

발간등록번호

11-1543000-001250-01

우수 검역탐지견 복제생산 연구

(Production of elite quarantine sniffing cloned dog)

서울대학교 산학협력단

농림축산식품자료실



0005247

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “우수 검역탐지견 복제생산 연구에 관한 연구” 과제(세부과제 “우수 검역탐지견 복제생산에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2016 년 2 월 4 일

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 이 병 천

세부연구책임자 : 이 병 천

연 구 원 : 오 현 주

연 구 원 : 김 민 정

연 구 원 : 김 건 아

연 구 원 : 최 유 빈 외 11인

협동연구기관명 : (주) 알바이오

협동연구책임자 : 강 성 근

위탁연구기관명 : 농림축산검역본부 인천공항지역본부

위탁연구책임자 : 백 현

요 약 문

I. 제 목

우수 검역탐지견 복제생산 연구

II. 연구성과 목표 대비 실적

본과제는 연차별로 목표한바 대비 정성적 정량적으로 100% 성과를 달성하였으며, 자세한 결과는 보고서에 열거 하였다.

III. 연구개발의 목적 및 필요성

본연구는 우수검역탐지견의 복제생산 및 객관적 지표의 필요성에 따라 1) 우수 검역탐지견의 체세포주를 확립, 체세포핵이식기법을 이용 탐지견의 복제 생산하고 2) 세포제공 우수탐지견과 복제탐지견들의 행동·유전·영상의 분석을 통해 탐지견 선발을 위한 객관적 다각적 지표를 제시하는 것이다. 이를 통해 최종적으로 체세포 복제 탐지견 생산 및 검증 시스템 확립을 통해 실용화 체계를 구축을 목표로 한다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 검역탐지견의 체세포핵이식 기법을 이용한 복제 및 정상성 분석
2. 유전학적 분석을 통한 우수 검역탐지견의 객관적 지표 제시
3. 영상학적 분석을 통한 우수 검역탐지견의 객관적 지표 제시
4. 행동학적 분석을 통한 우수 검역탐지견의 객관적 지표 제시
5. 훈련을 통한 복제 검역탐지견의 선발 및 현장적응 능력 평가
6. 우수 검역탐지견의 세포제체의 बैं킹화 및 사업화 네트워크 구축
7. 복제 검역탐지견의 현장에서의 탐지능력 홍보 및 실용화 시장 구축
8. 복제 검역탐지견의 사업화를 위한 인프라 구축

V. 연구개발결과

1. 본 연구를 통해 우수 검역 탐지견의 생산 효율 증진 기술을 확립하였다.
2. 검역탐지견의 유전학적 분석을 통해 후각유전자뿐만 아니라 인지능력 관련 유전자도 탐지능력에 더 영향을 미침을 확인 하였다.
3. 검역탐지견의 영상학적 분석을 통해 일반견에 비해 우수 검역 복제견의 인지관련 영역과 후각관련 영역의 뇌 용적이 크다는 결과를 도출하였다.
4. 검역탐지견의 행동학적 분석을 통해 자견시절의 자질분석시험은 탐지견으로의 가능성을 검증할수 있는 지표가 됨을 확인하였다.

5. 체세포복제기술이 복제개들의 개체간의 행동의 유사성을 보존함을 검증하였다.
6. 세포제공건의 나이에 상관없이 우수한 능력의 개체를 복제하였을 때 노화가 나타나지 않음을 검증하였으며, 복제 효율에도 영향을 미치지 않음을 확인하였다.
7. 우수한 능력의 탐지견을 복제하고 그 복제견을 재복제를 하여도 능력이 변하지 않음을 검증하였으며, 이를 통해 재복제기술이 유전자원 보존을 위해 유용함을 확인하였다.
8. 또한 개지방줄기세포의 추출 및 배양을 위한 최적의 조건을 확립하고, 배양액을 개발 특허를 등록하였으며, 재복제를 위해 지방줄기세포가 매우 효과적임을 확인하였다.
9. 4년간 총 20마리의 복제개가 검역원에 이송되었으며, 100%의 선발율을 보임으로 체세포복제 기술의 실용화를 검증하였다.
10. 본 연구를 통해 이룩된 우수 검역탐지견 복제 생산 연구 결과는 성공적으로 과학기술의 생활속으로의 실용화를 이루었으며, 본 과제에서 새로운 탐지견을 생산하기 위한 행동, 유전학적 및 영상학적 지표를 도출하였다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 우수 복제 검역탐지견 생산 시스템을 이용한 여타 특수 목적견 생산 정책건의
2. 우수 복제 검역탐지견의 현장 투입을 통한 연구 결과의 실용화 및 현장애로 해결
3. 우수 검역탐지견의 세포제제 수출을 통한 산업화를 통해 사업화 가능
4. 본 연구결과의 국내외 관련기업에 기술 실시
5. 우수 복제 검역탐지견의 생산 및 활용을 통해 불법축산물 반입에 대한 인식 개선

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Production of elite quarantine sniffing cloned dog

II. Achievements for the goals of research

One hundred percent of the qualitative and quantitative goals were achieved in this research. Detailed outcomes are written one by one in this report.

III. Objective and necessity of the research

The purpose of this research is 1) to produce elite quarantine sniffing cloned dogs using somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology after establishing fibroblast cell lines derived from elite quarantine dogs and 2) to suggest objective indicators for selecting an quarantine sniffing dog after analysis of behavior, recognition, and images acquired from the comparison between the donor elite quarantine dog and its clones. Therefore, subsequently, the final goal is to put the cloned quarantine sniffing dogs to practical use via an established system from production to evaluation of a cloned quarantine sniffing dog.

IV. Contents and scope of the research

1. Cloning a quarantine sniffing dog using SCNT and analyzing its normality
2. Suggesting an objective index of elite quarantine sniffing dogs by genetic analysis
3. Suggesting an objective index of elite quarantine sniffing dogs by image analysis
4. Suggesting an objective index of elite quarantine sniffing dogs by behavior analysis
5. Selection of the cloned dogs as quarantine sniffing dogs and evaluation of its adaptation ability in the quarantine field
6. Cell banking of an elite quarantine sniffing dogs and establishment of a commercial network
7. Publicizing quarantine sniffing ability of the clones in the field and establishing a commercial market
8. Establishment of an infrastructure for the industrialization of the cloned quarantine sniffing dogs.

V. Results of the research

1. Technologies to increase producing elite quarantine sniffing dogs has been established by this research.
2. It was confirmed by genetic analysis that recognition related genes affects sniffing ability rather than olfactory genes.
3. It was confirmed by image analysis that volumes of olfactory brain regions in elite quarantine sniffing dogs were bigger than the control dogs.
4. It was confirmed by behavior analysis that puppy aptitude test could be used as an index for the evaluation of quarantine sniffing dogs.
5. There were similarities in behaviors among clones produced by SCNT.
6. Telomere activity, telomere length, and cloning efficiency did not affected by the age of a donor dog.
7. Sniffing ability was maintained in the clones and reclones, which indicates that recloning can be a valuable tool to preserve outstanding genetic resources.
8. The optimum conditions to extract and culture the canine adipose derived stem cells were established, and the culture medium was patented. It was also assessed that canine adipose derived stem cells were effected for recloning.
9. A total of 20 cloned dogs were transferred to the QIA during 4 years of the research period, and successful practical application of SCNT technology was verified by 100% of quarantine dog selection rate.
10. The outcomes of this “production of elite quarantine sniffing cloned dog” research achieved successful application of advanced scientific technology to the daily life of the people, and the genetic and behavior indexes drawn by this research would be a valuable guideline to produce a new kind of service dogs.

VI. Attainment of research and plan for utilization of outcome

1. Policy proposal for other service dogs using the system for producing elite quarantine sniffing dogs
2. Commercialization of the research outcomes by put the cloned elite quarantine sniffing dogs to the practical use and settlement of the difficulties in the quarantine fields
3. Industrial possibilities by exporting the cell products derived from the elite quarantine sniffing dogs.
4. Technology licensing to the related companies
5. Improving awareness of carrying illegal livestock products by producing elite quarantine sniffing dogs and applying them to the practical use

CONTENTS

(영 문 목 차)

I. Outline and objective of the research

- 1) Ultimate objective
- 2) The necessity of research
- 3) The contents of research
- 4) Achievements for the goals of research

II. Domestic and foreign research current state

- 1) The operation status of quarantine sniffing dog
- 2) The production status of quarantine sniffing dog
- 3) The olfactory related genetic analysis status of quarantine sniffing dog
- 4) The morphology and functional analysis status of cloned dogs
- 5) The cognitive behavior analysis status of dogs
- 6) The production status of cloned dogs using recloning approach
- 7) The aging analysis status of cloned animals

III. Results

- 1) Production and verification of the elite quarantine sniffing cloned dogs
- 2) Providing the elite the quarantine sniffing dog derived cells for cloning, training and evaluation of the elite quarantine sniffing cloned dogs
- 3) Commercialization and industrialization of the elite quarantine sniffing cloned dog production

IV. Achievement and level of contribution into interest fields

V. Attainment of research and plan for utilization of outcome

VI. Collected foreign science technology informations during research development

VII. The status of research equipment and facilities

VIII. The implement result of laboratory safety management

IX. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

- 1) 연구개발의 최종목표
- 2) 연구개발의 필요성
- 3) 연구개발의 범위
- 4) 연구성과 목표 대비 실적

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 1) 국내외 탐지견 운영 현황
- 2) 국내외 복제탐지견 생산 현황
- 3) 국내외 탐지견의 후각 관련 유전학적 분석 연구 현황
- 4) 국내외 복제견의 형태기능학적 분석 연구 현황
- 5) 국내외 개의 인지행동학적 분석 연구 현황
- 6) 국내외 재복제 (recloning) 기법을 이용한 개복제 연구 현황
- 7) 국내외 복제 개체의 노화 연구 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- 1) 1세부: 우수검역탐지견 복제 생산 및 검증
 - 검역탐지견의 자질 분석을 위한 다양한 프로토콜 확립 및 객관적 지표 제시
 - 복제 검역탐지견 생산
 - 복제 검역탐지견(1차년도)의 유사성 및 정상성 분석
 - 복제견(1차년도)과 세포공여견간의 유전학적 분석
 - 복제 검역탐지견(1차년도)의 영상학적 분석을 통한 유사성 및 차이점 분석
 - 복제견(1차년도)과 대조군과의 행동학적 분석
 - 2차년도 복제 검역탐지견 생산
 - 탐지능력과 유전학적 객관적 지표와의 연관관계 분석
 - 복제견과 세포공여견간의 영상학적 분석; 복제 검역 탐지견의 후각기능 및 뇌기능 평가
 - 훈련종료시 복제견과 대조군의 행동학적 분석
 - 복제 검역탐지견의 노화 관련 정상성 분석-김건아
 - 재복제 검역탐지견의 생산
 - 우수 검역탐지견의 기년도 확립한 검역탐지견스프링거스파니엘의 복제 생산
 - 탐지능력과 인지행동학적 연관관계 분석을 통한 객관적 지표제시
 - 복제 검역탐지견(재복제견과 기복제견)의 유전학적 평가 및 분석
 - 복제 검역탐지견 (재복제견과 기복제견)의 영상학적 평가 및 분석; 복제 검역 탐지

건의 뇌의 형태학적 평가

2) 제1세부 위탁: 복제용 세포제공 및 복제견 훈련과 평가

- 검역탐지견의 객관적 평가 및 체세포 및 생식 세포 बैंकिंग을 위한 검역탐지견 공급
- 복제견의 집중훈련 시 복제견 및 후보견 간의 훈련결과를 행동학적 객관적 지표를 이용 비교 분석
- 선발된 1차 복제 검역탐지견의 현장적응능력 비교 조사
- 선발된 2차 복제 검역탐지견의 현장적응능력 비교 조사

3) 제 1협동 : 우수 복제 검역 탐지견 시스템의 실용화 및 산업화

- 우수 검역탐지견의 생식세포 및 줄기세포 बैंकिंग
- 검역 탐지 복제견의 지방줄기세포 배양 및 특성 검증
- 지방줄기세포 बैंकिंग 표준화
- 재복제탐지견의 지방줄기세포의 분리, 배양 및 줄기세포 검증
- 세포공여견과 재복제 탐지견의 지방줄기세포의 능력의 정량적 상대적 비교
- 지방줄기세포의 분화능 정량평가법 개발
- 세포공여견과 재복제탐지견의 지방줄기세포의 분화능 정량적 상대적 비교
- 지방줄기세포주 배양기술의 산업화
- 원본견-복제견-재복제견의 특성 비교확인
- 원본견-복제견-재복제견의 줄기세포를 이용한 다능성 확인
- 원본견과 복제견, 재복제 탐지견의 지방줄기세포 골세포 분화능 정량 비교

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설·장비 현황

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

제 9 장 참고문헌

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 최종목표

1. 연구개발의 최종목표

- 가. 우수 검역탐지건의 체세포주를 확립, 체세포핵이식기법을 이용 복제탐지건 생산
- 나. 유전형질이 동일한 복제탐지건들을 통해 행동학·유전학·영상학적 분석을 통해 탐지건 선발을 위한 객관적 지표 제시
- 다. 체세포 복제 탐지건 생산 및 검증 시스템의 구축을 통한 산업화 체계 구축

2. 연구개발 목표의 성격

체세포핵이식에 의한 개의 복제기술은 일반 애완동물뿐만 아니라 늑대 및 특수목적견의 복제 성공 사례를 통해 기술력이 검증되었기 때문에, 기 개발된 기술의 과학적 분석과 검증을 통한 실용화 및 산업화 지표제시를 위한 연구과제의 성격을 지님

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 국내의 검역시스템의 현황 및 문제점

가. 국가재난형 해외 전염병의 발생 및 피해

- (1) 경제·사회·문화적 교류 증가로 국내·외의 물품 교역량이 증대되고 있는 추세를 따라 다양한 통로로 국가재난형 해외 악성 전염병인 구제역 (FMD), 고병원성 조류 인플루엔자 (AI) 등의 발생 빈도수가 증가하고 있다.
- (2) 국내에서 2010년부터 2011년 초까지 구제역 및 조류인플루엔자의 유입 후 급속적으로 전파되어 살처분, 매몰로 인한 농가의 직접적인 피해액이 3조원에 이르렀고, 관련산업에 천문학적인 액수의 경제적인 피해 사례가 속출하였다 (그림 1).

구제역 및 조류인플루엔자에 의한 경제적 피해 (2010. ~ 2011.)

살처분 가축수	994만 968마리 (소 15만871마리, 돼지 330만9496마리, 염소 7615만마리, 사슴 3205마리, 닭 432만마리, 오리 215만마리)
총 피해액	살처분보상비 1조8000억원, 직접방역비 7000억원 포함 3조원 이상 추정
살처분 가축 매몰지 수	5000곳
1,2차 백신접종 가축수	2377만 3000마리 (소 709만마리, 돼지 1649만마리, 닭 15만마리, 오리 4만3000마리)
방역에 동원된 총인원	205만 4359명
매몰작업에 도입된 중장비 대수	1만 7913대

그림 1. 구제역과 조류인플루엔자에 의한 피해 상황
(출처; 중앙재난안전대책본부·농림수산식품부)

- (3) 이러한 엄청난 경제적 손실을 막기 위해서 해외에서 유입되는 각종 축산물 및 여행객에 대한 철저한 검역 과정이 필수적이며, 세계 여러 나라에서도 자국 내 검역 여건 구축을 위한 노력을 지속적으로 기울이고 있다.
- (4) 검역선진국에서는 이러한 사태를 예방하기 위해 인력보완 및 선진 검역시스템 확충을 위한 예산 지원이 적극적으로 이루어지고 있으나 국내에서는 제도적 연계시스템을 보완하는 등의 대안을 제시가 미비한 실정이다.

나. 사람이나 기계가 할 수 없는 해외유입 전염원 차단 필요

- (1) 나라별로 검역시스템은 검역대상에 따라 인력, 장비, 검역탐지건을 이용하고 있으며, 국내에서도 인력 및 장비가 부족한 부분은 탐지건을 활발히 활용하고 있다.
- (2) 관세청에 따르면, 탐지건의 활용을 통해 일평균 8만 5,000여 건이 반입되는 국제우편물을 10여분 만에 검색하여 마약류 적발과 업무 효율성 제고 등 1석 2조의 효과를 거두고 있다고 한다. 인력으로 동일한 양의 우편물을 검사 시 24시간 동안 줄곧 30여 명이 필요한 것과 비교하면 고효율 및 고정확성의 효과를 보여준다고 할 수 있다.
- (3) 탐지건은 사람보다 500배 뛰어난 후각 능력으로 교묘하게 숨겨서 들어오는 해외 불

법반입물을 정확히 찾아내므로, 해외에서는 탐지견의 적극적인 활용을 위해 정책적으로 검역탐지견 육성제도를 마련하여 증가하고 있는 수요에 충당하고 있다.

- (4) 특히 해외의 경우 이러한 특수 유용견을 산업화 하여 이미 수익을 도모하고 있으며, 우수 유용견의 세포제재 및 동결정액을 활용한 사업을 진행 중이다. 또한 정자은행 네트워크의 구축으로 이를 활용한 수입 수출을 통해 부가 가치가 창출되고 있다.
- (5) 국내의 인천 공항은 교역물량의 지속적인 증가로 인해 총체적인 검역 시스템의 한계를 보여주고 있으며, 이러한 한계 극복을 위해 해외악성가축전염병 발생 위험국가를 중심으로만 제한적으로 탐지견을 투입하고 있는 실정이다.

2. 연구 개발의 필요성



그림 2. 연구의 필요성 및 전망

가. 국내의 총체적 검역 시스템의 한계 극복을 위해서는 우수 검역탐지견의 보급이 필수적이다. 그러나 우수 검역탐지견의 재생산은 우수견끼리 교배 시에도 효율이 낮으며, 자견훈련부터 현장투입까지의 고비용·낮은 선발 효율이 애로사항이 되고 있다.

- 나. 이러한 **우수 검역탐지견 공급의 애로사항을 타파하기 위해 본 연구과제에서는 체세포 핵이식 기법을 이용해 우수 검역탐지견을 복제**하고자 한다. 이미 본 연구팀에서 생산된 복제 마약탐지견의 경우 관세청에서 2010년 비용절감-높은효율로 관세청 우수사례로도 선정되었으며 성공적으로 실용화를 거두었다.
- 다. 본 과제를 통해 도출된 동일한 유전자를 가진 **복제 검역 탐지견들을 이용하여 유전학적, 형태기능학적, 행동학적인 측면과 탐지견자질 및 탐지능력간의 상관관계를 분석**하여 우수능력을 지닌 **복제견의 생산 기법의 실용성을 보다 과학적으로 증명해야 할 필요**가 있다.
- 라. 본 연구에서 세포 공여견과 복제견간의 행동·유전자·영상 분석을 통한 결과 도출은 미국 국토안보부에서 2010년 1월 제시한 복제사업을 통한 제반 탐지견의 실용화 사업을 구체화 하여 최근 증가하고 있는 해외 악성전염병의 유입 등 “검역” 현장에서의 문제점을 극복할 수 있는 해결책이 될 뿐만 아니라 더 나아가 국책 사업으로도 제시될 수 있으므로 본 연구결과의 도출은 당위성을 가지고 있다.
- 마. 본 연구를 통해 도출되는 다양한 측면에서의 결과들은 생산된 복제 검역탐지견의 경제적인 가치와 과학적인 가치에서의 활용도의 증진을 통해 다양한 종류의 탐지견 및 유용견 생산으로 포괄적 활용 가능함으로 본 연구 과제는 필수적인 선결 과제이다.
- 바. 개 복제가 전세계적으로 국내 유일의 기술인만큼 세계의 중심에서 유용견 복제 센터 인프라를 구축하게 된다면 우리나라는 세계 최고 유용견 자원 보유국이 되어 미래 산업 시장을 확보할 것으로 예상된다.
- 사. 우수 검역탐지견 복제 활용으로 국내 최고의 전문기관이 검역견 훈련 및 분석 인프라를 구축한다면 ‘제 1등 검역 국가’로서의 원천기술력을 확보하고 보급할 수 있는 중점이 될 수 있으므로 다년간의 국가집중지원을 해야 한다.
- 자. 국내 순수 기술인 개 체세포 복제 기술을 활용한 우수 복제 검역탐지견의 대량 생산의 산업화는 다른 어느 국가에서도 가능하지 않은 산업 분야를 창출할 수 있다.

제 3 절 연구개발의 범위

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구범위
1차 년도 (2011)	제1세부: 우수 검역탐지건 복제 생산 및 검 증	- 검역탐지건의 유전학 적 평가 위한 객관적 지표 제시	○ 검역탐지건의 유전학적 분석을 위해 본 연구팀에서 기 생산된 복제건의 분석 을 통해 양적 유전학적 연구 병행 실시 ○ 최우수 검역탐지건, 일반 검역탐지건 및 일반비글 간의 유전학적 분석 결과 비교평가를 통한 객관적 지표 도출
		- 검역탐지건의 영상학 적 평가 위한 객관적 지표 제시	○ 검역탐지건의 영상학적, 행동학적 평가 프로토콜 개발
		- 검역탐지건의 행동학 적 평가 위한 객관적 지표 제시	○ 평가 프로토콜을 통한 자질 분석 표준 화한 지표 제시
		- 복제 검역탐지건 생 산	○ 복제건의 효율적인 생산을 위한 최적의 세포주 선정 ○ 체세포 핵이식을 통한 복제건의 생산
	제1세부위탁: 복제용 세포제공 및 복제건 훈련 과 평가	- 검역탐지건의 객관적 평가 및 체세포 및 생식 세포 बैं킹을 위 한 검역탐지건 공급	○ 최우수 검역탐지건 1두 이상 공급 ○ 탐지건의 객관적 지표를 도출하기 위한 최우수그룹 3두와 일반 그룹 3두의 검 역 탐지건의 공급
	제 1협동 : 우수 복제 검역 탐지건 시스템의 실용화 및 산업 화	- 우수 검역탐지건의 체세포 및 생식세포 뱅크	○ 우수검역탐지건의 생식세포 बैं킹 ○ 개의 지방유래 성체줄기세포의 분리를 표준화 하기 위한 조건 확립 ○ 피부섬유아세포주와 지방줄기세포주 및 생식세포 बैं킹 기술 최적화를 위한 다 양한 배양액을 이용한 최적의 배양 배 지 확립 ○ 지방유래 성체 줄기세포의 बैं킹 기술 최적화를 위한 बैं킹 조건 확립 ○ 우수 검역탐지건의 체세포·지방줄기세 포·생식세포 1종 이상 बैं킹
2차 년도 (2012)	제 1세부: 우수 검역탐지건 복제생산 및 검 증	- 복제 검역탐지건(1차 년도)의 유사성 및 정 상성 분석	○ 복제 검역탐지건의 영상기법을 통한 성장패턴의 유사성 및 정상성 분석 ○ 복제건의 생식세포 평가 및 동결 보존 여부 ○ 복제건의 번식능력의 정상성 분석
		- 복제건(1차년도)과 세 포공여건간의 유전학 적 분석	○ 복제건들과 체세포 공여건의 SNP, CNV 변이 여부 평가 ○ 복제건들간의 SNP, CNV 변이 여부 평가

		<ul style="list-style-type: none"> - 복제 검역탐지견(1차년도)의 영상학적 분석을 통한 유사성 및 차이점 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 안저 카메라를 이용한 복제견의 유전학적 유사성 및 차이점 분석 ○ 심장 초음파를 이용한 복제견의 유전학적 유사성 및 차이점 분석 ○ 복제 검역 탐지견의 CT 촬영 및 영상학적 분석 ○ MRI를 이용한 공여견과 복제 검역 탐지견의 영상학적인 분석
		<ul style="list-style-type: none"> - 복제견(1차년도)과 대조군과의 행동학적 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기초훈련 및 집중훈련시 복제견 및 대조군간의 행동학적 평가를 통한 탐지견으로의 자질 평가 ○ 행동학적 분석 지표 제시 ○ 복제견의 단계적이고 체계적인 훈련을 통한 결과의 통계 및 동영상 분석을 통한 지표 도출 ○ 선발된 복제검역견의 현장 배치 및 지속적인 훈련결과와 통계 및 동영상 분석 통한 지표 도출
		<ul style="list-style-type: none"> - 2차년도 복제 검역탐지견 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 체세포핵이식을 위한 최적의 공여세포 배양 조건 확립 ○ 최적의 복제수정란 활성화조건 확립을 통한 복제수정란 생산효율 향상 및 복제 검역탐지견 생산
	제1세부위탁기관: 복제용 세포제공 및 복제견 훈련과 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 복제견의 집중훈련시 복제견 및 후보견간의 훈련결과를 행동학적 객관적 지표를 이용 비교 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1세부에서 생산한 복제견을 이용하여 단계적이고 체계적인 훈련을 통한 결과 분석 ○ 복제견의 현장훈련 및 선발평가 ○ 선발된 복제검역견의 현장 배치 및 지속적인 훈련 및 평가
	제 1협동 : 우수 복제 검역 탐지견 시스템의 실용화 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> - 검역 탐지 복제견의 지방줄기세포 배양 및 특성 검증 - 지방줄기세포 banking 표준화 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 검역탐지견 및 복제견의 지방줄기세포 배양 ○ 우수 검역 탐지견 및 복제견의 지방줄기세포 검증 및 비교 ○ 지방줄기세포 banking 조건의 표준화를 위해 다개체 비교를 통한 최적 조건 확립 ○ 지방줄기세포 보존기간에 따른 세포 활성 및 banking 안정성 확인 ○ 지방줄기세포 banking 품질관리 확립
3차년도 (2013)	제1세부: 우수 검역탐지견 복제 생산 및 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 탐지능력과 유전학적 객관적 지표와의 연관관계 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 후각관련 유전자의 polymorphism 확대검증을 위한 후각기능의 뚜렷한 차이를 나타내는 비글들을 대상으로 후각관련 유전자의polymorphism 비교
		<ul style="list-style-type: none"> - 복제견과 세포공여견간의 영상학적 분석; 복제 검역 탐지견의 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대조군 및 프로토콜 확립을 위해 일반 비글견에서의 fMRI 촬영 및 영상 기능적 분석

	후각기능 및 뇌기능 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 복제 검역 탐지건의 fMRI 촬영 및 영상 기능적 분석 ○ 일반 비글견과 복제 검역탐지건의 fMRI 결과 비교 연구
	- 훈련종료시 복제견과 대조군의 행동학적 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발된 복제검역견(1차년도생산)의 현장 투입시 기록한 영상자료 작성 및 분석 ○ 확립된 행동학적 분석 지표를 이용한 2차년도 생산 복제견의 행동 평가 통계학적 결과 분석 ○ 2차년도생산 복제견의 훈련성적 분석 및 영상기록 자료 분석
	- 복제 검역탐지건의 노화 관련 정상성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ ELISA기법을 이용한 복제 검역탐지건의 텔로머레이즈 활성 분석 ○ Southern blot기법을 통한 복제 검역탐지건의 텔로미어 길이 정상성 분석
	- 재복제 검역탐지건의 생산	<ul style="list-style-type: none"> ○ 체세포 핵이식을 통한 재복제건의 생산 ○ 텔로미어 길이 조절을 통한 공여세포의 배양조건 확립 ○ 텔로미어 길이가 조절된 공여세포를 통한 복제 검역탐지건 생산 ○ 비글외의 스프링거스파니엘종의 검역건의 세포주 확립
제1세부위탁: 복제용 세포제공 및 복제견 훈련과 평가	- 선발된 복제 검역탐지건의 현장적응능력 비교 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 현장 투입된 복제 검역 탐지견(1차생산 견)의 현장 투입 적응력 평가 ○ 검역견으로서의 현장 수행능력 평가
제 1협동 : 우수 복제 검역 탐지견 시스템의 실용화 및 산업화	- 재복제탐지건의 지방줄기세포의 분리, 배양 및 줄기세포 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 재복제탐지건의 지방줄기세포의 분리, 배양하고 banking한다. ○ 세포공여견과 재복제탐지건의 지방줄기세포를 배양하여 세포의 성장률, 표면항원형의 변화, 분화능 확인 및 배양 후 유전자 변이검사 (karyotype)을 한다.
	- 세포공여견과 재복제 탐지건의 지방줄기세포의 능력의 정량적 상대적 비교	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세포공여견과 재복제탐지건의 동일 계대에서의 줄기세포의 stemness 능과 연관된 유전자 (OCT4,, Sox-2 등)의 발현 양상을 비교, 줄기세포능을 평가한다.
	- 세포공여견과 재복제 탐지건의 지방줄기세포의 분화능 정량	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수립된 정량화 평가방법을 이용하여, 세포공여견과 재복제탐지건의 지방줄기

		적 상대적 비교	세포의 분화능력을 정량적으로 평가한다.
		- 지방줄기세포의 분화능 정량평가법 개발	○ 지방줄기세포의 분화능을 정량적으로 평가하기 위한 방법의 개발으로 지방세포, 골세포, 연골세포 및 angiogenesis 능 중 1종 이상 분화능의 정량적 평가 방법을 개발한다.
		- 지방줄기세포주 배양 기술의 산업화	○ 최적의 개의 지방줄기세포 표준화된 배양용 배양액개발과 지적재산권 출원을 통한 산업화
4차 년도 (2014)	제1세부: 우수 검역탐지견 복제 생산 및 검증	- 기년도 확립한 검역 탐지견 스프링거스파니엘의 복제 생산	○ 공여세포 제1차세포배양시 배양법에 따른 복제개의 생산효율 비교 분석
		- 탐지능력과 인지행동학적 연관관계 분석을 통한 객관적 지표 제시	○ 복제 탐지견의 현장 투입 및 수행능력 결과를 통한 체세포공여견과의 수행능력 비교 분석 ○ 복제 탐지견의 능력 검증을 통한 체세포복제기술의 실용성 검증 ○ 재복제견의 훈련을 통한 선발 효율 분석 및 기복제견과의 행동학적 평가 및 분석
		- 복제 검역탐지견 (재복제견과 기복제견)의 유전학적 평가 및 분석; 복제 검역 탐지견의 인지능력 관련 유전자 분석	○ 기복제견의 인지능력 관련 유전자 다형성 분석 ○ 재복제견의 인지능력 관련 유전자 다형성 분석
		- 복제 검역탐지견 (재복제견과 기복제견)의 영상학적 평가 및 분석; 복제 검역 탐지견의 뇌의 형태학적 평가	○ 프로토콜 확립을 위해 일반 비글견에서의 MRI 촬영 및 VBM을 통한 영상형태적 분석 ○ 복제 검역 탐지견의 MRI 촬영 및 VBM을 통한 영상 형태적 분석 ○ 일반 비글견과 복제 검역 탐지견의 VBM 결과 비교 연구
	제1세부위탁: 복제용 세포제공 및 복제견 훈련과 평가	- 선발된 복제 검역탐지견의 현장적응능력 비교 조사	○ 현장 투입된 복제 검역 탐지견(2차생견)의 현장 투입 적응력 평가 및 현장 수행능력 평가
	제 1협동 : 우수 복제 검역 탐지견 시스템의 실용화 및 산업화	- 원본견-복제견-재복제견의 특성 비교확인	○ 재복제 탐지견의 지방줄기세포 추출 및 배양, बैं킹 ○ 원본견과 복제견, 재복제 탐지견의 지방줄기세포를 배양하여 세포의 표면항원형의 변화, 분화능 비교 확인
		- 원본견-복제견-재복제견의 줄기세포를 이용한 다능성확인	○ 원본견과 복제견, 재복제 탐지견의 동일 계대에서의 줄기세포의 stemness 능과 연관된 유전자 (OCT4, Sox-2

			등)의 발현 양상을 비교, 줄기세포능 평가
		- 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포의 골세포분화능 정량비교	○ 수립된 정량화 평가방법을 이용하여, 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포의 골세포분화능력을 정량적으로 평가하고 개 유래 지방줄기세포의 골세포분화능 시험법을 정립한다.
		- 지방줄기세포주 배양 기술의 산업화	○ 최적의 개의 지방줄기세포 표준화된 배양용 배양액개발과 지적재산권 출원을 진행하여 산업화하도록 한다. 이때, 특허획득을 위한 보완실험을 진행한다.

제 4 절 연구성과

1. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기타	
	출원	등록	SCI	비 SCI										
최종목표	4	5	15	0	24	3		2			1	5	0	
1차년도	목표		3		3									
	실적		6		5							10		
2차년도	목표	1		4		6								
	실적	3		5		7								
3차년도	목표	1	3	4		7					1			
	실적	1	2	5		9					1	18	1	
4차년도	목표	2	2	4		8								
	실적	0	1	2	6	10	3		2					
소 계	목표	4	5	15	0	24	3		2		0	1	5	0
	실적	4	3	18	6	31	3		2		8	1	28	1
종료 1차년도	<u>1</u>		<u>3</u>		<u>4</u>					<u>1</u>				
종료 2차년도														
종료 3차년도		<u>1</u>												
종료 4차년도														
소 계	1	1	3		4					1				
합 계														

* 단계별 연구성과 목표는 중간평가의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구개발계획에 맞춰 도출하고 예시와 같이 작성

2. 지식재산권

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격], 신품종, 프로그램개발 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로) 기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]									
구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
상표	상표등록 Quppy	대한민국	서울대학교 산학협력단	2013. 10.17	40-2013- 0068510	서울대학교 산학협력단	2014. 11.19	40-10723 83-0000	
상표	상표등록 큐피	대한민국	서울대학교 산학협력단	2013. 10.17	40-2013- 0068509	서울대학교 산학협력단	2014. 11.19	40-10723 82-0000	
발명특허	개과 동물 복제용 핵 공여 세포 배 양용 배지 및 이 의 이용	대한민국	주식회사케 이스템셀	2013. 11.07	10-2013- 0134602	주식회사케 이스템셀	2015. 05.19	10-15231 41	
발명특허	복제견을 이용한 우수 검역 탐지견 의 조기 선발법	대한민국	서울대학교 산학협력단	2014. 11.10	10-2014- 0155684				

3. 논문게재 및 학술회의 발표

가, 논문게재

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/ 비SCI)
1	Lessons learned from cloning dogs	Reproduction in Domestic Animals	김민정	s4	독일	Paul Parey Scientific Publishers	SCI
2	Effects of mineral supplements on ovulation and maturation of dog oocytes	Theriogenology	김민정	1	미국	Elsevier	SCI
3	Altered cell cycle gene expression and apoptosis in post-implantation dog parthenotes	PLoS One	박정은	8	미국	Public Library of Science	SCI
4	Comparison of cell proliferation and epigenetic modification of gene expression patterns in canine foetal fibroblasts and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells	Cell proliferation	오현주	5	영국	Blackwell Scientific Publications	SCI
5	Species-specific challenges in dog cloning	Reproduction in Domestic Animals	김건아	s6	독일	Paul Parey Scientific Publishers	SCI

6	Employing mated females as recipients for transfer of cloned dog embryos	Reproduction, Fertility and Development	김건아	4	호주	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation	SCI
7	Duration of gestation in pregnant dogs carrying cloned fetuses	Theriogenology	김민정	2	미국	Elsevier	SCI
8	Effect of culture medium type on canine adipose-derived mesenchymal stem cells and developmental competence of interspecies cloned embryos	Theriogenology	김건아	2	미국	Elsevier	SCI
9	De novo copy number variations in cloned dogs from the same nuclear donor	BMC Genomics	정승현	1	영국	BioMed Central	SCI
10	Behavioral analysis of cloned puppies derived from an elite drug-detection dog	Behavior genetics	최진	1	영국	Kluwer Academic/Plenum Publishers	SCI
11	Reduced birth weight, cleft palate and preputial abnormalities in a cloned dog	Acta Veterinaria Scandinavica	김민정	56	영국	London : BioMed Central	SCI
12	Survival of skin graft between transgenic cloned dogs and non-transgenic cloned dogs	PLoS one	김건아	11	미국	San Francisco, CA : Public Library of Science	SCI
13	Update on the First Cloned Dog and Outlook for Canine Cloning	Cellular Reprogramming	장구	5	미국	Mary Ann Liebert, Inc.	SCI
14	Maintaining canine sperm function and osmolyte content with multistep freezing protocol and different cryoprotective agents	Cryobiology	에리프마하	2	미국	Academic Press	SCI
15	Effect of primary culture medium type for culture of canine fibroblasts on production of cloned dogs	Theriogenology	김건아	4	미국	Elsevier	SCI
16	Age-dependent alteration of transgene expression and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic cloned and re-cloned dogs.	Molecular reproduction and development	오현주	5	미국	Wiley-Liss	SCI
17	Altering histone acetylation status in donor cells with suberoylanilide hydroxamic acid does not affect dog cloning efficiency	Theriogenology	김민정	7	미국	Elsevier	SCI
18	Ectopic liver and gallbladder in a cloned dog: Possible nonheritable anomaly	Theriogenology	김민정	6	미국	Elsevier	SCI
19	Propagation of elite rescue dogs by somatic cell nuclear transfer	Animal Science Journal	오현주	1	호주	Wiley	SCI
20	Toward A Transgenic Dog as a Human Disease Model	J IVF Reprod Med Genet	오현주	1	인도	OMICS Publishing Group	비SCI
21	Failure of reproduction management in an inbreeding English bulldog	Journals of veterinary clinics	김민정	5	한국	한국임상수의학회	비SCI

22	Application of chemiluminescence enzyme immunoassay method to collect in vivo matured oocyte in dog cloning	Journla of veterinary clinics	김민정	4	한국	한국임상수의학회	비SCI
23	Echocardiographic Evaluation of Cardiovascular Function in Cloned Dogs	Journla of veterinary clinics	여주환	4	한국	한국임상수의학회	비SCI
24	Preservation through Cloning of Superior Canine Scent Detection Ability for Cancer Screening	Journla of veterinary clinics	김민정	4	한국	한국임상수의학회	비SCI
25	Recovery of In Vivo Matured Oocytes from a Bitch with Hydrometra	Journla of veterinary clinics	김민정, 조영광	6	한국	한국임상수의학회	비SCI

나. 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표 (학술회의명을 세부적으로 전부(건별로) 기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록. - 본 연구과제의 수행결과로 발표한 것만 기재합니다.)					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	49th Annual meeting of the Animal Behavior Society	최진	20120610-20120614	University of New Mexico	미국
2	38 th IETS	김건아	20120107-20120110	the Renaissance Glendale Hotel & Spa	미국
3	ISCFR 2012 - EVSSAR 2012	김건아	20120726-20120729	Westin Whistler Resort	캐나다
4	17th International Congress on Animal Reproduction	오현주	20120729-20120802	Vancouver Convention Centre	캐나다
5	The Asia Pacific Veterinay Conference 2012	김민정	20121010-20121012	BITEC	방콕
6	39 th IETS	이병천	20130119-20130122	Hannover Congress Centrum	독일
10	39 th IETS	오현주	20130119-20130122	Hannover Congress Centrum	독일
11	2013 ISEANS Annual Conference	오현주	20130829-20130830	JNTUA University	중국
7	2013 ISEANS Annual Conference	김건아	20130829-20130830	JNTUA University	중국
8	2013 ISTT Annual Conference	김건아	20130224-20130227	Baiyun International Convention Center	중국
9	2013 한국발생생물학회	김민정	20130830	서울대학교병원 의생명연구원	한국
12	2013 대한수의학회 추계 국제학술대회	김건아	20131010	서울 교육문화회관	한국
13	40 th IETS	신지원, 박원준	20140111-20140114	John Ascuaga's Nugget Hotel	미국
14	40 th IETS	김민정	20140111-20140114	John Ascuaga's Nugget Hotel	미국
15	40 th IETS	오현주	20140111-20140114	John Ascuaga's Nugget Hotel	미국
16	40 th IETS	김건아	20140111-20140114	John Ascuaga's Nugget Hotel	미국
17	2014 Symposium on advance in Alzheimer Therapy (SAAT)	김건아	20140326-20140329	University of Geneva Medical School	스위스

18	The 2014 Asian Conference on the Life Sciences and Sustainability	에리프 마하	20140827-20140829	The KKR Hotel Hiroshima	일본
19	Neuroscience 2014	김건아	20141114-20141119	Walter E. Washington Convention Center	미국
20	2014년 대한수의학회 추계국제학술대회	최유빈	20141016-20141017	제주컨벤션센터	한국
21	2014년 대한수의학회 추계국제학술대회	조영광	20141016-20141017	제주컨벤션센터	한국
22	41 st IETS	최유빈	20150110-20150113	Versailles	프랑스
23	41 st IETS	오현주	20150110-20150113	Versailles	프랑스
24	41 st IETS	김민정	20150110-20150113	Versailles	프랑스
25	41 st IETS	이석희	20150110-20150113	Versailles	프랑스
26	41 st IETS	김건아	20150110-20150113	Versailles	프랑스
27	22 nd COGI	이석희	20150917-20150920	Syma Event and Congress Centre	헝가리
28	22 nd COGI	김건아	20150917-20150920	Syma Event and Congress Centre	헝가리
29	2015 대한수의학회 추계국제학술대회	최유빈	20151029-20151030	더케이호텔 경주	한국
30	2015년 대한수의학회 춘계 학술심포지움	에리프 마하	20150429	서울대학교 호암교수회관	한국
31	2015 한국임상수의학회 춘계학술대회 및 컨퍼런스	조영광	20150516-20150517	대구광역시 엑스코	한국
32	42 nd IETS	김민정	20160123-20160126	The Galt House	미국
33	42 nd IETS	최유빈	20160123-20160126	The Galt House	미국
34	42 nd IETS	이석희	20160123-20160126	The Galt House	미국

다. 사업화

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용 창출	R&D 기여율
1	RCME-P	지방줄기세포배양액	네이처셀	준비 중	0	0		
2	DLM140004	우수검역탐지견 지방줄기세포	네이처셀	준비 중	0	0		

라. 인력활용/양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
1	인력양성	2012-2015	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			3	5			3	5	8				

마. 정책활용 내역

정책활용 내역(농정시책 반영 및 정책건의)				
번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도
1	활용중	농림축산검역본부	구제역 등 악성가축전염병은 물론, 목조건축물 등 문화재에 큰 피해를 주는 흰개미와 복제 포장제 등에 대해서도 탐지가 가능하도록 검역 탐지건의 활용범위를 넓혀갈 계획	2013부터-현재

바. 홍보/전시

(1) 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	신문	아주경제	복제 검역탐지건 '큐피' 실전훈련 돌입	2012.05.03
2	신문	국제신문	최우수 검역탐지건 체세포 복제개 세 마리 탄생	2012.05.04
3	신문	국민일보	최우수 검역탐지건 복제'큐피' 인천공항서 검역 활동 시작	2012.10.21
4	신문	매일경제	서울대-알앤엘바이오, 공동연구 복제검역 탐지건'큐티' 현장 훈련 개시	2012.04.26
5	신문	매일경제	명 검역탐지건 복제개 현장훈련 실시	2012.04.26
6	신문	연합뉴스	세계 최초 복제 탐지건 3총사 인천공항서 맹활약	2012.10.21
7	신문	이투데이	인천공항에 나타난 '복제 탐지건 큐피'	2012.10.21
8	신문	머니투데이	복제 검역탐지건 '큐피' 3총사, 국경검역 책임진다	2012.10.21
9	신문	한국경제	케이스템셀, 복제검역 탐지건 생산 특허 출원	2014.7.24
10	신문	헤럴드경제	"검역탐지건 14마리 복제 성공"... 서울대 이병천교수팀과 케이스템셀 공동성과	2014.7.24
11	신문	파이낸셜뉴스	케이스템셀, 복제검역 탐지건 생산 특허 출원	2014.7.24
12	신문	연합뉴스	이병천 교수팀 "검역탐지건 14마리 복제"	2014.7.24
13	신문	머니투데이	케이스템셀, 검역탐지건 14마리 복제 성공	2014.7.24
14	신문	아주경제	케이스템셀, 복제검역 탐지건 생산 특허 출원	2014.7.24

15	신문	문화일보	케이스템셀, 복제 검역탐지견 생산 실용화 성공	2014.7.24
16	신문	뉴스1	케이스템셀, 복제 검역탐지견 생산 실용화에 성공	2014.7.24
17	신문	뉴스타운	케이스템셀, 복제검역 탐지견 생산 특허출원	2014.7.24
18	신문	약업신문	케이스템셀, 복제검역 탐지견 생산 실용화 성공	2014.7.24
19	신문	경제투데이	복제 검역탐지견, 주요공항서 '맹활약'	2014.7.26
20	신문	연합뉴스	복제 검역탐지견 '큐피' 공항 검역현장서 맹활약	2014.7.26
21	신문	경향신문	복제견 '큐피' 공항 검역현장에서 맹활약	2014.7.26
22	신문	국제뉴스	복제 검역탐지견 '큐피' 국경검역의 중심축으로 성장	2014.7.28
23	신문	현대축산뉴스	우수검역탐지견 14두 복제해 배치 활용	2014.8.22
24	신문	경인일보	'복제 검역탐지견' 국경검역의 중심축 우뚝	2014.7.27
25	신문	정책브리핑	복제 검역탐지견'큐피(Quppy)'국경검역의 중심축으로 성장	2014.7.27
26	신문	현대축산뉴스	우수검역탐지견 14두 복제해 배치 활용	2014.8.22

(2) 전시회 등 참여

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	전시회	오송 국제 바이오산업 엑스포	복제검역견	오송	2014
2	전시회	BK2 1사업 성과 전시회	복제견	과천과학관	2012
3	전시회	2012 생명산업 과학기술대전	복제검역견	서울 양재동 aT 센터	2012

사. 기타

(1) 포상 및 수상 실적

포상 및 수상실적					
종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일자	포상기관
우수성과	2014 국가연구개발 우수성과 100선	우수 검역탐지견의 복제효율 향상 및 실용화 성공	이병천	2014.7.24	미래창조과학부

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 탐지견 운영 현황

1. 국외 탐지견 현황

미국, 캐나다, 영국, 호주 등 해외에서는 오래 전부터 국책 사업으로 우수 탐지견을 확보·양성하기 위해 국립탐지견센터를 운영하며 많은 전문가의 도움으로 효율적인 훈련 프로그램을 체계화하여 다양한 품종 및 탐지견을 다수 확보·양성하고 있다. 그러나 능력이 우수한 탐지견이 발굴되어도 후대로 그 능력이 그대로 전해지지 못하는 문제점을 지니고 있어, 우수한 탐지견의 양성을 위해 지속적인 고비용과 훈련이 필요한 문제점이 있다.

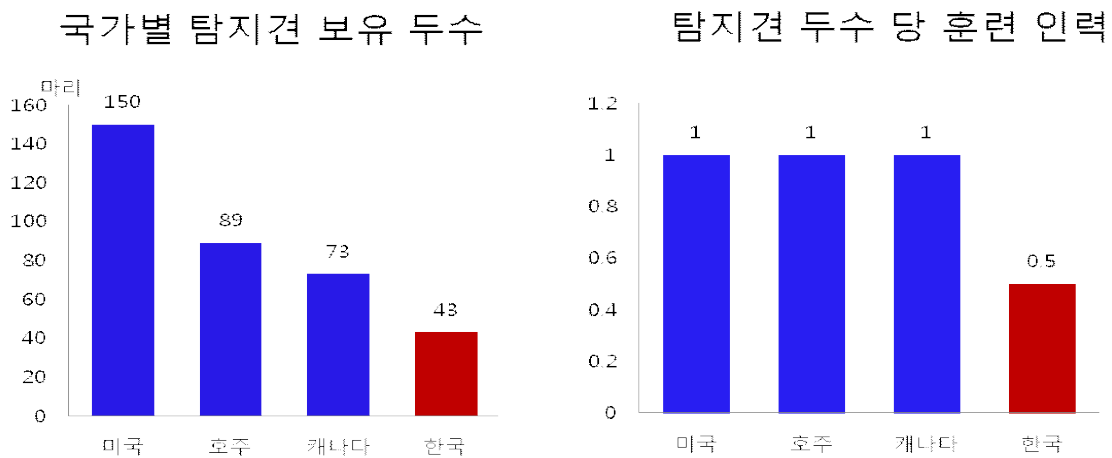


그림 2. 국내외 검역탐지견 현황
(출처; 농림수산검역검사본부 검역검사와 검역탐지견센터)

- 가. 유럽은 1950년대부터 검역탐지견 프로그램을 개발하여 국가주도의 국립탐지견훈련센터 (National Training Center)를 별도 설립 후 탐지견 양성 비용에 연간 10만불 이상의 예산을 지원하고 있다.
- 나. 미국은 탐지견과 훈련사가 총 1200개의 팀으로 이루어져 73개 통관항과 국경 순찰소에 배치되어 있으며, 호주 관세청 프로그램을 벤치마킹하여 국립탐지견 훈련센터를 운영 중이다. 최근에는 의료 진단장비를 이용한 방법의 대체 방법중 하나로 개를 이용한 암 진단의 가능성에 관한 논문을 다수 출판한 사례가 있다 (Horvath et al. BMC Cancer 2010).
- 다. 캐나다는 탐지견과 훈련사가 총 73팀으로 이루어져 활동 중이고, 별도의 탐지센터는 없으나 전국 각지에서 후보견을 선발하여 탐지견 운영을 하고 있다. 식품, 동식물, 마

약, 총기류, 지폐 탐지 목적의 다양한 탐지견을 다수 보유하고 있다.

2. 국내 탐지견 현황

가. 국내에서는 1981년 육군의 폭발물탐지견 운용을 시초로 탐지견을 지속적으로 생산하고 있으나 생산 효율성의 저하와 절대적인 확보 개체수의 부족, 탐지견 훈련 인력의 부족 및 무려 70배가량의 차이를 나타내는 탐지견 육성 국가별 예산의 차이 (미국: \$69million, 한국: 1,176백만원; 출처: 농림수산검역검사본부 검역검사과 검역탐지견센터, 미국토안보부 Canine detection program (<http://www.gao.gov>)) 등 탐지견 보유 현황 수준에서는 선진국에 비해 상대적으로 많이 뒤처지고 있다.

표 18. 국내표 운영중인 검역탐지견의 보유 현황

구 분	검역검사본부	인천	영남	제주	총 합계
	운영견	운영견	운영견	운영견	
비 글	4	9	2	2	17
라브라도 레트리버	1	-	-	-	1
스프링거 스파니엘	1	1	-	-	2
합 계	6	10	2	2	20

나. 관세청은 매년 교배를 통한 번식 또는 구매를 통해 세관 운영이 가능한 약 20마리의 탐지견을 공급하고 있으나 탐지능력 뿐 아니라 자질까지 우수한 탐지견을 매년 지속적으로 찾기가 어렵고, 개체차로 인한 탐지율의 편차도 심해 체계적인 훈련이 힘든 문제점이 있다.

다. 해외에서 엄선된 검역탐지용 자견 1 마리를 구입하여 훈련을 마칠 때까지 고비용과 약 2년의 오랜 기간의 훈련이 소요되는데 반해, 검역탐지견으로 선발될 확률은 30% 정도에 불과하므로 이러한 비효율성을 감소시킬 수 있는 적극적인 대안이 필요한 실정이다.

제 2 절 국내외 복제탐지견 생산 현황

1. 국내외 복제개 생산 연구 현황

체세포핵이식 기법을 이용한 복제개의 생산은 대한민국만이 보유한 유일무이한 기술이다. 본 연구팀은 본과제의 복제개 생산 및 이에 관련연구를 통하여 26편의 논문을 발표 (PubMed listed 16편, 국내학술지 8편)한 바 있다. 또한 국내에서 개의 체세포핵이식 기술의

적극적인 장려로 현재 우수한 특수목적견의 보존을 위한 관심이 증대되고 있다.

가. 우수 마약탐지견의 체세포를 이용하여 복제개를 생산하였으며, 이들의 탐지능 개발 훈련을 통해 전원 모두 합격하여 현재 국내 공항만에서 마약탐지를 실시하고 있다. (Oh et al. 2009. Theriogenology; Choi, 2014. Behav Genet).

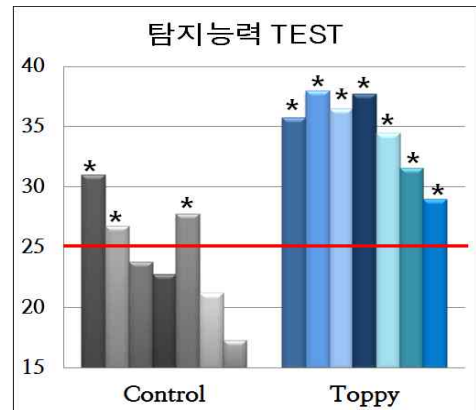


그림 4. 체세포 핵이식기법에 의해 생산된 복제 마약탐지견 7마리 (Oh et al., Theriogenology, 2009)(좌). 마약 탐지견 훈련 테스트에서 복제견과 일반 대조군간의 합격률 비교. *40점 만점 25점 이상 선발 Control 7두 중 3두 선발/Topy 7두 중 7두 모두 선발 (우).

나. 2012년 대한민국 농촌진흥청 사업을 통해 국내 특수목적견중 우수한 개체의 보존을 위한 국가 연구정책 사업이 추진되었다.

다. 국내의 우수한 특수목적견의 체세포를 이용한 복제특수목적견의 각 기관내로의 투입이 추진중이다.

라. 2014년 본연구팀은 본과제를 통해 복제 검역탐지견 14두를 생산, 전국 주요 공항만 등 검역현장에 활용함으로써 우수검역탐지견 유전자원을 보존하는 동시에 국경 검역에서도 큰 효과를 보는데 기여한 업적을 인정받아 2014년도 국가연구개발우수성과 100선에 선정되었다.

2. 한국 복제 마약탐지견에 대한 국내의 관심도

국내외에서 주요 언론사에서 복제 마약탐지견의 훈련부터 현장에 배치까지 지속적으로 관심을 가지고 보도되고 있으며, 이는 우수 유용견 복제의 실용화의 현실성을 보여주는 결과이다. 주요 보도는 아래와 같다.

가. 한국 복제 마약탐지견의 활약을 국내는 물론 해외 CNN에서는 'Super clone' sniffer dogs: Coming to an airport near you?의 기사(2011년 9월 30일)에서 훈련된 복제 소수정예부대가 도시에서 마약과 무기류 단속임무로 파견되어 결과를 보고하는 것을 두

고 공상과학 영화가 아닌 인천공항에서 실제로 일어나고 있는 현실이라며 복제 마약 탐지견의 활약을 보도하였다.

나. 또한 ZME Science에서는 ‘Cloned canine drug-sniffers are an amazing success in South Korea. Big leap for animal cloning in the future’로 평가 하여, 복제 마약탐지견의 우수성을 보도하였다 (2011년 10월).

다. BBC News에서는 2008년에는 ‘S Korea trains sniffer-dog clones’으로 복제 마약탐지견의 훈련이 시작됨을 알리고, 이듬해 2009년 기사에서 ‘Cloned sniffer dogs begin duties’로 현장에 투입되어 복제 마약탐지견이 활동함을 보도 하였다.

라. 국내 주요 언론사에서 앞다투어 복제 마약탐지견의 마약 적발을 보고하고 이를 ‘복제 마약탐지견을 이용하여 실용화에 성공’하였다고 평하였으며, ‘체세포 복제 기술을 활용한 유용견복제개 생산 및 이로 인한 재정적인 이득’을 자세히 보도하였다 (중앙일보, 2009년 8월, 세계일보, 2009년 9월, 국내 주요방송3사(SBS, KBS, MBC 2009년 9월).



그림 5. 해외 및 국내주요언론사에 보도된 복제 마약탐지견 (가) CNN, 2011년 10월, (나) ZME Science, 2011년 10월, (다) BBC News 2008년 7월, 2009년 7월 보도, (라) SBS News, 2009년 9월, (마) 세계일보, 2009년 9월, (바) KBS News, 2009년 9월

제 3 절 국내외 탐지견의 후각 관련 유전학적 분석 연구 현황

1. 국내의 개의 후각관련 유전자 분석 연구 현황

유용견의 능력과 상관성이 있는 후각관련 유전자에 대한 연구는 국내에서는 거의 보고가 되지 않고 있다. 해외에서는 다양한 목적을 지닌 유용견의 훈련 및 개발이 가속화되면서 개의 후각 유전자에 대한 분석 역시 활발히 이루어지고 있으며, 현황은 아래와 같다.

- 가. 개과 동물에서 후각 수용체 유전자 (Olfactory receptor (OR) gene)는 사람에 비해서 상대적으로 개 특이적인 후각 유전자의 다양성이 더 높게 나타남을 보고하였다 (Quignon et al., 2003, Genome Biol).
- 나. 개과 동물에서 나타나는 CNV (Copy Number Variation)에 대해 분석한 결과, CNV는 후각, 면역, 유전자 조절 같은 광범위한 부분을 포함한 429개의 유전자에서 나타났다 (Chen et al., 2009, Genome Res).
- 다. 여섯 종의 개에서 109개 서열의 OR gene의 다양성을 분석하여 Labrador Retriever나 German Shepherd의 품종이 Pekingese보다는 탐지견으로서 더 큰 잠재력을 지니고 있다고 평가하였다 (Robin et al., 2009, BMC Genomics).
- 라. OR gene 레파토리는 서식지, 특정감각, 다른 생태학적 특성에 의해 넓혀져 왔음을 보고하였고, 50종의 포유류 유전자의 전체 서열 중 OR gene 레파토리를 비교하여 특정한 냄새와 OR gene 그룹 사이의 관계를 밝혔다 (Hayden et al., 2010, Genome Res).
- 마. 고해상도 마이크로어레이를 통하여 품종에 특이적인 다수의 CNV를 발굴하였다. 또한 GC content peak 분석을 통하여 PRDM9유전자를 포함하는 CNV의 형성 기전(NHEJ mechanism)을 밝혔다. (Berglund et al., 2012, Genome Biol).
- 바. 손가락 편평세포암종(SCCD)에 걸린 31마리 푸들과 정상 대조군 푸들 34마리에 대해 GWAS분석을 수행하여 KIT ligand locus가 SCCD의 감수성에 영향을 주며, 이 KIT ligand가 SCCD oncogenesis에 필요한 MC1R loci와 interaction한다는 사실을 밝혔다. (Karyadi et al., 2013, Plos Genet).
- 사. Shiba-Inus종과 Shih-Tzus종의 개에 대해 녹내장과 관련된 3개 유전자(SRBD1, ELOVL5, ADAMTS10)에 대해 association test를 수행한 결과 SRBD1유전자의 polymorphism이 녹내장과 관련있다는 사실을 밝혔다. 이 SRBD1유전자의 polymorphism은 사람의 녹내장과도 관련이 있는 유전자로 알려져 있으며, 따라서 이 유전자가 사람과 개 모두에서 녹내장의 감수성에 관여할 것이란 사실을 밝혔다. (Kenemaki et al., 2013, Plos One).
- 아. 유전성 실조증(SCA)에 걸린 Parson Russell Terrier종의 개의 GWAS분석을 통해 CAPN1 유전자가 SCA에 연관된 사실을 밝혔다. (Forman et al., 2013, Plos One).
- 자. SNP GWAS분석을 통해 Alaskan husky의 뇌병증에 연관된 유전자 SLC19A3을 밝혔다. 다른 품종의 개 187마리에서는 SLC19A3유전자 돌연변이가 확인되지 않았으며, 이는 Alaskan Husky Encephalopathy (AHE)의 발병에 SLC19A3유전자의 돌연변이가 중요한 역할을 할 것으로 평가하였음. (Vernau et al., 2013, Plos One).

2. 국내외 개의 인지능력 관련 유전자 분석 연구 현황

국내외에서 인지능력 관련 유전자의 분석 연구에 관한 적극적인 장려로 현재 사람에서 인지능력 관련 유전자 분석 연구에 대한 관심이 증대되고 있다. 대부분 사람 또는 설치류 모델 동물에서 실시되고 있으며 개에서도 인지능력 관련 유전자의 다형성에 대한 분석은 이뤄지고 있으나 각 품종 또는 개체의 인지능력 및 관련 행동과 연관성 등을 연구한 사례는 거의 없다.

가. 니코틴 수용체의 단위체인 CHRNA4와 DBH (dopamine beta hydroxylase) 유전자에서의 T,C 유전자의 다형성과 인지능력 및 기억능력의 상관관계를 비교분석 한 결과, 인지능력은 CHRNA4 유전자와 관련이 있었으며, 기억능력에 관해서는 DBH 유전자와 관련이 있었고, 이러한 니코틴 수용체 유전자형 차이로 인해 개개인의 인식 기능에 차이가 나타난다고 보고하였다 (Parasuraman et al., 2005, Psychol Sci).

나. 도파민은 노르에피네프린, 에피네프린 등의 전구체이다. 이 연구를 통해 개에서의 tyrosine hydroxylase에 의해 도파민의 전구체 변환에 관여되는 DBH 등을 포함한 여러 물질의 유전자 내에서 다형성이 발견되었다 (Hejjas et al., 2007, Mamm Genome).

다. 사람에서 니코틴 수용체 단위체인 CHRNA4 유전자와 DBH 유전자와의 상관관계를 비교 분석해 본 결과, 업무 수행과정에서 CHRNA4와 DBH 유전자가 함께 작용하여 최적의 인지능력과 기억 수행능력을 보여주었다. 이로써, CHRNA4와 DBH 유전자가 독립적으로 작용하지 않고, 상호작용을 통해 시각공간 인지능력 및 기억능력에 관여한다는 사실을 보고하였다 (Greenwood et al., 2009, J cogn Neurosci).

라. CHRNA4 유전자형은 기억력 습득에 유의하게 영향을 미쳤으며 특히 C/C 상동유전체일 경우 특히 습득력이 빠른 것으로 나타났다. 그리고 이러한 결과는 성별, 나이, 그리고 IQ 에 영향을 받지 않았다 (Espeseth et al., 2010, PLoS One).

마. 사람에서 니코틴 수용체의 알파 subunit과 베타 subunit에 관련한 CHRNA4 유전자에서의 인지능력을 분석해본 결과, 니코틴 수용체의 CHRNA4 유전자는 시각과 관련된 인지능력, 주의력 등에 밀접한 연관이 있음을 알 수 있었다 (Greenwood et al., 2012, Neurosci Biobehav Rev).

바. 사람에서 니코틴 수용체에서의 CHRNA4 유전자가 시각공간 인지능력과 뇌의 활성화 부위를 분석하기 위해 functional MRI를 이용하여 실시하였다. 뇌의 두 부위가 주의력과 크게 관련되었는데 우측 측두엽의 벽쪽 연결 부분은 유전자와 상관관계가 높은 활성을 띄었다. 특히 CHRNA4 유전자의 C/C 상동 유전체형인 경우 신경 활성이 주의력과 관련된 행동 양상을 보일 때 높게 나타났다 (Giessing et al., 2012, Neuroimage).

사. 타이로신 하이드록시레이즈 (tyrosine hydroxylase) 유전자의 다형성이 저먼 셰퍼드 품종에서 행동-충동성과 관련이 된다 (Kubinyi et al., 2012, PLoS One).

제 4 절 국내외 복제견의 형태기능학적 분석 연구 현황

1. 국내외 개의 형태기능학적 분석과 후각 능력간의 상관관계 분석 연구 현황

형태기능학적 분석 연구와 개의 후각 능력의 상관성에 대한 연구 분야는 최근 각광받고 있는 연구 분야이나 그 연구가 활발하지 못하며 관련연구는 아래와 같다.

가. 개의 비강을 MRI로 분석한 결과, 비강 내 구조물이 매우 넓은 표면적을 제공하며, 특히 상악과 연결된 구조물이 매우 복잡함을 밝혀내어, 냄새를 맡는 동안 후각 기능에 큰 역할을 하는 것으로 보고 하였다 (Craven et al., 2007, Anat Rec (Hoboken)).

나. MRI를 이용하여 개의 비강 내 공기흐름이 비강 깊숙이 후각담당 부분까지 냄새입자가 도달할 수 있도록 최적화되어 있고, 오목한 구조가 많아 민감한 후각에 크게 기여하고 있다고 보고하였다 (Craven et al., 2010, J R Soc Interface).

2. 국내외 복제개의 fMRI를 이용한 뇌 분석

후각에 대한 다양한 분야의 연구는 활발히 이루어지고 있다. 하지만 영상을 통한 형태기능학적 연구와 이를 활용한 후각 능력에 대한 연구는 미미한 실정이다. 후각이 뛰어난 개나 설 치류를 대상으로 몇몇 연구들이 진행되었고, 그 연구 내용은 다음과 같다.

가. 수의영역에서 후각 및 뇌기능 평가를 위한 fMRI를 이용한 연구는 매우 부족한 실정이다. 특히 진신마취의 필요성이라는 한계점이 매우 크게 작용하는 뇌 연구의 특성상 결과가 제한적 일 수밖에 없었다.

나. 최근 동물을 이용한 fMRI 연구가 시도되면서 마취법 및 프로토콜에 대한 논문이 점차 출판되고 있으며 이는 향후 fMRI를 이용한 동물 실험의 기초가 될 것이라 판단된다 (Berns et al., 2012, PLoS ONE).

다. 인의에서는 fMRI를 이용한 후각기능의 연구는 최근 활발해지고 있으며 ‘치매’ 및 ‘알츠하이머’ 질병의 초기 증상으로 후각기능이 저하된다는 연구 결과가 있어 fMRI를 이용한 후각기능의 연구가 이루어졌다.

라. 또한 fMRI 촬영 시 얻는 영상으로, olfactory bulb 의 크기, olfactory sulcus의 깊이 등을 측정할 수 있으며, 인의에서는 이 두 구조물이 후각과 매우 밀접한 연관성을 지닌다고 밝혀졌다 (Buschhuter et al., 2008, Neuroimage; Hummel et al., 2003, Brain Res).

3. 국내외 복제개의 VBM을 이용한 뇌분석 환경변화

현재 인의에서는 신경가소성(Neuroplasticity)이라는 뇌의 특징을 바탕으로 VBM을 이용하여 노화 및 각종 질병, 행동장애에 따른 뇌의 형태학적인 변화를 분석하고 그에 연관된 뇌기능의 변화 및 임상증상을 비교 분석하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 수의학 분야에서의 연구는 극히 미미한 실정이다. 따라서 본 실험의 목적은 VBM을 이용한 동물 실험 결과를 선점하고 프로토콜을 확립하여 향후 동물실험의 기초가 되며, 우수검역탐지복 제견과 대조군의 후각 및 인지, 학습 능력의 차이를 뇌의 형태학적인 근거로 밝히는 것이다. 기존에 진행하였던 fMRI는 기능적 연구인 반면 VBM은 형태학적 연구법으로 기능적 연구에 비해 마취 및 주위환경의 영향에 따른 변수가 적어 보다 더 객관적인 결과를 얻을 수 있다.

가. 신경가소성(Neuroplasticity)은 두뇌가 내부 혹은 외부의 환경 변화에 따라 기능적, 구조적으로 변화되는 능력을 말한다. 뇌는 신경세포와 신경 교세포가 연결되어 구성되는데 신경세포 연결길이의 변화, 연결의 추가 또는 제거, 그리고 새로운 신경세포의 형성 등에 따라 뇌가 형태학적, 기능적으로 변화될 수 있다. (Shatz et al 1992. Science; Draganski et al. 2008, Behav Brain Res)

나. 거울상의 잡지를 2주 동안 매일 읽게 한 그룹과 대조군의 뇌를 fMRI와 VBM의 두 가지 분석방법을 이용해 분석하였다. fMRI를 통해 시각 신호를 담당하는 우측 두정엽 피질(Right superior parietal cortex)에서 최대 활성화 신호를 얻었으며, 이는 VBM에서 피질의 두께 증가를 보인 영역과 일치하였다. (Ilg et al. 2008, J Neurosci)

다. 건강한 성인 20명을 대상으로 저글링을 가르쳐주고 훈련을 시켜 훈련 전, 훈련 후, 훈련 후 저글링을 그만 둔 6달 후의 뇌를 VBM으로 분석하였다. 훈련 전에 비해 인지 및 학습을 담당하는 뇌 영역인 전두엽(frontal lobe), 측두엽(temporal lobe), 대상엽(cingulate cortex)의 부피 증가가 관찰되었고 훈련을 멈춘 6개월 후 다시 부피는 감소하였다. (Driemeyer et al. 2008, Plos one)

라. 125명의 19-79세의 정상 후각기능을 가진 사람들을 대상으로 냄새의 역치, 냄새 구별 능력, 인식 능력을 검사하여 점수화 하고 VBM으로 후각망울(olfactory bulb)의 부피와 비교한 결과로, 후각망울의 부피와 후각능력 점수와의 뚜렷한 연관성을 확인하였다. 또 다른 연구에서는 냄새를 인식하는 능력과 후각망울의 부피와의 연관성을, 냄새의 역치와 안와전두피질(orbitofrontal cortex)와의 연관성을 확인했다. (Buschhuter et al. 2008. Neuroimage; Seubert et al. 2013, Cereb cortex)

마. 조향사(perfumer)의 뇌를 일반인의 뇌와 VBM으로 비교분석한 결과 후각신호의 입력과 관계된 곧은이랑/매측안와이랑 (gyrus rectus/medial orbital gyrus), 안와 전두 피질의 회백질 부피가 더 크게 관찰되었고, 경력에 따라 기억과 관계된 대상회(cingulate gyrus)와 미상핵(caudate nuclei)의 회백질 부피가 증가함이 관찰되었다. (Delon-Martin et al. 2013, Neuroimage)

- 바. Olfactory bulb는 받아들이는 후각신호의 양에 따라 높은 가소성(plasticity)을 가지며 상 후 후각 상실증 환자에서 후각신호의 부재로 인해 olfactory bulb의 부피가 감소한 것으로 보여졌다. 이와 같은 맥락으로 파킨슨병 환자의 초기 증세로 후각이상을 보일 수 있는데 이는 primary and secondary olfactory의 회백질의 위축소견과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.(Lee et al. 2014, Mov Disord)
- 사. 선천적 후각상실증 환자의 뇌와 같은 연령대의 정상인의 뇌를 VBM으로 분석비 교한 결과 olfactory bulb, olfactory tracts, olfactory sulcus, primary olfactory cortex, secondary olfactory area의 회색질의 부피 감소가 확인되었다. (Yao et al 2013. Eur Arch Otorhinolaryngol)
- 아. 정상비글견의 연령에 따른 뇌의 형태학적 변화를 VBM을 적용하여 분석한 논문이 2006년 발표되었고 노화가 진행됨에 따라 전반적인 회백질의 감소가 확인되었다. (Tapp et al. 2006, Neuroimage)

제 5 절 국내외 개의 인지행동학적 분석 연구 현황

최근 활용가치가 높은 다양한 종류의 탐지견에 대한 연구가 진행중이며, 인지행동학적 분석을 통해 탐지능력과 개인적인 기질, 성격 등의 상관관계에 대한 연구가 주목받고 있다.

- 가. 폭발물 탐지견에서 실내·외, 밝은 곳·어두운 곳의 조건에서 탐지 성공률, 탐지 소요 시간, 쿵쿵거리는 횟수 등을 측정한 결과 시각보다 후각이 탐지에 있어 더 주요한 감각임을 확인하였다 (Gazit et al., 2003, Appl Anim Behav Sci).
- 나. 도쿄 세관에서 197두의 마약탐지 후보견의 행동학적·유전학적 특성 분석 결과, 탐지 욕구는 성공적인 훈련 완료와 관계가 있으나 유전자형에 있어서는 미약한 상관관계가 있음을 제시하였다 (Maejima et al., 2007, Appl Anim Behav Sci).
- 다. 목재의 해충을 탐지하기 위한 방법으로 열에너지 이미징 카메라, 엑스레이, 흰개미 탐지견 등 여러 기술과 탐지견의 효율을 비교한 연구 결과에서 엑스레이는 40%의 효율을 보였으며 탐지견은 자연적으로 생긴 흰개미에서는 100% 효율을, 인공적으로 감염시킨 목재에서는 전혀 탐지하지 못하는 양상을 보였다 (Zahid et al., 2012, Scand J Forest Res).
- 라. 군견을 대상으로 탐지대상에 대한 집중도, 민감도, 사람에 대한 집중도, 탐지 집중도 4가지 항목을 바탕으로 한 군견에 대한 행동테스트 도구가 얼마나 유효한지를 조사하였다 (Sinn et al., 2010, Appl Anim Behav Sci).
- 마. 일본 오키나와 지역에 외래종인 Small Indian Mongoose를 제거하기 위해 분변 냄새

만을 특이적으로 탐지할 수 있도록 탐지견을 훈련시킨 결과, 정확도 98%, 민감도 99%의 높은 훈련 성공률을 보였다 (Fukuhara et al., 2010, J Vet Behav).

바. 마약탐지견, 폭발물탐지견 훈련사를 대상으로 설문조사를 실시하여, 목표에 대한 집중도, 흥미, 의지, 행동의 일관성, 학습 능력 등의 항목에서 이상적인 탐지견과 일반견이 차이를 보임을 발견하였다 (Adamkiewicz et al., 2013, Anim Sci Pap Rep).

사. 뉴 사우스 웨일즈의 경찰견 26두를 대상으로 연령에 따라 냄새를 구별하는 행동이 어떻게 달라지는지를 조사하였다 (Salvin et al., 2012, J Vet Behav).

아. 복제 마약탐지견과 교배로 태어난 일반 개체들 간 자질평가 결과가 유의적인 차이를 나타내었으며, 마약 탐지견 선발 테스트 결과 복제 마약탐지견이 높은 선발 효율을 나타내었다 (Choi et al., 2014, Behav Genet).

자. 동일 세포 유래 복제견의 미로 평가 시 대조군에 비해 미로를 찾아가는 시간의 유사성이 높게 나타났으며 동일 연령의 개체에 비해 보다 빠르게 미로를 인지함을 밝혀복제견 간 인지능력의 유사성을 검증하였다 (Shin et al., 2014, IETS).

제 6 절 국내외 재복제 (recloning) 기법을 이용한 개복제 연구 현황

희귀 품종이나 멸종 위기의 동물에서 체세포 복제 기술을 통한 개체의 재복제 생산 등이 활발히 이루어지고 있다. 현재 체세포 복제 기술을 이용하여 복제 산자의 공여세포를 이용해 재복제 생산한 연구 현황은 아래와 같다.

가. 개에서는 최초로 형질전환 복제개의 지방줄기세포를 분리하여 재복제 생산에 성공하여 동일한 형질을 지닌 개체의 체세포 복제 기술을 통한 생산 가능성을 증명하였다. 체세포 복제 기술을 적용하여 생산된 복제 개체는 공여세포의 개와 마찬가지로 형질전환 유전자가 발현되었다 (Oh et al. 2011, Theriogenology)

나. 좌우의 눈동자 색이 다른 수컷 고양이의 세포 (G0)를 이용하여 체세포 복제 기술을 통해 복제 산자를 생산하였다. 또한 6개월령이 되었을 때 피부 세포 (G1)를 이용하여 재복제 산자를 생산하였다. 산자 중 단 한 마리에서만 좌우의 눈동자 색이 다르게 나타났다 (Yin et al. 2008, Theriogenology)

다. 재복제시 복제 개체의 정상성을 분석하기 위해 형질전환 돼지의 체세포를 이용하여 재복제 돼지 산자 생산의 연구를 진행하였다. 사람의 트롬보포이에틴(hTPO) 유전자가 발현되는 섬유아세포를 이용하여 체세포 복제 기술을 이용, 형질전환 돼지를 생산하였으며, 이 복제 돼지의 세포를 이용하여 재복제 생산 (G1)하였고 또한 이 재복제 돼지의 세포를 이용하여 또다시 재복제 (G2) 생산하였다 (Cho et al. 2007, Dev Dyn).

라. 체세포 복제 기술을 이용하여 복제 소의 재복제 생산을 최초로 보고하였다. 복제된 개

체는 재복제 개체, 복제 개체 소 모두 정상성을 갖고 있었으며 텔로미어 길이는 재복제되어 생산된 개체에서 모두 정상이었다 (Kubota et al. 2004, Nat Biotechnol).

마. 21세령의 Brahaman bull의 섬유아세포를 이용하여 체세포 복제 기술을 이용 이식을 하였고 40일령의 복제 태아를 회수하여 그로부터 섬유아세포를 분리하여 성체의 섬유아세포와 효율을 비교하였다. 성체의 섬유아세포와 40일령의 복제 태아에서 분리한 섬유아세포를 공여세포로 이용하였을 때의 복제 수정란의 체외 발달율은 거의 차이가 없었다 (Hill et al. 2000, Biol Reprod)

바. 체세포 복제 기술을 이용하여 복제 마우스의 6세대까지의 생산을 최초로 보고 하였다 (Wakayama et al. 2000, Nature)

제 7 절 국내외 복제 개체의 노화 연구 현황

텔로머레이즈 활성 및 텔로미어 길이 등을 분석하는 노화 관련된 연구는 국내외에서 활발히 이뤄지고 있으며 특히 체세포 복제 기술을 통한 다양한 품종에서의 복제개체 생산이 활발해짐에 따라 노화와 관련된 분석 역시 활발히 이루어지고 있다. 공여세포에서의 노화상태 조절 연구 및 이를 활용한 복제 효율에 대한 연구는 미미한 실정이며, 화학물질 처리를 통해 노화 상태가 조절된 세포에 관한 연구는 사람 또는 설치류를 대상으로 몇몇 연구들이 진행되었고, 그 연구 내용은 아래와 같다.

가. 세계 최초로 복제 생산된 돌리는 평균 텔로미어 길이가 공여세포와 일치하였으며 나이가 일치하는 일반 양과 비교하였을 때에는 더 짧은 것으로 나타났다 (Shiels et al. 1999, Nature).

나. 섬유아세포를 이용하여 복제된 소의 경우 평균 텔로미어 길이가 공여세포에 비해 더 길어진 것으로 나타났다 (Lanza et al. 2000, Science).

다. 복제 소 생산의 경우 텔로미어 길이가 공여세포로 섬유아세포 및 난구세포를 이용하여 복제하였을 때 생산된 개체와 공여세포가 일치하였으며 복제양 돌리의 경우 종 특이적인 것 같다고 언급하였다 (Tian et al. 2000, Nat Genet).

라. 다양한 종류의 공여 세포를 이용하여 복제 소를 생산하여 각각의 생산된 개체 및 공여세포별로 비교를 하였다. 피부 섬유아세포를 이용하여 복제된 소의 경우 공여세포에 비해 텔로미어의 길이가 길어진 반면에, 근육세포, 난소 표피세포, 유선 표피세포에서 분리한 세포를 공여세포로 이용한 경우에는 복제된 소의 텔로미어 길이가 모두 짧아졌다(Miyashita et al. 2002, Biol Reprod).

마. 소의 태아 섬유아세포는 배아 줄기세포에 비해 텔로머레이즈 활성이 유의하게 감소하였으며 두 종류의 세포에서 모두 계대가 증가할수록 텔로머레이즈 활성이 감소하는

것이 나타났다.복제된 소에서 텔로미어 길이는 성체 공여세포에 비해 길어졌으며 나이가 일치하는 일반 소와 비교하였을 때 크게 다르지 않았다 (Betts et al. 2001, Proc Natl Acad Sci).

바. 태아 섬유아세포를 이용하여 복제 돼지를 생산하였고 공여세포와 비교하였을 때 텔로미어 길이가 연장되었다 (Jeon et al. 2005, Mol Reprod Dev).

사. 체세포 복제 기술을 통해 생산된 복제 소에서 텔로미어 길이와 관련된 기준값으로 번식능, 우유 생산능, 수명의 관계를 알아보았다. 복제된 소의 사망 원인은 대부분 사고와 관련된 것으로 부적절한 관리, 감염, 급성 유방염 및 저칼슘혈증과 관련된 것이었으며 텔로미어 길이와는 관련이 없었다 (Konishi et al. 2011, J Reprod Dev).

아. Resveratrol은 사람의 내피 전구세포에서 세포의 노화를 감소시켰으며 이것은 Akt에 의존적으로 텔로머레이즈 활성을 증가시키는 기전에 의한 것이다 (Xia et al. 2008, Br J Pharmacol).

자. 사람의 피하 섬유아세포에서 텔로머레이즈 활성을 유도하는 것은 리프로그래밍 효율을 증가시키는 것으로 나타났다 (Dashinimaev et al. 2011, Moscow Univ Biol Sci Bull).

차. 난자의 성숙 및 착상전 배아 발달에 대한 Resveratrol의 효과에 대한 연구를 진행하였다. Resveratrol을 돼지 난자에 체외성숙 배양액에 첨가하여 체외 수정 및 체외 수정 후 배아의 발달 효율을 향상시켰다 (Kwak et al. 2012, Theriogenology).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

<1세부: 우수 검역탐지건 복제생산 및 검증>

제 1 절 검역탐지건의 자질 분석을 위한 다양한 프로토콜 확립 및 객관적 지표 제시

1. 검역탐지건의 유전학적 평가 위한 객관적 지표 제시

가. 기 생산된 복제건들의 유전학적 분석

(1) 연구수행 방법

생산된 복제건들의 유전학적인 동질성을 평가하기 위해 공여건과 복제건들의 genome data를 활용하여 CNV를 발굴하고, 발굴된 CNV를 바탕으로 비교분석을 진행하였다. Genome data는 NimbleGen의 CNV array를 통해 생산된 data로, 38만5천개의 tiling probe와 이미 알려져 있는 CNV 구역에서 38만 5천개의 probe를 합쳐서 설계된 플랫폼이다. 아래 그림은 Nimblegen CNV array의 probe 설계를 타나낸 그림이며, 최종 probe spacing은 3.2Kb이다. CNV 분석은 공여건과 복제건 7두를 대상으로 진행하였다. Data의 정확성을 확인하기 위하여 다른 품종(Boxer)의 개 1마리를 함께 분석하였다. CNV의 발굴은 BioDiscovery사의 NEXUS 소프트웨어를 사용하였으며, Rank-Segmentation CNV calling algorithm을 사용하여 CNV를 검출하였다. 분석에 사용한 조건은 다음과 같다; Significance threshold = $1.0E-6$; maximum contiguous probe spacing (Kbp) = 1000; minimum number of contiguous probes per CNV segment = 5; threshold of signal intensity ratio > 0.2 on \log_2 scale for gains and < -0.2 on \log_2 scale for losses.

(2) 연구수행 결과

서울대학교 수의과대학에서 기 생산된 복제 마약탐지건 7두를 통해 일차적으로 유전학적 분석을 실시하였다.

Dog CGH 385K Whole-Genome Tiling Arrays

Format 385K Source: NCBI Build: caFam2 , May 2009 Recommended Storage: Store arrays desiccated at room temperature.						
Description	Probe Length	Median Probe Spacing	Catalog Number	Design Name	Pack Size	Work-flow
Dog CGH 385K Whole-Genome Tiling Array	50-75mer	4675bp	83679001-00-01	ca-Fam2 WG CGH	1 Slide	Contact Us to Buy
			83679001-00-01	ca-Fam2 WG Dataset		Order Options

* Availability of products varies from country to country.



Mapping DNA structural variation in dogs

Yue-Kang Chen, Jimhua D. Swartz, Libin J. Rush, et al
Genome Res. 2009 19: 550-558 originally published online November 17, 2008
 Access the most recent version at doi:10.1101/303741-109

Supplemental Material <http://genome.cshlp.org/content/suppl/2009/11/17/550-558.DC1.html>

References This article cites 42 articles, 27 of which can be accessed free at <http://genome.cshlp.org/content/19/11/550.full.html#ref-list-1>

Article cited in <http://genome.cshlp.org/content/19/11/550.full.html#related-urls>

Related Content The genomic architecture of segmental duplications and associated copy number variants in dogs. Thomas J. Nicholas, Da-Chang, Maria Ventura, et al. *Genome Res.* March 2009 19: 420-430

Email alerting service Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or click here.

Correction A correction has been published for this article. The contents of the correction have been appended to the original article in this report. The correction is also available online at <http://genome.cshlp.org/content/19/4/439.full.html>

720K custom array (average tiling interval = 3.2Kb)

그림 6 BioDiscovery사의 NEXUS 소프트웨어

우선, data의 객관성을 확인하기 위해 다른 품종(Boxer) 1두의 CNV를 분석하였다. 아래 그림은 Boxer에서 발굴된 CNV의 예를 나타내고 있다. 분석 결과, 74종의 CNV가 autosome에서 검출되었으며, 평균 CNV의 size는 118Kb로 나타났다.

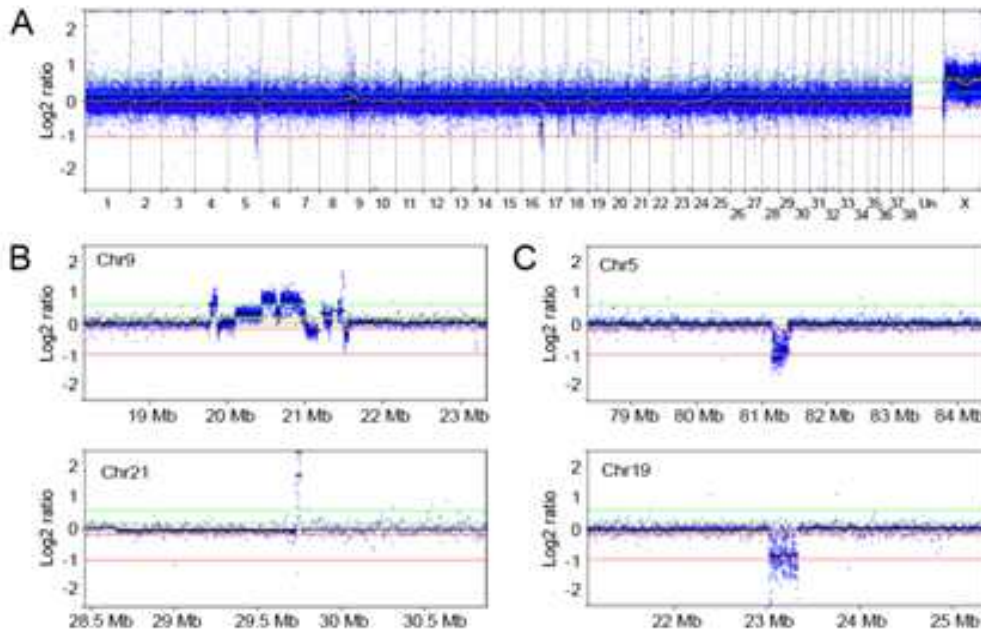


그림 7 Boxer에서 발굴된 CNV의 예

Boxer에서 검출된 CNV를 기존에 알려진 CNV와 비교한 결과 81% 일치하는 것을 아래의 그림에서 확인할 수 있었다.

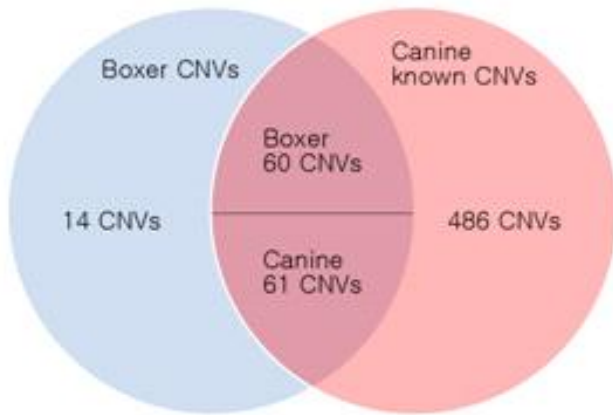


그림 8 Boxer CNV와 기존에 알려진 CNV의 비교

Boxer에서 검출된 CNV를 genomic qPCR로 검증한 결과 arrayCGH에서 도출된 결과와 일치함을 아래의 그림으로 확인할 수 있었다.



그림 9 Boxer CNV의 검증 예제

위 data는 Nimblegen CNV array가 CNV를 정확하고 재현성있게 검출한다는 것을 제시한다. 본 플랫폼을 이용하여 복제건 7두에서의 CNV를 분석한 결과, 4두에서는 CNV를 검출할 수 없었다. 나머지 3 샘플에서는 7종의 CNV가 발굴되었으며 평균 CNV size는 744Kb였다. 아래 그림은 복제건에서 검출된 CNV의 예를 나타내고 있다.

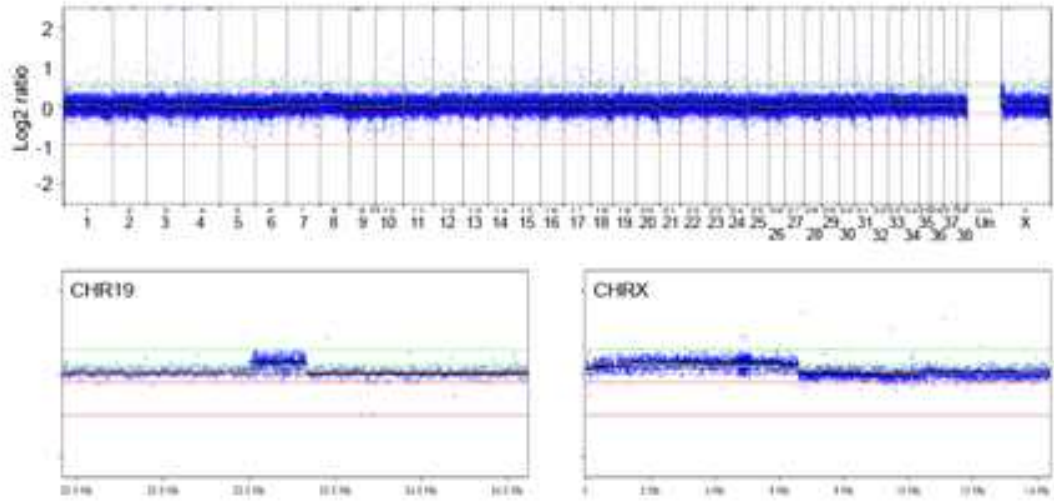


그림 10 복제건에서 검출된 CNV의 예제

아래 그림은 7주의 복제건에서 검출된 CNV의 수를 나타내고 있다.

Number of CNVs detected in individual dogs^o

Dog sample ^o	Dog breed ^o	No. of CNVs (1.0E-05/1.0E-06) ^o			Average CNV
		Gain ^o	Loss ^o	Total ^o	Size (Kb) ^o
To-Mon ^o	Retriever (clone dog) ^o	0 ^o	1 ^o	1 ^o	56.6 ^o
To-Tue ^o	Retriever (clone dog) ^o	0 ^o	0 ^o	0 ^o	- ^o
To-Wed ^o	Retriever (clone dog) ^o	5 ^o	0 ^o	5 ^o	1,023 ^o
To-Thur ^o	Retriever (clone dog) ^o	0 ^o	0 ^o	0 ^o	- ^o
To-Fri ^o	Retriever (clone dog) ^o	0 ^o	0 ^o	0 ^o	- ^o
To-Sat ^o	Retriever (clone dog) ^o	0 ^o	1 ^o	1 ^o	36.1 ^o
To-Sun ^o	Retriever (clone dog) ^o	0 ^o	0 ^o	0 ^o	- ^o

그림 11 복제건에서 검출된 CNV의 수

위 data를 통하여 복제건에서 검출되는 CNV 개수가 일반 개체간에 발생하는 CNV의 수에 비해 현저히 적음을 확인하였다.

나. 검역탐지건의 유전학적 평가 위한 객관적 지표 제시

(1) 연구수행 방법

(가) Whole-genome SNP array를 이용한 SNP 및 CNV를 검출

검역탐지견의 유전학적 지표를 발굴하기 위하여 Illumina의 canineHD BeadChip을 이용하여 각 샘플(비글)의 SNP와 CNV를 검출한다. Illumina의 canineHD BeadChip은 한번의 실험으로 12샘플의 whole genome SNP profile을 얻을 수 있으며, 각 샘플의 분석에는 17만개 이상의 SNP probe가 사용된다. 17만여개의 SNP probe는 Dog genome project에서 발굴된 250만개의 dog SNP중, 검증이 잘 된 SNP marker로만 구성되어있다.

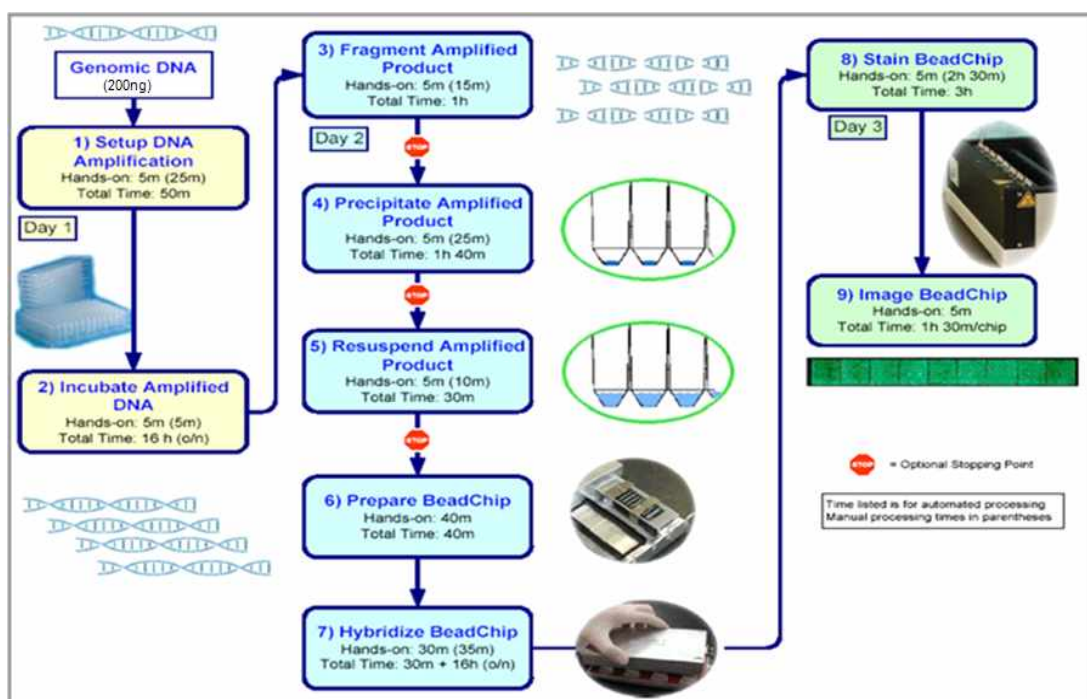


그림 12 canineHD BeadChip 실험 과정 및 방법 Canine BeadChip 실험 원리.

