석하여 평가하였으며, 특히 <b>PCK1 발현 복제건은 최종 탐지건 선발 평가를 합격하여 현장 적용 가능성을 보여</b>주었다. 근육 특이적 PCK1 과발현 형질전환 개 생산 기술과 근육 특이적 피옥시좀 증식체 활성화 수용체 델타(PPAR-delta) 과발현 형질전환 개 생산 기술은 국내 특허로 각각 출원하여 <b>2건의 지적 재산을 확보</b>하였다. 따라서 3차 년도에서는 <b>2종의 운동능 향상 복제건을 생산과 차년도 집중력 향상(5-HT3R발현) 발현 세포를 확립하여 평가의 착안점 및 기준을 100% 달성</b>하였다.</p>			

4차년도 (2019)	집중력 향상(5-HT3R발현) 복제건 생산	50	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 5-HT3R 발현 복제을 성공적으로 생산하고 검역탐지건에 이송함으로써 100% 달성</li> <li>○ 5-HT3R 발현 복제건의 분자생물학적인 분석을 100% 성공적으로 실시함</li> <li>○ 5-HT3R 발현 복제건의 생리학적 분석 연구중단으로 불가</li> <li>○ 5-HT3R 발현 복제 자건에서 보상물에 대한 집중력을 행동학적으로 평가 연구중단으로 불가</li> </ul>	50
	운동능 향상II(PPAR $\gamma$ 발현) 복제건 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성/운동능/집중 력 평가	35	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 영상학적 기법을 이용한 해부학적 정상성 평가는 100% 달성</li> <li>○ PPAR<math>\gamma</math> 발현 복제건(은하)의 영상학적 기법을 이용한 운동능 평가 불가</li> <li>○ PPAR<math>\gamma</math> 발현 복제건의 생리학적 분석 100% 성공적으로 실시함</li> <li>○ PPAR<math>\gamma</math> 발현 복제 유건/자건의 자질 행동 100% 달성</li> <li>○ PPAR<math>\gamma</math> 발현 복제건의 영상학적 기법을 이용한 집중력 평가 연구중단으로 불가</li> <li>○ PCK1 발현 복제건과 PPAR<math>\delta</math> 발현 복제건의 검역 현장 검증 및 스마트 탐지건으로의 검증 연구중단으로 불가</li> </ul>	50
	형질전환 복제건의 분자생물학적 분석	15	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 형질전환 복제건 3종의 나이에 따른 유전자 발현량 추이를 유전학적으로 분석 일반 복제건과 비교하여 진행</li> </ul>	20
	<p><b>※ 4차 년도 달성도</b>  4차년도는 <u>주요 목표인 집중력 향상(5-HT3R발현) 복제건을 성공적으로 생산하여 분자생물학적 분석을 완료하여 성과를 달성하였다.</u> 3차년도 생산한 PPAR<math>\gamma</math> 발현 복제건의 생리학적 영상학적 정상성 평가를 완료하였으며, <u>검역탐지건으로의 유건/자건 자질평가를 통과하였다.</u> 그러나 4차년도 상반기 과제수행이 중지되어 생산된 5-HT3R 발현 복제건의 평가와 운동능 향상 복제건들의 추가적인 분석을 수행하지 못하여 운동능과 집중력을 계획대로 완벽하게 분석하지 못하였다.</p>			

결론적으로, 본 과제는 3년 4개월 동안 총 3종의 운동능 향상 복제건과 집중력 향상 복제건을 성공적으로 생산하였으며, 신품종 우수 검역탐지건 유래 복제건 6두를 생산 및 검역탐지건으로의 검증을 완료하였다. 근육 특이 PCK1 발현 복제건은 행동·유전·영상 분석을 통해 검역탐지건으로의 가능성을 검증하였다. 비록 PPAR $\gamma$  발현 복제건과 5-HT3R 발현 복제건의 추가적인 분석과 근육 특이 PCK1 발현 복제건을 포함하여 고도검역화를 위한 스마트 탐지건의 활용 가능성을 최종적으로 검증하지는 못하였으나, 현재까지의 결과를 토대로 본 과제에서 생산된 근육 특이 PCK1 발현 복제건과 PPAR $\gamma$  발현 복제건은 스마트 탐지건으로의 활용 가능성을 충분히 보여주었다고 판단한다.