Illumina canine BeadChip을 이용하여 우수 검역탐지견 13두, 일반 비글 8두를 대상으로 실험 진행하였다. 200ng의 genomic DNA를 사용하며, 전체적인 실험 과정을 위의 그림에 나타냈다. 실험 과정을 요약하면 다음과 같다; 1. 200ng의 genomic DNA는 amplification과정을 통해 DNA양이 증폭된다. 2. 증폭된 DNA는 fragmentation과정을 통해 SNP genotyping에 적당한 크기로 잘라준다. 3. 반응이 끝난 샘플을 정제한 후, beadchip에서 16시간동안 hybridization반응을 진행한다. 4. 반응이 끝난 beadchip은 stain 과정과 wash과정을 진행한 후, beadchip scanner를 통해 형광값을 포함하는 image파일을 얻게 된다.

(나) 우수 검역탐지견 선발을 위한 유전학적 지표 SNP, CNV marker의 발굴

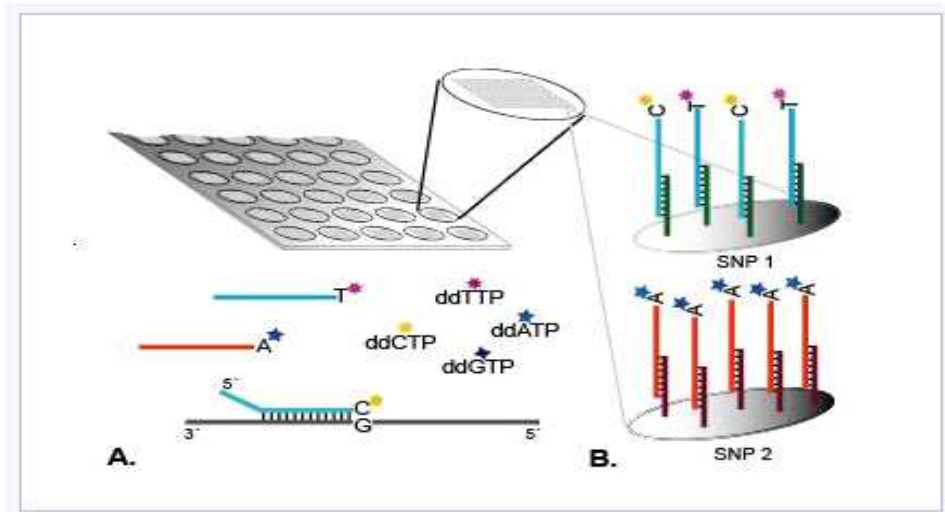


그림 13 Canine BeadChip 실험 원리. Distribution of SNP by chromosome

각 샘플의 image에는 173,662 SNP probe의 signal intensity를 포함하고 있으며, 각 probe는 하나의 SNP를 대변하고 있다. Genomic DNA는 hybridization과정을 통하여 각 probe에 특이적으로 반응하게 되며, BeadChip 분석을 통하여 whole-genome SNP profiling이 가능하다. 위의 그림에 CanineHD BeadChip의 실험 원리를 나타내었으며, 아래의 그림은 각 염색체 별로 분포하고 있는 SNP의 수를 나타내고 있다.

검역탐지견의 유전학적 지표 발굴은 검출된 SNP와 CNV를 토대로 case-control association test를 진행하여 우수검역탐지견 그룹과 일반 비글 그룹간에 유의한 차이를 나타내는 마커를 발굴한다. CanineHD BeadChip 실험을 통해 얻어진 이미지는 BeadStudio 3.2 software의 Genotyping Module 3.3.8을 이용하여 genotype calling을 수행한다. 다음으로 SNP call rate, reproducibility, HWE test를 하여 probe filtering을 한다. Calling된 genotype에 genetic model을 적용하여 case-control association study를 진행한다. 통계적으로 유의한 SNP marker를 선별하며, 이 SNP marker는 검역탐지견의 유전학적 지표로 활용한다.

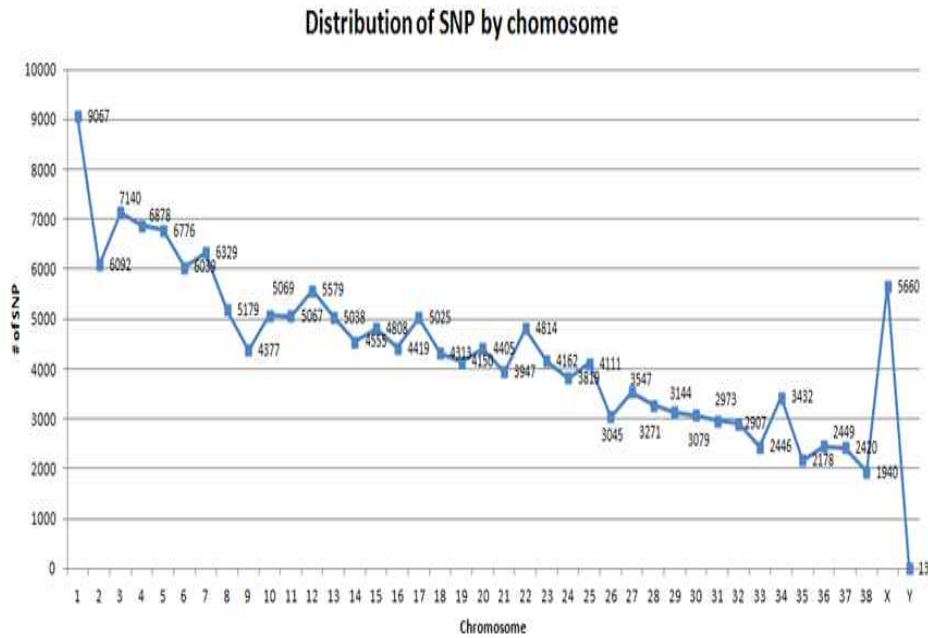


그림 14 Distribution of SNP by chromosome

(2) 연구수행 결과

(가) Canine HD BeadChip

우수 검역탐지건 13두, 일반 비글 8두를 대상으로 Illumina canine BeadChip을 scan 하여 얻은 image를 분석한 결과, 5가지 실험상의 QC 기준을 모두 충족하였다. 또한 genotyping data를 분석한 결과 샘플들의 평균 call rate는 99.7%였으며, 평균 SNP call rate는 98.9%를 나타내었다. Minor allele frequency를 확인한 결과 49,295 SNP는 monomorphic인 것으로 확인되었으며, 이 monomorphic probe를 제외한 나머지를 대상으로 HWE test를 진행한 결과 99%이상의 probe가 만족하는 것으로 보아 우수한 genotype quality를 갖는 data가 도출되었음을 확인할 수 있었다. 아래 그림은 전체 샘플의 minor allele frequency를 나타내고 있다.

표 19 Experiment QC

Experiment Controls	Confirm
Allele specific extension controls	Pass
PCR uniformity controls	Pass
Gender controls	Pass
Extension gap controls	Pass
First Hybridization controls	Pass

표 20 Genotype data QC

QC metrics	Result
Averaged Sample call rate	99.686%
Averaged SNP call rate	98.88% (monomorphic: 49,295)
HWE test (p-value<0.0001)	99.25% SNPs kept with HWE $p \geq 0.0001$: 172,365 SNPs dropped with HWE $p < 0.0001$: 1,297

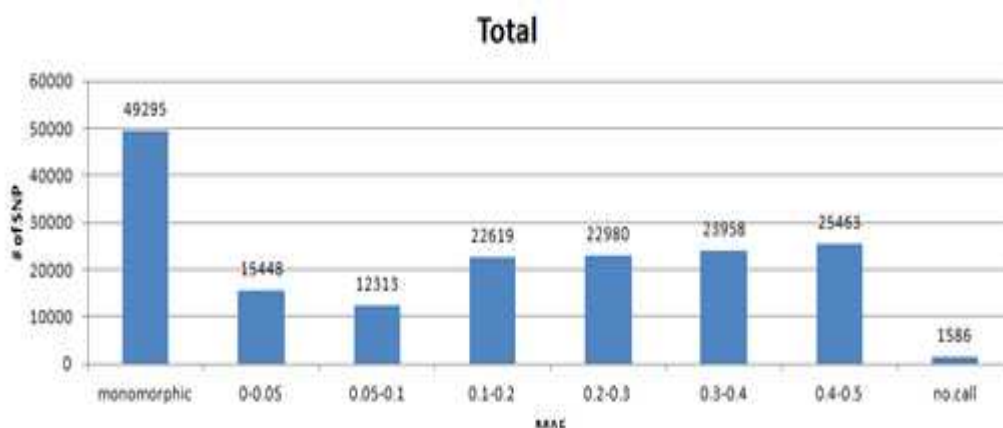


그림 15 Distribution of minor allele frequency

(나) 우수 검역탐지견 선발을 위한 유전학적 지표 SNP marker의 발굴

CanineHD BeadChip 실험을 통해 얻어진 이미지는 BeadStudio 3.2 software의 Genotyping Module 3.3.8을 이용하여 genotype calling을 수행한다. 다음으로 SNP call rate, reproducibility, HWE test를 하여 probe filtering을 한다. Calling된 genotype에 genetic model을 적용하여 case-control association study를 진행한다. 통계적으로 유의한 SNP marker를 선별하며, 이 SNP marker는 검역탐지견의 유전학적 지표로 활용한다.

173,662개의 SNP probe중, SNP call rate가 99% 미만인 것과 monomorphic probe, HWE test를 충족하지 않는 probe를 filter한 결과 122,618개의 probe가 남았다. 122,618 SNP probe marker를 대상으로 multiple logistic regression을 수행하였으며, 성별로 보정을 진행하였다. Additive model을 적용하여 우수 검역탐지견 그룹과 일반 비글 그룹간의 association test를 진행한 결과, 113개의 SNP가 $p < 0.01$ 이하의 값을 아래의 표에 나타냈다. 이 중, 가장 유의한 SNP 마커 2개를 아래 그림에 나타냈다. 아래 그림의 위쪽은 32번 염색체의 BICF2P1090057 genotype을 나타낸 것으로, 일반 비

클 그룹은 대부분 hetero type(C/T)의 SNP를 갖는 반면, 우수 검역탐지견들은 mutant type(C/C)의 SNP를 갖는 것을 알 수 있다. 아래 그림의 아래 부분은 11번 염색체의 BICF2P471203 genotype을 나타낸 것으로, 우수 검역탐지견들은 wild type(A/A)의 SNP를 갖는 반면, 일반 비글 그룹에서는 hetero type(A/C)의 빈도가 높게 나타났다.

표 21 Association test (우수 검역 탐지견 그룹 vs. 일반 비글)

SNP.Name	SNP	Chr	MapInfo	add.odds	add.p.value
BICF2P1090057	[A/G]	32	25,744,525	0.011966071	0.003022685
BICF2P471203	[T/G]	11	58,170,361	0.011966071	0.003022685
BICF2P1203931	[A/G]	37	17,625,237	70.59277454	0.004281379
BICF2S23118349	[T/G]	11	58,389,087	0.014428225	0.004524943
TIGRP2P214766_rs8840175	[T/C]	16	38,487,969	39.84554645	0.006090079
BICF2P855529	[T/C]	12	52,843,170	39.84554645	0.006090079
BICF2P97917	[A/C]	30	14,629,116	0.025096908	0.006090079
TIGRP2P16643_rs9089258	[A/G]	1	21,005,768	0.025096908	0.006090079
BICF2G630458001	[A/C]	34	30,854,000	0.025096908	0.006090079
BICF2P1430013	[A/G]	18	19,309,301	0.025096908	0.006090079
BICF2G6303957	[A/G]	X	115,036,705	7.741034792	0.006667602
BICF2S2306377	[C/G]	11	67,401,892	0.026513492	0.007137235
BICF2P98773	[A/G]	29	38,874,930	0.026513492	0.007137235
BICF2S23311911	[T/C]	5	5,337,103	0.026513492	0.007137235
BICF2G630814520	[C/G]	16	49,058,349	0.020697376	0.007443783
BICF2P169524	[T/C]	7	4,477,519	0.020697376	0.007443783
BICF2P215393	[A/G]	8	62,406,661	36.28565456	0.007488314
BICF2P1142502	[A/C]	23	23,800,667	35.40148666	0.007708383
BICF2P895104	[A/G]	1	20,089,432	35.40148666	0.007708383
BICF2G630589046	[T/C]	32	26,524,272	0.028247401	0.007708383
BICF2P800148	[T/C]	22	58,222,756	0.028247401	0.007708383
BICF2P1308862	[T/C]	22	58,373,667	35.40148666	0.007708383
BICF2G630650335	[T/C]	21	21,934,154	50.16119654	0.008187196
BICF2P1273761	[T/C]	9	50,522,350	35.05208596	0.008188733
BICF2G630589717	[A/G]	32	25,709,141	0.021053125	0.008425403
BICF2P20035	[A/G]	1	94,317,374	0.021053125	0.008425403
BICF2P392168	[T/C]	11	67,022,883	0.021053125	0.008425403
BICF2P699669	[A/G]	32	25,816,401	0.021053125	0.008425403
TIGRP2P151840_rs8674188	[T/C]	11	68,029,045	0.021053125	0.008425403
BICF2G630714678	[A/C]	1	21,415,718	0.021053125	0.008425403
BICF2G630714751	[T/A]	1	21,488,903	0.021053125	0.008425403
BICF2G630789412	[A/G]	1	97,978,078	0.021053125	0.008425403
BICF2G630789445	[A/C]	1	97,954,814	0.021053125	0.008425403

BICF2G630789455	[A/G]	1	97,927,079	0.021053125	0.008425403
BICF2G630789526	[T/C]	1	97,889,445	0.021053125	0.008425403
BICF2G630789598	[T/C]	1	97,754,887	0.021053125	0.008425403
BICF2G630790511	[C/G]	1	95,924,191	0.021053125	0.008425403
BICF2P1017660	[T/C]	1	97,142,777	0.021053125	0.008425403
BICF2P1043423	[A/C]	1	96,750,162	0.021053125	0.008425403
BICF2P1047836	[A/G]	32	38,121,349	0.021053125	0.008425403
BICF2P1068000	[A/G]	1	103,588,996	0.021053125	0.008425403
BICF2P1074699	[A/G]	1	96,787,084	0.021053125	0.008425403
BICF2P1111957	[A/C]	1	96,769,118	0.021053125	0.008425403
BICF2P1144419	[A/G]	1	103,573,646	0.021053125	0.008425403
BICF2P1176015	[A/G]	1	97,693,478	0.021053125	0.008425403
BICF2P1199727	[C/G]	1	104,182,961	0.021053125	0.008425403
BICF2P1215752	[A/G]	1	105,479,168	0.021053125	0.008425403
BICF2P1275438	[A/G]	1	103,713,750	0.021053125	0.008425403
BICF2P1282290	[A/C]	1	104,023,838	0.021053125	0.008425403
BICF2P1285465	[A/C]	1	98,505,107	0.021053125	0.008425403
BICF2P1303515	[A/G]	1	104,065,686	0.021053125	0.008425403
BICF2P1310036	[A/G]	1	104,052,282	0.021053125	0.008425403
BICF2P1310039	[C/G]	1	104,051,687	0.021053125	0.008425403
BICF2P1354388	[A/C]	16	42,319,063	0.021053125	0.008425403
BICF2P1356685	[G/C]	1	104,034,747	0.021053125	0.008425403
BICF2P155605	[T/C]	1	96,699,396	0.021053125	0.008425403
BICF2P219458	[A/G]	1	104,135,762	0.021053125	0.008425403
BICF2P226585	[T/G]	1	103,747,421	0.021053125	0.008425403
BICF2P370744	[T/C]	1	103,873,619	0.021053125	0.008425403
BICF2P405129	[T/A]	1	104,147,726	0.021053125	0.008425403
BICF2P454465	[A/C]	1	103,735,517	0.021053125	0.008425403
BICF2P472059	[T/C]	1	103,415,221	0.021053125	0.008425403
BICF2P472180	[A/C]	1	105,325,426	0.021053125	0.008425403
BICF2P485283	[T/C]	1	104,220,693	0.021053125	0.008425403
BICF2P598446	[T/G]	1	103,653,250	0.021053125	0.008425403
BICF2P609790	[T/C]	1	104,164,856	0.021053125	0.008425403
BICF2P617257	[T/C]	1	97,153,398	0.021053125	0.008425403
BICF2P617358	[A/C]	1	91,428,958	0.021053125	0.008425403
BICF2P662068	[A/G]	1	104,128,695	0.021053125	0.008425403
BICF2P662070	[A/G]	1	104,127,220	0.021053125	0.008425403
BICF2P694273	[T/C]	1	104,154,530	0.021053125	0.008425403
BICF2P812267	[A/G]	1	97,764,455	0.021053125	0.008425403
BICF2P836557	[A/C]	1	103,937,894	0.021053125	0.008425403
BICF2P858661	[A/C]	1	104,191,350	0.021053125	0.008425403
BICF2P864589	[A/G]	32	38,008,281	0.021053125	0.008425403

BICF2P886580	[A/G]	1	103,380,529	0.021053125	0.008425403
BICF2P88860	[A/G]	1	104,089,480	0.021053125	0.008425403
BICF2P957124	[A/G]	1	96,775,475	0.021053125	0.008425403
BICF2P960982	[T/C]	1	104,208,642	0.021053125	0.008425403
BICF2S22930407	[A/G]	1	106,627,516	0.021053125	0.008425403
BICF2S22931066	[A/G]	1	103,815,650	0.021053125	0.008425403
BICF2S2296700	[T/C]	1	104,119,246	0.021053125	0.008425403
BICF2S23149945	[T/C]	1	104,175,521	0.021053125	0.008425403
BICF2S23158876	[T/C]	1	104,236,253	0.021053125	0.008425403
BICF2S23255562	[A/G]	1	101,174,646	0.021053125	0.008425403
BICF2S23414183	[A/G]	1	104,233,883	0.021053125	0.008425403
BICF2S23441791	[T/C]	23	48,842,315	0.021053125	0.008425403
BICF2S23441814	[A/G]	1	104,016,369	0.021053125	0.008425403
BICF2S23453593	[T/C]	1	103,924,782	0.021053125	0.008425403
BICF2S2359858	[A/G]	1	104,290,707	0.021053125	0.008425403
BICF2S23657961	[T/C]	1	101,109,172	0.021053125	0.008425403
BICF2S23732602	[T/C]	1	101,146,665	0.021053125	0.008425403
BICF2S23735739	[A/G]	1	21,390,995	0.021053125	0.008425403
BICF2S23754080	[T/C]	1	21,359,420	0.021053125	0.008425403
TIGRP2P12382_rs8840648	[A/G]	1	91,404,745	0.021053125	0.008425403
BICF2P408362	[T/C]	23	38,548,831	0.030527806	0.008494332
TIGRP2P240493_rs8663167	[T/C]	18	19,328,399	0.030527806	0.008494332
BICF2P23499	[A/C]	35	13,542,586	33.39631395	0.008512691
BICF2S23545490	[A/G]	35	13,550,578	33.39631395	0.008512691
BICF2S23616918	[A/C]	38	7,410,368	33.39631395	0.008512691
BICF2P461192	[A/C]	21	53,713,077	33.39631395	0.008512691
TIGRP2P217966_rs9237882	[A/G]	16	49,208,348	43.26476844	0.008746572
BICF2P351067	[T/C]	38	7,335,821	0.021432422	0.008764764
BICF2G630454275	[A/G]	34	34,273,978	29.5056409	0.009089257
BICF2G630521293	[T/C]	14	13,856,276	32.22783515	0.009301102
BICF2P737374	[T/C]	9	45,148,023	32.22783515	0.009301102
BICF2P532665	[T/C]	22	46,313,563	32.44522985	0.009324241
BICF2G630641156	[A/C]	21	50,087,027	31.17708647	0.009467843
BICF2P931370	[T/G]	11	45,765,479	0.032409375	0.009934079
BICF2S23057479	[A/C]	2	69,345,721	0.032409375	0.009934079
G198f10S176	[T/C]	2	69,363,795	0.032409375	0.009934079
BICF2G630113704	[A/G]	16	34,704,538	42.79486065	0.009999492
BICF2G630113706	[A/C]	16	34,705,298	42.79486065	0.009999492

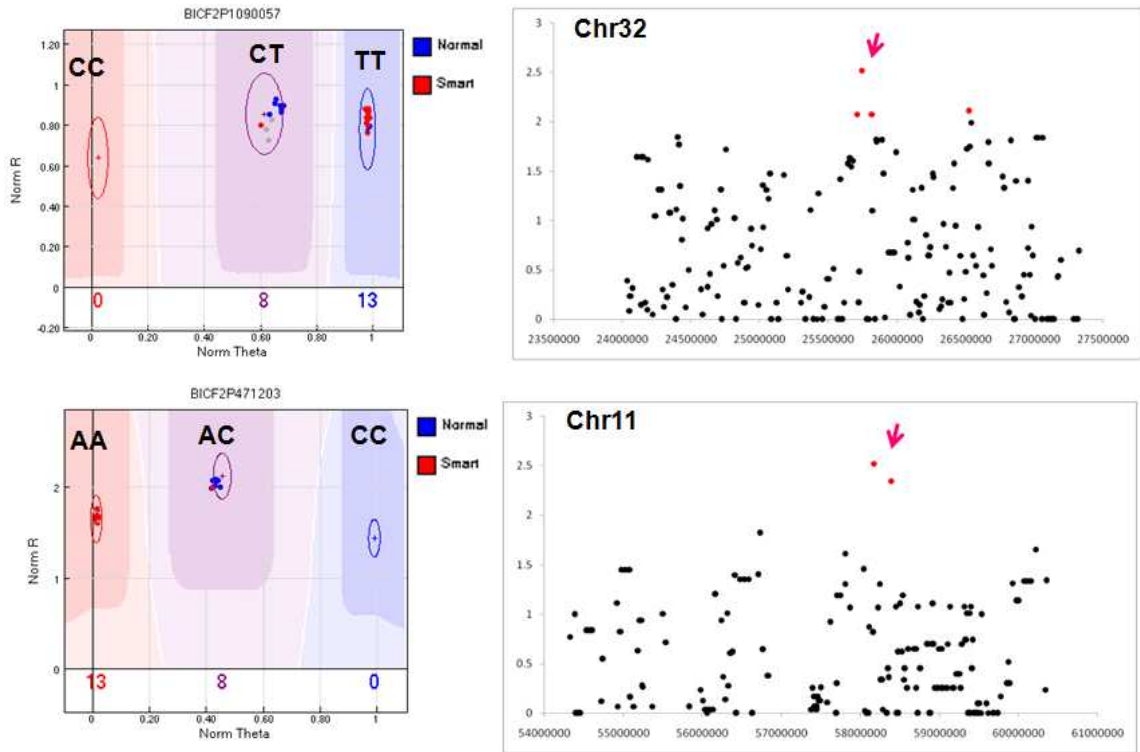


그림 16 검역탐지건의 유전학적 지표 예제

(다) 우수 검역탐지건 선발을 위한 유전학적 지표 CNV marker의 발굴

아래 그림은 검역탐지건의 유전학적 지표 발굴 분석 방법을 나타내었다. 앞서 기술된 분석 기준 하에서, 96개의 CNV를 발굴할 수 있었다. 이 중, 26 CNV는 copy gain이었으며, 70 CNV는 copy loss였다. 각 샘플의 평균 CNV 개수는 4.6개로, 적게는 1개의 CNV에서 많게는 10개의 CNV를 갖는 샘플이 있는 것으로 확인되었다. 발굴된 CNV의 평균 크기는 5.1Mb였다. 아래 표에 각 샘플별 검출된 CNV의 개수를 표시하였다.

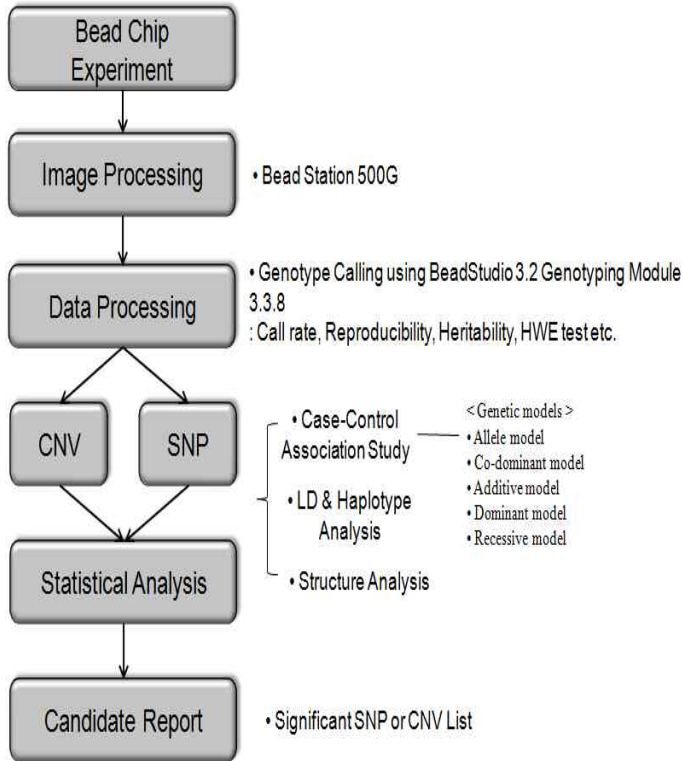


그림 17 SNP와 CNV를 이용한 우수 검역탐지건 마커 발굴 방법

발굴된 96개의 CNV를 대상으로 CNVR을 계산하였으며, CNVR에 대해 multiple logistic regression을 수행하여 우수 검역탐지건 그룹과 일반 비글 그룹간의 association test를 하였다. 그 결과 24개의 CNVR을 얻을 수 있었으며, 우수검역탐지건 그룹과 일반 비글 그룹간의 유의한 CNV marker는 발굴할 수 없었다. 아래 그림에 가장 낮은 p 값을 갖는 14번 염색체의 copy loss를 나타내었다. 이 구역의 p 값은 0.14였으며, Odds값은 6.0이었다.

본 연구에 사용한 CanineHD BeadChip은 SNP를 보기 위해 디자인 된 플랫폼이며, human SNP array에 비해 낮은 probe가 집적되어 있다. 이러한 문제 때문에 발굴된 CNV의 개수가 적었으며, 결과적으로 통계적으로 유의한 CNV 지표를 발굴하는데 어려움이 있다고 판단된다.

표 22 샘플별 검출된 CNV 개수

Sample_ID	Gain	Loss
EX02	0	1
EX01	1	2
EX04	0	3
EX08	0	3
EX03	1	3
EX13	0	4
EX06	3	2
EX07	3	2
EX09	0	6
EX10	0	6
EX05	5	2
EX11	5	3
EX12	0	8
NE05	0	1
NE12	0	2
NE01	0	3
NE04	1	2
NE09	2	1
NE07	2	3
NE03	2	4
NE02	1	9

표 23 CNVR list and CNV association test

CNVR ID	Chr	Start	End	Size	Freq. (Control)	Freq. (Case)	Description	p value	Odds Ratio
CNVR_loss_6	14	5,286,019	5,837,459	551,441	1	6	loss	0.136359	6.044137
CNVR_loss_5	9	39,512,583	39,778,734	266,152	1	5	loss	0.227409	4.324875
CNVR_loss_1 2	27	28,672,504	28,932,492	259,989	2	1	loss	0.287917	0.242839
CNVR_loss_3	8	76,248,908	77,315,194	1,066,287	2	1	loss	0.311344	0.25
CNVR_gain_9	X	99,744,793	103,231,473	3,486,681	1	3	gain	0.547351	3
CNVR_gain_4	23	23,610,202	23,815,705	205,504	1	1	gain	0.757899	0.625
CNVR_gain_2	6	48,184,776	50,193,142	2,008,367	1	2	gain	0.792751	1.428571
CNVR_loss_1 0	X	35,925,934	48,498,895	12,572,962	1	2	loss	0.792751	1.428571
CNVR_loss_9	X	10,792,313	32,800,391	22,008,079	3	4	loss	0.832758	0.8
CNVR_loss_2	7	16,134,312	16,373,079	238,768	1	2	loss	0.926391	1.138122
CNVR_loss_1 3	27	34,855,079	34,936,243	81,165	1	0	loss	0.994031	1.60E-08
CNVR_gain_3	15	12,021,089	12,445,846	424,758	1	0	gain	0.994296	3.55E-08
CNVR_gain_1	5	81,316,137	81,499,682	183,546	1	0	gain	0.994296	3.55E-08
CNVR_loss_8	21	51,488,105	51,599,979	111,875	0	1	loss	0.994587	11738521
CNVR_loss_1	1	14,376,663	15,084,664	708,002	0	1	loss	0.994587	11738521
CNVR_loss_1 5	32	37,659,882	37,947,451	287,570	0	1	loss	0.994587	11738521
CNVR_loss_1 4	31	7,288,596	7,598,900	310,305	0	1	loss	0.994587	11738521
CNVR_loss_4	9	19,832,516	21,549,201	1,716,686	0	1	loss	0.994587	11738521
CNVR_loss_7	19	22,915,033	23,129,230	214,198	0	1	loss	0.994626	10434241
CNVR_gain_7	X	78,848,727	82,341,279	3,492,553	0	1	gain	0.994626	10434241
CNVR_gain_8	X	96,863,938	97,728,798	864,861	0	1	gain	0.994626	10434241
CNVR_gain_6	X	60,223,238	77,438,645	17,215,408	2	3	gain	0.994626	9.58E-08
CNVR_gain_5	X	26,446,519	28,229,484	1,782,966	0	2	gain	0.99499	42544812
CNVR_loss_1 1	X	62,810,957	120,719,702	57,908,746	6	12	loss	0.995919	2.31E+08

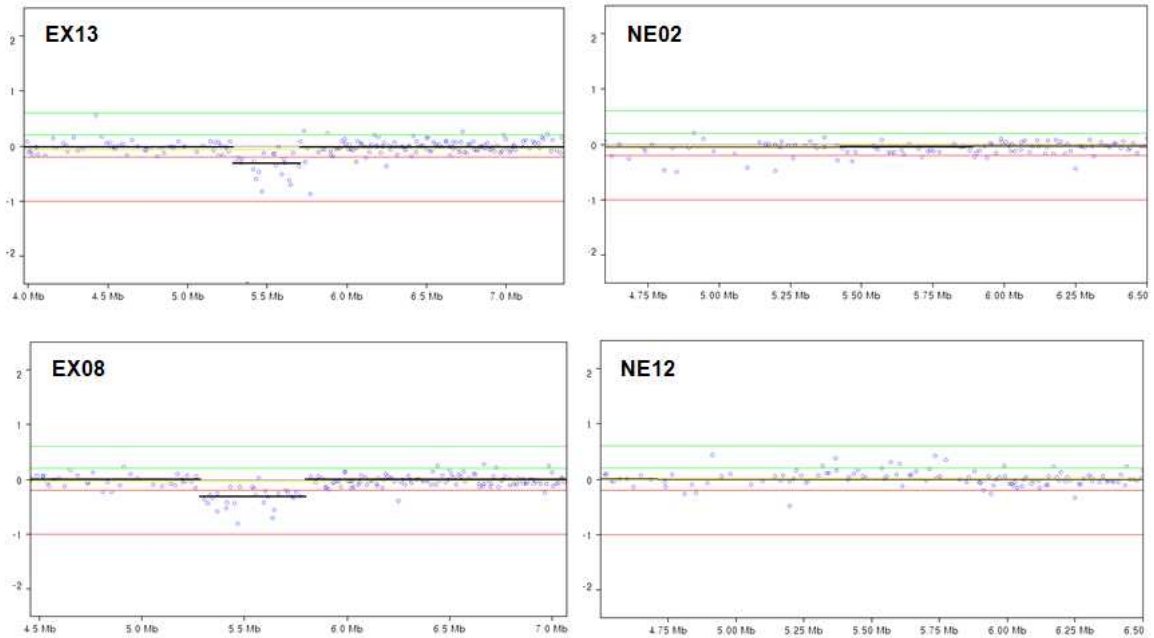


그림 18 chr14:5286019-5837459의 예제. EX13과 EX08은 우수검역탐지그룹에 속한 샘플이며, copy loss가 검출되었다. NE02와 NE12는 일반 비글 그룹에 속한 샘플로, 동일한 genomic region에 copy의 변화가 검출되지 않았다.

2. 검역탐지건의 형태학적 평가 위한 객관적 지표 제시

가. Nose printing과 분석

(1) 연구수행 방법

stamping을 이용하여 각 개체별 nose print를 획득하고 분석한다. nose print은 다음과 같은 과정으로 획득했다. 먼저, 잉크를 묻히기 전에 휴지로 코를 닦아 물기를 없앤 후, 잉크 패드를 이용해 잉크를 코에 바른다. 그 후, 종이를 잉크가 묻은 코에 잘 눌러 nose print를 획득한다. nose print의 분석은 특정한 부위에서 패턴을 비교함으로써 이루어졌다.

(2) 연구수행 결과

(가) 복제견 비문(Nasal printing) 비교

복제견의 코에서 비문(Nasal printing)을 확보하기 위해 소에서 비문을 채취 방법 및 비교 방법 (W. E. Petersen, 1921)을 참고 하였다. 스탬프 잉크를 비문에 바른 다음 흰색 종이에 프린팅 한다음 서 비문의 동일성 여부를 비교하였다. 이용한 비문 비교 결과는 아래와 같으며, **복제견에서 비문은 개체별 다양성을 보이는 것으로 판단**되었

고 비문의 복제는 관찰되지 않았다.

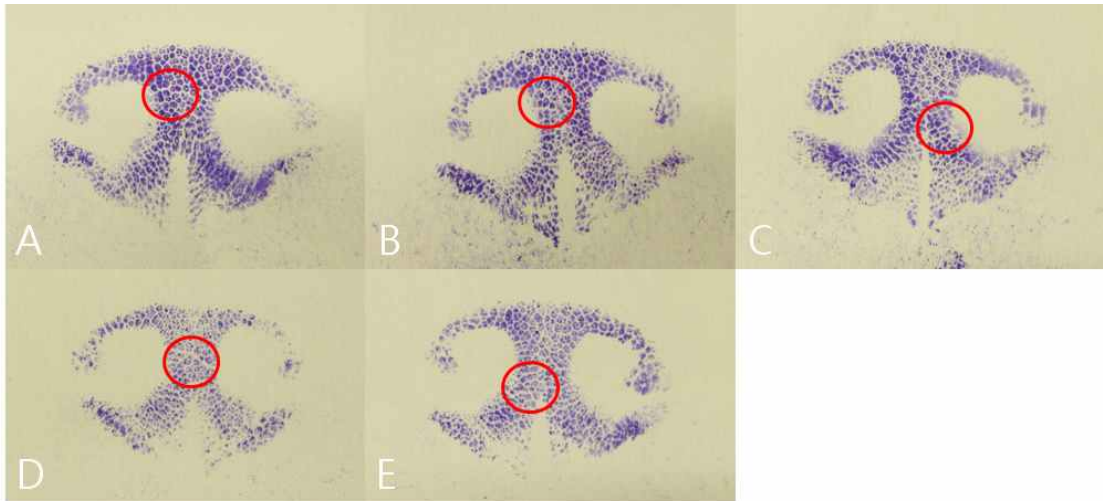


그림 19 복제건의 비문. (A) Magic; (B) RFP1; (C) RFP2; (D) RFP3; (E) RFP5.

나. 두부 및 비강 CT 촬영 프로토콜 확립 및 CT와 방사선 촬영

(1) 연구수행 방법

다양한 밀도의 조직으로 구성되어 있는 두부와 비강 구조의 CT 영상 최적화를 위한 촬영 자세 및 조건을 확립하기 위하여 동일한 조건하 일반 비글견, 형질전환 복제견, 비복제 탐지견의 CT 및 방사선 촬영을 실시하였다. 최적화된 CT 프로토콜을 확립하기 위해 수의 컴퓨터 단층 촬영 교재 (Veterinary computed tomography, 1st edition) 를 참고하여 몇 차례의 실험적인 촬영을 진행하였다.

(2) 연구수행 결과

최종적으로 확립된 CT 프로토콜은 다음과 같다. CT (LightSpeed Plus, GE Medical System, LLC, 미국) 촬영 중에는 1.5-2% isoflurane (Foran® solution, Choongwae pharma Co., Seoul, Korea)을 이용하여 호흡 마취를 유지하며, 마취 유도를 위해 6 mg/kg 의 용량의 propofol (Anepol® injection, Hana Pharma Co., Hwasung, Korea)이 정맥주사로 투여한다. Scout를 제외하고 뼈 구조물의 세밀한 영상화를 위해 Head protocol의 bone level로의 촬영과 조영 전후의 standard level로 각각 한 번씩 촬영하여 총 3회 촬영을 진행한다. 두부와 비강에 대한 방사선 촬영은 right lateral projection과 dorsoventral projection으로 촬영하며, 마취나 진정 없이 진행한다.

다. 방사선 및 CT 영상의 두부 및 비강 구조의 비교 지표 확립 및 분석

(1) 연구수행 방법

(가) 프로토콜에 따라 획득한 방사선과 CT 영상을 통해 유전학적 유사성과 후각과 관련된 두부 및 비강 구조의 분석을 위해 영상학적 지표를 설정하였다. 먼저, 유전학적 유사성을 분석하기 위한 지표로 방사선 영상과 CT 영상에서 비교하기 쉬운 해부학적 구조를 지정하였다. CT 영상에서는 기본적인 transverse view뿐만 아니라 재구성을 통해 dorsal 및 sagittal view를 획득하여 삼차원적인 지표를 지정하고 측정하였다. 그리고 후각과 관련하여 참고 논문(Craven et al, 2009, J Biomech Eng)에 따라 CT 영상에서 후각과 관련되어 있는 해부학적인 지표를 설정하고 영상의 VR rendering 재구성을 통해 자세에 따른 오차를 최소화하여 측정하였다. 영상에서 측정된 결과는 개체별, 그룹별로 비교 분석되었다.

(나) 복제견 X-ray, CT 촬영

복제견의 비강 구조를 비교하기 위해 영상 진단 장비인 X-ray(Titan 2000M, Comed, 한국)와 CT(LightSpeed Plus, GE Medical System, LLC, 미국)를 이용하여 비강 부위를 촬영하였다. X-ray는 마취하지 않고 촬영하였으며, CT 촬영은 전신 마취하에 실시하였다.

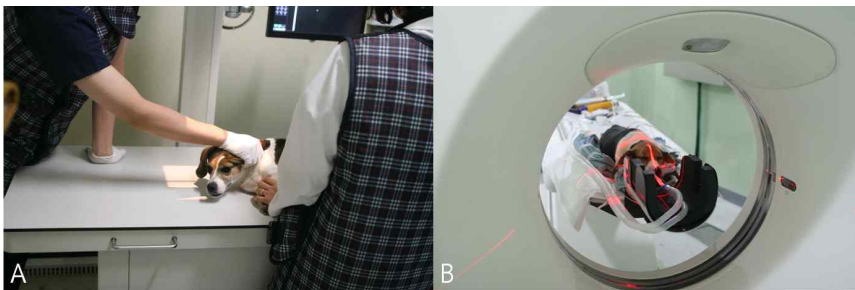


그림 20 (A) X-ray 촬영; (B) CT 촬영.

(다) 후각 관련 해부학적 구조물 설정

개의 후각 예민함은 비강 내 공기흐름과 관련된 해부학적 구조물이 냄새 물질의 이동과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다 (Craven et al, 2009, J Biomech Eng). 후각 공기 흐름의 유입은 콧구멍의 움직임과 관계가 있으며, 인위적으로 조작하였을 때 공기 유입량이 달라진다 (Craven et al, 2009, J Biomech Eng). 그리고 후각 공기흐름은 nasopharynx를 통해 일어난다 (Craven et al, 2009, J Biomech Eng). 이러한 내용을 토대로 하여 후각 기능과 관련된 구조물을 설정하고 이에 대한 정량적인 평가를 수행하였다.

비강 내 공기 유입과 관련된 부위로 nose entrance, 공기 유출과 관련된 부위로 nasopharynx entrance, 공기의 흐름과 관련된 부위로 palatine bone length(PBL) 을 설정하고 각각의 길이 및 크기 비교를 통해서 차이점을 알아보고자 하였다. 그리고 skull의 크기와 Body length를 설정하여 control group과의 비교를 통해 skull의 크기 및 body length에 따른 비강 내 구조물의 크기 변화를 알아보고자 하였다. skull의 크기는 occipital tubulance에서 nasal tip까지의 길이로, body length는 sacrum의 caudal plate에서 dens of axis의 peak 부분을 설정하고 측정하였다. Head size와 Body length가 비슷한 control group을 설정하여 CT 이미지를 촬영하였다. Control group 역시 비강내의 후각 관련 구조물인 nose entrance, nasopharynx entrance, palatine bone의 길이 및 크기 비교하였다.

(라) 복제견 비강의 해부학적 구조 복제 여부를 비교하기 위한 해부학적 구조 지표 설정
복제견의 X-ray 촬영후, Occipital tubulance에서 Mandible symphysis까지의 길이를 측정하여 비교하였다.

CT의 경우, 비강의 구조를 입체적으로 비교할 수 있는 부분인 Frontal sinus volume, Nasal cavity length, Maxillary sinus volume을 비교하였다.

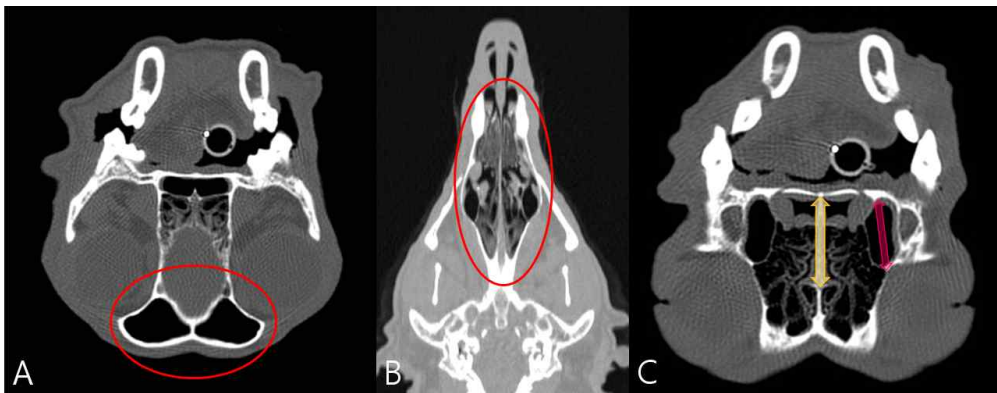


그림 21 비강 구조 비교 지표. (A) Frontal sinus volume; (B) Nasal cavity length (C) Maxilla sinus volume



그림 22 X-ray에서 Head size 비교. (A) Magic; (B) RFP1; (C) RFP2; (D) RFP3; (E) RFP5

(2) 연구수행 결과

(가) X-ray 영상 및 CT 영상 비교 결과

X-ray영상에서 설정된 지표와 CT에서 설정된 지표를 각각 비교하였다. X-ray에서 비교한 길이와 CT에서 비교한 크기 모두 복제견 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

표 24 Occipital tubercle에서 mandible symphysis 길이의 X-ray 분석 결과

단위: mm					
		Control (n=5)		Clone (n=5)	
		mean ± SD	Kurtosis	mean ± SD	Kurtosis
length from occipital tubercle to mandible symphysis		1091.61 ± 32.87	0.226	1064.14 ± 28.58	0.587

표 25 Frontal sinus 및 Nasal cavity에 대한 CT 영상 분석결과

	Control (n=5)		Clone (n=5)	
	mean ± SD	Kurtosis	mean ± SD	Kurtosis
Left frontal sinus (cm ³)	1.10 ± 0.35*	0.80	1.05 ± 0.29	-0.74
Right frontal sinus (cm ³)	1.07 ± 0.31*	2.21	1.09 ± 0.26*	-1.14
Left Maxilla sinus (cm ³)	0.54 ± 0.10	0.48	0.65 ± 0.07*	0.61
Right Maxilla sinus (cm ³)	0.59 ± 0.07	0.75	0.71 ± 0.12*	-0.74
Nasal cavity (mm)	71.84 ± 0.67*	3.02	73.90 ± 1.04	2.36

*, significantly different with parent (P<0.05).

복제견의 비문을 비교한 결과, 비문은 복제되지 않았지만 X-ray와 CT의 영상을 분석한 결과는, 각각의 구조물에 있어서 통계학적 차이를 나타내지 않지만 표준편차가 커서 복제견의 크와 관련된 해부학적 구조물은 복제와 관련성을 연관 짓기는 어렵다고 판단된다.

(나) 복제견 group과 control group의 비강 내 흡입공기 이동 통로에 대한 해부학적 구조물 분석 결과

X-ray 같은 이차원적 분석에서의 한계를 보완하기 위해 CT를 이용한 3차원적 분석을 통해 정확도를 높이하고자 하였다. 모든 이미지는 CT의 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 측정되었다. CT 이미지 분석을 통한 **복제견 group 및 대조군의 비강 내 해부학적 구조물의 크기 및 길이를 측정하고, 통계 분석 (기술 통계 및 T-test)한 결과 유의적인 차이를 보이지 않았다.**

표 26 후각관련 해부학적 구조물에 대한 CT 영상 분석결과

	Control (n=5)		Clone (n=5)	
	mean ± SD	Kurtosis	mean ± SD	Kurtosis
PBL	57.70 ± 1.33	-2.42	57.44 ± 1.17*	-0.03
Nose entrance	14.74 ± 1.77	-2.58	13.76 ± 0.31	3.75
Nasopharynx entrance	14.82 ± 1.12	-2.35	15.64 ± 0.85	-2.21
Head size	154.54 ± 3.25	1.06	155.8 ± 1.71	-3.09
Body length	432.76 ± 10.90	-1.16	438.86 ± 7.30	-1.61

PBL, palatine bone length; *, significantly different with parent (P<0.05).

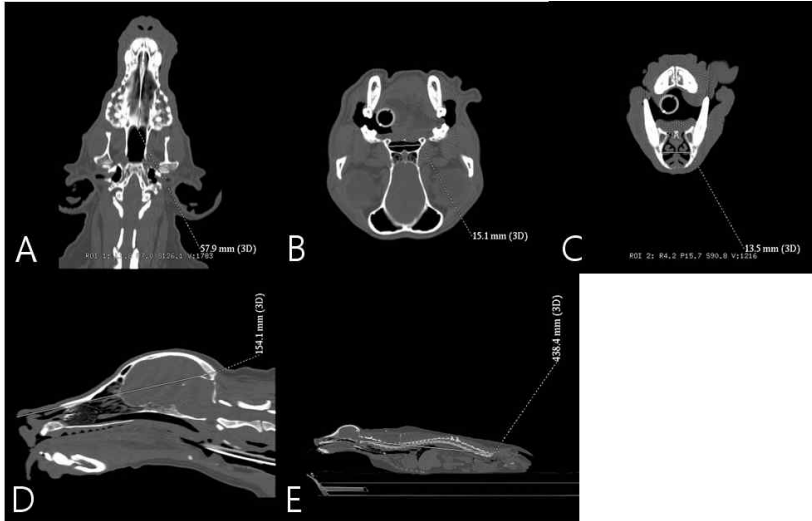


그림 23 후각 관련 해부학적 구조물. (A) Palatine bone length; (B) Nasopharynx entrance; (C) Nose size; (D) Head size; (E) Body length

3. 검역탐지견의 행동학적 평가 위한 객관적 지표 제시

가. 유견 시절 행동평가를 위한 평가 프로토콜 작성 및 분석 기준 제시

(1) 연구수행 방법

유견 적성 평가 (Puppy Aptitude Test)는 유견이 6-8주령일 때 진행하며 검역탐지견 센터의 평가법을 기본으로 하여 (Bartlett, 1979, Am Kennel Gazette)의 유견 적성 평가, 캠벨 테스트를 참고로 하였다. 평가방법은 각각의 하위 평가는 30초로 이루어지며 유견과 초면인 사람이 평가 진행자로 실시한다. 평가도구에는 캠코더, 평가지, 종이공, 금속판, 타월, 끈이 필요하다. 평가를 진행하며 1차로 점수를 체크하고 평가 후 토론을 통해(녹화한 영상 확인) 재평가한다. 세부 하위 평가로는 1. 사회적 친화도 (Social attraction), 2. 따르기 (Following), 3. 구속 (Restraint), 4. 사회적 우위성 (Social dominance), 5. 거상 우위성 (Elevation dominance), 6. 회수 능력 (Retrieving), 7. 촉각 민감성(Touch sensitivity), 8. 청각 민감성 (Sound sensitivity), 9. 시각 민감성 (Sight sensitivity), 10. 안정성 (Stability)이 있으며 하위 평가의 방법과 평가 기준은 다음과 같다.

(가) 사회적 친화도 (Social attraction)

- 평가 방법 : 강아지를 테스트 장소에 데리고 간 다음 5분 정도 혼자 둔다. 실험자는 들어가 강아지를 구슬려서 가까이 오게 한 다음 무릎을 꿇고 가볍게 만져준다.
- 평가 기준
 - ① 기꺼이 꼬리를 세우고 평가자에게 뛰어오르며 손을 물기도 한다.

- ② 기꺼이 꼬리를 세우고 평가자에게 뛰어오며 앞발로 손을 건드리기도 하고 활기도 한다.
- ③ 꼬리를 세우고 기꺼이 온다. (꼬리를 수평 이상으로)
- ④ 꼬리를 내리고 기꺼이 온다.
- ⑤ 꼬리를 내리고 주저하며 온다.
- ⑥ 전혀 오지 않는다.

(나) 따르기 (Following)

- 평가 방법 : 평상시 태도로 일어서서 강아지로부터 멀어진다. 강아지가 평가자가 걸어가는 모습을 보게 한다.
- 평가 기준
 - ① 꼬리를 세우고 기꺼이 따라가며 다리 밑으로 들어가기도 하고 물기도 한다.
 - ② 꼬리를 세우고 기꺼이 따라가며 다리 밑으로 들어가기도 한다.
 - ③ 꼬리를 세우고 기꺼이 따라간다.
 - ④ 꼬리를 내리고 기꺼이 따라간다.
 - ⑤ 꼬리를 내리고 주저하며 따라간다.
 - ⑥ 따라가지 않고 도망간다.

(다) 구속 (Restraint)

- 평가 방법 : 웅크리고 앉아서 부드럽게 강아지를 눌힌 다음 한쪽 손으로 30초간 누르고 있다. (지속적으로 눈을 맞춘다.)
- 평가 기준
 - ① 격렬하게 저항하고 몸을 움직이며 문다.
 - ② 격렬하게 저항하고 몸을 움직인다.
 - ③ 진정과 저항을 반복하고, 몇 초간 눈을 마주치면 곧 진정한다.
 - ④ 저항한 다음 진정된다.
 - ⑤ 저항하지 않고 눈을 맞추지 않는다.
 - ⑥ 저항하지 않고 눈을 맞추지 않으려 애쓴다.

(라) 사회적 우위성 (Social dominance)

- 평가 방법 : 강아지를 세워놓고 평가자는 그 옆에 앉아 머리에서 등까지 부드럽게 쓰다듬는다. 인식할 수 있는 행동이 나올 때까지 계속 쓰다듬는다.
- 평가 기준
 - ① 뛰어올라서 앞발로 긁고 물고 으르렁거린다.
 - ② 뛰어오르고 앞발로 긁는다.

- ③ 평가자에게 기대고 얼굴을 훑으려 한다.
- ④ 몸을 꿈틀대며 손을 훑으려 한다.
- ⑤ 데굴데굴 구르고 손을 훑으려 한다.
- ⑥ 멀리 떨어져 도망간다.

(마) 거상 우위성 (Elevation dominance)

- 평가 방법 : 허리를 숙이고 강아지를 복부 쪽으로 굽혀 손가락을 교차시키고 손바닥으로 강아지를 받치고 땅에서 잠깐 멀어지도록 강아지를 든다. 그 자세를 30 초 동안 유지한다.
- 평가 기준
 - ① 격렬하게 저항하고 으르렁거리고 문다.
 - ② 격렬하게 저항한다.
 - ③ 저항과 진정을 반복한다.
 - ④ 저항 없이 편안하다.
 - ⑤ 저항 없이 몸이 뻗뻗하다.
 - ⑥ 저항 없이 굳어져 있다. (얼어 있다.)

(바) 회수 능력 (Retrieving)

- 평가 방법 : 강아지 옆에서 몸을 숙이고 쭈글쭈글한 종이공으로 주의를 끈다. 강아지가 관심을 표명할 때, 공을 보여주면서 1~2 떨어진 곳으로 공을 굴린다.
- 평가 기준
 - ① 물체를 쫓아가고 물체를 잡아서 도망간다.
 - ② 물체를 쫓아가고 물체를 가지고 놀지만 오지는 않는다.
 - ③ 물체를 쫓아가고 실험자에게 물체를 가지고 온다.
 - ④ 물체를 쫓아가지만 물체 없이 실험자에게 되돌아 온다.
 - ⑤ 물체를 쫓기는 하지만 곧 흥미를 잃어 버린다.
 - ⑥ 물체를 쫓지 않는다.

(사) 촉각 민감성 (Touch sensitivity)

- 평가 방법 : 강아지의 한쪽 앞발을 들어 엄지와 손가락 사이에 발을 위치시킨다. 발가락 사이를 가볍게 문지른 후 반응이 있을 때까지 강도를 세게 한다. 반응이 있을 때까지 실험자는 천천히 10까지 센다.
- 강아지가 발을 빼거나 불안한 기색을 보이면 바로 중단한다.
- 평가 기준
 - ① 반응까지 9~10초

- ② 반응까지 7~8초
- ③ 반응까지 5~6초
- ④ 반응까지 3~4초
- ⑤ 반응까지 1~2초

(아) 청각 민감성 (Sound sensitivity)

- 평가 방법 : 강아지를 평가 장소에 데리고 간다. 강아지로부터 몇 미터 떨어진 곳에서 날카로운 소음을 낸다.
- 평가 기준
 - ① 듣고 소리의 위치를 찾으려 하며, 짖으며 걸어간다.
 - ② 듣고 소리의 위치를 찾고 짖는다.
 - ③ 듣고 소리의 위치를 찾아서 쳐다보며 호기심을 보이며, 소리가 나는 방향으로 걸어간다.
 - ④ 듣고 소리의 위치를 찾는다. 두리번거린다.
 - ⑤ 당황해하며 뒤로 물러서서 숨는다.
 - ⑥ 소리를 무시하고 어떠한 관심도 보이지 않는다.

(자) 시각 민감성 (Sight sensitivity)

- 평가 방법 : 강아지를 평가 장소 중앙에 위치하게 한다. 큰 타월에 실을 묶어서 강아지로부터 몇 미터 떨어진 곳에서 타월을 이리저리 움직인다.
- 평가 기준
 - ① (꼬리를 세우고) 보고 공격하고 문다.
 - ② 보고, 짖고, 꼬리를 세운다.
 - ③ 호기심을 가지고 보고 조사하려고 한다.
 - ④ 보고, 짖고, 꼬리를 내린다.
 - ⑤ 도망가서 숨는다.

(차) 안정성 (Stability)

- 평가 방법 : 강아지의 1.5m 정도 떨어진 곳에서 우산을 펼쳤다가 부드럽게 땅에 내려 놓는다.
- 평가 기준
 - ① 보고 우산으로 달려들어, 입질을 하거나 문다.
 - ② 보고 우산으로 걸어가서, 조심스럽게 냄새를 맡는다.
 - ③ 보고 조사하려고 한다.
 - ④ 앉아서 보지만 우산 앞으로 가지는 않는다.

- ⑤ 우산으로부터 도망간다.
- ⑥ 흥미를 보이지 않는다.

(2) 연구수행 결과 분석

(가) 유견적성평가의 결과해석 및 1차년도 복제 산자에의 적용 결과

생후 9주령 3두와 10주령 1두를 이용하여 본 과제에서 작성한 방법으로 1차 유견 적성 평가를 실시하였다. 또한 연령별 비교를 위하여 2차 유견 적성 평가를 16주령에 맞춰 실시하였다. 최종 선발 결과와의 연계성을 볼 때 9주령의 적성 평가가 최종 결과와 더 유사하게 나타난다. 따라서 본 평가는 16주령보다 9주령에 실시하기 더 적합하다고 여겨지며, 향후 복제견 평가의 경우 문헌에 표기된 6~8주령 (7주령이 가장 적절함) 평가를 진행할 예정이다. 4마리의 유견은 1차년도 연구과제를 위해 성견이 될 때까지 지속적으로 평가받고 그 결과로 본 과제에서 도출되어진 평가방법의 지표 가능성을 검증하는데 이용되었다. 앞으로 이 4마리의 결과를 통해 도출된 기준으로 복제견 3두 역시 동일한 방법으로 적용한다. 유견평가결과로부터 Type 1~6으로 결과를 해석한다. 그 방법은 다음과 같다. 전형적인 PAT;Puppy Aptitude Test 해석과 탐지견훈련센터 평가매뉴얼을 참조하였다 (Bartlett, 1979, Am Kennel Gazette).

① 대부분이 1번(Type I)

극단적으로 우위성을 보이며 공격적인 경향을 가지고 있음. 재빠르게 물고 일반적으로 어린이나 노인들에게는 좋지 않은 것으로 간주됨. 촉각 민감성에서 1번과 2번이 조합되었을 때에는 훈련이 어려움. 경험이 있는 훈련사에게 적합하기 보다는 훈련사가 강력한 리더쉽을 보여 주어야만 함.

② 대부분이 2번(Type II)

우위성이 있으며 갑자기 물 수도 있음. 어른이 키워야 하며 일관적이면서 숙련된 핸들링에 잘 반응함. 일단 사람을 리더로 인식하면 매우 충성스러운 개가 되는 경향이 있음. 매우 쾌활하고 즐거운 기질임 : 노인에게는 너무 활동적이고 작은 어린이에게는 매우 우위성이 강함.(기능견으로 적합)

③ 대부분이 3번(Type III)

이 개는 사람을 리더로 쉽게 받아들임. 보통의 주인에게 최고의 개이며 비록 너무 활동적인 경향이 있기는 하지만 모든 상황에 잘 적응하고 어린이나 노인과도 일반적으로 잘 지냄. 복종 훈련에 매우 잘 반응하고 일반적으로 생명체에 잘 적응함. (기능견으로 적합)

④ 대부분이 4번(Type IV)

이 개는 복종적이며 대부분의 주인에게 잘 적응함. 약간 내성적이며 대부분 3번을

받은 개 보다는 덜 활동적임. 어린이와 잘 지내며 일반적으로 훈련에도 소질이 있음.

⑤ 대부분이 5번(Type V)

이 개는 극단적으로 복종적이며 자신감을 확립하고 본인의 보금자리에서 데리고 나가는데 특별한 핸들링이 필요함. 변화와 혼란에 잘 적응하지 못하고 일반적인 보통 환경이 필요하다. 보통 어린이에게 안전하며 아주 스트레스를 받았을 경우에만 문다. 보통 잘 놀래고 새로운 경험을 받아들이는데에 매우 오랜 기간이 걸리므로 초심자에게 좋은 선택은 아님.

⑥ 대부분이 6번(Type VI)

이 개는 독립적임. 이 개는 다정다감하지 않고 쓰다듬는 것이나 귀여워해 주는 것을 싫어 함. 기능견으로 혹은 애완견으로 어떠한 관계를 성립하기 어려움. 관심을 강요하는 어린이에게 추천하지 않음; 초심자에게 적당한 개는 아님.

(나) 평가 결과

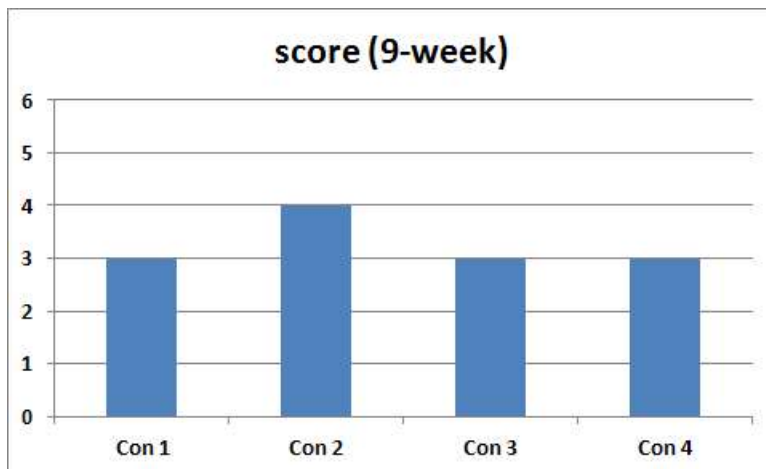


그림 24 후보 탐지견(유견)의 적성 평가 (PAT) 9주령

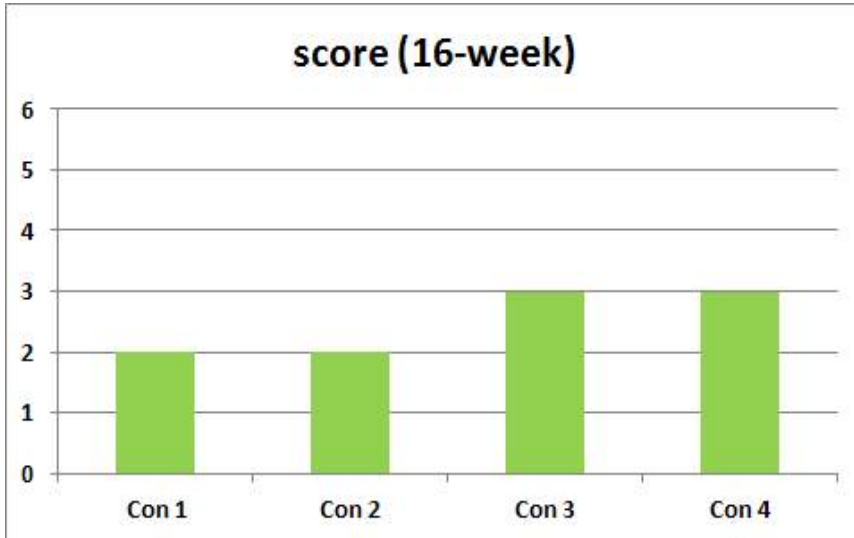


그림 25 후보 탐지견(유견)의 적성 평가 (PAT) 16주령

1번 대조군(2011.12.27)

- 2012.04.10(15주령) : 탐지견 자질평가(4형 우수)
- 2012.04.17(16주령) : Volhard Test 실시(2형)

2번, 3번, 4번 대조군(2012.01.05)

- 2012.04.10(14주령) : 탐지견 자질평가(4형 우수)
- 2012.04.26(16주령) : Volhard Test 실시(2형)

1번 대조군의 경우 10주령에 3형, 16주령에 2형으로 평가되었으며 2번 대조군은 각각 4형, 2형을, 3번과 4번 대조군은 2회의 평가에서 모두 3형을 받았다. 유견 적성 평가를 통해 1형~6형까지 어디에 속하는지를 구별하여, 우위성 정도를 파악할 수 있다. **이 평가의 결과는 훈련교관과의 관계 방향을 제시하며 향후 탐지 능력과의 상관관계를 비교분석하는 데에 용이**하도록 한다.

나. 자견 시절 행동평가를 위한 평가 프로토콜 작성 및 분석 기준 제시

(1) 연구수행 방법

평가 방법은 현장 훈련을 시작하는 6개월령에 보상 먹이 자극에 대한 반응, 환경 적응성, 사회성, 보행상태, 장애물에 대한 반응으로 나뉘어서 총 40항목을 평가하였다. 평가자는 검역탐지견센터 훈련교관, 훈련요원 등이 수행하였다.

구 분	평가 항목	불량	부족	보통	우수	매우우수
장애물에 대한 반응 (4항목)	◦ 수하물	1	2	3	4	5
	◦ 카트	1	2	3	4	5
	◦ 자연장애물	1	2	3	4	5
	◦ 기타	1	2	3	4	5

구 분	평가 항목	불량	부족	보통	우수	매우우수
보상턱이 자극에 대한 반응 (8항목)	◦ 손에 있는 먹이	1	2	3	4	5
	◦ 바닥에 있는 먹이	1	2	3	4	5
	◦ 수하물 바닥에 있는 먹이	1	2	3	4	5
	◦ 높은곳에 있는 먹이	1	2	3	4	5
	◦ 벨트에 있는 동안	1	2	3	4	5
	◦ 케로셀 주변	1	2	3	4	5
	◦ 긴장상태	1	2	3	4	5
	◦ 기타	1	2	3	4	5
	◦ 소 계 :					

환경 적응성 (16항목)	◦ 수하물 수레	1	2	3	4	5
	◦ 케로셀	1	2	3	4	5
	◦ 출입문	1	2	3	4	5
	◦ 생소한 새로운 지역	1	2	3	4	5
	◦ 목소리에 의한 칭찬 반응	1	2	3	4	5
	◦ 촉각 자극	1	2	3	4	5
	◦ 소리 자극	1	2	3	4	5
	◦ 소음, 소란스런 목소리	1	2	3	4	5
	◦ 생소한 개, 고양이	1	2	3	4	5
	◦ 용기, 크레이트	1	2	3	4	5
	◦ 가죽끈, 목걸이	1	2	3	4	5
	◦ 손에 의한 갑작스런 이동	1	2	3	4	5
	◦ 발 및 꼬리 조작상태	1	2	3	4	5
	◦ 우산에 대한 반응	1	2	3	4	5
	◦ 낙하수하물에 대한 반응	1	2	3	4	5
	◦ 기타	1	2	3	4	5
◦ 소 계 :						

사회성 (7항목)	◦ 어린이	1	2	3	4	5
	◦ 성인	1	2	3	4	5
	◦ 소그룹	1	2	3	4	5
	◦ 1대1(one on one)	1	2	3	4	5
	◦ 쾌활성	1	2	3	4	5
	◦ 복종성	1	2	3	4	5
	◦ 기타	1	2	3	4	5
	◦ 소 계 :					

보행상태 (5항목)	◦ 움직이는 컨베이어 벨트	1	2	3	4	5
	◦ 계단	1	2	3	4	5
	◦ 타일	1	2	3	4	5
	◦ 철망	1	2	3	4	5
	◦ 기타	1	2	3	4	5
	◦ 소 계 :					

(2) 연구수행 결과

자건 자질 평가는 현장 훈련을 처음 시작한 시기인 14주령 (2번, 3번, 4번 대조군)과 15주령(1번 대조군)에 진행하였으며 항목은 보상먹이 자극에 대한 반응 (8항목), 환경 적응성(16항목), 사회성 (7항목), 보행상태 (5항목), 장애물에 대한 반응 (4항목)으로 구성되어 있다. 평가 결과 대조군 4두 모두 4형 우수의 결과를 받았으며, **이 평가는 탐지 현장에서 어떠한 반응을 보이는지 기본 자질을 확인하는 데에 의의가 있다.**

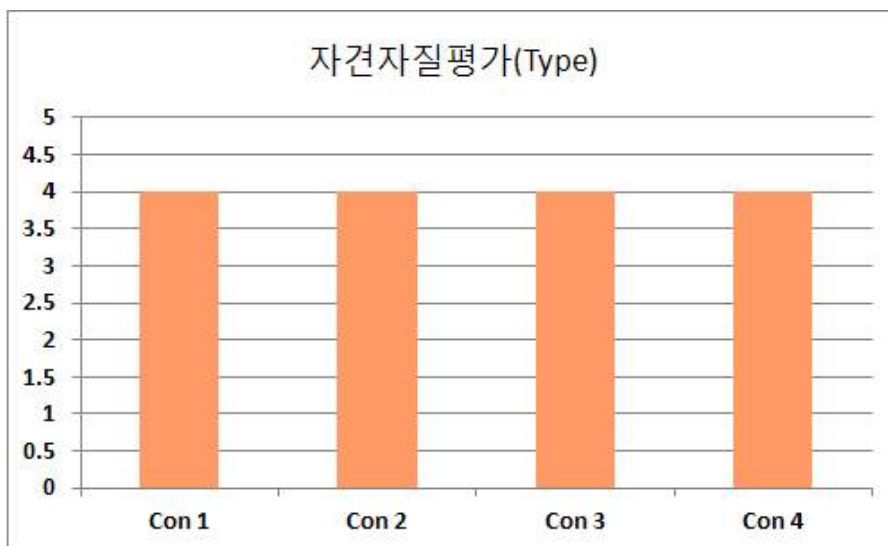


그림 26 대조군 4두의 자건 자질 평가 결과
1 : 불량, 2 : 부족, 3 : 보통, 4 : 우수, 5 : 매우 우수

다. 성견 시절 행동평가를 위한 평가 프로토콜 작성 및 분석 기준 제시

(1) 연구수행 방법

(가) 성견 선발평가 방법의 확립 및 분석

검역탐지견센터의 내부 평가 방법인 의욕, 반응(민감성, 관심성, 적극성)관련 항목 이외에 본 연구시 생성된 우수견과 비우수견 평가 기준 10가지 항목을 추가하여 총점으로 평가하였다.

구 분	탐지의욕	목적물에 대한 반응		
		민감성	관심성	적극성
매우우수(60점)	30	10	10	10
우수(49점)	25	8	8	8
보통(35점)	20	5	5	5
부족(19점)	10	3	3	3
불량(8점)	5	1	1	1

(나) 탐지요원 평가표 (40점)

내 용	점수	내 용	점수
○ 탐지업무 투입 전 핸들러의 자세 및 탐지견의 상태 컨디션 체크의 상실	4	○ 탐지 시 승객에게 거부감을 줌	4
○ 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지 시키지 못함	4	○ 탐지대상 물품을 빼먹고 탐지를 함	4
○ 견줄의 취급이 부적절하여 탐지업무에 방해로 줌	4	○ 오반응을 보일때 적절한 대처능력부족	4
○ 탐지업무중 적절한 명령어 사용 부족	4	○ 보상타월을 사용하는 경우 타월놀이 요령 부족으로 탐지견이 흥미를 가지지 못함	4
○ 탐지견 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족	4	○ 탐지견 반응에 대한 사후처리 부족	4

(다) 평가세부사항

- ① 탐지견평가 60점, 탐지요원 평가40점, 총100점으로 한다.
- ② 합격점수는 60점이고 기준에 도달되지 않는 개는 그 시점에서 훈련을 중단하고 이후의 탐지훈련으로 진행시키지 않는다.
- ③ 탐지견은 탐지의욕이 가장중요하기 때문에 매우우수, 또는 불량에 차이가 크다.
- ④ 평가 할 때 주의해야 하는 것은 『매우우수』의 평가에 있어 100% 완벽하고 고칠

것이 없을 때에 점수를 줄 수 있지만, 조금이라도 나쁜 점이 있을 때에는 『우수, 보통』으로 하고 절대 과도평가를 하지 않는 것이 중요하다, “보통과 부족”의 중간이라고 느꼈을 때에는 “부족”으로 평가 한다.

- ⑤ 평가 실시 후 평가자는 탐지요원의 기술부족으로 인하여 탐지견에게 낮은 점수밖에 줄 수 없다고 판단되는 경우에는 탐지요원과의 친화관계를 다시 지켜보거나 또는 다른 개체의 탐지견으로 교체등도 생각할 필요가 있으므로, 적당한 판단에 의해 가장 좋은 방법으로 합격 또는 불합격의 판단을 하는 것이 중요하다.

(라) 영국 훈련사와 핸들러 244명의 설문을 바탕으로 훌륭한 탐지견의 10가지 항목을 선정 (Rooney et al., 2004, J Forensic Sci)하였으며 이를 바탕으로 1-5점으로 평가되는 항목을 선정하였다.

- ① 후각이 얼마나 예민한가?(acuity of sense of smell)
- ② 보이지 않는 물건을 찾으려는 욕구가 강한가?(incentive to find an object which is out of sight)
- ③ 건강 상태는 양호한가?(health)
- ④ 단독으로 탐지하려는 경향이 강한가?(tendency to hunt by smell alone)
- ⑤ 체력은 강한가?(stamina)
- ⑥ 보상먹이에 의해 잘 훈련되고, 관심이 많은가?(ability to learn from being rewarded)
- ⑦ 탐지할 때 산만하지 않고 집중하는가?(tendency to be distracted when searching)
- ⑧ 민첩하게 탐지하는가?(agility)
- ⑨ 매일 행동이 일정하게 유지되는가?(consistency of behaviour from day to day)
- ⑩ 물건을 쫓으려는 동기가 강한가? (motivation to chase an object)

(2) 연구수행 결과

(가) 성견 선발 평가의 각항목별 결과 해석 방법

① 탐지견의 의욕적인 부분

- 매우우수, 우수; 환경에 전혀 영향을 받지 않고, 빠르고 정확한 탐지를 하면서 탐지요원의 도움을 필요로 하지 않는 경우
- 보통; 적극적인 탐지를 하면서 일반적으로 주위환경에 영향을 받고 탐지요원이 의욕을 북돋움에 의해 관심이 돌아오고 정확한 탐지를 할 수 있는 경우
- 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

- 불량; 열의나 관심을 거의 볼 수 없고, 탐지요원이 적극적으로 의욕을 북돋아주려고 시도해 봐도 충분한 탐지를 할 수 없는 경우

② 탐지견의 반응적인 부분

※민감성, 관심성, 적극성의 3가지로 나눔

㉠ 민감성

- ❖ 매우우수, 우수; 취기의 식별능력이 완벽하고 목적물 냄새를 맡았을 때 현저하고 기민한 동작을 보이고 망설임 없이 즉시 냄새의 근원지를 추적하려고 하는 경우
- ❖ 보통; 취기의 식별능력이 뛰어나고 목적물 냄새를 맡았을 때 기민한 움직임을 보이고 냄새의 근원지를 추적할 열의를 보이는 경우
- ❖ 부족; 취기의 식별능력이 부족하고 목적물 냄새를 맡았을 때의 반응이 둔한 경우
- ❖ 불량; 취기의 식별을 못하고 목적물 냄새를 맡았을 때의 반응이 현저히 부족한 경우

㉡ 관심성

- ❖ 매우우수, 우수; 목적물 냄새를 맡은 후 망설임 없이 완벽하게 냄새의 근원지를 탐지 한다. 숨겨진 장소에서 떨어지는 일이 전혀 없고, 탐지요원의 충고 등이 필요 없음
- ❖ 보통; 목적물 냄새를 맡은 후 적극적으로 냄새의 근원지를 탐지하려 한다. 숨겨진 장소까지는 탐지요원의 충고를 필요 할 때가 있지만 탐지했을 때는 그 장소를 떠나려 하지 않음
- ❖ 부족; 목적물 냄새를 맡은 후 냄새의 근원지를 탐지하려는 행동이 결여되어 있고, 탐지요원의 충고 등이나 유도 없이 숨겨진 장소까지 도달 할 수 없음
- ❖ 불량; 목적물 냄새를 맡은 후 확실한 냄새의 근원지를 탐지하려는 열의가 느껴지지 않고, 탐지요원의 충고나 유도를 하여도 그 장소에서 떨어져 물러나버림

㉢ 적극성(공격성) Active Dog

냄새의 근원지에서 타월을 꺼내오려고 하고, 발을 긁거나 또는 물어뜯거나 해서 그 장소를 적극적으로 공격 하는 것이다.

- ❖ 매우우수, 우수; 목적물이 숨겨진 장소에 대하여 망설임 없이 즉시 미친 듯

한 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
- ❖ 불량; 탐지요원의 부추김에 의해서도 공격이 나타나지 않고 그 장소에서 물러나거나 또는 그 장소에서도 관심이 없다.

(나) 성견 선발평가 및 실제 적용 결과

① 탐지요원 및 탐지견 평가서

<탐지요원 및 탐지견의 총괄적 평가표>

구 분	탐지요원	탐지견 및 성별	생년월일	품 종	평가일자
	강영웅	블랙(M)	2012.01.05	비글	2012.09.20
탐지장소	인천공항 입국장(CIQ)				
탐지견	탐지의욕(30점)	목적물에 대한 반응(30점)			탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	
	<input type="checkbox"/> 매우우수(30)	<input type="checkbox"/> 매우우수(10)	<input type="checkbox"/> 매우우수(10)	<input type="checkbox"/> 매우우수(10)	
	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(25)	<input type="checkbox"/> 우수(8)	<input type="checkbox"/> 우수(8)	<input type="checkbox"/> 우수(8)	
	<input type="checkbox"/> 보통(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 보통(5)	<input checked="" type="checkbox"/> 보통(5)	<input checked="" type="checkbox"/> 보통(5)	
	<input type="checkbox"/> 부족(10)	<input type="checkbox"/> 부족(3)	<input type="checkbox"/> 부족(3)	<input type="checkbox"/> 부족(3)	
<input type="checkbox"/> 불량(5)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	40	
탐지요원 (각항목 4점)	◦ 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				36
	<input checked="" type="checkbox"/> 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지시키지 못함				
	<input type="checkbox"/> 견 줄의 취급이 부적절하여 탐지 시 방해로 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 반응 및 관심물품에 대한 기록					
평가자	탐지견 교관 김홍범				총 점
평가자의견	지속적 현장 탐지경험 필요				76

평가 결과는 100점을 기준으로 탐지견의 의욕, 민감성, 관심성, 적극성을 평가하고 탐지 요원의 상황 대처 능력을 함께 평가하여 점수화한다. 1번 대조군은 75점, 2번 대조군은 59점, 3번 대조군은 76점, 4번 대조군은 75점의 점수를 얻었다.

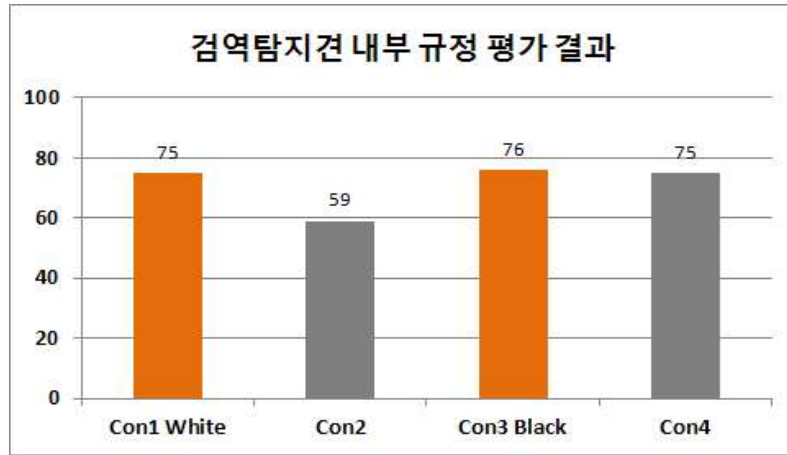


그림 27 검역탐지견 내부 규정 평가 결과

이 평가법은 현장 근무를 통한 탐지요원 및 탐지견을 평가하여 실제 투입편명에 대한 객관적 검증을 위한 것이다. 현장 상황에 대한 적응 정도를 파악하여 탐지 요원의 상황별 적절한 대처 능력을 양성하여 배치가 원활히 이루어지도록 하며, 자질이 적절하지 않은 후보견은 불합격시키도록 한다. 탐지요원은 견의 탐지활동이 부드럽게 이루어지도록 탐지를 진행하고, 견의 미세한 반응을 잘 읽을 수 있도록 유의한다. 탐지견에 대한 적절한 명령, 지시, 칭찬, 교정을 하도록 한다.

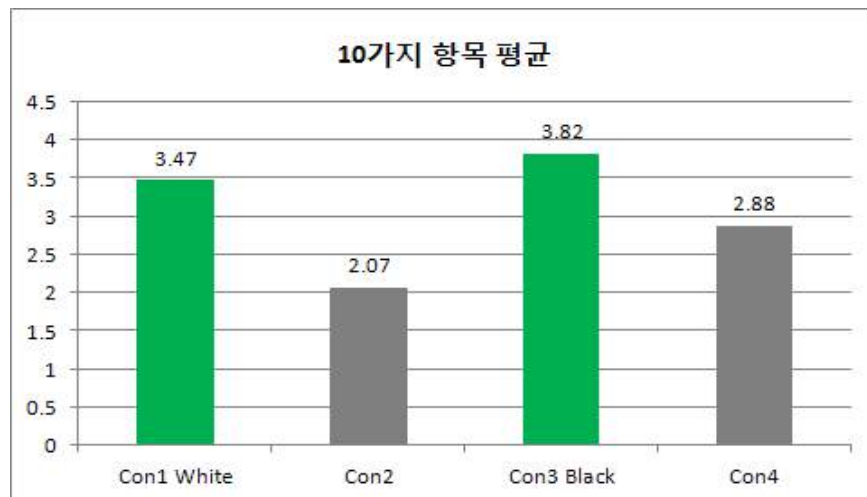


그림 28 본 과제시행서 추가된 10가지 항목 평가 결과

대조군 4두(일반견)의 10가지 항목 평가 결과, 각각의 평균이 3.47, 2.07, 3.82, 2.88로 1번견과 3번견은 평균을 상회하였고 2번견과 4번견은 상대적으로 점수가 낮았다. 10가

지 항목 평가 (Rooney et al., 2004, J Forensic Sci) 점수는 영국 244명의 핸들러와 트레이너들에게 탐지건의 어떤 자질이 중요한지 설문을 받은 항목을 기준으로 평가한 것이다. 이 각 자질을 1~5점으로 평가하도록 변형하였다.

대조군의 최종 판정은 10가지 항목과 검역탐지건센터 내부 평가를 조합하여 진행하였다. 후각의 예민한 정도, 물건을 찾으려는 욕구 등을 포함하여 민감성, 관심성 등에서 대조군 1 (control 1) 과 대조군 2 (control 3)의 경우에는 비교적 우수한 자질을 보였다. 그러나 대조군 2 (control 2)의 경우에는 평균보다 낮은 점수로 탐지건에는 부적합한 자질을 보였으며, 대조군 4 (control 4)의 경우에는 평균값과 비슷한 수치를 보였으나 개체의 체격이 작아 활동에 제약이 있어 2번과 4번의 경우 불합격으로 판정되었다.

합격 : Jan, Feb, Mar, White(con 1), Black(con 3)

불합격 : 첫째(con 2), 셋째(con 4)

<우수탐지건을 평가하는 다각적 객관적 지표>

구분	객관적 지표	비고
유 전 학 적 객관적지표	BICF2P1090057	우수 탐지건들의 gemone 상에서 CNV분석결과 샘플수가 적어 통계적 유의차는 발견할 수 없었으나, 추가적 SNP분석을 실시하여 통계적 특이성을 지닌 4개의 마커를 도출함
	BICF2P471203	
	BICF2P1203931	
	BICF2S23118349	
영 상 학 적 객관적지표	비강 구조 평가	대조군 및 일반 복제건에서 비강구조평가를 통해 유의적 지표가 도출되지는 않았지만 추후 복제검역탐지건에서의 해부학적 구조 특이성 여부를 판정할 수 있는 지표로는 비강구조평가가 유효한 지표일 것으로 제시함.
	후각 관련 뇌 구조 평가	대조군과 일반복제건의 후각 관련 뇌 구조의 비교를 실시하여 우수건의 선발 지표 가능성을 탐구한 결과, 후각 관련 뇌 구조평가는 차년도 복제검역탐지건을 포함한 다수의 복제건과의 비교 연구를 통한 평가지표로 유효할 것으로 제시함.
행 동 학 적 객관적지표	유견 적성 평가 (생후 6~8주령)	유견시절 2형, 3형으로 결과가 도출되어지는 유견은 탐지건으로 매우 적합함
	자견 자질 평가 (생후 14~16주령)	자견평가지 우수, 매우 우수로 결과가 도출되어지는 자견은 탐지건으로 매우 적합함
	성견 선발 평가 (10가지항목, 검역탐지건센터 내부 규정 평가)	10가지 항목 평가 결과 3점 이상의 평가를 받고 내부 평가 결과 75점 이상의 점수를 받은 후보견을 대상으로 검토하여 성견 탐지건으로 선발

제 2 절 복제 검역탐지견 생산

1. 복제효율 향상을 위한 최적의 공여세포주 선정

가. 연구수행 방법

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 운반한다. 채취한 피부조직을 동일한 크기 (1cm *1cm)로 각각 자르고 PBS에 3번 Washing하였다. 그 후, 미세가위를 이용하여 조직을 잘게 자르고 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 RCME-P (RNL Bio)의 배양액으로 조직을 부유시킨 후 원심분리를 실시한다. 원심분리 후 상층액은 제거하고 조직과 세포 펠렛을 회수하여 35mm 플라스틱 배양접시 (Becton Dickinson Lincoln Park, NJ) 에 나누어 침지한다. 침지된 조직은 계속하여 각각 DMEM과 RCME-P (RNL Bio)에서 39℃, 5% CO₂ 및 95% 공기로 가습된 조건으로 6-10일간 배양한다. 부착되지 아니한 세포 또는 외식편 덩어리를 제거한 후, 부착된 세포들을 컨플루언시 (confluency)까지 계속하여 배양한다. 이들 세포들을 3내지 5일 간격으로 배지를 교환하고, 컨플루언시에 도달하면 0.1% 트립신 /0.02% EDTA를 사용하여 3분간 트립신을 처리하고 플라스틱 배양접시에서 세포가 분리된 양상을 확인 후 동결배지를 사용하여 -196 ℃의 액체질소 내에서 동결 저장한다. 상기 동결배지는 10% (v/v) DMSO 가 첨가된 90% (v/v) FBS를 이용하여 동결하여 공여세포로 사용하기 까지 보관한다.

나. 연구수행 결과

(1) 2 가지의 다른 배양액으로 배양한 우수검역 탐지견 대니의 세포주 확립

우수 검역견 대니의 복제 생산을 위하여 세포주를 확립하였다. 현재까지 다양한 조직 중 피부 유래의 성체 섬유아세포를 흔히 사용하고 있으나 보다 효율적인 생산을 위해 2가지의 다른 배양액을 이용하여 섬유아세포를 확립하였다. 결과는 아래 기술하였다.

우수 검역견 대니(11세, 수컷, 비글)의 피부조직으로부터 2가지의 다른 배양액을 이용하여 각각 확립되었다. 확립된 세포는 RCME-P에서 유래된 세포는 0계대에서 5 x10⁵ cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 8개로 각각 동결되었고, DMEM에서 유래된 세포는 0계대에서 5 x10⁵ cells/ml 농도로 1.5ml 동결 튜브 5개로 각각 동결되어 세포의 이용 전 까지 액체질소에서 보관하였다. 동일한 조직에서 유래된 세포이지만 컨플루언시에 도달

하기 까지의 시간이 두 다른 배지를 사용하였을 때 차이가 있었고 **RCME-P를 사용한 배지가 더 빠른 시일내에 컨플루언스에 도달하였으며 세포의 증식이 활발**하였다.

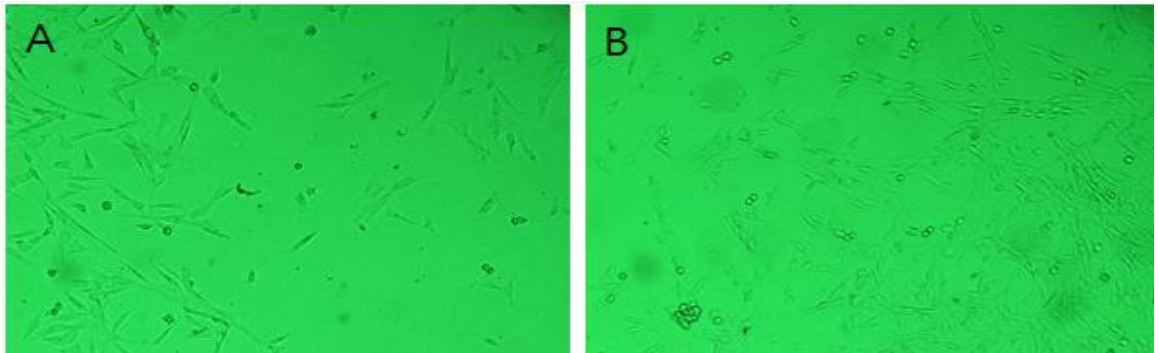


그림 29 검역건 대니 유래로 DMEM 배양액을 사용한 섬유아세포 (A), RCME-P 배양액을 사용하여 확립된 섬유아세포 (B).

(2) 2가지 배양액을 이용해 확립한 세포주의 유전자 발현 패턴 분석

한 개체에서 분리한 조직을 2가지의 다른 배양액을 통해 그로부터 유래된 세포의 유전자의 발현 정도를 비교 분석하였다. 줄기세포의 특징으로 제시되는 여러 가지 마커 유전자(Oct4, Sox2, Nanog, Rex1, Stella)와 재구성 양상을 비교할 수 있는 다양한 마커 유전자 (HDAC, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MeCP2), 세포사를 나타내는 지표인 Bax/Bcl2의 유전자의 발현 양상을 비교하였다.

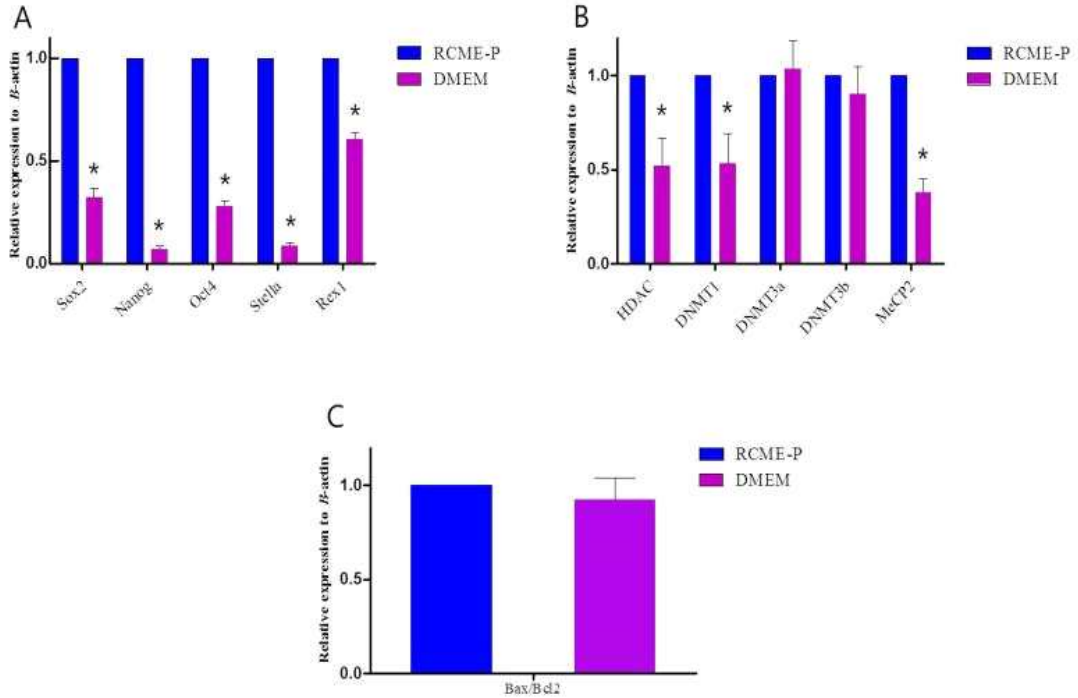


그림 30 검역건 대니에서 유래한 섬유아세포의 유전자 발현 비교 분석 (A) 줄기세포의 특성과 관련된 유전자의 발현 비교 분석 결과, (B) 세포의 재구성과 관련된 유전자의 발현 비교 분석 결과, (C) 세포사와 관련된 유전자의 발현 비교 분석 결과, *로 표기된 것은 두 그룹간에 유의적 차이가 있음을 의미함 ($P < 0.05$).

대니의 조직에서 유래한 세포를 2가지의 다른 배양액을 통해 유전자의 발현을 분석한 결과는 위의 그림과 같다. 먼저 줄기세포의 특징으로 제시되는 유전자의 발현은 유의하게 줄기세포 배양액으로 쓰이고 있는 RCME-P에서 유래된 세포들이 유의하게 모두 발현 수준이 높게 나타났다. 재구성과 관련된 유전자의 발현은 분석한 유전자 중 DNMT3A, DNMT3B를 제외하고는 모두 **RCME-P에서 유래된 세포들이 모두 발현 수준이 줄기세포의 특징을 나타내는 유전자들과 동일하게 높은 수준을 유지**하였다. 세포사와 관련된 유전자는 두 그룹간에 차이가 발견되지 않았다.

(3) 2가지 배양액을 이용해 생산된 복제수정란의 체내 발달 효율 비교

세포의 유전자 발현에 영향을 미치는 배양액의 이용을 통해 개 체세포 섬유아세포의 세포주를 확립하였으며 2가지의 다른 배양액을 이용하여 확립한 세포주를 이용하여 복제수정란을 생산하고 생산된 복제 수정란을 대리모에 이식한 후 체내 발달률을 연구하여 산자 생산율을 향상 시켰다.

표 27 DMEM배양액과 RCME-P 배양액에서 확립한 성체 섬유아세포를 이용한 체세포 핵 이식 후 개 복제 수정란의 성체 내 발달

배양액	이식배아 수	대리모 수	임신 대리모 수 (임신대리모 수/총대리모 수)	산자 수 (산자 수/이식배아 수)
DMEM (대조군)	105	6	2 (33.3%)	2 (1.9%) ^a
RCME-P (처리군)	77	5	2 (40.0%)	3 (3.9%) ^b

a,b 다른 위첨자를 가진 값은 같은 열 안에서 유의적 차이를 나타냄 (P<0.05).

보다 효율적인 세포주 확립 방법으로 기존에 흔히 사용하는 DMEM에 비해 RCME-P를 사용하는 것이 세포를 확립하는 시일도 짧게 소요되며 산자 수 생산 효율도 높일 수 있다는 점을 고려하였을 때 **피부조직 유래의 섬유아세포 확립시 RCME-P 배지를 사용하여 세포주를 확립하는 것이 효용성이 높다는 결론**을 내릴 수 있었다.

2. 체세포 핵이식을 통한 복제견의 생산

가. 연구수행 방법

(1) 체세포 핵이식을 위한 공여 핵세포의 준비

체세포 핵 이식 (SCNT)를 위하여 2 내지 6 계대의 세포들을 사용한다. 체세포 핵이식을 하기에 앞서, 세포들을 해동하고, 100% 컨플루언시가 될 때까지 배양한 후 약 3분 동안 트립신 처리하여 단일 층으로부터 분리시켜 하나의 세포로 회복시켜 핵 공여 세포로 이용한다.

(2) 체내 성숙 난자의 획득

발정초기의 암캐를 선별하여 매일 요추피정맥에서 혈액을 채취 및 혈청 분리한 후 전문 검사기관에 보내어 혈중프로게스테론 농도를 측정한다. 측정된 프로게스테론 농도를 기초로 배란일을 결정 후 배란 3일 후에 Isoflurane으로 전신 마취후 개복하여 난관내의 성숙 난자를 회수한다. 생식열구 (bursal slit)를 통하여 난관의 처음 끝단에 접근하여 inverted flanged bulb needle를 삽관한다. (바늘을 수술적 결찰로 고정하였으며, 3cm 플라스틱튜브 및 지혈 겸자 (hemostatic forceps)를 사용하는 급속-방출 장치 (quick-release device)를 이용하여 실시한다. 주위 조직 및 난관 내강을 창백하게 (blanch) 위해 지압을 가하여, 자궁-난관접속부 바로 위의 난관 기저부를 드러내고, 10% (v/v) FBS, 2 mM NaHCO₃, 5 mg/ml BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA)가 보충된 HEPES-완충 조직 배양 배지 (TCM)-199로 이루어진 수정란 수집 배지로 채워진 미세한

피하 주사기(24 게이지)를 삽관한다.

플러싱으로부터 채란된 생체내 성숙된 난자들은 38.5°C 조건의 HEPES-buffered TCM-199 내에서 10분 이내에 실험실로 옮긴다.

(3) 체세포 핵 이식을 위한 수핵 난자의 준비

HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 0.1% (v/v) 히알루로니다제 (hyaluronidase)에 침지한 후, 미세 유리파이펫을 이용하여, 생체 내에서 성숙된 난자로부터 난구세포를 제거한다. 그 후, 각각의 난자들을 홀딩 마이크로피펫 (내경 150 μ m)으로 고정하고, 10% (v/v) FBS 및 5 μ g/mL 헥스트 (Hoechst 33342)와 5 μ g/mL 사이토칼라신 B가 첨가된 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 미세조작기 (Nikon-Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 헥스트로 염색된 난자의 염색체를 흡입 피펫 (aspiration pipette)을 사용하여 제거한다. 탈핵된 난자는 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199에 두고 계속하여 체세포를 주입하는데 사용한다.

(4) 미세주입, 융합, 활성화 및 이식

공여 체세포와 수핵 세포질체의 합체를 향상 시키도록 10% (v/v) FBS가 보충된 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 탈핵 난자의 위란강 (perivitelline)으로 하나의 공여세포를 주입한다. 상기 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM HEPES 및 0.05% (w/v) BSA를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 바늘 형의 2개의 마주보는 전극 사이에 놓는다. 난자 세포질체 및 핵 공여 세포 사이의 접촉면을 전극과 평행하게 놓고, Electro-Cell Fusion apparatus (NEPA GENE Co., Chiba, Japan)로 전기 자극을 준다. 70-75V, 15 μ sec 지속시간으로 2 펄스를 가하며, 전기 자극 30 분 후에 핵 공여세포와 난자세포질체의 융합을 실체현미경 하에서 관찰한다. 융합된 수정란만을 선별하여 10 μ M 칼슘 아이노포어 (calcium ionophore)를 포함하는 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199 배지에서 4분간 활성화를 유도한다. 그 후, 복제된 수정란을 세척한 후 1.9 mM 6-디메틸아미노푸린 (dimethylaminopurine)이 보충된 난관액합성배지 (mSOF) 내에서 4시간 동안 추가로 배양한다. 복제수정란의 활성화가 끝나면, 자연배란 동기화가 된 대리모의 난관내로 탐침 카테터를 이용하여 복제수정란을 로딩하여 이식한다. 이식한 날로부터 30일째 초음파기기를 이용하여 태아의 형성 유무를 확인하여 임신을 판정한다. 임신되어진 개체는 이식한날로부터 60일째 분만을 위한 준비를 한다.

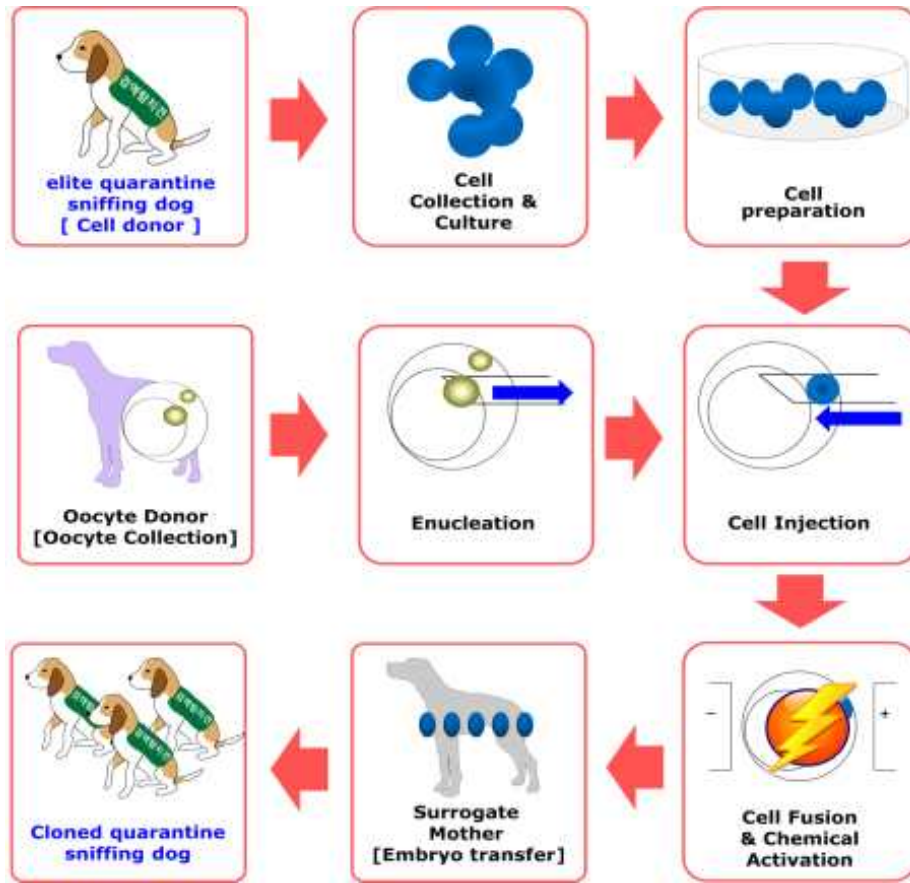


그림 31 체세포핵이식 기법을 이용한 복제 탐지견 생산 방법

(5) 유전자검사를 위한 DNA 추출 및 마이크로세털라이트 분석

복제개의 유전적 동일성을 확인하기 위해 핵 공여세포, 복제된 개 및 대리모의 DNA를 이용하여 혈통분석 (Parentage analysis)을 수행한다. 태어난 개체의 혈액으로부터 조직 단편을 수집하고, 공여세포 및 대리모의 혈액 샘플을 수집한다. 조직 단편들과 혈액 및 트립신 처리된 핵 공여 세포들을 400g 프로테인나제 K가 보충된 용해 완충액 [0.05 M Tris (pH 8.0), 0.05 M EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS]에서 밤새 배양하고, 페놀 추출 및 에탄올 침전을 수행한다. 분리된 genomic DNA를 50 μ l TE에 용해시키고, 개로부터 유래한 10개의 특이적 마커와 함께 마이크로세털라이트 분석에 사용한다.

마이크로세털라이트 평가는 다음의 마커를 사용한다: PEZ1, PEZ12, PEZ20, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8, FH2010, FH2054, FH2079. 자동화 DNA 서열분석기 (ABI 373: Applied Biosystems, Foster City, CA) 상에서 형광 표지된 프라이머를 사용한 PCR 증폭 및 전기영동으로 길이 변이를 분석한다. 뉴클레오타이드에서 PCT 산물의 크기를 측정하기 위해 상용 소프트웨어 (GeneScan and Genotyper; Applied Biosystems)를 사용한다.

(6) 미토콘드리아 DNA 분석

미토콘드리아 DNA에서 유전자 조절 부분인 D-loop 부분을 분석하기 위하여 공여세포와 복제건 및 난자공여건에서 마이크로세틸라이트 분석에서 기술한 바와 같이 Genomic DNA를 분리한다. 유전자 데이터베이스 탐색을 통해 개의 D-loop부분에서 개 특이 염기서열을 찾아 낸 후 이러한 염기서열을 바탕으로 미토콘드리아 DNA 분석을 위한 PCR 증폭용 프라이머를 제작한다. 제작된 특이 프라이머를 이용해 분리된 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR 분석을 실시한다. 증폭된 PCR 산물을 전기영동 하여 분리한 후 이에 대한 염기서열 분석을 자동화 DNA 서열 분석기를 이용하여 실시한다. 미토콘드리아의 염기서열을 비교 분석하여 체세포 유래인지 난자유래 미토콘드리아 DNA인지를 판정한다.

나. 연구수행 결과

(1) 체세포핵이식을 이용한 복제수정란 생산 및 이식

확립된 우수검역 탐지건 비글의 체세포를 이용하여 212개의 복제수정란을 12마리의 대리모에 이식하였고 이식후 약 30일째 초음파 임신 진단을 한 결과 4마리의 대리모가 임신한 것을 확인하였다. 이식후 52일째 엑스레이 촬영을 하여 산자수를 확인한 결과 아래 사진에서처럼 한 마리의 대리모에 하나의 태아가 임신된 것을 확인할 수 있었다. 그리고 임신 60일째 제왕절개 및 자연분만을 통해 **1마리의 대리모당 1마리의 복제개가 분만되었으며, 총 4마리의 복제개를 생산하는데 성공** 하였다.

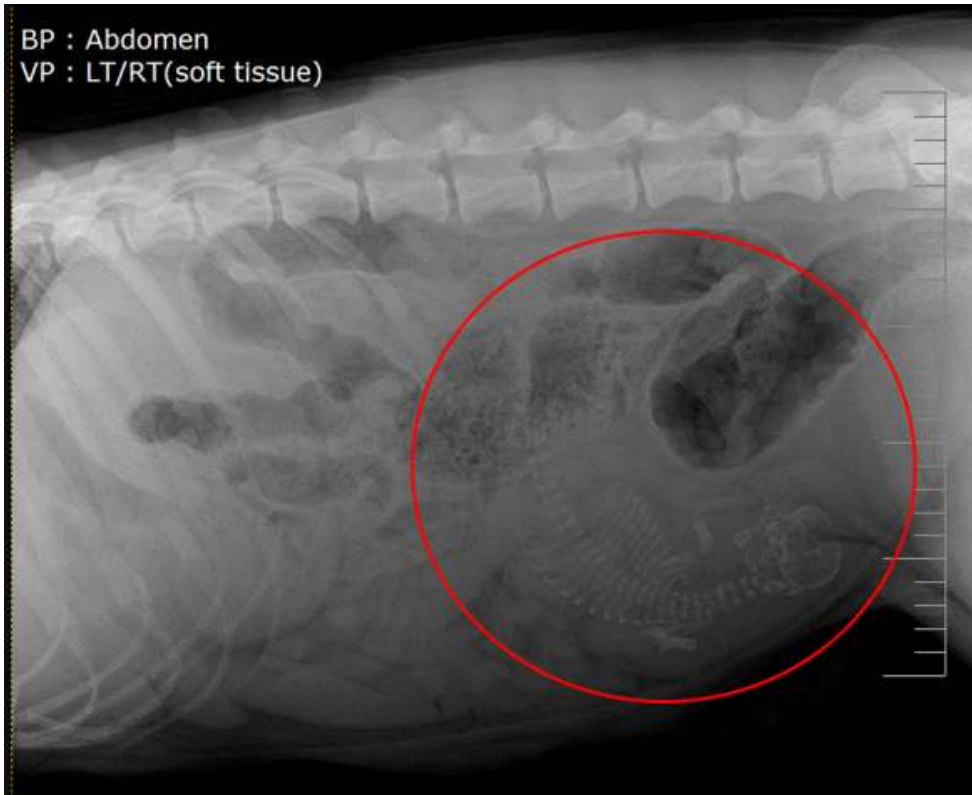


그림 32 복제수정란 대리모내 이식후 52일째 엑스레이 촬영 영상

(2) 복제개 분만 및 유전자 분석

생산되어진 4두의 복제개는 복제개, 대리모, 난자공여견 및 공여세포의 DNA를 통해 친자감별 및 미토콘드리아 DNA 검사를 실시하였다. 결과 아래 표에서 보여주는 바와 같이, 4마리의 복제견의 DNA가 모두 공여세포와 일치하는 것을 확인할수 있었다.

표 28. 복제개, 공여세포, 대리모의 genomic DNA로 canine specific microsatellite 마커를 이용한 유전자 분석

Marker	Donor dog		Clone1		Clone2		Clone3		Clone4	
PEZ1	119	116	120	116	120	116	120	116	120	116
FHC2054	169	156	169	156	168	156	168	156	168	156
FHC2010	237	229	237	229	236	229	237	229	236	229
PEZ5	108	104	108	104	108	103	108	104	108	104
PEZ20	181	177	181	177	181	177	181	177	181	177
PEZ12	276	272	276	272	275	272	276	272	276	272
PEZ3	138	125	137	125	138	125	138	125	138	125
PEZ6	188	176	188	175	188	176	188	176	188	176
PEZ8	242	239	242	239	242	239	242	239	242	239
FHC2079	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270

또한 4마리의 복제견의 미토콘드리아 DNA를 검사하였다. 결과는 아래 제시되어진 표와

같다. cloned 1~4의 미토콘드리아 DNA는 모두 난자공여건의 것과 일치하였다. 이는 복제건들을 생산하기 위하여 사용되어진 난자가 복제시 제공되어진 난자임을 검증하는 결과이다. 결론적으로 **4두의 복제건은 모두 체세포핵이식을 통해 태어난것임을 검증**하였다.

CLONE 1 group	Nucleotide positions			
	15639	15653	15814	16025
Reference	T	A	C	T
Donor cell	T	G	T	T
Clone 1	A	A	T	C
Oocyte donor A	A	A	T	C
Recipient A	A	A	T	C

표 29 Clone1 group 간의 미토콘드리아 DNA 분석

표 30 Clone2 group 간의 미토콘드리아 DNA 분석

CLONE 2 group	Nucleotide positions																		
	15435	15518	15526	15595	15612	15627	15632	15639	15643	15652	15653	15665	15800	15814	15815	15912	15955	16003	16083
Reference	G	A	C	C	T	A	C	T	A	G	A	T	T	C	T	C	C	A	A
Donor cell	G	A	C	C	T	A	C	T	A	G	G	T	T	T	T	C	C	A	A
Clone 2	G	A	C	C	T	A	C	T	A	G	A	T	T	C	T	C	C	A	A
Oocyte donor B	G	A	C	C	T	A	C	T	A	G	A	T	T	C	T	C	C	A	A
Recipient B	A	C	T	T	C	A	T	G	G	A	A	T	C	T	C	T	T	G	G

표 31 Clone3 group 간의 미토콘드리아 DNA 분석

CLONE 3 group	Nucleotide positions																	
	15435	15518	15526	15595	15612	15632	15639	15643	15652	15653	15800	15814	15815	15912	15955	16025	16083	
Reference	G	A	C	C	T	C	T	A	G	A	T	C	T	C	C	T	A	
Donor cell	G	A	C	C	T	C	T	A	G	G	T	T	T	C	C	T	A	
Clone 3	G	A	C	C	T	C	A	A	G	A	T	T	T	C	C	C	A	
Oocyte donor C	G	A	C	C	T	C	A	A	G	A	T	T	T	C	C	C	A	
Recipient C	A	C	T	T	C	T	G	G	A	A	C	T	C	T	T	T	G	

표 32 Clone4 group 간의 미토콘드리아 DNA 분석

CLONE 4 group	Nucleotide positions																	
	15435	15518	15526	15595	15612	15632	15639	15643	15652	15653	15800	15814	15815	15912	15955	16003	16025	16083
Reference	G	A	C	C	T	C	T	A	G	A	T	C	T	C	C	A	T	A
Donor cell	G	A	C	C	T	C	T	A	G	G	T	T	T	C	C	A	T	A
Clone 4	G	A	C	C	T	C	A	A	G	A	T	T	T	C	C	A	C	A
Oocyte donor D	G	A	C	C	T	C	A	A	G	A	T	T	T	C	C	A	C	A
Recipinet D	A	C	T	T	C	T	G	G	A	A	C	T	C	T	T	G	T	G

그러나 불행하게도 4마리의 복제견중 1두가 태어난후 사망하였다 (아래표). 사망 원인은 출생후 대리모에 의해 케어시 대리모의 갑작스런 이상행동으로 인해 1마리가 대리모에 의해서 폐사하게 되었다. 폐사한 복제견의 경우 부검을 실시하였으나, 특이 소견은 보이지 않았으며 모든 것이 정상임을 확인 할 수 있었다. 남아있는 **3마리의 복제견은 모두 건강하게 성장하였으며 외형이 세포공여견과 매우 유사함을 확인**할수 있었다.

표 33 복제수정란이 이식된 임신한 대리모와 생산되어진 복제개의 정보

Replication	No. transferred embryos	No. offspring	Status of offspring
Recipient A	10	1	live
Recipient B	10	1	death
Recipient C	13	1	live
Recipient D	19	1	live

제 3 절 복제 검역탐지견(1차년도)의 유사성 및 정상성 분석

1. 복제 검역탐지견의 영상기법을 통한 성장패턴의 유사성 및 정상성 분석

가. 연구수행 방법

- (1) 동일 연령의 복제견들에서 방사선 촬영을 통해 해부학적 성장의 유사성 및 정상성 분석

약 21개월령의 복제견들에서 두개골, 골반, 요추골, 치아 구조를 비교하기 위하여 다음과 같이 방사선 촬영을 실시하였다. 두개골은 dorsoventral view로 촬영하였고, 두개골의 세로 길이(Sk1)는 상악 앞니(upper incisor)의 끝 가장자리와 바깥뒤통수뼈융기(external occipital protuberance)의 끝까지의 길이로, 가로 길이(Sk2)는 좌우 관골궁 (zygomatic arch) 사이의 길이로, 두개골 너비는 좌우 calcarium 사이의 길이로 측정하였다. 요추골은 right lateral view로 촬영하였고, 네 번째 요추(L4)의 높이(PH), 위쪽 길이 (UL), 아래쪽 길이 (LL)를 측정하여 비교하였다. 골반은 ventrodorsal view로 촬영하였고, 골반골의 세로 길이는 (Pe 1) 장골능선(iliac crest)의 위쪽 끝에서 골반골의 아래쪽 끝까지로, 가로 길이 (Pe 2)는 좌골 융기(ischiatic tuberosity)의 좌우 끝 사이의 길이로 측정하였다. 치아 발달을 비교하기 위하여 oblique view로 상악과 하악의 방사선 촬영을 실시하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 복제 검역탐지견의 영상기법을 통한 성장패턴의 유사성 및 정상성 분석

약 21개월령의 복제 검역 탐지견 Jan, Feb, March는 영상 촬영 당시 체중이 13.5kg, 14.3kg, 13.7kg으로 유사한 성장을 나타냈다. 두개골 방사선 촬영을 실시한 결과는 아래 그림과 같다.



그림 33 두개골 방사선 촬영 사진 (dorsoventral view). 좌측부터 복제 검역 탐지견 Jan, Feb, March.

세 마리에서 두개골의 세로 길이(Sk1)가 순서대로 175.84, 177.63, 172.27 mm, 가로 길이 (Sk2)가 순서대로 64.19, 66.90, 63.26 mm, 너비(Sk3)가 순서대로 103.38, 105.66, 98.73 mm로 측정되어 모두 유사한 성장패턴을 보이고 있었고, **해부학적으로 두개골의 구조가 정상임을 확인**하였다.

세 마리의 복제 검역 탐지견 Jan, Feb, March의 골반 촬영에서는 세로 길이(Pe1)가 순서대로 129.42, 133.01, 130.89 mm, 가로 길이(Pe2)가 순서대로 91.87, 91.32, 89.74 mm로 측정되어 모두 유사한 성장패턴을 보이고 있었고, 해부학적으로 골반부 구조가 정상임을 확인하였다. 그 결과는 아래 그림에서 보여주고 있다.



그림 34 골반 방사선 촬영 사진 (dorsoventral view). 좌측부터 복제 검역 탐지견 Jan, Feb, March.

해부학적 성장 패턴의 유사성 분석을 위해 세 번째로 Jan, Feb, March의 요추를 촬영하였고, 네 번째 요추의 높이(PH)가 순서대로 10.86, 11.97, 11.47 mm, 위쪽 길이(UL)가 순서대로 23.07, 23.86, 22.14 mm, 아래쪽 길이(LL)가 순서대로 23.55, 22.64, 22.58 mm로 측정되어 **모두 유사한 성장패턴**을 보이고 있었다.



그림 35 요추 방사선 촬영 사진 (dorsoventral view). 좌측부터 복제 검역 탐지견 Jan, Feb, March.

상악 및 하악의 방사선 촬영 결과, Jan, Feb, March 세 마리의 치아가 모두 잔존 유치가 없이 영구치 상태이며, 치식 역시 상악은 앞니 3개, 송곳니 1개, 작은 어금니 4개, 큰 어금니 2개로 동일하였고, 하악도 앞니 3개, 송곳니 1개, 작은 어금니 4개, 큰 어금니 3개로 **모두 동일함을 확인**하였다.

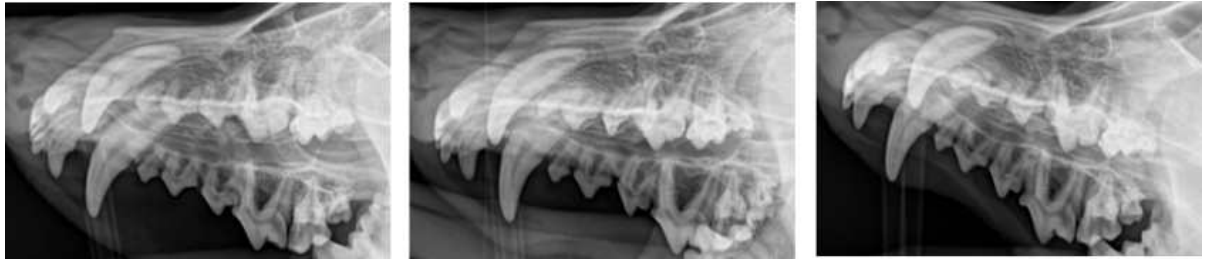


그림 36 상악 방사선 촬영 사진 (oblique view). 좌측부터 복제 검역 탐지건 Jan, Feb, March.

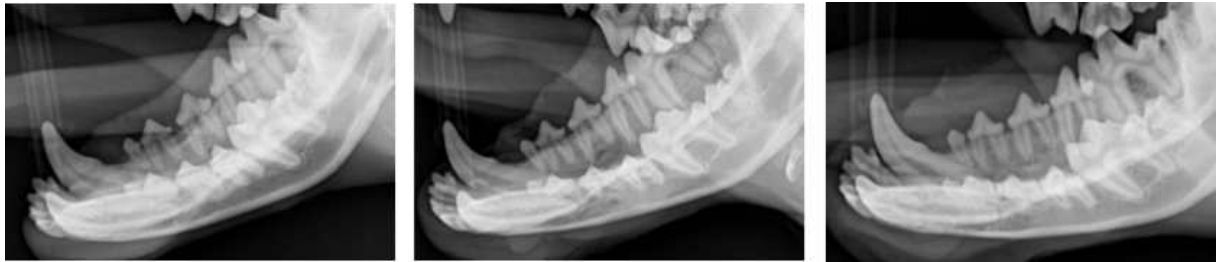


그림 37 하악 방사선 촬영 사진 (oblique view). 좌측부터 복제 검역 탐지건 Jan, Feb, March.

2. 복제건의 번식능력의 정상성 분석

가. 연구수행 방법

(1) 복제건의 정액해동 및 인공수정

발정초기의 암캐를 선별하여 매일 요추 피정맥에서 혈액을 채취 및 혈청 분리한 후 전문 검사기관에 보내어 혈중프로게스테론 농도를 측정한다. 측정된 프로게스테론 농도를 기초로 배란일을 결정 후 배란 2일 후에 Isoflurane으로 전신 마취 후 개복하여 인공 수정을 실시한다. 인공 수정은 자궁내 주입법으로 실시하여 자궁각을 노출, 22gauge catheter를 이용하여 좌, 우측 자궁각에 정액을 0.5ml씩 주입한다.

정액은 복제건의 정액을 해동하여 이용하도록 한다. 정액을 해동하는 방법은 아래와 같다. 질소 탱크에 저장되어 있는 straw를 꺼낸다. 70 °C로 미리 데워져있는 saline에 넣고 8초간 녹인다. 꺼내서 37°C의 생리식염수에 넣어서 씻어준다. 750rpm으로 7-8분간 원심을 돌리고 상층액은 버리고 생리 식염수 1ml로 희석한다. CASA (Computer assisted semen motility analyzer)를 이용하여 정액의 운동성, 모양, 질적인 면을 분석하고 인공 수정시 사용한다.

(2) 체내 수정란의 획득

측정된 프로게스테론 농도를 기초로 배란일을 결정 후 배란 3일 후에 Isoflurane으로 전신 마취후 개복하여 난관내의 수정난자를 회수한다. 생식열구 (bursal slit)를 통하여 난

관의 처음 끝단에 접근하여 inverted flanged bulb needle를 삽관한다. (바늘을 수술적 결찰로 고정하였으며, 3cm 플라스틱튜브 및 지혈 겸자 (hemostatic forceps)를 사용하는 급속-방출 장치 (quick-release device)를 이용하여 실시한다. 주위 조직 및 난관 내강을 창백하게 (blanch) 위해 지압을 가하여, 자궁-난관접속부 바로 위의 난관 기저부를 드러내고, 10% (v/v) FBS, 2 mM NaHCO₃, 5 mg/ml BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA)가 보충된 HEPES-완충 조직 배양 배지 (TCM)-199로 이루어진 수정란 수집 배지로 채워진 미세한 피하 주사기(24 게이지)를 삽관한다. 플라싱으로부터 채란된 체내 수정란은 38.5°C 조건의 HEPES-buffered TCM-199 (CW) 배지내에서 10분 이내에 실험실로 옮긴다.

나. 연구수행 결과

(1) 복제건의 번식 능력의 정상성 분석

복제건의 번식능력의 정상성을 분석하기 위해 복제건 1두의 정액을 이용하여 수술적 기법으로 배란 이틀째인 암컷의 자궁각에 주입, 체내 수정을 유도하였다. 배란 후 5일째에 암컷의 난관 내를 플라싱하여 체내 수정란을 회수, 분할 상태를 관찰하여 번식 능력의 정상성을 증명하였다.

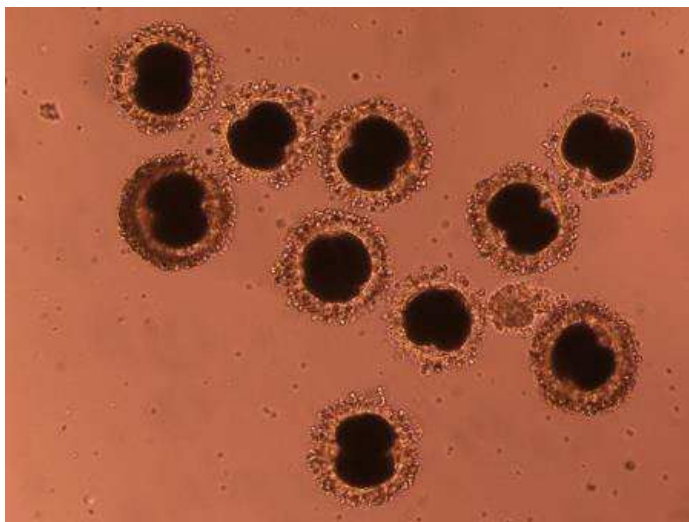


그림 38
복제건 Jan 의 정액을 이용한 발정기간의 인공수정 2일째 회수된 체내 수정란

위의 그림과 같이 암컷 개체의 난관에서 채취한 체내 수정란이 분할이 잘 이루어진 것으로 미뤄보아 복제건의 번식 능력은 정상적임을 확인할 수 있었다.

제 4 절 복제견(1차년도)과 체세포공여견간의 유전학적 분석

1. 복제견들과 체세포 공여견의 SNP, CNV 변이 여부 평가

가. 연구수행 방법

(1) Whole-genome SNP array를 이용한 SNP, CNV의 검출

(가) CanineHD beadchip의 이용

1차년도에는 retriever를 대상으로 체세포공여견과 7마리의 복제견간의 유전학적인 동질성을 CNV의 측면에서 평가하였다. 2차년도에는 beagle을 대상으로 동일한 방법을 적용하여 체세포공여견과 7마리의 복제견간의 유전학적인 동질성을 SNP의 측면에서 평가하고자 하였다. 독립된 개체간의 유전학적 이질성 및 다른 breed간의 유전학적 이질성을 함께 평가하기 위하여 beagle 20두, retriever 1두, retriever에서 복제된 7두의 retriever또한 SNP genotyping을 진행하였다. Whole-genome SNP genotyping을 위해 Illumina의 CanineHD BeadChip이 사용되었다. 본 플랫폼은 dog genome project에서 발굴된 250만개의 SNP중, 검증이 잘 된 SNP 17만개로 구성되어 있다. 200ng의 genomic DNA를 사용하였으며, 실험 과정의 요약은 다음과 같다.

- ① 200ng의 gDNA는 whole-genome의 PCR을 통해 그 양을 증폭 시킨다.
- ② 증폭된 DNA는 enzyme을 이용하여 SNP genotyping에 적당한 크기로 fragmentation된다.
- ③ Fragmentation된 DNA를 정제한 후, beadchip에서 16시간동안 hybridization반응을 진행한다.
- ④ Hybridization 반응이 끝난 beadchip은 stain과정과 wash과정을 진행한 후, beadchip scanner를 통해 형광값을 포함하는 image파일을 얻게 된다.

BeadChip의 실험 원리는 다음과 같다. 각 샘플의 image에는 173,662 SNP probe의 signal intensity를 포함하고 있으며, 각 probe는 하나의 SNP를 대변하고 있다. Genomic DNA는 hybridization과정을 통하여 각 probe에 특이적으로 반응하게 되며, beadchip 분석을 통하여 whole-genome SNP profiling이 가능하다. 체세포 공여견과 복제 검역탐지견의 유전학적 동질성 평가는 검출된 SNP를 토대로 진행하였다. SNP genotype calling은 BeadStudio 3.2 software의 Genotyping Module 3.3.8을 이용하였다. 17만 SNP의 genotype을 토대로, clustering analysis, 3D PCA analysis, Fst test를 진행하였다.

(나) case-control association test를 통한 유전학적인 지표 발굴

검역탐지건의 유전학적 지표를 발굴하기 위하여 Illumina의 canineHD BeadChip을 이용하여 각 샘플(비글)의 SNP와 CNV를 검출한다. BeadChip을 이용한 whole-genome SNP genotyping방법은 위의 설명과 같다. 검역탐지건의 유전학적 지표 발굴은 검출된 SNP와 CNV를 토대로 case-control association test를 진행하여 우수검역탐지건 그룹과 일반 비글 그룹간에 유의한 차이를 나타내는 마커를 발굴한다. 우선 실험을 통해 얻은 genotyping data는 SNP call rate, reproducibility, HWE test등의 QC과정을 통해 probe filtering을 한다. Calling된 genotype에 genetic model을 적용하여 case-control association study를 진행한다. 통계적으로 유의한 SNP marker를 선별하며, 이 SNP marker는 검역탐지건의 유전학적 지표로 활용한다. 이렇게 찾아진 유의한 SNP marker는 Rule Mining 분석 방법을 이용하여 최적의 marker 조합을 찾는다. 아래 그림은 rule mining의 원리를 나타내고 있다.

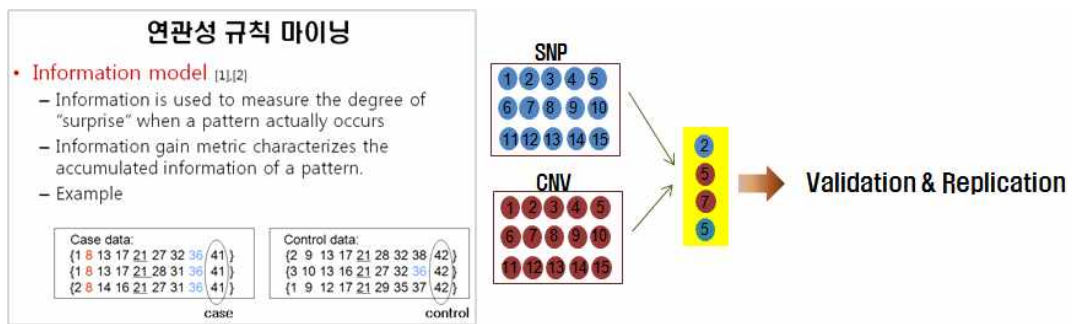


그림 39 연관성 규칙 마이닝의 원리

(2) 후각관련유전자의 polymorphisms 비교

우수 검역탐지건의 후각기능과 관련한 유전소인을 기 위하여 5개의 canine OR gene에 대해 direct-sequencing을 진행하였다(Lesniak et al., 2008, J Hered). 이를 위해 PCR primer를 설계하였다. PCR reaction은 Toyobo사의 KOD FX taq polymerase를 이용하였으며, PCR 반응 조건은 95°C 2분 반응 후 98°C 10초, 61°C 30초, 72°C 1분간 35회 반응하였다, 반응이 끝난 PCR product는 Affymetrix사의 ExoSAP-IT을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR product로 direct-sequencing 하였으며, DNASTar로 SNP genotyping을 수행하였다. Case-control association test는 SNP genotype을 바탕으로 진행되었으며, Plink software가 사용되었다.

나. 연구수행 결과

(1) Whole-genome SNP array를 이용한 SNP, CNV의 검출

(가) CanineHD beadchip의 이용

① 36두의 개에 대한 전장 SNP 분석

복제견과 체세포 공여견간의 유전학적인 동질성을 평가하기 위해 Illumina CanineHD BeadChip을 이용하여 복제마약탐지견 7두(리트리버), 체세포공여견 1두(리트리버), 복제검역탐지견 7두(비글), 체세포공여견 1두(비글), 대조군 20두(비글)에 대한 전장 SNP 분석을 완료하였다. SNP 분석에는 BeadStudio 3.2가 사용되었으며, genotype calling에는 Genotyping Module 3.3.8이 사용되었다. Call rate, Reproducibility, Heritability, HWE tset등의 QC과정을 통해, 전체 173,662 SNP probe 중, 6,975 SNP probe가 filter 되었으며, 최종적으로 166,687 SNP probe가 향후 유전학적 동질성 평가에 사용되었다.

② Clustering 분석

36샘플의 clustering 분석에는 hierarchical clustering 방법이 사용되었으며, 분석 조건은 Euclidean distance와 average linkage로 설정되었다. Hierarchical clustering 분석 결과, 리트리버 8두와 비글 28두간의 유전적 거리가 가장 먼 것으로 확인되었다(node height=429.69). 대조군인 20두의 비글 샘플들 간 유전적 거리는 각 개체간 유사한 값을 나타내었다 (average node height=310.46, range=250-390). 복제마약탐지견들(리트리버)간 유전적 거리는 평균 8.2 (range=0-41), 복제검역탐지견들(비글)간 유전적 거리는 평균 1.3 (range=0-4)이었다.

이러한 결과는, 복제를 통해 생산된 개들이 일반 독립된 개들이 갖는 유전체에 비해 상당히 동질적임을 나타내는 결과이다. 서로 다른 종간의 유전체는 같은 종 내 각 개체들이 갖는 유전체에 비해 상대적으로 이질적이며, 이는 각 종의 특성이 유전적인 소인에 기인할 수 있다는 증거가 될 수 있다. 아래 그림은 hierarchical clustering 분석 결과를 나타내고 있다.

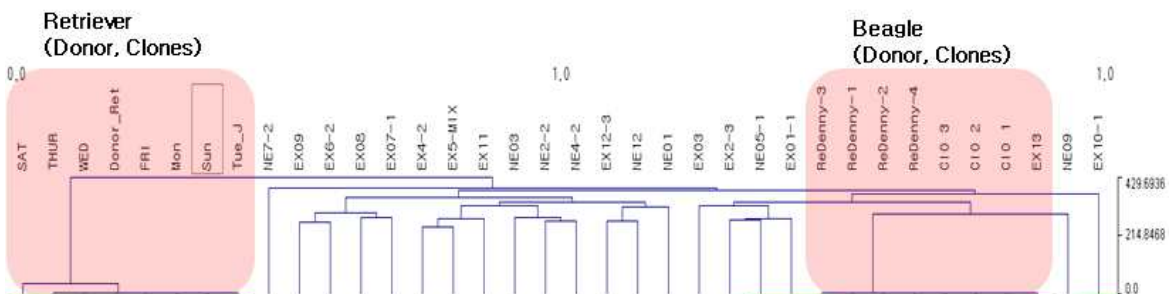


그림 40 SNP genotype을 이용한 cluster 분석 결과

③ 3D PCA 분석

36샘플의 3D PCA 분석 결과는 아래 그림과 같다. 20두의 독립된 비글들은 검은 색 점으로 표시되며, 다양한 각도로 보았을 때 불규칙적으로 서로 다른 위치에 분포하고 있는 것을 확인할 수 있다. 각 점들 간의 거리는 유전적으로 얼마나 가까운지를 보여준다. 복제견들과 그 체세포 공여견은 마약탐지견(리트리버, 녹색)과 검역 탐지견(비글, 빨간색) 모두에서 동일한 위치에 분포하고 있었다. 3D PCA 분석 결과도 hierarchical clustering결과와 같이 복제된 개체들간, 그리고 복제된 개체와 체세포 공여견간의 유전체는 동질적임을 나타내고 있다.

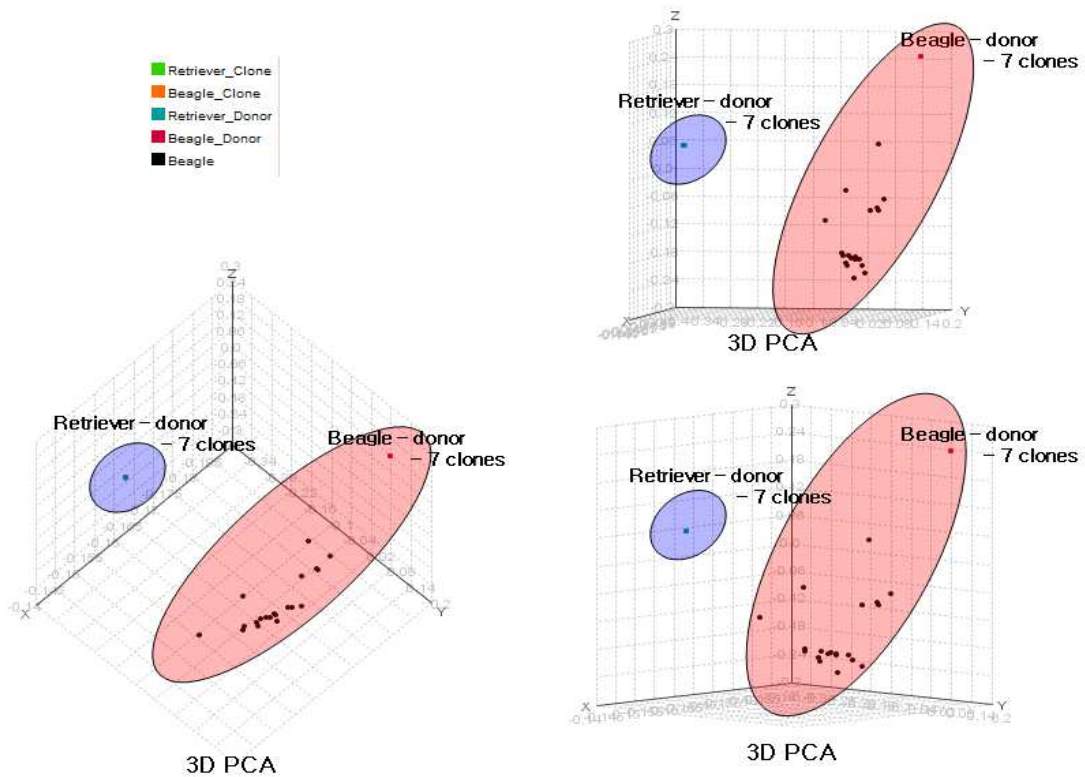


그림 41 PCA 분석 결과

④ 8두의 개에 대한 전장 CNV 분석

복제견과 체세포 공여견간의 유전학적인 동질성을 평가하기 위해 NimbleGen의 aCGH array를 이용하여 복제마약탐지견 7두(리트리버), 체세포공여견 1두(리트리버)에 대한 전장 CNV 분석을 완료하였다. aCGH 실험의 대조 샘플은 마약탐지견의 체세포 복제견을 사용하였다. CNV 분석에는 BioDiscovery의 NEXUS4가 사용되었으며, CNV calling에는 RankSegmentation algorithm이 사용되었다.

CNV 분석결과, 7두의 복제 마약탐지견 중 5두에서는 CNV가 발굴되지 않았으며, 이는 CNV의 측면에서 복제견 5두는 체세포 공여견과 전장 유전체가 같음을 나타낸다. 나머지 2두의 복제견에서 체세포 공여견과는 다른 5구역의 CNV를 확인하였으며, 아래 표는 체세포 공여견과 복제견간의 CNV 분석에서 발굴된 5 CNV 구역

을 나타내고 있다. 이 중, X염색체에 위치한 NLGN4X 유전자는 일본과 한족에서 자폐증과 관련되어 있다는 보고가 있다. 또한 STS 유전자는 지적장애와 관련이 있다는 보고가 있으며, 하지만 CNV가 발굴된 복제건에서의 표현형의 차이는 관찰되지 않았으며, 이는 체세포 모자이즘에 의해 유전형이 표현형으로 발현되지 않았을 것으로 예상된다.

표 34 체세포 공여건과 복제건간의 CNV 분석에서 발굴된 5 CNV 구역

Clone	Chr	Start	End	Length	Event	Genes*	Reported CNV**
Clone-3	15	32,983,895	33,026,044	42,150	CN Gain	-	Yes
Clone-3	19	23,000,913	23,338,557	337,644	CN Gain	-	Yes
Clone-3	32	41,654,990	41,731,424	76,435	CN Gain	-	Yes
Clone-3	X	1,401,988	6,598,355	5,196,367	CN Gain	<i>ARSE, ARSH, OBP, GYG2, ARSD, ARSF, MXRA5, PRKX, PRKY, NLGN4T, NLGN4X, HDHD1, STS, PNPLA4, AKL1, TAF9, APOO, SHROOM2</i>	Yes
Clone-6	2	71,652,481	71,688,546	36,066	CN Loss	<i>ZBTB8A, PCNAP1</i>	No

앞서 발굴된 5종의 CNV 중 4종은 1두의 복제건에서 발굴된 것이다. 발굴된 CNV가 artifact일 가능성을 확인하기 위하여 dye-swap방법을 이용하여 aCGH를 다시 수행하였다. Dye-swap은 aCGH에 사용되는 형광물질을 반대로 사용하는 실험 방법으로, 만약 처음 발굴된 CNV가 정말 존재한다면 dye-swap aCGH에서는 CNV의 패턴이 정 반대로 나타나게 된다. 아래 그림은 4 CNV가 발굴된 샘플의 dye-swap 결과를 나타내고 있으며, 그림과 같이 4 CNV 모두에서 역상의 패턴을 확인할 수 있었다.

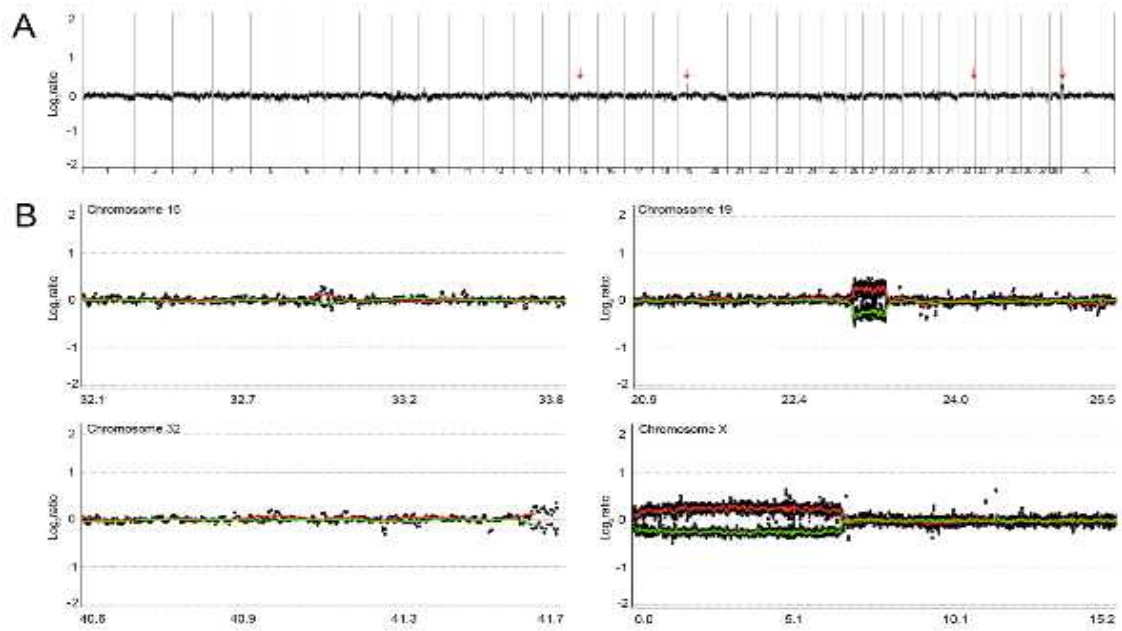


그림 42 CNV가 발굴된 샘플의 dye-swap 결과

위의 결과를 통해 발굴된 CNV는 de novo CNV면서 somatic mosaicism인 것으로 확인되었다. 이러한 de novo CNV, somatic mosaicism의 발굴에는 artifact가 발생할 가능성이 높다고 알려져 있으며, 가능한 많은 검증을 필요로 한다. 따라서 Illumina CanineHD BeadChip을 이용하여 발굴된 CNV를 다시 검증하였으며, 아래 그림은 19번 염색체와 X 염색체에서 발굴된 CNV의 검증 결과를 나타내고 있음. 위의 log2ratio plot은 aCGH결과를 나타내며, 아래 B allele frequency plot은 illumina SNP array결과를 나타낸다. aCGH에서 발굴된 CNV-gain은 SNP array에서 B allele frequency가 깨진 것으로 확인되었고, aCGH에서 발굴된 나머지 3 CNV는 SNP array의 resolution 이 낮기 때문에 확인할 수 없었다.

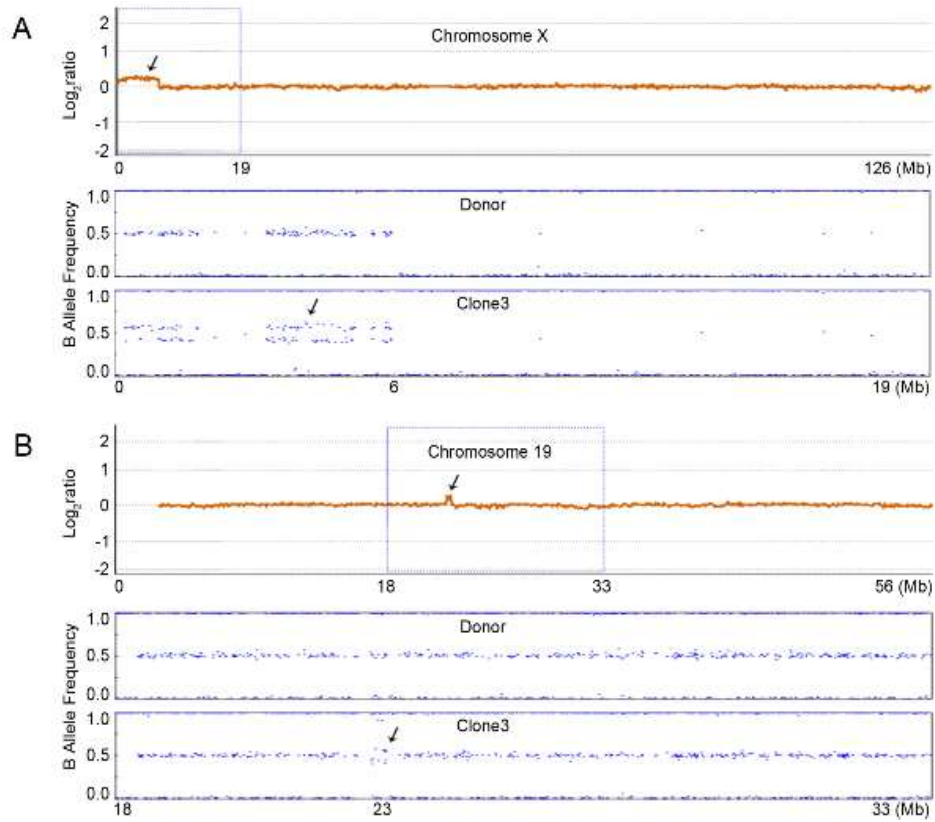


그림 43 19번 염색체와 X 염색체에서 발굴된 CNV의 검증

Illumina CanineHD BeadChip의 B allele 패턴 분석을 통해, 복제건에서의 LOH를 새롭게 확인할 수 있었다. 아래 그림은 LOH가 발견된 2번 염색체를 나타내고 있으며, 체세포 공여견과 6두의 복제견에서는 없던 LOH가 1두의 복제견(Clone-6)에서만 발견된 것을 확인하였다.

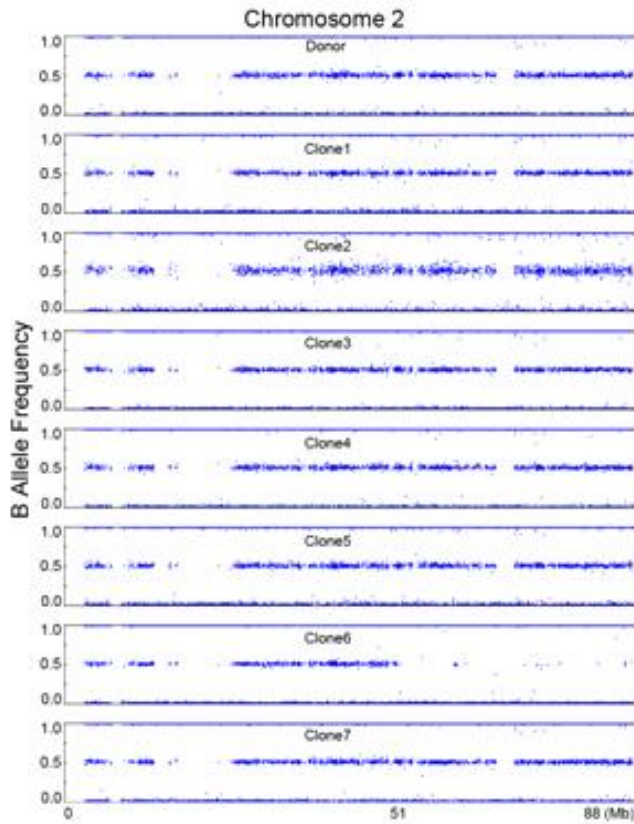


그림 44 LOH가 발견된 2번 염색체

Illumina CanineHD BeadChip의 low resolution으로 검증할 수 없었던 3 CNV를 확인하기 위해 qPCR 실험을 수행하였다. 아래 그림은 5 CNV의 aCGH결과(왼쪽)와 qPCR결과(오른쪽)를 나타내고 있다. qPCR실험에서 4 CNV는 검증되었으며, 32번 염색체의 CNV-gain은 검증되지 않았다.

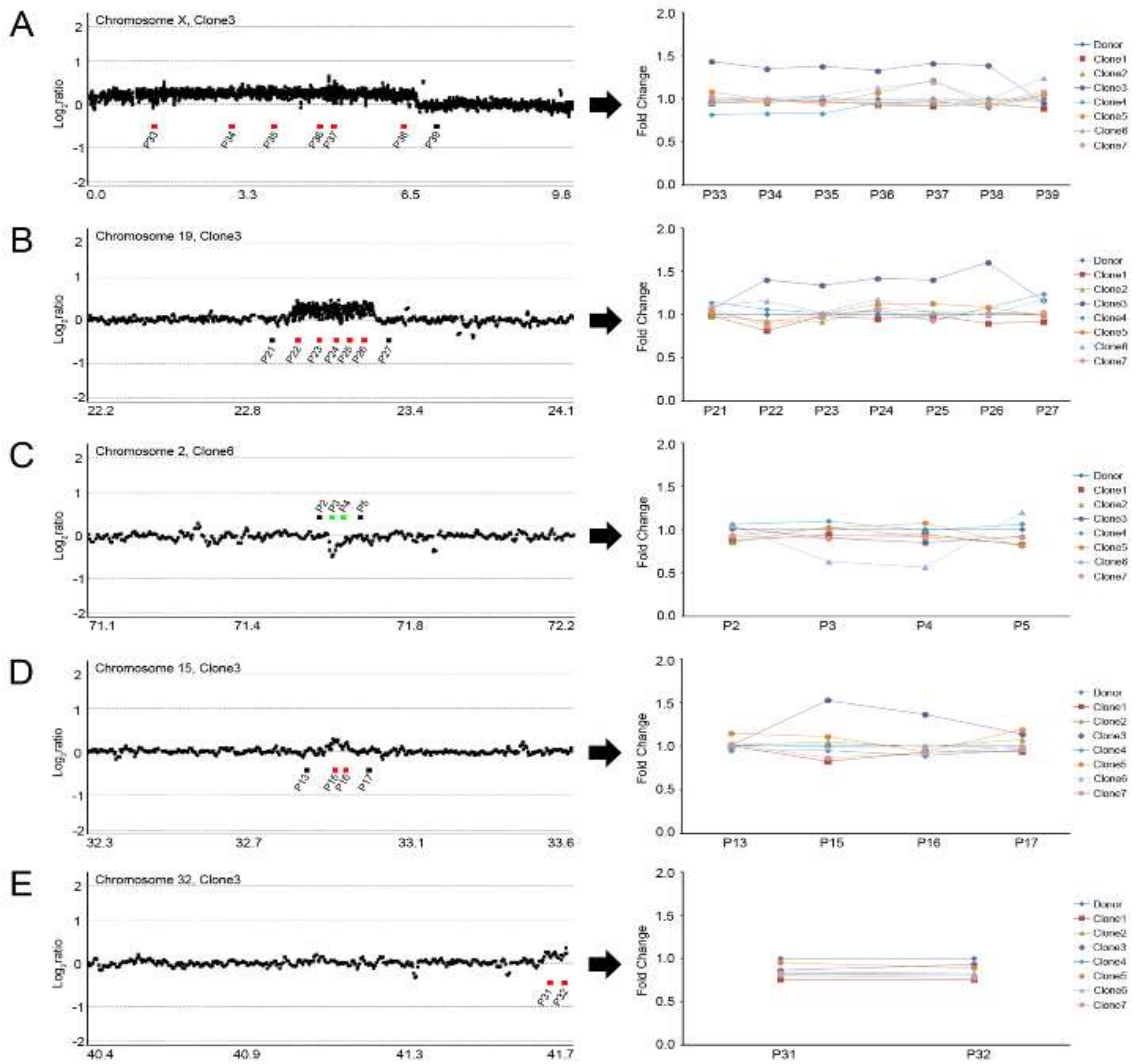


그림 45 5 CNV의 aCGH결과(왼쪽)와 qPCR결과(오른쪽)

(나) case-control association test를 통한 유전학적인 지표 발굴

Illumina CanineHD beadchip을 진행한 우수 검역탐지견 13두와 일반 비글 8두에 대해 SNP 분석을 하였다. 17만개 SNP probe를 바탕으로 genotyping을 분석하였으며, Genotyping module 3.3.8이 사용되었다. 상기 분석조건 하에서 우수 검역탐지견 13두와 일반 비글 8두의 SNP 분석 결과 평균 SNP call rate는 98.9%였다. 우수 검역탐지견과 일반 비글간의 유의한 SNP를 발굴하기 위해 association test를 하였으며, additive model을 사용하였다. SNP association test 결과, 113종의 SNP가 우수 검역탐지견과 일반 비글간에 유의한 차이($p < 0.01$)를 나타냈으며, 아래 그림은 유의한 SNP의 list와 그 예를 나타내고 있다.

SNPName	SNP	Chr	MapInfo	rfd.ods	rfd.pvalue
BICF2P1090057	[A/G]	32	26,344,626	0.021966071	0.003022685
BICF2P471203	[T/C]	11	66,170,661	0.011966071	0.003022685
BICF2P1203931	[A/G]	37	17,406,287	70.59277454	0.004201379
BICF2S2118369	[T/C]	11	66,088,007	0.019428225	0.004204943
TIGR2P214746_n5840175	[T/C]	16	66,487,696	39.84546445	0.006990079
BICF2P55529	[T/C]	12	62,846,170	39.84546445	0.006990079
BICF2P5917	[A/C]	30	14,820,118	0.023096908	0.006990079
TIGR2P16643_r089250	[A/G]	1	21,004,708	0.023096908	0.006990079
BICF2G630658001	[A/C]	34	66,864,000	0.023096908	0.006990079
BICF2P5430013	[A/G]	18	38,400,400	0.023096908	0.006990079
BICF2G630957	[A/G]	X	11,040,670	7.243034792	0.006667602
BICF2S2306377	[C/G]	11	67,401,887	0.026513492	0.007137235
BICF2P98773	[A/G]	28	67,874,890	0.026513492	0.007137235
BICF2S2311911	[T/C]	5	6,887,308	0.026513492	0.007137235
BICF2G630814520	[T/C]	16	69,026,848	0.026697376	0.007443785
BICF2P59524	[T/C]	7	4,472,618	0.026697376	0.007443785
BICF2P215393	[A/G]	8	62,406,661	36.28565456	0.007488314
BICF2P142502	[A/C]	23	39,903,987	35.40148666	0.007708383
BICF2P95104	[A/G]	1	20,098,402	35.40148666	0.007708383
BICF2G63093946	[T/C]	32	26,404,272	0.028247401	0.007708383
BICF2P900148	[T/C]	22	66,222,768	0.028247401	0.007708383
BICF2P530862	[T/C]	22	66,478,887	35.40148666	0.007708383
BICF2G630650335	[T/C]	21	21,364,184	50.16319654	0.008187156
BICF2P5273761	[A/C]	9	66,822,490	35.05208996	0.008188753
BICF2G63089717	[A/G]	32	26,709,141	0.028953125	0.008425403
BICF2P20035	[A/G]	11	66,317,874	0.028953125	0.008425403
BICF2P992168	[T/C]	11	67,022,888	0.028953125	0.008425403
BICF2G630714678	[A/C]	1	21,818,718	0.028953125	0.008425403
BICF2P96669	[A/G]	32	26,818,401	0.028953125	0.008425403
TIGR2P151840_n5674188	[T/C]	11	66,208,048	0.028953125	0.008425403
BICF2G630714751	[T/A]	1	21,488,908	0.028953125	0.008425403
BICF2G630989412	[A/G]	1	67,878,078	0.028953125	0.008425403
BICF2G630919445	[A/C]	1	67,864,814	0.028953125	0.008425403
BICF2G630989455	[A/G]	1	67,867,078	0.028953125	0.008425403
BICF2G630989526	[T/C]	1	67,868,448	0.028953125	0.008425403
BICF2G630989590	[T/C]	1	67,864,887	0.028953125	0.008425403
BICF2G630990511	[A/C]	1	66,404,191	0.028953125	0.008425403
BICF2P1017660	[T/C]	1	67,142,777	0.028953125	0.008425403
BICF2P1043423	[A/C]	1	66,760,167	0.028953125	0.008425403
BICF2P1047836	[A/G]	32	66,121,848	0.028953125	0.008425403

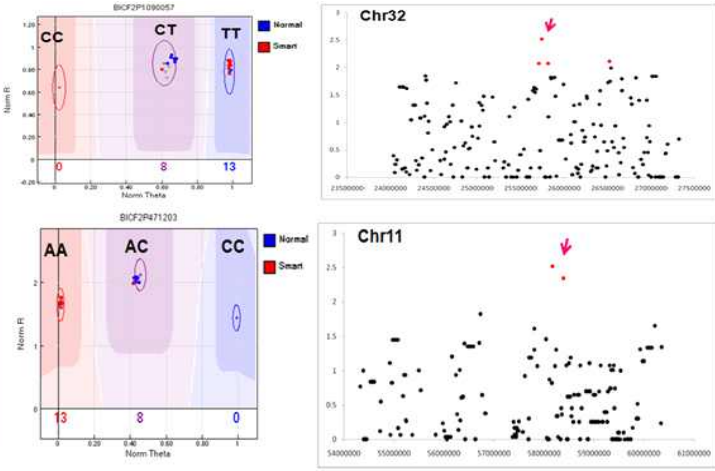


그림 46 우수 검역탐지견 13두와 일반 비글 8두에 대해 SNP 분석

113종의 SNP를 바탕으로 연관성 규칙 마이닝 분석을 진행하였으며, 아래 그림은 연관성 규칙 마이닝의 기본 원리를 의미한다.

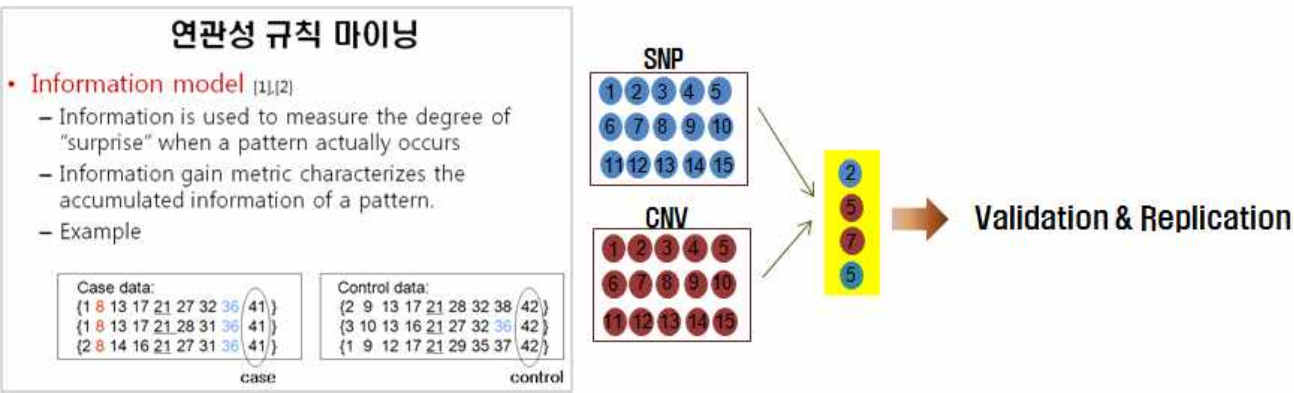


그림 47 SNP를 바탕으로 연관성 규칙 마이닝의 기본 원리

연관성 규칙 마이닝 분석 결과, 14개의 SNP marker조합에서 92%이상의 score가 확인되었다. 아래 그림은 연관성 규칙 마이닝의 결과를 나타내고 있다. 14개 조합은 15개의 unique SNP을 포함하고 있으며, PPP3CA 유전자가 위치하고 있다. 객관적 검증을 위하여 15개 unique SNP marker set에 대해 independent-replication을 실시해야 한다.

15 Unique SNPs
(PPP3CA gene)

Decoded Rules	
(1)	BICF2G630128443 = {CC}, BICF2G630458001 = {GG} --> Smt (0.92)
(2)	BICF2G630128443 = {CC}, BICF2P1090057 = {CC} --> Smt (0.92)
(3)	BICF2G630128443 = {CC}, BICF2P1142502 = {GG} --> Smt (0.92)
(4)	BICF2G630128443 = {CC}, BICF2P200182 = {CC} --> Smt (0.92)
(5)	BICF2G630128443 = {CC}, BICF2P408362 = {TT} --> Smt (0.92)
(6)	BICF2G630128443 = {CC}, BICF2S23057479 = {AA} --> Smt (0.92)
(7)	BICF2G630128443 = {CC}, G198f105176 = {TT} --> Smt (0.92)
(8)	BICF2G630590374 = {GG} --> Smt (0.92)
(9)	BICF2P146373 = {AA} --> Smt (0.92)
(10)	BICF2P338655 = {CC} --> Smt (0.92)
(11)	BICF2S22938023 = {TT} --> Smt (0.92)
(12)	BICF2S22942824 = {AA} --> Smt (0.92)
(13)	BICF2S2347337 = {GG} --> Smt (0.92)
(14)	BICF2S23528071 = {TC} --> Smt (0.92)
(15)	BICF2G630128443 = {CC}, BICF2G630454037 = {TT} --> Smt (0.91)
(16)	BICF2G630128443 = {CC}, BICF2G630454275 = {TT} --> Smt (0.91)
(17)	BICF2G630128443 = {CC}, BICF2G630454280 = {TT} --> Smt (0.91)
(18)	BICF2G630128443 = {CC}, BICF2G630533788 = {CC} --> Smt (0.91)

그림 48 SNP를 바탕으로 연관성 규칙 마이닝의 결과

체세포 공여건과 복제건 7두에 대해 15종의 unique SNP marker set genotype을 확인한 결과 모든 복제건에서 체세포 공여건과 같은 genotype을 갖는 것이 확인되었다.

(2) 후각관련유전자의 polymorphisms 비교

우수 검역탐지견 13두와 일반 비글 8두에 대해 후각관련 유전자의 SNP 비교 분석을 위해 5개 유전자를 선택하여 sequencing을 수행하였으며, 후각관련 유전자 5개의 선택은 Lesniak의 논문을 참조하였다 (Lesniak et al., 2008, J Hered). 5개 OR 유전자의 PCR을 위해 primer를 설계하였으며, 설계된 primer의 sequence는 아래 표와 같다.

표 35 5개 OR 유전자의 PCR primer

gene	Chromosome location	family	subfamily	length	GeneBank association number	Forward	Reverse
cOR1P2	CFA9	1	P	954	EF451962	ATGGCACATCACATTCATCG	GCAAAGGCATTTTTCTTG
cOR51H5	CFA21	51	H	957	EF451963	GCCTGTGCATATTCGCTC	TTCTCTCAAATTGGCAGATCC
cOR52P3	CFA21	52	P	981	EF451965	GACTGAAAGTGCCTCCATC	ACCCAGGTGTCCCAGTAAAA
cOR52N9	CFA21	52	N	963	EF451964	GCCTACCTCCTATCAGCCA	ACGCTCAAGAAATCTCCTCTG
cOR9S13	CFA25	9	S	951	403901	GATCCCAGACTGAGGAGACC	TCAGTGACTCTCCCCCACTC

PCR reaction은 Toyobo사의 KOD FX taq polymerase를 이용하였으며, PCR 반응 조건은 95°C 2분 반응 후 98°C 10초, 61°C 30초, 72°C 1분간 35회 반복시켰다. 반응이 끝난 PCR product는 Affymetrix사의 ExoSAP-IT을 이용하여 정제한후, 정제된 PCR product로 direct-sequencing 하였으며, DNASTar로 SNP genotyping을 수행하였다. 아래 그림은 OR 유전자 특이적 primer를 이용하여 PCR을 수행한 예를 나타내고 있다.

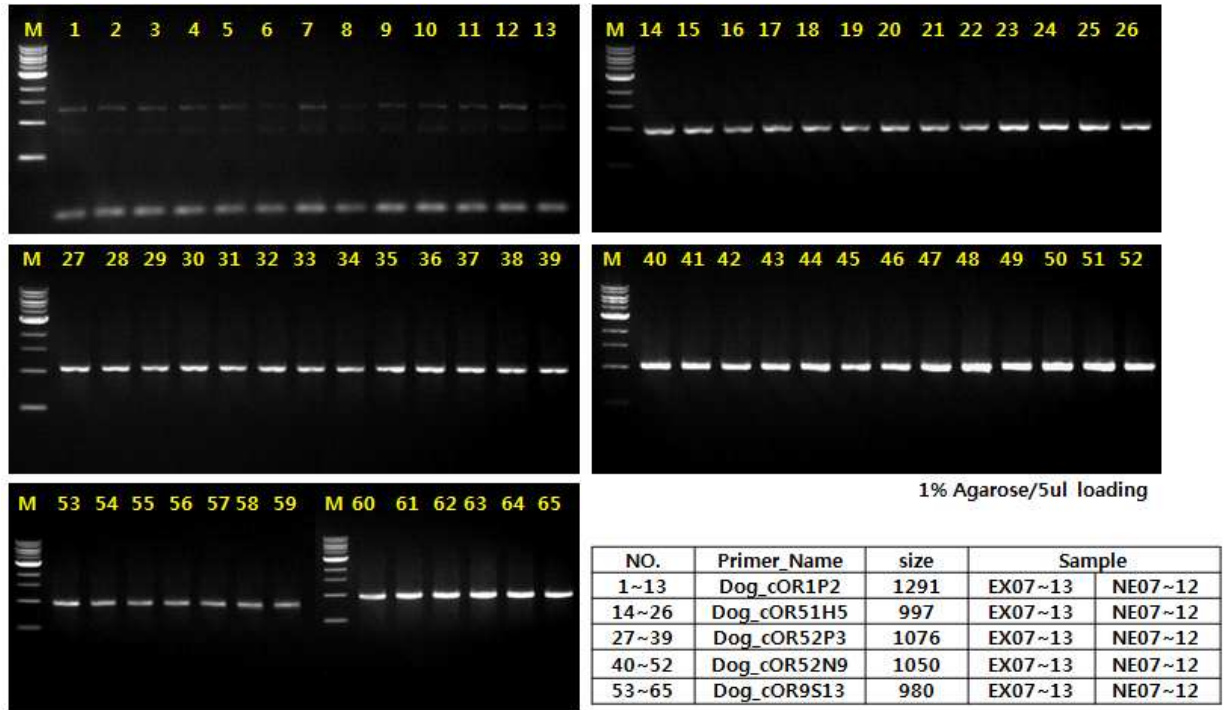


그림 49 OR 유전자 특이적 primer를 이용한 PCR 결과

5개 OR gene의 direct-sequencing 결과 17종의 SNP site를 발굴하였다. 17종의 SNP중, 16종의 SNP는 이미 알려진 SNP site였으며, 1종은 본 연구에서 새롭게 발굴된 SNP site였다. 아래 표는 17종의 SNP 정보를 나타내고 있다. **우수 검역탐지건과 대조군간의 SNP association test 결과, 1종의 SNP만이 통계적으로 유의한 차이(P<0.05)를 나타냈다.**

Gene	SNP site	Ue(Pearson)	OR	Lower	Upper
cOR1P2	703 T>C	0.142	0.353	0.106	1.180
	912 G>A	0.171	0.440	0.141	1.369
cOR51H5	112A>G	0.093	6.579	0.709	61.083
	455T>C	1.000	1.091	0.141	8.420
	408 T>C	0.704	0.600	0.127	2.838
cOR51P3	59 G>C	0.480	0.958	0.882	1.042
	116T>C	0.145	0.368	0.113	1.198
cOR52N9	117C>T	0.011	0.154	0.036	0.655
	118A>G	0.145	0.368	0.113	1.198
	176A>G	0.145	0.368	0.113	1.198
	288G>T	0.480	0.958	0.882	1.042
	376G>C	-	-	-	-
cOR52H9	370G>A	0.136	2.821	0.837	9.509
	414T>G	0.751	1.373	0.386	4.876
	450G>A	0.751	1.373	0.386	4.876
	744T>C	0.751	1.373	0.386	4.876
	855C>T	0.533	1.667	0.479	5.794

그림 50 17종의 SNP 정보

유의한 차이를 나타낸 SNP의 정보를 아래 표에 나타냈다. 해당 SNP는 C/T type의

SNP이며, C 염기가 T로 변하면서 amino acid의 변화를 유발하는 것을 확인하였다. **우수 검역탐지견들은 일반 비글에 비해 C의 빈도가 6.5배 많은 것을 확인하였다.**

표 36 유의한 차이를 나타낸 SNP의 정보

Gene	Residue	Genotypes	Polymorphism	Type	Overall Genotype frequency	Smart Genotype frequency	Normal Genotype frequency
cOR52N9	Thr ⁴⁰ Ala	CC	117C>T	Substitution	0.560	0.769	0.333
		CT			0.320	0.231	0.417
		TT			0.120	0.000	0.250

제 5 절 복제 검역탐지견(1차년도)의 영상학적 분석을 통한 유사성 및 차이점 분석

1. 안저 카메라를 이용한 복제견의 유전학적 유사성 및 차이점 분석

가. 연구수행 방법



그림 51 검역 탐지 복제견의 망막

검역 탐지 복제견의 안저 촬영을 통한 망막 영상을 확보 후 분석은 이전의 연구에서 실시되었던 소와 양에서의 망막 획득 후 비교를 위한 지표를 이용하였다 (Rusk et al, 2006). 지표는 아래그림에서처럼 ① 혈관 가지의 숫자 ② main large vessel에서 첫 번째 혈관 가지 사이의 각도 ③ 신경 유두에서 첫 번째 혈관 가지까지의 거리를 설정하였다.

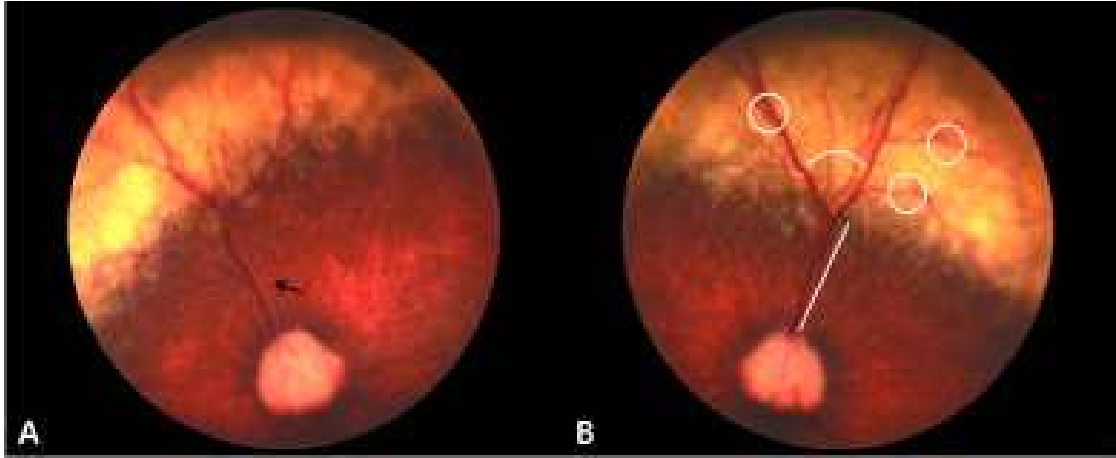


그림 52 망막에서 분석을 위한 지표 설정. (A) Main large vessel 설정. (B) 혈관수, 각도, 거리 설정

나. 연구수행 결과

각 개체에서 측정된 결과는 표와 같다. 검역 탐지 복제건에서 망막의 특징은 복제되지 않았으며, 개체별로 다양성을 나타내는 것으로 확인되었다. 3마리의 개체에서 분석 결과는 유의적인 차이 및 동일함을 확인할 수가 없었다. 3마리라는 부족한 개체 수로 인해서 혈관 형성의 경향 및 특징을 분석하는 데 한계가 있는 것으로 생각되며 차후 더 많은 개체가 있으며 비교 분석하는 지표로 활용 가능할 것으로 보인다.

표 37 망막 지표 분석 결과

	Jan		Feb		March	
	Right	Left	Right	Left	Right	Left
Vessel number	5	4	3	4	3	5
Angle between vessels	91.91	41.85	82.22	27.41	64.82	1113.30
Distance from optic disc to first branch	184.48	159.54	153.26	130.50	274.56	274.51

2. 심장 초음파를 이용한 복제건의 유전학적 유사성 및 차이점 분석

가. 연구수행 방법

이전의 연구에서 복제한 동물들 (소, 양, 돼지)에서 우심의 기능 이상 및 폐 고혈압은 흔한 심혈관계 이상으로 보고되어 있다. 정확한 원인은 아직 밝혀지지 않았으나 복제 과정

에서 발생하는 이상 때문인 것으로 생각되고 있다. 복제건의 경우도 다른 동물들과 같이 복제 과정에서 이상이 발생하는지 여부를 평가하기 위해 심장 초음파를 이용한 평가를 실시하였다.

(1) Right ventricular outflow tract에서 main pulmonary artery flow 평가

폐의 혈압이 증가하게 되면 주 폐동맥에서 혈류 모양의 변화가 발생하게 되며 혈류의 ejection time (Et)의 감소 및 acceleration time (At)에 대한 ejection time (Et)의 비율이 감소하게 된다. 또한 주 폐동맥의 지름이 증가하게 된다. 이전의 연구에서 폐 고혈압을 예측할 수 있는 참고 기준을 설정해 놓았으며, 복제건에서 측정된 결과를 이와 비교하여 분석하였다.

(2) Right heart 기능 평가

우심의 기능을 평가하기 위해 right tricuspid annulus에서 Tissue Doppler Imaging (TDI) velocity를 측정하였다. 우심의 수축 기능이 떨어지게 되면 Stdi의 속도가 10.5 이하로 떨어지게 되며 전반적인 myocardial function을 측정하기 위한 Global TDI (G-TDI)의 경우 11.8 이하로 떨어지게 된다. 또한 우심실의 이완 기능을 평가하기 위해 Tricuspid inflow를 측정 하였다. Early peak (E 파)와 Late peak (A 파)의 속도 측정 후, E파 와 A파의 비율을 분석하였다.

나. 연구수행 결과

(1) Right ventricular outflow tract에서 main pulmonary artery flow 평가

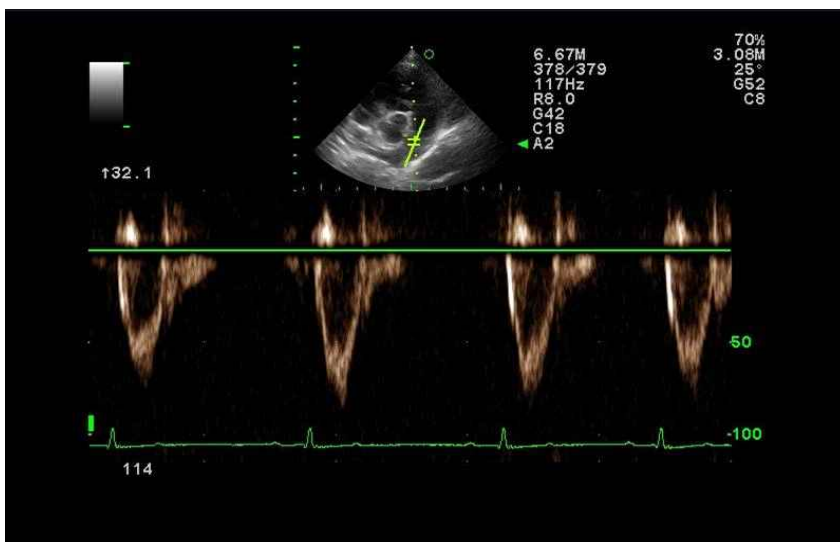


그림 53 폐동맥 혈류의 모양

폐동맥 혈류의 모양은 정상 개들에서 볼 수 있는 양측으로 대칭인 모습을 나타냈으며, 폐동맥의 크기, AT의 시간 및 AT/ET의 비율 또한 정상 참고 수치를 벗어나지 않았다.

표 38 폐동맥 크기 및 혈류 측정

	Jan	Feb	Mach	Reference
MPA:AO	0.88	0.87	0.8	Under 0.98
AT	84	80	92	Exceeding 58
At:Et	0.43	0.41	0.42	Exceeding 0.31

(2) Right heart 기능 평가

우심의 기능 또한 수축 기능에 문제가 없었으며, 이완 기능은 정상으로 판단되었다. March의 G-TDI 수치에서 정상 범위 보다 떨어진 모습을 보였으나 Stdi 속도 및 이완 기능이 정상인 것으로 볼 때, 전반적인 myocardial 기능은 정상이지만 일부 심근에서 이상이 있을 가능성을 생각할 수 있다. 복제 검역 탐지견에서 폐 고혈압을 예측할 수 있는 증거는 나타나지 않았으며, 또한 우심의 기능은 정상으로 평가 되었다. 하지만 이전의 다른 복제 동물에서 나타났던 폐 고혈압과 우심 기능 이상 또한 복제견에서 나타날 수 있을 것으로 예측되며, 심장 초음파를 통해 비침습적으로 추후 발생할 수 있는 가능성을 screening 할 수 있는 지표로 사용 가능할 것으로 보인다.

표 39 검역 탐지 복제견의 우심 평가를 위한 수치 측정

	Jan	Feb	March	Reference
Tricuspid Stdi	14.3	11.6	10.8	Exceeding 10.5
Tricuspid E/Atdi	0.97	1.33	0.96	Exceeding 1.12
Tricuspid G-TDI	13.87	15.42	10.36	Exceeding 11.8
Tricuspid E/A ratio	1.39	1.20	1.15	Exceeding 0.8

3. 복제 검역 탐지견의 CT 촬영 및 영상학적 분석

가. 연구수행 방법

(1) 복제견 비강 (Nasal cavity) 구조 비교를 위한 X-ray 촬영

대니와 복제견의 비강 구조를 비교하기 위해 영상 진단 장비인 X-ray(Titan 2000M, Comed, 한국)와 CT(LightSpeed Plus, GE Medical System, LLC, 미국)를 이용하여 비강 부위를 촬영하였다. X-ray는 마취하지 않고 촬영하였으며, CT 촬영은 전신 마취하에

실시하였다. 대니와 복제견의 X-ray 촬영후, Occipital tubulance에서 Mandible symphysis까지의 길이를 측정하여 아래 그림과 같이 비교하였다.

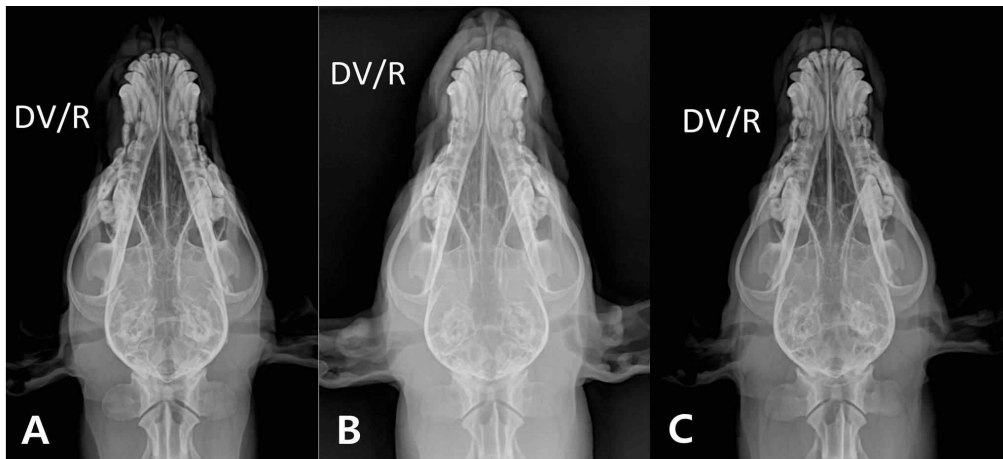


그림 54 X-ray에서 Head size 비교. (A) Jan (B) Feb (C) March

(2) 복제견 비강 (Nasal cavity) 구조 비교를 위한 CT 촬영

CT의 경우, 비강의 구조를 입체적으로 비교할 수 있는 부분인 Frontal sinus volume, Nasal cavity length, Maxillary sinus volume을 아래 그림에서 비교하였다.

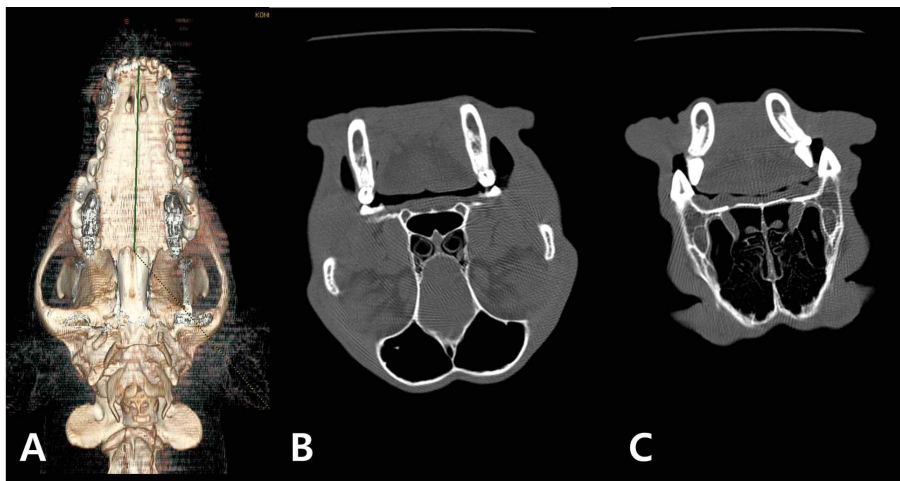


그림 55 CT에서 비강 구조 비교 지표 (A) Nasal cavity length (B) Frontal sinus volume (C) Maxilla sinus volume

나. 연구수행 결과

(1) 복제견 간의 X-ray 영상 및 CT 영상 비교 결과 분석

X-ray영상에서 설정된 지표와 CT에서 설정된 지표를 각각 비교하였으며 결과는 아래 2개의 표와 같다. X-ray에서 비교한 길이와 CT에서 비교한 크기 모두 복제견 간에 유

의적인 차이를 보이지 않았다. X-ray와 CT의 영상을 분석한 결과는 각각의 구조물에 있어서 많이 차이가 나지 않았으며, 세포공여건의 경우 복제견들에 비해 조금씩 수치가 크게 나왔다. 이는 단순히 세포공여건의 신체적인 크기가 복제견에 비해 크다는 것을 의미하며, 그 차이에 있어서 큰 의미는 찾을 수 없다.

표 40 Occipital tubercle에서 mandible symphysis 길이의 X-ray 분석 결과

	단위: mm			
	Danny	Jan	Feb	March
length from occipital tubercle to mandible symphysis	188.7	178.33	181.21	173.29

표 41 Frontal sinus 및 Nasal cavity에 대한 CT 영상 분석결과

	Danny	Jan	Feb	March
Left frontal sinus (cm ³)	7.821	6.706	6.639	5.724
Right frontal sinus (cm ³)	7.371	6.627	6.555	5.266
Left Maxilla sinus (cm ³)	1.341	1.342	1.731	1.210
Right Maxilla sinus (cm ³)	1.328	1.347	1.575	1.220
Nasal cavity (mm)	90.4	87.9	89.2	84.4

4. fMRI를 이용한 공여견과 복제 검역 탐지견의 영상학적인 분석

가. 연구수행 방법

(1) 대조군 및 프로토콜 확립을 위해 일반 비글견에서의 기능적 자기공명영상(fMRI) 촬영 및 영상 기능적 분석

(가) fMRI 촬영 시 후각자극 향기의 종류 및 농도를 설정하기 위하여 target 향과 non-target향의 후보를 여러 가지 선정하여 실험을 실시하기 전 검역탐지견 센터에서 반응을 확인하였다.

(나) fMRI 촬영 시 사용될 마취제의 종류 및 용량을 확립하기 위하여 임상적으로 가장 많이 사용되는 주사마취제인 Mrdetomidine-zolazepam-tiletamine과 신경관련 동물실험에서 많이 사용되는 주사마취제인 pentobarbital sodium을 사용하여 fMRI촬영을 시행하였다. 두 마취제에 대한 영상 결과를 비교하였다.

(다) MRI실의 고자기장(3 Tesla)상태로 의하여 대부분의 전자장치의 설치가 불가하므로

전자장치의 설치 없이 후각자극을 줄 수 있는 후각자극의 회로를 설계하였다.

- (라) fMRI 영상이 최적화되는 촬영 조건 및 후각자극 시간 간격을 확립하기 위하여 기저 상태 (Resting state), 활성화자극상태 (Activation state)의 조건을 조절하여 촬영을 실시하였다.

(2) 복제 검역 탐지건의 fMRI 촬영 및 영상기능적 분석

촬영 개체는 모두 데니의 복제견인 잰, 페브, 마치, 메이, 준, 줄라이로 총 6두의 촬영이 8회에 걸쳐 실시되었다. 당초 세포공여견인 데니의 촬영도 계획했으나 마취에 따른 위험으로 인해 취소되었다. 마취제 및 용량은 기존에 확립된 프로토콜인 Pentobarbital sodium 25mg/kg I.V.로 하되, 마취심도가 너무 낮을 경우 MRI 촬영 중 움직임으로 인한 허상이 발생할 수 있으므로 마취심도가 낮은 개체인 경우 5mg/kg 추가마취 하였다. 6회의 촬영 후 신호가 강하게 뜨지 않은 2두(준, 줄라이)는 추가촬영이 실시되었다. 모든 개체는 마취직후와 촬영중간에 호흡수를 모니터링하여 일정한 호흡수(평균 8회)를 나타내는 것을 확인하였다. 대조군인 일반비글견 촬영과 마찬가지로 같은 3.0T MRI기를 이용하여 촬영을 실시하였다.

(3) 일반 비글견과 복제 검역탐지건의 fMRI 결과 비교연구

일반 비글견 및 복제검역탐지건의 실험과정에서 얻어진 모든 fMRI 영상을 fMRI 분석 프로그램인 Statistical Parametric Mapping (SPM, MRC Cyclotron Unit, London, UK)을 이용하여 시행하였고 SPM은 MATLAB (The MathWorks, Inc, Natick, MA, USA) 환경 하에서 구현되었다. 프로그램을 이용한 전체적인 표준화과정을 시행한 후 얻어진 activation map을 T1 강조영상에 중첩하여 최종적으로 기능적 영상을 획득하였다. 이 영상에서 noise를 제거하고 통계적으로 유의한 활성화 신호만을 선택하기 위해 p값을 역치로 사용하였다. 본 연구에서 유의수준은 $p < 0.01$ 을 기준으로 하였다. 이러한 방법을 통해 진행된 영상분석은 다음과 같은 항목에 대해 진행되었다.

- (가) 일반 비글견과 복제검역탐지건의 검역향에 대한 뇌기능영역의 활성화 신호 평가
- (나) 복제검역탐지견에서 검역향과 비검역향에 대 뇌기능영역의 활성화 신호 평가

나. 연구수행 결과

- (1) 대조군 및 프로토콜 확립을 위해 일반 비글견에서의 기능적 자기공명영상(fMRI) 촬영 및 영상 기능적 분석

- (가) target향은 검역물 중 하나인 사과향으로 설정하였으며 non-target 향은 검역물이 아

닌 인공사과향으로 선정하였다.



그림 56 target향으로 사용된 천연사과농축액(좌)과 non target향으로 사용된 인공사과향(우)

(나) 마취된 개에서 후각자극에 따른 뇌의 기능적 변화는 fMRI를 통해 확인 되었으며 Barbiturate 계통인 Pentobarbital sodium을 이용하였을 때, 해리성 마취제인 medetomidine-zolazepam-tiletamine과 비교하여 후각과 관련된 뇌 영역의 신호가 통계적으로 유의성 있게 높게 확인되었다. 최종적으로 확립된 마취 프로토콜은 pentobarbital sodium 25 mg/kg I.V. 이다.

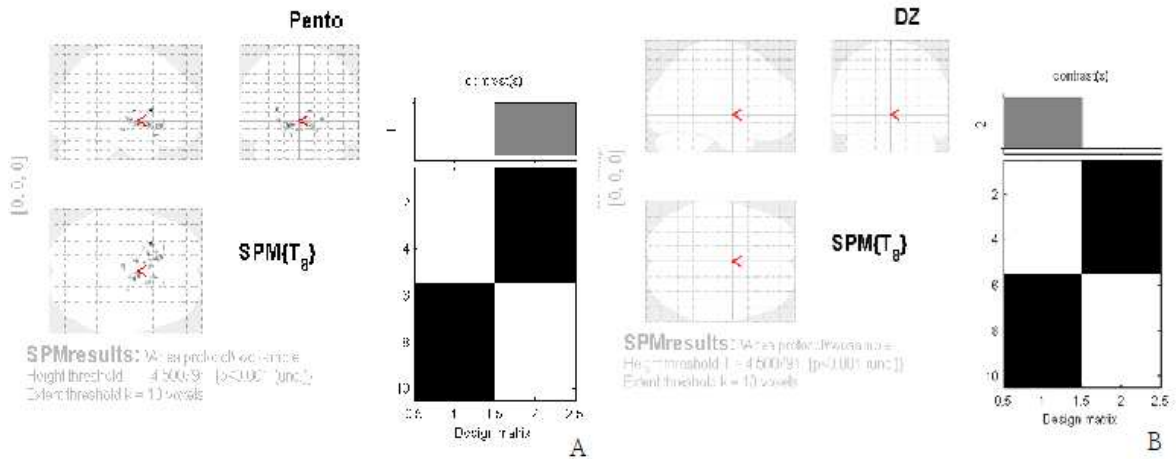


그림 57 그룹1 (Pentobarbital) 과 그룹2(Domitor-Zoletil)를 비교하여 각각 더 높은 활성화 신호를 나타내는 뇌 영역의 모식도. 그룹1이 그룹2에 비해 더 높은 활성화 신호를 나타내는 뇌의 영역이 많은 것을 알 수 있다. (A) 그룹1이 그룹2에 비해 더 높은 활성화 신호를 나타내는 영역. (B) 그룹2가 그룹1에 비해 더 높은 활성화 신호를 나타내는 영역.

(다) 100% 압축공기(Generator) 와 2개의 산소발생기(Oxygen regulator)를 연결하고 각각

증류수와 100% 천연사과주스를 30ml 담는다. 각 산소발생기는 서로 다른 산소코줄 (Nasal cannula)을 통해 비글건의 콧구멍과 직접적으로 연결된다. 100% 천연사과농축액이 담긴 산소발생기는 사과향을 발생시키고 이 회로를 통해 후각자극을 제어하면서 fMRI를 촬영하였다.

(라) 촬영은 기저상태 (Resting state) 20초, 활성화자극상태 (Activation state) 10초로 시행하였고 총 5회 반복하였다.