### 3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성)

본 연구과제는 4차년도 사업 중 2019. 4. 18. 서울대학교 동물윤리위원회의 연구과제 중단 요청과 2019년도 농림축산식품부 수출전략기술개발사업 수행연구과제 연구개발비 집행정지를 2019.5.29.에 통보를 받아 연구가 중단되었다. 본 연구과제 3차년도까지 연차별 연구개발 추진일정에 따라 성실하게 연구가 진행되어 연차별 목표를 모두 달성하였으며, 연차별로 모두 80점 이상 우수한 연차평가를 받았다. 그러나 2019. 4. 이후 계획되어진 연구내용은 진행하지 못하였다.

## 제 4 장 연구결과의 활용 계획

### 1. 추가 연구의 필요성 및 타 연구에의 응용

본 연구를 통하여 체세포핵이식 기법을 이용한 스마트 탐지견의 생산 가능성을 검증하였다. 그러나 과제의 수행이 4차년도 상반기에 중단되어 2종의 운동능 향상 복제견과 1종의 집중력 향상 복제개를 생산했음에도 불구하고, 모니터링을 충분히 하지 못하는 문제점이 발생하였으나, 근육 특이 PCK1 발현 복제견의 영상분석과 행동분석 결과에서 검역탐지견으로 활용성 검증이 충분히 이루어졌다. 따라서 추가 분석연구를 통해 3종의 형질전환 복제견의 활용 가능성을 검증해야 할 필요성은 분명히 타당하다.

본 연구진 이외에 운동능 향상과 집중력 향상을 유도한 개 모델의 생산연구는 없으며, 본 과제에서는 특히 생산에서 연구를 마치지 않고 행동학적 반응과 영상학적 분석을 통해 유전자 변형으로 인해 일어나는 대사와 표현형을 분석하여 관찰하였다. 이러한 세계에 유일무이한 형질전환 복제견들의 지속적인 관찰과 분석은 스마트 탐지견으로의 활용뿐만 아니라 인간의 근육 관련 질환과 집중력 관련 질환 연구에도 활용할 수 있는 모델견이 될 것이다. 또한, 본 과제에서 개의 집중력을 향상을 위해 이용한 유전자는 인지와 관련된 퇴성성 뇌질환 또는 집중력장애와 같은 질환과 관련 있음이 밝혀져 있다. 따라서 이러한 유전자들의 발현이 높은 복제견들을 역으로 이용하면 관련 유전자들의 발현 기전 또는 이들과 관련된 환경 또는 물리적인 요소들에 대한 연구에도 응용이 가능할 것이다.

### 2. 연구개발 결과의 활용방안

#### 가. 스마트 탐지견의 실용화를 통한 국내 고유 검역기술의 역량강화

- (1) 운동능, 집중력처럼 특정 능력을 향상시킨 스마트 탐지견의 개발 및 현장 투입을 통해 실용화가 가능할 뿐 아니라 검역 현장에서의 기존 한계점을 극복하는 등 현장 애로를 해결할 수 있다.
- (2) 검역탐지견에게 필수적인 운동능, 집중력 등을 조절하여 검역 기술의 효율을 향상시킴으로써 전세계적으로 국내 연구진만 보유하고 있는 개 복제의 기술력을 향상시켜 적용 영역을 더 넓힐 수 있을 뿐 아니라 국내 고유의 검역 기술을 확보할 수 있다.
- (3) 국내 연구진에 의해 확보된 유일무이한 스마트 탐지견 생산, 분석 기술의 개발 및 스마트 탐지견에 적합한 검역탐지견 훈련 및 활용 기술을 도출함으로써 국내 검역 기술의 고도화가 가능할 것이다.