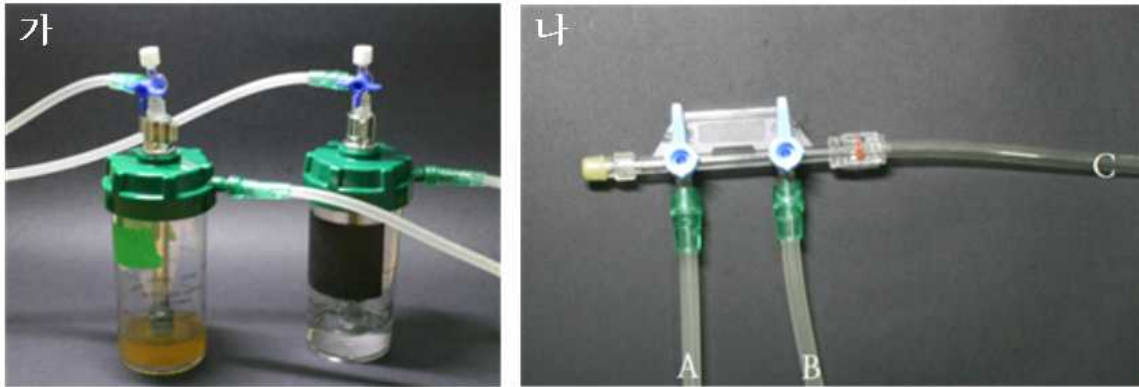


그림 58 가) 향기발생을 위해 사용한 공기발생장치(Oxygen regulator). Target향인 천연사과향 발생을 위해 천연사과농축액을 30ml 넣은 모습(좌)과 대조군인 증류수를 30ml 넣은 모습(우). 나) 향기의 제어를 위해 사용된 2WAY OFF handle. 튜브 C를 통해서 100% 압축공기가 지속적으로 유입된다. 튜브 A는 Target향이 들어있는 oxygen regulator와 연결되며 튜브 B는 증류수가 들어있는 Oxygen regulator와 연결된다. 튜브 A 쪽의 스위치를 조절함으로써 향을 통제할 수 있다.

MRI ROOM

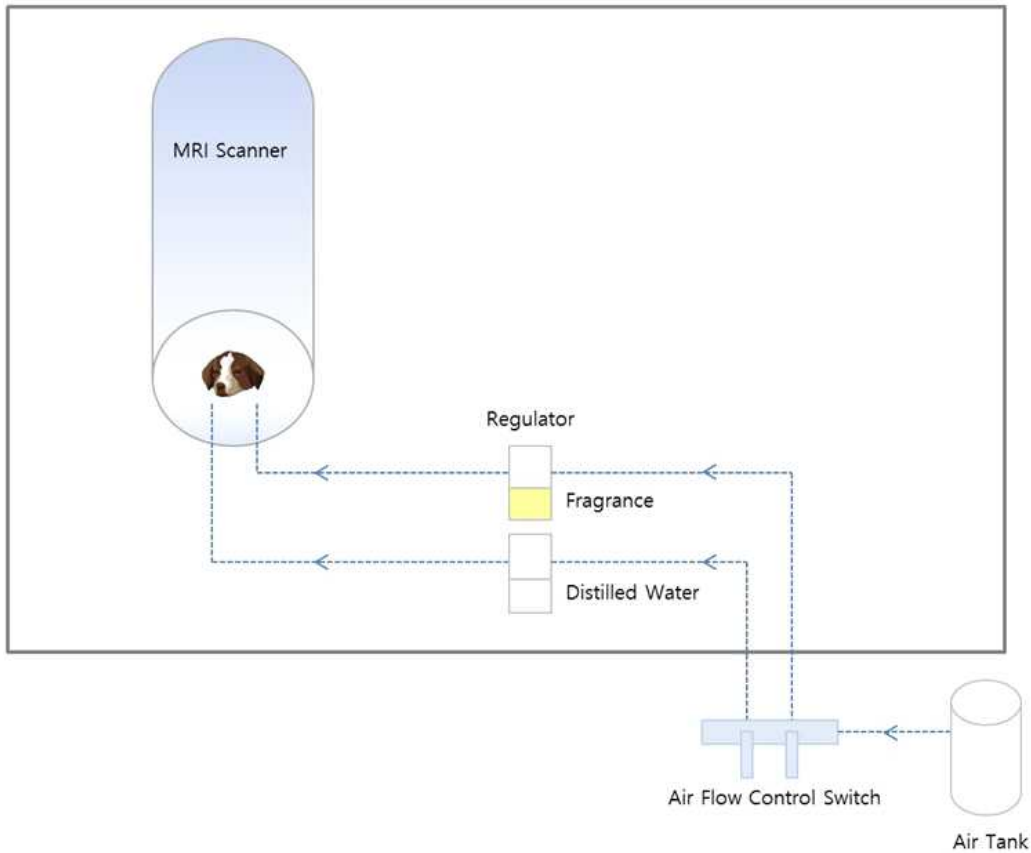


그림 59 fMRI 촬영 시 전체적인 모식도

(2) 우수검역탐지견과 대조군의 fMRI 결과 비교분석

(가) 마취프로토콜에 따른 fMRI 후각신호의 차이

현재 수의학 부분에서 fMRI를 이용한 후각연구는 매우 드물며, 때문에 마취 프로토콜 또한 확립되어 있지 않다. 본 실험을 통해 개에서 fMRI를 이용한 후각기능연구의 마취 프로토콜과 실험과정, 그리고 연구결과를 선점하였다는 데 있어서 그 의의가 있다. 본 실험을 통해 확립된 프로토콜을 우수검역탐지복제견과 일반 비글견과의 비교 연구 및 뇌 기능 연구에 적용할 수 있다고 판단되며 향후 임상적으로도 개의 비강종양이나 뇌질환, 후각연구 및 인지기능 연구에도 활용할 수 있다고 판단된다.

(나) 우수검역탐지 복제견의 fMRI 연구

본 연구를 진행시 개를 fMRI로 연구하기 위해 마취가 필요했다는 점, 회로상에 남아 있는 향기를 제거하기 위한 장치 (예, 진공흡인기) 또는 마스크) 의 부재, 그리고 해부학적인 차이(VBM) 와 기능적인 차이 (fMRI)를 함께 분석하기 위한 진단기법의 부족의 한계점을 보여주었다. 그러나 아래와 같은 결과를 도출할 수 있었다.

일반 비글견과 우수검역탐지복제견간의 fMRI 연구결과에서는 대조군인 일반 비글견

과 우수검역탐지복제건의 fMRI 결과는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그 원인으로서는 여러 가지 문제를 생각해 볼수 있겠으나 탐지건의 능력의 상당 부분이 훈련에 의하여 발현되며 깊은 진정 하에서는 의식이 소실되어 후각 능력의 발현이 제한되기 때문이라고 생각된다.

우수검역탐지복제건에서의 검역물과 비검역물에서의 fMRI 연구결과, 복제건 자체에서 검역물인 천연사과향과 비검역물인 인공사과향의 fMRI 결과를 비교 분석하였을때 활성화 신호가 뜨는 뇌의 영역이 다른 것을 확인하였다. 검역물과 비검역물의 차이는 주로 후각영역보다는 인지, 기억의 영역에서 차이를 보였다. 즉 **일반 비글건과 우수검역탐지건의 차이는 선천적인 후각기능의 차이라기보다는 주로 학습이나 인지, 기억의 차이일 확률이 높다고 판단된다.**

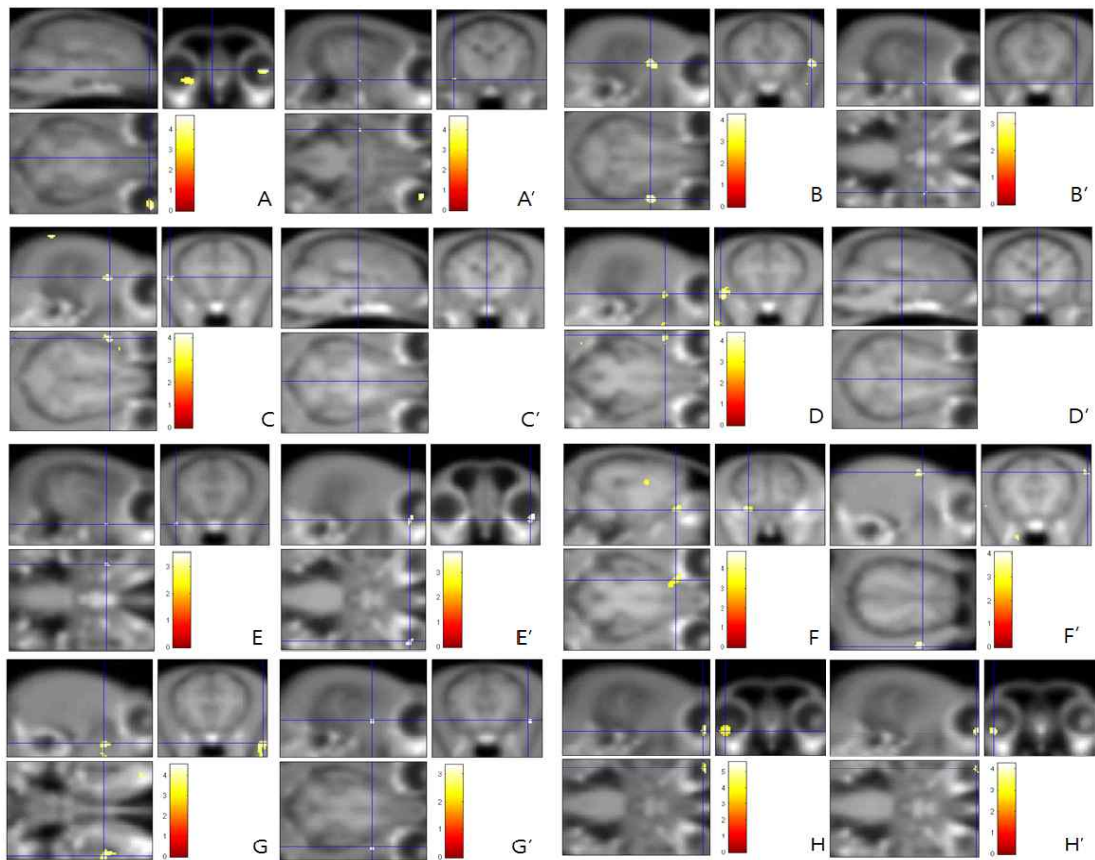


그림 60 복제검역탐지건의 T2 강조영상과 중첩된 fMRI영상. 그림 A부터 H까지 알파벳 순서에 따라 마치, 줄라이, 잔, 준, 페브, 메이, 줄라이(재촬영), 준(재촬영)의 뇌기능적 영상이다.

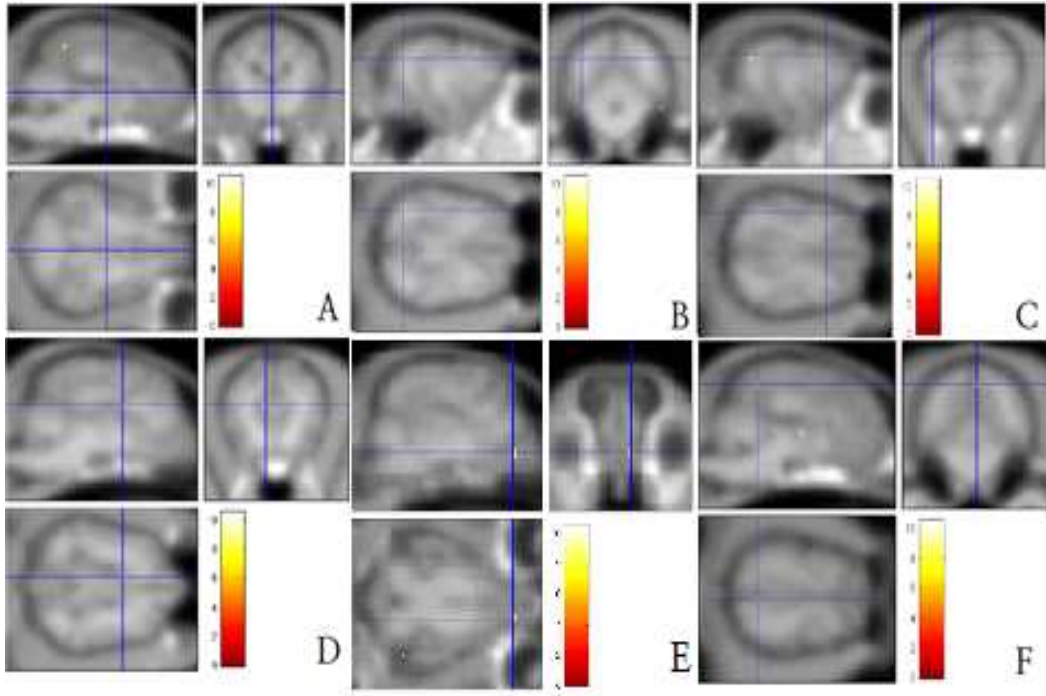


그림 61 비검역물과 비교했을 때 검역물에서 더 높은 활성화 신호를 나타내는 부위의 fMRI영상. 이 영역들은 학습 및 인지능력에 관련한다고 알려져 있다. (A) Thalamus, (B) Cerebral white matter, (C) Cerebral white matter, (D) Cingulate cortex (anterior), (E) Caudate nucleus, (F) Cingulate cortex (posterior)

제 6 절 복제견(1차년도)과 대조군과의 행동학적 분석

1. 기초훈련 및 집중훈련시 복제견 및 대조군간의 행동학적 평가를 통한 탐지견으로의 자질 평가

가. 연구수행 방법

(1) 유견 적성평가 및 자견자질 평가

(가) 유견 적성평가

1차년도에 확립한 유견 적성 평가 (Puppy Aptitude Test)는 유견이 6-8주령일 때 진행하며 검역탐지견센터의 평가법을 기본으로 하여 (Bartlett, 1979, Am Kennel Gazette)의 유견 적성 평가, 캠벨 테스트를 참고로 변경하여 수행하였다. 평가방법은 각각의 하위 평가는 30초로 이루어지며 유견과 초면인 사람이 평가 진행자로 실시한다. 평가도구에는 캠코더, 평가지, 종이공, 금속판, 타월, 끈이 필요하다. 평가를 진행

하며 1차로 점수를 체크하고 평가 후 토론을 통해(녹화한 영상 확인) 재평가한다.
 세부 하위 평가로는 1. 사회적 친화도 (Social attraction), 2. 따르기 (Following), 3. 구속 (Restraint), 4. 사회적 우위성 (Social dominance), 5. 거상 우위성 (Elevation dominance), 6. 회수 능력 (Retrieving), 7. 촉각 민감성(Touch sensitivity), 8. 청각 민감성 (Sound sensitivity), 9. 시각 민감성 (Sight sensitivity), 10. 안정성 (Stability)이 있으며 각 세부평가는 우위성 정도에 따라 1~6형으로 평가하고 그 기준은 1차년도에 확립하였다.

(나) 자건 자질평가

현장 훈련을 시작하는 13주령에 보상 먹이 자극에 대한 반응, 환경 적응성, 사회성, 보행상태, 장애물에 대한 반응으로 총 40항목을 평가하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 유견 적성평가 및 자건자질 평가

(가) 복제견의 유견 적성평가

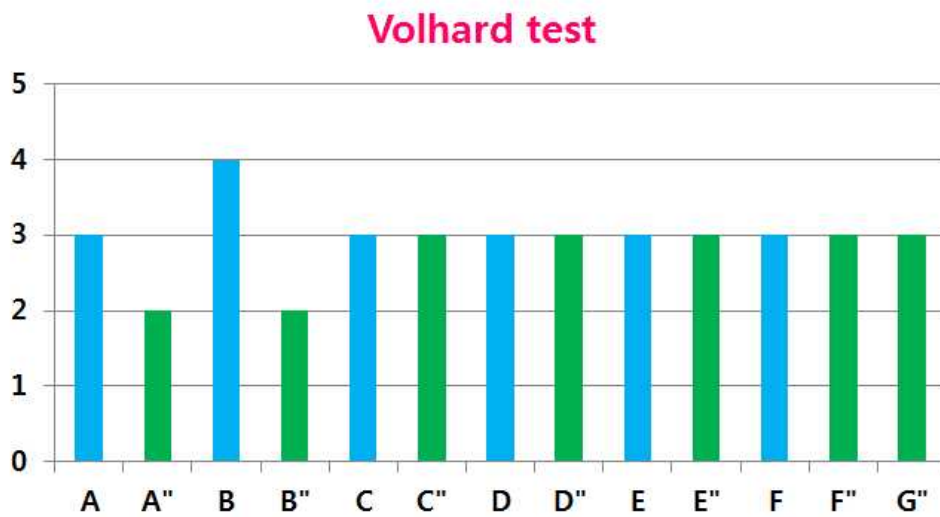


그림 62 복제견과 일반견의 유견 적성 테스트 (PAT)

- A : 대조군 1 (흰둥이)
- B : 대조군 2 (첫째)
- C : 대조군 3 (둘째)
- D : 대조군 4 (셋째)
- E : 복제 테니 2 (Feb)
- F : 복제 테니 3 (March)
- G : 복제 테니 1 (Jan)
- A, B, C, D, E, F : 8-10주령
- A'', B'', C'', D'', E'', F'', G'' : 16주령

유견 평가의 결과는 대부분 3형(사람을 리더로 받아들이며 활동적인 성향)으로 조사되었으며, 대조군 2(B)는 4형(복종적인 성향)으로 나타났다가 16주령에 2형으로 변화가 있었다. 데니 3은 일령이 가장 어려 데니 2와 같은 시기에 retest를 실시하였으며 첫 번째 테스트에서는 3~4형 중 3형에 가까운 것으로 나타났고 retest에서는 2~3형 사이로 나타났다. retest 의 시기가 적정 연령(7주)이기 때문에 본 그래프에서는 이 시기로 나타내었다. 대조군 1(A)의 경우 3형에서 2형으로 변화가 보였다. 유견 적성 평가를 통해 1형~6형까지 어디에 속하는지를 구별하여, 우위성 정도를 파악할 수 있다. 이 평가의 결과는 훈련교관과의 관계 방향을 제시하며 향후 탐지 능력과의 상관 관계를 비교분석하는 데에 용이하도록 하여, 결론적으로 **유견테스트에서 복제견은 모두 탐지견으로서의 성향을 지니고 있으며, 복제견들은 대조군에 비하여 주령에 따른 행동성향의 변화가 일어나지 않음**을 알 수 가 있었다.

유견평가의 결과는 Type 1~6으로 나뉘며, 평가 결과 해석 보기는 다음과 같다. 전형적인 PAT(Puppy Aptitude Test) 해석과 탐지견훈련센터 평가매뉴얼을 참조하였다. (Bartlett, 1979, Am Kennel Gazette; 관세청 탐지견훈련센터 평가 매뉴얼)

① 대부분이 1번(Type I)

극단적으로 우위성을 보이며 공격적인 경향을 가지고 있음. 재빠르게 물고 일반적으로 어린이나 노인들에게는 좋지 않은 것으로 간주됨. 촉각 민감성에서 1번과 2번이 조합되었을 때에는 훈련이 어려움. 경험이 있는 훈련사에게 적합하기 보다는 훈련사가 강력한 리더쉽을 보여 주어야만 함.

② 대부분이 2번(Type II)

우위성이 있으며 갑자기 물 수도 있음. 어른이 키워야 하며 일관적이면서 숙련된 핸들링에 잘 반응함. 일단 사람을 리더로 인식하면 매우 충성스러운 개가 되는 경향이 있음. 매우 쾌활하고 즐거운 기질임 : 노인에게는 너무 활동적이고 작은 어린이에게는 매우 우위성이 강함.(기능견으로 적합)

③ 대부분이 3번(Type III)

이 개는 사람을 리더로 쉽게 받아들임. 보통의 주인에게 최고의 개이며 비록 너무 활동적인 경향이 있기는 하지만 모든 상황에 잘 적응하고 어린이나 노인과도 일반적으로 잘 지냄. 복종 훈련에 매우 잘 반응하고 일반적으로 생명체에 잘 적응함.(기능견으로 적합)

④ 대부분이 4번(Type IV)

이 개는 복종적이며 대부분의 주인에게 잘 적응함. 약간 내성적이며 대부분 3번을 받은 개 보다는 덜 활동적임. 어린이와 잘 지내며 일반적으로 훈련에도 소질이

있음.

⑤ 대부분이 5번(Type V)

이 개는 극단적으로 복종적이며 자신감을 확립하고 본인의 보금자리에서 데리고 나가는데 특별한 핸들링이 필요함. 변화와 혼란에 잘 적응하지 못하고 일반적인 보통 환경이 필요하다. 보통 어린이에게 안전하며 아주 스트레스를 받았을 경우에만 문다. 보통 잘 놀래고 새로운 경험을 받아들이는데에 매우 오랜 기간이 걸리므로 초심자에게 좋은 선택은 아님.

⑥ 대부분이 6번(Type VI)

이 개는 독립적임. 이 개는 다정다감하지 않고 쓰다듬는 것이나 귀여워해 주는 것을 싫어 함. 기능견으로 혹은 애완견으로 어떠한 관계를 성립하기 어려움. 관심을 강요하는 어린이에게 추천하지 않음; 초심자에게 적당한 개는 아님.

(나) 자견 자질평가

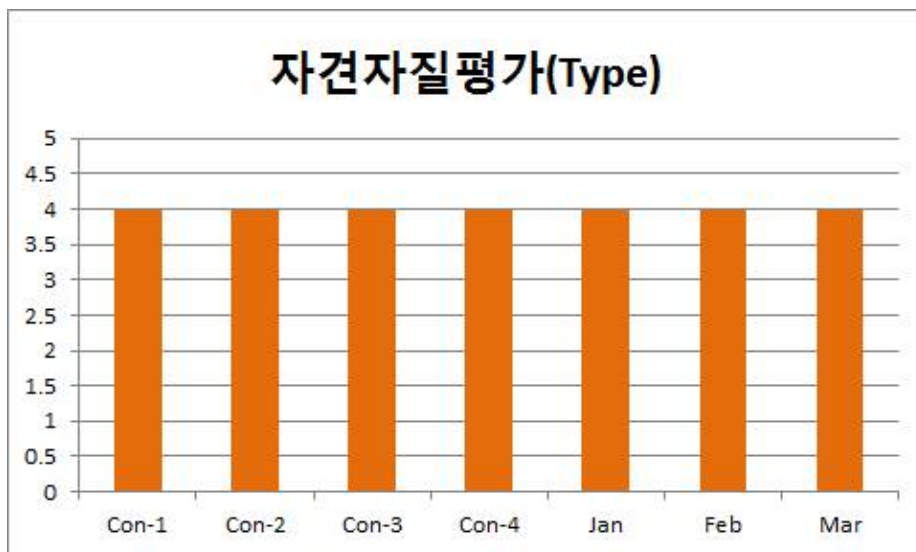


그림 63 복제견과 일반견의 자견 자질 평가

위 결과는 복제견의 자견시절 탐지견으로서의 자질을 지녔는지 여부를 판단하는 평가이다. 평가자는 여러 가지 자극 및 상황에 대한 반응을 보고 점수를 선택하여 해당란에 표시하며, 각 단원별 점수가 보통(3) 이상의 점수 획득일 경우 합격으로 간주된다. **이 자견 자질 평가에서는 7두 모두 4형 '우수'로 평가되었다.** 따라서 보상 먹이 자극에 대한 반응, 환경 적응성, 사회성, 보행상태, 장애물에 대한 반응 부분에 있어서는 7두가 큰 차이를 보이지 않는 것으로 생각할 수 있다. 이 평가는 처음으로 현장(공항)에 나갔을 때의 반응을 보는 것이므로, **실제 탐지 능력을 확인하기 위해서는 최종 선발 평가를 중심으로 판단**해야할 것이다.

2. 행동학적 분석 지표 제시

가. 연구수행 방법

(1) 행동학적 분석 지표제시를 위한 성견 선발평가

(가) 성견 선발평가

검역탐지견센터 내부 평가 방법인 의욕, 반응(민감성, 관심성, 적극성)에 우수견과 비 우수견 평가 기준 10가지 항목을 추가하여 총점으로 평가하였다.

<탐지견의 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
- 4) 불량; 열의나 관심을 거의 볼 수 없고, 탐지요원이 적극적으로 의욕을 북돋아주려고 시도해 봐도 충분한 탐지를 할 수 없는 경우

<탐지견의 반응적인 부분>

; 민감성, 관심성, 적극성의 3가지로 나눔

검역탐지견센터 내부 평가 방법인 의욕, 반응(민감성, 관심성, 적극성)에 우수견과 비 우수견 평가 기준 10가지 항목을 추가하여 총점으로 평가하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 행동학적 분석 지표제시를 위한 성견 선발평가

(가) 성견 선발평가 및 설문 평가

이 평가법은 현장 근무를 위한 탐지요원 및 탐지견을 평가하여 실제 투입편명에 대한 객관적 검증에 위한 것이다. 현장 상황에 대한 적응 정도를 파악하여 탐지 요원의 상황별 적절한 대처 능력을 양성하여 배치가 원활히 이루어지도록 하며, 자질이 적절하지 않은 후보견은 불합격시키도록 한다. 탐지요원은 견의 탐지활동이 부드럽게 이루어

어지도록 탐지를 진행하고, 견의 미세한 반응을 잘 읽을 수 있도록 유의한다. **탐지견에 대한 적절한 명령, 지시, 칭찬, 교정을 하도록 한다.** 본 평가에서는 복제견 2(Feb)가 90으로 가장 높은 점수를 받았고 대조군 2(Con-2)의 경우에는 59점으로 가장 낮은 점수를 받았다. 60점 미만 탐지견은 훈련대상견이나 관리대상견으로 분류하게 된다. 아래 표에서 보듯이, **복제견 3마리 (JAN, FEB, MAR)의 경우는 모두 60점 이상의 점수**를 받았으며 특히 FEB와 MAR의 경우에는 90점의 매우 우수한 점수를 받았다. 이에 비해 대조군은 4마리중 1마리가 관리대상견으로 분류가 되었으며, 나머지 3마리는 60점 이상의 점수를 받았으나, 복제견 그룹의 평균에 비해 낮은 점수를 받은 것을 알 수 있다. 마지막으로 탐지견으로서의 최종 결과는 다음에 제시되어 있는 10가지 항목 평가도 함께 고려하여 결정하게 된다.

표 42 탐지요원 및 탐지견 평가 결과 (검역탐지견센터 내부 규정 평가)

Jan	Feb	Mar	Con-1 White	Con-2	Con-3 Black	Con-4
75	90	90	75	59	76	75

일반견 4두의 10가지 항목 평가 결과, 각각의 평균이 3.47, 2.07, 3.82, 2.88로 1번견과 3번견은 평균을 상회하였고 2번견과 4번견은 상대적으로 점수가 낮았다. 복제견 1, 2, 3의 경우 각 4.39, 4.46, 4.38의 높은 점수를 받았다. 이 점수는 영국 244명의 핸들러와 트레이너들에게 탐지견의 어떤 자질이 중요한지 설문을 받은 항목을 기준으로 평가한 것이다. 이 각 자질을 1-5점으로 평가하도록 변형하였다. 10가지 항목 평가(Rooney, 2004, J Forensic Sci)외에 검역탐지견 내부 평가 기준에 의한 평가 결과는 다음과 같다.

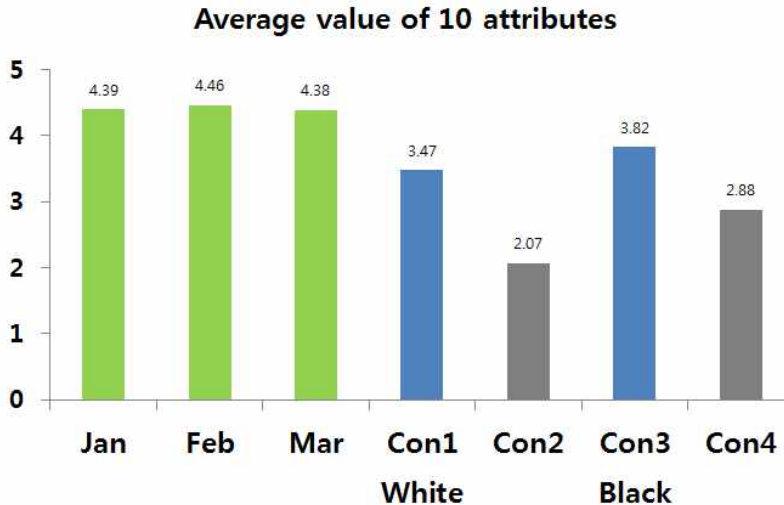


그림 64 10가지 항목 평가 결과의 평균
 합격 : White(Con-1), Black(Con-3), Jan, Feb, March
 불합격 : 첫째(Con-2), 셋째(Con-4)

(나) 최종 판정

대조군과 복제건의 최종 판정은 10가지 항목과 검역탐지건센터 내부 평가를 조합하여 진행하였다. 후각의 예민한 정도, 물건을 찾으려는 욕구 등을 포함하여 민감성, 관심성 등에서 대조군 1 (Con-1) 과 대조군 3 (Con-3)의 경우에는 비교적 우수한 자질을 보였다. 그러나 대조군 2 (Con-2)의 경우에는 평균보다 낮은 점수로 탐지건에는 부적합한 자질을 보였으며, 대조군 4 (Con-4)의 경우에는 평균값과 비슷한 수치를 보였으나 개체의 체격이 작아 활동에 제약이 있어 2번과 4번의 경우 불합격으로 판정되었다. **체세포 핵이식을 실시해서 생산된 복제건의 경우 탐지요원 및 탐지건 평가 결과, 10가지 항목 평가 결과에서 합격선 이상의 점수를 받아 모두 합격**하였다.

3. 복제건의 단계적이고 체계적인 훈련을 통한 결과의 통계 및 동영상 분석을 통한 지표 도출

가. 연구수행 방법

(1) 일반 훈련 일지를 통한 행동학적 지표 도출

검역탐지건센터에서 지속적으로 훈련 과정을 기록하여, 복제건과 대조군의 행동 변화양상을 비교하여 행동학적 지표를 도출하고자 시도하였다. 훈련일지 기록 내용은 다음과 같다. 훈련 종류, 훈련 내용과 장소, 목적물과 비목적물, 반응횟수, 훈련 결과를 기록하며, 평가 항목은 적극성, 환경에 대한 적응력, 쾌활성, 보상먹이와 탐지물품에 대한 관심도, 목적물과 비목적물 구별능력, 반응의 지속성으로 분류되어 있다.

나. 연구수행 결과

(1) 일반 훈련 일지를 통한 행동학적 지표 도출

아래의 그림은 복제견 3두와 대조군 2두의 훈련일지의 예를 수치 자료화 한 것이다. 훈련과정에서 작성되어진 일지의 점수를 토대로 하여 평가 항목의 평균값이 변화 추이를 분석하였다. 이와 같은 양식으로 데이터화를 진행하여 복제견과 대조군간의 훈련과정에서 따른 행동학적 변화 및 성격의 일치성이 나이에 따라 유지되는지 또는 변화하는지에 대해 분석하였다.

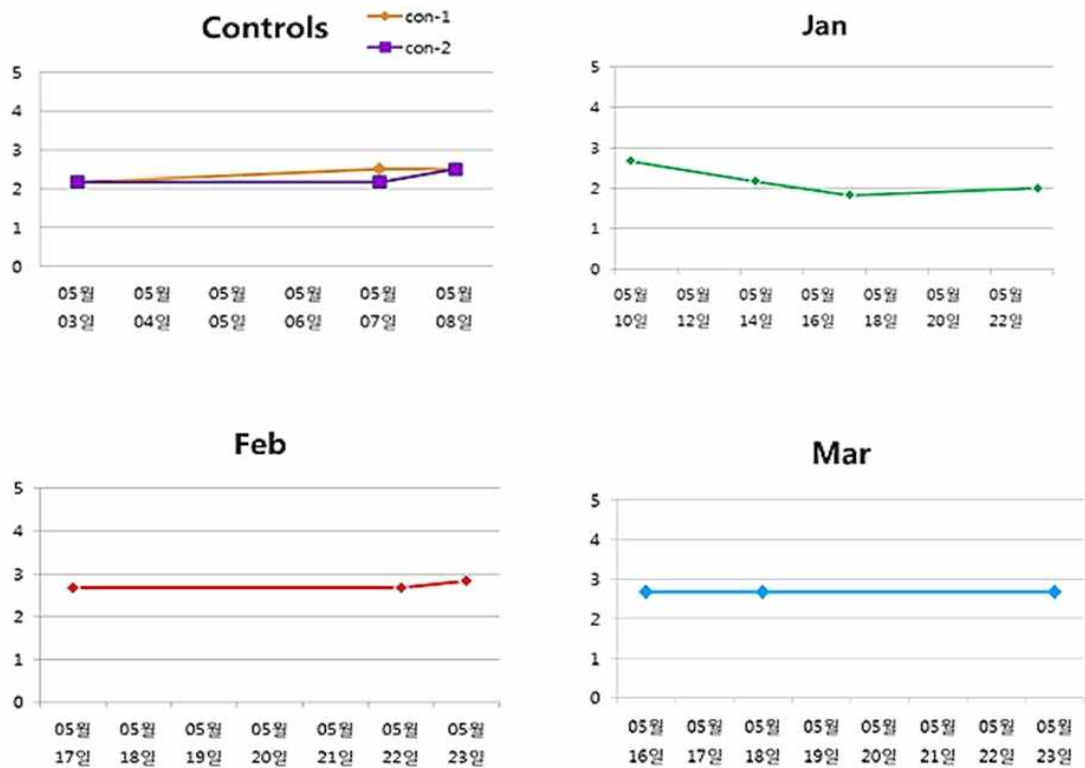


그림 65 복제견 3두와 대조군 훈련일지 분석 예

4. 선발된 복제견의 현장 배치 및 지속적인 훈련결과의 통계 및 동영상 분석 통한 지표 도출

가. 연구수행 방법

(1) 행동학적 지표 도출을 위한 동영상 분석

행동 변화 과정 및 보다 구체적인 양상 비교를 위해 훈련 일지 기록을 통한 분석, 매일 훈련 시 촬영한 영상 분석 등 다각도의 비교를 시도하고 있다. 영상 분석의 기준은 이동 거리, 탐지 시부터 반응까지의 시간, 반응 시간, 탐지 시 산만 정도, 핸들러와의 거리, 탐

지 유도 행위의 유무 등으로 아래 표에 제시하였다.

표 43 영상 자료 분석 기준

Variable	Description
Movement distance	Number of space from the beginning to the finishing
Latency time	Time between beginning of sniffing(exploring) and beginning of the response
Response time	Time from the beginning of response to the finishing of response for each exploring
Frequency to be distracted when detecting	Number of times to see other sides except objects during detection
Distance from the handler	Distance between handler and the dog
Intervention to pinpoint (Y/N)	Whether handler intervened to make the dog pinpoint or not (needed or not)

나. 연구수행 결과

(1) 행동학적 지표 도출을 위한 동영상 분석

영상 분석을 통해 복제견과 대조군의 행동 양상을 비교 분석하고 있으며, 각 latency time 분석의 예와 frequency to be distracted when detecting 분석의 예를 제시하였다. 2개의 그림 모두 2012년 8월 1일의 영상을 분석한 것이며, 아래 그림의 경우에 처음 탐지 시작 시부터 최초 반응이 일어나기까지의 시간이 대조군 4가 6.8초로 가장 길었으며 대조군 3이 2초로 가장 짧았음을 보여준다.

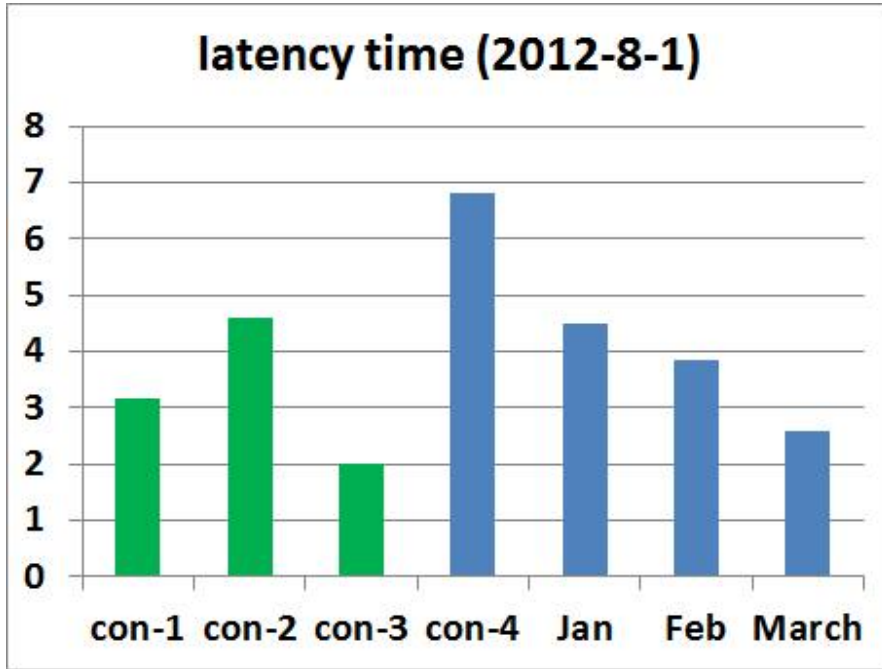


그림 66 latency time 분석의 예

또한 탐지시 다른 곳을 돌아보는 frequency to be distracted when detecting 횟수의 경우 아래그림에서처럼 복제건 1 (Jan)과 복제건 3 (March)은 한 번도 다른 곳을 보지 않았고 대조군 2, 대조군 4의 경우에는 각 3번씩 다른 곳을 바라본 결과를 보여주었다. 향후 더 많은 동영상의 분석을 통하여 복제건의 행동을 수치화하여 분석한 결과의 유사성 및 차이점을 비교분석하여 자료화하고자 한다.

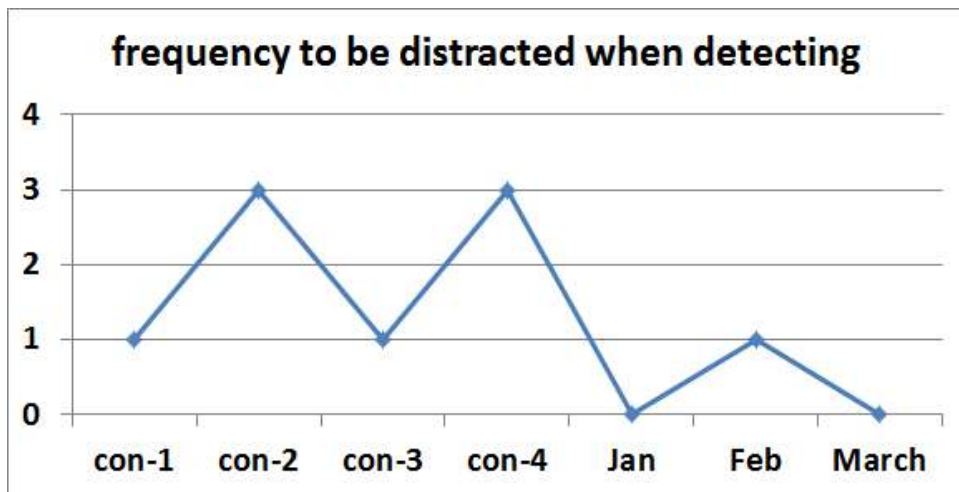


그림 67 frequency to be distracted when detecting 분석의 예

아래의 사진은 탐지 시의 모습을 나타내고 있다. 사진 1은 목적물 발견 후 견이 그 반응으로써 자리에 앉는 모습이며, 사진 2는 탐지를 유도하기 위해 훈련교관이 타겟을 탐하는 모습이다. 사진 3은 탐지 시에 다른 곳을 보고 있는 모습이다.



Response



Intervention to pinpoint



Distracted when detecting

그림 68 훈련시 검역견들의 반응을 촬영한 사진

제 7 절 2차년도 복제 검역탐지견 생산

1. 체세포핵이식을 위한 최적의 공여세포 배양조건 확립

가. 연구수행 방법

(1) 2가지의 다른 배양액으로 배양한 지방줄기세포주의 유전자 발현 수준 비교

한 개체에서 분리한 지방 유래의 줄기세포를 2가지의 다른 배양액을 통해 그로부터 유래된 세포의 유전자의 발현 정도를 비교 분석하였다. 지방줄기세포는 0 계대에서 동결하였으며 이중체세포 핵이식 또는 세포 수준에서의 유전자 발현 수준 비교분석을 위해 세포를 해동하여 사용하였다. 확립된 지방줄기세포주는 각각 해동시 DMEM배양액 9ml과 RCME-P 배양액 9ml에 세포를 thawing시킨다. 1000rpm, 3분간 원심분리를 실시하고 각 20만개의 세포를 35mm²의 dish에 배양한다. 배양된 세포는 confluency에 도달하면 다음 계대로 배양하고 체세포 핵이식 및 분석 실험에의 이용을 위해서 confluency 상태에 도달하면 trypsin을 처리하여 cell을 분리하여 체세포 핵이식의 공여세포 및 유전자 분석 세포로 이용한다. 줄기세포의 특징으로 제시되는 여러 가지 마커 유전자(Oct4, Sox2, Nanog, DPPA2)와 재구성 양상을 비교할 수 있는 다양한 마커 유전자 (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MeCP2), 세포사를 나타내는 지표인 Bax/Bcl2의 유전자의 발현 양상을 비교하였다. 유전자의 발현 양상은 qRT-PCR을 통해 분석을 실시하였으며 각 분석에 이용된 Primer의 서열은 아래 그림과 같다.

Gene	Accession No.	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
Beta-actin	NM_001003349	F: GCTACGTGCGCCTGGA R: AGCGGTTCCGCTGCCC	173
Sox2	XM_545216	F: CAGACCTACATGAACGGCTCGC R: CCCACTCCAGGGCGCCCTGCC	157
Nanog	XM_543828.2	F: CTCAGTCTCCAGCAGATGC R: GCCAATCCTGGAGCAGCCACTC	301
Oct4	XM_538830	F: CGAGTGAGAGGCAACCTGGAGA R: CCACACTCGGACCACATCCTTC	114
Rex1	XM_533958.2	F: GTATGACCCTGTGCCAACTTCTCT R: CATCATCATCTGAGTCTGAGAACCT	130
DPPA2	XM_843766.2	F: TACCCATGGCCGAAAAATAG R: AAATCTTGGCCACCACTTG	152
HDAC	XM_859623	F: GCTGCACCATGCAAAGAAGT R: TCGCCGTGGTGAATATCAAT	129
DNMT1	XM_533919.3	F: GGAGAACTGAATCTCTTGCAT R: TAGCCAGGIAGCCCTCCTCT	115
DNMT3a	XM_540110.2	F: CAAAGAAGTTACACAGACATGTGG R: GCAGAAGTGCCGAACATCGAGG	178
DNMT3b	XM_003433245.1	F: TTGACTTGGTGATTGGTGGA R: TTCTTCTCGGCCGGACAT	134
MeCP2	XM_003435553.1	F: AAGCCTTTCGCTCTAAAGTGG R: TGGGAGATTGGGCTTCTTA	150
Bax	AB080230.1	F: TCAAGGCCCTGTGTACCAA R: ACGTGGGTGTCCAAAGTAG	143

그림 69 qRT-PCR 분석을 위한 각 유전자의 Primer 서열

(2) 2가지의 다른 배양액으로 배양한 지방줄기세포주의 세포 표면 마커에 대한 비교 분석
지방줄기세포를 RCME-P배지와 DMEM 배양배지를 이용하여 배양한 세포의 면역형을 분석하였다. 분석에 사용한 세포의 계대는 양 배양액에서 4계대가 될 때 분석하였다. 특이적 발현 세포 표지자들을 이용하여 유세포 분석기(BD, FACSCalibur)에서 줄기세포 표지자인 CD29, CD44와 CD90과 면역세포 표지자인 CD31, CD34, CD45와 CD105로 확인 하였다.

(3) 2가지의 다른 배양액으로 배양한 지방줄기세포주를 공여세포로 한 이중체세포 핵이식 및 이중복제 배반포에서의 유전자 분석

이중 복제 배반포를 만들기 위해 체세포 핵이식을 위한 수핵 난자를 준비한다. 개의 난자는 수급에 제한이 있으므로 universal oocyte donor로 이용되고 있는 소의 난자를 이용하여 실험을 실시한다. 20시간 체외성숙된 난자를 CW 배지 내에서 0.1% (v/v) hyaluronidase에 침지한 후, 미세 유리파이펫을 이용하여, 생체 내에서 성숙된 난자로부터 난구세포를 제거한다. 그 후, 각각의 난자들을 홀딩 마이크로피펫 (내경 150 μm)으로 고정하고, 10% (v/v) FBS 및 5 μg/mL 핵스트 (Hoechst 33342)와 5 μg/mL 사이토칼라신 B가 첨가된 CW배지 내에서 미세조작기 (Nikon-Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 핵스트로 염색된 난자의 염색체를 흡입 피펫 (aspiration pipette)을 사용하여 제거한

다. 탈핵된 난자는 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199에 두고 계속하여 체세포를 주입하는데 사용한다. 각각의 배양액에서 confluency 상태에 도달한 공여 체세포를 탈핵된 난자의 위란강 (perivitelline space)에 넣는다. 공여 체세포와 수핵 세포질체의 합체를 향상 시키도록 10% (v/v) FBS가 보충된 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 탈핵 난자의 위란강 (perivitelline)으로 하나의 공여세포를 주입한다. 상기 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM HEPES 및 0.05% (w/v) BSA를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 바늘 형의 2개의 마주보는 전극 사이에 놓는다. 난자 세포질체 및 핵 공여 세포 사이의 접촉면을 전극과 평행하게 놓고, Electro-Cell Fusion apparatus (NEPA GENE Co., Chiba, Japan)로 전기 자극을 준다. 30-32V, 15 usec 지속시간으로 2 펄스를 가하며, 전기자극 30 분 후에 핵 공여세포와 난자세포질체의 융합을 실체현미경 하에서 관찰한다. 융합된 수정란만을 선별하여 10 uM 칼슘 아이노마이신 (calcium ionomycin)을 포함하는 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199 배지에서 4분간 활성화를 유도한다. 그 후, 복제된 수정란을 세척한 후 1.9 mM 6-디메틸아미노푸린 (dimethylaminopurine)이 보충된 난관액합성배지 (mSOF) 내에서 4시간 동안 추가로 배양한다. 복제수정란의 활성화가 끝나면 체외 배양을 시작하여 분할 및 발달 상태를 관찰한다. 회수한 배반포는 사진을 촬영하고 RNA 추출을 위해 PBS로 3회 씻어준 후 실험 전까지 -80에 동결 보관한다. 배반포에서 RNA를 추출하고 배반포 수준에서의 유전자 발현 수준을 비교한다. 유전자 발현은 세포 수준에서 관찰하였던 유전자 외에 배반포의 발달정도를 비교할 수 있는 Na⁺-K⁺ ATPase, E-Cadherin, Glucose transporter-1을 추가하여 진행한다.

(4) 2가지의 다른 배양액으로 배양한 세포주의 텔로머레이즈 활성 비교

성체섬유아 체세포 확립을 위하여 우수 검역탐지견 대니의 복부 피부의 털을 제거한 후 채취한 피부조직을 동일한 크기 (1cm *1cm)로 각각 자르고 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 RCME-P (RNL Bio)의 배양액으로 조직을 부유시켜 배양한다. 이들 세포들을 3내지 5일 간격으로 배지를 교환하고, 컨플루언시에 도달하면 0.1% 트립신/0.02% EDTA를 사용하여 3분간 트립신을 처리하고 플라스틱 배양접시에서 세포가 분리된 양상을 확인 후 동결배지를 사용하여 -196 °C의 액체질소 내에서 동결 저장한다. 상기 동결배지는 10% (v/v) DMSO 가 첨가된 90% (v/v) FBS를 이용하여 동결하여 실험에 이용하기 전까지 보관한다. 텔로머레이즈 측정은 Telimeric repeat amplification protocol (TRAP) assay를 이용하였다. 동결된 세포를 녹인 후 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척하고 1.5ml 튜브로 옮겼다. 200ul의 RNAase이 첨가된 CHAPS 완충용해액을 1.5ml 튜브에 넣은 후 30분간 얼음에서 반응시키고 4 °C, 15,000rpm에서 25분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 단백질을 정량분석 하였다. 단백질 농도가 0.5ug/ul가 되도록 CHAPS 완충용해액에 희석하고 단백질 추출액

2ul에 10ul의 5x TRAP반응 혼합물과 0.4ul의 Taq polymerase, 37.6ul의 증류수를 넣어 TRAP 분석을 위한 반응 혼합액을 준비하고 연쇄중합 반응을 통하여 TRAP반응을 실시하였다. 연쇄중합반응 산물은 ELISA기법을 통해 분석하였다.

(5) 텔로머레이즈 활성 조절을 위한 공여세포에의 Resveratrol처리

공여세포에서의 텔로머레이즈 활성 조절을 위한 Resveratrol 처리를 통한 세포주의 증식능 비교 분석을 실시한다. 복제할 공여세포주는 일반적으로 지방줄기세포와 섬유아세포로 나뉜다. 섬유아세포와 지방줄기세포에서 각각 텔로머레이즈의 활성 조절이 가능하다고 알려진 Resveratrol을 0, 2, 10, 25uM의 농도와 24시간, 48시간의 두 그룹으로 처리하였다. 증식능 측정을 위해 각 계대별로 세포를 10만개씩 35mm²의 dish에 세포를 배양하기 시작한다. 세포가 dish 바닥에 잘 부착하여 세포가 증식할 수 있는 환경이 조성됨을 확인한 뒤, 두 개의 시간 처리그룹, 네 개의 농도로 나누어 세포를 처리한다. 계대하고 이틀 후에 세포는 트립신 처리를 통해 회수하여 총 세포의 개수를 확인하여 초기에 배양을 시작한 세포에 비해 얼마만큼 증식하였는지 그 비율을 확인한다. 또한 회수된 세포는 위의 방법에 제시된 것과 동일한 방법으로 텔로머레이즈의 활성을 측정하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 배양액에 따른 지방줄기세포의 유전자 발현수준 비교

각 배지에서 배양된 세포는 유전자의 발현 수준에 있어서 차이가 있었다. 특히 전능성과 관련된 유전자는 DPPA2 유전자를 제외하고 모두 발현 정도에 차이가 있었으며 리프로그래밍과 관련된 유전자 중 DNMT1 또한 RCME-P 배지에서 배양된 세포에서 발현 정도가 높았다.

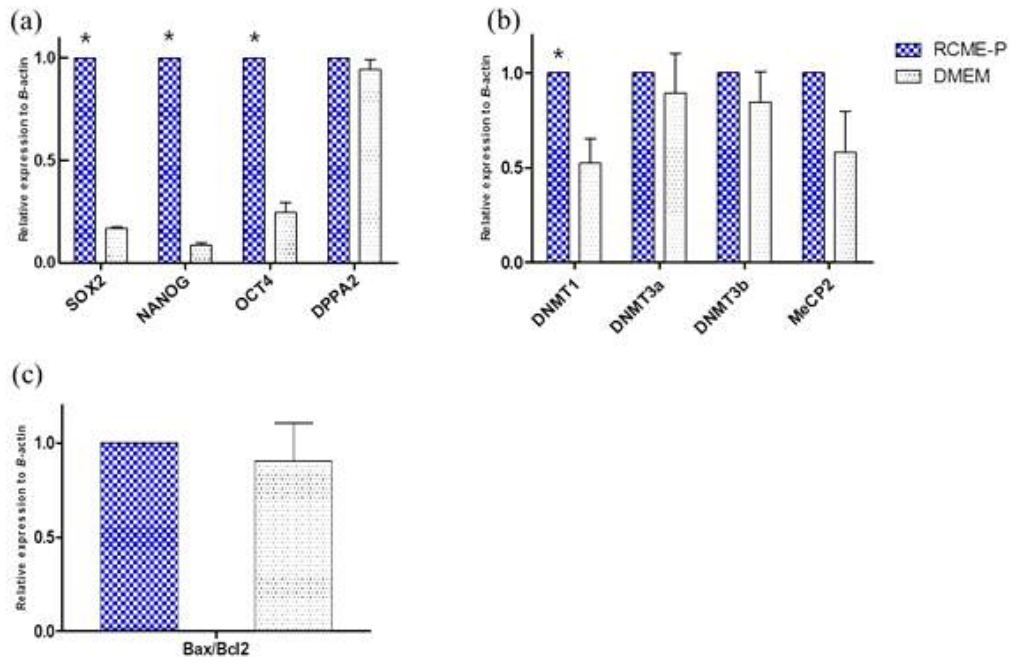


그림 70 두 배양액에서 배양된 지방줄기세포의 유전자 발현 수준 비교. (a)는 전능성과 관련된 유전자의 발현 수준, (b)는 리프로그래밍과 관련된 유전자, (c)는 세포사와 관련된 유전자의 발현수준을 의미한다.

(2) 두 종류의 배양액에서 배양한 세포의 세포 표면 marker 비교 분석

지방줄기세포를 DMEM배지와 RCME-P배지를 각각 이용하여 배양한 후 유세포 분석기 (BD, FACSCalibur)에서 줄기세포 표지자인 CD29, CD44와 CD90과 면역세포 표지자인 CD31, CD34, CD45와 CD105로 확인 하였다.

표 44 두 종류의 배양액 (RCME-P, DMEM)에서 배양된 지방줄기세포의 세포 표면 marker 비교 분석

	MSCs cultured in RCMEP	MSCs cultured in DMEM
CD29	+	+
CD44	+	+
CD90	+	+
CD105	-	-
CD31	-	-
CD34	-	-
CD45	-	-

세포의 유전자 발현 수준에 있어서는 동일한 지방줄기세포라고 하더라도 배양액에 따라 유전자 발현 정도의 차이가 있었으나 세포 표면의 marker를 분석한 실험에서는 배양액에 따른 차이가 관찰되지 않았다. 따라서 **배양액은 세포의 유전자 발현 수준에는 영향을 끼칠 수 있으나 세포 표면의 marker에는 영향을 끼치지 않는다.**

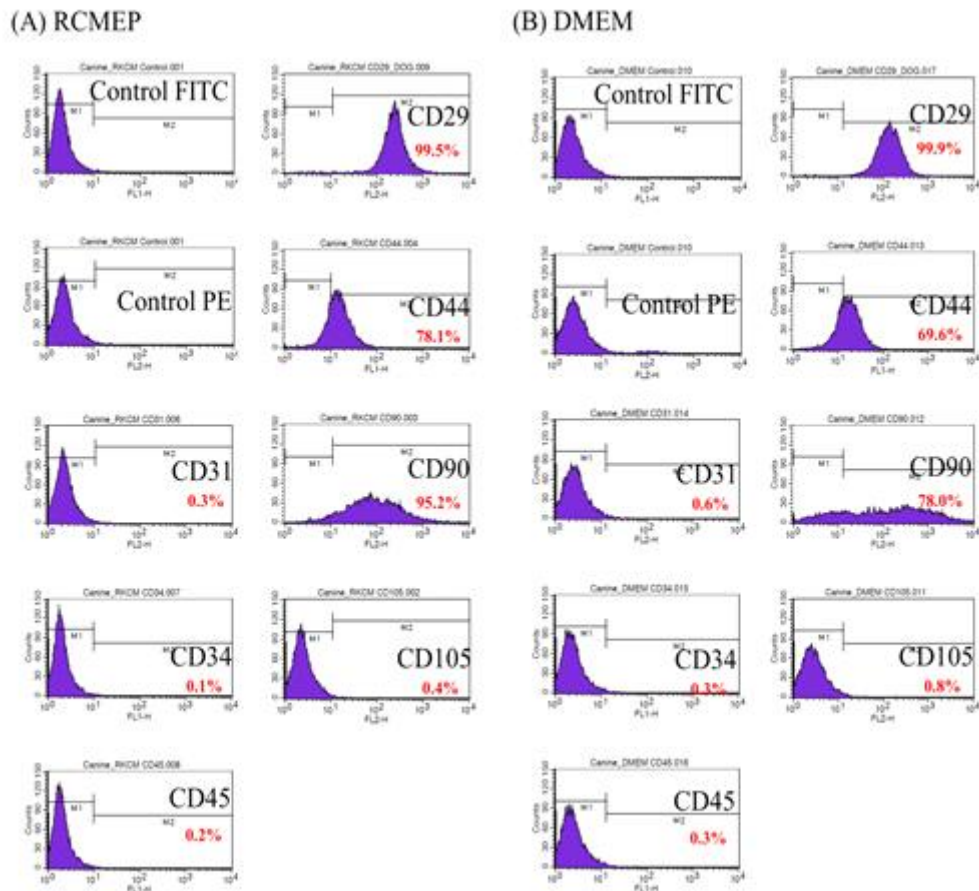


그림 71 (A) RCME-P 배양액에서 배양된 지방줄기세포와 (B) DMEM 배양액에서 배양된 지방줄기세포에서의 세포 표면 marker의 분획 비교 실험

(3) 두 종류의 배양액에서 배양한 세포를 공여핵세포로 이중체세포핵이식 및 체외발달능 비교분석

각 배지에서 배양한 개의 지방줄기세포를 공여핵세포로 이용하였을 때 초기 분할율에 있어서는 DMEM배지를 사용하였을 때 초기에 더 잘 분할되어 유의적인 차이가 있으나 배반포까지의 발달은 유의한 차이가 없다. 아래 표에 자세한 수정란의 배발달 결과를 나타냈으며, 배반포 사진을 함께 작성하였다.

표 45 각 배양액에 따른 공여핵세포 유래의 복제수정란의 체외발달능 비교 분석

배양액 종류	총복제수정란 수	복제수정란 수 (분율, %)		
		분할	상실배	배반포
RCME-P	93	70 (75.2) ^a	4 (4.3)	3 (3.2)
DMEM	94	77 (87.5) ^b	4 (4.5)	4 (4.5)

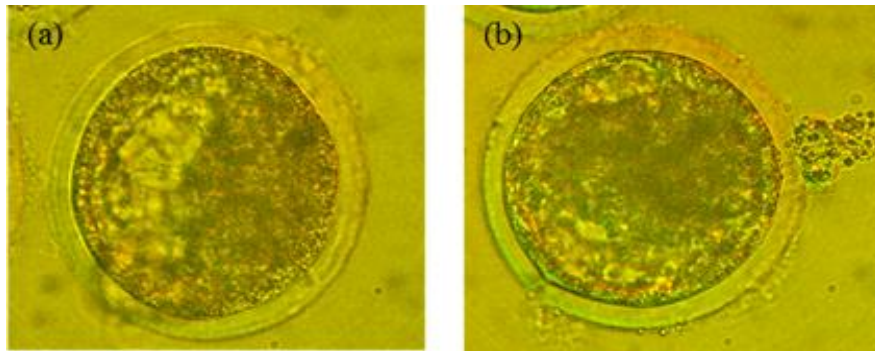


그림 72 각 배양액에서 배양한 체세포에 의한 이종간복제 배반포 (a)^w RCME-P배지에서 배양한 세포 유래의 배반포, (b) DMEM배지에서 배양한 세포 유래의 배반포 (200배 확대사진).

(4) 두 종류의 배양액에서 배양한 지방줄기세포에 의한 이종간복제 배반포에서의 유전자 발현수준 비교 분석

두 종류의 배양액에서 배양된 지방줄기세포로 이종간 체세포 핵이식을 실시하고 결과적으로 배반포를 회수하였다. 배반포에서의 유전자 발현 수준은 DNMT1을 제외하고는 거의 차이가 없었다. 따라서 결론적으로 **개 지방줄기세포의 경우 배양하는 과정에서 유전자 발현 수준의 정도에는 차이는 영향을 끼쳤으나 이러한 변화가 체세포 핵이식 과정의 효율에는 영향을 주지 않았으며 또한 이종체세포 핵이식의 산물인 복제 수정란의 유전자 발현 수준에도 어떠한 영향을 끼치지 않았다.**

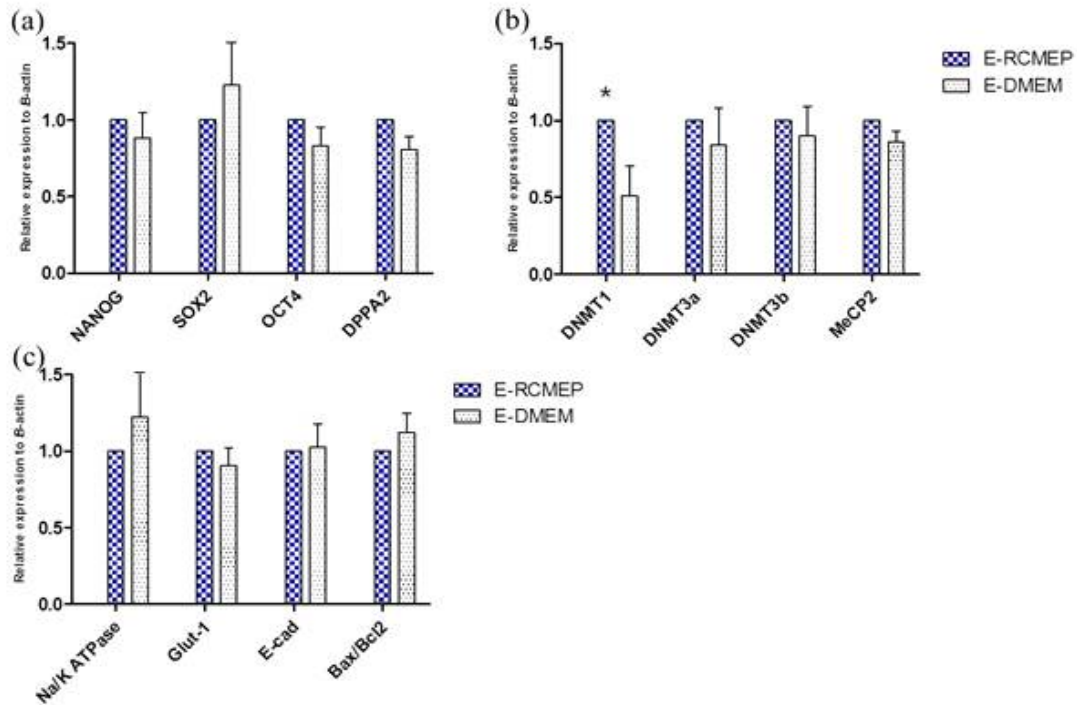


그림 73 RCME-P 배양액과 DMEM 배양액 유래의 지방줄기세포를 이용한 이중복제수정란의 유전자 발현 수준 비교 (a) 전능성 관련 유전자, (b) 리프로그래밍 관련 유전자, (c) 배반포 발달과 관련된 유전자의 발현 수준 비교. *표시는 두 그룹 간에 유의적인 차이가 있음을 의미 ($P < 0.05$).

(5) 2 가지의 다른 배양액으로 배양한 우수검역 탐지견 대니의 세포주 확립

우수 검역견 대니의 복제 생산을 위하여 기 1차년도 연구 결과를 통해 두가지의 다른 배양액으로 배양한 우수검역 탐지견 대니의 세포주를 확립하였다. RCME-P배지에서 유래된 세포와 DMEM에서 유래된 세포의 차이점 중 계대에 따라 텔로머레이즈 활성을 분석하였고 그 결과는 아래 그림과 같다. **1차 배양액의 종류에 따라 각 계대별 세포에서의 상대적 텔로머레이즈의 활성은 차이가 나타났다.** 모든 계대에서 RCME-P배양액에서 1차 배양된 섬유아세포주의 텔로머레이즈 활성이 DMEM배양액에서 배양된 섬유아 세포주에 비해 유의하게 높았다. 또한 각 배양액에서 배양된 세포주는 계대가 증가할수록 텔로머레이즈의 활성이 감소하였다.

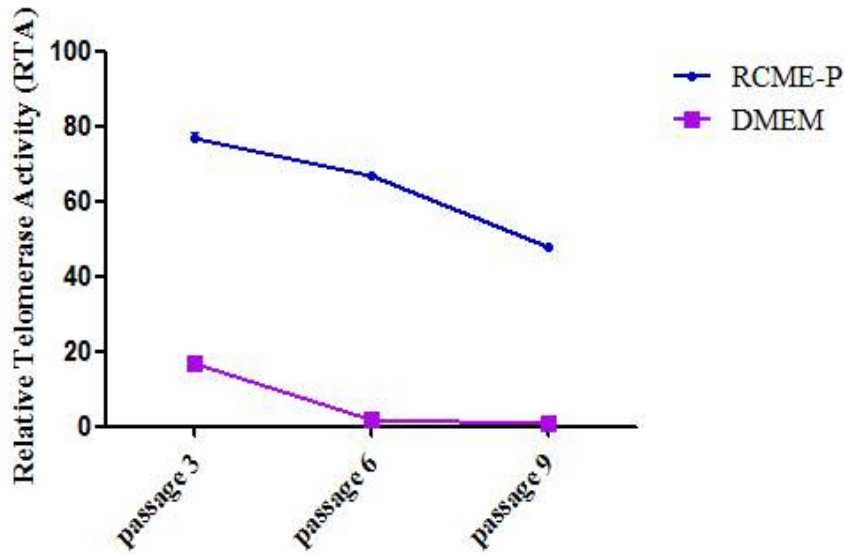


그림 74 김역건 대니의 배양액에 따른 세포의 계대별 텔로머레이즈의 활성 비교분석

(6) Resveratrol 처리를 통한 세포주의 증식능 비교 분석

배양액의 조건에 따라 텔로머레이즈의 활성에 차이가 남을 확인하였고 텔로머레이즈의 활성을 조절할 수 있는 물질을 탐색하였다. 최근, 적포도주에 많이 포함되어 있는 것으로 알려진 Resveratrol은 이미 포유류의 다양한 세포주에서 처리를 통해 텔로머레이즈 활성을 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 공여세포로 이용되고 있는 섬유아세포, 지방줄기 세포 두 유형의 세포로 나뉘어 체세포의 종류에 따라 Resveratrol을 처리하여 세포의 증식능을 확인하였으며 그 결과는 아래 그림과 같다. 지방줄기세포의 경우 전 계대에서 세포의 증식능에는 25uM을 처리했을 때를 제외하고는 세포의 증식능에 영향을 끼치지 않았다. 섬유아세포의 경우 2uM과 10uM에서는 증식능이 높은 것에 반해 0uM과 25uM에서는 유의한 차이가 없었다.

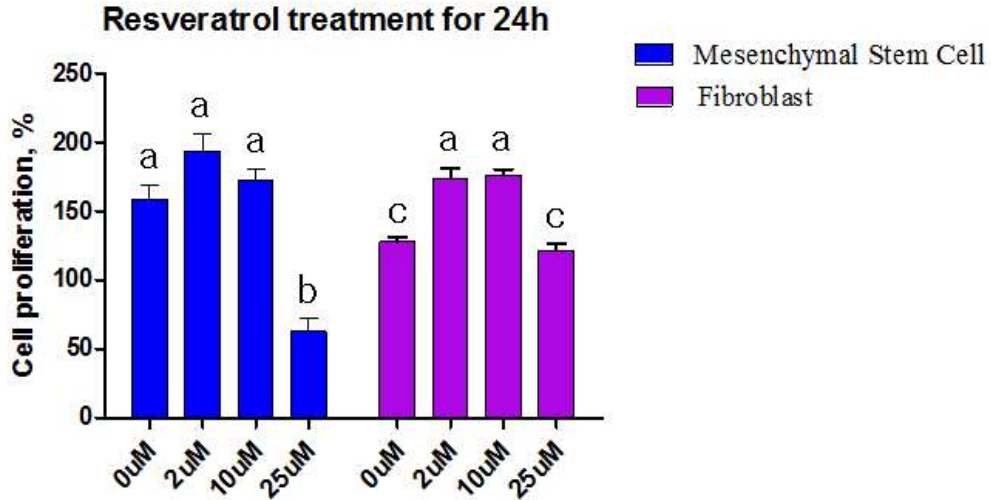


그림 75 Resveratrol 처리에 따른 세포의 증식능 비교, 알파벳이 다른 것은 그룹간에 유의적 차이가 있음을 의미함 (P<0.05).

(7) Resveratrol 처리에 따른 세포주의 텔로머레이즈 활성 비교 분석

Resveratrol을 세포주에 따라 처리한 결과는 아래와 같다. 섬유아세포의 경우 처리 시간을 연장하더라도 처리 시간에 따른 텔로머레이즈의 활성 차이는 없었다. 처리하지 않은 그룹과 2μM로 처리된 세포는 유의차가 없었으며 10μM과 25μM에서 모든 계대에서 증가하는 양상이 나타났으며 7계대의 세포에서는 1, 4계대에 비해 낮은 텔로머레이즈 활성을 나타냈다.

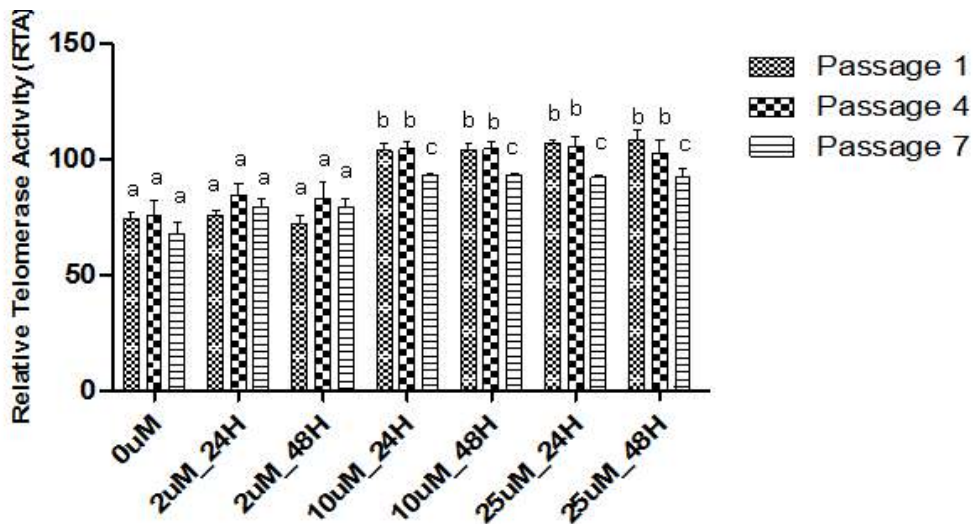


그림 76 섬유아세포에서의 Resveratrol처리에 따른 텔로머레이즈 활성 변화. 그래프 상의 알파벳이 다른 것은 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 의미함 (P<0.05).

지방줄기세포는 섬유아세포와 마찬가지로 처리 시간에 따라 다른 양상을 나타내지 않았으며 아래 그림에서 그 결과를 보여준다. 특히 7계대의 세포에서는 Resveratrol의 효과

가 전혀 없는 것으로 나타났다. 따라서 **각 공여세포별로 체세포핵이식을 위한 최적의 공여세포 배양 조건으로서 가장 적절한 농도는 증식능이 활발하며 동시에 텔로머레이즈의 활성이 높은 10uM에 해당되며 처리 시간은 24시간이 적절하다고 할 수 있다.**

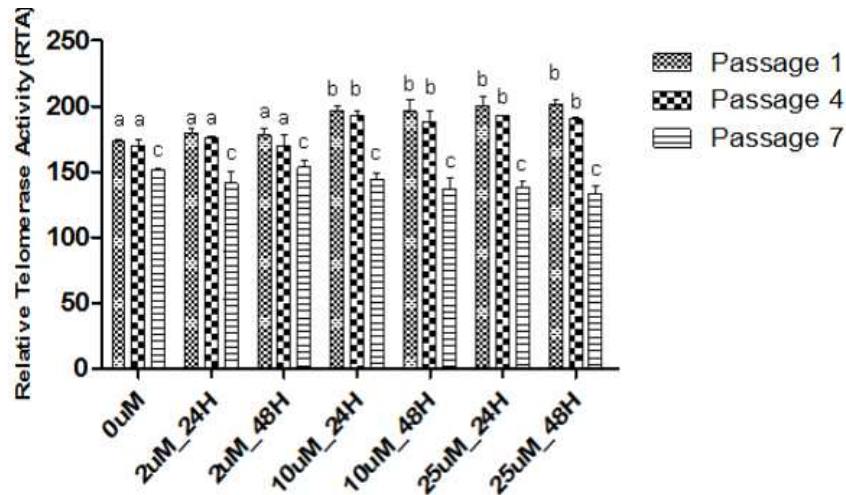


그림 77 지방줄기세포에서의 Resveratrol처리에 따른 텔로머레이즈 활성 변화. 그래프 상의 알파벳이 다른 것은 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 의미함 (P<0.05).

2. 최적의 복제수정란 활성화조건 확립을 통한 복제수정란 생산효율 향상 및 복제 검역탐지견 생산

가. 연구수행 방법

(1) 체내 성숙 난자의 획득

발정초기의 암캐를 선별하여 매일 혈액을 채취 및 혈청 분리한 후 혈중프로게스테론 농도를 측정한다. 측정된 프로게스테론 농도를 기준으로 배란일을 결정 후 배란 3일째에 Isoflurane으로 전신 마취후 개복하여 난관내의 성숙 난자를 회수한다. 생식열구 (bursal slit)를 통하여 난관의 처음 끝단에 접근하여 inverted flanged bulb needle을 수술적 결찰로 고정하며, 고정은 3cm 플라스틱튜브 및 지혈 검자와 quick-release device를 이용하여 실시한다. 자궁-난관접속부 바로 위의 난관 기저부를 드러내고, 10% (v/v) FBS, 2 mM NaHCO₃, 5 mg/ml BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA)가 보충된 CW배지로 채워진 24게이지 주사기를 삽관하여 배지를 밀어낸다. 이때 배지와 함께 흘러나오는 생체내 성숙난자를 회수하여, 38.5℃ 조건의 CW배지로 운반한다. 실험실로 운반후 CW배지 내에서 0.1% (v/v) hyaluronidase에 침지한 후, 미세 유리파이펫을 이용하여, 난자로부터 난구세포를 제거하여 단위생식을 위하여 준비한다.

(2) 단위발생을 위한 난자의 활성화

최적의 활성화 조건을 확립하기 위하여, 체내성숙된 난자를 2가지의 조건으로 인위적으로 활성화를 유도한다. 기존의 calcium-ionophore (C-I) 로 4분간 처리하여 calcium oscillation을 유도한후, 4-Dimethylaminopyridine (DMAP)을 이용하여 활성화를 완료한다. 이때 4-DMPA 의 처리시간을 달리하여 단위발생을 유도하고자 한다. 4-DMAP는 2시간과 4시간을 처리하여 단위발생후 단위발생 수정란의 관찰을 통해 형성되는 핵상을 관찰한다.

(3) BrDU 면역염색을 이용한 단위생식 수정란의 핵상 관찰

활성화를 마친 수정란은 핵상 관찰을 위하여 Brdu를 이용하여 면역 염색을 한다. Brdu가 첨가된 PZM-5(수정란 배양배지)에서 1시간 배양후, 4% PFA에서 고정한다. 고정후 2%BSA로 blocking된 수정란은 1차항체 mouse anti-BrDU 에서 침지된후, 2차항체 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG로 염색한다. 마지막으로 수정란은 DNA-binding DAPI로 염색하여 핵상을 관찰한다. 수정란의 핵상 관찰은 6-DMAP 처리후 2시간, 4시간 그리고 12시간째 관찰하여 전핵 형성 시기과 올바른 형성을 보이는지 여부를 관찰한다.

(4) 6-DMAP의 처리시간에 따른 단위생식 수정란의 체내 발생 결과 비교

난자의 활성화후 단위발생 수정란은 체내발달 효율을 조사하기 위하여, 자연배란 동기화가 된 대리모의 난관내로 탐켓 카테터를 이용하여 이식한다. 이식한날로부터 26일째 대리모를 개복하여,이식한 단위발생 수정란의 착상 및 착상된 배아의 수와 배아의 상태를 확인한다. 최종적으로 착상되어진 배아를 통해 개의 최적의 활성화 조건을 확립한다.

(5) 체세포 핵이식을 위한 공여 핵세포의 준비

체세포 핵 이식 (SCNT)를 위하여 2 내지 6 계대의 세포들을 사용한다. 체세포 핵이식을 하기에 앞서, 세포들을 해동하고, 100% 컨플루언시가 될 때까지 배양한 후 약 3분 동안 트립신 처리하여 단일 층으로부터 분리시켜 하나의 세포로 회복시켜 핵 공여 세포로 이용한다.

(6) 체세포 핵 이식을 위한 수핵 난자의 준비

앞서 언급한 체내성숙 난자회수 방법을 이용하여, 제1극체를 지닌 개의 체내 성숙 난자를 플라싱을 통해 회수한다. 회수된 난자는 실험실로 운반된후, CW 배지 내에서 0.1% (v/v) 히알루로니다제 (hyaluronidase)에 침지한 후, 미세 유리파이펫을 이용하여 난구세포를 제거한다. 그 후, 각각의 난자들은 미세조작기를 이용하여 홀딩 마이크로피펫으로 고정하고, 10% (v/v) FBS 및 5 ug/mL 핵스트 (Hoechst 33342)와 5 ug/mL 사이토칼라

신 B가 첨가된 CW 배지 내에서 핵스트로 염색된 난자의 염색체를 aspiration pipette을 사용하여 제거한다. 탈핵된 난자는 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199에 두고 계속하여 체세포를 주입하는데 사용한다.

(7) 미세주입, 융합, 활성화 및 이식

공여 체세포와 수핵 세포질체의 합체를 향상 시키도록 10% (v/v) FBS가 보충된 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 탈핵 난자의 위란강 (perivitelline)으로 하나의 공여세포를 주입한다. 상기 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM HEPES 및 0.05% (w/v) BSA를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 바늘 형의 2개의 마주보는 전극 사이에 놓는다. 난자 세포질체 및 핵 공여 세포 사이의 접촉면을 전극과 평행하게 놓고, Electro-Cell Fusion apparatus (NEPA GENE Co., Chiba, Japan)로 전기 자극을 준다. 70-75V, 15 usec 지속시간으로 2 펄스를 가하며, 전기 자극 30 분 후에 핵 공여세포와 난자세포질체의 융합을 실체현미경 하에서 관찰한다. 융합된 수정란만을 선별하여 단위생식기법을 통해 개발된 최적의 활성화 조건으로 융합수정란의 활성화를 유도한다. 복제수정란의 활성화가 끝나면, 자연배란 동기화가 된 대리모의 난관내로 탐침 카테터를 이용하여 복제수정란을 로딩하여 이식한다. 이식한날로부터 30일째 초음파기기를 이용하여 태아의 형성 유무를 확인하여 임신을 판정한다. 임신되어진 개체는 이식한 날로부터 60일째 분만을 위한 준비를 한다.

나. 연구수행 결과

(1) 두가지 다른 활성화 조건을 이용한 단위발생 개수정란의 핵상 관찰

개의 체내 성숙난자를 이용하여 2가지의 다른 조건의 활성화 기법을 이용하여 단위생식을 실시하였다. 개 난자의 활성화를 위하여 C-I 에서 5분간 처리후, 6DMAP을 2시간과 4시간으로 나누어 실험을 실시하였다. 난자의 활성화 후, 각 그룹의 난자들은 2시간, 4시간 그리고 12시간 쯤에 BrdU 염색을 이용하여 단위발생시 난자의 핵형의 변화를 관찰하였다. 그 결과는 아래 그림과 같다.

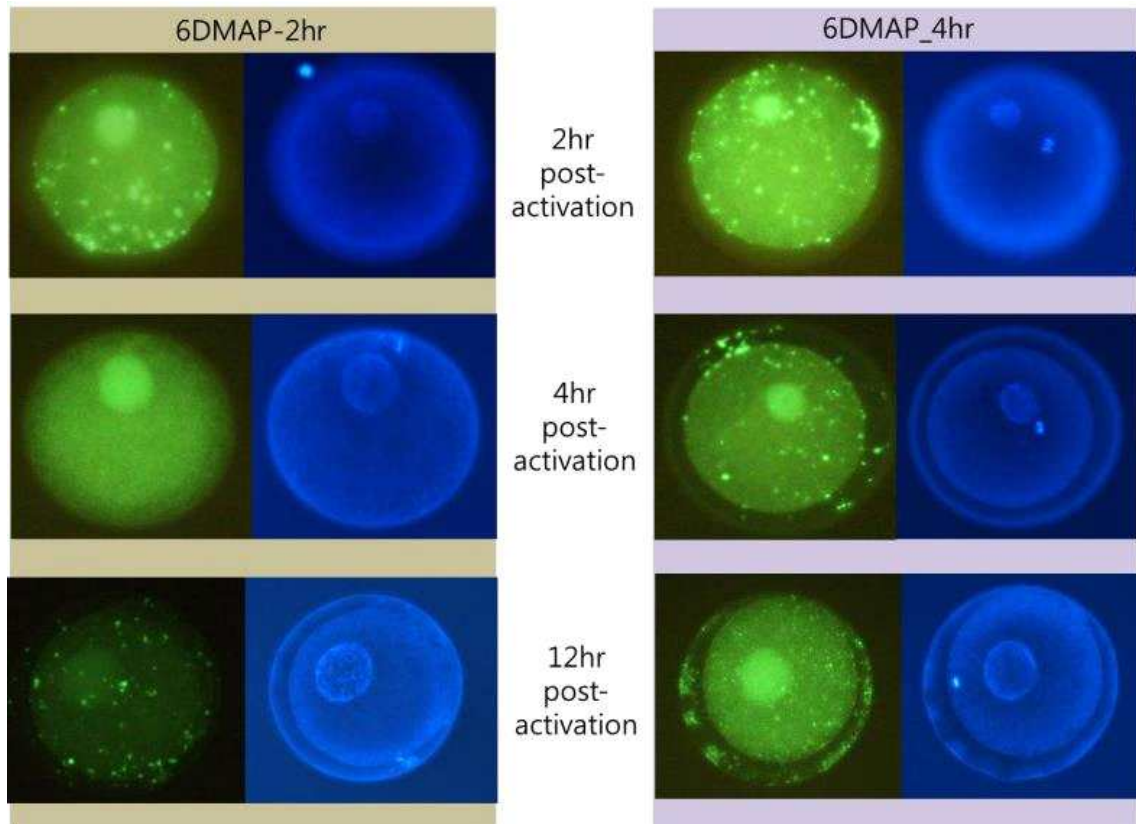


그림 78 6-DMAP 4시간과 2시간 처리한 단위발생 수정란의 활성화후 2시간, 4시간, 12시간째 형성된 전핵과 BrdU assay를 이용한 DNA 합성

대부분의 개 난자는 활성화후 2시간째부터 DNA synthesis의 개시와 함께 전핵이 형성된다. 전핵의 올바른 형성은 이후 재구축된수정란이 정상적인 수정란으로 발달하는데 중요한 시초가 되어진다. 따라서 본 실험에서는 난자의 활성화조건중 올바른 전핵형성이 유도되는 조건을 선정하고자 실험을 하였으면 결과는 다음과 같다. 2시간 6DMAP 를 처리한 그룹은 활성화 2시간째부터 DNA 합성의 개시가 나타나기 시작했으며, 모든 난자가 완벽하게 합성이 개시된 것을 확인하였다. 이에 반해 4시간 6DMAP처리구는 DNA 합성의 개시가 나타났으나 아래 표과 같이 70%만이 합성이 개시되어졌으며, 나머지는 일어나지 않은 것을 확인할수 있었다. 또한 활성화후 2시간, 4시간 그리고 12시간째 나타나는 전핵의 크기역시 6DMAP 2시간 처리구에 비해 그 크기가 크지 못한 것을 확인할수 있었다. 따라서 **전핵형성을 관찰한 결과는 6DMAP 2시간 그룹이 개 난자의 활성화를 용이하게 유도하는 것을 확인**하였다.

표 46 단위발생 수정란에 있어 활성화조건에 따른 DNA 합성 비교

Group	Post-activation (hr)	No. of embryos	No. of BrDU stained embryos	DNA synthesis rate(%)
2hr	2	10	10	100
	4	12	12	100
	12	12	12	100
Total		34	34	100
4hr	2	10	7	70
	4	11	11	100
	12	12	12	100
Total		33	30	70

- (2) 두 가지 다른 활성화 조건으로 생산된 단위발생 수정란의 이식 및 체내발달 비교
 단위생식 수정란의 전핵형성결과에 이어, 단위생식 수정란의 대리모의 난관내 이식시 그들의 체내 발달율을 비교 실험 하였다. 결과는 아래 표와 같다.

표 47 난자의 활성화조건에 따른 단위생식배아의 체내발달을 비교

활성화 조건	이식한 단위생식 배아수	대리모수	임신 대리모수 (임신대리모수/총대리모수)	착상된 배아수 (착상배아수/이식배아수)
6-DMAP 2hr	53	5	3 (60%)	13 (24.5%)
6-DMAP 4hr	45	4	2 (50%)	2 (4.4%)

표에서 보는바와 같이, 6-DMAP 2시간 그룹이 4시간 그룹에 비하여 유의하게 높은 임신율과, 착상율을 나타내었다. 또한 아래 그림과 같이 착상에서 형성된 배아의 형태에서도 차이를 보여주었다. 이식 후 26일째 회수한 배아의 형태는 4시간 그룹에 비하여 2시간 그룹이 정확한 형태를 지니고 있는 것이 관찰되었으며, 그 수도 유의하게 많았다. 따라서 **개 난자의 활성화 조건은 6-DMAP 처리시 2시간이 적합할것으로 결론**되어진다.

**6-DMAP
2hr**

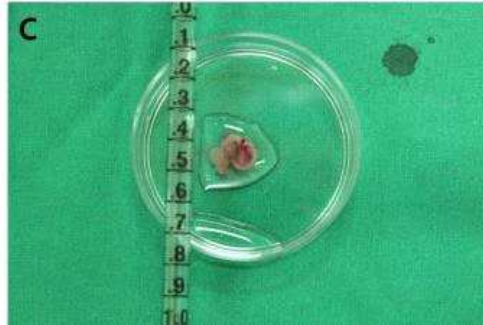


그림 79 6-DMAP 2시간 처리한 단위발생 수정란의 대리모 이식후 26일째회수된 태아의 모습

**6-DMAP
4hr**

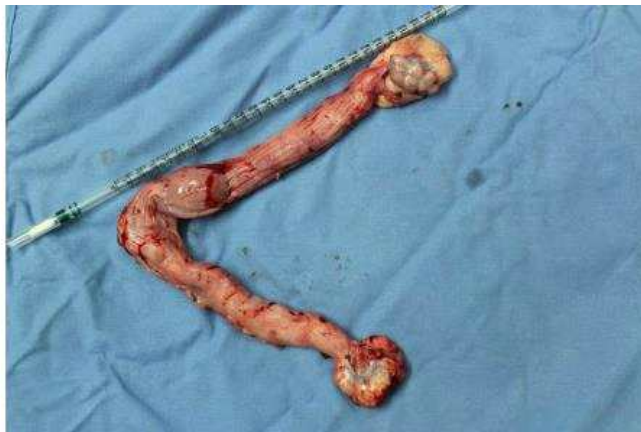
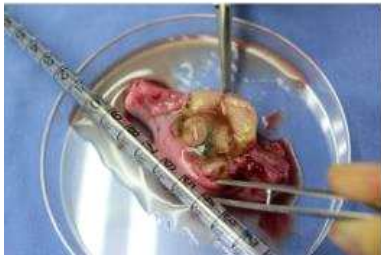


그림 80 6-DMAP 4시간 처리한 단위발생 수정란의 대리모 이식후 26일째회수된 태아의 모습

- (3) 두 가지 다른 활성화 조건으로 생산된 단위발생 수정란의 이식 및 체내발달 비교
복제수정란의 활성화를 유도시에, 2가지의 다른 조건에 따른 DNA 합성결과를 비교 분석하였다. 그 결과는 아래 그림과 같다.

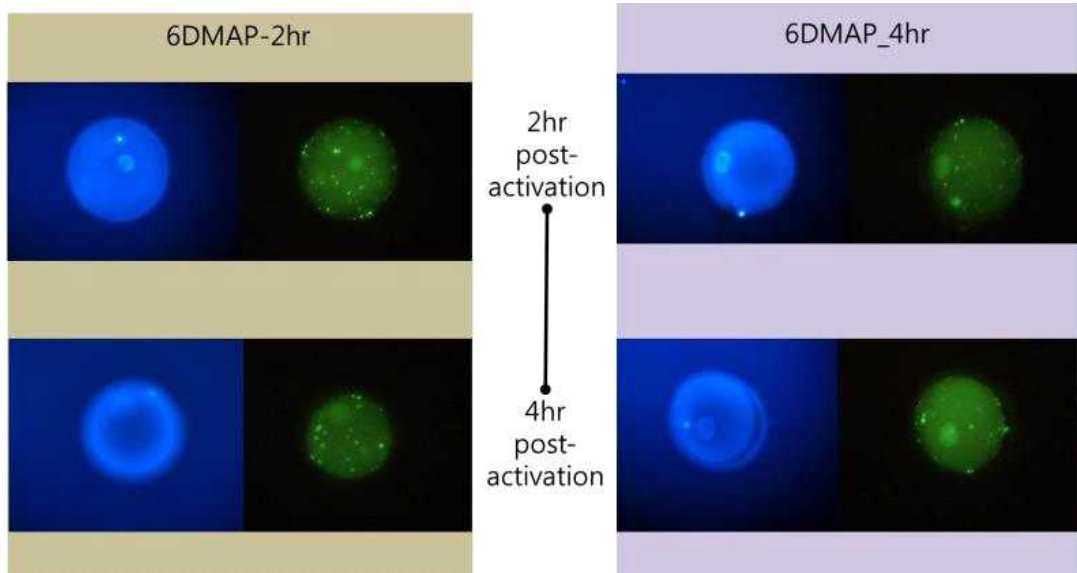


그림 81 복제수정란의 생산시 활성화 조건에 따른 수정란의 DNA 합성 개시 관찰. 활성화 후 2시간째와 4시간째의 수정란을 관찰한 결과

활성화후 6DMAP 2시간 처리군과 6DMAP 4시간 처리군의 결과는 다른 양상을 보여주었다. 활성화후 2시간째 복제수정란의 DNA 합성 개시는 2시간 그룹 수정란의 90%가 DNA합성이 개시되었고, 4시간 그룹은 77%가 수정란의 DNA합성을 보여주었다. 활성화 후 4시간째는 두그룹 모두에서 DNA합성이 일어난 것을 확인하였다. 따라서 **개 난자의 활성화의 경우 복제수정란의 발달을 위해 DNA 합성을 통해 전핵형성이 빠르게 나타나는 6DMAP 2시간 처리군이 더욱 우수한 것을 확인**하였다.

(4) 체세포핵이식을 이용한 복제수정란 생산 및 이식

앞선 복제수정란 생산시 DNA 합성 개시에서 우수한 결과를 보여준 **6DMAP 2시간 처리군을 이용하여 복제검역견을 3두 생산**하였다. 그 결과는 아래 표와 같다.

표 48 6DMAP 2시간 처리를 이용한 우수 검역탐지견 카이저의 복제 생산

	대리모	이식한 복제배아수	임신진단	착상된 배아수	생존 산자수
1	A	14			
2	B	9			
3	C	11	+	3	2
4	D	8	+	3	1
5	E	8			
총합	5	50	2 (40%) ^a	6 (12%) ^b	3 (50%) ^c

a임신한 대리모수/총대리모의 백분율, b착상된 배아수/이식한 복제배아수의 백분율, c생존 산자수/착상된 배아수의 백분율

새롭게 개발되어진 6DMAP 2시간 처리로 복제수정란을 생산하여, 대리모에 이식한 결과 기존의 6DMAP 4시간 처리군에 비하여 우수한 배아형성율을 확인하였다. 본 연구결과에 의하면 6DMAP 2시간 처리그룹이 이식한 복제배아의 수가 한배에 3마리로 유의하게 높은 착상율을 보여주었고, 이 결과는 이전의 결과에 비하여 유의하게 높은 결과임을 검증하였다. 그러나 착상된 배아중 최종 분만시 생존한 개체는 50%로 향후 생존율을 높일 수 있는 방법을 모색하여 보다 안정적이고 높은 효율의 복제개 생산 시스템을 개발할 계획이다.

제 8 절 탐지능력과 유전학적 객관적 지표와의 연관관계 분석

1. 후각관련유전자의 polymorphism 확대 검증을 위한 복제견 및 재복제견의 후각관련 유전자의 polymorphism 비교

가. 연구수행 방법

(1) 유전자 다형성 비교

(가) 공여견과 복제견, 재복제견의 도파민 전달체 비교

2013년 도파민 전달체 유전자와 Belgian Malinois의 활동성과의 상관관계가 보고되었고 (Lit et al., 2013, PLoS One), 특히 도파민 전달체 유전자의 경우, 해당 유전자의 넉아웃 모델 마우스에서 후각 능력 소실이 나타나는 등 (Tillerson et al., 2006, Behav Brain Res)을 보고하였다. 따라서 이러한 논문의 내용을 참조하여 우수 검역견의 객관적 지표의 연관성 분석을 위한 유전자로 후각능력 유전자의 하나인 도파민 유전자의 다형성을 공여견과 복제견들간의 유사성 분석을 진행하게 되었다.

분석 대상으로 선정된 Dopamine Transporter (SLC6A3) 유전자상의 single nucleotide polymorphism (SNP, rs8679684)에 대해 PCR을 시행한 뒤 direct-sequencing을 진행하였다. PCR reaction은 Toyobo사의 KOD FX taq polymerase를 이용하였으며, PCR 반응 조건은 95°C 2분 반응 후 98°C 10초, 62°C 30초, 68°C 1분간 35회 반응하였다, PCR 반응에 사용한 프라이머는 다음과 같다.

표 49 Primer 정보

Name	Type	Primer sequence (5'→3')
SLC6AC	Forward	CAGATCAGACATTACTCTAACTATTGC
	Reverse	TCATCAAGCAGGGAAAAAGG

반응이 끝난 PCR product는 Affymetrix사의 ExoSAP-IT을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR product로 direct-sequencing 하였으며, DNASTar로 sequence를 분석하였다.

(나) 공여견과 복제견, 재복제견의 옥시토신 수용체 유전자 다형성 비교

2014년 개에서의 사람을 대하는 사회성과 옥시토신 수용체 유전자의 다형성의 연관성 (Kis et al., 2014, PLoS One)에 대한 보고가 있었다. 따라서 이러한 논문의 내용을 참조하여 우수 검역견의 행동학적 분석 지표 중 사회성과 관련된 행동평가 목록과 함께, 공여견과 복제견들간의 옥시토신수용체 유전자에 대한 유사성 분석을 진행하게 되었다.

분석 대상으로 선정 된 Oxytocin receptor (OXTR) 유전자 내의 두 개 구역(-212AG, 19131AG)에 대한 single nucleotide polymorphism (SNP)에 대해 PCR을 시행한 뒤 direct-sequencing을 진행하였다. PCR reaction은 Toyobo사의 KOD FX taq polymerase를 이용하였으며, PCR 반응 조건은 95°C 2분 반응 후 98°C 10초, 62°C 30초, 68°C 1분간 35회 반응하였다, PCR 반응에 사용한 프라이머는 다음과 같다.

표 50 Primer 정보

Name	Type	primer sequence
OXTR1	Forward	GGATGGTGCTGAGCGGGGGA
	Reverse	GGCCGTGCGGTTGCCCT
OXTR2	Forward	TAGACAGTCCGCCCTTGGTGG
	Reverse	CACCTTCTGACATGCTGGTGCCC

나. 연구수행 결과

(1) 유전자 다형성 비교

(가) 공여견과 복제견, 재복제견의 도파민 전달체 비교

사람의 질환에서 인지능력과 후각 능력이 함께 소실되어 나타나는 병증으로 Machado-Joseph disease 가 알려져 있다 (Schöls et al., 2004, Lancet Neurol;

Braga-Neto et al., 2011, Parkinsonism Relat Disord). 이러한 환자들은 파킨슨 환자와 마찬가지로 운동 기능도 소실되어 있을 뿐만 아니라 시각적 기억 능력이 결핍되어 있다 (Radvany et al., 1993, Arq Nueropsiquiatr; Klinke et al, 2010, Cerebellum; Pedroso et al., 2011, Cerebellum). 또한 파킨슨 환자에서도 가장 초기 증상으로 후각 능력의 소실이 알려져 있다 (Doty, 2007, Parkinsonism Relat Disord). 이러한 환자의 증상과 가장 관련이 있는 신경전달 물질은 dopamine transporter 이다. Dopamine transporter의 경우 후각 능력과 관련이 되어 있어서 이 유전자의 녹아웃 마우스에서 후각 능력이 소실되었다는 보고가 있다 (Tillerson et al., 2006, Behav Brain Res). 또한 후각 능력 외에 이 유전자의 녹아웃 마우스에서 사회성 등의 이상 행동도 관찰되는 등 사회성에도 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다. 따라서 후각관련 유전자의 polymorphism관련 분석을 위해 첫 번째 유전자로 Dopamine transporter에 대해 공여 세포 제공건과 복제건의 polymorphism의 유사성 및 비교 검증 분석을 실시하였다. Dopamine Transporter (SLC6A3)의 유전자에 대해 두 공여건에 대해 분석 실시하였다.

Danny	GGAAAATCCTCAGCCTGTCTTTTAAGGAGGCCCTGAC
Kaiser	GGAAAATCCTCAGCCTGTCTTTTAAGGAGGCCCTGAC

그림 82 복제건 대니, 카이저의 유전자 다형성 분석

Direct-sequencing을 통한 SLC6A3의 염기서열은 위 그림의 결과와 같았다. chr34:11243915 위치에서의 두 공여건 (대니, 카이저)의 염기서열은 GGAAAATCCTCAGCCTGTCTTTTAAGGAGGCCCTGAC로, 비글이 아닌 다른 품종의 염기 서열을 제시한 참고문헌의 서열과 같이 시작위치에서 GGAAAATC의 동일한 염기서열을 확인할 수 있었다.

또한 대니와 대니의 복제건 7두 (재복제건 포함)에서 도파민 트랜스포터의 서열을 분석하였다. 그 결과는 아래의 그림과 같다. 제시된 위치에서의 시작 염기서열은 견종에 관계없이 GGAAAATC로 시작되었으나, Boxer나 Malinois 종에서 확인되는 poly A allele은 본 분석에 사용된 Beagle의 종에서는 찾을 수 없었다. 그러나, 동일한 염기서열로부터 30base pair의 염기서열을 확인한 결과, 복제건에 염기서열은 GGAAAATCCTCAGCCTGTCTTTTAAGGAGGCCCTTGAC로, chr34:11243949 위치에 [T]가 삽입되었음을 확인하였다 (아래 그림 붉은 박스 참조). 반면 공여건은 GGAAAATCCTCAGCCTGTCTTTTAAGGAGGCCCTGAC 였다. 특히 복제건과 재복제건 모두 동일한 서열 삽입을 나타냈다.

Danny	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC
Jan	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC
Feb	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCATGAC
March	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCNNTAAGGAGGCCCTTGNC
April	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC
May	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTNGAC
June	GGAAAATCCTCAGCCTNTCTTTAANGAGGCNCTNGAC
July	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC



그림 83 대니, 대니 복제견 3두 (Jan, Feb, March) 및 재복제견 4두 (April, May, June, July)의 dopamine transporter 유전자의 다형성 분석

그리고 카이저와 카이저의 복제견 7두에서 유전자 서열을 분석한 결과 대니의 결과와 동일하였다.



Kaiser	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC
Mercury	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC
Venus	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC
Earth	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC
Mars	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC
Jupiter	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC
Saturn	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC
Uranus	GGAAAATCCTCAGCCTGCTCTTTAAGGAGGCCCTTGAC

그림 84 카이저 및 카이저 복제견 7두의 dopamine transporter 유전자의 다형성 비교 분석

견종에 관계없이 GGAAAATC로 시작되었으며 동일한 염기서열로부터 30 base pair의 염기서열을 확인한 결과, 14두의 복제견에 염기서열은

GGAAAATCCTCAGCCTGTCTTTTAAGGAGGCCCTTGAC로, chr34:11243949 위치에 [T]가 삽입되었음을 확인하였다. 이러한 복제건의 후각 관련 유전자의 다형성은 삽입에 있어서 한 서열의 차이가 있음을 검증하였으며 이 결과는 복제건에서 삽입된 [T]로 인해 다음 염기서열에서의 frame shift가 발생하고, 이로 인해 amino acid의 변화가 유도됨을 보여주었다.

(나) 공여건과 복제건, 재복제건의 옥시토신 수용체 유전자 다형성 비교

옥시토신은 엄마의 자애로운 행동과 관련이 있는 호르몬인데, 사람에서 이 호르몬을 투여한 결과 사회성이 훨씬 더 좋아지는 것으로 나타났다. 연구팀은 이들 호르몬이 수용체에 달라붙으면 세포 조직에 메시지를 보내는 방식으로 세상을 바라보는 시각이나 성격에 영향을 미친다고 설명했다 (Poulin et al., 2012, Psychol Sci). 또한 옥시토신이 자폐아의 사회성 결핍을 치료하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 미국 예일대에서 자폐증을 앓는 8~16세의 청소년 17명을 대상으로 옥시토신 호르몬이 든 스프레이를 코로 흡입하도록 했다. 그런 뒤 한번은 사람의 눈을 찍은 사진들을, 또 한 번은 트럭과 자동차 같은 물체 사진들을 보여주면서 감정을 관장하는 뇌 부위들이 어떤 반응을 보이는지를 자기 공명영상장치 (MRI)로 촬영했다. 연구 결과, 옥시토신이 투여된 상황에서 사람의 눈 사진을 보여주었을 때 감정이입, 보상 같은 사회적 기능을 수행하는 뇌 부위가 활성화되는 것으로 나타났다. 반면 자동차 같은 물체를 보여주자 사회적 기능을 관장하는 뇌 부위의 활동이 줄어들었다 (Gordon et al., 2013, PNAS). 또한 옥시토신 수용체는 개에서도 사회성 및 사람에 대한 친화도에 관련하여 유전적 다형성이 확인되었다 (Kis et al., 2014, PLoS One).

Anna Kis, et al. (Kis et al., 2014, PLoS One)에 의해 제시된 개에서의 20번 염색체에 위치한 Oxytocin receptor (OXTR) 유전자의 세 구역(-212AG, 19131AG, rs8679684)에 대한 정보는 아래와 같다.

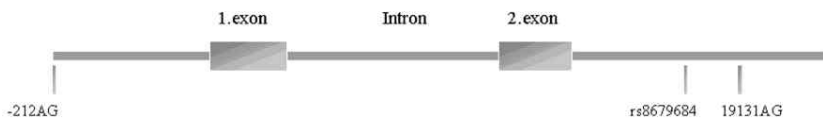


그림 85 Oxytocin receptor (OXTR) 유전자의 세 구역(-212AG, 19131AG, rs8679684)에 대한 정보

따라서, 옥시토신 수용체 (OXTR) 유전자의 세 구역(-212AG, 19131AG, rs8679684)에 대해 유전적 다형성의 유사성을 확인하였다. 각 유전자의 구역에 대한 특이적 primer를 이용한 PCR 반응 후 OXTR 유전자의 polymorphic site를 포함하는 부위의 direct-sequencing을 진행하고 복제건, 공여건간에 차이가 나는 염기서열이 있는지 확인하였다.

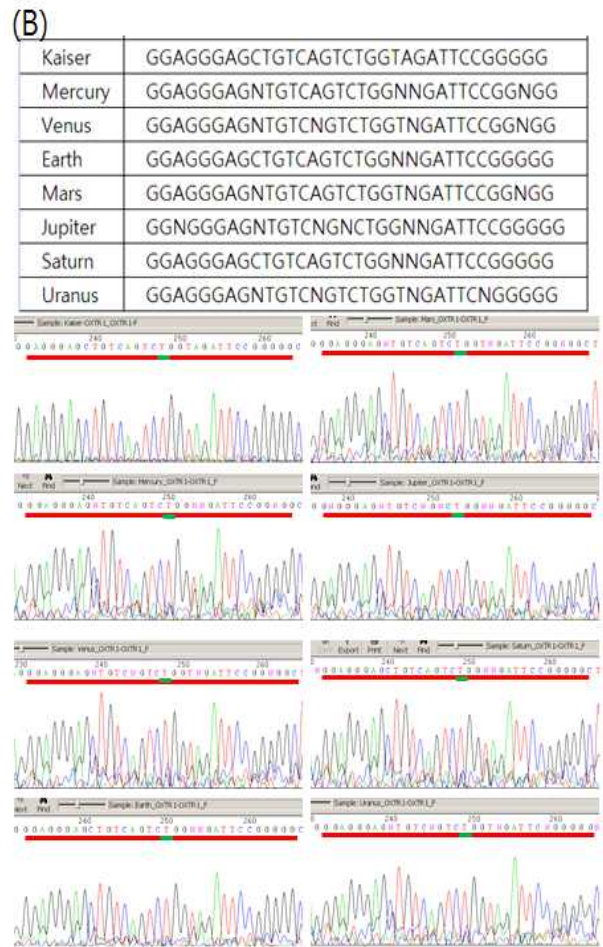
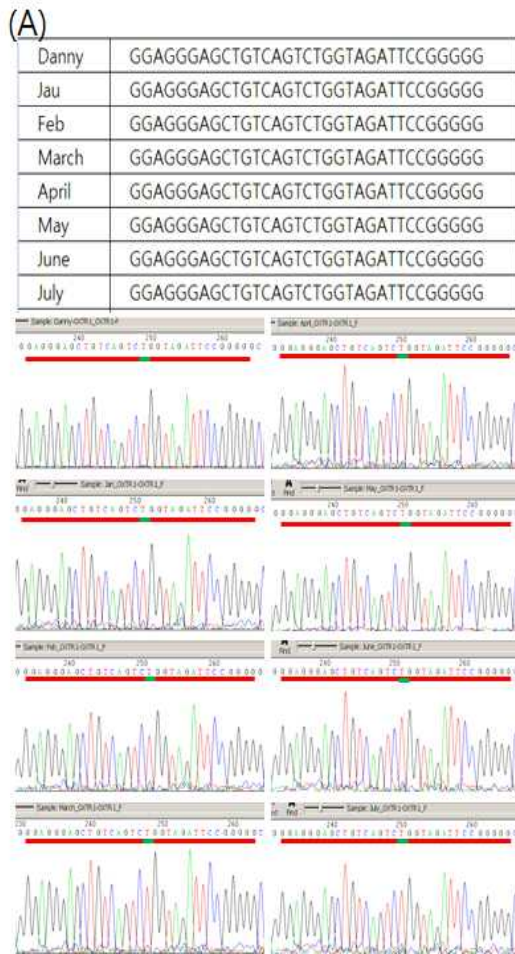


그림 86 (A) 대니, 대니 복제견 3두 (Jan, Feb, March) 및 재복제견 4두 (April, May, June, July)의 옥시토신 수용체 -212AG 유전자의 다형성 분석 비교 연구. (B) 카이저와 카이저 복제견 7두의 옥시토신 수용체 -212AG 구역의 다형성 분석 비교 연구.

옥시토신 수용체 세 구역 중 첫 번째 타겟인 -212AG는 비글의 염기 서열의 경우 참고 문헌에서 제시된 Shepherd, Collie 종에서의 AG type이 아닌 T type으로 확인되며, 대니와 카이저 두 세포 공여견 및 복제견 14두에서 모두 동일하게 나타났다. 이는 분석된 견종간의 차이에서 기인한 것으로 해석된다. **첫 번째 타겟 유전자에서는 세포 제공견과 복제견 모두 동일하게 나타났으며 대니와 카이저 모두 동일하게 나타났다.**

(A)



(B)

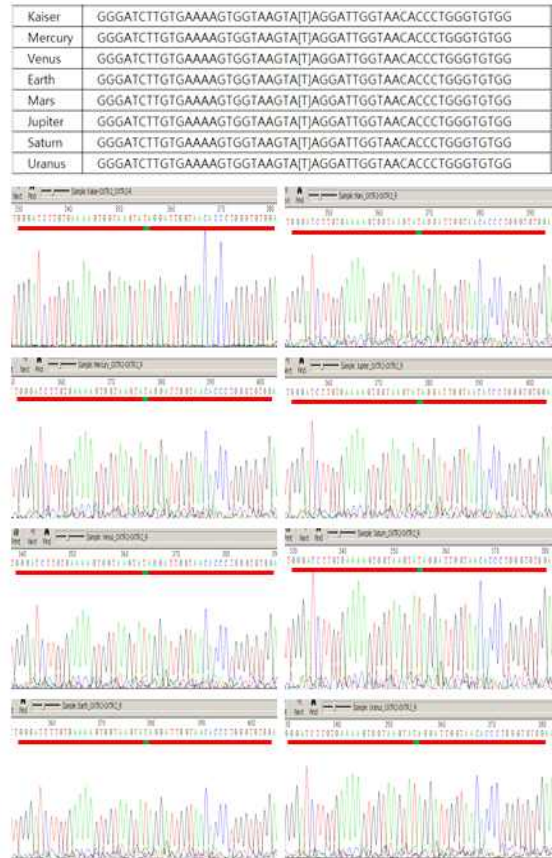


그림 87 (A) 대니, 대니 복제견 3두 (Jan, Feb, March) 및 재복제견 4두 (April, May, June, July)의 옥시토신 수용체 rs8679684 구역의 다형성 분석 비교 연구. (B) 카이저와 카이저 복제견 7두의 옥시토신 수용체 rs8679684 구역의 다형성 분석 비교 연구.

옥시토신 수용체 다형성 분석의 두 번째 타겟인 19131AG type 역시, AG type이 아닌 T type으로, -212AG와 같은 이유에 의한 결과로 해석된다. 복제견들 사이에서 모두 동일하게 나타났으며 대니와 카이저 두 종 간에 차이 없이 모두 동일한 서열을 갖고 있는 것으로 나타났다.

(A)

Danny	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
Jau	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
Feb	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
March	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
April	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
May	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
June	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
July	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA

(B)

Kaiser	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
Mercury	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
Venus	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
Earth	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
Mars	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
Jupiter	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
Saturn	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA
Uranus	TTTTTTTCTTCTTTTTTCTCCTGGACCTA

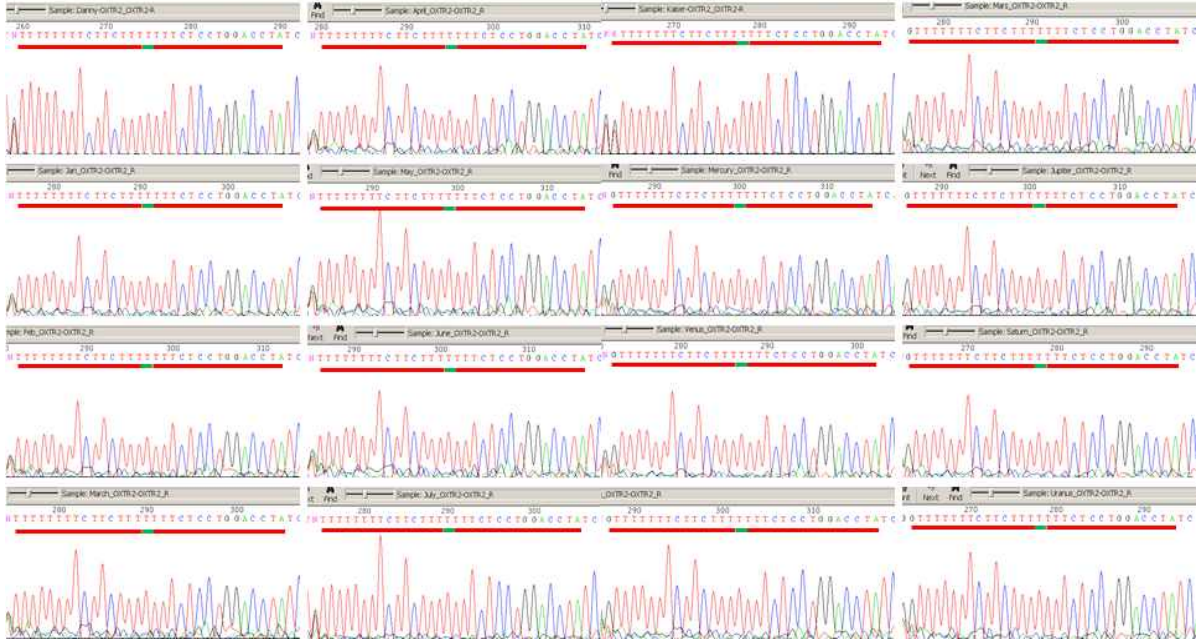


그림 88 (A) 대니, 대니 복제건 3두 (Jan, Feb, March) 및 재복제건 4두 (April, May, June, July)의 옥시토신 수용체 rs8679684 구역의 다형성 분석 비교 연구. (B) 카이저와 카이저 복제건 7두의 옥시토신 수용체 rs8679684 구역의 다형성 분석 비교 연구.

옥시토신 수용체 다형성 분석의 세 번째 타겟인 rs8679684의 참고 염기서열은 GGGATCTTGTGAAAAGTGGTAAGTA[A/T]AGGATTGGTAACACCCTGGGTGTGG로 분석된 공여건과 복제건은 모두 T type으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. SNP 위치의 T type을 제외한 참고 염기서열의 차이는 공여건-복제건 또는 두 공여건에서의 개체간의 차이는 없었다. 이로써, OXTR 유전자는 분석 위치에 관계없이 공여건-복제건간의 유사성이 100% 일치하는 것으로 확인되었다.

현재까지의 결과를 토대로 후각 관련 유전자의 다형성 또한 복제건에서 특이적인 차이점을 보이지 않는 것으로 나타났다. **현재까지 분석된 유전자 4개 중 3개 (75%)는 체세포 공여건과 복제건의 유전자 서열이 완전히 동일하게 나타났으며 후각과 관련된 유전자 dopamine transporter 유전자는 유전자 서열의 하나만 차이가 발생하였다.**

제 9 절 복제견과 세포공여견간의 영상학적 분석; 복제 검역 탐지견의 후각기능 및 뇌기능 평가

1. 대조군 및 프로토콜 확립을 위해 일반 비글견에서의 fMRI 촬영 및 영상 기능적 분석

가. 연구수행 방법

(1) 일반 비글견을 이용하여 우수 검역 탐지견 fMRI촬영을 위한 프로토콜을 확립

(가) 실험대상

5마리의 비글견을 2종류의 마취법으로 각각 마취하였으며, 마취 종류에 따라 Pentobarbital 그룹 (그룹1; 25mg/kg, pentobarbital sodium, 정맥투여)과 Domitor-Zoletil 그룹 (그룹2; 0.03-0.05ml/kg, 정맥투여)으로 나누었다. 두 그룹은 동일한 비글견 5마리로 구성되었으며 모든 개는 최소 2주의 간격을 두고 마취되었다. 마취심도는 미국마취과학회 (American Society of Anesthesiologists, ASA) 의 정의에 따라 깊은 진정 (Deep sedation) 단계로 분류하였다.

(나) 영상촬영

fMRI촬영은 3.0T MRI기기 (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) 를 이용하여 촬영을 실시하였고, 각각의 개에서 T1-weighted sequence 이후 BOLD (Blood Oxygen Level Dependent) sequence를 촬영하였다. 이때 촬영변수들은 다음과 같이 설정하였다. T1 강조영상의 조건은 repetition time (TR)/echo time (TE) 1900/2.26 msec, field of view (FOV) 250 × 218.8 mm, matrix size 215 × 256 mm, 절편두께 1 mm, BOLD 영상의 조건은 repetition time (TR)/echo time (TE) 3000/29 msec, field of view (FOV) 192 × 100 × 192 mm, matrix size 64 × 64 mm, 절편두께 3 mm의 조건으로 촬영되었다.

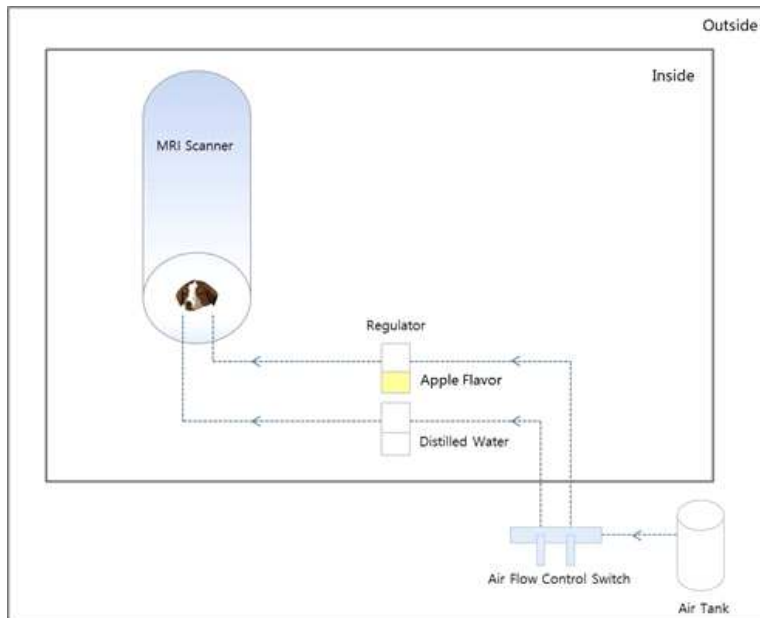


그림 89 후각자극을 위해 설계된 회로

(다) 후각자극

후각자극을 주기 위해 다음과 같은 향기 발생장치를 고안하였다. 100% 압축공기 (Generator) 와 2개의 산소발생기 (Oxygen regulator) 를 연결하고 각각 증류수와 100% 천연사과주스를 30ml 담는다. 각 산소발생기는 서로 다른 산소코즐 (Nasal cannula)을 통해 비글견의 콧구멍과 직접적으로 연결된다. 100% 천연사과주스가 담긴 산소발생기는 사과향을 발생시키고 이 회로를 통해 후각자극을 제어하면서 fMRI 를 촬영하였다. 촬영은 기저상태 (Resting state) 20초 - 활성화자극상태 (Activation state) 10초로 시행하였고 총 5회 반복하였다. 회로의 후각자극은 실험수행자에 의해 수동으로 제어되었다.



그림 90 target향으로 사용된 천연사과농축액(좌)과 non target향으로 사용된 인공사과향(우)

(라) 영상분석

SPM (Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Cognitive

Neurology, London, UK) 을 이용하여 영상학적 분석을 실시하였고, SPM은 MATLAB (The MathWorks, Inc, Natick, MA, USA) 환경 하에서 구현되었다. 마취법에 따라 그룹1과 그룹2로 나누어 통계학적 분석을 실시하였다.

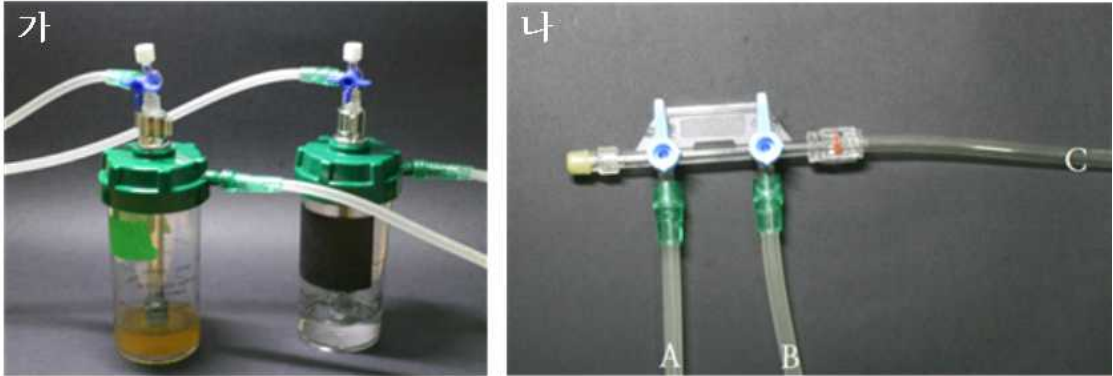


그림 91 가) 향기발생을 위해 사용한 공기발생장치(Oxygen regulator). Target향인 천연사과향 발생을 위해 천연사과농축액을 30ml 넣은 모습(좌)과 대조군인 증류수를 30ml 넣은 모습(우). 나) 향기의 제어를 위해 사용된 2WAY OFF handle. 튜브 C를 통해서 100% 압축공기가 지속적으로 유입된다. 튜브 A는 Target향이 들어있는 oxygen regulator와 연결되며 튜브B는 증류수가 들어있는 Oxygen regulator와 연결된다. 튜브 A 쪽의 스위치를 조절함으로써 향을 통제할 수 있다.

나. 연구수행 결과

(1) 그룹1(Pentobarbital)과 그룹2(Domitor-Zoletil)에서 얻어진 기능적 영상의 분석결과

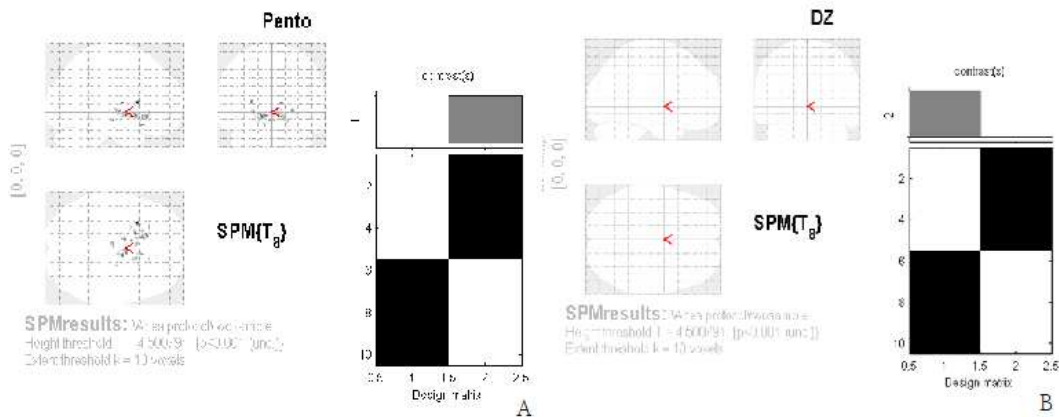


그림 92 그룹1과 그룹2를 비교하여 각각 더 높은 활성화 신호를 나타내는 뇌 영역의 모식도. 그룹1이 그룹2에 비해 더 높은 활성화 신호를 나타내는 뇌의 영역이 많은 것을 알 수 있다. (A) 그룹1이 그룹2에 비해 더 높은 활성화 신호를 나타내는 영역. (B) 그룹2가 그룹1에 비해 더 높은 활성화 신호를 나타내는 영역.

그룹1과 그룹2를 비교해 보았을 때 그룹1의 영상에서 통계적으로 유의성 있게 높은 활성화 신호를 얻을 수 있었다. 특히 후각 및 인지기능과 관련되어 있다고 알려진

Olfactory tract, Piriform lobe, Subthalamic nucleus, Medial lemniscus of medulla oblongata, Hippocampus, Temporal lobe의 통계적으로 유의한 ($P < 0.001$) 활성화 신호를 얻을 수 있었다. Barbiturate 계통인 Pentobarbital sodium을 이용하였을 때, 해리성 마취제인 Domitor-Zoletil과 비교하여 후각 및 인지기능과 관련된 뇌 영역의 신호가 통계적으로 유의성 있게 높게 확인되었다.

본 연구 결과는 **개에서 최초로 fMRI를 이용하여 다양한 마취법에 따라 후각반응을 확인한 첫 연구이며, 향후 수의분야에서의 후각 및 인지기능 연구에 활용될 수 있다고 기대된다.**

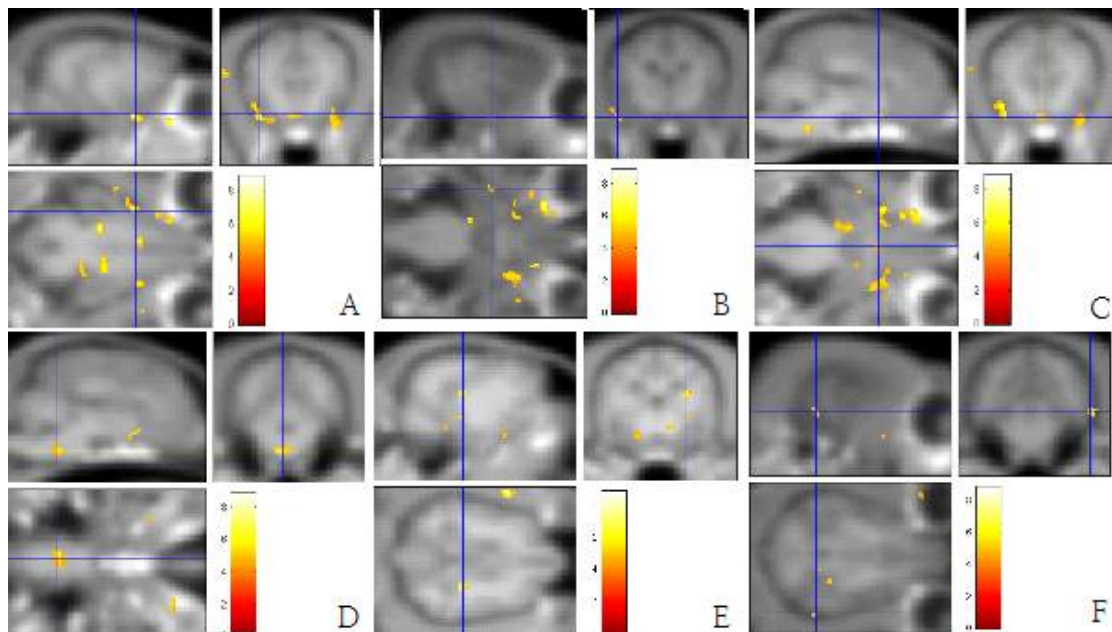


그림 93 Pentobarbital sodium으로 마취 시 활성화된 뇌 부위의 신호. 이 6개의 부위는 모두 후각 및 인지기능과 관련되어 있다고 알려져 있다. (A) Olfactory tract, (B) Piriform lobe, (C) Subthalamic nucleus, (D) Medial lemniscus of medulla oblongata, (E) Hippocampus, (F) Temporal lobe.

2. 복제 검역 탐지견의 fMRI 촬영 및 영상 기능적 분석

가. 연구수행 방법

(1) fMRI 촬영

(가) 최종적으로 확립된 촬영 및 마취 프로토콜을 활용하여 우수검역탐지복제 견의 fMRI 촬영이 실시되었다. 촬영 개체는 모두 데니의 복제견인 쟈, 페브, 마치, 메이, 준, 줄라이로 총 6두의 촬영이 8회에 걸쳐 실시되었다. 대조군인 일반비글견 촬영과 마찬가지로 같은 3.0T MRI기기 (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) 를 이용

하여 촬영을 실시하였다.

(나) 모든 개체는 fMRI 촬영 전에 흉부 방사선 상을 통해 목 뒤에 이식된 마이크로칩의 위치를 확인해 뇌의 자기공명영상을 간섭하지 않을지 확인 후에 촬영되었으며 마취 직후와 촬영 중간에 호흡수를 체크하여 적절한 환기가 이루어지고 있는지 모니터링하였다. 마취심도는 미국마취과학회 (American Society of Anesthesiologists, ASA) 의 정의에 따라 깊은 진정 (Deep sedation) 단계로 분류되었다. 그 외 세부적인 사항은 아래 표에 나타내었다.

표 51 후각기능 평가를 위한 fMRI 촬영시 마취 프로토콜

마취	마취제 및 용량	Pentobarbital sodium 25mg/kg I.V
	마취심도	Deep sedation (ASA 기준)
	호흡수	분당 평균 8회 (6-9회) 유지

표 52 fMRI촬영 프로토콜

회로	Delivery System	100% 압축공기
	Valve System	Two way system
	공기의 흐름	공기의 흐름은 지속적, 스위치의 ON시 향기 추가
	회로의 구성	Nasal Oxygen Tube, Nasal cannula
	Target 향	천연사과주스
	Non-Target 향	인공사과향
	Coil	Head Coil
Resting : Activation 비율	2:1	



그림 94 3.0 Tesla Siemens Tim Trio MRI 기기에서 fMRI 촬영 중인 복제견

표 53 fMRI 촬영 시 호흡수 및 마취심도 모니터링

촬영순서	이름	체중	호흡수	총마취용량	마취심도
1	마치	13kg	마취직후 : 18회/분 촬영중간 : 6회/분	30mg/kg	깊은 진정
2	줄라이	12.1kg	마취직후 : 10회/분 촬영중간 : 8회/분	30mg/kg	깊은 진정
3	젠	12.8kg	마취직후 : 18회/분 촬영중간 : 9회/분	25mg/kg	깊은 진정
4	준	13.2kg	마취직후 : 15회/분 촬영중간 : 9회/분	25mg/kg	깊은 진정
5	페브	15.4kg	마취직후 : 18회/분 촬영중간 : 12회/분	25mg/kg	깊은 진정
6	메이	14kg	마취직후 : 15회/분 촬영중간 : 6회/분	25mg/kg	깊은 진정
7	줄라이	12.1kg	마취직후 : 20회/분 촬영중간 : 9회/분	25mg/kg	깊은 진정
8	준	13.2kg	마취직후 : 15회/분 촬영중간 : 8회/분	25mg/kg	깊은 진정

(2) 영상 기능적 분석

일반 비글견 및 복제검역탐지견의 실험과정에서 얻어진 모든 fMRI 영상을 fMRI 분석 프로그램인 Statistical Parametric Mapping (SPM, MRC Cyclotron Unit, London, UK)

을 이용하여 시행하였고 SPM은 MATLAB (The MathWorks, Inc, Natick, MA, USA) 환경 하에서 구현되었다. 프로그램을 이용한 전체적인 표준화과정을 시행한 후 얻어진 activation map을 T1 강조영상에 중첩하여 최종적으로 기능적 영상을 획득하였다. 이 영상에서 noise를 제거하고 통계적으로 유의한 활성화 신호만을 선택하기 위해 p값을 역치로 사용하였다. 본 연구에서 유의수준은 $p < 0.01$ 을 기준으로 하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 복제 검역탐지건의 fMRI 영상 획득

8회의 촬영으로 통해 얻어진 모든 영상에서 통계적으로 유의한 수준 ($P < 0.01$)의 후각 자극에 대한 뇌 활성화 신호를 확인할 수 있었으며 SPM 소프트웨어를 통해 대조군과의 비교가 가능할 것으로 밝혀졌다.

(2) 대조군과의 활성화 신호 비교를 위한 Template 영상 구축

개체별 뇌 형태적 차이를 보정하기 위해 모든 개체의 T1 강조 영상을 중첩하여 해부학적 Template 영상을 제작하고 여기에 활성화 신호를 입혀 신호의 해부학적 위치를 규명할 수 있었다.

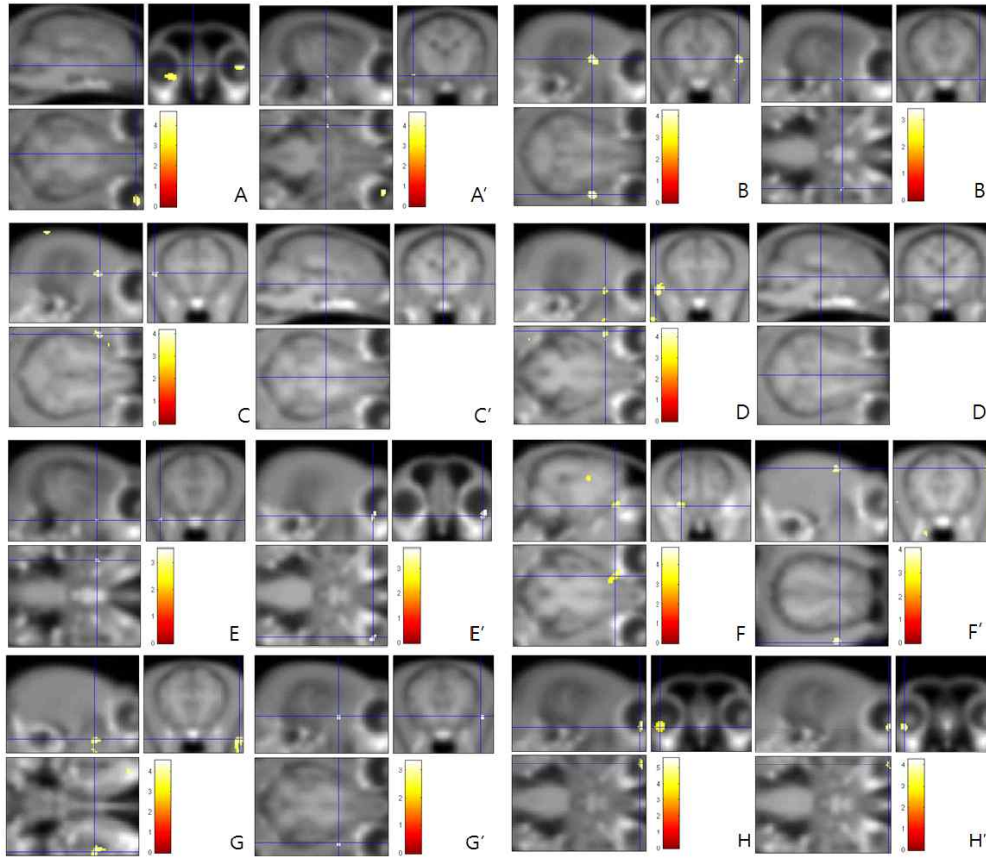


그림 95 복제검역탐지건의 T2 강조영상과 중첩된 fMRI영상. 그림 A부터 H까지 알파벳 순서에 따라 마취, 줄라이, 쟈, 준, 페브, 메이, 줄라이(재촬영), 준(재촬영)의 뇌기능적 영상이다. 그림 X와 X'는 각각 비검역향과 검역향 자극 시에 획득된 영상이다.

3. 일반 비글견과 복제 검역탐지건의 fMRI 결과 비교 연구

가. 연구수행 방법

SPM(Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK)을 이용하여 영상분석을 실시하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 마취프로토콜에 따른 fMRI 후각신호의 차이

현재 수의학 부분에서 fMRI를 이용한 후각연구는 매우 드물며, 때문에 마취 프로토콜 또한 확립되어 있지 않다. 본 실험을 통해 개에서 fMRI를 이용한 후각기능연구의 마취 프로토콜과 실험과정, 그리고 연구결과를 선점하였다는 데 있어서 그 의의가 있다. 본 실험을 통해 확립된 프로토콜을 우수검역탐지복제견과 일반 비글견과의 비교 연구 및

뇌 기능 연구에 적용할 수 있다고 판단되며 향후 임상적으로도 개의 비강종양이나 뇌질환, 후각연구 및 인지기능 연구에도 활용할 수 있다고 판단된다.

(2) 우수검역탐지 복제건의 fMRI 연구

(가) 일반 비글견과 우수검역탐지복제건간의 fMRI 연구

대조군인 일반 비글견과 우수검역탐지복제건의 fMRI 결과는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그 원인으로서는 여러 가지 문제를 생각해 볼수 있겠으나 탐지건의 능력의 상당 부분이 훈련에 의하여 발현되며 깊은 진정 하에서는 의식이 소실되어 후각 능력의 발현이 제한되기 때문이라고 생각된다.

(나) 우수검역탐지복제건에서의 검역물과 비검역물 에서의 fMRI연구

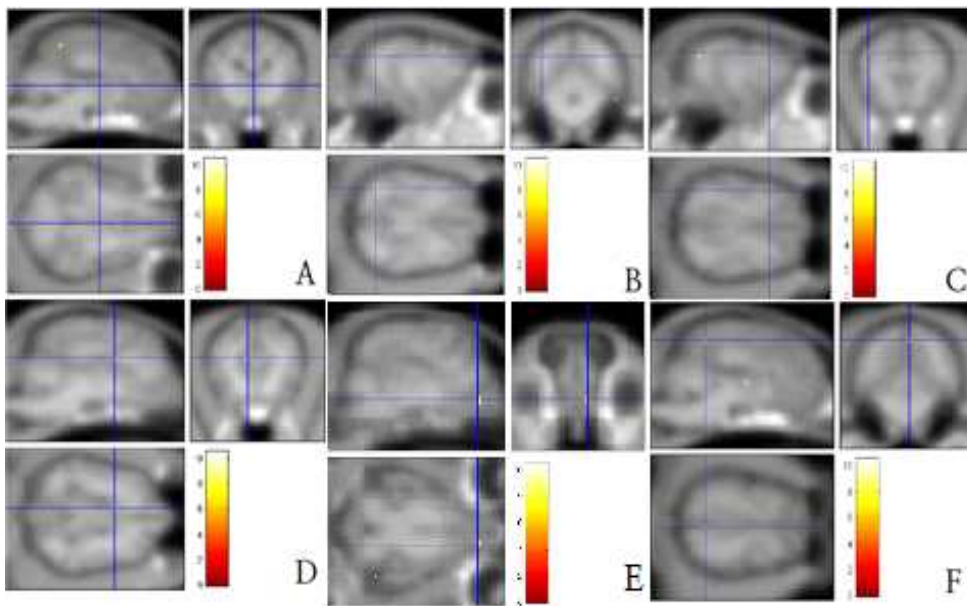


그림 96 비검역물과 비교했을 때 검역물에서 더 높은 활성화 신호를 나타내는 부위의 fMRI영상. 이 영역들은 학습 및 인지능력에 관련한다고 알려져 있다. (A) Thalamus, (B) Cerebral white matter, (C) Cerebral white matter, (D) Cingulate cortex (anterior), (E) Caudate nucleus, (F) Cingulate cortex (posterior)

복제건 자체에서 검역물인 천연사과향과 비검역물인 인공사과향의 fMRI 결과를 비교 분석하였을때 활성화 신호가 뜨는 뇌의 영역이 다른 것을 확인하였다. 검역물과 비검역물의 차이는 주로 **후각영역보다는 인지, 기억의 영역에서 차이**를 보였다. 즉 일반 비글견과 우수검역탐지건의 차이는 선천적인 후각기능의 차이라기보다는 주로 학습이나 인지, 기억의 차이일 확률이 높다고 판단된다. 따라서 **이러한 가설을 확인하기 위해서는 fMRI 상에서 신호 차이를 보였던 영역을 차년도 연구 계획인 VBM으로 분석하여 뇌실질의 부피 차이나 회백질과 백질의 비율 등을 연구함으로써 밝혀질 수 있다고** 판단된다.

제 10 절 훈련종료시 복제견과 대조군의 행동학적 분석

1. 선발된 복제견역견(1차년도 생산)의 현장 투입 시 기록한 영상자료 작성 및 분석

가. 연구수행 방법

(1) 적발 대상 물품(target)과 허용 물품(non-target)의 배치 및 탐지

1차년도에 생산된 복제견 복제견 째, 페브, 마치와 대조군 화이트, 브라운, 블랙, 딸이를 포함한 7두를 대상으로 하여 각 개체의 탐지 활동을 영상 촬영한 후 분석하였다. 인천국제공항의 도착 캐로셀 (수하물이 도착하는 벨트) 옆에서 여행용 가방과 상자 안에 적발 대상 물품(target)과 허용 물품(non-target)을 배치하고 탐지하도록 하였다. 적발 대상 물품에는 육류, 과일, 햄 등이 포함되고 허용 물품에는 해바라기씨, 참깨, 과자, 고춧가루, 버섯, 대추차, 땅콩 등이 포함되었다. 탐지 활동을 하는 개체가 7두이므로 시간 내 승객들은 짐 수취 여부에 따라 시시각각 변화였다. 주변 승객들과 방송, 소음에 대한 훈련은 꾸준히 하였고 이에 대한 영향은 받지 않는다고 판단하였기에 영향을 줄 수 있는 요인에서 배제하였다. 또한 일반적으로 핸들러에게 말을 걸며 관심을 보이거나 공항 관련 문의를 하는 승객이 종종 있으나, 이 경우 탐지 집중도 등을 객관적으로 비교하기 어렵기 때문에 영상 촬영 중에는 승객과의 대화 또는 접촉을 하지 않았다.

각 탐지견은 탐지 현장이 보이지 않는 곳에 각자의 캔널에 들어가 대기하였기 때문에 탐지 활동을 미리 보거나 적발 대상 물품의 위치를 확인하는 것은 불가능하였다.

분석 항목은 다음과 같다.

- (가) Detection time: time to detect the whole section
- (나) Latency time: Time between beginning of sniffing (exploring) and beginning of the response
- (다) Response time: Time from the beginning of response to the finishing of response for each exploring
- (라) Frequency to be distracted when detecting : Number of times to see other sides except objects during detection
- (마) Intervention to pinpoint: Frequency of handler's intervention to make the dog pinpoint

나. 연구수행 결과

(1) 적발 대상 물품(target)과 허용 물품(non-target)의 배치 및 탐지 양상 분석

(가) 1차년도 생산 복제검역건의 탐지 시 양상분석

탐지 활동 시 검역건의 행동을 세부적으로 분석하기 위해 1차년도 연구에서 생산한 복제검역건과 대조군의 탐지시 양상을 분석하였다. 영상 촬영 및 분석 대상 개체는 복제건 켄, 페브, 마치와 대조군 화이트, 브라운, 블랙, 돌이를 포함한 7두였다. 일정한 탐지 구간을 살펴보는데 걸린 총 시간을 아래그림에 나타내었다.

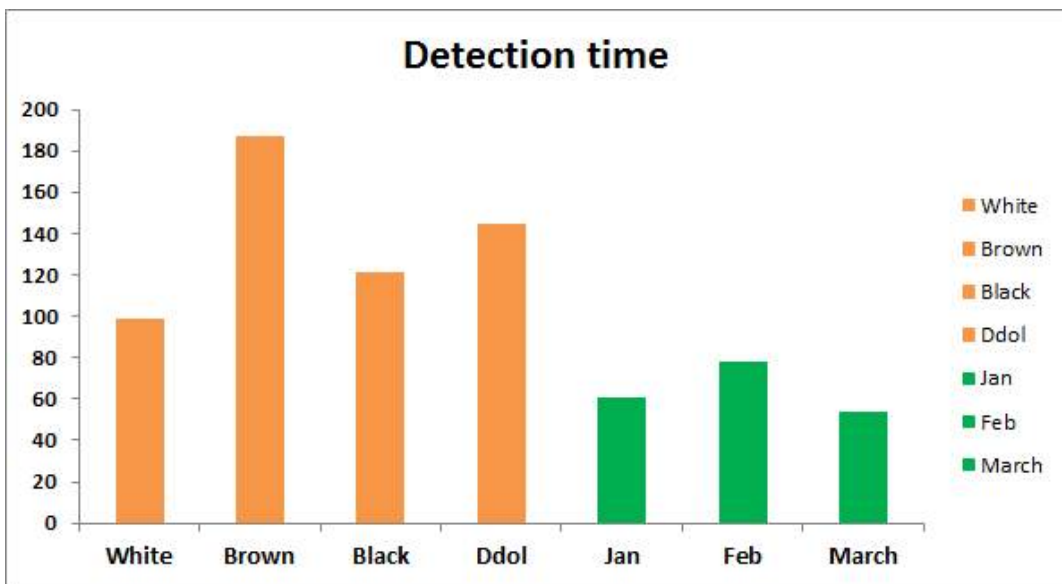


그림 97 총 탐지 시간. 단위 (초). ■ 대조군 ■ 복제건

분석 결과, 대조군 보다 복제건은 정해진 구간을 탐지하는 데 걸리는 시간이 적은 것으로 나타났다. 많은 인원이 이동하고 빠른 시간 내에 탐지를 해야 하는 업무 특성 상, 탐지 시간이 적을 경우 활동에 더 유리할 것으로 기대된다. **대체로 복제건은 대조군 보다 일정 구간 탐지를 진행하는 데 걸리는 시간이 짧았다.**

(나) 대조군과 복제건의 Latency time과 Response time 분석

촬영한 영상을 통하여 대조군과 복제건의 Latency time과 Response time를 분석하였다. 각 탐지 순간에서의 Latency 와 Response를 분석한 후, 탐지 횟수별 평균을 산출하였다.

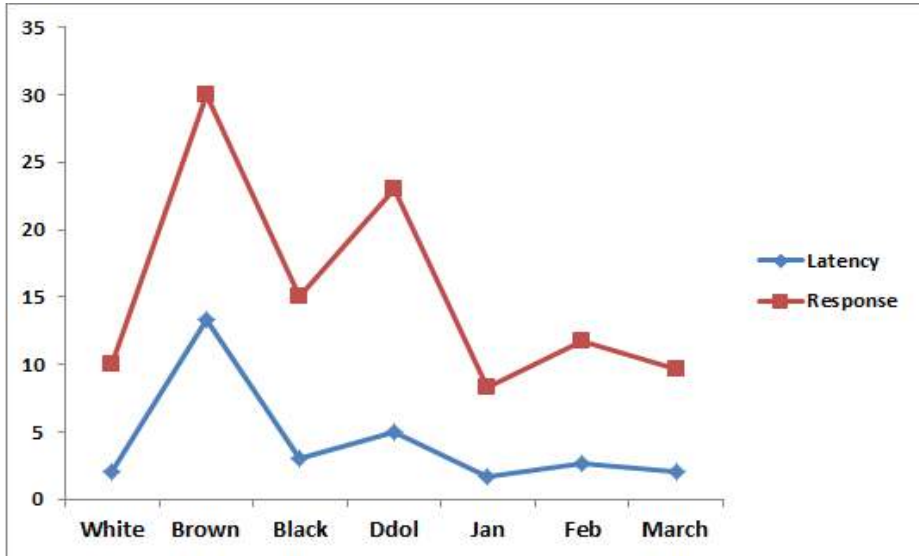


그림 98 Average of latency and response time 단위 (초).

위 그림에서와 같이 White, Black, Jan, Feb, March 는 Brown, Ddol 보다 짧은 Latency와 Response를 보였다. 이는 물품에 접근하여 target 여부를 파악하는 데 보다 빠른 시간 내에 판단할 수 있는 것으로 보이며, 이는 판단력 또는 집중력과 연관이 있을 것으로 추정된다. 그러나 Response 지속 시간의 경우에는 짧을 경우 빠르게 확인 후 다음 물품으로 넘어간다는 장점이 있지만, 핸들러에게 알려주기 위해 보다 인내심을 가지고 신호를 주는 것이 좋을 수도 있다. 따라서 시간의 적정성을 결론짓기는 어렵다. Brown, Ddol 은 다른 5두 보다 target 여부 판단에 시간이 더 걸리며 target 신호를 더 오래 주는 것으로 나타났다.

다) 대조군과 복제건의 intervention 과 distracted frequency 분석

주변 환경으로부터 방해 받지 않고 탐지 활동에 얼마나 집중을 하는지 분석하기 위해 intervention 과 distracted frequency를 분석하였다. Intervention 의 경우에는 탐지건의 시선을 끌기 위한 핸들러의 tap의 횟수로 산정하였다.



그림 99 Intervention of handler



그림 100 Distractedness

이 경우 탐지견이 다른 곳에 관심을 가져 물품으로 관심을 끌기 위한 탭을 분석하였고, 관심 유도가 아닌 행동(신호)의 shaping을 위한 탭은 배제하였다. 분석 결과 Brown은 다른 개체들 보다 탐지 물품 외에 시선을 두는 경우가 많았으며, 탭의 경우에는 전체적으로 많지 않았으나 이 역시도 Brown 이 가장 많이 받은 양상을 보였다. 이 결과로 볼 때 Brown 은 탐지견의 적성에 부합하지 않는 것으로 생각되었다 (이 견은 최종 평가에서 불합격). 이 결과는 아래 그림에 나타내었다.

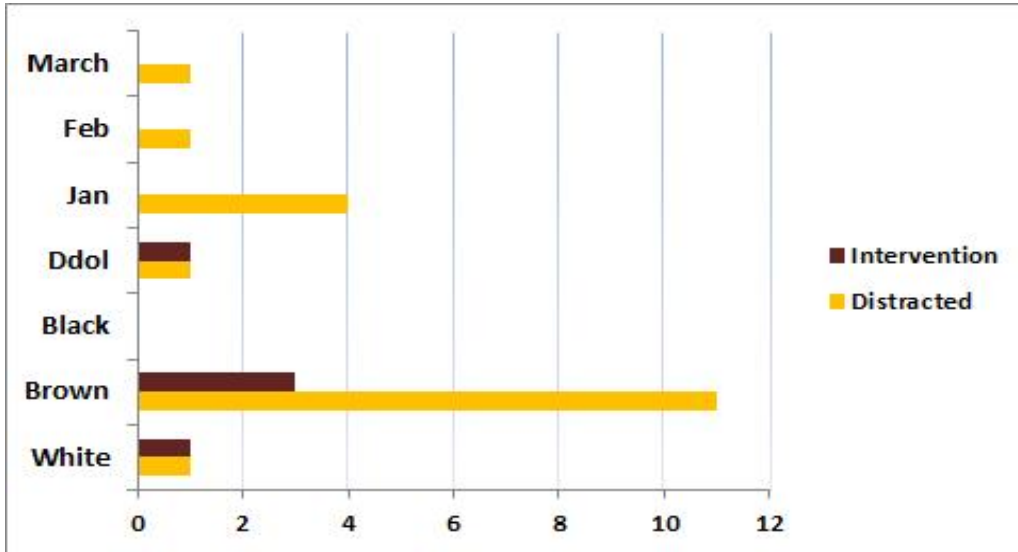


그림 101 Frequency of Intervention, distractedness.

복제견과 대조군은 탐지에 걸리는 시간, Latency와 Response 등에서 차이를 보이는 것으로 생각된다. 대조군의 개체별 차이가 복제견의 개체별 차이 보다 큰 것으로 추정된다. 따라서 동일한 유전형질을 지닌 복제견이 그렇지 않은 대조군에 비해 유사한 탐지패턴을 보여줄을 알 수 있었다.

2. 확립된 행동학적 분석 지표를 이용한 2차년도 생산 복제견의 행동 평가 통계학적 결과 분석

가. 연구수행 방법

(1) 2차년도 복제견의 행동 평가 실시

(가) 2차년도 생산 복제견의 유견행동 평가 및 통계학적 분석

낯선 사람에 대한 강아지의 태도 및 반응을 blind test를 통해 평가함으로써 탐지견으로서의 필요 자질 소유 여부를 측정하기 위해 7주령의 카이저 복제견 7두를 대상으로 하여 농림축산검역본부 검역탐지견센터 평가장에서 훈련교관의 3명이 참석한 가운데 유견평가 항목을 총 9개 항목에 대하여 평가를 실시하였다. 이 평가 결과에서는 2형, 3형 검역탐지견을 포함한 특수 목적견으로서 적합한 것으로 판정하였으며 9개의 항목은 유형에 따라 각 3개의 drive로 구분하여 평가할 수 있었다.

- ① Pack drive: 사회적 친화도, 따르기, 사회적 우위성
- ② Defense drive: 구속, 거상 우위성, 안정성
- ③ Prey drive: 회수능력, 촉각 민감성, 청각 민감성, 시각 민감성

(나) 2차년도 생산 복제건의 자건행동 평가 및 통계학적 분석

탐지견으로서의 적합성을 판단하기 위한 테스트로 먹이자극, 환경적응력, 사회성, 보행상태, 장애물에 대한 반응을 종합적으로 평가 실시하기 위해, 13주령의 카이저 복제견 7두를 대상으로 하여 공항 입국장, 화물청사 등 탐지견 업무 수행하면서 훈련 교관 외 2명이 참석, 총 5개 항목 60여개 항목에 대한 반응을 평가하여 1-5점까지로 점수를 기록하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 복제견 행동평가의 통계학적 결과분석

(가) 2차년도 생산 복제건의 유견행동 평가 및 통계학적 분석

복제견 7두 수성, 금성, 지구, 화성, 목성, 토성, 천왕성 등의 복제견에서 유견 평가 항목으로 사회적 친화도, 따르기, 구속, 사회적 우위성, 거상 우위성, 회수능력, 촉각 민감성, 청각 민감성, 시각 민감성, 안정성 등 10개 항목을 토대로 하여 실시한 결과는 복제 검역 탐지견에서 아래의 그림과 같이 각 항목에 따라 약간의 변이를 지니며 나타났다.

각 항목에 대해 6명의 평가자가 실시한 결과를 종합적으로 검토하였고 각 항목에 따른 행동 결과는 아래와 같이 종합 할 수 있다. 사회적 친화도는 총점의 평균 결과 2 또는 3으로 복제견 7두 모두 나타났으며 따르기 항목의 경우, 1에서 3으로 다양하게 나타났다. 사회적 우위성은 2에서 4 이내의 행동 양상을 나타냈다.

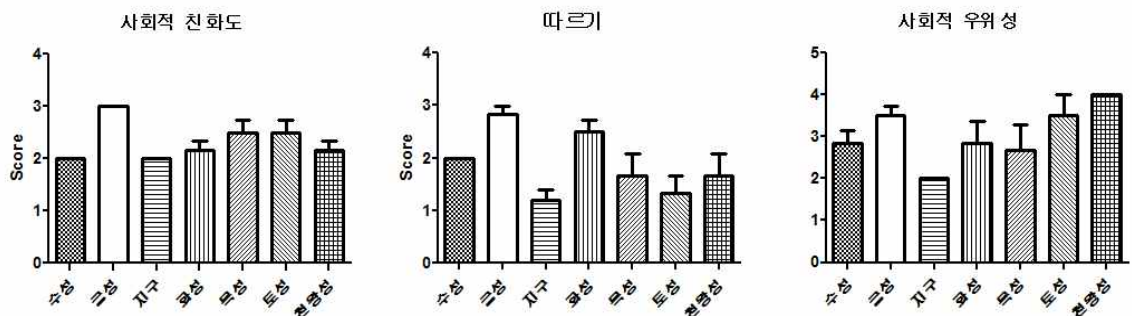


그림 102 복제견 7두의 유견시 사회적 친화도, 따르기, 사회적 우위성의 비교 분석

다음은 구속, 거상우위성, 안정성을 검토한 결과이다. 구속 항목의 경우 평균점수가 1에서 3 사이에 지구와 토성을 제외하고 약간의 변이를 지니며 나타났으며 거상우위성은 3에서 4 사이에 비교적 일정한 수준으로 나타났다. 안정성은 비교적 1에 가까운

점수를 띄웠으나 금성의 경우만 2점으로 나타났다.

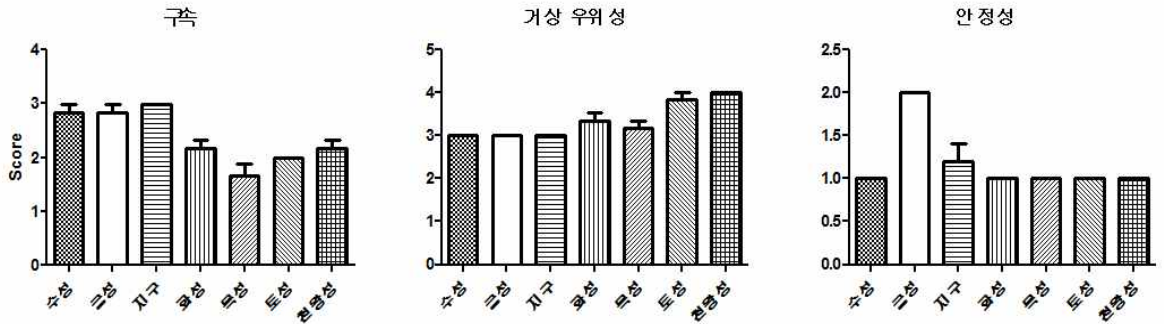


그림 103 복제견 7두의 유견시 구속, 거상우위성, 안정성의 비교 분석

다음은 회수능력, 촉각, 청각 및 시각 민감성에 대한 행동 양상을 분석한 결과 1점에서 5점 등으로 다양한 변이를 나타냈다. 이러한 변이는 다른 항목에 비해 다소 큰 변이에 해당되며 약간의 개체별 차이를 나타냈으나 항목을 전체적으로 취합하여 평가하였을 때에는 복제견 7두의 성향은 매우 비슷하였으며, 촉각과 청각의 경우 탐지견 훈련과 큰 연관성을 보이지 않는 것으로 나타났다.

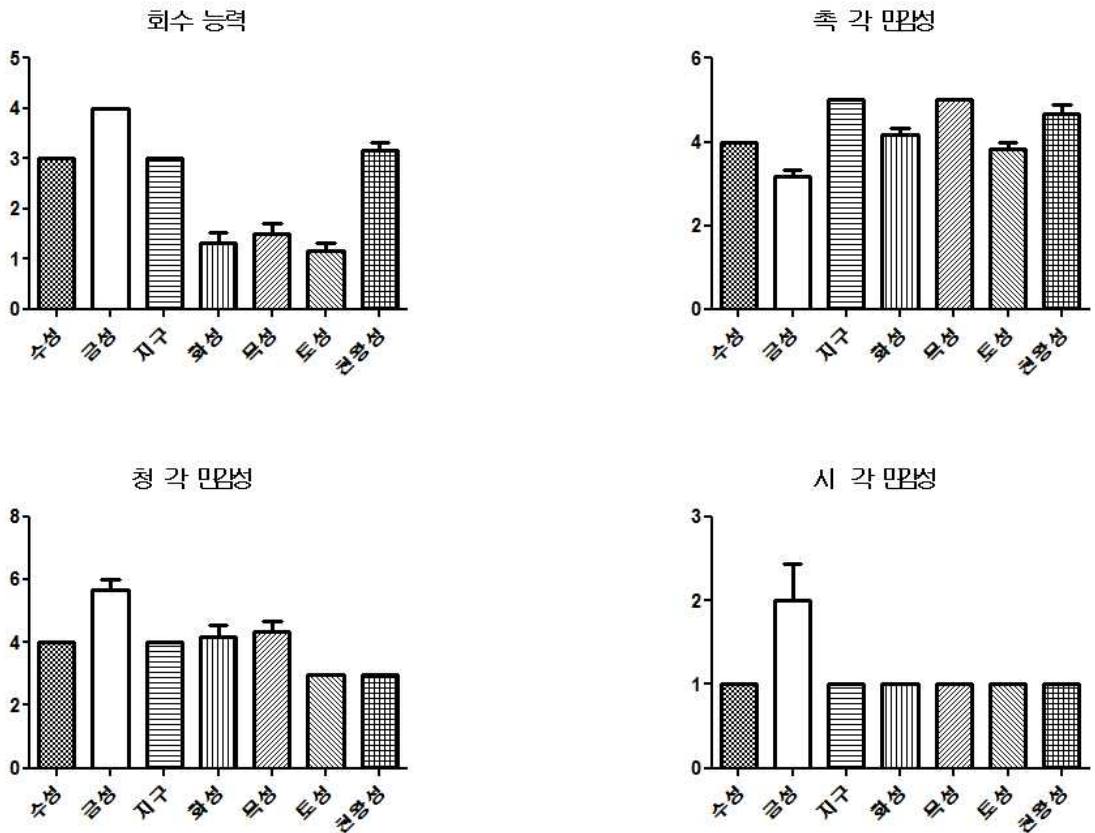


그림 104 복제견 7두의 유견시 회수능력, 촉각, 청각 및 시각 민감성 비교 분석

다음은 이러한 항목 중 서로 관련성이 높은 항목을 각 세 개 항목으로 분류하였다. 사회적 친화도, 따르기 및 사회적 우위성은 Pack Drive로, 구속, 거상우위성, 안정성은 Defense Drive로, 회수능력, 촉각민감성, 청각 민감성 및 시각 민감성은 Prey Drive로 구분하여 각 개체의 유형을 모두 분석하였다.

유견 평가시 종합적으로 평가한 결과 복제 검역탐지견 7두 모두 특수 목적견으로서 적합한 2형과 3형으로 확인되었다. 2형과 3형의 경우 특수 목적견으로서 적합한 것으로 알려져 있는데 모든 개체가 동일한 유형은 아니었으나 모두 2형, 3형으로 판정받아 유견 평가를 통한 검역탐지견으로서의 자질 평가시 적합 판정을 받았다.

표 54 카이저 복제견 7두의 유견 평가 결과

연번	견명	평가 결과			유형	유견 평가를 통한 최종평가
		Pack Drive	Defense Drive	Prey Drive		
1	수성	2	3	3	3	적합
2	금성	3	3	4	3	적합
3	지구	2	3	3	3	적합
4	화성	3	2	1	2	적합
5	목성	3	2	1	2	적합
6	토성	3	2	1	3	적합
7	천왕성	2	2	3	2	적합

* 최종 결정시 각 평가 결과 중 대다수를 차지하는 유형으로 결정하되, 경합을 이룰 때에는 세 가지 Drive 중 탐지견의 기질 중 가장 훈련과 연관성을 많이 가지는 사회적 친화도, 따르기, 회수항목 (Pack Drive)을 중점으로 평가하였음.

(나) 2차년도 생산 복제견의 자견행동 평가 및 통계학적 분석

일반적으로 검역탐지견센터에서 훈련 전 탐지견 적합성을 판단하기 위한 테스트 방법으로, 우수견의 복제견에 대한 전훈련 평가 자료로 사용하였다. 7주령 평가의 경우 개의 행동발달 단계 중 환경의 영향을 받지 않는 7-8주령 이전에 실시함으로써 선천적으로 타고나는 성향에 대한 평가를 실시하였다면 (모건의 영향 제외), 13주령 평가는 복제견이 사회화가 폭발적으로 진행되고, 환경에 적응하는 단계인 13주령에 실시함으로써, 7주령에서 평가할 수 없었던 먹이 자극, 환경 적응력, 사회성, 보행상태, 장애물 (향후 훈련상황에서 접하게 될 사물 등) 항목 평가함으로써 보다 신뢰도 높은 평가 진행 가능하다. 기존 평가 기준과 맞추어 3점 이상을 합격선으로 설정, 평가하였으며, **복제견 13주령 자견에서의 자질 평가 결과를 최종적으로 검토한 결과 복제견의 자견**

평가 결과는 각 먹이자극, 환경적응, 사회성, 보행상태, 장애물 등의 각 항목에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

표 55 13주령 탐지견 선발 평가

연번	견명	평가 결과 (평균±표준편차)						최종 평가
		먹이자극	환경적응	사회성	보행상태	장애물	최종 점수	
1	수성	4.00±0.00	3.83±0.39	3.83±0.39	3.75±0.50	4.00±0.00	3.92±0.12	적합
2	금성	3.92±0.29	3.79±0.41	3.83±0.39	3.75±0.50	4.00±0.00	3.86±0.10	적합
3	지구	4.00±0.00	3.83±0.39	3.92±0.29	4.00±0.00	4.00±0.00	3.95±0.17	적합
4	화성	4.00±0.00	3.96±0.20	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	3.99±0.12	적합
5	목성	3.92±0.29	3.42±0.50	3.50±0.52	3.50±0.58	3.50±0.55	3.56±0.29	적합
6	토성	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	4.00±0.00	적합
7	천왕성	3.50±0.52	3.42±0.50	3.50±0.52	3.25±0.96	3.50±0.55	3.43±0.31	적합

모든 항목을 수렴하였을 때 복제견 7두의 평가 결과 수성 3.92, 금성 3.86, 지구 3.95, 화성 3.99, 목성 3.56, 토성 4.00, 천왕성 3.43으로 최종 점수에 있어서도 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. **따라서 카이저 복제견 7두 모두 검역탐지견으로서 훈련에 적합하다는 최종 평가를 획득하였다.**

3. 2차년도 생산 복제견의 훈련성적 분석 및 영상기록 자료 분석

가. 연구수행 방법

(1) 2차년도 복제견의 훈련성적 및 영상분석

(가) 2차년도 생산 복제견에 대한 설문조사 및 훈련성적 비교

복제견의 기본 일반 정보 및 기질 수준을 영상 자료를 활용하여 기록하고, 복제견 간 행동 및 영향을 미치는 환경 분석 보조 자료로 활용의 목적으로 훈련교관, 담당 핸들러를 대상으로 설문조사를 수행하였다. 탐지견 훈련 필수 행동 특성인 집중력, 소유욕, 대담성, 활동성, 독립심, 호기심, 개체별 안정성, 흥분성, 민감도, 반응성, 공격성에 대한 주요 자료 분석을 위해 총 75문항 (기본 일반 정보 22문항, 주요 행동 특성 37문항, 기질 수준 16문항)에 대해서 설문조사를 수행하였다. 또한 훈련성적의 비교를 위해 은닉된 검역물에 대한 반응, 탐지 과정, 반응 표현, 대담성, 집중력에 대한 평가를 100점 만점에 60점 이상시 합격하는 것으로 하여 훈련교관이 평가하였다.

(나) 2차년도 생산 복제건의 영상분석

실제 탐지 현장에서 Target(목표물)을 탐지하는 Sequence에 대한 영상을 탐지에 대한 집중력 및 정확도의 평가를 목표로 하여 영상분석을 통해 탐지 시간, Distraction(산만도), Tap 회수, Target(목적물) 적발 개수 등을 측정하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 2차년도 복제건의 훈련성적 및 영상분석

(가) 2차년도 생산 복제건에 대한 설문조사 및 훈련성적 비교

복제 검역 탐지건 7두의 6개월령 이후 기초 훈련을 진행한 탐지건 훈련교관 2-3명의 의견의 설문 조사를 통해 기술한 일반 행동 양상을 평가하였으며 일반적인 행동 평가를 위해 영상 기록 또한 참조하였다. 기본 일반 정보에서는 사육 환경 정보 수집함으로써 행동의 변화에 영향을 미치는 요소를 분석하고 검역 탐지건 훈련 필수 행동 특성인 안정성, 흥분성, 민감성, 반응성, 공격성 대한 교관의 의견을 수집하고 영상 기록 평가를 종합적으로 검토하였다.

표 56 설문 조사 결과

설문 항목	설문 항목 개수	동일	상이
기본 일반정보	20	20	0
주요 행동 특성	36	25	11
기질 수준	16	1	4

기본 일반 정보 설문 결과 복제건 7두 모두 동일한 환경, 조건에서 생활하고 있으며, 그에 따른 행동 변화의 정도 또한 비슷하였다. 또한 36항목에 대해 조사한 주요 행동 특성의 경우 25항목에서 동일한 행동 양식을 보여 주었으며, 상이한 결과를 나타낸 11항목의 경우 낯선 동물을 보았을 때의 반응과 같이 약간의 개체간 경험 차가 반영된 경우가 많았다. 설문 조사에서 나타난 주요 기질 안정성, 흥분도, 민감도, 반응성, 공격성의 정도는 공격성의 경우 7두 모두 전혀 공격성을 보인적이 없다고 응답하였고, 안정성은 높다에서 매우 높다, 민감성과 흥분성은 낮음에서 보통, 반응성은 높다에서 매우 높기로 7두 모두 약간의 차이는 있으나 비슷한 경향을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

2014년 9월 검역 탐지건 훈련 과정 최종 평가는 실제 탐지가 이루어지는 인천공항

입국장에서 이루어졌으며, 탐지견(60점)과 핸들링을 하는 탐지요원에 대한 평가(40점) 두가지로 이루어진다. 탐지견에 대한 평가는 탐지의욕(30점)과 목적물에 대한 반응(30점)이며, 목적물에 대한 반응은 각각 민감성(10점), 관심성(10점), 적극성(10점)으로 이루어져 있다. 탐지의욕은 매우 우수(30점), 우수(25점), 보통(20점), 부족(10점), 불량(5점)이며, 목적물에 대한 반응은 각 항목 배점은 매우 우수(10점), 우수(8점), 보통(5점), 부족(3점), 불량(1점) 이다. 탐지요원은 핸들링 기술, 순서, 명령어 사용, 승객과의 반응, 정밀 탐지, 오반응에 대한 감별, 흥미유도 정도, 탐지견 반응에 대한 대처 능력, 반응을 읽는 능력에 대하여 평가를 받게 되며 각 항목당 4점이고 총점은 40점이다.

표 57 탐지견 최종 평가 결과

구분	탐지요원	탐지의욕	목적물에대한 반응			총점	결과
			민감성	관심성	적극성		
수성	40	우수(25)	보통(5)	우수(8)	보통(5)	83	합격
금성	40	우수(25)	보통(5)	보통(5)	보통(5)	80	합격
지구	40	우수(30)	우수(8)	우수(8)	우수(8)	94	합격
화성	40	보통(20)	보통(5)	보통(5)	보통(5)	75	합격
목성	40	보통(20)	보통(5)	보통(5)	보통(5)	75	합격
토성	40	부족(10)	보통(5)	보통(5)	보통(5)	65	합격
천왕성	40	보통(20)	보통(5)	보통(5)	보통(5)	75	합격

최종 평가 결과 복제견 7두 모두 합격하였으며, 그 중 수성, 금성, 지구의 경우 80점 이상으로 매우 우수한 결과를 보여 주었다.

(나) 2차년도 생산 복제견의 영상분석

복제견 영상 분석에 사용된 상황은 실제 인천국제공항 입국장 컨베이어 벨트에서 실시한 것이며, 각 견에게 실제와 동일한 조건에서 탐지를 하도록 하였다. 탐지 시간은 실제와 같이 담당 핸들러의 판단 하에 목표물을 최대한 찾을 때까지로 하였다. 복제견 7두의 탐지 성향에 대한 분석을 위하여 일정 Target(목표물) 4개를 실제 탐지 현장 (인천공항 입국장)에 미리 은닉 후, 평균 가방 1개당 탐지 시간 및 목표물 적발 개수를 측정하였다. 복제견 7두의 평균 탐지 시간은 최장 4.5초에서 최소 2.34초였으며, 이는 앞에서 제시된 대조군의 목표물 탐지에 소요된 최장 시간에 비해 적게 소요된 것으로 확인되었다. 또한 기 복제견인 대니의 복제견 3두와 유사한 결과이다.

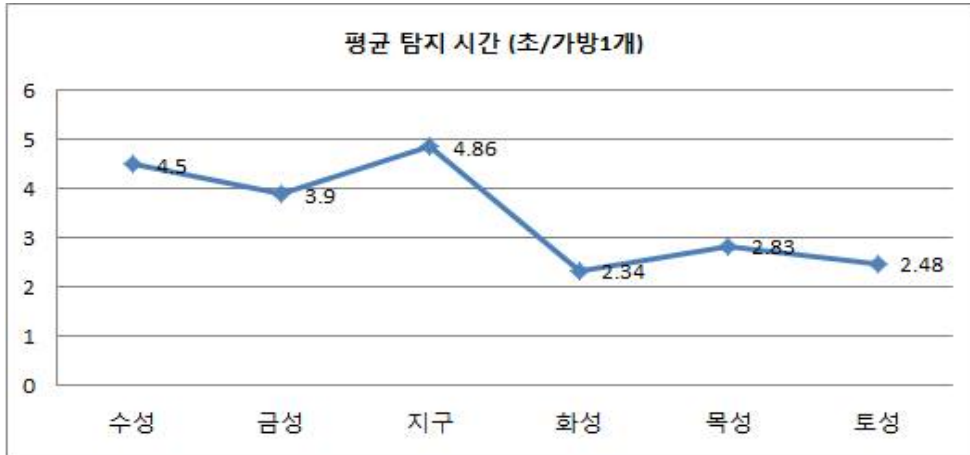


그림 105 복제견 7두의 가방 탐지에 소요된 시간 비교 분석

다음 사항으로 복제견 7두의 탐지시 소음 또는 주변의 기타 사물에 대해 시선 및 집중도가 떨어지는 횟수를 측정하고 산만해지는 시간이나 횟수가 잦을 경우 담당 핸들러가 집중 시키는 손 반응의 횟수를 비교 측정하였다.

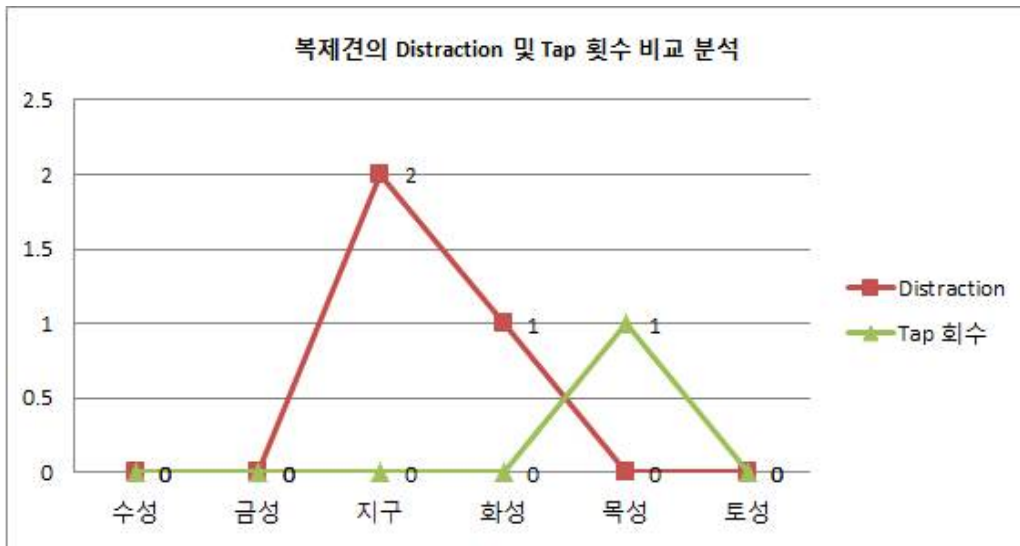


그림 106 복제견 7두의 주의집중력 비교 분석

영상 분석을 통한 복제견 7두의 주의집중력을 비교 분석하기 위한 지표로서 탐지에 집중하지 못하는 모든 행동 및 산만해진 탐지건을 집중시키기 위한 행위를 수행한 결과를 비교 분석한 결과 목성 이외에 복제견에서 Tap을 지시한 것은 관찰되지 않았다. 또한 산만해진 행동이 나타나는 것 또한 복제견 7두에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 그리고 복제견에서 탐지하는데 소요되는 시간이 변이를 갖는 것은, 탐지 중 Distraction 횟수 Tap의 횟수와 비교해 볼 때 개별 탐지 성향에 따른 것이지 집중력 저하로 인한 탐지 시간 연장은 아닌 것으로 판단된다. 목성을 제외한 6두 모두 또한 7두 중 4두가 목표물 100% 적발하였으며, 7두 모두 Nontarget (잘못된 목표물)은 모

두 구분하였으며(반응을 보이지 않음) 탐지 시 정확도가 매우 우수하였다.

현재 실시한 영상 분석은 현장 실무를 거치지 않은 상태의 2차년도 복제견 7두에서 실시한 것으로, 향후 탐지견 훈련 종료 후 담당 핸들러와 실전 경험을 한다면 Target(목표물) 적발률은 더욱 향상 될 수 있을 것으로 사료된다.

표 58 복제견 7두의 영상분석 결과

견명	수성	금성	지구	화성	목성	토성	천왕성
탐지시간(초)	3.5	3.9	4.86	2.34	2.83	2.48	2.2
Distraction	0	0	2	1	0	0	2
Tap 회수	0	0	0	0	1	0	0
Target 적발	3	4	4	3	4	4	2
오반응 회수	0	0	0	0	0	0	0

* Distraction : 탐지 sequence에 집중하지 못하는 모든 행동
(다른 곳 주시, 관심표명, 탐지장소 이탈, 배설 행위 등)

** Tap : 산만해진 탐지견을 집중시키기 위한 행위로써 손으로 지시하는 것

*** 오반응 : 잘못된 물건(Non-Target)에 반응을 보이는 것

<Target 탐지>

<정반응>

<Nontarget 변별>



그림 107 탐지 Sequence

최종 선발 결과에서 2차년도 생산된 복제견 7두 모두 1차년도 생산되어진 복제견과 동일하게 100% 검역견으로 선발이 되었다. 또한 복제견들간에 유견시에는 행동패턴의 차이를 보이기는 하였으나 자견시에는 행동 패턴에 있어서 유의적인 통계적 차이는 보이지 않았으며, 모두 평가 항목에서 유사한 결과를 보여주었다. 따라서 우수한 능력의 세포공여견의 체세포이식을 이용하여 태어난 복제견들은 그들간의 행동패턴이 유사하며, 탐지를 위한 능력을 지니게 됨을 다시 한번 명백히 입증하게 되었다.

제 11 절 복제 검역탐지건의 노화 관련 정상성 분석

1. ELISA기법을 이용한 복제 검역탐지건의 텔로머레이즈 활성 분석

가. 연구수행 방법

(1) 일반 비글건의 나이에 따른 텔로머레이즈 활성 분석

복제검역탐지건의 노화 정상성 분석을 위해 일반 비글건의 텔로머레이즈 활성을 분석하였다. 일반 비글건을 10개월령, 20개월령, 5세령, 7세령, 8세령 등 각 연령에 대해 최소 2두 이상을 대상으로 하여 혈액 세포의 텔로머레이즈 활성을 분석한다. 전혈 세포의 확보를 위하여 비글건의 목 주변의 털을 제거한 후 전혈을 3cc 채취하여 4℃ 냉장 상태로 이송하여 텔로머레이즈 활성을 측정하기 위해 -80℃에서 보관한다. 텔로머레이즈 측정은 Telimeric repeat amplification protocol (TRAP) assay를 이용하였다. 동결된 혈액을 녹인 후 200ul의 RNAase이 첨가된 CHAPS 완충용해액을 1.5ml 튜브에 넣은 후 30분간 얼음에서 반응시키고 4℃, 15,000rpm에서 25분간 원심 분리하여 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 단백질을 정량분석 하였다. 단백질 농도가 0.5ug/ul가 되도록 CHAPS 완충용해액에 희석하고 단백질 추출액 2ul에 10ul의 5x TRAP반응 혼합물과 0.4ul의 Taq polymerase, 37.6ul의 증류수를 넣어 TRAP 분석을 위한 반응 혼합액을 준비하고 연쇄중합 반응을 통하여 TRAP반응을 실시하였다. 연쇄중합반응 산물은 ELISA기법을 통해 분석하였다.

(2) 세포 공여건과 복제건의 텔로머레이즈 활성 분석

복제검역탐지건의 노화 정상성 분석을 위해 세포공여건과 복제건의 전혈을 이용하여 이들 각각의 텔로머레이즈 활성을 분석하였다. 세포 공여건과 복제건의 혈액 세포의 전혈 세포의 확보를 위하여 비글건의 목 주변의 털을 제거한 후 전혈을 3cc 채취하여 4℃ 냉장 상태로 이송하여 텔로머레이즈 활성을 측정하기 위해 -80℃에서 보관한다. 텔로머레이즈 측정은 Telimeric repeat amplification protocol (TRAP) assay를 이용하였다. 동결된 혈액을 녹인 후 200ul의 RNAase이 첨가된 CHAPS 완충용해액을 1.5ml 튜브에 넣은 후 30분간 얼음에서 반응시키고 4℃, 15,000rpm에서 25분간 원심 분리하여 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 단백질을 정량분석 하였다. 단백질 농도가 0.5ug/ul가 되도록 CHAPS 완충용해액에 희석하고 단백질 추출액 2ul에 10ul의 5x TRAP반응 혼합물과 0.4ul의 Taq polymerase, 37.6ul의 증류수를 넣어 TRAP 분석을 위한 반응 혼합액을 준비하고 연쇄중합 반응을 통하여 TRAP반응을 실시하였다. 연쇄중합반응 산물은 ELISA기법을 통해 분석하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 일반 비글견의 나이에 따른 텔로머레이즈 활성 분석

일반 비글에서의 텔로머레이즈 활성과 비교 분석하기 위해 10개월령, 20개월령, 5년령, 7년령, 8년령 개체의 일반 비글견에서의 텔로머레이즈 활성을 최소 3회 이상 반복하여 텔로머레이즈 활성을 비교 분석하였다. 일반 비글견에서의 연령에 따른 텔로머레이즈의 활성 결과는 아래 그림과 같다.

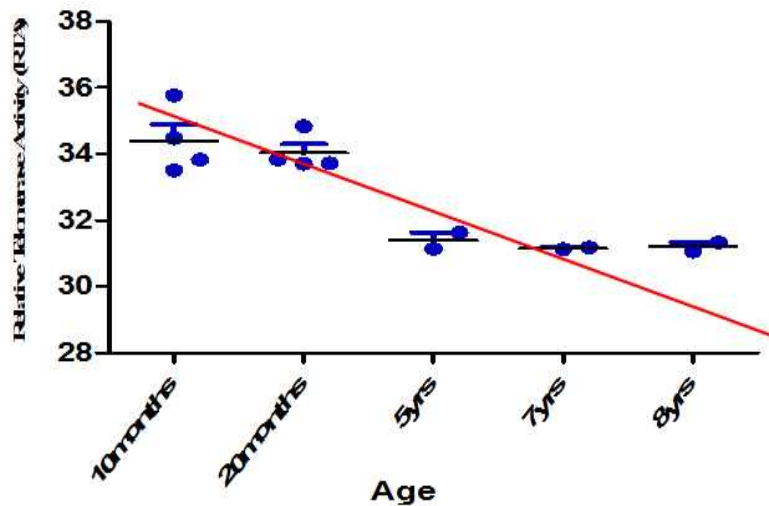


그림 108 일반 비글견에서의 연령에 따른 텔로머레이즈의 활성 결과

다양한 연령의 비글에서 텔로머레이즈 활성을 측정된 결과 가장 어린 10개월령에서 가장 높은 활성을 띄었고 5년령이 되었을 때 10개월, 20개월령에 비해 일반 비글 개체의 텔로머레이즈 활성이 유의하게 감소함을 확인하였다. 따라서 **상대적으로 연령이 증가함에 따라 텔로머레이즈 활성이 감소함을 확인**하였다.

(2) 세포 공여견과 복제견의 텔로머레이즈 활성 분석

1차년도 체세포 핵이식을 위한 체세포 제공견인 대니와 대니의 복제 검역 탐지견 Jan, Feb, March의 18~20개월령 시 텔로머레이즈 활성은 7세령인 체세포 제공견 대니의 텔로머레이즈의 활성에 비해 높게 나타났다. 복제 검역 탐지견 Jan, Feb, March의 상대적인 텔로머레이즈 활성은 일반 비글견과 비교하였을 때 각각 33.5, 33.7, 33.7 (RTA)로 측정되어 비슷한 연령의 일반비글견의 평균값인 33.9 (RTA)와 유의차 없이 모두 유사한 텔로머레이즈 활성을 지님을 확인할 수 있었고, 노화와 관련된 하나의 인자인 텔로머레이즈 활성은 복제 검역 탐지견에서 정상임을 확인하였다. 그 결과는 아래 그림에서 보여주고 있다.

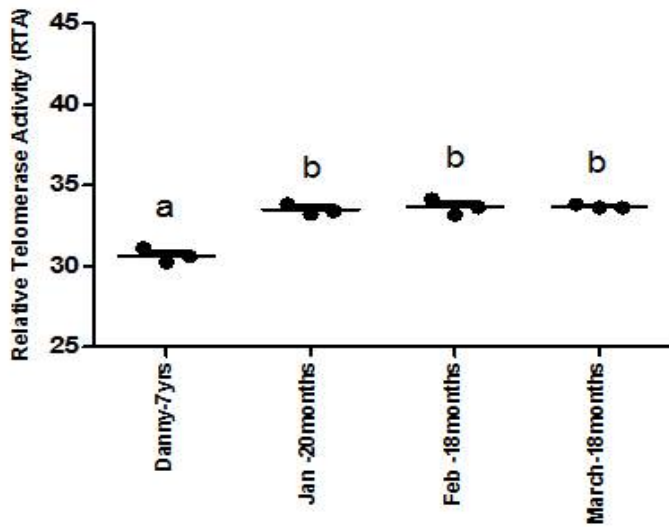


그림 109 대니와 복제 검역견 Jan, Feb, March의 텔로머레이즈 활성 분석 결과

2차년도 체세포 제공견인 카이저와 카이저의 복제 검역 탐지견 수성 (Mercury), 금성 (Venus), 지구 (Earth), 화성 (Mars), 목성 (Jupiter), 토성 (Saturn), 천왕성 (Uranus)의 텔로머레이즈 활성 분석 결과 3 개월령 시 복제 검역 탐지견들의 텔로머레이즈 활성은 9세령인 체세포 제공견, 카이저의 텔로머레이즈의 활성에 비해 높게 나타났다. 복제 검역 탐지견 Mercury, Venus, Earth, Mars, Jupiter, Saturn, Uranus 의 상대적인 텔로머레이즈 활성은 일반 비글견과 비교하였을 때 각각 37.49, 37.59, 37.06, 37.34, 37.70, 37.59, 37.42 (RTA)로 나타나 일반비글견의 가장 어린 개체인 10개월령의 평균값인 33.9 (RTA) 에 비해 유의하게 높은 활성을 나타냈다. 비교 분석 결과는 복제 검역견간의 동일한 연령에 있어서는 모두 유사한 텔로머레이즈 활성을 지님을 확인할 수 있었고, 따라서 텔로머레이즈 활성은 복제 검역 탐지견에서 정상임을 확인하였다. 그 결과는 아래 그림에서 보여주고 있다.

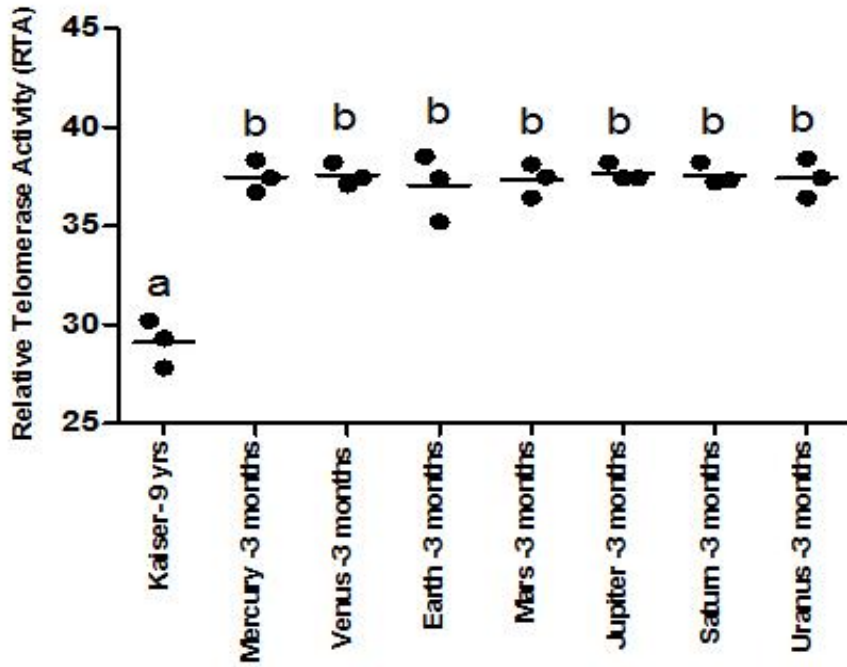


그림 110 카이저와 복제 검역탐지건 Mercury, Venus, Earth, Mars, Jupiter, Saturn, Uranus의 텔로머레이즈 활성 분석 결과

특히 연령에 따른 텔로머레이즈 활성 변화를 비교하기 위해 3개월령과 6개월령의 각 개체의 전혈 채혈을 통해 혈액 세포에서의 텔로머레이즈 활성을 비교하였다. 비교 분석한 결과 3개월령의 차이에서는 텔로머레이즈의 활성 변화가 관찰되지 않았다.