#### 나. 스마트 탐지견 생산 및 분석 기술의 산업화

- (1) 세계화의 가속화에 따라 신종 감염병과 불법 축산물로부터 자국민을 보호하기 위한 검역 강화의 중요성이 점차 부각됨에 따라 사람이나 기계의 한계를 기존 대비 2 배 이상의 효율로 보완할 수 있는 스마트 탐지견을 해외 각국에 수출하여 새로운 시장을 형성할 수 있다.
- (2) 운동능 및 집중력 향상 스마트 탐지견의 생산은 근육 및 신경, 행동이상 모델 형질전환 복제견 생산의 가능성을 제시하며, 마우스 위주의 실험동물 모델 시장을 계통발생학적으로 인간과 가까운 개 모델 시장으로 확대시킬 것이고 이와 연관된 시장의 선점에 활용할 수 있다.
- (3) 스마트 탐지견의 운동능 및 집중력을 분석하고 평가하는 방법을 개발하여 스마트 탐지견 자체 외에도 개에서 발달 초기 단계의 분석 기술들을 확립하여 지적재산권을 도출함으로써 산업화로의 활용이 가능할 것이다.
- (4) 암 탐지견처럼 대사증후군, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 등 현대인의 건강을 위협하는 대표적인 질병들을 초기에 탐지하도록 특화된 스마트 메디컬 탐지견 (일본 문부성 선정 '50년 후 미래기술'의 하나) 등 다양한 목적의 스마트 탐지견의 생산 기술에 대한 라이선싱을 확보할 수 있다.

### 3. 연구개발 결과의 기대성과

#### 가. 기술적 측면

- (1) 운동력 또는 집중력이 향상된 스마트 탐지견에 적합한 특수 훈련 기술, 사육 기술 등을 개발할 수 있음은 물론 개체의 향상된 에너지 대사에 적합한 특수 사료가 개발되는 등 스마트 탐지견의 개발에 따라 필수불가결하게 필요한 관련 산업의 기술이 발달될 것으로 기대된다.
- (2) 근육 특이 또는 신경 특이 외래유전자 발현 시스템을 활용하여 인간질병에 대한 다양한 형질전환 모델을 개발하는데 활용함으로써 유도한 질병에 대하여 치료제 또는 예방약 개발 및 진단 기술 개발도 향상될 수 있을 것으로 기대된다.
- (3) 수의 분야에서도 자기공명분광법, 조영 증강 초음파 검사법, 정량적 전산화 단층촬영법 및 부피측정 자기공명영상법 등 다양한 영상학적 분석 기술이 확립됨에 따라 수의영상학 분야에서 진단의 정밀성과 효율성이 향상될 것으로 기대된다.
- (4) 집중력 향상을 평가하기 위한 행동 평가법 개발을 통해 우수한 후보 탐지견을 선발하는 새로운 가이드라인을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

#### 나. 경제·산업적 측면



- (1) 운동능 또는 집중력이 향상된 스마트 탐지건은 현재 정부기관 내에서 운용 중인 특수목적건에 대한 활용도를 한층 증진시켜 특수목적건의 양성을 제고와 생산 및 구매비용 절감에 기여할 것이다.
- (2) 다양한 난치성 질병모델 개발의 계기가 되어 차세대 질병 연구 모델 및 치료제 개발에 대한 메디컬 산업 시장을 선점하여 진단 및 치료비용 경감 효과를 가시화 할 수 있을 것으로 기대된다.
- (3) 집중력/운동능이 향상된 우수한 스마트 탐지건이 일선에서 활동함으로써 불법 농축산물 반입을 효과적으로 제재하는 등 국가 검역과 국경안보 등 범국민적 안전 향상에 크게 기여 할 것으로 기대된다.