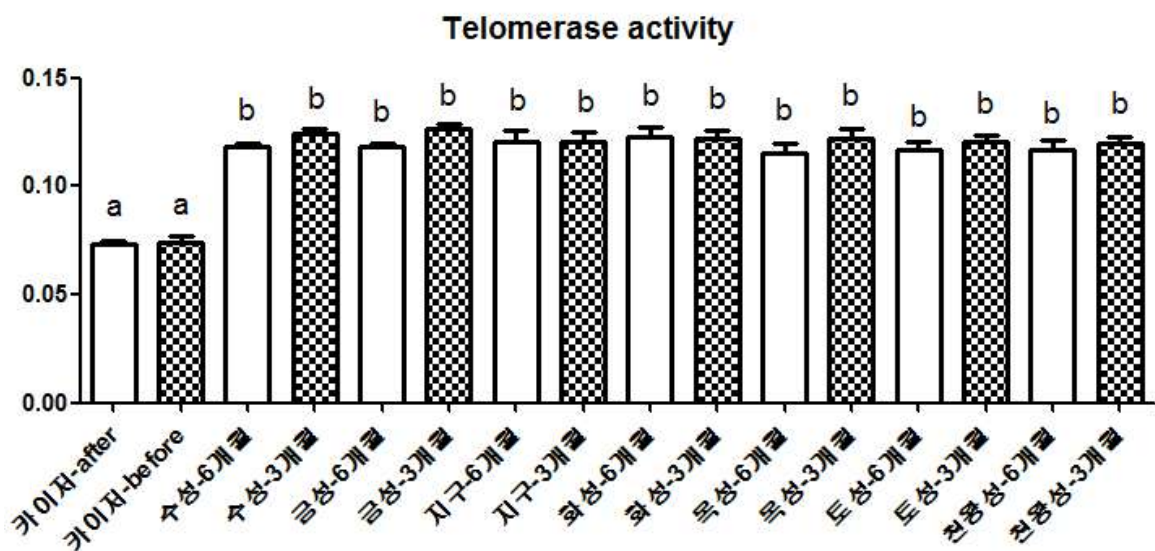


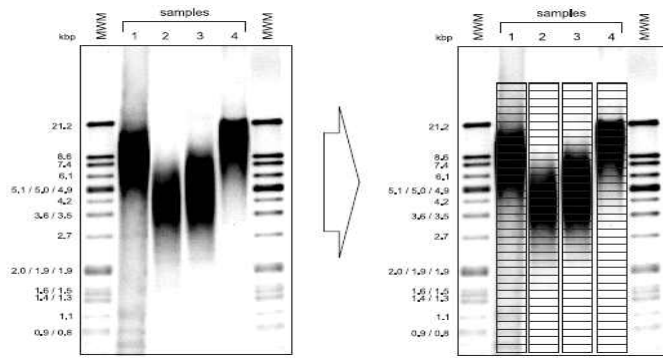
그림 111 카이저 및 카이저 복제건의 3개월 사이의 텔로머레이즈 활성 변화

2. Southern blot기법을 통한 복제 검역탐지건의 텔로미어 길이 정상성 분석

가. 연구수행 방법

(1) 일반 비글건의 나이에 따른 텔로미어 길이 분석 및 세포 공여견과 복제견의 텔로미어 길이 분석

복제검역탐지견의 노화 정상성 분석을 위해 일반 비글건의 텔로미어 길이를 분석하였다. 텔로미어 길이 분석을 위해 공여견 대니, 카이저 및 복제견 총 14두 에서 genomic DNA (gDNA)를 추출하였다. gDNA의 추출을 위해 Qiagen의 DNeasy Blood & Tissue 키트를 사용하였고, 혈액세포에 protease K를 처리하여 단백질을 용해시킨 후 순수한 gDNA 추출을 위해 RNase A를 처리하여 RNA를 제거한다. 다음 과정으로 세포용해 용액을 첨가한 다음 56°C에서 10분간 처리하여 세포를 용해시킨다. 에탄올을 처리하여 핵으로부터 용출된 gDNA를 응집시켰고, 컬럼을 이용하여 정제 및 추출을 진행한다. 추출된 gDNA의 농도 및 순도를 Nanodrop과 전기영동으로 확인하였다. 이렇게 추출된 1.5 μ g의 gDNA를 Roche의 TeloTAGGG Telomere Length Assay 키트를 이용하여 텔로미어 길이 분석을 진행하였다. 키트 내에 있는 Enzyme을 이용하여 gDNA를 fragmentation 시킨다. Fragmentation 된 DNA를 0.8% 아가로즈 젤에 75 V로 전기영동을 한다. 전기영동 된 젤을 각각의 용액을 이용하여 denaturation과 neutralization을 시킨 후, 나일론 멤브레인에 모세관 투과현상을 이용하여 transfer한다. Transfer가 끝난 후, UV를 이용하여 crosslinking을 시킨 다음, Telomere probe를 이용하여 hybridization을 진행한다. Hybridization 반응이 끝난 멤브레인에 Telomere probe와 결합할 Anti-DIG-AP를 붙인다. 반응이 끝난 멤브레인에 세척 과정을 거친 후, detection 용액을 처리한 다음 X-ray 필름에 노출 한 뒤, 필름을 현상하여 이미지 결과를 얻어낸다. 필름을 통해 얻어진 이미지를 스캐닝하였고, 아래의 그림과 같이 전체 밴드를 Image J 프로그램을 이용하여 최소 30개 이상의 구역으로 나눈 뒤, 각 구역의 OD값을 얻어낸다. 각 구역에서 얻어진 OD 값을 다음의 공식에 대입하여 텔로미어 길이를 분석하게 된다.



$$\overline{\text{TRF}} = \frac{\sum (\text{OD}_i)}{\sum (\text{OD}_i / L_i)}$$

그림 112 텔로미어 길이를 분석 공식

나. 연구수행 결과

(1) 일반 비글견의 나이에 따른 텔로미어 길이 분석

복제 검역탐지견의 텔로미어 길이 정상성 분석을 위해 우선 다양한 연령의 비글을 통해 텔로미어 길이를 분석하였다. 10개월령, 20개월령, 5세령, 7세령, 8세령 등의 비글을 각 연령별로 최소 2두 이상 각 3회 분석을 통해 연령에 따른 텔로미어 길이의 변화를 분석하였다. 분석한 결과 10개월령, 20개월령에 이어 5세령까지는 감소하는 듯하였으나 7세, 8세령의 개체에서는 텔로미어 길이가 다시 증가하는 추세로 보여서 예상과 다른 결과가 나타났다. 특히 각 연령을 기준으로 하여 통계학적 분석 결과시엔 연령에 따른 유의적인 차이가 보이지 않음으로서 비글에서는 연령에 따른 텔로미어 길이의 감소가 나타나지 않았다. 따라서 노화와 관련한 요인으로 **텔로미어 길이에서는 연령에 따른 뚜렷한 변화를 확인 할 수 없었다.** 그 결과는 아래 그림과 같다.

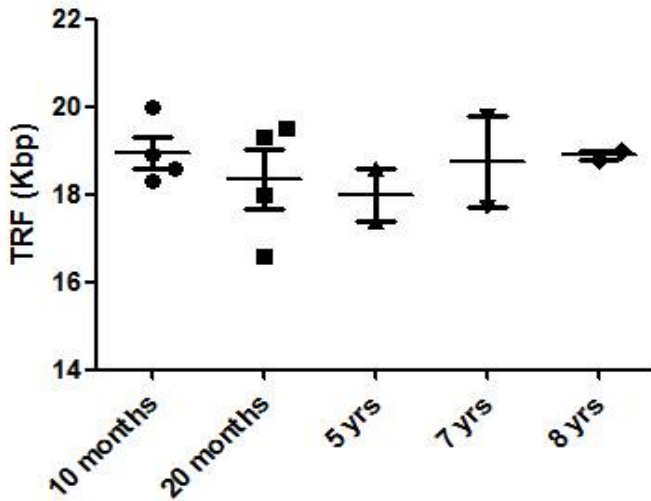


그림 113 일반 비글견의 텔로미어 길이 분석

(2) 세포 공여견과 복제견의 텔로미어 길이 분석

1차년도 체세포 핵이식을 위한 체세포 제공견인 대니와 대니의 복제 검역 탐지견 Jan, Feb, March의 18~20개월령 시 텔로미어 길이를 분석 하였다. 7세령인 체세포 제공견 대니의 텔로미어 길이의 평균 값은 18.1 (TRF)이었다. 복제 검역 탐지견 Jan, Feb, March의 텔로미어 길이는 각각 18.6, 18.1, 18.2 (TRF)로 측정되어 복제 검역 탐지견 사이에 모두 유사한 텔로머레이즈 활성을 지님을 확인할 수 있었고, 노화와 관련된 하나의 인자라고 알려져 있는 텔로미어 길이는 복제 검역 탐지견 비글에서는 연령에 따라 차이는 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 그 결과는 아래 그림에서 보여주고 있다.

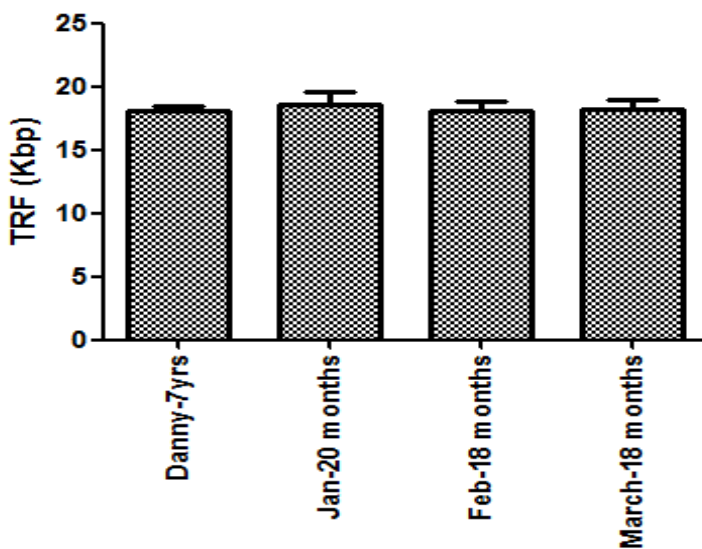


그림 114 체세포 제공견 대니와 대니 복제검역 탐지견 Jan, Feb, March의 텔로미어 길이 분석

2차년도 체세포 제공건인 카이저와 카이저의 복제 검역 탐지건 Mercury, Venus, Earth, Mars, Jupiter, Saturn, Uranus의 텔로미어 길이 분석 결과 3개월령 시 복제 검역 탐지건들의 텔로미어 길이는 9세령인 체세포 제공건, 카이저의 텔로미어 길이와 비교시 뚜렷한 변화가 없었다. 또한 복제 검역 탐지건 Mercury, Venus, Earth, Mars, Jupiter, Saturn, Uranus 의 텔로미어 길이는 각각 20.0, 21.6, 21.4, 19.2, 21.1, 20.7, 21.3 (TRF) 그리고 23.1 (TRF)로 나타나 동일령의 복제 검역 탐지건 그룹 내에서도 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 **동일한 연령에 있어서는 모두 유사한 텔로미어 길이를 지님을 확인**할 수 있었고, 일반 비글건의 실험 결과 중 가장 어린 연령에 해당하는 10개월령 개체의 텔로미어 길이와 비교를 하였을 때에도 유의적인 차이가 보이지 않고 그에 상응하는 텔로미어 길이를 지님을 확인하였다. 따라서 **복제 검역 탐지건에서 텔로미어 길이 또한 정상임을 확인**하였다. 그 결과는 아래 그림에서 보여주고 있다.

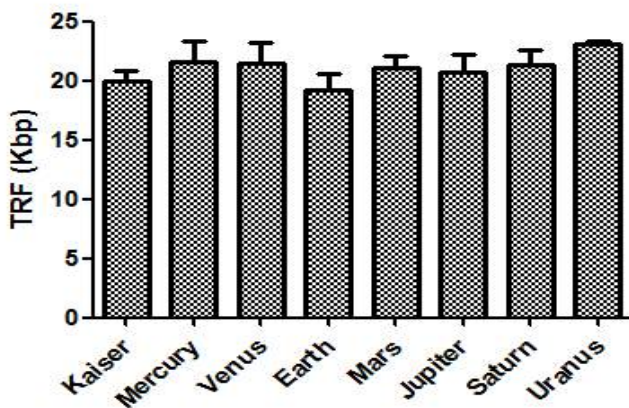


그림 115 카이저 및 카이저 복제 검역 탐지건 7두의 텔로미어 길이 비교 분석. 유의적인 차이가 발생하지 않음.

연령에 따른 텔로미어 길이의 변화를 분석하기 위해 카이저 복제건을 대상으로 3개월령 및 6개월령에 각각 전혈 채혈을 통해 혈액 세포의 텔로미어 길이를 비교 분석하였다. 분석한 결과 3개월 이내에 혈액 세포에서의 텔로미어 길이는 유의적인 차이가 없었다.

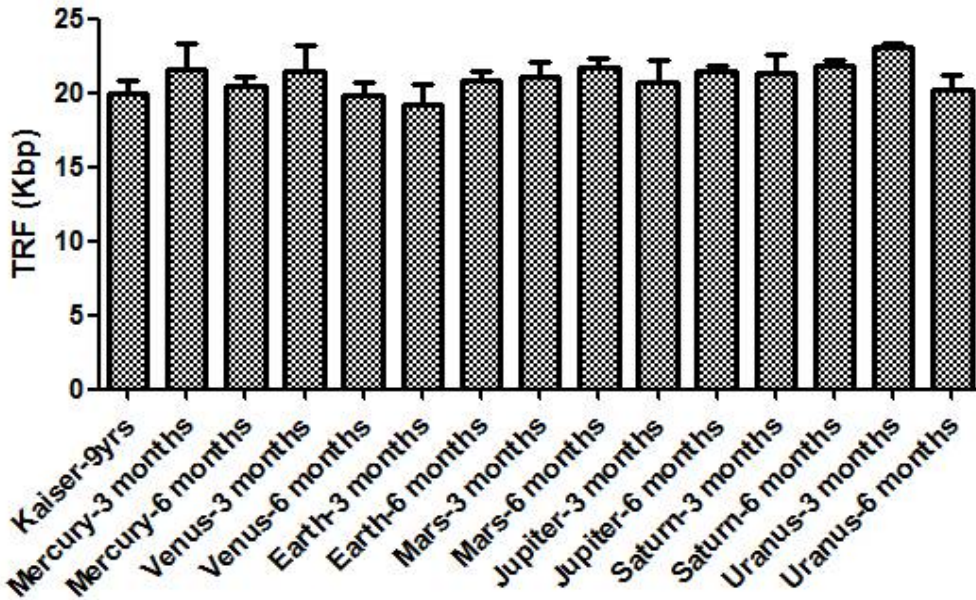


그림 116 카이저 및 카이저 복제 검역 탐지건 7두의 3개월 사이의 텔로미어 길이 변화 측정

이번 복제건들을 이용한 노화 관련 정상성 분석의 결과는 복제건의 텔로머레이즈는 동일연령의 일반비글과 유사하게 발현이 되었으며, **노화와 관련된 인자인 텔로미어 길이는 복제 검역 탐지건 비글에서는 연령에 따라 차이가 없는 것을 확인**하였다. 또한 복제건의 텔로미어 길이는 체세포 공여건과 유의한 차이가 나타나지 않아 정상적임을 보여주었다. 한편, 텔로머레이즈 활성은 연령이 증가함에 따라 점점 감소하는 결과가 나타났다. 특히 복제건의 텔로머레이즈 활성은 체세포 공여건에 비해 동일한 연령의 비글과 같이 유의적으로 높게 나타남에 따라 리프로그래밍 과정에서 복제건의 텔로머레이즈의 활성이 복구 됨을 확인 할 수 있었다. 따라서 **이번 연구의 결과는 복제건에서의 노화와 관련된 지표인 텔로미어 길이 및 텔로머레이즈의 활성의 정상성을 확인하였다. 또한 체세포 복제 과정에서의 텔로머레이즈의 활성이 재복구된다는 사실 또한 입증**하였다.

제 12 절 재복제 검역탐지건의 생산

1. 체세포 핵이식을 통한 재복제건의 생산

가. 연구수행 방법

(1) 체세포 핵이식을 통한 재복제건의 생산

발정초기의 암캐를 선별하여 매일 혈액을 채취 및 혈청 분리한 후 혈중프로게스테론 농도를 측정한다. 측정된 프로게스테론 농도를 기준으로 배란일을 결정 후 배란 3일째에 Isoflurane으로 전신 마취후 회복하여 난관내의 성숙 난자를 회수한다.

생식열구 (bursal slit)를 통하여 난관의 처음 끝단에 접근하여 inverted flanged bulb needle을 수술적 결찰로 고정하며, 고정은 3cm 플라스틱튜브 및 지혈 검자와 quick-release device를 이용하여 실시한다. 자궁-난관접속부 바로 위의 난관 기저부를 드러내고, 10% (v/v) FBS, 2 mM NaHCO₃, 5 mg/ml BSA가 보충된 CW배지로 채워진 24게이지 주사기를 삽관하여 배지를 밀어낸다. 이때 배지와 함께 흘러나오는 생체내 성숙난자를 회수하여, 38.5°C 조건의 CW배지로 운반한다.

(2) 체세포 핵이식을 위한 공여 핵세포의 준비

체세포 핵 이식을 위하여 2 내지 6 계대의 세포들을 사용한다. 체세포 핵이식을 하기에 앞서, 세포들을 해동하고, 100% 컨플루언시가 될 때까지 배양한 후 약 3분 동안 트립신 처리하여 단일 층으로부터 분리시켜 하나의 세포로 회복시켜 핵 공여 세포로 이용한다.

(3) 체세포 핵 이식을 위한 수핵 난자의 준비

앞서 언급한 체내성숙 난자회수 방법을 이용하여, 제1극체를 지닌 개의 체내 성숙 난자를 플라싱을 통해 회수한다. 회수된 난자는 실험실로 운반된후, CW 배지 내에서 0.1% (v/v) 히알루로니다제 (hyaluronidase)에 침지한 후, 미세 유리파이펫을 이용하여 난구세포를 제거한다. 그 후, 각각의 난자들은 미세조작기를 이용하여 홀딩 마이크로피펫으로 고정하고, 10% (v/v) FBS 및 5 ug/mL 핵스트 (Hoechst 33342)와 5 ug/mL 사이토칼라신 B가 첨가된 CW 배지 내에서 핵스트로 염색된 난자의 염색체를 aspiration pipette을 사용하여 제거한다. 탈핵된 난자는 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199에 두고 계속하여 체세포를 주입하는데 사용한다.

(4) 미세주입, 융합, 활성화 및 이식

공여 체세포와 수핵 세포질체의 합체를 향상 시키도록 10% (v/v) FBS가 보충된 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 탈핵 난자의 위란강 (perivitelline)으로 하나의 공여세포를 주입한다. 상기 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM HEPES 및 0.05% (w/v) BSA를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 바늘 형의 2개의 마주보는 전극 사이에 놓는다. 난자 세포질체 및 핵 공여 세포 사이의 접촉면을 전극과 평행하게 놓고, Electro-Cell Fusion apparatus (NEPA GENE Co., Chiba, Japan)로 전기 자극을 준다. 70-75V, 15 usec 지속시간으로 2 펄스를 가하며, 전기자극 30 분 후에 핵 공여세포와 난자세포질체의 융합을 실체현미경 하에서 관찰한다. 융합된 수정란만을 선별하여 단위생식기법을 통해 개발된 최적의 활성화 조건으로 융합수정란의 활성화를 유

도한다. 복제수정란의 활성화가 끝나면, 자연배란 동기화가 된 대리모의 난관내로 탐침 카테터를 이용하여 복제수정란을 로딩하여 이식한다. 이식한날로부터 30일째 초음파기기를 이용하여 태아의 형성 유무를 확인하여 임신을 판정한다. 임신되어진 개체는 이식한 날로부터 60일째 분만을 위한 준비를 한다.

나. 연구수행 결과

(1) 1차년도 생산된 테니 복제건의 세포를 이용한 재복제건 생산

과제 1차년도에 생산되었던 테니 복제건의 체세포를 확립한 후, 체세포를 이용하여 21개, 26개의 복제수정란을 각각 2마리의 대리모 A, B에 이식하였고 대리모 A는 이식 후 30일째 초음파 임신 진단을 한 결과 2개의 태아를 확인할 수 있었고, 이식 후 52일째에 엑스레이 촬영을 하여 산자수를 확인 한 결과 아래의 사진(A)처럼 2마리의 산자를 확인할 수 있었다. 또한 대리모 B는 이식후 32일째에 초음파 임신 진단을 통해 3개의 태아를 확인할 수 있었으며, 이식 52일째 엑스레이 촬영을 하여 산자수를 확인한 결과 아래의 사진(B) 와 같이 3마리의 태아를 확인 하였다.

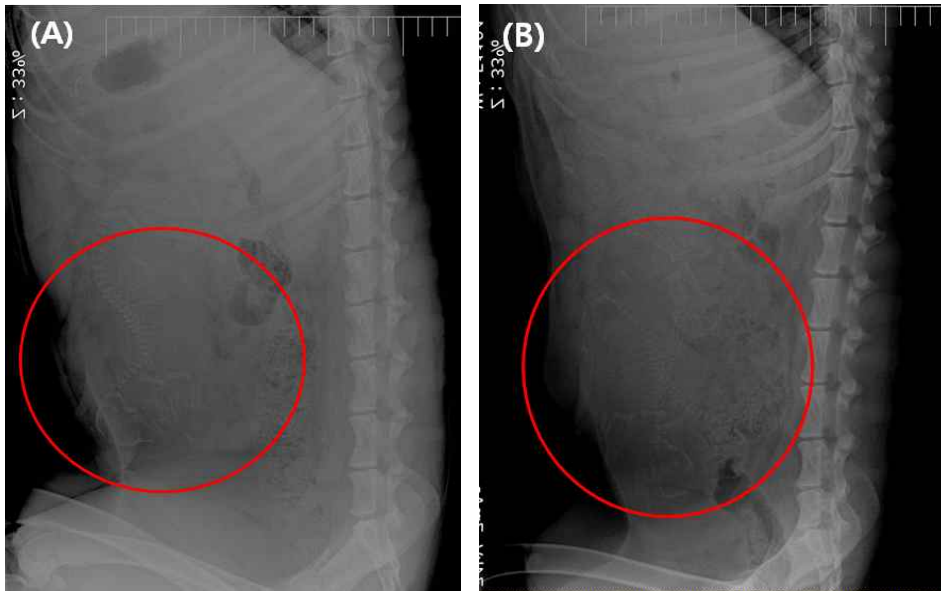


그림 117 대리모내 복제수정란 이식후 52일째 엑스레이 촬영 영상. (A) 대리모 A, (B) 대리모 B

그리고 임신 60일째에 대리모 A는 자연분만을 통해 2마리의 재복제 테니를 얻었고 대리모 B의 경우 자연분만을 통해 1마리 제왕절개를 통해 2마리를 얻었으며, 총 5마리의 재복제 테니를 생산하는데 성공 하였다. 그러나 불행하게도 5마리의 재복제 테니 중 1두가 생후 3일째에 사망하였다 (아래표 참조). 사망한 1두의 경우 대리모 A에서 태어났으며 태어났을 당시 뒷다리 기형이 관측 되었으며, 폐사한 재복제건을 부검을 실시한 결과 비

정상적으로 커진 간을 관측할 수 있었지만, 직접적인 사망원인은 아니었으며, 다른 장기에서는 특이 소견은 보이지 않았으며 정상임을 확인 할 수 있었다. 남아있는 **4마리의 재복제 데니들은 모두 건강하게 성장하였으며 외형이 세포공여견과 매우 유사함을 확인** 할 수 있었다. (아래 사진 참조)

표 59 복제수정란이 이식된 임신한 대리모와 생산되어진 복제개의 정보

Replication	No. transferred embryos	No. offspring	Status of offspring
Recipient A	21	2	1 live, 1 death
Recipient B	26	3	live



그림 118 (A) 우수 검역 탐지견 데니, (B) 3마리의 복제 데니, (C) 4마리의 재복제 데니

(2) 2차년도 생산된 카이저 복제견 세포를 이용한 재복제견 생산

재복제견을 생산하기 위해 2차년도에 생산된 우수검역탐지견 카이저의 세포를 이용하여 복제되어진 수정 (Mercury)의 체세포와 지방줄기세포를 확립하고 지방줄기세포를 사용하여 55개의 복제 수정란을 3마리의 대리모에 이식 하였다.



그림 119 대리모내 복제수정란 이식 후 50일째 엑스레이 촬영 영상

이식후 30일째 초음파 임신 진단을 한 결과 1마리의 대리모가 임신한 것을 확인 하였다. 이식후 50일째 엑스레이 촬영을 하여 산자수를 확인한 결과 아래의 사진처럼 2마리의 태아가 임신된 것을 확인할 수 있었다. 이후 **제왕절개를 통해 2마리의 제복제 카이저가 분만되어 총 2마리의 재복제견을 생산하는데 성공** 하였다 (아래 사진 참조). 그 결과는 아래와 같다.

표 60 재복제견 생산을 위한 복제 수정란 생산 및 이식

세포 유형	이식한 복제 수정란 수	대리모수	임신 대리모수 (임신대리모수/총대리모수)	착상된 배아수 (착상배아수/이식배아수)
수성 지방줄기세포	55	3	1 (33.3 %)	2 (3.6 %)

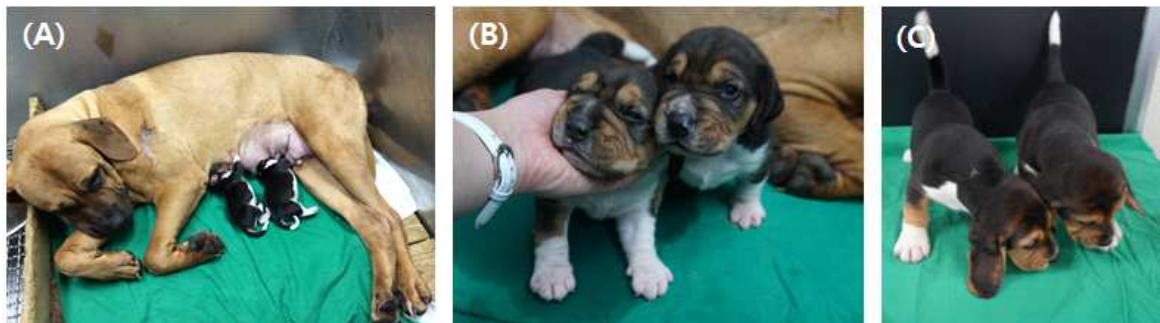


그림 120 (A) 생후 1일째, (B) 생후 21일째, (C) 생후 49일째의 재복제 카이저들

2. 텔로미어 길이 조절을 통한 공여세포의 배양조건 확립

가. 연구수행 방법

- (1) 텔로미어 길이 조절을 통한 공여세포의 배양조건 확립 및 세포의 텔로미어 길이 분석
- 한 개체에서 분리한 체세포를 resveratrol의 처리에 따라 유전자 발현 정도를 비교 분석하였다. 확립된 지방줄기세포주는 해동시 RCME-P 배양액 9ml에 세포를 thawing시킨다. 1000rpm, 3분간 원심분리를 실시하고 각 20만개의 세포를 35mm²의 dish에 배양한다. 배양된 세포는 confluency에 도달하면 다음 계대로 배양하고 체세포 핵이식 및 분석 실험에의 이용을 위해서 confluency 상태에 도달하면 trypsin을 처리하여 cell을 분리하여 체세포 핵이식의 공여세포 및 유전자 분석 세포로 이용한다.

줄기세포의 특징으로 제시되는 여러 가지 마커 유전자(Oct4, Sox2, Rex1, DPPA2)와 재구성 양상을 비교할 수 있는 다양한 마커 유전자 (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B)의 발현 양상을 비교하였다. 마지막으로 텔로미어 길이 조절의 여부를 확인하기 위해서 공여 세포 중 지방줄기세포의 텔로미어 길이 및 resveratrol의 처리 농도에 따른 텔로미어 길이를 비교하였다. 텔로미어 길이 분석을 위해 resveratrol이 처리된 공여세포에서 genomic DNA (gDNA)를 추출하였다. gDNA의 추출을 위해 Qiagen의 DNeasy Blood & Tissue 키트를 사용하였고, 혈액세포에 protease K를 처리하여 단백질을 용해시킨 후 순수한 gDNA 추출을 위해 RNase A를 처리하여 RNA를 제거한다. 다음 과정으로 세포용해 용액을 첨가한 다음 56°C에서 10분간 처리하여 세포를 용해시킨다. 에탄올을 처리하여 핵으로부터 용출된 gDNA를 응집시켰고, 컬럼을 이용하여 정제 및 추출을 진행한다. 추출된 gDNA의 농도 및 순도를 Nanodrop과 전기영동으로 확인하였다. 이렇게 추출된 1.5 µg의 gDNA를 Roche의 TeloTAGGG Telomere Length Assay 키트를 이용하여 텔로미어 길이 분석을 진행하였다. 키트 내에 있는 Enzyme을 이용하여 gDNA를 fragmentation 시킨다. Fragmentation된 DNA를 0.8% 아가로즈 젤에 75 V로 전기영동을 한다. 전기영동된 젤을 각각의 용액을 이용하여 denaturation과 neutralization을 시킨 후, 나일론 멤브레인에 모세관 투과현상을 이용하여 transfer한다. Transfer가 끝난 후, UV를 이용하여 crosslinking을 시킨 다음, Telomere probe를 이용하여 hybridization을 진행한다. Hybridization 반응이 끝난 멤브레인에 Telomere probe와 결합할 Anti-DIG-AP를 붙인다. 반응이 끝난 멤브레인에 세척 과정을 거친 후, detection 용액을 처리한 다음 X-ray 필름에 노출 한 뒤, 필름을 현상하여 이미지 결과를 얻어낸다. 필름을 통해 얻어진 이미지를 스캐닝하였고, 전체 밴드를 Image J 프로그램을 이용하여 최소 30개 이상의 구역으로 나눈 뒤, 각 구역의 OD값을 얻어낸다. 각 구역에서 얻어진 OD 값을 위에서 제시한 공식으로 계산 검증한 후 resveratrol이 처리된 세포의 텔로미어 길이 정상성을 분석하였다.

나. 연구수행 결과

(1) resveratrol을 이용한 세포의 텔로머레이즈 활성 변화 비교

개 체세포의 resveratrol 의 처리는 지방줄기세포와 섬유아세포주에서 모두 텔로머레이즈 활성의 변화가 나타났다. 기 차년도에 보고한 것처럼 특히 지방줄기세포와 섬유아세포 모두 10 uM의 농도로 세포를 처리한 경우 텔로머레이즈 활성의 유의적인 차이가 발생하였다 (2차년도 계획서 참조).

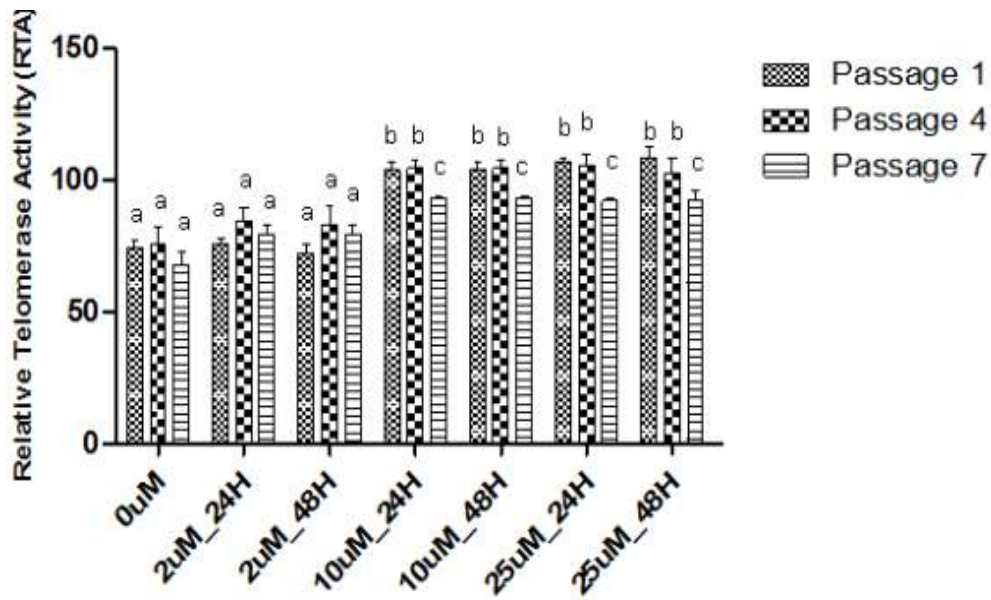


그림 121 섬유아세포에서의 Resveratrol처리에 따른 텔로머레이즈 활성 변화. 그래프 상의 알파벳이 다른 것은 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 의미함 (P<0.05).

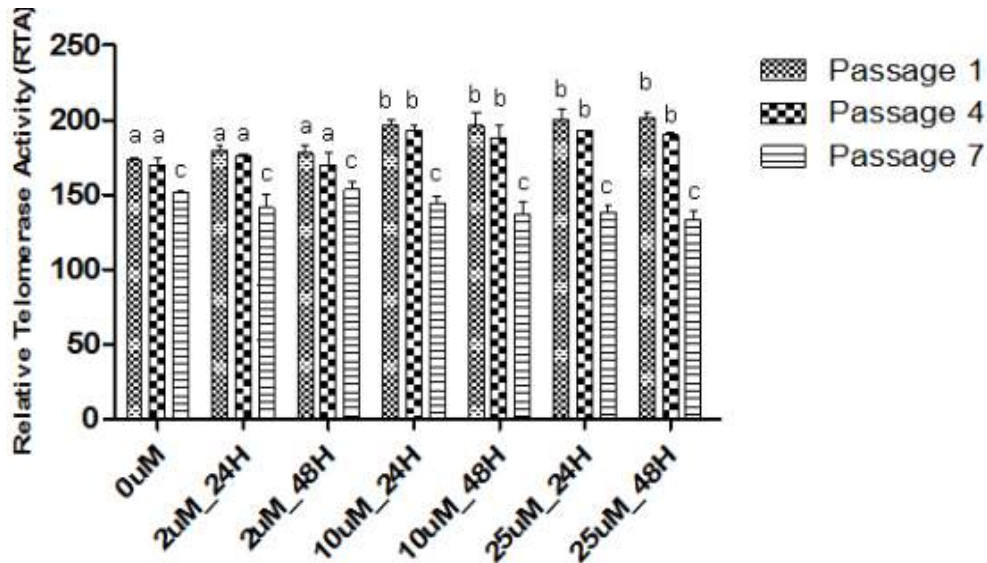


그림 122 지방줄기세포에서의 Resveratrol처리에 따른 텔로머레이즈 활성 변화. 그래프 상의 알파벳이 다른 것은 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 의미함 (P<0.05).

(2) resveratrol 처리에 따른 유전자발현 양상 비교분석

앞선 결과에서 확인할 수 있듯이 개의 체세포에서 resveratrol처리는 텔로머레이즈 활성 변화를 유도하였다. 텔로머레이즈 활성은 많은 문헌에서 알려진 바와 같이 재구성능력 및 복제 효율향상과도 관련이 되어 있고 이러한 양상은 유전자 발현과도 관련이 되어 있으므로 resveratrol의 처리에 따른 유전자 발현 정도를 비교 분석하였다. 텔로미어 길이 조절을 통한 공여세포의 배양조건 확립 실험에서 세포 유형 및 Resveratrol의 처리 농도에 따라 유전자 발현 수준의 차이가 있었다. 지방줄기세포와 섬유아세포에서 OCT4, SOX2, REX1과 DPPA2 등의 유전자와 같이 전분화능과 관련된 유전자 발현 수준을 비교하였다. 아래 그림에서 제시된 것처럼 10uM을 처리한 세포에서 OCT4와 REX1, DPPA2등 분석한 유전자의 발현 수준이 섬유아세포, 지방줄기세포 모두에서 처리하지 않은 그룹에 비해 유의적으로 증가하는 양상을 나타냈다. 텔로머레이즈 활성은 전분화능과 관련되어 있는 것으로 보고되었으며 이번 실험 결과를 통해서도 텔로머레이즈 활성 증가 및 전분화능 관련 유전자의 발현 양상이 일치하는 것으로 확인되었다.

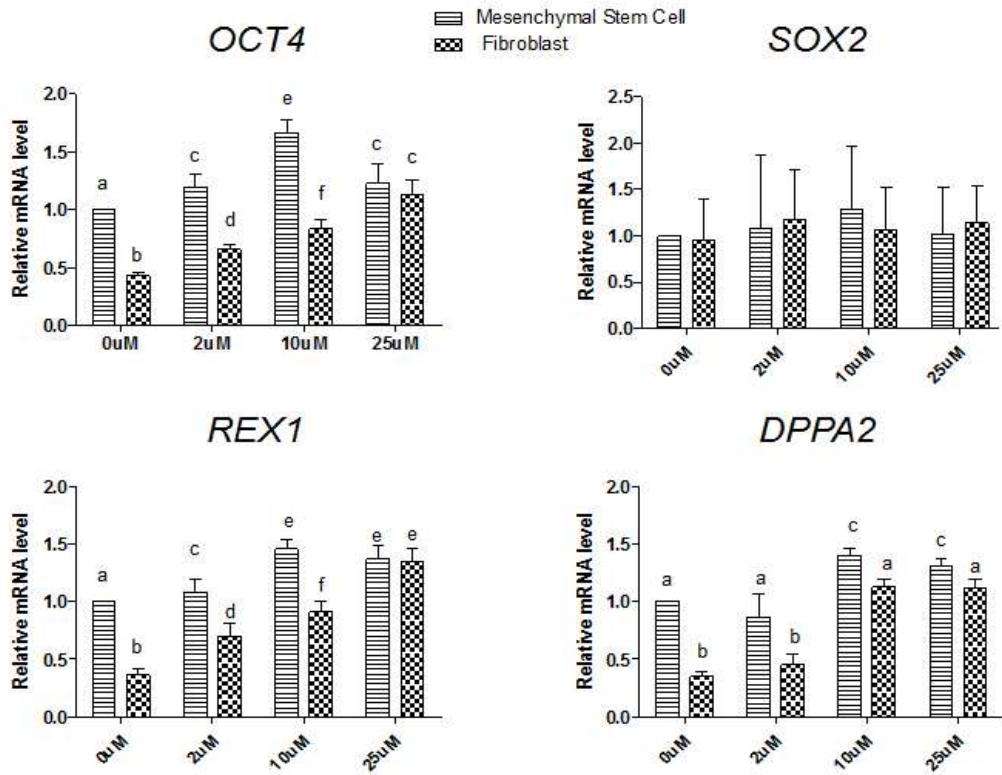


그림 123 resveratrol처리에 따른 OCT4, SOX2, REX1, DPPA2 유전자의 발현을 비교 분석. 그래프 상의 알파벳이 다른 것은 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 의미함 (P<0.05).

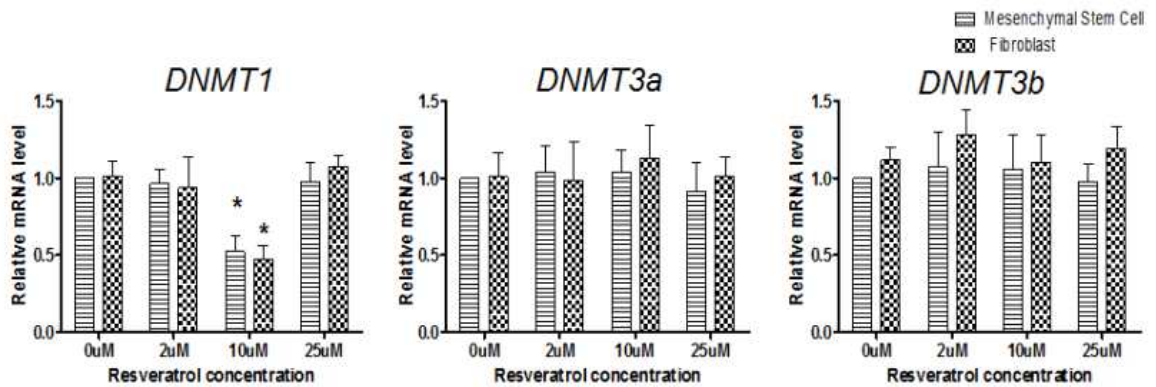


그림 124 resveratrol을 처리한 세포의 DNMT1, DNMT3a, DNMT3b 유전자의 발현 비교 분석

또한 재구성 능력을 의미하는 유전자 DNMT1, DNMT3A, DNMT3B의 유전자 발현 수준 비교한 결과에서 DNMT3A, 3B는 농도에 따른 차이가 나타나지 않았으나 DNMT1은 10uM에서만 유전자 발현 수준이 감소하는 결과가 나타났다. 그 결과는 위의 그림과 같다.

(3) resveratrol처리에 따른 텔로미어 길이 변화

앞선 실험 결과에서 보여지듯이 개 체세포에서 resveratrol의 처리는 텔로머레이즈 활성 외에도 복제 효율과 관련이 있는 유전자의 발현율의 변화를 유도하였다. 최종적으로 텔로미어 길이 변화 여부를 확인하기 위해 개 지방줄기세포를 이용하여 resveratrol처리에 따른 텔로미어 길이를 비교 분석하였다.

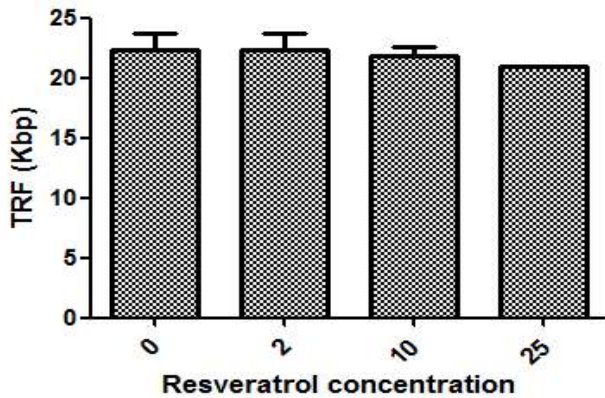


그림 125 개 지방줄기세포의 resveratrol 처리에 따른 텔로미어 길이 비교 분석

개 지방줄기세포의 텔로미어 길이 변화는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 세포의 유전자 발현 외에 텔로머레이즈 활성이 resveratrol을 10uM처리하였을 때 유의적으로 증가하였으므로 최적의 resveratrol의 처리 농도는 10uM임을 확인하였다. **결론적으로 resveratrol 처리를 통해 텔로머레이즈 활성의 향상과 전분화능 및 재구성능력과 관련된 유전자의 발현 향상 등의 요소는 개 체세포에서 조절되었으나 텔로미어 길이는 변화가 없었다.**

3. 텔로미어 길이가 조절된 공여세포를 통한 복제 검역탐지견 생산

가. 연구수행 방법

(1) 텔로미어 길이가 조절된 공여세포를 통한 복제 검역탐지견 생산

resveratrol의 적정 농도로 처리된 공여세포를 이용한 체세포 핵이식 및 수정란 이식 실시 텔로미어 길이의 조절 여부 및 텔로머레이즈 활성, 유전자 발현 수준등의 결과를 비교 분석하여 최적의 공여세포 처리 조건을 설정한다. 설정된 처리 농도에 따라 공여 핵세포를 준비한다. 체내 성숙 난자의 획득, 체세포 핵이식을 위한 공여 핵세포의 준비, 체세포 핵 이식을 위한 수핵 난자의 준비, 미세주입, 융합, 활성화 및 이식의 순서로 위와 같은 방법으로 공여세포를 이용하여 복제 수정란을 생산하고 대리모에 복제 수정란을 이식한다.

나. 연구수행 결과

(1) 체세포핵이식을 이용한 복제수정란 생산 및 이식

앞선 복제 수정란 생산시 유전자 발현 향상 및 텔로머레이즈 활성의 증가 등의 결과를 보여준 **10 uM Resveratol 처리군을 이용하여 복제검역견을 1두 생산**하였다. 그 결과는 아래 표와 같다.

표 61 resveratol 처리를 이용한 우수 검역담지견의 복제 생산

	대리모	이식한 복제배아수	임신진단	착상된 배아수
1	A	16	+	1
2	B	15		
3	C	9		
4	D	8		
5	E	8		
총합	5	56	1 (20%) ^a	1 (1.8%) ^b

a 임신한 대리모수/총대리모의 백분율,

b 착상된 배아수/이식한 복제배아수의 백분율

새롭게 개발된 resveratol 10uM의 처리로 복제수정란을 생산하여 대리모에 이식한 결과 처리하지 않은 그룹에 비하여 우수한 배아 형성율을 확인하였다. 그러나 착상된 배아 중 최종 분만 후 생존한 개체는 없으며 향후 생존율을 높일 수 있는 방법을 모색하여 보다 안정적이고 높은 효율의 복제개 생산 시스템을 개발할 계획이다.

4. 비글외의 스프링거스파니엘종의 검역견의 세포주 확립

가. 연구수행 방법

(1) 현재 검역담지견 센터에서 활동하고 있는 우수한 검역담지견의 선정, 조직채취 및 배양과정을 통한 세포주 확립

성체 섬유아세포 확립을 위하여 우수 검역담지견 인 비글 외의 스프링거스파니엘의 복부 피부의 털을 제거한 후 채취한 피부조직을 동일한 크기 (1cm *1cm)로 각각 자르고

RCME-P (RNL Bio)의 배양액으로 조직을 부유시킨다. 배양액 9ml을 넣고 조직을 부유시킨 다음 가라앉은 조직 이외의 상층액은 제거하는 방법으로 조직 내의 불순물을 제거한다. 이러한 과정을 3회 이상 반복하여 제거하고 1,500 rpm에서 2분간 원심분리를 실시한다. 일차 배양 직전에 조직은 두 그룹으로 나눠서 배양을 실시한다. 원심 분리 이후 배양을 바로 실시하는 그룹과 또 다른 그룹은 배양하기 직전 조직을 트립신 3ml을 넣고 37°C의 인큐베이터에서 처리한다. 30분간 처리하며 매 10분 간격으로 조직을 부유시켜 트립신 처리가 원활히 이뤄질 수 있도록 한다. 트립신 처리가 끝난 세포 또한 처리하지 않은 그룹과 마찬가지로 방법으로 조직의 일차 배양을 시작한다. 일차 배양 이후 세포들이 조직에서 뚫어나오기 시작하면 3내지 5일 간격으로 배지를 교환하고, 컨플루언시에 도달하면 0.1% 트립신/0.02% EDTA를 사용하여 3분간 처리하고 플라스틱 배양접시에서 세포가 분리된 양상을 확인 후 동결배지를 사용하여 -196 °C의 액체질소 내에서 동결 저장한다. 상기 동결배지는 10% (v/v) DMSO 가 첨가된 90% (v/v) FBS를 이용하여 동결하여 실험에 이용하기 전까지 보관한다.

나. 연구수행 결과

(1) 비글외의 스프링거스파니엘종의 검역건의 세포주 확립

스프링거스파니엘 종의 검역건 세포주 확립을 위해 수컷, 잉글리쉬 스프링거스파니엘 종 1두 개체의 섬유아세포를 확립하였다. 동결된 세포주는 액체 질소에 보관하였으며 확립한 세포의 수는 아래와 같다.

표 62 스프링거스파니엘 종의 세포주 확립

그룹	계대수	바이알 수	세포농도
트립신 처리군	0	4	5×10^5
	2	14	1×10^6
트립신 비처리군	0	5	2×10^6
	1	13	5×10^5

제 13 절 우수 검역탐지건의 기년도 확립한 검역탐지건 스프링거스파니엘의 복제 생산

1. 복제효율 향상을 위한 최적의 공여세포주 선정

가. 연구수행 방법

(1) 2가지의 방법의 일차 세포 배양법을 통해 얻어진 세포주를 이용하여 체세포복제에 효율적인 일차 세포 배양법 선정 및 세포주 선정

(가) 2가지의 일차배양법을 통한 세포주 확립

성체섬유아 체세포 확립을 위하여 우수 검역탐지건 일요일의 복부 피부의 털을 제거한 후 일반적 외과 수술에 준해 알콜 스폰지와 베타딘으로 소독한 후 1cm * 2cm의 크기로 조직을 절제하여 실험실로 가져온다. 채취한 피부조직을 동일한 크기 (1cm * 1cm)로 각각 자르고 PBS에 3번 Washing하였다. 그 후, 미세가위와 블레이드를 이용하여 조직을 잘게 자른 다음, 트립신 처리군은 조직이 잠길 정도의 트립신을 넣어 주어 39℃, 5% CO2 및 95% 공기로 가습된 조건에서 30분 처리해준다. 30분 후 RCME-P (RNL Bio)를 이용하여 3번 washing 후, RCME-P의 배양액으로 조직을 부유시킨 후 원심분리를 실시한다. 원심분리 후 상층액은 제거하고 조직과 세포 펠렛을 회수하여 플라스틱 배양접시 (Becton Dickinson Lincoln Park, NJ) 에 침지한다. 트립신 비처리군은 잘게 자른 조직을 RCME-P (RNL Bio)를 이용하여 3번 washing 후 원심분리 후 상층액은 제거하고 조직과 세포 펠렛을 회수하여 플라스틱 배양접시에 침지한다. 침지된 조직은 계속하여 RCME-P (RNL Bio)에서 39℃, 5% CO2 및 95% 공기로 가습된 조건으로 6-10일간 배양한다. 부착되지 아니한 세포 또는 외식편 덩어리를 제거한 후, 부착된 세포들을 컨플루언시 (confluency)까지 계속하여 배양한다. 이들 세포들을 3내지 5일 간격으로 배지를 교환하고, 컨플루언시에 도달하면 0.1% 트립신/0.02% EDTA를 사용하여 3분간 트립신을 처리하고 플라스틱 배양접시에서 세포가 분리된 양상을 확인 후 동결배지를 사용하여 -196 ℃의 액체질소 내에서 동결 저장한다. 상기 동결배지는 10% (v/v) DMSO 가 첨가된 90% (v/v) FBS를 이용하여 동결하여 공여세포로 사용하기 까지 보관한다.

(나) 2가지 일차배양 방법으로 확립한 세포주의 CCK-8을 이용한 생존능 비교

일차 배양을 통하여 얻어진 트립신 처리군과 비처리군의 세포를 각각 96-well plate의 각 well에 1 x 10⁴개씩의 세포를 24시간 동안 39℃, 5% CO2 및 95% 공기로 가습

된 조건으로 배양 하여준다. 그 후, Cell Counting Kit-8를 각 well에 10ul 씩 넣어준 다음 4시간 39°C, 5% CO2 및 95% 공기로 가습된 조건에서 배양한다. 4시간 후, ELISA 기계를 사용하여 흡광도 측정하였다.

(다) 2가지 방식의 일차배양법으로 확립한 세포의 유전자 분석

일차배양 과정 중 트리신을 처리 한 것과 그렇지 않은 세포의 유전자의 발현 정도를 비교 분석하였다. 일차 배양에서 얻은 세포는 0 계대에서 동결하였으며 세포 수준에서의 유전자 발현 수준 비교분석을 위해 세포를 해동하여 사용하였다. 확립된 세포주는 각각 해동시 DMEM배양액 9ml에 세포를 thawing시킨다. 1000rpm, 3분간 원심분리를 실시하고 각 50만개의 세포를 60mm²의 dish에 배양한다. 배양된 세포는 confluency에 도달하면 다음 계대로 배양하고 분석 실험에의 이용을 위해서 confluency 상태에 도달하면 trypsin을 처리하여 cell을 분리하여 유전자 분석에 이용한다. 세포의 metabolism 관련 유전자인 PHB, MAPK1, MAPK3, PI3K, Akt1, Akt2 그리고 Akt3와 세포사를 나타내는 지표인 Bax와 Bcl2의 유전자의 발현 양상을 비교하였다. 유전자의 발현 양상은 qRT-PCR을 통해 분석을 실시하였으며 각 분석에 이용된 Primer의 서열은 아래 표와 같다.

표 63 qRT-PCR 분석을 위한 유전자의 Primer 서열

Gene	Accession No.	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
Beta-actin	NM_001003349	F-GCTACGTCGCCCTGGACTTC R-GCCCGTCGGGTAGTTCGTAG	86
PHB	XM_001110179	F- CCACCTCGGTGTCTCAAAAT R- CTCTGGAAGGGCAGTCTCTG	134
MAPK1	NM_001110800.1	F- TGTGCCCTAGAACTGCTCCT R- TCCGATCTCTGAGGCTGAGT	144
MAPK3	XM_005621357.1	F- ACAGTCTCTGCCCTCCAAGA R- GATGAGCCAGTGCTTCTTCC	140
PI3K	NM_001287160	F- TCAGCCAAGCATTGTTGAAG R- GCACCAGCCGATCTACAAAT	90
Akt1	XM_014116176	F- GCAGGAGGAAGAGATGATGG R- CCCAGCAGCTTCAGGTAATC	135
Akt2	NM_001012340	F- TTTGACGACGAGTTCAGTGC R- GGATGCTGGCTGAGTAGGAG	124
Akt3	XM_014115248	F- GCACAGGAGATCAGTGCGTA R- TCCTCAGCAGTGTCACACAG	143
Bax	NM_001003011	F- ACTTTGCCAGCAAAGTGGTG R- AGGAAGTCCAGTGTCAGCC	88
Bcl2	NM_001002949.1	F-TGAGTACCTGAACCGGCATC R-GTCAAACAGAGGCTGCATGG	100

나. 연구수행 결과

(1) 복제건의 효율적인 생산을 위한 최적의 포주 선정

(가) 2 가지의 일차배양 방법을 이용한 우수검역 탐지건 일요일의 세포주 확립

우수 검역탐지건 일요일의 세포주를 트립신 처리군과 트립신 비처리군으로 나누어 섬유아세포를 확립하였다. 확립된 세포주는 액체 질소에 보관하였으며, 트립신 처리군과 비처리군에서 확립한 세포수는 다음과 같다.

표 64 2가지 방법의 일차배양을 통한 세포주 확립

그룹	사용 조직량	세포 확립까지 걸린 일수	회수 세포수
트립신 처리군	0.37g	13일	7.6×10^6
트립신 비처리군	0.38g	12일	7.8×10^6

(나) 2가지 일차배양 방법을 이용해 확립한 세포주의 생존능 비교

CCK-8 kit를 이용하여 일차 배양시 트립신을 처리한 그룹과 그렇지 않은 그룹의 세포 생존능을 측정된 결과, 두 그룹의 생존능에 차이가 없었다. 따라서 결론적으로 일차 배양시 트립신을 처리하는 것이 세포의 생존능에 영향을 끼치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

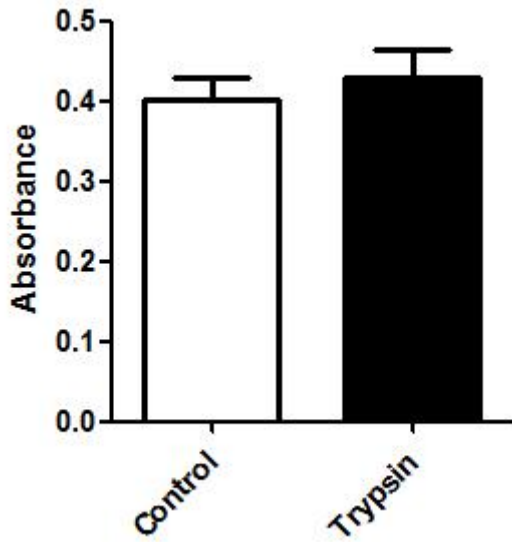


그림 126 CCK-8 kit를 이용하여 일차배양시 트립신을 처리한 트립신 처리군과 비처리군의 세포 생존능 비교

(다) 2가지 일차배양 방법을 이용해 확립한 세포주의 유전자 발현 패턴 분석

일차 배양시 트립신 처리군과 비처리군의 세포의 metabolism 관련 유전자 7가지를 비교한 결과, 트립신 처리 그룹에서 PHB, MAPK1, PI3K, Akt1의 유전자 발현이 유의하게 낮았다.

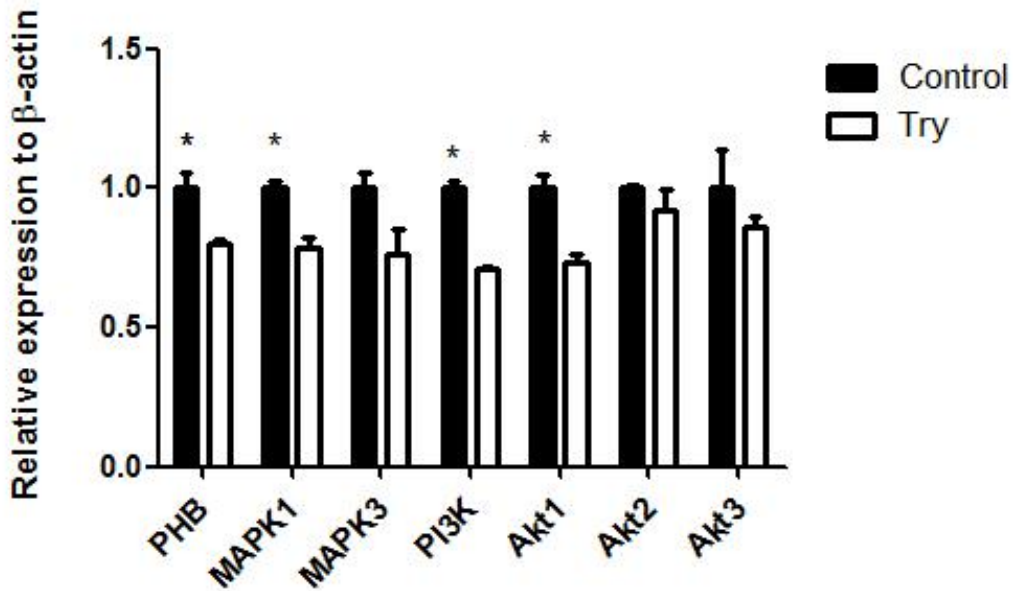


그림 127 일차 배양시 트립신 처리군과 비처리군 세포의 metabolism 관련 유전자 발현 수준 비교

또한 트립신 처리군과 비처리군의 세포에서 세포사를 나타내는 유전자 Bax와 Bcl2의 유전자 발현정도를 비교 하였을 때, 트립신 처리군이 anti-apoptosis 유전자인 Bcl2가 유의하게 낮았으며, 또한 Bax/Bcl2의 비율이 트립신 처리군에서 높게 나타났다.

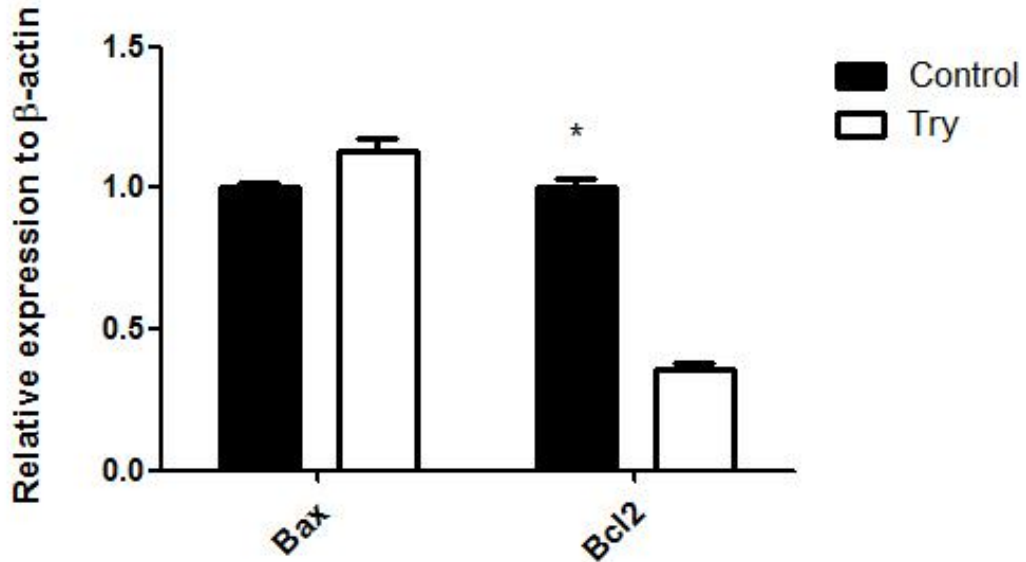


그림 128 일차 배양시 트립신 처리군과 비처리군 세포사 관련 유전자 발현 수준 비교

2. 체세포 핵이식을 통한 복제견의 생산

가. 연구수행 방법

(1) 체세포 핵이식을 위한 공여 핵세포의 준비

체세포 핵 이식 (SCNT)를 위하여 2 내지 6 계대의 세포들을 사용한다. 체세포 핵이식을 하기에 앞서, 세포들을 해동하고, 100% 컨플루언시가 될 때까지 배양한 후 약 3분 동안 트립신 처리하여 단일 층으로부터 분리시켜 하나의 세포로 회복시켜 핵 공여 세포로 이용한다.

(2) 체내 성숙 난자의 획득

발정초기의 암캐를 선별하여 매일 요추피정맥에서 혈액을 채취 및 혈청 분리한 후 전문 검사기관에 보내어 혈중프로게스테론 농도를 측정한다. 측정된 프로게스테론 농도를 기초로 배란일을 결정 후 배란 3일 후에 Isoflurane으로 전신 마취후 개복하여 난관내의 성숙 난자를 회수한다. 생식열구 (bursal slit)를 통하여 난관의 처음 끝단에 접근하여 inverted flanged bulb needle를 삽관한다. (바늘을 수술적 결찰로 고정하였으며, 3cm 플라스틱튜브 및 지혈 겸자 (hemostatic forceps)를 사용하는 급속-방출 장치 (quick-release device)를 이용하여 실시한다. 주위 조직 및 난관 내강을 창백하게 (blanch) 위해 지압을 가하여, 자궁-난관접속부 바로 위의 난관 기저부를 드러내고, 10% (v/v) FBS, 2 mM NaHCO₃, 5 mg/ml BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA)가 보충된 HEPES-완충 조직 배양 배지 (TCM)-199로 이루어진 수정란 수집 배지로 채워진 미세한

피하 주사기(24 게이지)를 삽관한다. 플라싱으로부터 채란된 생체내 성숙된 난자들은 38.5°C 조건의 HEPES-buffered TCM-199 내에서 10분 이내에 실험실로 옮긴다.

(3) 체세포 핵 이식을 위한 수핵 난자의 준비

HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 0.1% (v/v) 히알루로니다제 (hyaluronidase)에 침지한 후, 미세 유리파이펫을 이용하여, 생체 내에서 성숙된 난자로부터 난구세포를 제거한다. 그 후, 각각의 난자들을 홀딩 마이크로피펫 (내경 150 μ m)으로 고정하고, 10% (v/v) FBS 및 5 μ g/mL 핵스트 (Hoechst 33342)와 5 μ g/mL 사이토칼라신 B가 첨가된 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 미세조작기 (Nikon-Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 핵스트로 염색된 난자의 염색체를 흡입 피펫 (aspiration pipette)을 사용하여 제거한다. 탈핵된 난자는 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199에 두고 계속하여 체세포를 주입하는데 사용한다.

(4) 미세주입, 융합, 활성화 및 이식

공여 체세포와 수핵 세포질체의 합체를 향상 시키도록 10% (v/v) FBS가 보충된 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 탈핵 난자의 위란강 (perivitelline)으로 하나의 공여세포를 주입한다. 상기 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM HEPES 및 0.05% (w/v) BSA를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 바늘 형의 2개의 마주보는 전극 사이에 놓는다. 난자 세포질체 및 핵 공여 세포 사이의 접촉면을 전극과 평행하게 놓고, Electro-Cell Fusion apparatus (NEPA GENE Co., Chiba, Japan)로 전기 자극을 준다. 70-75V, 15 μ sec 지속시간으로 2 펄스를 가하며, 전기자극 30 분 후에 핵 공여세포와 난자세포질체의 융합을 실체현미경 하에서 관찰한다. 융합된 수정란만을 선별하여 10 μ M 칼슘 아이노포어 (calcium ionophore)를 포함하는 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199 배지에서 4분간 활성화를 유도한다. 그 후, 복제된 수정란을 세척한 후 1.9 mM 6-디메틸아미노푸린 (dimethylaminopurine)이 보충된 난관액합성배지 (mSOF) 내에서 4시간 동안 추가로 배양한다. 복제수정란의 활성화가 끝나면, 자연배란 동기화가 된 대리모의 난관내로 탐캣 카테터를 이용하여 복제수정란을 로딩하여 이식한다. 이식한 날로부터 30일째 초음파기기를 이용하여 태아의 형성 유무를 확인하여 임신을 판정한다. 임신되어진 개체는 이식한날로부터 60일째 분만을 위한 준비를 한다.

나. 연구수행 결과

(1) 3차년도 생산된 카이저 재복제견 세포를 이용한 재재복제견 생산: 2가지 배양액을 이용해 생산된 복제수정란의 체내 발달 효율 비교

일차 배양시 트립신 처리군과 비처리군으로 확립된 우수검역 탐지견 카이저의 재 복제

견은 일요일의 체세포를 이용하여 체세포 핵이식을 진행하였다. 트립신 처리군의 세포에서 유래된 90개의 복제 수정란을 6마리의 대리모에 이식하였고 트립신 비처리군 세포에서 유래된 71개의 복제 수정란을 5마리의 대리모에 이식하였다. 이식후 약 30일째 초음파 임신 진단을 한 결과 트립신 처리군과 비처리군 각 각 3마리가 임신한 것을 확인하였다. 이식후 52일째 엑스레이 촬영을 하여 산자수를 확인한 결과 **트립신 처리군과 비처리군 모두 1마리의 대리모가 2마리의 태아를 임신하였고, 2마리의 대리모가 1마리씩의 태아를 임신된 것을 확인** 할 수 있었다.

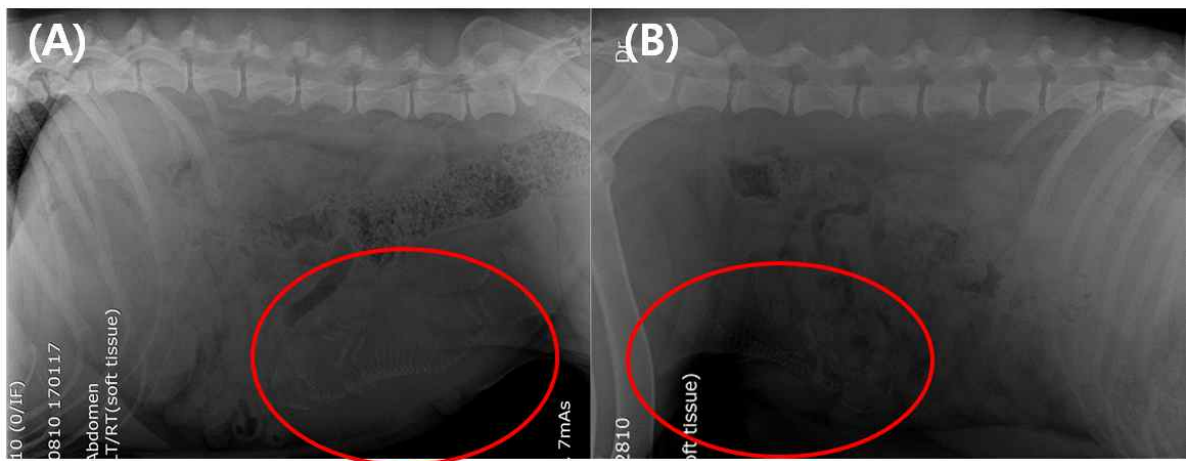


그림 129 대리모내 복제 수정란 이식 후 52일 때 엑스레이 촬영 영상. (A) 트립신 비처리군, (B) 트립신 처리군

그리고 임신 60일째 제왕절개 및 자연분만을 통해 트립시 처리군과 비처리군 각 각 4마리씩의 복제새를 생산 하는데 성공 하였다. 1마리의 대리모당 1마리의 복제개가 분만되었 으며, 총 4마리의 복제개를 생산하는데 성공 하였다. 그러나 불행하게도 트립신 처리군의 산자 중 1마리는 목근육 과다 발달된 상태로 태어나, 호흡곤란으로 폐사 하게 되었 으며, 트립신 비처리군의 산자 중 2마리 또한 목근육 과다 발달된 상태로 태어나, 호흡곤란으로 폐사 하게 되었다. 아래의 그림처럼 남아 있는 **5마리의 복제견은 모두 건강하게 성장** 하였다.

표 65 일차 배양시 트립신의 처리 여부에 따른 복제 수정란의 체내 발달을 비교

	대리모 수	이식한 복제 수정란 수	임신 대리모수 (임신대리모수/총대리모수)	산자수 (산자수/이식 수정란수)	생존 산자수
트립신 처리군	6	90	3 (50%)	4 (4%)	3
트립신 비처리군	5	71	3 (60%)	4 (5%)	2



그림 130 우수 검역견 카이저의 재복제견 일요일의 세포로 복제된 재재복제견. (A) 트립신 비처리군, (B) 트립신 처리군.

4차년도 복제견 생산은 스피링거스파니엘종을 복제하는 것이 목표였으나, 3차년도에 확립한 세포로 9회 이식(총이식한 복제란 120개, 대리모9마리)을 실시하였으나, 불행히도 임신이 되지 않아 검역탐지견센터에서 요구하는 새로운 견종 일요일을 복제를 하였습니다.

제 14 절 탐지능력과 인지행동학적 연관관계 분석을 통한 객관적 지표제시

1. 확립된 행동학적 분석 지표를 이용한 2차년도 생산 재복제견(수성 복제)의 행동 평가 통계학적 결과 분석

가. 연구수행 방법

(1) 2차년도 생산 재복제견 복제견의 행동 평가 실시

(가) 2차년도 생산 복제견의 유견행동 평가 및 통계학적 분석

2차년도 생산 복제견 수성의 체세포 복제견인 일과 월의 유견 행동 평가는 수성과 동일한 방법으로 7주령에 농림축산검역본부 검역탐지견 평가장에서 훈련 교관 외 2명이 실시하였고

결과 또한 2형, 3형을 검역 탐지견 특수 목적견으로 적합한 것으로 판정하였으며, 10개 항목을 유형에 따라 동일하게 구분하였다.

(나) 2차년도 생산 재복제견 복제견의 자견행동 평가 및 통계학적 분석

원본견인 수성이와 동일한 방법으로 13주령에 탐지견의 적합성을 판단하기 위한 테스트를 실시하였다.

나. 연구 수행 결과

(1) 복제견의 행동평가의 통계학적 결과 분석

(가) 2차년도 생산 재복제견의 유견 행동 평가 분석 및 통계학적 분석

수성을 재복제한 복제견 2두 일, 월의 유견 평가 항목은 수성이와 동일하게 사회적 친화도, 따르기, 구속, 사회적 우위성, 거상 우위성, 회수 능력, 촉각 민감성, 청각 민감성, 시각 민감성, 안정성이었으며 결과는 아래와 같다. 각각의 결과는 평가자 4명의 결과를 집계하여 다수의 평가 결과를 최종 결과로 사용하였다. 항목 중 안정성, 촉각 민감성, 시각 안정성에서는 동일한 결과를 나타내었으며, 사회적 친화도와 따르기에서는 일이 1, 월이 2로 약간의 변이를 나타내었으나 Volhard puppy aptitude test 해석에 따르면 1과 2 모두 사회적이며, 자신감 있고 독립적인 성향을 보여주고 있다. Pack drive 구성 항목, 사회적 친화도, 따르기, 사회적 우위성 이 모든 항목에서 월이 일보다 평가자에게 호전적인 표현을 하였으나 훈련 과정이나 평상시 태도에서 공격성을 보여주는 일은 없었고, 적극적인 친밀감의 표현으로 보여진다. 다음 구속, 거상 우위성, 안정성으로 구성된 Defense drive에서 구속은 일이 5, 월이 2, 거상 우위성은 일이 4, 월이 3, 안정성은 동일하게 3이었다. 다음은 회수, 촉각, 청각, 시각으로 구성된 Prey drive의 경우 두 개체 모두 회수능력과 청각 민감성이 약간의 차이를 보였지만 전체적으로 비슷한 행동 양식을 보여주고 있다.

이 모든 결과를 종합하여 특수 목적견 훈련에 적합 여부를 판단하였으며, **일은 3형, 월은 2형으로 재복제견 2두 모두 유견 평가에서 훈련에 적합 판정을 받았다.** 월의 경우 Pack drive에서 1형으로 판정을 받았으나 탐지견 훈련에 가장 연관성을 가지는 회수 능력 항목을 중점으로 2형으로 판정하였다.

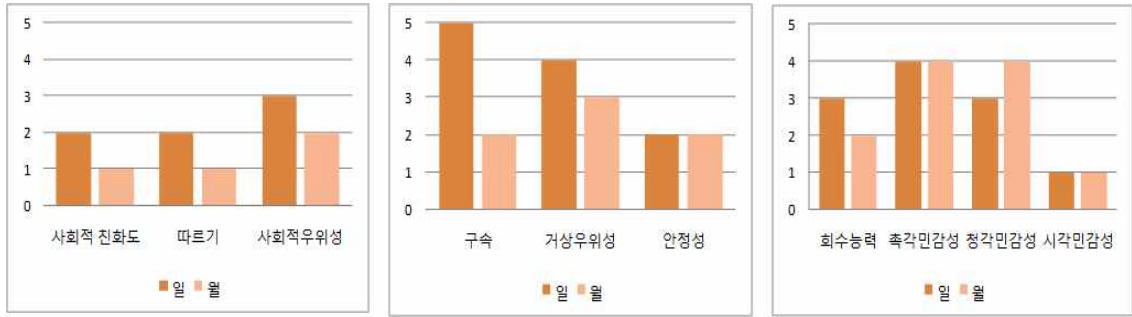


그림 131 재복제건 2두의 유건 평가 비교 분석

표 66 카이저 재복제건 2두의 유건 평가 결과

연번	견명	평가 결과			유형	유건 평가를 통한 최종평가
		Pack Drive	Defense Drive	Prey Drive		
1	일	2	4	3	3	적합
2	월	1	3	2	2	적합

이를 **원본견인 수성의 유건 평가 결과와 비교해 보면 사회적 우위성에서 월이 2를 받을 것을 제외하곤 원본견과 재복제건 사이에 차이는 없었으며 Pack drive의 경우 원본견과 재복제견이 동일한 성향을 보이는 것을 알 수 있었다.**



그림 132 원본견 수성과 재복제건 평가 비교 : Pack drive

다음은 구속, 거상우위성, 안정성을 비교해 본 결과 수성과 일의 경우 모두 동일한 결과를 나타 내었으며, 월은 구속 항목에서 수성, 일과는 다른 반응을 보여 주었다. 거상 우위성과 안정성 역시 월이 수성과 일과는 다른 반응을 보였다.

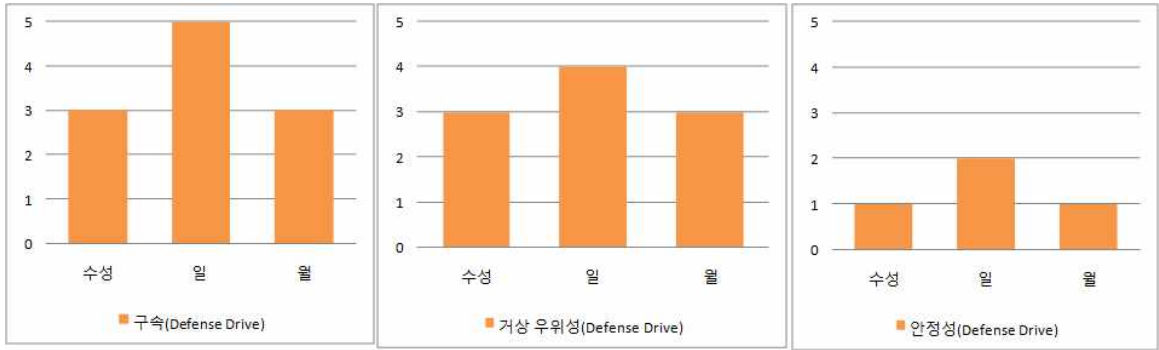


그림 133 원본견 수성과 재복제견 평가 비교 : Defense drive

회수 능력과 촉각 민감성의 경우 수성과 일은 회수는 3, 월은 2 반응, 촉각은 동일하게 4번 반응을 보였다.

청각 민감성에서는 수성과 월은 동일한 반응, 시각 민감성은 수성과 복제견이 모두 같은 반응을 보였다.

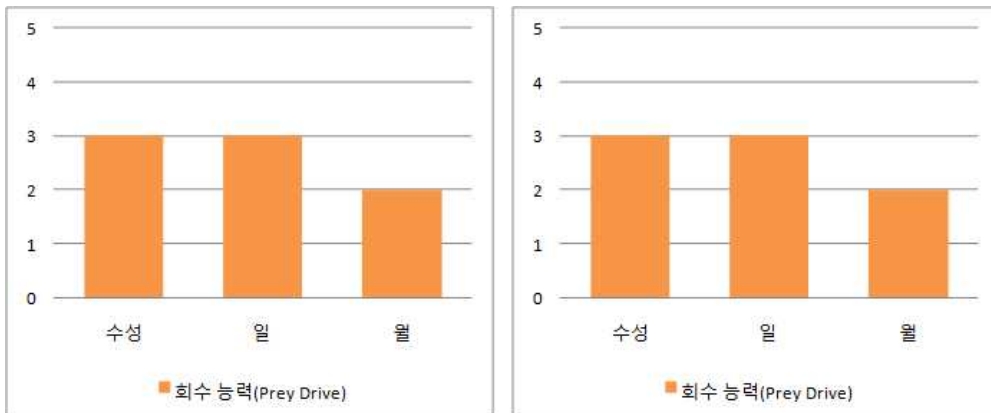


그림 134 원본견 수성과 재복제견 평가 비교 : Prey drive 1

각각의 결과에서 수성과 일,월 사이에는 약간의 변이는 있었으나 거의 비슷한 양상의 반응을 보여 주었으며, 각각의 평가 결과 모두 특수 목적견 훈련에 적합한 수준 내에서 변이를 보여 주고 있다.

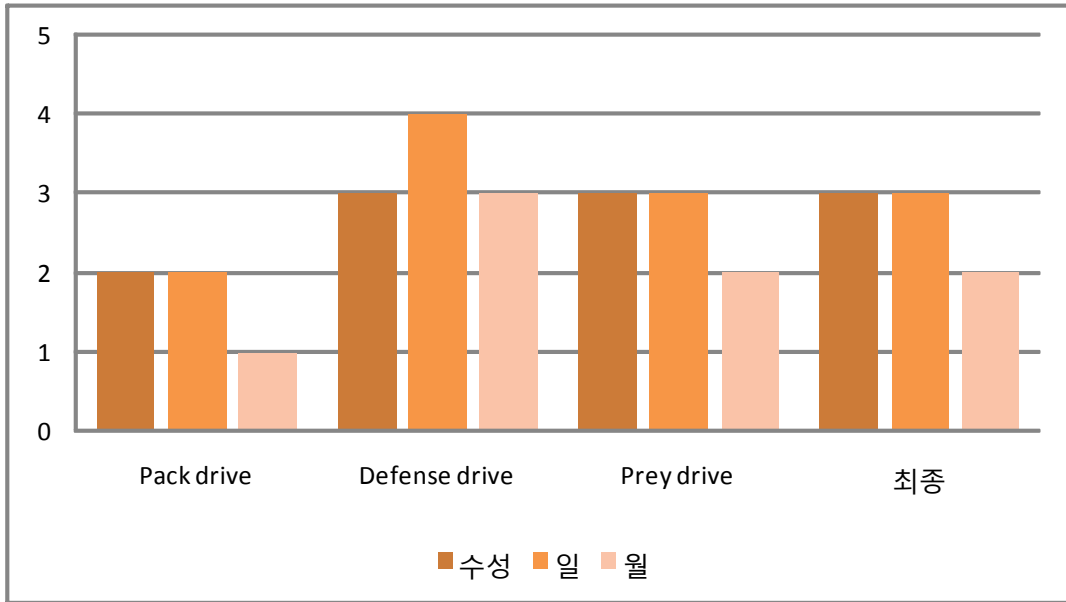


그림 135 원본건 수성과 재복제건 간 유견 훈련 최종 평가 결과

최종적으로 각 개체의 결과를 종합하여 평가한 훈련 적합성 유형의 결과로 볼 때, 수성과 일은 동일한 3형, 월은 2형으로 모두 특수 목적건 훈련에 적합 판정을 받았다. 유견 평가 결과가 없었던 카이저로 인해 수성과 카이저 간 평가 결과를 분석하지 못했던 것에 비해 **수성과 수성 복제건 사이의 유견 평가 결과를 볼 때 복제건 간 평가 결과의 유사성 뿐 아니라 원본건과 그 복제건 간에도 훈련에 필요한 필수 자질에 유사성이 있음을 알 수 있다.**

(나) 2차년도 생산 재복제건 복제건의 자견행동 평가 및 통계학적 분석

원본건인 수성이와 동일한 검역 탐지건 훈련 전 13주령 평가 자료를 사용하였으며, 기존 평가 기준과 동일하게 3점 이상을 합격선으로 설정, 평가하였다. 이 평가 결과를 바탕으로 원본건인 수성의 평가 결과와 비교 분석을 실시하였다.

표 67 13주령 재복제건 탐지건 선발 평가

연번	견명	평가 결과					최종 점수	최종 평가
		먹이자극	환경적응	사회성	보행상태	장애물		
1	일	3.9	3	3.6	3.2	3.5	3.3	적합
2	월	3	3.5	3.7	3.6	3.5	3.4	적합
3	수성	4	3.83	3.83	3.75	4	3.92	적합

13주령 재복제건 탐지건 선발 평가 결과 일 3.3, 월 3.4로 최종 평가 결과 적합으로 검역 탐지건 훈련에 적합한 견으로 판정되었다.

이 결과를 원본건 수성과 비교해 보면 재복제건과 원본건의 최종 점수 차이는 일은 0.62점, 월은 0.5점으로 거의 유사한 수준이며, 모두 적합 판정을 받았다.

5. 2차년도 생산 복제건 재복제건의 훈련성적 분석

가. 연구 수행 방법

훈련 성적은 기존 연구에 이용하였던 검역탐지견 최종 평가를 사용하였으며 검역 탐지견 훈련 교관에 의해 평가를 시행하였다. 평가 장소는 검역 탐지견센터 인근 공항(인천국제공항) 입국장에서 실제 이루어졌으며, 탐지요원 평가 점수 40점, 탐지견 평가 점수 60점, 총점 100점 60점 이상 합격으로 판정하였다. 탐지견에 대한 평가는 탐지 의욕이 30점, 목적물에 대한 반응이 30점이다. 탐지 의욕 배점은 매우 우수(30), 우수(25), 보통(20), 부족(10), 불량(5)이며, 목적물에 대한 반응은 민감성, 관심성, 적극성으로 이루어져 있고 각 10점씩이며, 배점은 매우 우수(10), 우수(8), 보통(5), 부족(3), 불량(1)이 었다.

나. 연구 수행 결과

2015.10월 인천공항 입국장에서 실시한 탐지견 최종 평가 결과는 아래의 표와 같으며, 일은 91점, 월은 88점으로 최종 검역 탐지견 최종 평가에 합격하였다.

표 68 인천공항 입국장에서 실시한 탐지견 최종 평가 결과

구분	탐지 요원	탐지의욕	목적물에대한 반응			총점	결과
			민감성	관심성	적극성		
일	40	매우우수(30)	보통(5)	우수(8)	우수(8)	91	합격
월	40	매우우수(25)	보통(5)	보통(5)	우수(8)	88	합격

제 15 절 복제 검역탐지견(재복제건과 기복제건)의 유전학적 평가 및 분석

1. 탐지능력과 관련된 유전자 지표 발굴을 위한 인지능력 유전자의 polymorphism 비교

가. 연구수행 방법

(1) 복제건의 인지능력 유전자 다형성 분석

(가) 기복제건의 인지능력 및 후각관련 유전자 다형성 분석

① Tyrosine Hydroxylase intron 4

최근의 연구결과에 따르면 아래 그림과 같이 시베리안 허스키 품종에서 활동성, 충동성 그리고 부주의성의 성격이 개에서 Tyrosine hydroxylase 유전자의 다형성과 관련이 되어 있다고 하였다.

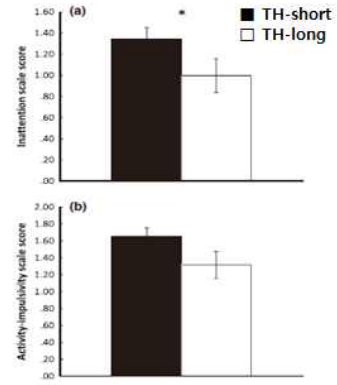
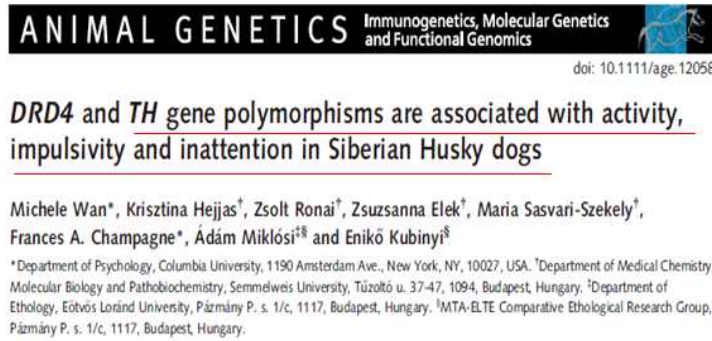


Figure 2 Associations between TH genotype and (a) inattention (M ± SE) scale scores and (b) activity-impulsivity scale scores (M ± SE) from the questionnaire. Siberian Huskies from Europe with two short alleles received significantly higher inattention ratings (P = 0.04) and marginally higher activity-impulsivity ratings (P = 0.05). Model-fitted values account for sex, age and owner identity. *P-value < 0.05.

그림 136 시베리안 허스키 품종에서의 TH유전자 다형성의 활동성, 주의성과의 상관관계

이 외에도 품종에 따라서 이 유전자의 다형성의 분포 차이가 있는 것으로 알려져 있으며 이는 늑대와 개의 진화에도 관련이 되어 있다고 하였다. 특히 이 유전자의 Intron부위의 길이에 대해서는 염기 서열의 길이가 4 base pair에서 36 base pair까지 품종별로 차이가 있기 때문에 이러한 길이의 차이를 통해 같은 품종 내에서 동일한 특성을 지닌 개에서 유전자 다형성의 비교가 중요하다.

본 연구의 수행을 위해 tyrosine hydroxylase 유전자의 4번째 intron에서 primer는 Forward primer : 5'-GTCTGTCTGCTGTCTGGCTCCC-3'와 Reverse primer는 5'-TGGAGAGGCTTCCTGACACCC-3'를 이용하였다. 증폭시키고자 하는 유전자의 프라이머를 준비하고 PCR mixture를 만든다. 튜브를 준비하여 각각의 조성표대로 tube에 넣어준다. 기 복제건의 분석을 위해 세포를 제공한 대니와 카이저의 Jugular vein에서 혈액을 1ml 가량 채취하고 대니와 카이저의 세포를 이용하여 복제된 젠, 페브, 마치, 그리고 수성, 금성, 지구, 화성, 목성, 토성, 천왕성의 jugular vein에서 혈액을 동량 채취하여 주형이 되는 DNA를 추출한다. 2.5 mM dNTP와 10X pfu buffer 5 ul 씩 넣는다. 그리고 template이 되는 각 개체의 DNA, Forward primer, Reverse primer를 각각 1ul씩 넣는다. Taq polymerase와 MgSO4를 1ul씩 넣는다. 마지막으로 DW 35 ul를 넣고 잘 섞어준다. 조성이 위와 같이 완성되면 PCR기계를 이용하여 95 °C에서 15분간 Denaturation시켜주고 Annealing temperature를 65 °C로 하여 PCR을 진행한다. 72 °C

에서 1분간 Extension하는 반응을 35회 반복하고 증폭된 산물을 전기영동을 하여 밴드의 크기를 관찰한다.

② Dopamine beta-Hydroxylase

이 유전자 또한 최근 주의력 및 집중력등과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 특히 주의력 결핍 과잉행동 증후군을 앓고 있는 아동의 유전자 검사에서 이 유전자의 다형성이 특이적으로 있는 것이 밝혀졌다. 개에서는 이 유전자 또한 도파민성 신경전달물질의 유전자 중 하나로서 품종간에 다형성의 분포 차이가 있는 것으로 알려져 있다. Dopamine beta-hydroxylase의 작용에 의해서 도파민은 노르에피네프린으로 변화한다. 아래와 같은 메카니즘으로 인해 Tyrosine부터 Epinephrine까지 변화하게 된다. 이 메카니즘의 중간에 발생하는 도파민은 인지능력과 운동 기능을 조절하는 것 외에 주의 집중력을 조절하는 것으로 알려져 있다.

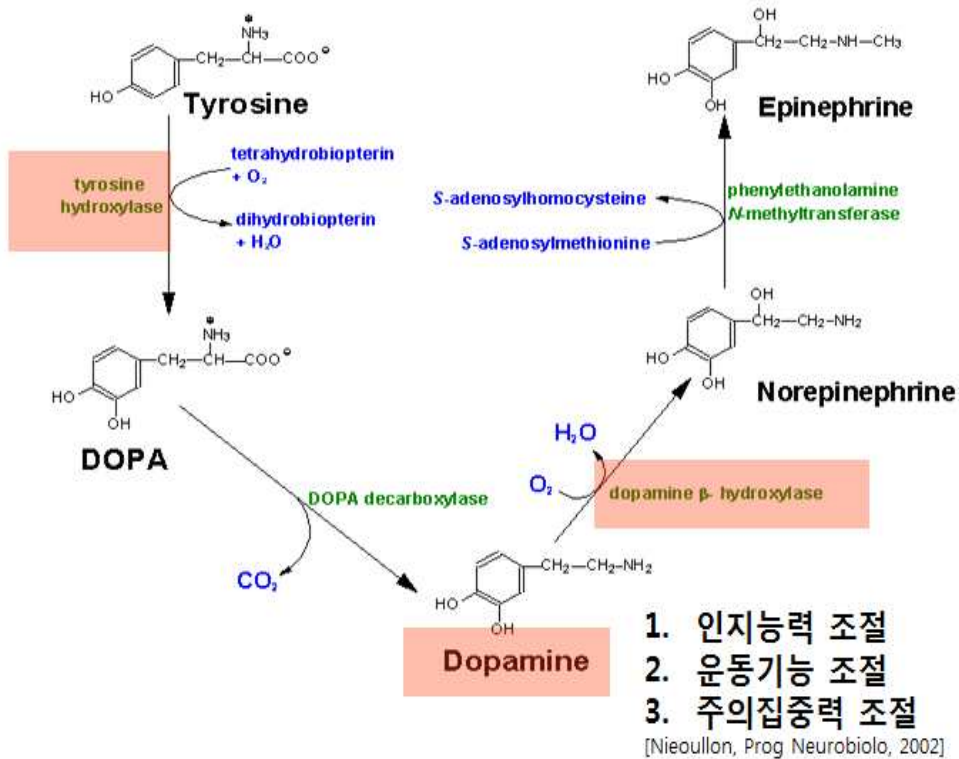


그림 137 타이로신-도파민-에피네프린 등 신경전달물질의 메카니즘

본 연구의 수행을 위해 tyrosine hydroxylase 유전자의 4번째 intron에서 primer는 Forward primer : 5'-CCCCTCACCTCCAAGCA-3'와 Reverse primer는 5'-AGGGTGATGTGGGCAGGAT-3'를 이용하였다. 증폭시키고자 하는 유전자의 프라이머를 준비하고 PCR mixture를 만든다. 튜브를 준비하여 각각의 조성표대로 tube에 넣어준다. 2.5 mM dNTP와 10X pfu buffer 5 ul 씩 넣는다. 그리고 template이 되는

각 개체의 DNA, Forward primer, Reverse primer를 각각 1ul씩 넣는다. Taq polymerase와 MgSO₄를 1ul 씩 넣는다. 마지막으로 DW 35 ul를 넣고 잘 섞어준다. 조성이 위와 같이 완성되면 PCR 기계를 이용하여 95 °C에서 15분간 Denaturation시켜주고 Annealing temperature를 53 °C로 하여 PCR을 진행한다. 72 °C에서 1분간 Extension하는 반응을 35회 반복하고 증폭된 산물을 전기영동을 하여 밴드의 크기를 관찰한다.

(나) 재복제건의 인지능력 및 후각관련 유전자 다형성 분석

① Tyrosine Hydroxylase intron 4

본 연구의 수행을 위해 tyrosine hydroxylase 유전자의 4번째 intron에서 primer는 Forward primer : 5'-GTCTGTCTGCTGTCTGGCTCCC-3'와 Reverse primer는 5'-TGGAGAGGCTTCCTGACACCC-3'를 이용하였다. 증폭시키고자 하는 유전자의 프라이머를 준비하고 PCR mixture를 만든다. 튜브를 준비하여 각각의 조성표대로 tube에 넣어준다. 재복제건의 분석을 위해 세포를 제공한 대니와 카이저의 Jugular vein에서 혈액을 1ml 가량 채취하고 복제건의 세포를 이용하여 재복제된 에이프릴, 메이, 준, 줄라이, 수성, 일, 월의 jugular vein에서 혈액을 동량 채취하여 주형이 되는 DNA를 추출한다. 2.5 mM dNTP와 10X pfu buffer 5 ul 씩 넣는다. 그리고 template이 되는 각 개체의 DNA, Forward primer, Reverse primer를 각각 1ul씩 넣는다. Taq polymerase와 MgSO₄를 1ul 씩 넣는다. 마지막으로 DW 35 ul를 넣고 잘 섞어준다. 조성이 위와 같이 완성되면 PCR기계를 이용하여 95 °C에서 15분간 Denaturation시켜주고 Annealing temperature를 65 °C로 하여 PCR을 진행한다. 72 °C에서 1분간 Extension하는 반응을 35회 반복하고 증폭된 산물을 전기영동을 하여 밴드의 크기를 관찰한다.

② Dopamine beta-Hydroxylase

본 연구의 수행을 위해 tyrosine hydroxylase 유전자의 4번째 intron에서 확립된 프라이머를 이용하여 분석한다. DNA는 위와 마찬가지로 대니와 카이저 외에 재복제건에 해당되는 에이프릴, 메이, 준, 줄라이, 수성, 일, 월의 jugular vein에서 혈액을 1ml씩 추출하여 주형이 되는 DNA를 추출한다. 2.5 mM dNTP와 10X pfu buffer 5 ul 씩 넣는다. 그리고 template이 되는 각 개체의 DNA, Forward primer, Reverse primer를 각각 1ul씩 넣는다. Taq polymerase와 MgSO₄를 1ul 씩 넣는다. 마지막으로 DW 35 ul를 넣고 잘 섞어준다. 조성이 위와 같이 완성되면 PCR 기계를 이용하여 95 °C에서 15분간 Denaturation시켜주고 Annealing temperature를 53 °C로 하여 PCR을 진행한다. 72 °C에서 1분간 Extension하는 반응을 35회 반복하고 증폭된 산물을 전기영동을 하여 밴드의 크기를 관찰한다.

나. 연구수행 결과

(1) 복제견의 인지능력 유전자 다형성 분석

(가) 기복제견의 인지능력 및 후각관련 유전자 다형성 분석

① Tyrosin Hydroxylase intron 4

기복제견의 유전자 분석을 위하여 세포를 제공한 대니와 잰, 페브, 마치의 Tyrosine Hydroxylase에 대한 유전자 다형성을 비교 분석하였다. 염기서열 분석시 대니의 세포를 이용하여 생산된 복제견 간의 네 번째 인트론의 유전자 서열은 모두 동일한 것으로 확인되었다. 특히 **대니와 대니의 복제견의 TH 네 번째 인트론의 유전자 형은 1/2에 해당되었으며 염기서열의 100% 일치성과 함께 모두 같은 유형의 유전자형을** 나타냈다. 또한 다른 공여세포를 제공한 카이저와 카이저의 복제견을 대상으로도 동일한 방법으로 이 유전자의 인트론 부위를 분석하였다. 카이저와 대니는 Tyrosine hydroxylase intron 4의 염기서열 반복부위의 길이가 다르게 나타났다.