## 붙임. 참고문헌

1. Manickam and Wahli. Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$  in skeletal muscle physiology. *Biochimie*. 2017. 136: 42-48.
2. Koh et al. PPAR $\beta$  is essential for maintaining normal levels of PGC-1 $\alpha$  and mitochondria and for the increase in muscle mitochondria induced by exercise. *Cell Metab*. 2017. 25: 1176-1185.e5.
3. Fan et al. PPAR $\delta$  promotes running endurance by preserving glucose. 2017. 25: 1186-1193.e4.
4. Harrel and Allan. Improvements in Hippocampal-Dependent Learning and Decremental Attention in 5-HT $3$  Receptor Overexpressing Mice. *Learning & Memory*. 2003. 10:410 - 419.
5. Bhatnagar et al. Deletion of the 5-HT $3$  receptor differentially affects behavior of males and females in the Porsolt forced swim and defensive withdrawal tests. *Behavioural Brain Research*. 2004. 153: 527 - 535.
6. Salahpour et al. Increased amphetamine-induced hyperactivity and reward in mice overexpressing the dopamine transporter. *PNAS*. 2008. 105(11): 4405 - 4410.
7. Giros et al. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*. 1996. 379: 611-612.
8. Ramos et al.  $\alpha$ 2A-adrenoceptor stimulation improves prefrontal cortical regulation of behavior through inhibition of cAMP signaling in aging animals. *Learn Mem*. 2006. 13: 770 - 776.
9. Sagvolden. The alpha-2A adrenoceptor agonist guanfacine improves sustained attention and reduces overactivity and impulsiveness in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). *Behav Brain Funct*. 2006. 2: 41.
10. Zuscik et al. Overexpression of the  $\alpha$ 1B-adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration: Multiple system atrophy. *Nature*. 2000. 16: 1388-1394.
11. Luhrs et al. Function of Brain A $2b$ -Adrenergic Receptor Characterized with Subtype-Selective A $2b$  Antagonist and KO Mice *Neuroscience*. 2016. 339: 608 - 621.
12. Mirza and Stolerman. Nicotine enhances sustained attention in the rat under specific task conditions. *Psychopharmacology*. 1998. 138: 266 - 274.
13. Semenova, Stolerman & Markou. Chronic nicotine administration improves attention while nicotine withdrawal induces performance deficits in the 5-choice serial reaction time task in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007. 87: 360 - 368.
14. Wesnes & Warburton. Effects of Smoking on Rapid Information Processing

- Performance. *Neuropsychobiology*. 1983. 9: 223-229.
15. Piper et al. Multiple Motives Approach to Tobacco Dependence: The Wisconsin Inventory of Smoking Dependence Motives (WISDM-68). *J Consult Clin Psychol*. 2004. 72(2): 139 - 154.
  16. Heishman et al. Nicotine and Smoking: A Review of Effects on Human Performance. *Exp Clin Psychopharmacol*. 1994. 2(4): 345-395.
  17. Bruhchim et al. Two Years of Combined High-Intensity Physical Training and Heat Acclimatization Affect Lymphocyte and Serum HSP70 in Purebred Military Working Dogs. *J Appl Physiol* (1985). 2014. 117: 112-118.
  18. Polyák et al. Long-term Endurance Training-Induced Cardiac Adaptation in New Rabbit and Dog Animal Models of the Human Athlete's Heart. *Rev Cardiovasc Med*. 2018. 19: 135-142.
  19. Radin et al. Heart rate deflection point during incremental test in competitive agility border collies. *Vet Res Commun*. 2015. 39(2), 137-142.
  20. Park et al. Growth and Hematologic Characteristics of Cloned Dogs Derived From Adult Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell Reprogram*. 2010. 12(2): 141-50.
  21. Ferasin et al. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *J Comp Physiol B*. 2009. 179(7):839-45.

## <뒷면지>

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.