그림 138 대니 및 대니복제견 TH유전자의 전기영동 결과

염기서열 분석시 카이저의 세포를 이용하여 생산된 복제견 (수성, 금성, 지구, 화성, 목성, 토성, 천왕성) 간의 네 번째 인트론의 유전자 서열은 모두 동일한 것으로 확인되었다. 특히 **카이저와 카이저의 복제견의 TH 네 번째 인트론의 유전자 형은 1/1에 해당되었으며 염기서열의 100% 일치성과 함께 모두 같은 유형의 유전자형을** 나타냈다.

Dog	ID
Donor	Kaiser
Cloned dog	수성
Cloned dog	금성
Cloned dog	지구
Cloned dog	화성
Cloned dog	목성
Cloned dog	토성
Cloned dog	천왕성

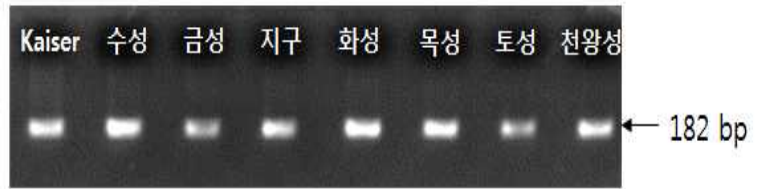


그림 139 카이저 및 카이저복제견 TH유전자의 전기영동 결과

② Dopamine beta-Hydroxylase

기복제견의 유전자 분석을 위하여 세포를 제공한 데니와 쟈, 페브, 마치의 Dopamine beta-Hydroxylase (DBH) 의 유전자 다형성을 PCR 및 Sequencing을 통해 비교 분석하였다. 전기 영동상의 밴드 확인 결과에서 체세포 제공견인 데니와 쟈, 페브, 마치의 밴드 크기가 동일한 것을 확인하였으며 Sequencing을 통한 염기서열 분석시 데니의 세포를 이용하여 생산된 복제견 간의 DBH 유전자 네 번째 인트론의 유전자 서열은 모두 동일한 것으로 확인되었다. 특히 **데니와 데니의 복제견의 DBH 네 번째 인트론의 유전자 형은 1/3에 해당되었으며 염기서열의 100% 일치성과 함께 모두 같은 유형의 유전자형**을 나타냈다.

Dog	ID
Donor	Danny
Cloned dog	Jan
Cloned dog	Feb
Cloned dog	March

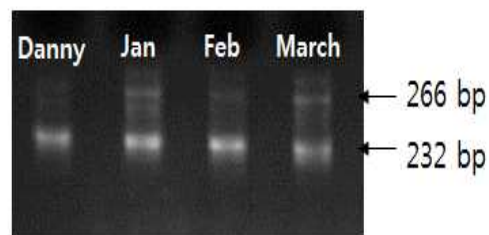


그림 140 데니 및 데니복제견 DBH유전자의 다형성 분석을 위한 전기영동 결과

또한 다른 공여세포를 제공한 카이저와 카이저의 복제견을 대상으로도 동일한 방법으로 이 유전자의 인트론 부위를 분석하였다. **카이저와 데니는 DBH intron 4의 염기서열 반복부위의 길이가 동일하게 나타났으며 유전자 염기서열 또한 동일하게 나타냄으로서 카이저와 데니를 구분할 수 있는 다형성을 나타내지 않았다.**

Dog	ID
Donor	Kaiser
Cloned dog	수성
Cloned dog	금성
Cloned dog	지구
Cloned dog	화성
Cloned dog	목성
Cloned dog	토성
Cloned dog	천왕성

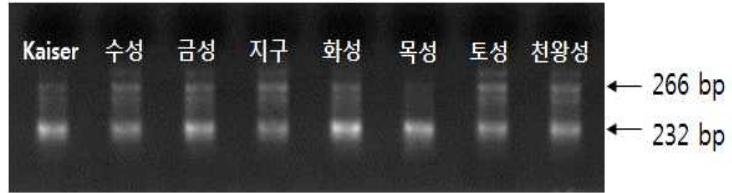


그림 141 카이저 및 카이저복제건 DBH유전자의 다형성 분석을 위한 전기영동 결과

(나) 재복제건의 인지능력 및 후각관련 유전자 다형성 분석

① Tyrosin Hydroxylase intron 4

재복제건의 유전자 분석을 위하여 세포를 제공한 대니와 재복제건인 에이프릴, 메이, 준, 줄라이의 Tyrosin Hydroxylase에 대한 유전자 다형성을 비교 분석하였다. 염기서열 분석시 대니의 세포를 이용하여 재복제되어 생산된 **복제건 4두간의 네 번째 인트론의 유전자 서열은 모두 동일한 것으로 확인**되었다. 특히 대니와 재복제건의 TH 네 번째 인트론의 유전자형은 1/2에 해당되었으며 염기서열의 100% 일치성과 함께 모두 같은 유형의 유전자형을 나타냈다.

Dog	ID
Donor	Danny
Recloned dog	April
Recloned dog	May
Recloned dog	June
Recloned dog	July

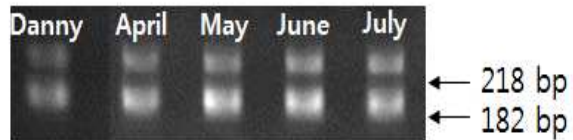


그림 142 대니와 대니재복제건의 TH유전자 전기영동 결과

또한 다른 공여세포를 제공한 카이저와 카이저의 복제건, 재복제건을 대상으로도 동일한 방법으로 이 유전자의 인트론 부위를 분석하였다. **카이저와 대니는 기본적으로 Tyrosine hydroxylase intron 4의 염기서열 반복부위의 길이가 다르게 나타났다.**

Dog	ID
Donor	Kaiser
Cloned dog	수성
Recloned dog	일
Recloned dog	월

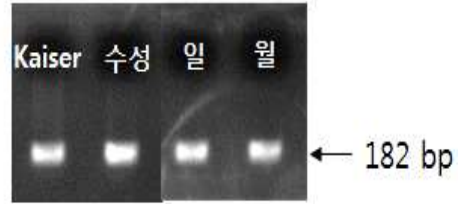


그림 143 카이저와 카이저재복제건의 TH유전자 전기영동 결과

염기서열 분석시 카이저의 세포를 이용하여 생산된 복제건 (수성), 재복제건 (일, 월) 간의 네 번째 인트론의 유전자 서열은 모두 동일한 것으로 확인되었다. 특히 **카이저와 카이저의 복제건, 카이저 재복제건의 TH 네 번째 인트론의 유전자형은 1/1에 해당되었으며 염기서열의 100% 일치성과 함께 모두 같은 유형의 유전자형을 나타냈다.**

② Dopamine beta-Hydroxylase

탐지능력과 관련이 있는 객관적 지표 유전자의 상관관계 분석을 위해 세포 공여건과 재복제건의 DBH 유전자의 다형성 분석을 위하여 세포를 제공한 대니와 재복제건인 에이프릴, 메이, 준, 줄라이의 Tyrosin Hydroxylase에 대한 유전자 다형성을 비교 분석하였다. 위의 방법과 같이 PCR을 통해 증폭된 산물을 전기 영동상에 30분간 실시하여 밴드의 나타나는 양상이 비슷함을 확인하였다. 아래의 그림에서 보는 것과 같이 밴드의 두께에 일부 차이가 있는 부분이 있어 복제건간의 CNV등을 고려하여 가장 굵게 동일하게 나온 232bp 크기의 밴드를 분리하여 염기서열 분석을 실시하였으나 DBH 유전자의 인트론 부분의 염기서열은 대니와 재복제된 4두간에 모두 동일한 것으로 확인되었다. 특히 대니와 재복제건의 DBH 유전자의 네 번째 인트론의 유전자형은 1/3에 해당되었으며 염기서열의 100% 일치성과 함께 모두 같은 유형의 유전자형을 나타냈다.

Dog	ID
Donor	Danny
Recloned dog	April
Recloned dog	May
Recloned dog	June
Recloned dog	July

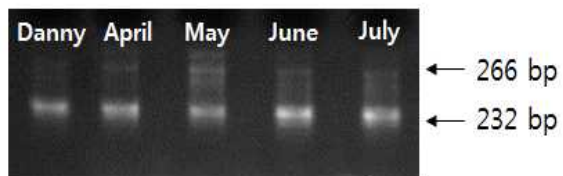


그림 144 대니와 대니재복제건의 DBH 유전자 전기영동 결과

또한 대니와 유전적으로 완전히 다른 세포를 지닌 개체를 대상으로 한 실험을 진행하

였다. 2차년도 공여세포를 제공한 카이저와 카이저의 복제견, 재복제견을 대상으로도 동일한 방법으로 이 DBH 유전자의 인트론 4번째 부위의 염기서열을 분석하였다. 카이저와 대니는 밴드의 패턴 양상으로 확인하였을 때 DBH 유전자의 Intron 4의 인트론 길이가 동일함을 확인할 수 있었다. 특히 sequencing을 통한 염기서열 반복부위의 염기서열이 완전히 동일하게 나타났다. 염기서열 분석시 카이저와 카이저의 세포를 이용하여 생산된 복제견 (수성), 재복제견 (일, 월) 간의 네 번째 인트론의 유전자 서열은 모두 동일한 것으로 확인되었다. 특히 **카이저와 카이저의 복제견, 카이저 재복제견의 DBH 네 번째 인트론의 유전자형은 1/3에 해당되었으며 염기서열의 100% 일치성과 함께 모두 같은 유형의 유전자형을** 나타냈다.

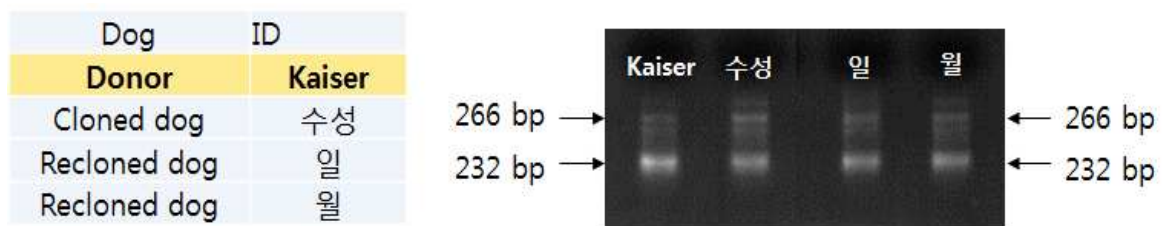


그림 145 카이저와 카이저재복제견의 DBH유전자의 전기영동 결과

2. 탐지능력과 관련된 유전자의 객관적 지표 발굴을 위한 복제견의 주의 집중력 평가

가. 연구수행 방법

(1) 복제견 및 재복제견의 주의 집중력 평가

(가) 주의력 평가를 위한 설문지

탐지 능력 중 중요한 항목 중 하나는 탐지하고 있는 물체에 관한 집중력이다. 신경발달 장애 중 사람에서는 주의집중력 결핍 증후군의 경우 집중력 저하 및 충동증상, 과활동성 등으로 나타난다. 주로 주변의 부모 및 교육을 받기 시작하면서 선생님에 의해 진단이 되는데 이러한 주의집중력의 경우 사회성 결핍과도 관련이 되는 것으로 알려져 있다. 특히 최근에 쌍둥이 연구를 통해 유전적인 영향이 있음을 확인하였다.

주의력 결핍 연구를 위한 적절한 모델 동물은 여러 측면에서 요건을 만족해야 한다. 특히 사람에서 나타나는 행동학적 특징을 보여야 하며 이론적으로 행동에 대해 설명이 가능한 합리성을 지녀야 하며 생물학적 특성과 행동을 예측할 수 있는 효용성이 있어야 한다. 특히 가장 중요한 부분은 시간이 지남에 따라 충동적인 행동을 보여야 하고 일시적으로 있는 공간에 대한 자극에 대해 주의력을 지니지 못하며 익숙한 환경에서 시간이 지남에 따라 과한 행동이 나타나야 한다.

최근 들어 개과 동물이 주의력을 평가하기 위한 모델 동물로 제시되고 있으며 주의 집중력 또한 물체를 탐지하는데 있어서 중요하기 때문에 적절한 모델 동물로 제시되고 있다. 따라서 개의 집중력을 평가하는 방법에 대한 연구도 진행되고 있다. 따라서 주의력 평가를 위한 설문지의 확립을 위해 참조문헌을 통하여 확립하였다.

표 69 주의집중력 및 활동성 평가를 위한 설문지 항목

No.	항목	절대 그렇지 않다	가끔씩 그렇다	종종 그렇다	항상 그렇다
1At	훈련 시 어려움이 많으며 주위가 산만하거나 주변의 다른 물체 (또는 소리, 사람)로 인해서 훈련에 집중을 하지 못한다.	0	1	2	3
2At	주의를 끌기에는 쉬우나 쉽게 흥미를 잃어버린다.	0	1	2	3
3At	훈련 또는 놀이에 집중하는 것이 힘들다	0	1	2	3
4Hy	특정 장소에서 머무르지 못하고 쉽게 장소를 옮긴다 (케이지 내에서도 이동이 잦다)	0	1	2	3
5Hy	자주 짖으며 쉽게 조용해지지 않는다.	0	1	2	3
6Hy	잠시도 가만히 잊지 않고 돌아다닌다.	0	1	2	3
7At	주변의 소리 또는 훈련교관이 말하고 있을 때 조차 개가 전혀 듣지 않는 것 같다.	0	1	2	3
8Hy	컨트롤하기가 힘들고 앞으로 돌진하거나 덤벼들 때에는 컨트롤하기가 힘들다	0	1	2	3
9Hy	항상 놀거나 뛰어다닌다.	0	1	2	3
10Hy	훈련을 했음에도 불구하고 특정 업무에 대해서 어려워하는 것 같다.	0	1	2	3
11At	업무 또는 결과에 개가 실수를 하는 것이 너무 서둘러서 행동해서 그런 것 같다.	0	1	2	3
12At	집중하고 있더라도 다른 소리 또는 자극을 이용하여 쉽게 집중력을 흐뜨릴 수 있다.	0	1	2	3
13At	스스로를 통제하지 못하여 기다리라는 명령에 복종하지 못한다.	0	1	2	3

사람에서 수행되었던 행동평가 방법은 개에서도 행동을 평가하는데 성공적으로 이용되고 있다. 특히 주의, 집중력을 평가하는데 있어서 개에서 가장 먼저 확립된 방법은 Du Paul ADHD-Rating Scale로서 이는 주의력 결핍 증후군을 평가하는데 있어서 DSM-IV를 기준으로 하고 있으며 크게 두 개의 유형으로 나눌 수 있다. 주의력 결핍 (At)에 대한 것과 과행동 (Hy)으로 나눌 수 있다. 이 방법은 동유럽의 개에서 최근에 증명되었다.

개의 주의집중력 평가를 위한 평가 방법은 Vas에 의해 사람에서 쓰였던 주의집중력의 평가 방법을 변경하여 사용하였다. 많은 항목 중 “보정을 하기 힘들고 행동을 제어하기가 어렵다.”의 항목은 제거되었다. 그 이유는 이 항목의 경우 훈련이나 기구 등에 의해 쉽게 영향을 받기 때문이다. ‘절대 그렇지 않다/가끔씩 그렇다/종종 그렇다/항상 그렇다’의 항목을 0/1/2/3의 점수로 수치화하여 집중력 및 활동성 등을 평가하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 복제건 및 재복제건의 주의 집중력 평가

(가) 대니와 대니 복제건, 재복제건의 주의 집중력 및 활동성 비교

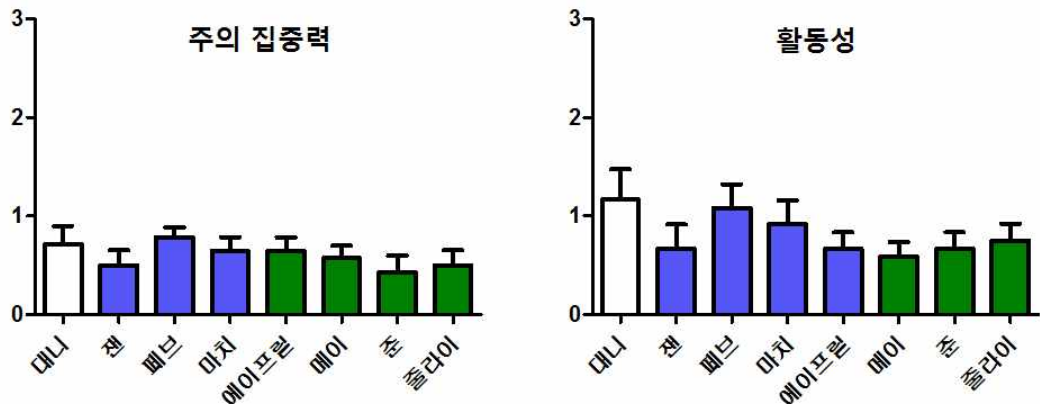


그림 146 대니, 대니복제건, 재복제건의 설문지 평가를 통한 주의집중력 및 활동성 평가

대니의 경우 주의집중력은 0.714점으로 1점 이하의 점수를 얻었으며 대니의 복제건인 젠, 페브, 마치는 0.500, 0.786, 0.643점으로 1점 이하로 대니와 유의적 차이가 없었다. 재복제건인 에이프릴, 메이, 준, 줄라이 또한 주의집중력이 0.643, 0.571, 0.429점 등의 점수로 대니와 유사한 주의 집중력을 나타냈다.

활동성의 경우에는 대니가 1.167의 점수를 나타냈고 젠, 페브, 마치는 0.667, 1.083, 0.917점의 점수로 대니와 유의적인 차이가 없었다. **재복제건 에이프릴, 메이, 준, 줄라이는 0.667, 0.583, 0.667, 0.750의 점수로 활동성에서도 대니와 유의적 차이를 나타내지 않았다.**

(나) 카이저와 카이저 복제건, 재복제건의 주의 집중력 및 활동성 비교

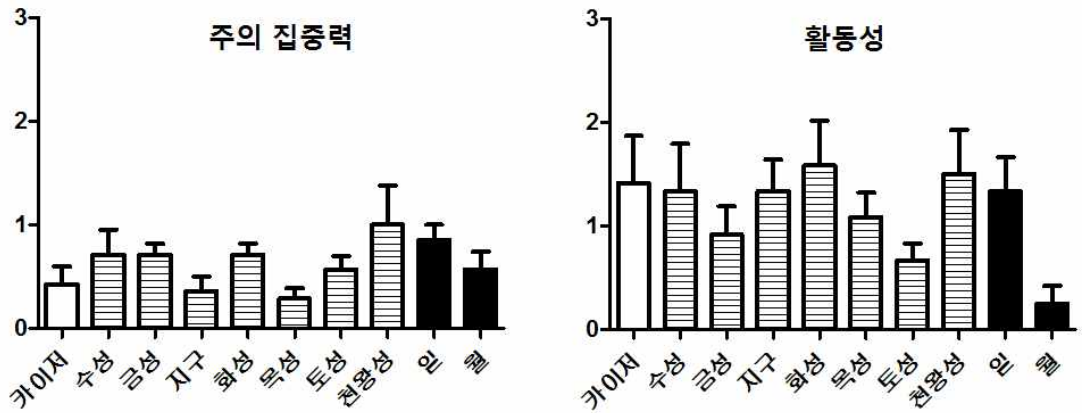


그림 147 대니, 대니복제건, 재복제건의 설문지 평가를 통한 주의집중력 및 활동성 평가

카이저의 경우 주의집중력은 0.429점으로 1점 이하의 점수를 얻었으며 카이저의 복제건인 수성, 금성, 지구, 화성, 목성, 토성, 천왕성은 0.714, 0.714, 0.357, 0.714, 0.286, 0.571, 1점으로 7개의 항목으로 통계학적 분석 결과 카이저의 주의 집중력 점수와 유의적 차이가 없었다. 수성의 세포를 이용하여 생산된 재복제건 일, 월 또한 주의집중력이 0.857, 0.571점 등의 점수로 카이저와 유사한 주의 집중력을 나타냈다.

활동성의 경우에는 원본건인 카이저는 1.417의 점수를 나타냈고 **카이저의 복제건인 수성, 금성, 지구, 화성, 목성, 토성, 천왕성은 1.333, 0.917, 1.333, 1.583, 1.083, 0.667, 1.500점의 점수로 카이저와 유의적인 차이가 없었다. 재복제건 일, 월은 1.333, 0.250의 점수로 활동성에서도 카이저와 유의적 차이를 나타내지 않았다.**

(다) 대니와 카이저 및 복제건의 주의집중력 및 활동성 비교 분석

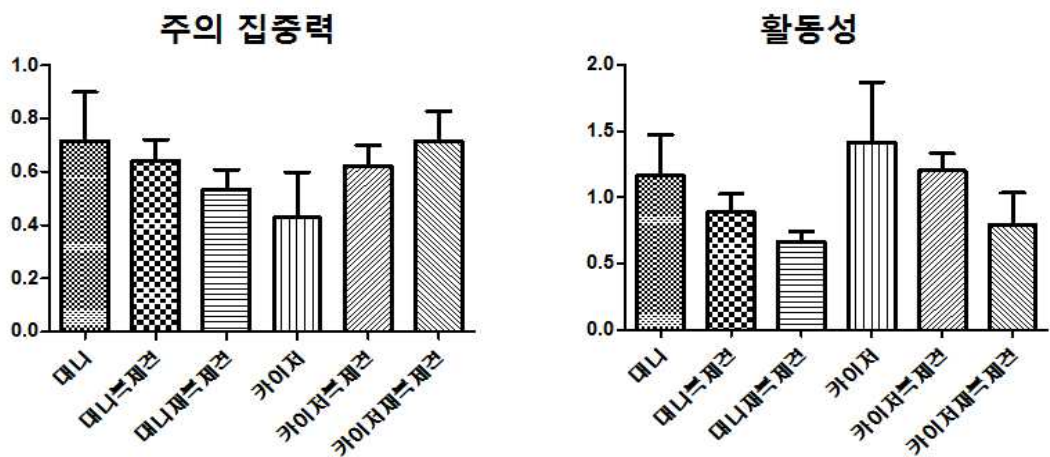


그림 148 원본건, 복제건, 재복제건의 주의집중력 및 활동성 비교평가

대니와 카이저의 주의집중력 점수를 각 복제건, 재복제건의 결과를 모두 통합하여 그들간의 비교분석을 실시하였다. 대니의 주의집중력은 0.714이고 대니 복제건은 0.643

점, 대니 재복제건은 0.536점이다. 그리고 카이저는 0.429, 카이저복제건은 0.622, 카이저 재복제건은 0.714점으로 모두 유의차가 없이 유사한 값을 나타냄으로서 **대니와 카이저 및 그들의 복제건의 주의 집중력은 유사함**을 나타냈다.

그리고 활동성의 점수를 대니와 카이저, 복제건, 재복제건의 결과를 비교하였다. 대니의 활동성은 1.167이고 대니 복제건은 0.889점, 대니 재복제건은 0.667점이다. 그리고 카이저는 1.417, 카이저복제건은 1.202, 카이저 재복제건은 0.792점으로 통계분석 시 유의차가 없었다. 원본건인 카이저와 대니의 경우 1점 이상의 점수를 보였으나 대니 복제건 및 카이저 복제건은 원본건보다 낮은 점수를 나타냈으며 대니재복제건과 카이저 재복제건의 활동성 값이 더 낮은 값을 나타냈다.

제 16 절 복제 검역탐지건 (재복제건과 기복제건)의 영상학적 평가 및 분석; 복제 검역 탐지건의 뇌의 형태학적 평가

1. 프로토콜 확립을 위해 일반 비글건에서의 MRI 촬영 및 volumetric MRI을 통한 영상 형태적 분석

가. 연구수행 방법

vMRI 연구를 위한 최적의 해상도를 가지되 noise를 줄일 수 있는 조건을 찾기 위해 정상 비글건 2마리를 통해 복셀의 크기 및 영상획득 시간 등 촬영변수를 변경하며 여러 회 촬영하였다.

나. 연구수행 결과

복셀의 크기를 0.5, 0.7, 1.0 mm로 설정하여 촬영한 영상을 비교해 보았을 때 voxel size가 작아지면 해상도가 높아지는 반면 noise가 증가하게 된다. 이러한 단점을 극복하기 위해 Voxel size 0.6으로 1차 촬영해보고 voxel size는 0.5로 유지하되 relaxation time을 기존의 21분에서 25분으로 늘여서 2차 촬영하였으며 FOV와 slice thickness는 변경하지 않았을 때 최적의 영상을 획득할 수 있었다.

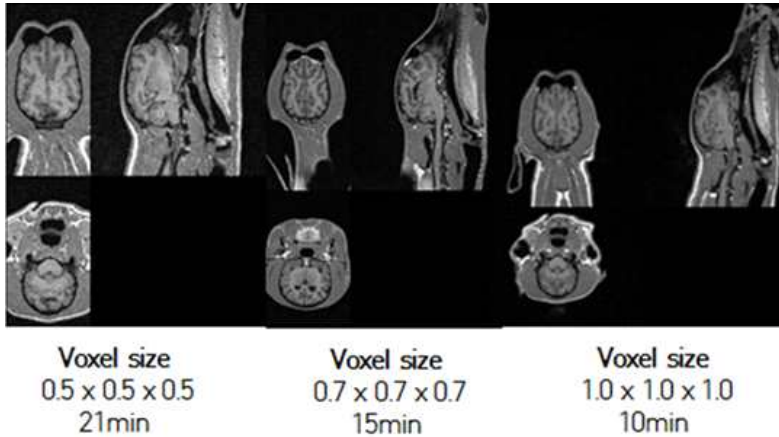


그림 149 복셀 크기 및 획득 시간에 따른 MRI 영상의 비교

2. 복제 검역 탐지건의 MRI 촬영 및 vMRI를 통한 영상 형태적 분석

가. 연구수행 방법

(1) 실험 대상

(가) 촬영 개체는 모두 테니의 복제건인 젠, 페브, 마치, 메이, 준, 줄라이 총 6두와 대조군 10두, 총 16두로 설정하였다.

(나) 모두 신체검사, x-ray 및 초음파를 통해 건강한 개체임을 확인한 후 진행하였다.

(2) 영상 획득 및 분석

(가) 3.0-Tesla MRI (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany)를 이용하여 실험군의 T1 강조 뇌 영상을 획득하였다. 촬영변수는 다음과 같이 설정하였다. (촬영변수 : TR = 1900 ms, TE = 2.26 ms, FOV = 250 x 218.8 mm, matrix size = 215 x 256 mm, slice thickness = 1mm, voxel size = 1mm, scan time = 10min)

(나) CIVET pipe line version 1.19 (MCGill, MNI, Motreal, Canada)를 이용하여 어파인 변환(Affine transformation)과 비선형 등록법(Non-linear registration)을 통해 획득된 영상들은 개체 간 크기, 모양, 방향의 차이를 교정하고, 이 영상들을 평균화 하여 뇌 영상 표본을 제작하였다.

(다) ITK-SNAP version 3.2 (PICSL, UPenn, Penn, USA)를 이용하여 뇌 영상 표본에 인

지 관련 영역(전체 뇌 용적, 대뇌 엽, 소뇌) 및 후각 관련 영역 (후각 망울, 이상 엽, 시상, 소뇌)을 정의하였으며, 이때 뇌 영역은 개의 해부 도보를 참고하여 수작업으로 정의 되었다. (Thompson C.E., Hahn C.,2012. Appendix. In: Veterinary Neuroanatomy; A Clinical Approach, Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp.137-164.)

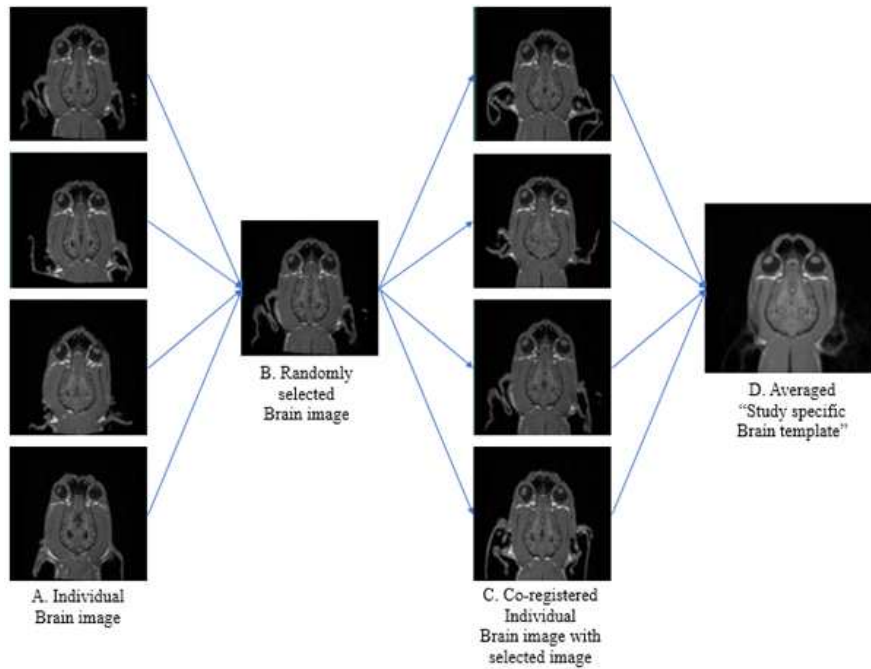


그림 150 뇌 영상 표본 제작 과정

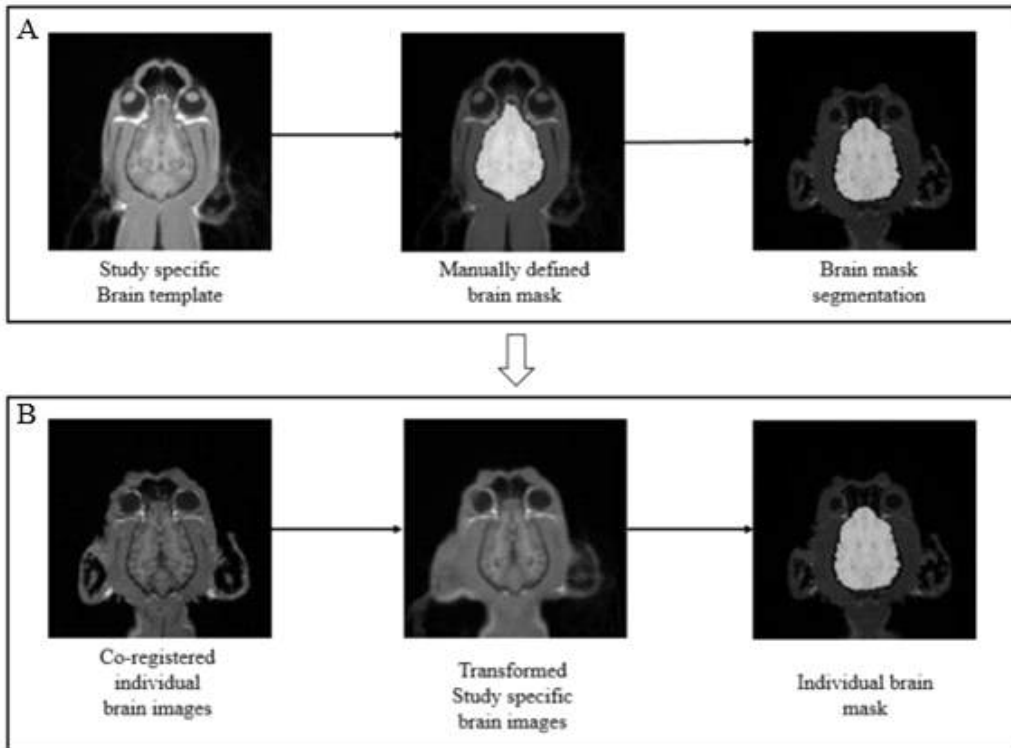


그림 151 뇌 영상 표본으로부터 전체 뇌영역 및 국소 영역을 추출하는 과정

나. 연구수행 결과

(1) 복제 검역 탐지건의 뇌 총 용적 및 국소 뇌 영역의 추출

CIVET pipe line version 1.19 (MCGill, MNI, Motreal, Canada)를 이용하여 각 개체별 뇌 영상과 국소 영역이 정의된 뇌 영상 표본을 상관 정립하여 전체 및 국소 뇌 영역을 추출하였고, 해당하는 영역의 voxel수가 자동적으로 계산되어 각 영역의 부피 값을 구하였으며 대조군과의 비교를 통해 뇌의 어느 부분에서 차이가 있는지 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

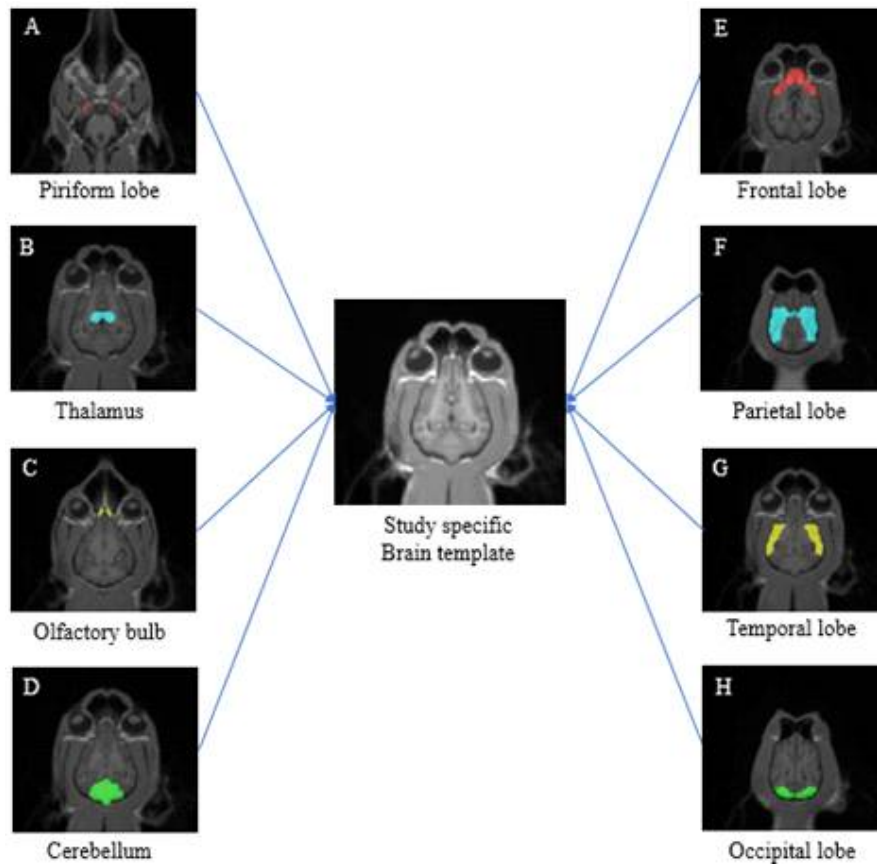


그림 152 인지 및 후각 관련 국소 영역 (A) 이상엽, (B) 시상, (C) 후각 망울, (D) 소뇌, (E) 전두엽, (F) 두정엽, (G) 측두엽, (H) 후두엽

3. 일반 비글견과 복제 검역 탐지견의 vMRI 결과 비교 연구

가. 연구수행 방법

(1) 대조군과 복제 검역 탐지견의 뇌 용적 비교

(가) CIVET 소프트웨어를 이용하여 뇌의 총용적 및 주요 부위인 전두엽, 두정엽, 측두엽, 후두엽, 소뇌, 후각망울, 이상엽, 시상의 부피를 비교한다.

(나) 대조군과 복제 검역 탐지견의 체중차이를 감안하여야 하므로 이를 통제된 통계적 결과를 산출한다. 얻어진 복제견과 대조군의 뇌의 각 부피 값은 SPSS software version 22.0 (SPSS INC., Chicago, IL, USA)를 이용하여 비교 분석하였다. 다음과 같은 항목에 대해 통계가 이루어졌고 본 연구의 유의 수준은 $P < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

- ① Pearson correlation test를 이용한 체중과 뇌의 용적의 상관관계
- ② Analysis of covariance를 이용하여 체중과 뇌의 총 용적을 통제한 후 그룹 간 뇌의 부피값 비교 분석

나. 연구수행 결과

(1) 체중과 뇌의 용적의 상관관계

(가) 체중과 뇌의 각 영역(총 용적, 국소 용적) 간 상관 계수는 0.69 이상으로 높은 양의 상관관계가 존재한다는 것을 확인하였으며, 뇌의 총 용적과 국소 용적사이 상관계수는 0.79 이상으로 역시 높은 양의 상관관계가 존재한다는 것을 확인하였다.

(나) 이는 체중이 많이 나갈수록, 뇌의 총용적 및 국소 용적이 크며, 뇌의 총 용적이 클수록 국소 용적도 크다는 것을 의미한다. 따라서, 본 연구에서 복제견 (체중 kg = 13.1 ± 0.9)과 대조군(체중(kg) = 9.5 ± 2.9)의 체중의 차이가 결과 값에 영향을 줄 수 있으므로, 통계적 방법을 이용하여 체중을 통제한 값을 비교하였다.

(2) 뇌의 총 용적 및 국소 용적 비교 결과

(가) 복제견 그룹의 총 뇌 용적 (평균 \pm 표준편차= $05,155 \pm 1,061$ mm³)은 대조군 그룹 (평균 \pm 표준편차= $77,306 \pm 850$ mm³)에 비해 26% 크다는 것이 확인되었다 (P<0.05). 또한, 국소 영역 비교 분석 시, **복제 견 그룹의 전두엽, 소뇌, 후각망울, 시상의 부피가 대조군에 비해 유의하게 큰 것으로 확인**되었다 (P< 0.05).

(나) 뇌의 부피는 뉴런의 개수 및 밀도, 수초화 정도, 시냅스 구성 등을 간접적으로 반영하는 지표이며 뇌의 기능적 활성 상태를 반영한다. 인의의 연구를 통해 뇌의 총 용적 및 전두엽의 부피와 지능 사이의 양의 상관관계가 밝혀져 있으며, 후각망울의 부피와 냄새 구별 능력, 시상의 부피와 냄새의 학습 및 기억 능력 사이의 상관관계가 밝혀져 있다. 소뇌의 부피와 기능의 관련성에대한 보고는 현재까지 없으나, fMRI 연구를 통해 소뇌가 상위 인지 기능 및 후각기능을 담당하는 것이 밝혀져 있다. 이를 토대로, **복제견의 인지 관련 영역과 후각 관련 영역의 뇌 용적이 크다는 결과는 복제견의 인지 능력 및 후각 능력이 더 우수할 것이라는 가능성을 뒷받침**한다고 볼 수 있다.

(다) 인의의 연구에 따르면, 개인별 뇌의 부피차이는 유전적 배경에 크게 영향을 받는다고 알려져 있다. 그 중에서도 인지관련 영역에 해당되는 전두엽과 소뇌의 부피는 유전적 성향이 강하다고 알려져 있다. 반면, 반복된 학습이나 훈련에 따른 뇌의 부피 변화 역시 보고가 되어있다. 후각망울의 경우 성인기에도 지속적으로 자극에 따라 뉴런의 증식이 1가능한 기관이다. 이를 바탕으로, **복제 견은 우수한 유전적 배경을 바탕으로**

우수한 학습, 인지능력을 나타내며, 후천적 학습의 결과로 인해 후각능력의 우수성을 보인다고 추정해볼 수 있다.

표 70 체중과 뇌의 총 용적이 통제된 부피 값과 공분산 분석 결과

	복제견	대조군	P value
총 뇌 용적	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*

Note. Data are expressed as mean ± standard deviation

NS, Not significant at a level of $P < 0.05$

*Statistical difference ($P < 0.05$) between groups

표 71 체중과 뇌의 용적 간 상관관계

	상관 계수 (r)	
	체중	총 뇌 용적
체중	1.00	0.79
총 뇌 용적	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

<제1세부 위탁: 우수 복제 검역 탐지건 시스템의 실용화 및 산업화>

제 1 절 검역탐지건의 객관적 평가 및 체세포 및 생식 세포 बैं킹을 위한 검역탐지건 공급

1. 최우수 검역탐지건 1두 이상 공급

가. 연구수행 방법

(1) 체세포 1차배양

성체 섬유아세포 확립을 위하여 우수 검역탐지건인 데니의 복부 피부의 털을 제거한 후 채취한 피부조직을 동일한 크기 (1cm *1cm)로 각각 자르고 RCME-P (RNL Bio)과 DMEM 2가지의 배양액으로 조직을 부유시킨다. 배양액 9ml을 넣고 조직을 부유시킨 다음 가라앉는 조직 이외의 상층액은 제거하는 방법으로 조직 내의 불순물을 제거한다. 이러한 과정을 3회 이상 반복하여 제거하고 1,500 rpm에서 2분간 원심분리를 실시한다. 원심 분리 이후 조직을 RCME-P과 DMEM 배양액에 띄워준 다음 일차 배양을 시작 한다. 일차 배양 이후 세포들이 조직에서 뺏어나오기 시작하면 3내지 5일 간격으로 배지를 교환하고, 컨플루언시에 도달하면 0.1% 트립신/0.02% EDTA를 사용하여 3분간 처리하고 플라스틱 배양접시에서 세포가 분리된 양상을 확인 후 동결배지를 사용하여 -196 °C의 액체질소 내에서 동결 저장한다. 상기 동결배지는 10% (v/v) DMSO 가 첨가된 90% (v/v) FBS를 이용하여 동결하여 실험에 이용하기 전까지 보관한다.

나. 연구수행 결과

(1) 우수검역 탐지건 데니 세포주 확립

우수 검역건 데니의 복제 생산을 위하여 세포주를 확립하였다. 현재까지 다양한 조직 중 피부 유래의 성체 섬유아세포를 흔히 사용하고 있으나 보다 효율적인 생산을 위해 2가지의 다른 배양액을 이용하여 섬유아세포를 확립하였다. 결과는 아래 기술하였다.

우수 검역건 데니(11세, 수컷, 비글)의 피부조직으로부터 2가지의 다른 배양액을 이용하여 각각 확립되었다. 확립된 세포는 RCME-P에서 유래된 세포는 0계대에서 5 x10⁵ cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 8개로 각각 동결되었고, DMEM에서 유래된 세포는 0계대에서 5 x10⁵ cells/ml 농도로 1.5ml 동결 튜브 5개로 각각 동결되어 세포의 이용 전까지 액체질소에서 보관하였다. 동일한 조직에서 유래된 세포이지만 컨플루언시에 도달하기 까지의 시간이 두 다른 배지를 사용하였을 때 차이가 있었고 RCME-P를 사용

한 배지가 더 빠른 시일내에 컨플루언스에 도달하였으며 세포의 증식이 활발하였다.

2. 탐지견의 객관적 지표를 도출하기 위한 최우수그룹 3 두와 일반 그룹 3 두의 검역 탐지견의 공급

가. 연구수행 방법

활동 중인 탐지견의 자질을 아래와 같은 항목에 따라 각 1~5 점으로 평가한 후, 우수와 비우수 그룹으로 나누어, 유전학적 및 영상학적 행동학적 객관적 지표 마련을 위하여 1 세부에 검역견을 공급한다.

- ① 후각이 얼마나 예민한가? (acuity of sense of smell)
- ② 보이지 않는 물건을 찾으려는 욕구가 강한가?(incentive to find an object which is out of sight)
- ③ 건강 상태는 양호한가? (health)
- ④ 단독으로 탐지하려는 경향이 강한가? (tendency to hunt by smell alone)
- ⑤ 체력은 강한가? (stamina)
- ⑥ 보상먹이에 의해 잘 훈련되고, 관심이 많은가? (ability to learn from being rewarded)
- ⑦ 탐지할 때 산만하지 않고 집중하는가? (tendency to be distracted when searching)
- ⑧ 민첩하게 탐지하는가? (agility)
- ⑨ 매일 행동이 일정하게 유지되는가? (consistency of behaviour from day to day)
- ⑩. 물건을 쫓으려는 동기가 강한가? (motivation to chase an object)

나. 연구수행 결과

우수견과 비우수견을 공급하기 위하여 앞에서 제시한 평가 항목을 가지고 조사를 한후, 평균을 내어 점수화하였다. 그후 상위 그룹과 하위 그룹으로 나누어 우수그룹과 비우수 그룹을 아래와 같이 작성하였다.

표 72 우수견 그룹

구분	견 명	순위	평점
1	카이저	1	4.96
2	제로	2	4.84
3	데니	3	4.83
4	베이스	4	4.46
5	코란	5	4.43
6	실버	6	4.14
7	브라운	7	4.08
8	남이	8	3.92
9	파랑	9	3.88
10	샤크	10	3.84
11	폴리	11	3.81
12	노랑	12	3.49

표 73 비우수견 그룹

구분	견 명	순위	평점
1	카이저	15	3.27
2	헤시	15	3.05
3	산	17	2.7
4	머드	19	2.6
5	태산	22	2.52
6	낙동	23	2.5
7	태양	24	2.5
8	아더	25	2.43

※ 다음과 같은 이유로 초록, 마샬, 헤미, 미키는 제외

- 우수견 그룹에 속해있던 초록이는 훈련을 조금 더 진행한결과 우수견에서 탈락
- 이 설문내용이 현장에 나간 경험없는 개체들을 평가하기에는 부적절하여, 비우수견으로 분류된 개체 중 현장에 나간적 없는 마샬, 헤미, 미키, 메기는 제외.

제 2 절 복제견의 집중훈련 시 복제견 및 후보견 간의 훈련결과를 행동학적 객관적 지표를 이용 비교 분석

1. 1세부에서 생산한 복제견을 이용하여 단계적이고 체계적인 훈련을 통한 결과 분석

가. 연구수행 방법

1세부에서 생산된 복제개는 생후 4 ~ 12 주까지는 검역탐지견 센터의 시설물을 활용하여 실질적인 현장적응을 위한 탐지 훈련을 진행하였다. 아래 그림과 같이 인천공항 입국장 (CIQ)에서 실제 탐지훈련을 놀이로 훈련 대상이 인지를 할 수 있도록 진행하였으며 탐지대상을 적발하기 위한 항공편은 주로 일본, 중국, 인도네시아, 태국 등의 아시아국을 위주로 하여 목적물 및 비목적물에 대한 탐지훈련놀이를 진행하였다. 특히 실제 임무를 수행하기 위한 장소인 인천공항 입국장에서의 탐지 훈련은 실내탐지 훈련장의 문제점을 보완, 교정할 수 있는 훈련도 같이 병행되었다. 움직이는 컨베이어 벨트 및 높은 곳에 위치한 탐지대상 물품 탐지 및 적발 표현에 대한 훈련을 중점적으로 실시하였다. 이러한 훈련을 지속적으로 일정하게 실시함에 따라 탐지 놀이에 대한 행동 반응을 강화시킬 수 있도록 하였으며 목적물에 대해서는 정적강화, 비목적물에 대해서는 부적강화 반응을 유도하였다.



그림 153 인천공항 입국장 (CIQ)에서 실제 탐지훈련을 놀이

공항에서 임무 수행 시 다양한 환경에 대한 적응력을 키우기 위해 사회화 훈련을 병행하였다. 인천공항 시설물에 대한 적응 훈련으로 각종 홍보시설물, 수하물 처리장, 램프장, 케로셀, 컨베이어 벨트 등에서 이루어졌다. 또한 각국을 오가는 다양한 국적의 여행객 및 각 공항내 여러기관의 종사자에 대한 적응 훈련을 실시하였으며 당시 복제 검역 탐지견에 대해 사람들이 대하는 태도에 대한 적절한 보호도 같이 진행하였다.

< 복제견 훈련을 위한 체계도 >



나. 연구수행 결과

표 74 복제검역 탐지견의 유견 적성평가 변화 분석

개체명	연령	유형
Jan	16 주령	3
Feb	8-10 주령	3
	16 주령	3
March	8-10 주령	3
	16 주령	3

복제 탐지견 3 두의 사회화 훈련을 4 주 이후에 시작하고 8 주 간격으로 유견적성평가를 실시하여 훈련으로 인한 복제 탐지견의 행동 변화를 관찰하였다. 복제견 Feb, March는 사회화 훈련을 시작하고 행동 패턴의 변화가 크게 나타나지 않았으며 모두 Type 3으로 나타났다. 유견으로서의 적성 평가는 사회화 훈련을 통해 변화하지 않는 것으로 여겨지며 Type 3의 경우 아래와 같이 해석할 수 있다. 그 해석법은 전형적인 PAT; Puppy Aptitude Test 해석과 탐지견훈련센터 평가 매뉴얼을 참조하였다 (Melissa Bartlett, 1979).

▶ Type III) 이 개는 사람을 리더로 쉽게 받아들임. 보통의 주인에게 최고의 개이며 비록 너무 활동적인 경향이 있기는 하지만 모든 상황에 잘 적응하고 어린이나 노인과도 일반적으로 잘 지냄. 복종 훈련에 매우 잘 반응하고 일반적으로 생명체에 잘 적응함 (기능적으로 적합).

따라서 생산된 복제견 3두는 모두 유견평가 적성 테스트에서 검역 탐지견으로서 적합한 것으로 나타났으며 훈련을 통하여 그러한 적성 평가는 변화하지 않는다는 결론을 내렸다. 또한 생산된 복제견 3두는 모두 유견평가 적성 테스트에서 검역 탐지견으로서 적합한 것으로 나타났으며 훈련을 통하여 그러한 적성 평가는 변화하지 않는다는 결론을 내렸다. 또한 훈련을 진행함에 있어서 적극성, 환경에 대한 적응성, 쾌활성, 보상먹이와 탐지 물품에 대한 관심도, 목적물과 비목적물 구별능력, 반응의 지속성 등을 1점 매우 소극적, 2점 소극적, 3점 보통, 4점 활발, 5점 매우 활발의 다섯 단계로 점수화하여 훈련일지를 지속적으로 기록하였으며 훈련 일지의 데이터 일부를 그래프화 하였다. Jan, Feb, March 3두 모두 평균적으로 2~3점 정도의 일정한 점수를 받으며 균일한 행동패턴 양상이 지속적으로 관찰되었다.

2. 복제견의 현장훈련 및 선발평가

가. 연구수행 방법

복제 검역 탐지견 3두의 10개월 령에 선발평가를 실시하였다. 선발평가에 있어서 1차년도에 확립한 선발평가 프로토콜을 기준으로 하여 각 항목에 대해 평가하였다.

<탐지견 평가표(60점)>

구 분	탐지의욕	목적물에 대한 반응		
		민감성	관심성	적극성
매우우수(60점)	30	10	10	10
우수(49점)	25	8	8	8
보통(35점)	20	5	5	5
부족(19점)	10	3	3	3
불량(8점)	5	1	1	1

<탐지요원 평가표(40점)>

내 용	점수	내 용	점수
○ 탐지업무 투입 전 핸들러의 자세 및 탐지건의 상태 컨디션 체크의 상실	4	○ 탐지 시 승객에게 거부감을 줌	4
○ 탐지순서가 바르지 않고 유연하게 탐지 시키지 못함	4	○ 탐지대상 물품을 빼먹고 탐지를 함	4
○ 견줄의 취급이 부적절하여 탐지업무에 방해를 줌	4	○ 오반응을 보일때 적절한 대처능력부족	4
○ 탐지업무중 적절한 명령어 사용 부족	4	○ 보상타월을 사용하는 경우 타월놀이 요령부족으로 탐지건이 흥미를 가지지 못함	4
○ 탐지건 반응에 핸들러의 적절한 대처능력 부족	4	○ 탐지건 반응에 대한 사후처리 부족	4

평가는 아래와 같은 기준에 의해 실시하였다.

- ① 탐지건평가 60점, 탐지요원 평가40점, 총100점으로 한다.
- ② 합격점수는 60점이고 기준에 도달되지 않는 개는 그 시점에서 훈련을 중단하고 이후의 탐지훈련으로 진행시키지 않는다.
- ③ 탐지건은 탐지의욕이 가장중요하기 때문에 매우우수, 또는 불량외의 차이가 크다.
- ④ 평가 할 때 주의해야 하는 것은 『매우우수』의 평가에 있어 100% 완벽하고 고칠 것이 없을 때에 점수를 줄 수 있지만, 조금이라도 나쁜 점이 있을 때에는 『우수, 보통』으로 하고 절대 과도평가를 하지 않는 것이 중요하다, “보통과 부족”의 중간이라고 느꼈을 때에는“부족”으로 평가 한다.
- ⑤ 평가 실시 후 평가자는 탐지요원의 기술부족으로 인하여 탐지건에게 낮은 점수밖에 줄 수 없다고 판단되는 경우에는 탐지요원과의 친화관계를 다시 지켜보거나 또는 다른 개체의 탐지건으로 교체등도 생각할 필요가 있으므로, 적당한 판단에 의해 가장 좋은 방법으로 합격 또는 불합격의 판단을 하는 것이 중요하다.

나. 연구수행 결과

복제 검역 탐지건 3두를 대상으로 탐지의욕, 민감성, 관심성, 적극성 등 목적물에 대한 반응을 기준으로 한 탐지건 평가 60점 및 탐지요원의 평가 40점을 합한 점수에 기준하여 선발평가를 실시하였다.

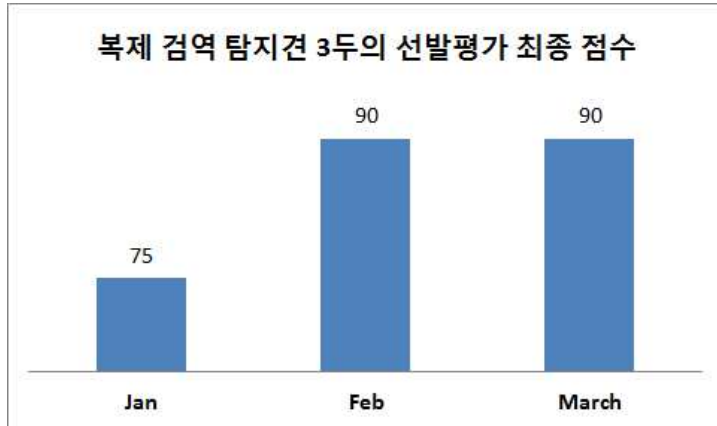


그림 154 복제 검역탐지견의 선발평가

따라서 복제견 3두 모두 복제 검역탐지견으로서 선발 되었으며 특히 여러 항목 중 영국 훈련사와 핸들러 244명의 설문을 바탕으로 훌륭한 탐지견의 10가지 항목을 선정(Rooney et al., 2004, J Forensic Sci)하였으며 이를 바탕으로 1-5점으로 평가되는 항목을 선정하였다. 후각이 얼마나 예민한가? (acuity of sense of smell), 보이지 않는 물건을 찾으려는 욕구가 강한가? (incentive to find an object which is out of sight), 건강 상태는 양호한가? (health), 단독으로 탐지하려는 경향이 강한가? (tendency to hunt by smell alone), 체력은 강한가? (stamina), 보상먹이에 의해 잘 훈련되고, 관심이 많은가? (ability to learn from being rewarded), 탐지할 때 산만하지 않고 집중하는가? (tendency to be distracted when searching), 민첩하게 탐지하는가? (agility), 매일 행동이 일정하게 유지되는가? (consistency of behaviour from day to day)의 항목으로 평가한 3두의 결과는 아래와 같다.

표 75 복제 검역탐지견 3두의 훌륭한 탐지견으로서의 적절성에 대한 10문항 평가 결과

개체명	설문평가 점수
Jan	4.39
Feb	4.46
March	4.38

훈련교관을 비롯한 훈련 요원 총 10인이 평가한 결과 복제견 3두 모두 평균적으로 4 점 이상의 우수한 성적을 받았다.

3. 선발된 복제검역견의 현장 배치 및 지속적인 훈련 및 평가

가. 연구수행 방법

최종적으로 선발평가에서 합격한 개체의 보수 훈련을 실시하였으며 실제 탐지 활동 중인 탐지견의 활동 성향 및 기질에 대한 논의를 진행하였다.

나. 연구수행 결과

선발된 복제 검역 탐지견 3두는 보수 훈련을 실시하였으며 실제 탐지 활동 임무 수행 시 탐지견의 활동 성향 및 기질에 대한 각 훈련 요원의 의견을 서로 사전 논의 없이 제출하였다. Jan의 경우 대상 목적물에 대해 빠뜨리지 않고 꼼꼼하게 탐지하고, 습득기간이 빠르며 스트레스 회복이 신속히 이루어지고 있는 것이 특징이며, Feb의 경우 목적의식이 강하고 적극적으로 탐지하는 특성이 있으며 다양한 대상에 대하여 호기심이 많고 소리에 민감하다는 의견이 있었다. March는 집중력이 있고 호기심이 많으며 소리에 민감하거나 위축된 적이 있으나 좋아지고 있으며 탐지 능력이 향상 중이다.

복제 검역 탐지견 3두의 활동 성향을 평가하였을 때 3두가 공통된 특징을 갖고 있었는데 특히 호기심이 강하며 탐지 활동임무시 적극적으로 임한다는 것이다.

기 1차년도 행동학적 연구 및 2차년도 훈련 및 행동학적 평가를 통해 각 시기에 따른 적절한 평가 항목 및 내용에 대한 프로토콜을 완전히 확립하였으며 그것은 아래와 같이 요약할 수 있다.

평가 항목	평가 시기	평가 내용	상태
유견 적성 평가 (Volhard test)	7~9주령	유견의 우위성 정도를 파악하고 사회 적응도, 성격, 적성을 평가한다.	완료
자견 자질 평가	6개월령 (현장 훈련 시작 시기)	보상 자극에 대한 반응, 환경 적응성, 사회성, 보행상태, 장애물에 대한 반응을 평가하여 향후 현장 적응 훈련의 방향을 정한다.	완료
선발 평가 (배치전 평가)	1년령 (현장 배치 시기)	탐지견의 의욕, 반응(민감성, 관심성, 적극성)을 평가하여 선발 여부와 핸들러 배치를 결정한다.	완료
훈련 습득 정도, 변화 비교	검역탐지견센터로 이송 후부터 계속	훈련 일지 - 일일의 훈련 습득 정도를 파악한다. 영상 자료 - 행동 특성 비교 기준을 마련하여 분석한다.	진행 중

그림 155 검역탐지견의 훈련 및 행동학적 평가 기준에 의거한 진행 사항

제 3 절 선발된 복제 검역탐지건의 현장적응능력 비교 조사

1. 현장 투입된 복제 검역 탐지건(1차생산건)의 현장 투입 적응력 및 수행능력 평가

가. 연구수행 방법

최종적으로 선발평가에서 합격한 3두 복제건의 현장 투입은 '12년도 10월부터 공항 C.I.Q 및 우편물류센터에 배치하였다. 각 개체의 핸들러가 지정되어 핸들러의 관찰하여 적응력 평가 및 수행능력을 실제 탐지 활동 중인 탐지건의 활동 성향 및 기질에 대한 논의를 진행하였다.

표 76 탐지건 현장 투입 적응력 평가 및 수행능력평가 기준

	탐지의욕 (30점)	목적물에 대한 반응(30점)			탐지건 점수
		민감성	관심성	적극성	
탐 지 건	<input type="checkbox"/> 매우 우수(10)	<input type="checkbox"/> 매우 우수(10)	<input type="checkbox"/> 매우 우수(10)	<input type="checkbox"/> 매우 우수(10)	
	<input type="checkbox"/> 우수(25)	<input type="checkbox"/> 우수(8)	<input type="checkbox"/> 우수(8)	<input type="checkbox"/> 우수(8)	
	<input type="checkbox"/> 보통(20)	<input type="checkbox"/> 보통(5)	<input type="checkbox"/> 보통(5)	<input type="checkbox"/> 보통(5)	
	<input type="checkbox"/> 부족(10)	<input type="checkbox"/> 부족(3)	<input type="checkbox"/> 부족(3)	<input type="checkbox"/> 부족(3)	
	<input type="checkbox"/> 불량(5)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	

나. 연구수행 결과

(1) 현장 투입 적응력 평가

복제건 3 두 (April, Feb, March)는 각각 '13.10월, '12.10월, '12.10월에 공항 C.I.Q에 투입되어 불법휴대 축산물 및 식물류 적발업무를 수행하였다. 현장투입 적응력평가는 탐지의욕 부분과, 목적물에 대한 반응으로 나누어 실시하였다. 탐지의욕 부분에서 모든 복제개는 우수이상의 평가를 받았고 목적물에 대한 반응은 민감성, 관심성, 적극성의 3가지로 평가하여 보통이상의 평가를 받았다. 따라서 **현장 조기투입에도 불구하고, 투입후 3마리의 복제건은 모두 우수하게 현장에 적응하였다고 평가받았다.**

(2) 검역건으로서의 현장 수행능력 평가

현장 적응후 본격적으로 2014년 9월 한달간 3두의 탐지수행능력을 조사하였다. 그 결과 **'14년 9월 1달간 1두당 평균 90여편을 투입하여 평균 축산물 93건, 식물류 130건을 적발하는 우수한 성적**을 보여주었다. 앞으로도 현장에 투입된 복제건들의 현장 수행평가를

지속적으로 조사하여 그들의 능력의 우수성을 검증하고자 한다.

제 4 절 선발된 복제 검역탐지견의 현장적응능력 비교 조사

1. 현장 투입된 복제 검역 탐지견 (2차 생산견)의 현장 투입 적응력 평가 및 현장 수행능력 평가

가. 연구수행 방법

두 마리의 복제 탐지견 (일, 월)의 탐지견 설발 평가는 아래와 같은 기준에 의해 실시하였고, 2015년 10월, 공항 CIQ에 투입되어 불법휴대축산물 및 식물류 적발업무를 실시하며 현장 적응력 및 수행능력을 평가하였다.

- (1) 탐지견평가 60점, 탐지요원 평가40점, 총100점으로 한다.
- (2) 합격점수는 60점이고 기준에 도달되지 않는 개는 그 시점에서 훈련을 중단하고 이후의 탐지훈련으로 진행시키지 않는다.
- (3) 탐지견은 탐지의욕이 가장중요하기 때문에 매우우수, 또는 불량에 차이가 크다.
- (4) 평가 할 때 주의해야 하는 것은 『매우우수』의 평가에 있어 100% 완벽하고 고칠 것이 없을 때에 점수를 줄 수 있지만, 조금이라도 나쁜 점이 있을 때에는 『우수, 보통』으로 하고 절대 과도평가를 하지 않는 것이 중요하다, “보통과 부족”의 중간이라고 느꼈을 때에는 “부족”으로 평가 한다.
- (5) 평가 실시 후 평가자는 탐지요원의 기술부족으로 인하여 탐지견에게 낮은 점수밖에 줄 수 없다고 판단되는 경우에는 탐지요원과의 친화관계를 다시 지켜보거나 또는 다른 개체의 탐지견으로 교체등도 생각할 필요가 있으므로, 적당한 판단에 의해 가장 좋은 방법으로 합격 또는 불합격의 판단을 하는 것이 중요하다.

나. 연구수행 결과

두 마리의 복제 탐지견 (일, 월)에서 현장적응 및 투입을 2015년 11월 한 달 간 2 마리의 탐지수행능력을 조사한 결과 1마리 당 평균 90여 편을 투입하여 평균 축산물 84 건, 식물류 184 건을 적발하는 우수한 성적을 보여주었다.

탐지요원 및 탐지견 평가서

구 분	탐지요원	탐지견 및 성별	생년월일	품 종	평가일자
	이준열	일 / ♂	2014.7.24	비글	2015.10.22
탐지장소	인천공항 입국장(CIQ)				
탐지견	탐지의욕(30점)	목적물에 대한 반응(30점)			탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(30)	<input type="checkbox"/> 매우우수(10)	<input type="checkbox"/> 매우우수(10)	<input type="checkbox"/> 매우우수(10)	
	<input type="checkbox"/> 우수(25)	<input type="checkbox"/> 우수(8)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(8)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(8)	
	<input type="checkbox"/> 보통(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 보통(5)	<input type="checkbox"/> 보통(5)	<input type="checkbox"/> 보통(5)	
<input type="checkbox"/> 부족(10)	<input type="checkbox"/> 부족(3)	<input type="checkbox"/> 부족(3)	<input type="checkbox"/> 부족(3)		
<input type="checkbox"/> 불량(5)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	51	
탐지요원 (각항목 4점)	○ 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 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 반응 및 관심물품에 대한 기록				총 점	
평가자	○ 이준열				91

탐지요원 및 탐지견 평가서

구 분	탐지요원	탐지견 및 성별	생년월일	품 종	평가일자
	이준열	월 / ♂	2014.7.24	비글	2015.10.22
탐지장소	인천공항 입국장(CIQ)				
탐지견	탐지의욕(30점)	목적물에 대한 반응(30점)			탐지견 점수
		민감성	관심성	적극성	
	<input checked="" type="checkbox"/> 매우우수(30)	<input type="checkbox"/> 매우우수(10)	<input type="checkbox"/> 매우우수(10)	<input type="checkbox"/> 매우우수(10)	
	<input type="checkbox"/> 우수(25)	<input type="checkbox"/> 우수(8)	<input type="checkbox"/> 우수(8)	<input checked="" type="checkbox"/> 우수(8)	
	<input type="checkbox"/> 보통(20)	<input checked="" type="checkbox"/> 보통(5)	<input checked="" type="checkbox"/> 보통(5)	<input type="checkbox"/> 보통(5)	
<input type="checkbox"/> 부족(10)	<input type="checkbox"/> 부족(3)	<input type="checkbox"/> 부족(3)	<input type="checkbox"/> 부족(3)		
<input type="checkbox"/> 불량(5)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	<input type="checkbox"/> 불량(1)	48	
탐지요원 (각항목 4점)	○ 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 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 반응 및 관심물품에 대한 기록				총 점	
평가자	○ 이준열				88

<제 1협동 : 우수 복제 검역 탐지건 시스템의 실용화 및 산업화>

제 1 절 우수 검역탐지건의 생식세포 및 줄기세포 banking

1. 우수검역탐지건의 정액 banking 조건 확립

가. 연구수행 방법

(1) 우수검역탐지건의 정액 banking

(가) 우수검역탐지건 대니의 정액 채취

수지마찰요법을 이용하기 위하여 아래 그림과 같은 도구를 이용하여 우수검역탐지건의 음경망울샘을 자극한 뒤 종대가 관찰되면, 빠르게 포피를 음경망울샘 뒤쪽으로 견인하여 음경과 음경망울샘이 노출 되도록 하였다. 이때 1회용 인공 질을 이용 엄지와 검지로 음경망울샘을 압박하였다. 충분히 발기가 이루어진 이후에는 자발적인 골반 움직임과 함께 1분획의 전립선 액이 소량 사출되며 이어 정자의 대부분을 차지하는 2분획의 정액이 사출되었다. 후지를 거상하면서 뒤로 도는 자세를 취하게 되는데 이때는 주로 3분획인 전립선 액이 나오는 시기이므로 정액 동결을 위해서는 제거하는 것이 좋으므로 2분획까지 채취하였다.

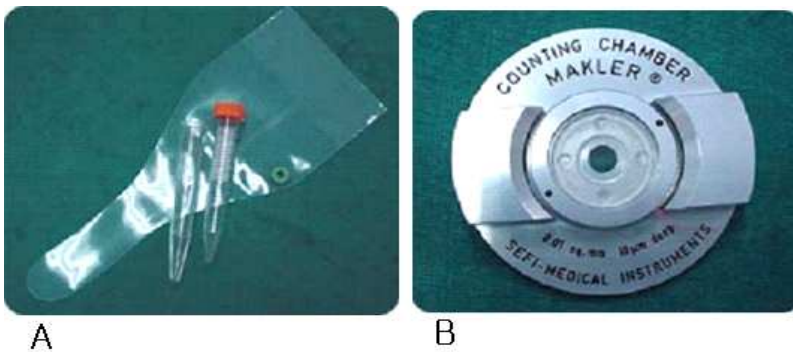


그림 156 정액채취에 사용되는 도구들. 1회용 인공질 (A)과 Makler sperm counting chamber (B)

(나) CASA (Computer assisted semen motility analyzer)를 이용한 정액의 평가

동결에 앞서 정자의 운동성, 모양 등의 질(quality) 적인 면을 분석하기 위하여 10 μ l의 정액을 Makler counting chamber (ZDL, USA)에 넣고, CCD camera (Toshiba, Tokyo, Japan)와 연결된 실체현미경 (Olympus, Tokyo, Japan) 위에 올려둔 뒤에

SIAS (SIAS, Medical supply, Seoul, Korea)를 이용하여 아래 그림의 정자이미지 분석 시스템을 이용하여 평가하였다.

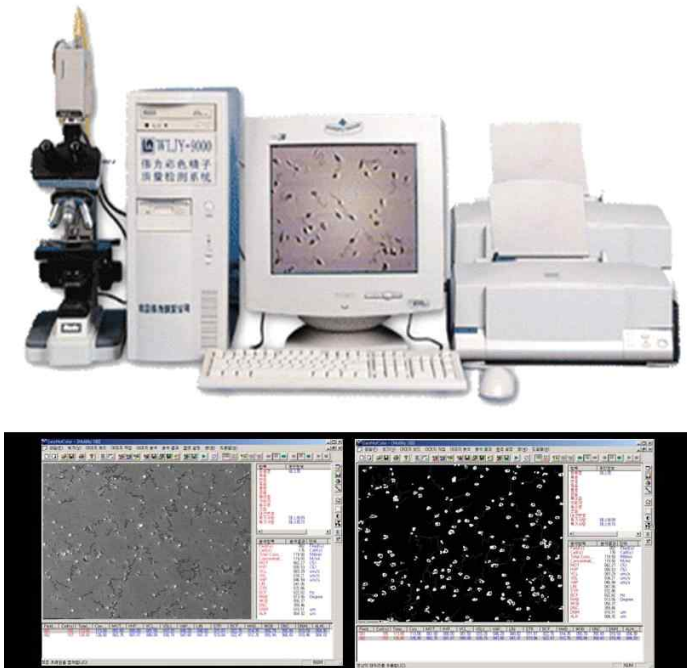


그림 157 정자 이미지 분석 시스템 (CASA)

(다) 정액 동결을 위한 완충액 제조

Tris 완충액은 아래 표의 조성대로 100ml의 증류수 내에 Tris, citric acid, 포도당, Na-Benzylpenicillin과 streptomycin sulphate를 포함하도록 만들고, pH와 삼투압을 각각 pH 6.5, 249 mOsm로 조절하였다. 첫 번째 동결 완충액(1st extender)은 20%의 난황액이 첨가된 Tris 완충액으로 pH와 삼투압은 pH 6.4, 843 mOsm이다. 두 번째 동결 완충액(2nd extender)은 12%의 glycerol이 첨가된 첫 번째 완충액으로 pH 6.4로 맞추어 주었다.

표 77. 동결 배지의 조성 (100ml distilled water, pH; 6.5)

Ingredient	Tris buffer	1 st freezing extender	2 nd freezing extender
Tris	2.4 g	2.4 g	2.4 g
Glucose	0.8 g	0.8 g	0.8 g
Citric acid	1.4 g	1.4 g	1.4 g
Streptomycin sulphate	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Na-benzyl penicillin	0.06 g	0.06 g	0.06 g
Egg yolk	-	20 ml	20 ml
Glycerol	-	-	12 %(v/v)

(라) 정액 동결 방법

정액 동결 방법은 아래 제시되는 그림과 같이 실시하였다. 자세한 설명은 다음과 같다. 채취된 정액은 원심분리기를 이용해 750rpm에서 7분 - 7분 30초 동안 원심분리를 통해 정자의 펠렛(pellet) 만을 회수하였다. 회수된 펠렛은 1st buffer를 이용하여 희석하여서 4 °C에서 40 - 60분간 평형을 시켰다.

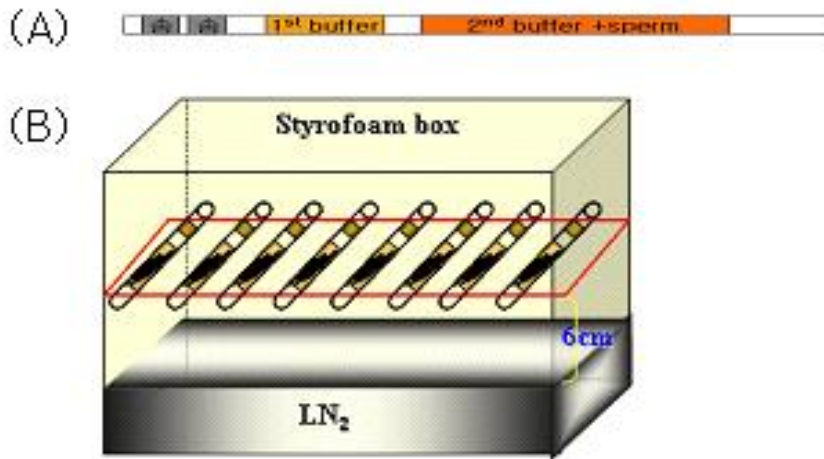


그림 158 정액 동결 모식도. Straw에 공기층과 함께 정액을 로딩한 모식도 (A)와 액체 질소 위 6cm 지점에 straw를 노출시키는 모습 (B)

평형이 이루어진 정자 희석액은 4 °C에서 40 - 60분간 처리한 12% 글리세롤이 첨가된 2nd buffer를 이용하여 다시 희석하여, 40 - 60분간 둔다. 40분이 지난 후, 0.5 ml의 straw에 로딩 (약 0.3 ml)을 시작하였다. Straw를 액체 질소의 6cm 높이에 넣고

10분간 두어 냉각시킨 후, 액체 질소 내로 담가 완전히 동결시킨다. 동결된 straw는 질소탱크로 옮겨져서, 인공수정을 실시하기 전까지 액체질소에서 보관하였다.

나. 연구결과

(1) 우수검역탐지건의 정액 banking

수지마찰요법을 사용하여 우수검역탐지건에서 정액 채취를 시도하였고, 2분획까지 약 1.5ml의 정액을 채취하였다. 일반적으로 **인공 수정을 통해 수정이 가능한 70% 이상의 운동성(motility)을 보였고, 2 x 108개씩 straw 9개로 동결하였다.**

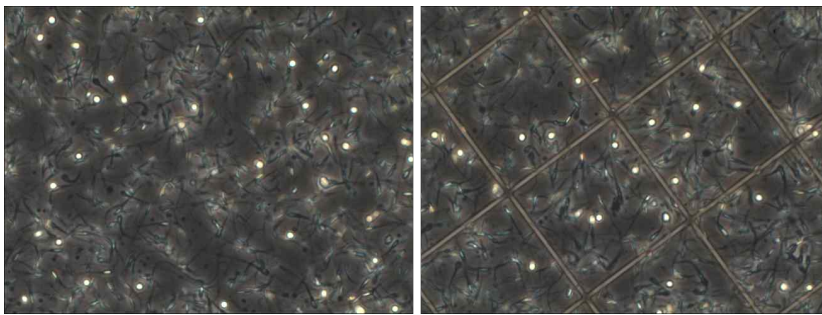


그림 159 우수검역탐지건의 정자를 CASA로 분석한 이미지

2. 사람 지방줄기세포주의 조건별 동결 보관을 통한 개의 지방줄기세포주 banking 최적화 예비 실험

가. 연구수행 방법

(1) 동결보관 적정 세포수 확인 연구

배양 후 액체질소에 보관되어 있는 사람의 지방줄기세포를 37°C 항온 수조에 담가 녹이고 사람지방줄기세포 배양 배지(RKCM)에 현탁하여 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 세포 펠렛을 회수 하여 배양 접시에 넣은 후 RKCM에 3일간 배양 한 후 계대배양 하여 컨플루언시하게 되었을 때 트립신 처리 하여 회수 한 후 각 1, 10, 50, 100, 750, 1000만개의 세포를 10% DMSO를 포함 한 RKCM을 이용하여 액체질소에 보관하였다. 1주일 후 보관 된 각 줄기세포를 다시 배양하여 트립신(TrypLE 사용) 처리 한 후 회수 하고 세포수를 세어 성장율로써 세포 활성 상태를 비교하였다.

(2) 세포 보존액 조성별 확인 연구

위의 1)실험과 동일하게 액체질소에 보관되어 있는 사람의 지방줄기세포를 배양 한 후 한번 계대배양 하여 컨플루언시하게 되었을 때 트립신 처리하여 세포를 회수 하였다. 세

포를 각 0%, 5%, 25%, 50%, 75%의 FBS를 포함하며 10% DMSO가 첨가 된 RKCM을 이용하여 액체질소에 보관하였다. 한달 후 보관 된 각 줄기세포를 다시 배양하여 트립신 (Gibco, TryPLE) 처리 한 후 회수하고 세포수를 세어 성장율로써 세포 활성 상태를 비교하였다.

나. 연구결과

(1) 동결보관 적정 세포수 확인 연구

사람 지방 줄기세포주를 이용하여 개의 지방줄기세포 보관에 관한 적정 세포수를 예측하는 실험을 진행하였다. 각 1, 10, 50, 100, 750, 1000만개의 세포를 Controlled rate freezer(CRF)를 이용하여 세포를 동결하였고 액체질소에 일주일간 보관 후 지방줄기세포 배양 배지(RCME-P)를 이용하여 3일간 배양 하였고 그 세포 수를 세어 세포 활성을 비교 하였다. 세포는 1, 10, 50, 100, 750, 1000만개 세포가 각 0, 6, 302, 612, 3468, 3815만개 세포로 증식하여서 각 0배, 0.6배, 6.044배, 6.122배, 4.624배, 3.815배로 배가 되었다. **초기 세포 수에 비해 100만개 세포를 넣고 키웠을 때 가장 많은 배수로 세포가 증가하여서 동결 시 100만개 농도에서 세포 활성이 가장 잘 유지 되는 것으로 보였다.**

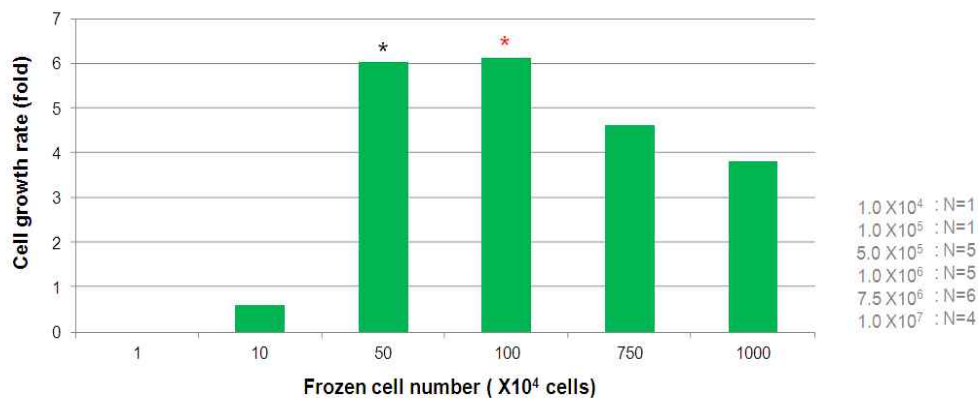


그림 160 지방줄기세포 동결시 세포수에 따른 성장율

(2) 세포 보존액 조성별 확인 연구

사람 지방줄기세포주를 이용하여 개의 지방줄기세포 보관에 관한 세포 보존액 조성을 예측하는 실험을 진행하였다. 10% DMSO와 각 0%, 5%, 25%, 50%, 75%의 FBS를 포함한 지방줄기세포 배양배지(RCME-P)로 50만개 세포를 CRF를 이용하여 동결하였고 액체질소에 보관하였다. 보관 후 RCME-P 배지를 이용하여 3일간 배양하였고 그 세포 수를 세어 세포 활성을 비교하였다. 세포는 0%, 5%, 25%, 50%, 75%의 FBS 동결조건에서 각 1.6, 2.56, 2.2, 2.73, 2.4만개 세포로 증식하여서 각 1.6배, 2.56배, 2.2배, 2.73배, 2.4배로 배가 되었다.

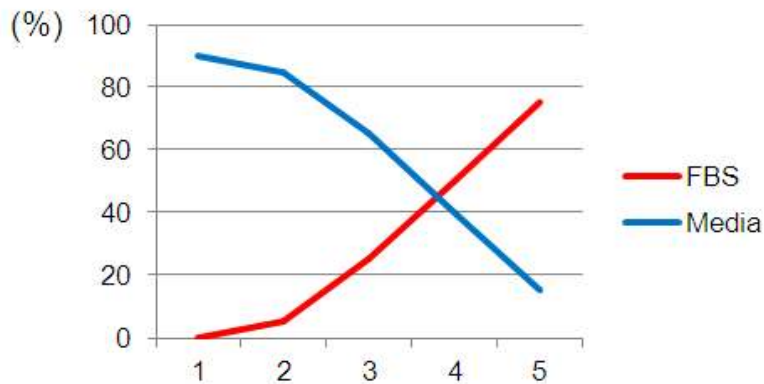


그림 161 세포 보존액의 FBS 비율에 따른 세포 생존율

75% FBS 조건에서 가장 많은 2.73배, 두번째로는 5% FBS 조건에서 2.56배 증가하였으나 실용화 및 산업화 측면에서 FBS 비용 효율이 5% FBS 조건에서 세포 활성이나 비용효율 차원에서 가장 적절 할 것으로 보였다. 또한 10% DMSO를 포함한 PBS에서도 2.3배 가량 세포가 증가하는 모습을 보였으나 장기 보관에 적절하지 않을 것으로 생각되어 제외 시켰다.

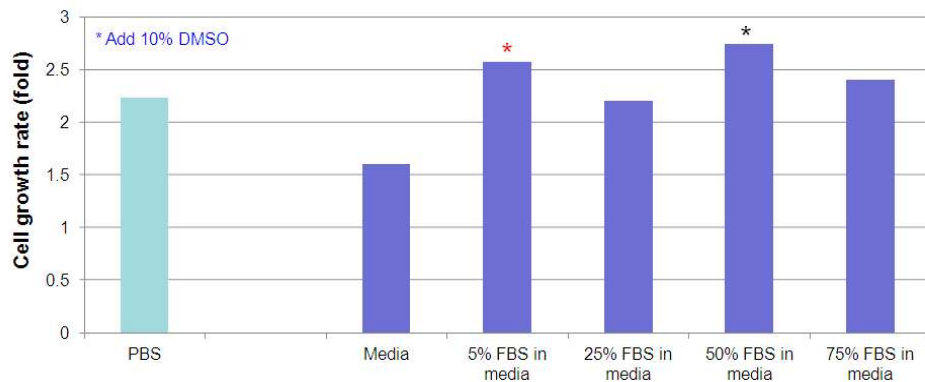


그림 162 세포 보존액의 FBS 비율에 따른 동결 후 해동 시 세포 성장률 평가

3. 개 지방줄기세포 banking 기술 최적화를 위한 다양한 배양액을 이용한 최적의 배양 배지 확립

가. 연구수행 방법

4가지 각기 다른 배지로 지방줄기세포주를 배양하고 그 특성을 비교하여 최적 배양배지를 확립하였다.

사람 지방줄기세포주는 배양 시 세포의 빠른 성장율과 줄기세포로서의 특성을 유지시키

는데 최적화 된 배지가 이미 개발되어 사용 중이다. 하지만 mouse나 rat의 지방줄기세포를 사람지방줄기세포 배양 배지(RKCM)로 배양 하였을 때 줄기세포의 생장이 매우 느려지고 줄기세포로서의 특성을 잃어버리는 것이 이전 실험을 통해 관찰되었기 때문에 쥐에 최적화 된 지방줄기세포 배양배지(RCME-P)를 개발하여 사용 중이다. 이와 같이 종에 따라 지방줄기세포의 배양 조건이 달라지기 때문에 개의 지방줄기세포의 banking 표준화를 위해 RKCM과 RCME-P를 포함한 총 4종의 배지를 개의 지방줄기세포 배양에 시험하여 최적 배지를 선정하였다.

액체질소에 보관 되어 있는 세포 중 개의 지방줄기세포로써 면역표현형이 확인 된 Passage No. 0인 세포를 37℃ 항온 수조에 담가 녹이고 RKCM와 RCME-P를 포함한 4가지 배지로 나누어 25T flask에서 배양하였다. (Passage No.1) 4일간 배양 후 세포가 컨플루언시하게 되면 트립신(Gibco, TryPLE) 처리 한 후 회수하고 세포수를 세어 성장율로써 세포 활성 상태를 비교 하고 각 세포 1.2백만개씩 75T flask에 넣고 각 배지로 배양하였다. (Passage No. 2) 3일간 배양 후 세포가 컨플루언시하게 되면 트립신 처리 한 후 세포 활성 상태를 비교하고 각 각 세포 1백만개씩 75T flask에 넣고 각 배지로 배양(Passage No. 3)하고 나머지 세포로 면역 표현형 확인을 하였다. 면역표현형 확인은 유세포 분석기(BD, FACSCalibur)를 이용하며 줄기세포 표지자인 CD44와 CD90과 면역세포 표지자인 CD34로 확인 하였다. 3일 배양 후 세포에 트립신 처리 후 세포수를 세고 각 세포 1백만개씩 75T flask에 넣고 각 배지로 배양하였다.(Passage No. 4) 나머지 세포로 면역 표현형을 확인 하였다. 같은 방법으로 3일 배양 후 세포를 세고 각 세포 1백만개씩 75T flask에 넣고 각 배지로 배양하고 나머지 세포로 면역 표현형을 확인 하였다. (Passage No. 5)

나. 연구수행 결과

(1) 배지에 따른 세포 성장율과 세포 상태 비교

(가) 배지에 따른 세포 성장율 비교

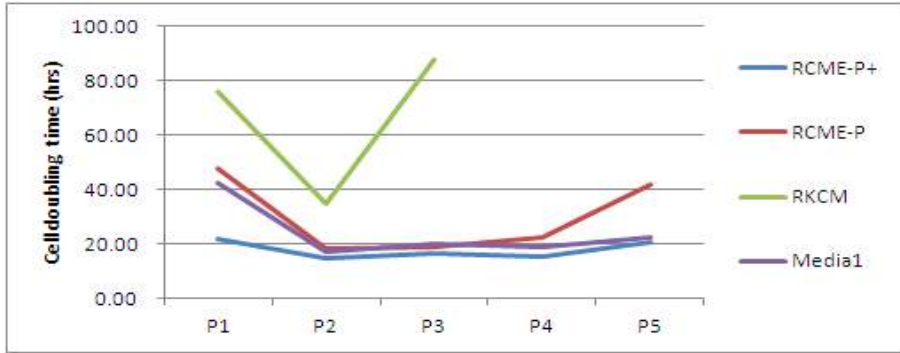


그림 163 다양한 조성의 배양액에서 배양한 지방줄기세포의 세포 성장을

사람 지방줄기세포 배양 배지는 쥐 줄기 세포에 적용 하였을 때 줄기세포의 생장이 느려지고 세포 괴사가 일어나는 등 동물줄기세포 배양에 적합하지 않은 모습을 보였다. 때문에 개의 지방줄기세포 배양에 적합한 배지를 찾기 위해 사람지방줄기세포 배양배지(RKCM)와 쥐 지방줄기세포 배양배지를 포함한 4가지 배지로 개의 지방줄기세포 성장 및 모양에 가장 적합한 배지를 확립을 위해 실험을 진행하였다. 세포 표현형 결과에서 줄기세포의 특성을 명확하게 보여 줬던 개체를 택하여 Passage No. 0에서 녹여서 P1에서 P5까지 실험을 진행하였다. RCME-P+, RCME-P, RKCM, Media1 중 세포수로 성장을 비교한 결과 RCME-P+ media에서 Media1과 RCME-P에 비해 많게는 5배에서 적게는 1.5배 더 많은 세포가 성장하였다. Media1과 RCME-P는 비슷한 성장속도를 보였으나 P4 이후에 RCME-P의 생장이 급격히 느려졌다. RKCM에서는 P3부터 세포 괴사를 보이며 P4에서는 전혀 성장하지 않고 모두 괴사 되었다.

(나) 배지에 따른 세포 모양 비교

RCME-P+에서 배양한 세포는 P5까지 모두 정상 성체줄기세포의 모양을 유지 하였고 RCME-P에서는 P3까지는 정상적인 성체줄기세포의 모양을 유지 하였으나 그 이후로 dendritic-like 한 모양으로 성체줄기세포 모양을 유지 할 수 없었다. 또한 Media1에서는 P5까지 줄기세포의 모양을 유지 하기는 하였으나 RCME-P+에 비해서 부착시 길어지는 모양을 보였고 RCME-P+에 비해 덜 압축적인 모습이였다. 또한 Media1는 배양배지를 바꿔 주거나 물리적인 충격을 가하였을 때 세포가 잘 떨어져서 부착상태가 좋지 않은 모습을 보였다. RKCM 배양 배지 상태에서는 P3이후로 세포 괴사가 일어나 P4에서는 완전히 괴사하여 더 이상 배양이 불가능 하였다.

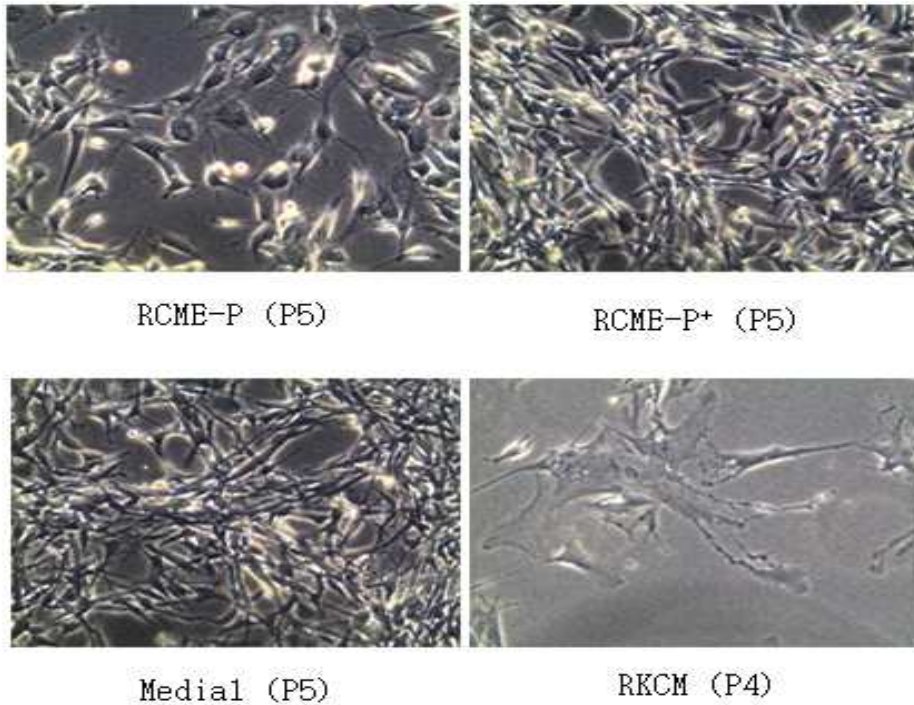


그림 164 다양한 조성의 배양액에서 배양한 지방줄기세포의 세포모양

(다) 배지에 따른 세포 크기 비교

세포 크기는 RCME-P+에서 P4까지 15um내외를 유지하다가 P5에서 16.8um까지 커지는 결과를 보였다. 하지만 다른 배지와 비교하여 작은 크기를 유지 하는 것으로 보였다. RCME-P와 Media1은 함께 15 um내외를 유지 하다 RCME-P는 P4이후로 16um이상으로 커지고 Media1은 14um이하로 작아지는 결과를 보였다. 하지만 Media1에서 배양한 세포는 배양접시에 부착 시 퍼져서 붙는 모양을 보이기 때문에 RCME-P+의 결과가 더 좋은 것으로 판단 되었다. RKCM 배지에서는 세포 괴사가 일어나면서 세포크기가 매우 커지는 경향을 보였다.

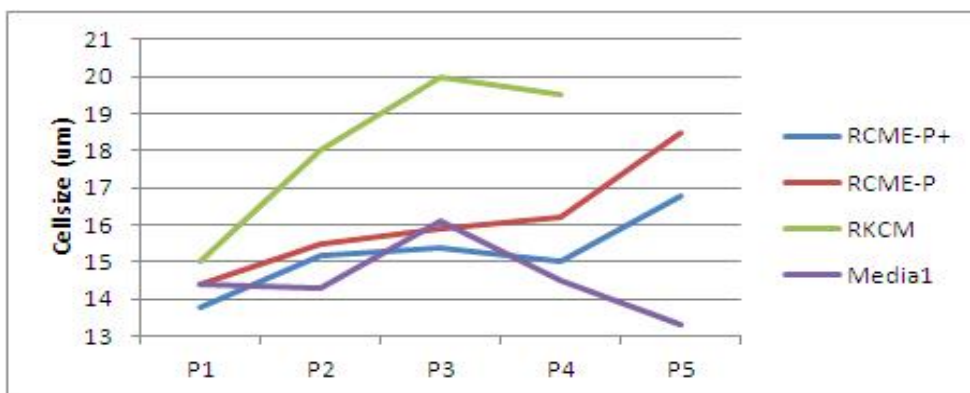


그림 165 다양한 조성의 배양액에서 배양한 지방줄기세포의 크기

(라) 배지에 따른 passage별 면역 표현형 비교

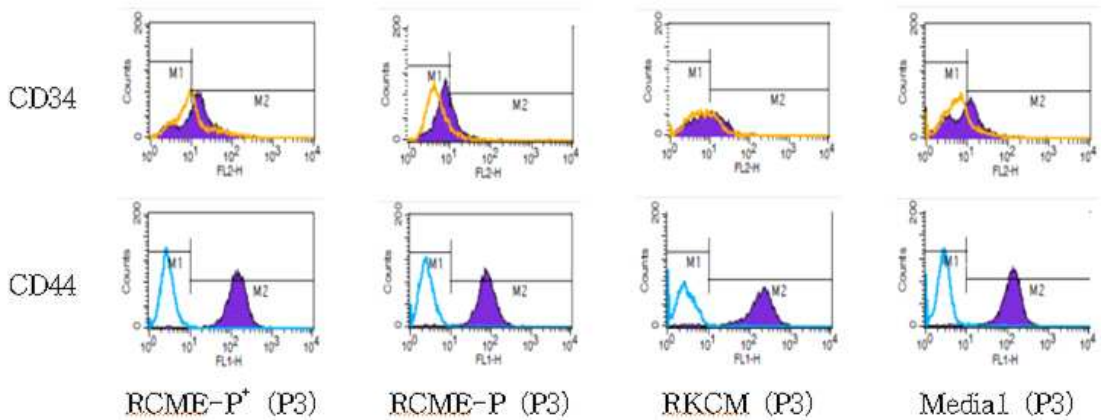


그림 166 배지에 따른 지방줄기세포의 passage별 CD44, CD34 발현 분석

4군의 배지 모두에서 줄기세포 표지자인 CD44는 P5까지 90% 이상의 발현율을 보이고 있으며 endothelial cell 표지자인 CD34는 모두 5% 이하의 발현율을 보인다. 또 다른 줄기세포 표지자인 CD90에서 Passage별로 다른 양상을 보였는데 동결상태에서 녹인 즉시인 P2에서는 모두다 다른 양상을 보이다가 P3와 P4에서 안정적으로 50% 이상 양성을 보였다. 그러나 P5에서는 모두 20%이하의 양성을 보이며 CD90의 발현율이 현저하게 떨어지는 모습을 나타내었다. CD90의 발현 양상이 세포 노화나 성장 조건등에 어떤 연관성을 가질 것으로 예상되며 이를 추후에 (2차년) 연구 할 필요가 있을 것으로 생각 되었다.

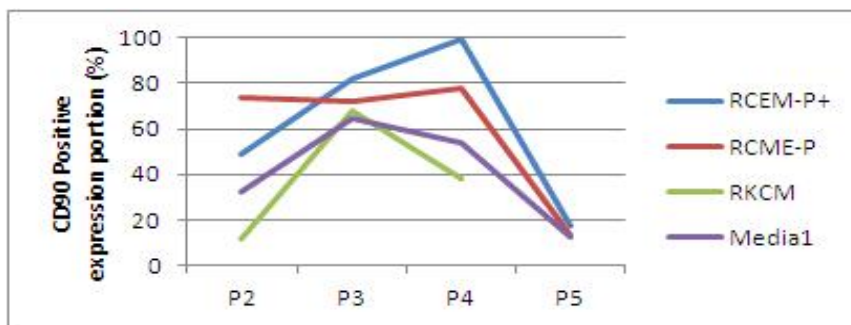


그림 167 배지에 따른 지방줄기세포의 passage별 CD90 발현 분석

4. 개 지방유래 성체 줄기세포의 banking 기술 최적화를 위한 banking 조건 확립

가. 연구수행 방법

(1) 동결보관 적정 세포수 확인 연구

배양 후 액체질소에 보관되어 있는 개지방줄기세포를 37℃ 항온 수조에 담가 녹이고 개 지방줄기세포 배양 배지(RCME-P)에 현탁하여 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 세포 펠렛을 회수 하여 배양 접시에 넣은 후 RCME-P에 3일간 배양 한 후 계대배양 하여 컨플루언시하게 되었을 때 트립신 처리 하여 회수 한 후 각 1, 10, 50, 100, 750, 1000만 개의 세포를 10% DMSO를 포함 한 RCME-P을 이용하여 액체질소에 보관하였다. 1주일 후 보관 된 각 줄기세포를 다시 배양하여 트립신(TryPLE 사용) 처리 한 후 회수하고 세포수를 세어 성장율로써 세포 활성 상태를 비교하였다.

(2) 세포 보존액 조성별 확인 연구

위의 1)실험과 동일하게 액체질소에 보관되어 있는 개지방줄기세포를 배양 한 후 한번 계대배양 하여 컨플루언시하게 되었을 때 트립신 처리하여 세포를 회수 하였다. 세포를 각 0%, 5%, 25%, 50%, 75%의 FBS를 포함하며 10% DMSO가 첨가 된 RCME-P을 이용하여 액체질소에 보관하였다. 한달 후 보관 된 각 줄기세포를 다시 배양하여 트립신(Gibco, TryPLE) 처리 한 후 회수하고 세포수를 세어 성장율로써 세포 활성 상태를 비교하였다.

나. 연구결과

(1) 동결보관 적정 세포수 확인 연구

개의 지방줄기세포 보관에 적정 세포수를 확립하기 위해 4개체의 개 지방줄기세포를 이용하여 각 10, 50, 100, 200, 500, 1000 만개 세포로 냉동 보관하였다. 보관시에는 10% DMSO를 포함한 RCME-P media에 세포를 현탁하고 controlled rate freezer(CRF)를 이용하여 세포에 무리가 가지 않게 순차적으로 온도를 떨어뜨려 동결하였고 액체질소에 보관하였다. 보관 1주일 후 각 지방줄기세포를 37℃에 담가 녹이고 녹인 즉시 생존율을 측정하여 세포 보존율을 비교하였다. 각 군당 개체별 평균을 비교하였을 때 모두 85% 이상의 세포 생존율을 보였고 그 중 **200, 1000만개 세포에서 각 92.35%, 93.2%의 생존율을 보여 가장 보존율이 좋았다.** 또한 10만개 세포를 보관 하였을 때 85.2%의 가장 낮은 보존율을 보였다.

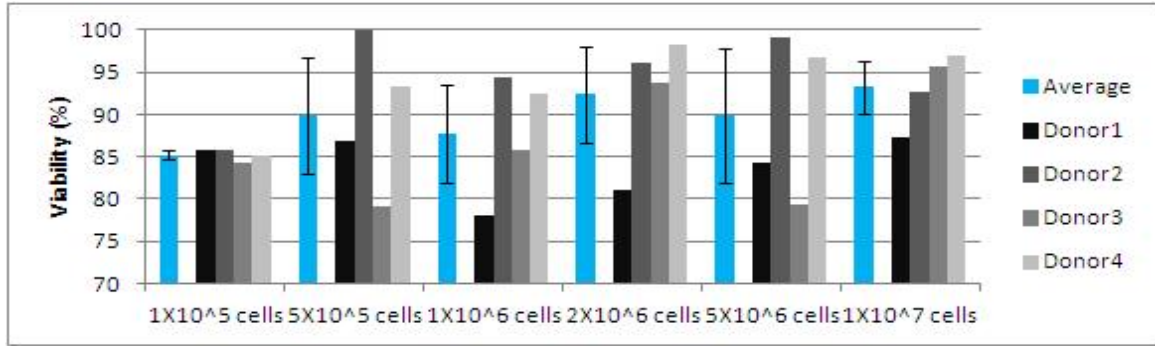


그림 168 다양한 농도의 세포수로 동결한 세포 생존율 평가

생존율을 측정 후 세포를 RCME-P 배지로 2일간 배양 하고 트립신 처리 한 후 세포를 회수하고 총 세포수를 세어 세포 활성 상태를 비교하였다. 세포는 10, 50, 100, 200, 500, 1000만개 세포가 각 16.5, 76.75, 245, 484, 1136, 1608개 세포로 증식하여서 각 1.65배, 1.54배, 2.45배, 2.42배, 2.27배, 1.61배로 배가 되었다. **초기 세포 수 100만개, 200만개를 넣고 키웠을 때 가장 많은 배수로 세포가 증가하여 이 때 가장 좋은 세포 활성을 보이는 것으로 확인되었다.** 세포 보존도와 세포 활성을 종합적으로 비교 하였을 때 200만개 세포를 넣고 키웠을 때 92.35%의 높은 세포 보존율과 2.42배의 높은 세포 증식율을 보여 가장 적절한 동결 보관 적정 세포수로 확인 되었다.

(2) 세포 보존액 조성별 확인 연구

줄기세포 banking 최적화를 위해 세포 보존액 중 FBS의 농도를 달리하여 개의 지방줄기세포 보존율을 최대로 유지 할 수 있는 조건을 찾는 실험을 진행하였다. 10% DMSO와 각 0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 75%의 FBS를 포함한 지방줄기세포 배양 배지로 200만개의 세포를 CRF를 이용하여 동결하였고 액체질소에 보관하였다. 보관 일주일 후 RCME-P+배지를 이용하여 2일간 배양하였고 그 세포 수를 세어 세포 활성을 비교하였다. 하지만 보관 기간이 너무 짧았던 탓에 세포 보존율에 있어 0%에서 75%FBS까지 모두 90% 이상의 세포 생존율을 보여 유의한 차이를 보이지 않았다. 이를 통해 1주일 정도의 짧은 기간에는 세포 보존에 있어 보존액의 영향을 받지 않는다는 것을 알 수 있었다.

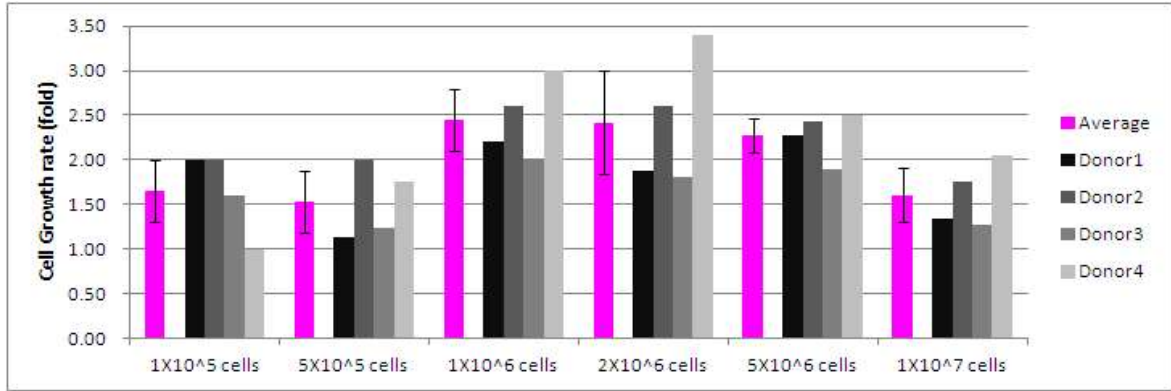


그림 169 다양한 농도의 세포수로 동결한 세포 성장을 평가

제 2 절 검역 탐지 복제건의 지방줄기세포 배양 및 특성 검증

1. 우수 검역탐지건 및 복제건의 지방줄기세포 배양

가. 연구수행 방법

(1) 우수 검역탐지건 지방줄기세포 분리 배양 및 बैं킹

우수검역건의 복부의 피하지방조직에 1: 4 ~ 1: 5 비율로 4% antibiotics를 포함한 멸균 생리식염수 (PBS)를 넣고 흔들어 혈액 및 지방과립 등을 세척하여 지방조직만을 남게 하였다. 이를 3회 반복하였다. 세척된 개 지방조직을 60 mm petridish에 옮기고, 1mg/ml collagenase를 넣고, 멸균된 미세가위를 이용하여 조직을 잘게 자른다. 이를 50ml conical tube에 옮긴 후, 지방조직 1g 당 4ml의 1 mg/ml collagenase 를 넣은 후, 37°C의 항온교반기에서 60분간 교반하면서 조직을 처리하였다. 100 μ m strainer를 이용하여 걸러내어 분해 되지 않은 조직을 걸러내어 버리고 나머지 분해된 조직을 원심 분리하여 세포 분획을 얻었다. 상층액을 제거하고 세포분획을 회수하고, 배양배지 (RCME-P)에 넣어 잘 부유시킨 후, 배양 flask에 옮기고, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 다음 날 배양접시에 부착되지 아니한 세포 또는 프리오일을 제거 한 후 동물 지방줄기세포 배양배지 (RCME-P : high glucose DMEM 및 10% FBS 등 함유하는 배지)를 추가한 후, 컨플루언시 80 ~ 90%까지 2 ~ 3일 간격으로 배지를 교환하면서 배양하였다. 유세포 분석기 (BD, FACSCalibur)을 이용하여 줄기세포 표지자인 CD44와 CD90과 면역세포 표지자인 CD34를 확인하여 줄기세포의 특징표지인자를 확인하였다. 이렇게 확립한 세포주는 10% DMSO가 첨가된 지방줄기세포 배양배지(RCME-P)에 부유시킨 후, 2 ~ 3 × 10⁶ cell/ml/vial로 분주하였다. controlled rate freezer에서 이용하여 동결한 다음 액

체질소탱크에 보관하였다.

(2) 우수 검역 탐지건 및 복제건의 지방줄기세포 검증 및 비교

분리 보관중인 지방줄기세포를 보관기간 5개월 이상 되었을 때, RCME-P 배지를 이용하여 passage 2 ~ passage 5까지 계대배양을 하여 각 passage별 면역표현형 확인을 실시하여, 표면항원형의 변화를 확인하였다. 지방줄기세포의 양성인자인 CD90 marker에 대해 95%이상의 양성발현률을 검증하기 위해 적절한 항체를 확인하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 지방줄기세포 분리 및 बैं킹

2012년 3월 우수검역건 테니의 지방줄기세포주의 분리, 배양 및 보관에 이어 **우수검역건인 카이저의 지방에서 2012년 10월 16일 (DLM120007) 및 2013년 6월 10일 (DLM130005) 2차례 지방줄기세포를 분리, 배양 및 보관 후, 주관기관에 복제건 생산 및 관련연구에 공급** 하였다.

(2) 우수 검역 탐지건 및 복제건의 지방줄기세포 검증 및 비교

(가) 테니의 지방줄기세포의 형태 및 면역표현형 확인

2012년 3월 31일, 테니의 지방조직 5g을 분리하여 약 1100만개의 지방줄기세포를 얻었다. (Passage No. 0) 이 중 700만개의 세포는 각 100만개씩 7개의 vial을 만들어 액체질소에 동결보존 하였고 나머지 400만개의 세포는 각 100만개씩 175T flask에 3일간 배양하여 총 1억 3000만개의 지방줄기세포를 얻었다.

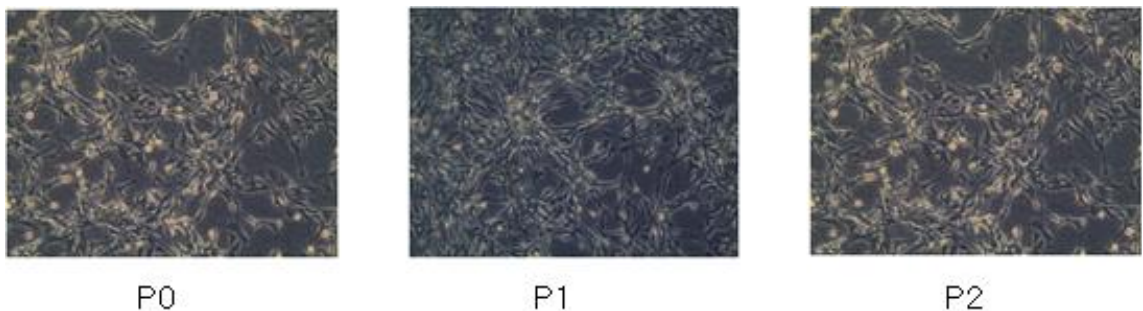


그림 170 우수검역탐지건 테니의 지방줄기세포주 배양

이중 1억 2400만개의 지방줄기세포는 각 200만개씩 62개의 vial을 만들어 액체질소에 동결 보존 하였다. 나머지 세포 중 450만개 세포는 각 150만개씩 175T flask에 3일간 배양하여 5640만개의 지방줄기세포를 얻어 냈고 각 200만개씩 27개의 vial을 만들어

액체질소에 보관 하였다. 이 중 일부를 주관기관에 제공하여 복제건 생산에 쓰이도록 하였다.

분리한 데니의 지방줄기세포 중 Passage No. 3의 세포를 일부 취하여 유세포 분석기 (BD, FACSCalibur)를 이용한 면역 표현형 확인을 진행하였다.

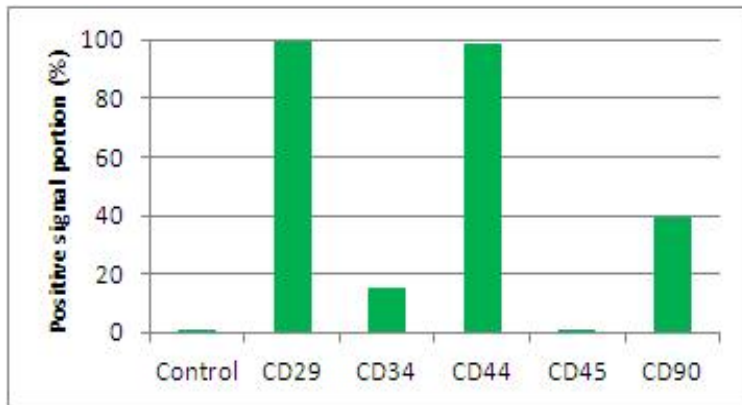


그림 171 데니 지방줄기세포주의 면역 표현형 CD29, CD34, CD44, CD45, CD90 발현 검증

줄기세포 표지자는 2008년 발표된 논문을 참고 하여 선정하였다. (Kang Et. al. Stem cells and development, 17:681-694, 2008) 데니의 지방줄기세포는 endoglin receptor인 CD44에서 98.7%의 양성을 보였으며 줄기세포 표지자인 CD29에서 또한 99.67%의 양성을 보였다. 조혈모 세포 표지자인 CD34에서는 15.2%로 일부 양성반응을 보였고 endoglin receptor인 CD90에서 또한 39.2%의 일부 양성반응을 나타내었다. leukocyte 표지자인 CD45에서는 0.67%로 음성 반응을 보였다. 위의 결과들을 바탕으로 **데니의 지방줄기세포가 지방줄기세포로서의 면역 표현형을 갖는 것을** 나타내었다.

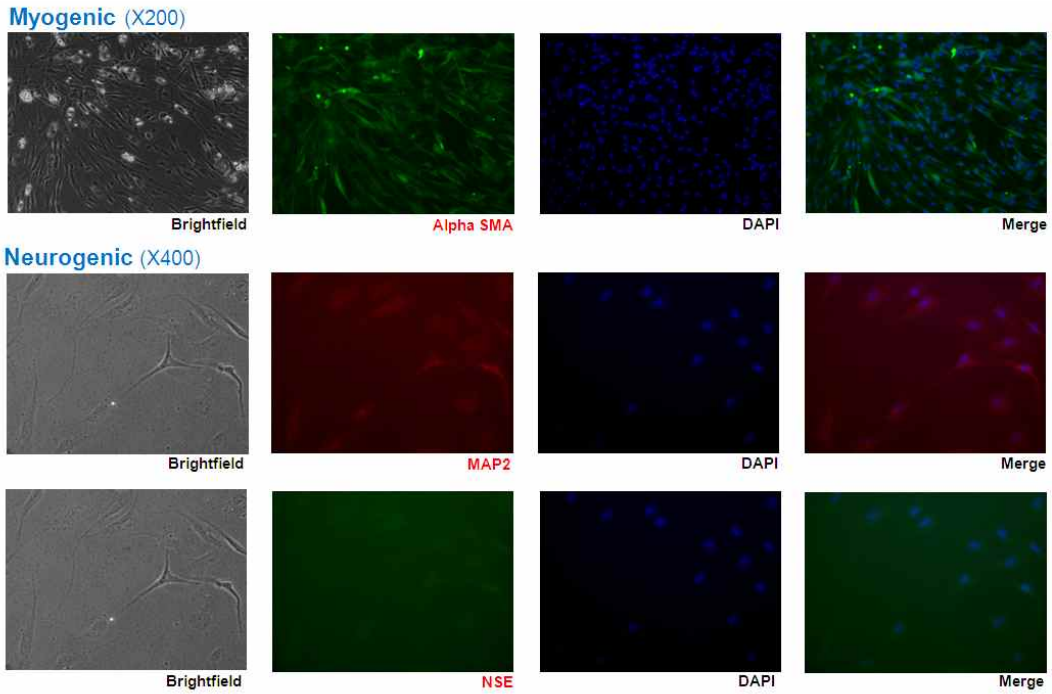


그림 173 대니 지방줄기세포의 근육, 신경으로의 분화 유도 및 검증

② 골분화능 및 연골분화능 확인

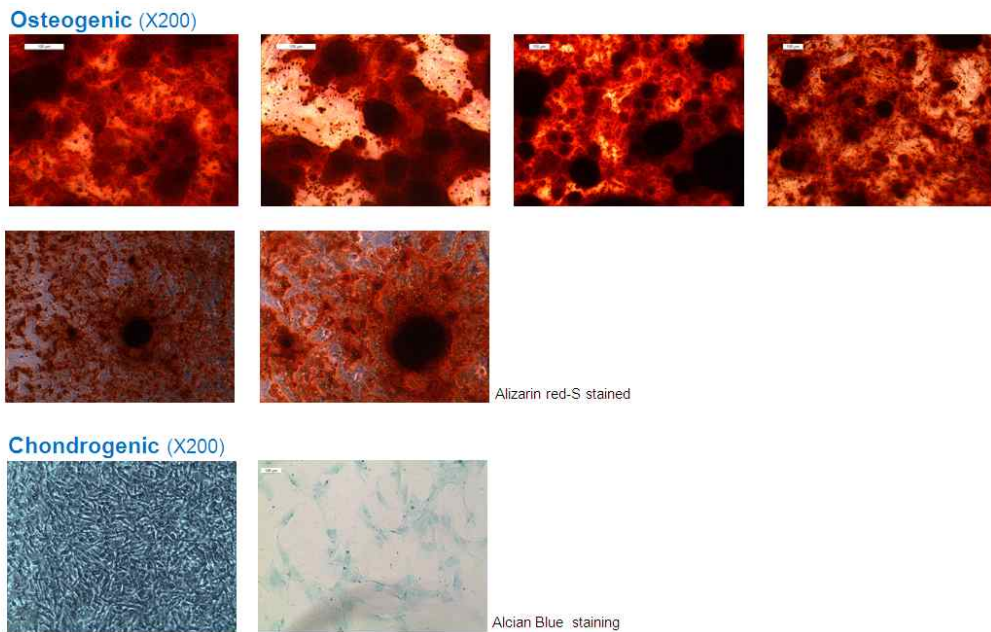


그림 174 대니 지방줄기세포의 골 및 연골로의 분화 유도 및 검증

(다) 카이저의 지방줄기세포의 형태 및 면역표현형 확인

2012년 10월에 분리, 보관한 카이저 지방줄기세포 (passage 1)를 5개월 후 (2013년 3월) RCME-P 배지를 이용하여 passage 2 ~ passage 5까지 계대배양을 하여 각 passage별 면역표현형 확인을 실시하였다.

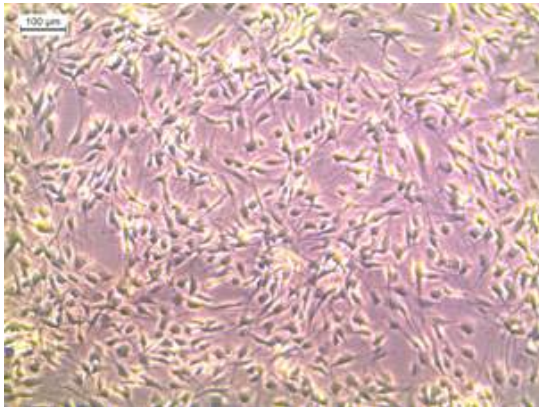


그림 175 우수검역견 카이저의 지방줄기세포주 배양 (DLM 120007, Passage 2)

유세포 분석기 (BD, FACS Calibur)를 이용한 면역표현형을 확인을 진행하였다. 줄기세포 표지자는 다음의 표의 항체들을 이용하였다.

표 78 개 지방유래 줄기세포의 세포 면역표현형 확인에 이용한 항체 정보

	CD Marker	Cat. No
CD 29	Anti Rat - CD29 (F)	BD 555005
CD 44	Anti canine - CD 44 (F)	11-5540-42 (eBioscience)
CD90 (Thy 1.1)	Anti canine - CD 90 (P)	MCA1036G
CD 31	Anti rat - CD 31 (P)	BD 555027
CD 34	Anti canine - CD 34 (P)	BD 559369
CD 45	Anti canine - CD 45 (F)	11-5450-42 (eBioscience)
CD 105	Anti human - CD 105 (F)	BD 561443

카이저의 지방줄기세포는 passage 2 ~ 5 까지 분석시 줄기세포 표지자인 CD29에서 94.5% 이상, endoglin receptor인 CD44에서 83.4% 이상, 줄기세포 표지자인 CD90에서는 97.4% 이상의 양성을 보였다. 조혈모 세포 표지자인 CD34에서는 초기계대 (Passage 2)에서는 10.56%로 일부 양성반응을 나타내었으나, Passage 3 이상 계대배양시 2.71% 이하의 반응을 보였다. leukocyte 표지자인 CD45에서는 Passage 2까지는 1% 이하로 반응하였다. 사람의 지방줄기세포에서는 양성표지자인 CD105인 경우, 개의 지방유래 줄기세포에서는 2.84%이하의 반응을 보였다. CD 29인 경우는 Oh H.J et al. (Theriogenology, 75:1221-1231, 2011)의 보고에 의하면, anti human CD29을 이용 시 45%의 양성반응을 보고하고 있으나, anti-rat CD29의 항체를 이용 시에는 95%의 이상의 강한 양성반응의 결과로 판단 시, CD29를 이용하여 줄기세포의 검증

시에는 종특이성을 확인하여야 할 것으로 여겨진다.

카이저의 표면항원형 분석결과는 Kang et al. (Stem cells and development, 17:681-694, 2008) 및 Oh H.J et al. (Theriogenology, 75:1221-1231, 2011)에서 보고된 표면항원분석의 결과처럼, 줄기세포 양성표시인자인 CD44, CD90에서는 높은 반응률을 보였으며, 음성표시인자인 CD34, CD45에서는 낮은 반응율을 보여 **카이저의 지방에서 분리한 세포가 지방줄기세포로서 계대배양이 진행되어도 그 표현형은 잘 유지됨을 확인**되었다.

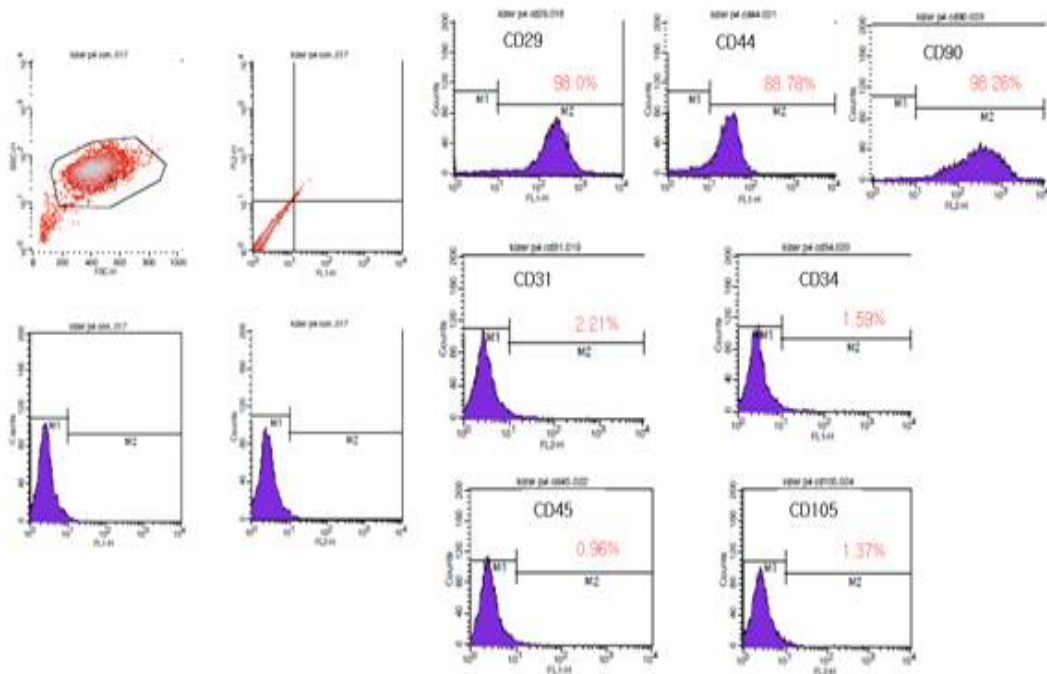


그림 176 유세포 분석기를 이용한 카이저 지방줄기세포의 면역표현형 확인 (DLM120007, Passage 4)

표 79 계대별 카이저 지방줄기세포의 면역표현형 확인(DLM120007)

CD Marker	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
CD29	98.70	97.90	98.00	94.59
CD44	95.95	86.29	88.78	83.49
CD90	98.72	99.41	98.26	97.46
CD31	1.10	0.98	2.21	3.37
CD34	10.56	2.44	1.59	2.71
CD45	0.95	0.96	0.96	2.56
CD105	1.79	1.98	1.37	2.84

(라) 카이저의 지방줄기세포의 분화능 확인

카이저 지방줄기세포의 지방세포, 골세포, 지방세포, 연골세포로의 분화능을 확인하였다.

① 골세포 분화확인

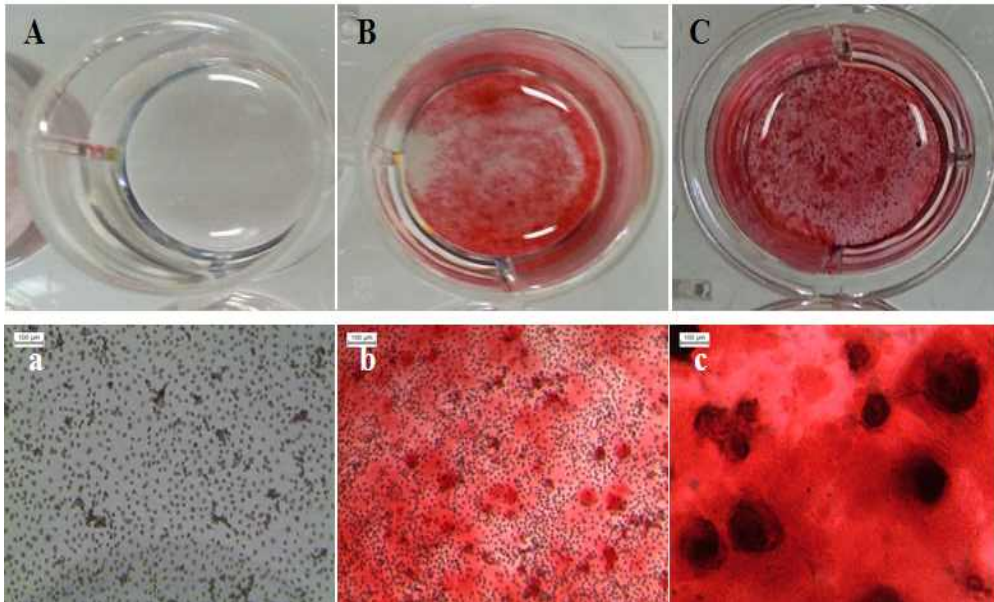


그림 177 우수검역견 카이저의 지방줄기세포의 골세포로의 분화확인

A, a) 미분화 대조군, B, b) 골세포유도 9일차, C, c) 골세포유도 16일차 결과로 골세포로 분화확인을 위해 각각 Alizarin Red S염색을 실시하였다. A, B, C) Alizarin Red S염색 후, 육안적 관찰, a, b, c) 현미경관찰에서 골세포분화 (b, c)시 mineral 침착물이 관찰되었다.

② 지방세포분화확인

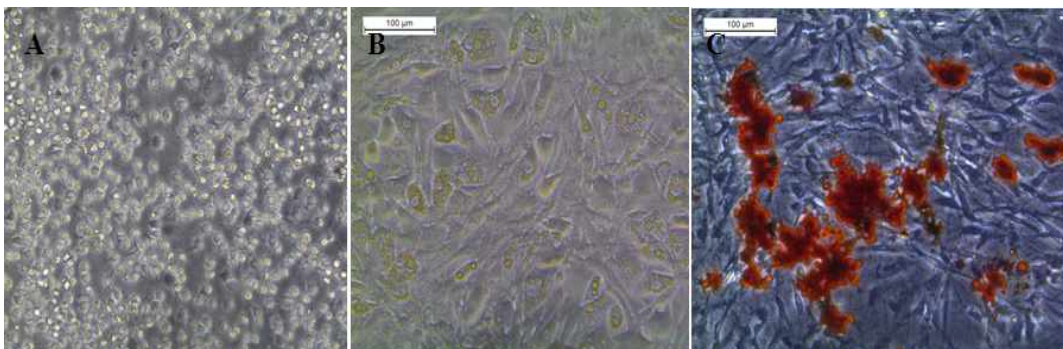


그림 178 우수 검역견 카이저 지방줄기세포의 지방세포 분화능 확인

지방분화 배지에서 지방세포로 분화 9일차에 세포내 지방과립의 축적을 확인하기 위해 Oil Red O 염색을 실시하였다. A) 미분화대조군, B) 지방분화유도 9일차 Oil Red

O 염색전 세포의 상태로 세포내 공포 형성을 확인하였다. C) Oil Red O 염색으로 붉게 염색되는 지방과립임을 확인하였다.

③ 연골분화확인

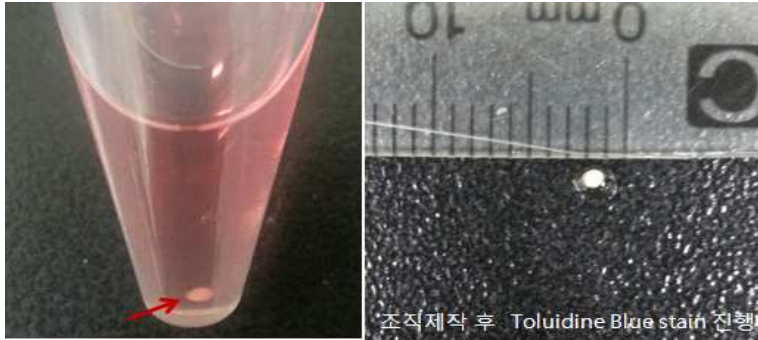


그림 179 우수검역견 카이저 지방줄기세포의 연골분화확인

연골분화배지에서 16일간 연골분화를 유도시 1mm 크기의 연골 aggregate을 확인하였다. 연골조직의 조직학적 특징인 Lacura를 확인하기 위해서 파라핀 조직 제작 후에 Toluidine blue로 염색을 진행중이다.

(마) 개 지방줄기세포의 표면항원 CD 90의 종특이성 확인

1차년도 (2012년) 보고서에서 대니의 지방줄기세포 표면항원형 분석결과에서 줄기세포의 양성표시인자로 알려진 endoglin receptor인 CD90에서 39.2%의 일부 양성반응을 나타내었다고 보고하였다. 카이저 지방줄기세포의 CD90에 대한 양성률이 97%이상의 강한 양성반응과 비교시 낮은 반응률이였다. 그러므로, 보관중인 대니의 지방줄기세포를 재 배양하여 표면항원에 대한 분석을 실시하였다. 그 결과, CD90인 경우, 91% 이상의 강한 반응을 보임을 확인하였다. 이는 1차년도에는 anti-human CD90, 2차년도는 anti-canine CD90을 이용하여 면역표현형을 분석한 결과로, 개 지방 줄기세포의 검증시에는 종특이성을 확인하여야 할 것으로 여겨진다.

표 80 대니의 지방줄기세포의 면역표현형의 분석

CD Marker	Passage 3	Passage 4
CD29	90.20	98.80
CD44	75.93	91.31
CD90	91.88	96.98
CD31	1.88	2.84
CD34	2.44	8.79
CD45	1.70	1.91
CD105	6.83	1.17

제 3 절 지방줄기세포 banking 표준화

1. 지방줄기세포 banking 조건의 표준화를 위해 다개체 비교를 통한 최적 조건 확립

가. 연구수행 방법

다개체를 이용해 보존기간에 따른 세포 활성 및 banking 안정성을 확인하였다. banking기간별 지방줄기세포의 세포의 안정성을 확인하기 위해서 일반견 3두 (K365, K374, K378)의 지방조직에서 줄기세포를 분리, 배양 (passage 1)하여 banking방법 ($2 \sim 3 \times 10^6$ cells/1ml/1vial, 세포보존액 : 10% DMSO를 포함한 RCME-P)에 따라 banking하였다. 그리고 banking기간 90일, 180일, 360일 후, 해동 직 후 세포 생존률, 세포의 크기를 측정하였다.

세포를 해동 및 RCME-P에서 배양한 후, 세포의 모양, 생존률, 크기 및 표면항원형 (FACs analysis)를 확인하였다. 보존기간 180일 때의 지방줄기세포는 Passage 2 ~ 6까지 계대 배양하여 세포의 모양, 크기, 생존률 및 표면항원형의 변화를 확인하고, passage 6에서의 최소 2종 이상의 분화능을 확인하였다.

또한 보존 후 배양 시 유전자형의 안전성을 확인하기 위해 180일 보관 후 passage 6까지 계대 배양 후, karyotype analysis를 하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 다 개체를 이용한 보존기간에 따른 세포 활성 및 banking 안정성 확인

뱅크기간별 지방줄기세포의 세포의 안정성을 확인하기 위해서 2012년 10월 일반견 3두 (K365, K374, K378)의 지방조직에서 줄기세포를 분리, 배양 (passage 1)하여 1차 년도의 수립한 뱅킹방법 ($2\sim 3 \times 10^6$ cells/1ml/1vial, 세포보존액 : 10% DMSO를 포함한 RCME-P)에 따라 뱅킹하였다. 뱅킹기간 90일, 180일, 360일 후, 해동 및 배양 후, 세포의 생존률, 세포의 크기, 세포의 표면 항원형 (FACs analysis) 및 2중 이상의 분화능을 확인하였다.

뱅크기간별 해동직후의 세포의 생존률을 비교 시, 해동직후의 세포 생존률은 180일 보관 일 까지는 90%이상의 생존률을 보였으나, 360일 보관 시에는 $77.7 \pm 1.5\%$ 로 감소하여, 뱅킹기간에 따라 세포 생존률에 영향을 주는 것으로 보이나 세포치료제 생존율 평가기준인 70% 이상으로 뱅킹 후 세포 배양 시 세포 성장에는 문제가 없는 것으로 판단되었다.

표 81 뱅킹 기간별 세포 해동직후의 세포크기 비교

Cell size (μm)	Cryopreservation period		
	90 days	180 days	350 days
K 365	13.5	13.5	13.3
K 374	15.2	12.7	14.3
K 378	13.2	12.8	13.7
Average (\pm S.D)	14.0 ± 1.1	13.0 ± 0.4	13.8 ± 0.5

세포의 크기는 평균 $13.0 \pm 0.4 \sim 14.0 \pm 1.1 \mu\text{m}$ 로, 이는 뱅킹기간에 상관없이 유지되는 것으로 판단되었다.

(2) 뱅킹기간별 배양 후 세포 생존률 및 세포크기의 비교

표 82 banking기간별 세포 배양 후 세포 생존률

Viability (%, at passage 2)	Cryopreservation period		
	90 days	180 days	350 days
K 365	81.0	97.2	85.9
K 374	81.5	94.6	91.6
K 378	85.2	85.7	86.6
Average (± S.D)	82.6 ± 2.3	92.5 ± 6.0	88.0 ± 3.1

banking기간 90, 180 및 350 일차에 개 지방줄기세포 (passage 1)를 해동하여 동일한 배양 배지 (RCME-P)에서 배양한 후 (passage 2)에서 세포 생존률을 측정하였다. banking기간 90일차의 배양 후 세포 생존률은 동일 개체의 해동직후의 생존률이 평균 95.5% 보다 평균 82.6%이었으나, 180 일차에서는 해동직후의 생존률 평균 91.9%와 유사한 평균 92.5%의 세포 생존률이었다. 350일차의 결과에서는 해동직후의 생존률 평균 77.7%에서 배양 후 평균 88.0%로 생존률이 상승하였다.

표 83 banking기간별 세포 배양 후 세포크기 변화

Cell size (µm, at passage 2))	Cryopreservation period		
	90 days	180 days	350 days
K 365	13.6	15.6	13.7
K 374	12.5	14.7	11.4
K 378	11.9	14.3	11.6
Average (± S.D)	12.7 ± 0.9	14.9 ± 0.7	12.2 ± 1.3

냉동보관기간별로 개 지방줄기세포(passage 1)를 해동하여 동일한 배양배지 (RCME-P)에서 배양한 후, 세포크기를 측정하였다. 배양 후 (passage 2) 세포의 크기를 측정하였다. **세포의 크기는 banking기간과는 상관성이 없는 것으로 판단**되었다.

(3) banking기간별 세포표면항원형의 변화

개 지방줄기세포를 banking 후 배양을 진행하여 Passage 3에서의 지방줄기세포의 표면 항

원형을 분석하였다. 아래의 표 및 그림과 같이 CD29, CD 44, CD 90에서는 95% 이상의 강한 양성 발현률을 보였으며, CD 31, CD 34, CD 45은 5% 미만의 발현률을 보였다. CD 105인 경우는 banking기간별로 변화가 있었으나, Oh H.J et al. (Theriogenology, 75:1221-1231, 2011)의 CD 105에 대해서 6%의 발현률과 비교 시 유사한 결과로, 개체 차이에 의한 것으로 판단되었다. 그러나, 본 보고서에서 사용된 항체는 anti-human CD105이므로, 개 지방줄기세포의 표면 항원형 마커 및 발현률의 기준 선정을 위해서는 anti-canine CD105 항체에 대한 검증이 필요할 것으로 판단되었다.

Immunophenotype analysis (%, passage 3)	Cryopreservation period		
	90 days *	180 days	360 days
CD29	99.80 ± 0.21	98.99 ± 0.05	10월 말 결과
CD44	99.93 ± 0.07	97.77 ± 0.72	
CD90	98.73 ± 1.63	99.95 ± 0.03	
CD31	0.59 ± 0.24	0.64 ± 0.28	
CD34	2.26 ± 1.23	0.26 ± 0.1	
CD45	0.69 ± 0.36	0.27 ± 0.15	
CD105	6.40 ± 4.29	1.7 ± 0.87	

Data = mean ± S.D (N=3, * N=2)

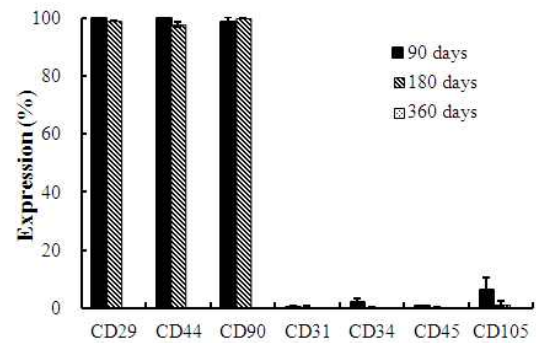


그림 180 banking기간별 세포 표면항원형의 변화

(4) banking 후, 배양 시 계대에 세포활성 안전성 확인

(가) banking 180일 후, 배양에 따른 개 지방줄기세포의 형태의 변화

banking한 개 지방줄기세포주의 임상에 적용할 수는 충분한 세포수를 안정적으로 공급가능한지를 확인하기 위해 180일 banking 후, passage 6까지 계대배양을 실시 하였을 때의 세포의 생존율, 크기 및 표면항원형의 변화를 조사하였다. 결과는 아래 그림들과 같으며 **개 지방줄기세포의 세포형태의 계대별 차이는 없었다.**

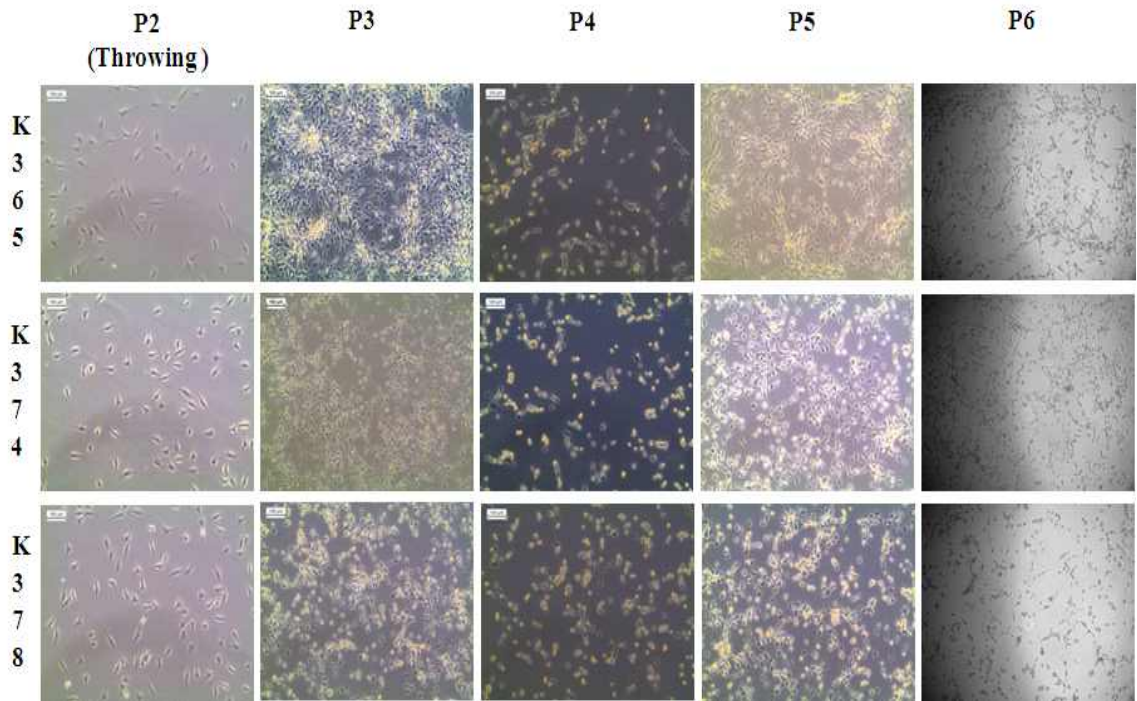


그림 181 세포의 형태

(나) 배킹 180일 후, 배양에 따른 개 지방줄기세포의 생존률 및 세포크기의 변화

계대별 세포의 생존률은 개체간의 차이는 있으나, passage 5부터 저하되는 양상을 보였으며, 개체간의 차이가 있었다. 자세한 결과는 아래 그림들에 나타내었다.

표 84 180일 배킹 후 세포 배양 시 계대별 세포 생존률의 변화

Viability (%)	Throwing (P1)	P2	P3	P4	P5	P6
K 365	92.7	97.2	93.0	93.6	88.4	88.6
K 374	92.8	94.6	95.9	90.5	90.6	90.8
K 378	90.1	85.7	92.8	91.2	84.4	74.5

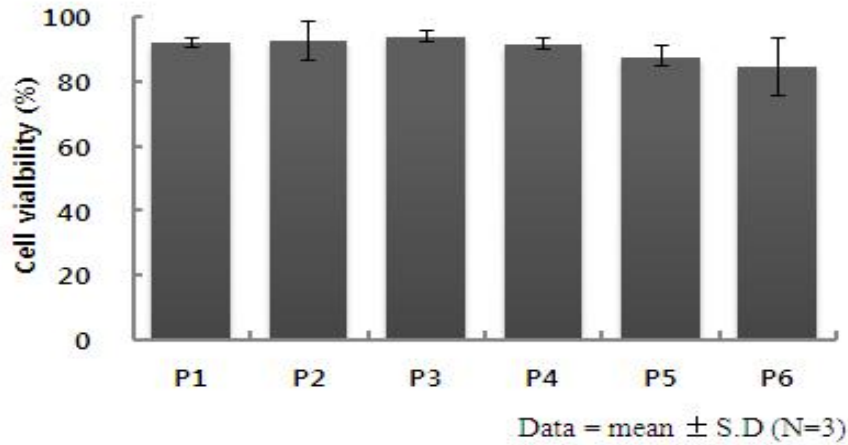


그림 182 180일 बैं킹 후 세포 배양 시 계대별 세포생존률의 변화

표 85 180일 बैं킹 후 세포 배양 시 계대별 세포 크기의 변화

Cell Size (μm)	Throwing (P1)	P2	P3	P4	P5	P6
K 365	13.5	15.6	14.8	15.3	15.8	15.7
K 374	12.7	14.7	14.1	14.0	16.5	14.9
K 378	12.8	14.3	14.0	13.9	15.3	13.2

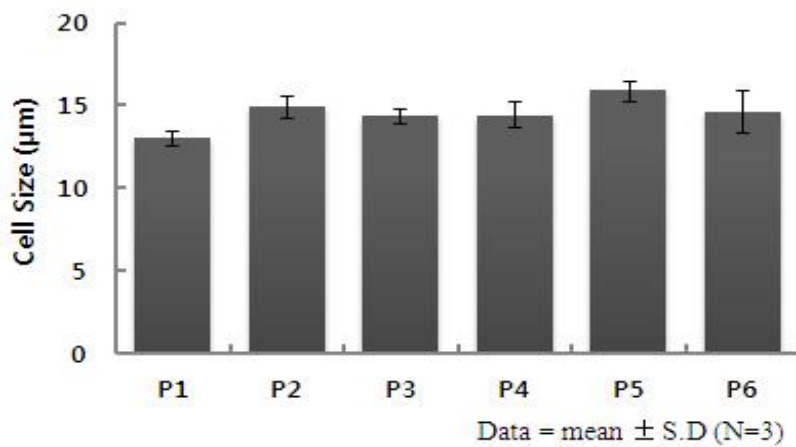


그림 183 180일 बैं킹 후 세포 배양 시 계대별 세포크기의 변화

계대별 세포의 크기는 배양이후에 해동직후 (passage 1)보다 직경이 커졌으나, 계대간의 유의적인 차이는 없었다.

(다) बैं킹 180일 후, 세포 표면항원형의 변화

세포 배양 후 passage 3, 6의 세포 표면 항원형을 비교 시, 아래의 표와 그림에서 처

림, CD29, CD 44, CD 90에서는 95% 이상의 강한 양성 발현률을 보였으며, CD 31, CD 34, CD 45 및 CD 105에서 5% 미만의 발현률을 보였다.

Immumophenotype analysis	Passage 3	Passage 6
CD29	98.99 ± 0.05	99.39 ± 0.51
CD44	97.77 ± 0.72	98.63 ± 0.99
CD90	99.95 ± 0.03	99.31 ± 0.25
CD31	0.64 ± 0.28	0.86 ± 0.38
CD34	0.26 ± 0.1	2.54 ± 0.41
CD45	0.27 ± 0.15	0.48 ± 1.63
CD105	1.7 ± 0.87	3.25 ± 1.26

Data = mean ± S.D (N=3)

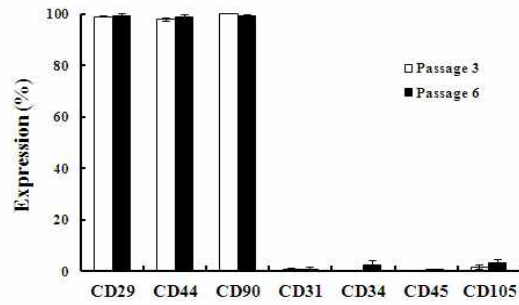


그림 184 180일 बैं킹 후 세포 배양 시 계대별 세포 표면 항원형의 변화

(라) बैं킹 180일 후, 분화능 확인

보존기간 180일 때의 지방줄기세포를 passage 6까지 계대배양을 진행하여 개지방줄기세포의 연골분화능 및 신경분화능을 확인하였다.



그림 185 180일 बैं킹후 세포 배양시 6계대에서의 연골분화능 확인

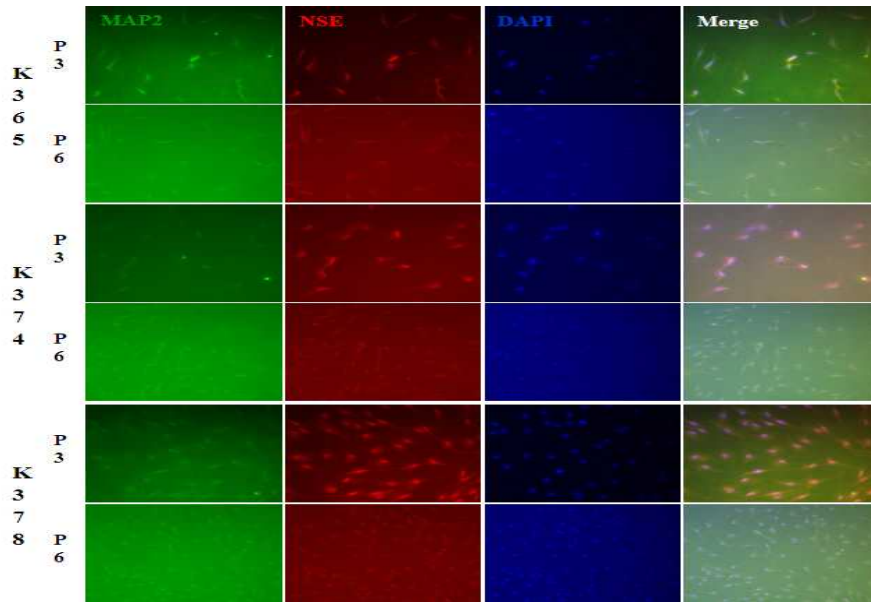


그림 186 180일 banking후 세포 배양시 3, 6계대에서의 신경분화능을 확인. 신경세포로 분화하는 신경세포 특이항원을 Map2, NSE 항체를 이용하여 면역염색을 실시하였다.

(5) banking 180일 후, 유전자형의 안전성

그림 187 세포핵형 분석결과

개 지방줄기세포의 बैं킹의 유전자형의 안전성을 확인하기 위해, 180일 बैं킹 보전 후 이를 Passage 6까지 계대배양한 다음, 핵형분석 (Karyotype analysis)을 분석업체 (젠덱스, 서울)에 의뢰하여 실시한 결과, 세 개체 (K 365, K374, K378) 모두 정상핵형임을 확인하였다.

2. 지방줄기세포 बैं킹 품질관리 확립

가. 연구수행 방법

(1) 개 지방줄기세포 품질관리의 확립

(가) 무균시험 검사법 마이코플라스마 검사법의 구축

무균검사법의 구축은 직접법 및 멤브레인 필터법에 의한 동물지방 입고, 지방줄기세포 배양, 줄기세포 बैं킹 및 공급과정에 적용하여 안전한 지방줄기세포의 품질관리 프로세스를 확립하였다.

직접법은 다음과 같은 방법을 사용하였다.

- ① 시험할 검체를 900ul씩 세균용배지(Thio-ST)와 진균용배지(TSB-ST)에 직접 접종하였다.
- ② 음성 대조군과 접종된 배지를 세균용 Incubator(30~35°C), 진균용 Incubator(20~25°C)에서 각각 배양하고, 14일간 미생물의 증식유무를 육안으로 관찰하였다.
- ③ 최종결과를 확인하고, 미생물의 증식이 확인되지 않을 경우 적합으로 하였다.

멤브레인 필터법은 다음과 같은 방법을 사용하였다.

- ① 시험할 검체(세포배양액)를 10ml씩 멤브레인에 여과한 후에 이를 세균용배지(Thio-ST)와 진균용배지(TSB-ST)에 각각 넣는다.
- ② 이를 세균용 Incubator(30~35°C), 진균용 Incubator(20~25°C)에서 14일간 배양한 후, 미생물의 증식유무를 육안으로 관찰하였다.

마이코플라스마 검사법은 다음과 같은 방법을 사용하였다.

- ① 마이코플라스마 부정시험인 ALERT법을 이용하였다. MycoAlert assay kit를 이용하여 시험방법에 따라 반응을 시킨 후, Luminometer로 측정하여 확인하였다.
- ② 반응 전, 후의 측정값이 ratio가 1이 넘지 않고, %SD값이 10% 이내일 경우 적합으로 판정하였다.

(나) 무균검사 및 마이코플라스마 검사 프로세스에 대한 검증

품질관리 시스템에 대한 검증을 위해 동일한 샘플 (K365, K374, K378)를 배양한 후, 이 배양액을 자체 (품질관리부서) 및 외부병성감정업체에 무균 검사 및 마이코플라스마를 각각 의뢰하여 그 결과를 비교하였다.

나. 연구수행 결과

본 업체는 사람지방조직의 입고, 분리, 배양단계 및 임상에 적용할 수 있는 세포주의 품질을 검증하기 위한 단계별 품질관리 프로세스를 확립하고 있다. 이러한 기술 및 시스템은 우수검역건의 지방세포주에 대해서 뿐만 아니라, 여러 개체의 개 지방 및 지방줄기세포주에 대해 개 지방조직의 입고, 배양, 분리단계 및 세포주의 공급단계의 품질관리에 적용하고 있다.

시스템에 대한 검증을 위해 동일한 샘플 (K365, K374, K378)의 배양액을 자체 및 외부 병성감정업체에 의뢰하여 무균 검사 및 마이코플라스마에 대한 검사를 실시하였다. 그 결과, 자체의 무균 및 마이코플라스마 검사는 외부병성감정업체와 동일하게 음성임을 확인하였다. 이는 자체의 **개 지방줄기세포 분리, 배양 및 banking에서의 무균 및 마이코플라스마 검사에 대한 시스템의 양호함을 증명**하였다.

A

완제품 시험 성적서			
제 품 명	Conne ADMSC	고객 명	-
제조 번호	K365	제조 일자	2013. 05. 23 ~ 2013. 05. 24
품질 번호	QK365	시험 일자	2013. 05. 20 ~ 2013. 06. 10

종류시험	기준	결과	판정
성상	이백색의 세포집단	-	합격/생략
세포수	2.0 × 10 ⁶ /ml 이상	-	합격/생략
생존율	70% 이상	-	합격/생략
무균시험	균이 검출되지 않아야(음성) 함	음성	합격/생략
검도확인	0.551/μl 이하	-	합격/생략
미이코플라스마	Alert test 만용주/만용진 값이 1미리(음성)	음성	합격/생략
(인발시험)	PCR test 268-277bp에서 밴드가 관찰되지 않아야 함	-	합격/생략
확진시험	CD73 80% 이상	-	합격/생략
	CD90 80% 이상	-	합격/생략
승도시험	CD31 5% 미만	-	합격/생략
	CD34 5% 미만	-	합격/생략
	CD45 5% 미만	-	합격/생략

최종판정 3=12, 0=0, 1=0
 판정일자 2013. 06. 10
 제조관리책임자 이 *[인도]*
 품질관리책임자 이 *[인도]*
 공장장 이 *[인도]*

B

미생물 검사 결과서				관우번호 : 13-2115		
[9348-524 충북 증평군 오송읍 오송테크 6길 43 Tel. 043-249-7300 Fax. 043-249-7393]						
접수일자	2013년 6월 29일	주요일	화요일	검사번호	RNL1110 (고양순 1호)	
작성일자	2013년 6월 31일	검요일	사요일	시료번호	세포배양액 3점	
검사 결과						
시료명	배양 조건		결과			
	시료명	배양온도	배양시간	복원시간	검출수(결과확인)	
K374	1	25일 25일	37 °C	15:00	25일 21일 15:00	불균음
	2	25일 25일	37 °C	15:00	25일 21일 15:00	불균음
	3	25일 25일	37 °C	15:00	25일 21일 15:00	불균음
K378	1	25일 25일	37 °C	15:00	25일 21일 15:00	불균음
	2	25일 25일	37 °C	15:00	25일 21일 15:00	불균음
	3	25일 25일	37 °C	15:00	25일 21일 15:00	불균음
K365	1	25일 25일	37 °C	15:00	25일 21일 15:00	불균음
	2	25일 25일	37 °C	15:00	25일 21일 15:00	불균음
	3	25일 25일	37 °C	15:00	25일 21일 15:00	불균음
검사 방법		검사 항목		결과		
K374		10 ⁶ CFU/ML 300.		불균음		
K378		10 ⁶ CFU/ML 300.		불균음		
K365		10 ⁶ CFU/ML 300.		불균음		
시험 소견 * 해당 샘플은 일반 미생물 및 10 ⁶ CFU/ML 300. 불균음은 확인되었으나 추가 미생물 유전자 시험도 확보된 검사결과를 진행하지 않았습니다.						
시험원 : 연우원 바이오 본 검사서는 최첨단 시료의뢰 한하여, 검사 결과는 수송 및 발주된 용도로 사용될 수 있습니다. Tel. 2009-7700 가축 병성 감 정 및 시 기 관						

그림 188 개 지방줄기세포 배양액에 대한 무균 및 마이코플라스마 검사 결과. A) 자체 B) 외부업체

제 4 절 재복제탐지건의 지방줄기세포의 분리, 배양 및 줄기세포 검증

1. 재복제탐지건의 지방줄기세포의 분리, 배양 및 줄기세포 검증

가. 연구수행 방법

(1) 재복제탐지건의 지방줄기세포의 분리, 배양, banking

우수 검역건 대니의 재복제건 April의 지방줄기세포주의 확립 및 보관하였다. April의 복부의 피하지방조직에 1:4 ~ 1:5 비율로 4% antibiotics를 포함한 멸균생리식염수 (PBS)를 넣고 흔들여 혈액 및 지방과립 등을 세척하여 지방조직만을 남게 하였다. 이를 3회 반복하였다. 세척된 개 지방조직을 60 mm petridish에 옮기고, 1 mg/ml collagenase를 넣고, 멸균된 미세가위를 이용하여 조직을 잘게 자른다. 이를 50 ml conical tube에 옮긴 후, 지방조직 1 g 당 4 ml의 1 mg/ml collagenase 를 넣은 후, 37 °C의 항온교반기에서 60분간 교반하면서 조직을 처리하였다. 100 μ m striner를 이용하여 걸러내어 분해되지 않은 조직을 걸러내어 버리고 나머지 분해된 조직을 원심 분리하여 세포 분획을 얻었다. 상층액을 제거하고 세포분획을 회수하고, 배양배지 (RCME-P)에 넣어 잘 부유시킨 후, 배양 flask에 옮기고, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 다음 날 배양접시에 부착되지 아니한 세포 또는 프리오일을 제거 한 후 동물 지방줄기세포 배양배지 (RCME-P : high glucose DMEM 및 10% FBS 등 함유하는 배지)를 추가한 후, 컨플루언시 80 ~ 90%까지 2 ~ 3일 간격으로 배지를 교환하면서 배양하였다. 유세포 분석기 (BD, FACSCalibur)을 이용하여 줄기세포 표지자인 CD44와 CD90과 면역세포 표지자인 CD34를 확인하여 줄기세포의 특징표지인자를 확인하였다. 이렇게 확립한 세포주는 10% DMSO가 첨가된 지방줄기세포 배양배지(RCME-P)에 부유시킨 후, 2 ~ 3 × 10⁶ cell/ml/vial로 분주하였다. controlled rate freezer에서 이용하여 동결한 다음 액체질소탱크에 보관하였다.

(2) 우수 검역 탐지건 및 재복제건의 지방줄기세포 검증 및 비교

분리 보관중인 우수검역건 대니 및 재복제건 April의 지방줄기세포를 RCME-P 배지를 이용하여 passage 3까지 계대배양을 하여 면역표현형 확인을 실시하여, 표면항원형의 변화를 확인하였다. 이때, 공여건 대니와 재복제건 April의 면역 표현형을 비교하여 확인하도록 하였다.

(3) 유전자 변이 검사

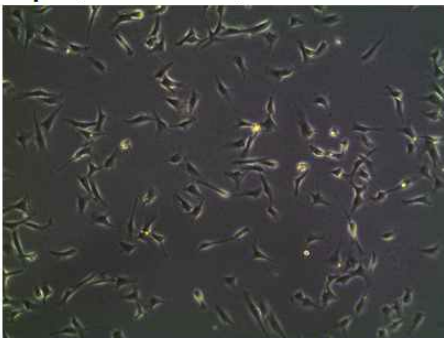
재복제건 April의 지방줄기세포의 경우 배양 후의 유전자 변이 검사를 통하여 유전자의 변이를 확인하도록 하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 재복제탐지건의 지방줄기세포의 분리, 배양, banking

2012년 3월 우수검역견 테니의 지방줄기세포주의 분리, 배양 및 보관에 이어 2014년 8월 13일 대니의 재복제건 April의 지방이 입고되었다. 이후 지방줄기세포주의 분리, 배양 및 보관을 통하여 banking을 진행하였다. 그 외, 태백의 지방줄기세포주의 분리, 배양 및 보관이 진행되었다.

April(DLM140004)



태백(DLM140003)

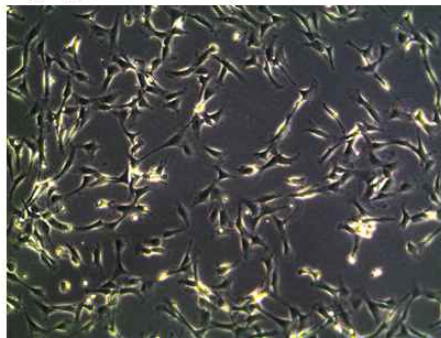
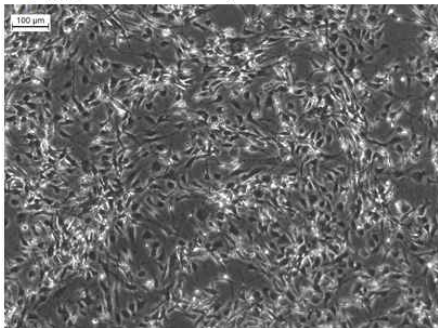


그림 189 공여견 대니의 재복제건 April 지방줄기세포(left), 태백 지방줄기세포(right) morphology

또한 우수검역견인 카이저의 지방에서 2012년 10월 16일 (DLM120007) 및 2013년 6월 10일 (DLM130005) 2차례 지방줄기세포를 분리, 배양 및 보관 후, 주관기관에 복제건 생산 및 관련연구에 공급 하였으며, 2013년 12월 8일 카이저의 복제건 수성(DLM130007), 지구(DLM130008) 2차례 지방줄기세포를 분리, 배양 및 보관 후, 역시 주관기관에 재복제건 생산 및 관련연구에 공급하였다.

수성(DLM130007) P3



지구(DLM130008) P3

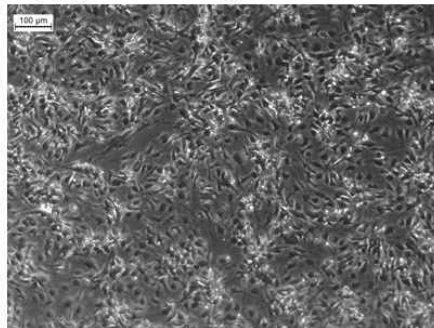


그림 190 카이저의 복제건 수성(left), 지구(right)의 지방줄기세포 morphology

(2) 우수 검역 탐지건 및 재복제건의 지방줄기세포 검증 및 비교

2014년 8월에 분리, 보관한 April 지방줄기세포 (passage 3)와 공여건 대니 지방줄기세포 (passage 3)를 RCME-P 배지를 이용하여 배양, 세포주기 (cell cycle) 분석을 통하여 세포분열능을 비교 확인하고, FACS분석을 통하여 줄기세포 특이적인 면역표현형을 확인하였다. 또한 2013년 12월 8일 분리한 **카이저의 복제건 수성, 지구 지방줄기세포를 बैं킹 후 3개월, 6개월, 9개월간의 줄기세포 면역표현형 및 세포 성장능을 확인**하였다.

유세포 분석기 (BD, FACS Calibur)를 이용한 면역표현형을 확인을 진행하였다. 줄기세포 표지자는 다음의 표의 항체들을 이용하였다.

표 86 개 지방유래 줄기세포의 세포 면역표현형 확인에 이용한 항체 정보

	CD Marker	Cat. No
CD 29	Anti Rat - CD29 (F)	BD 555005
CD 44	Anti canine - CD 44 (F)	11-5540-42 (eBioscience)
CD90 (Thy 1.1)	Anti canine - CD 90	MCA1036G
CD 31	Anti canine - CD 31 (F)	orb15291
CD 34	Anti canine - CD 34 (P)	BD 559369
CD 45	Anti canine - CD 45 (F)	11-5450-42 (eBioscience)
CD 105	Anti canine - CD 105 (F)	orb102264

공여건 대니와 재복제탐지건 April의 지방줄기세포는 분석시 줄기세포 표지자인 CD29에서 99.98% 이상, endoglin receptor인 CD44에서 100%, 줄기세포 표지자인 CD90에서는 99.92% 이상의 양성을 보였다. 조혈모 세포 표지자인 CD34에서는 3.34% 이하의 반응을 보였다. leukocyte 표지자인 CD45에서는 1.47% 이하로 반응하였다. 또한 CD31에서 3.03% 이하로 반응함을 확인하였다. 이를 통하여 공여건 대니와 재복제건 April 지방줄기세포의 면역표현형은 매우 유사함을 확인 할 수 있었다.

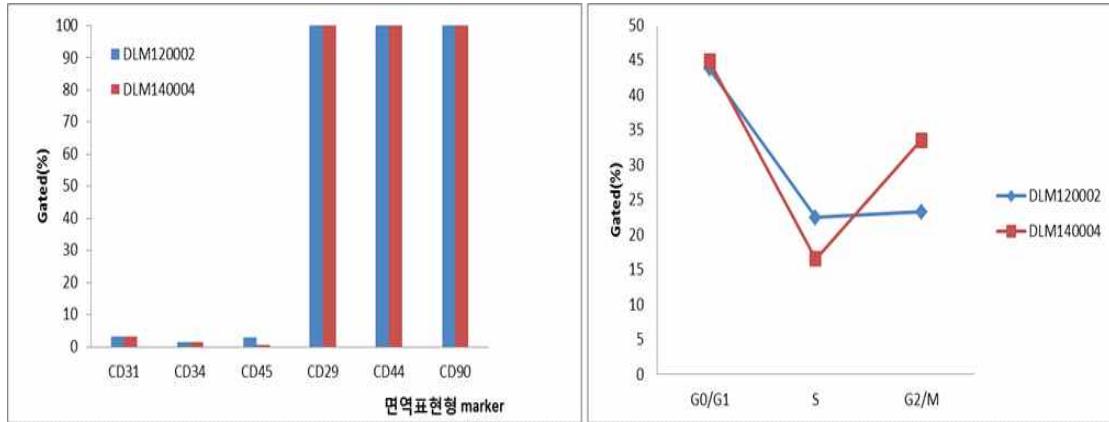


그림 191 공여견 대니(DLM120002)와 재복제견 April(DLM140004) 지방줄기세포의 면역표현형 비교(left)와 세포주기 패턴 비교(right)

공여견 대니와 재복제견 April의 세포분열 패턴을 비교하였을 때, 매우 유사한 패턴을 확인하였으며 April의 경우 세포추출 후 바로 진행을 하여서 S기가 짧고 G2/M기가 긴 성장패턴을 확인 할 수 있었으나, 그 차이가 매우 경미하여 유의성은 확인되지 않았다.

카이저의 복제견 수성, 지구의 면역표현형 분석결과는 Kang et al. (Stem cells and development, 17:681-694, 2008) 및 Oh H.J et al. (Theriogenology, 75:1221-1231, 2011) 에서 보고된 표면항원분석의 결과와, 이전 단계의 결과보고서와 같이 줄기세포 양성표시 인자인 CD29, CD44, CD90에서는 높은 반응률을 보였으며, 음성표시인자인 CD31, CD34, CD45에서는 낮은 반응율을 보여 수성, 지구의 지방에서 분리한 세포가 지방줄기 세포로써 동결보관이 지속적으로 진행되어도 그 표현형은 잘 유지됨을 확인되었다.

카이저의 복제견 수성과 지구의 성장률을 확인하였을 때, 수성의 S기가 지구의 S기보다 낮은 편이나 역시 차이가 경미하여 유의성이 없음을 확인하였다. 따라서 굉장히 유사한 패턴을 가지고 있음을 확인 하였다.

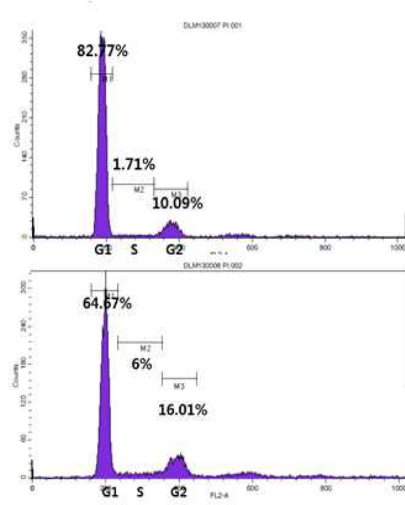
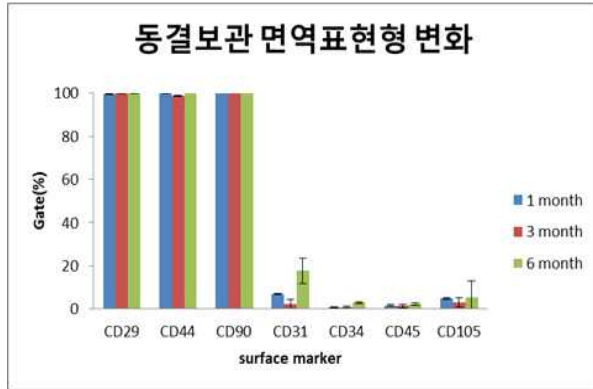


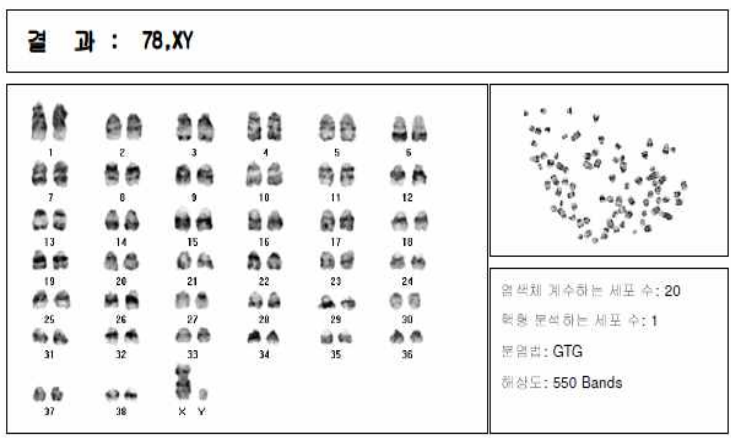
그림 192 카이저의 복제견 수성, 지구의 동결 보관 후 1개월, 3개월, 6개월차 면역표현형 변화(left)와 6개월차의 세포 주기 패턴 확인(right)

(3) 유전자변이 검사

공여견 대니의 재복제견 April의 지방줄기세포 배양 후 유전자 변이검사 (Karyotype)을 진행 한 결과 정상적인 핵형을 확인하였다.

세포유전학 결과 보고서

검 체 번 호 : CS2014-170	종 명 : Canine
이 름 : DLM140004 P3	검 체 종류 :
검 사 일 : 2014-09-15	의 료 기 관 : (주)케이스템셀
보 고 일 : 2014-09-16	의 료 자 명 : 고태경



의 견
염색체 분석 결과 정상 핵형입니다.

그림 193 대니의 재복제견 April의 핵형분석 보고서 결과 정상 핵형임을 확인

공여견 카이저의 복제견 수성, 지구의 지방줄기세포 유전학적 변이를 검사하기 위하여 karyotyping을 진행한 결과 모두 정상임을 확인하였다.



그림 194 카이저의 복제견 수성(left), 지구(right)의 핵형분석 결과 정상을 확인하였다.

제 5 절 세포공여견과 재복제 탐지견의 지방줄기세포의 능력의 정량적 상대적 비교

1. 세포공여견과 재복제탐지견의 지방줄기세포능력의 정량적 상대적 비교

가. 연구수행 방법

세포공여견과 재복제탐지견의 동일 계대에서의 줄기세포능과 연관된 유전자(OCT4, SOX2 등)의 발현 양상을 비교하고 평가하기 위하여 공여견 대니와 재복제견 April의 지방줄기세포에서 RNA를 추출, cDNA를 합성한 후 OCT4, SOX2, NANOG의 발현량을 확인하고 정량하도록 하였다.

나. 연구수행 결과

세포공여견 대니와 재복제탐지견 April의 동일 계대(P3)에서의 줄기세포 STEMNESS능과 연관된 유전자 OCT4, NANOG, SOX2를 확인하였다. 하우스키핑 유전인 GAPDH의 발현을 조사하여 이를 이용하여 OCT4, NANOG, SOX2의 발현을 normalization 하였다.

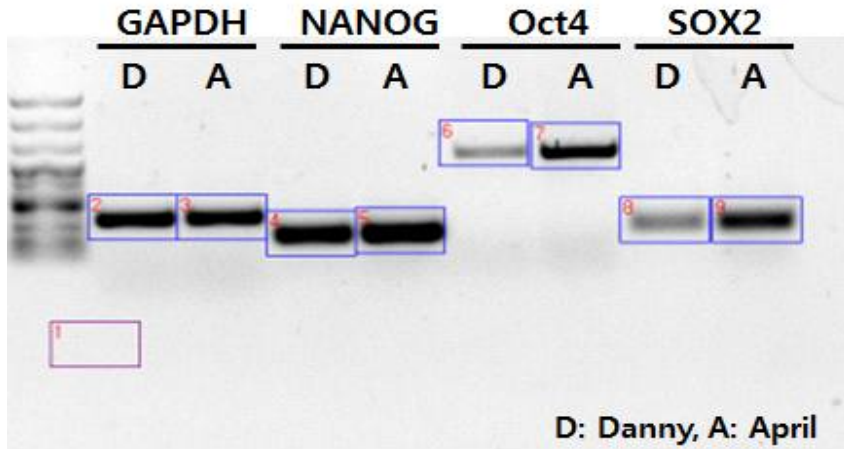


그림 195 대니와 April의 유전자 발현 비교 결과

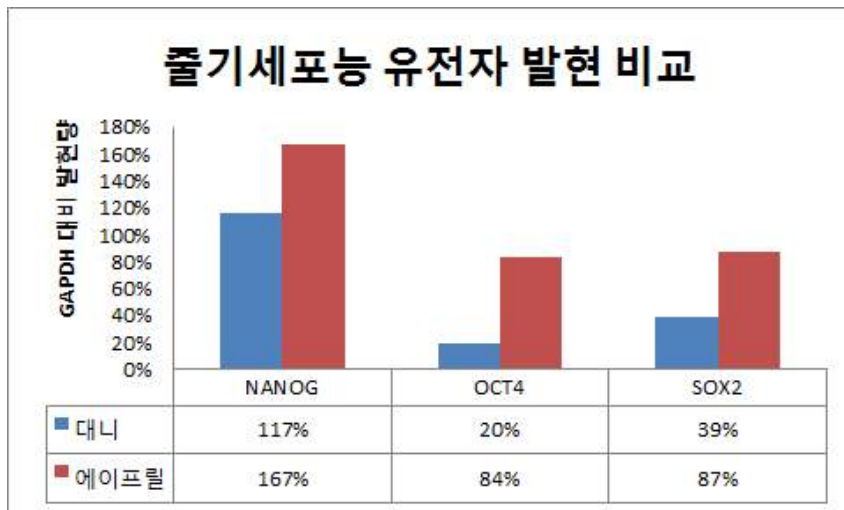


그림 196 대니의 April의 GAPDH(표준유전자) 대비 유전자 발현량 확인 및 상대 비교

줄기세포능 확인 결과, 공여견 대니의 줄기세포가 발현하는 줄기세포 STEMNESS 관련 유전자 (NANOG, OCT4, SOX2)의 발현량이 재복제견 April의 줄기세포에서의 발현량 보다 보다 높게 나타남을 확인하였다.

제 6 절 지방줄기세포의 분화능 정량평가법 개발

1. 지방줄기세포의 분화능 정량평가법 개발

가. 연구수행 방법

지방줄기세포의 지방세포분화능을 정량적으로 평가하기 위하여 세포의 수를 달리하여 분화를 확인 후 염색을 하여 LIPID가 염색이 되는지를 확인하였다. 이후 이 염색약을 추출하여 측정, 수치화 하도록 하였다. 지방줄기세포의 골세포분화능을 정량적으로 평가하기 위하여 세포의 수를 달리하여 분화를 확인 후 염색을 하여 calcium-Alizarin Red S가 형성되는지 확인하였다. 이후 이 염색약을 추출하여 측정, 수치화 하도록 하였다. 지방줄기세포의 연골세포분화능을 정량적으로 평가하기 위해 연골분화기전에 해당하는 요소들을 선정, 연골세포분화과정에서 얻은 CM을 대상으로 측정, 수치화하여 정량하였다.

나. 연구수행 결과

복제건 및 공여건 지방줄기세포의 수적 제한으로 인해 사람지방줄기세포를 이용하여 분화능 정량평가법을 개발하고 이를 개 지방줄기세포에 적용하고자 하였다.

(1) 지방줄기세포의 지방 세포 분화능 정량적으로 평가하기 위한 방법 개발

지방줄기세포의 분화능을 정량적으로 평가하기 위하여 지방세포분화능, 골세포분화능, 연골세포 분화능의 정량적 평가방법을 개발하도록 하였다. 먼저 지방세포분화능의 경우 millipore사의 SCR020 Adipogenic differentiation assay kit를 구매하여 사용하였으며, 분화 후 **Oil Red O solution으로 염색하여 관찰 한 결과 지방세포분화가 매우 잘 되었음을 확인**하였다.

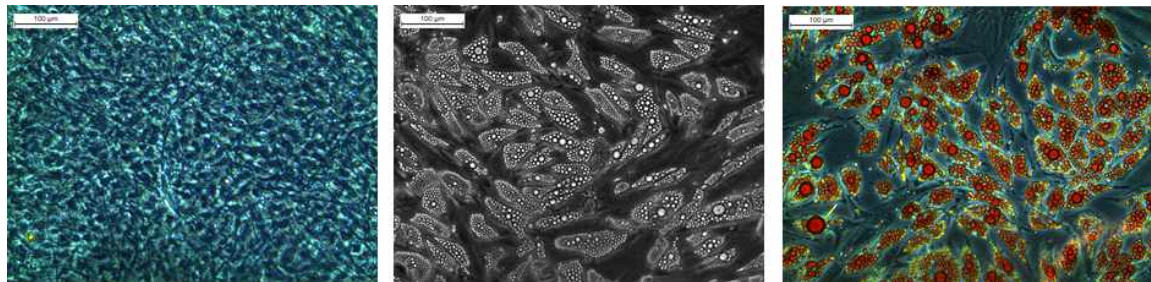


그림 197 사람유래 지방줄기세포의 지방세포분화. 분화배지미첨가대조군(left), 분화배지시험군 미염색 결과(center), 분화배지시험군 Oil Red O stain 결과(right)

아래 그림과 같이 염색을 이용한 시험 방법은 이상이 없음을 확인하였으며, 이를 보다 정량적으로 평가하기 위해 세포수를 달리하여 지방세포분화를 진행 후 Isopropanol을 이용하여 추출, 520nm에서 흡광도를 측정하여 정량하도록 하였다.

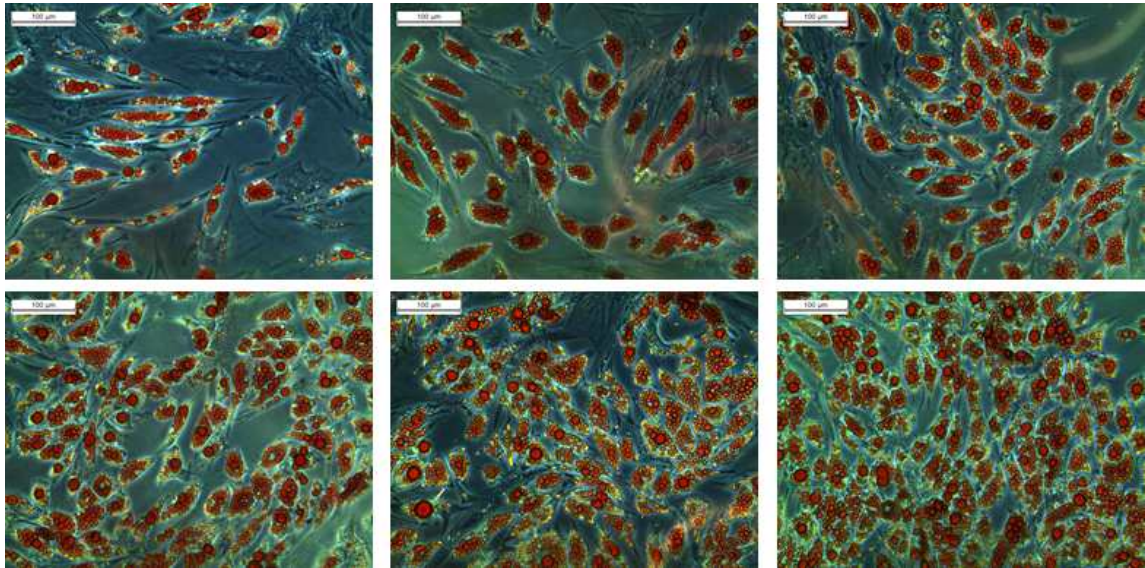


그림 198 사람유래 지방줄기세포의 지방세포분화 염색법 Validation을 위한 Oil Red O 염색 결과. 1250 cell/well (top left), 2500 cell/well (top center), 5000 cell/well (top right), 10000 cell/well (bottom left), 20000 cell/well (bottom center), 40000 cell/well (bottom right)

세포수를 달리하여 지방세포분화정도를 비교시험 한 결과, 세포 수에 따른 줄기세포의 지방세포분화 정도가 유의적으로 차이가 나는 것을 확인 할 수 있었다. 지방세포분화의 유의성은 앞서 말한 바와 같이 염색 이후에 추출법을 통하여 확인 하였다.

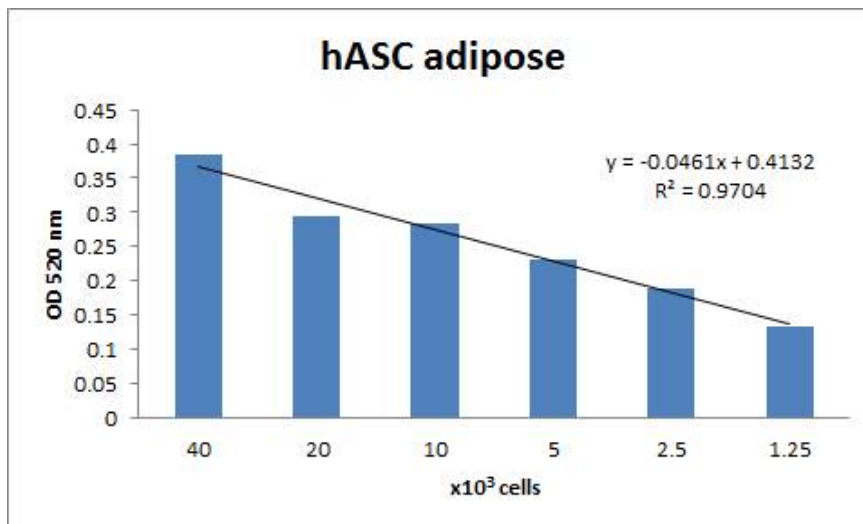


그림 199 사람유래 지방줄기세포의 지방세포분화 염색법 Validation을 위한 추출 정량법 결과

추출법을 이용하여 흡광도를 측정 한 결과 **지방줄기세포 수에 따라서 분화정도가 유의적으로 다르게 나타남을 확인**하였다.

(2) 지방줄기세포의 골세포분화능 정량적으로 평가하기 위한 방법 개발

지방줄기세포의 골세포분화능의 경우 MACS사의 골세포분화배지를 사용하였다. 21일 분화 진행 후 Alizarin Red S 염색을 진행 한 결과 대조군(미분화배지, 왼쪽)에 비하여 시험군(골세포분화배지, 오른쪽)에서 지방줄기세포가 골세포로 분화 된 것을 확인하였다.

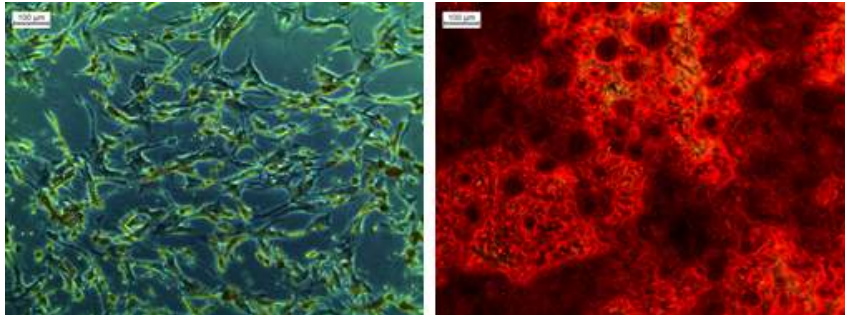


그림 200 사람유래 지방줄기세포의 골세포 분화능 확인. 분화배지미첨가대조군(left)과 분화배지첨가시험군(right)

이후 보다 정량적인 평가를 하기 위하여 지방줄기세포의 세포 수를 조절하여 골세포 분화를 유도하였고, 이후 세포 수에 따른 골세포 분화정도를 비교 확인하였고, 추출법을 이용한 흡광도 측정을 통해 골세포 분화에 대한 유의성을 확인하였다.

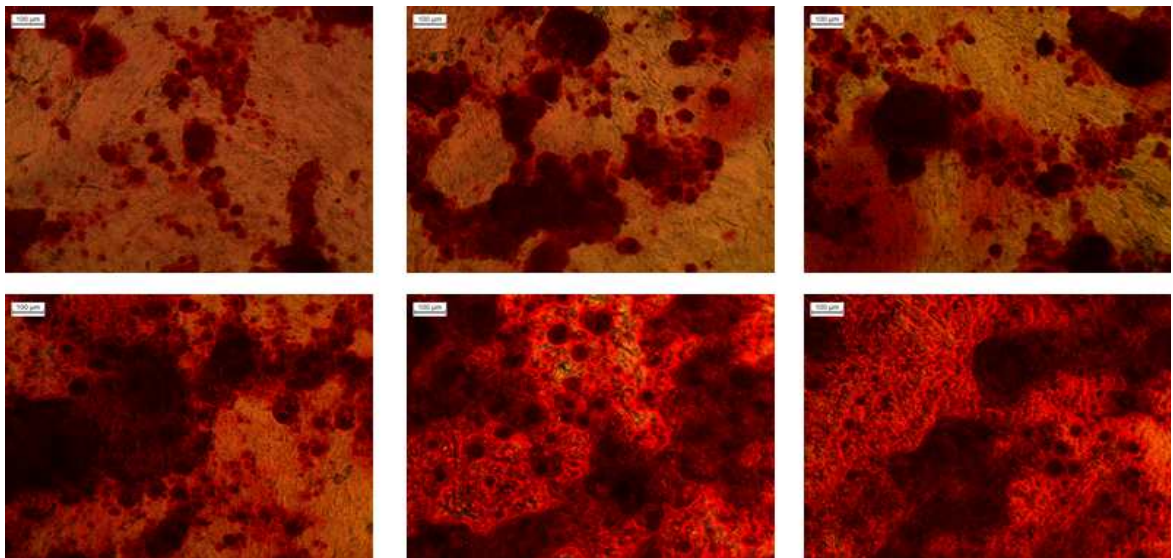


그림 201 사람유래 지방줄기세포의 골세포분화 염색법 Validation을 위한 Alizarin Red S 염색 결과. 1250 cell/well (top left), 2500 cell/well (top center), 5000 cell/well (top right), 10000 cell/well (bottom left), 20000 cell/well (bottom center), 40000 cell/well (bottom right)

그림과 같이 세포 수를 조절하여 골세포분화를 진행 한 경우 **세포수에 따라서 염색 및 추출 정도가 다름을 확인**하였으며, Alizarin Red S-Calcium 이 확연히 나타남을 보여주었다.

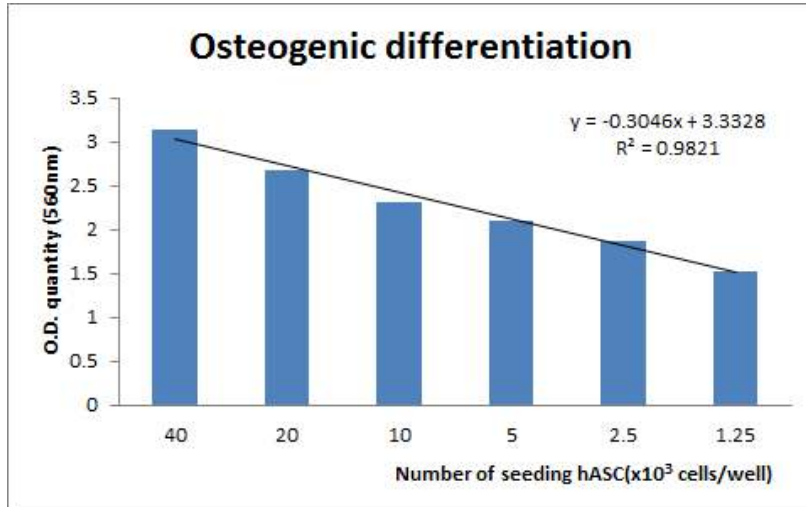


그림 202 사람유래 지방줄기세포의 골세포분화 염색법 Validation 을 위한 추출 정량법 결과

(3) 지방줄기세포의 연골세포분화능 정량적으로 평가하기 위한 방법 개발

지방줄기세포의 연골세포분화능의 경우 Lonza사의 연골세포분화배지를 사용하였다. 15 일 분화 진행 후 Toluidine blue 염색을 진행 한 결과 미분화배지 대조군(왼쪽)에 비하여 연골세포분화배지 시험군(오른쪽)이 연골세포로의 분화가 잘 진행 된 것을 확인하였다.

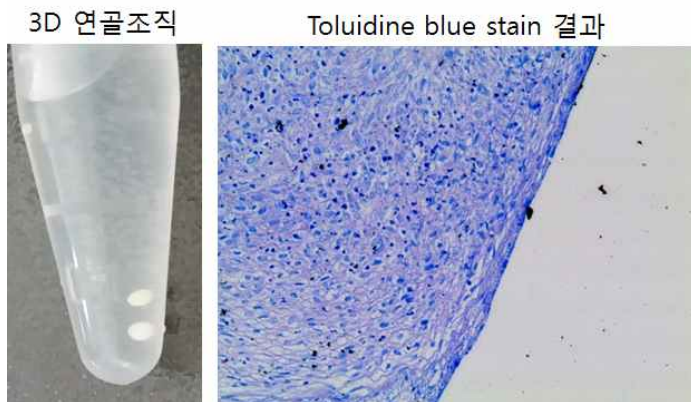


그림 203 사람유래 지방줄기세포의 연골세포분화 결과. 3D culture를 이용한 연골조직생성(left), 조직 단편 Toluidine blue염색 결과(right)

이후 보다 객관적으로 정량화된 데이터를 확인하기 위하여 연골분화기전에 해당하는 요소들을 선정, 이를 연골세포분화과정에서 얻은 CM에서 측정하여 이러한 요소들의 증감을 확인하도록 하고 정량하였다.

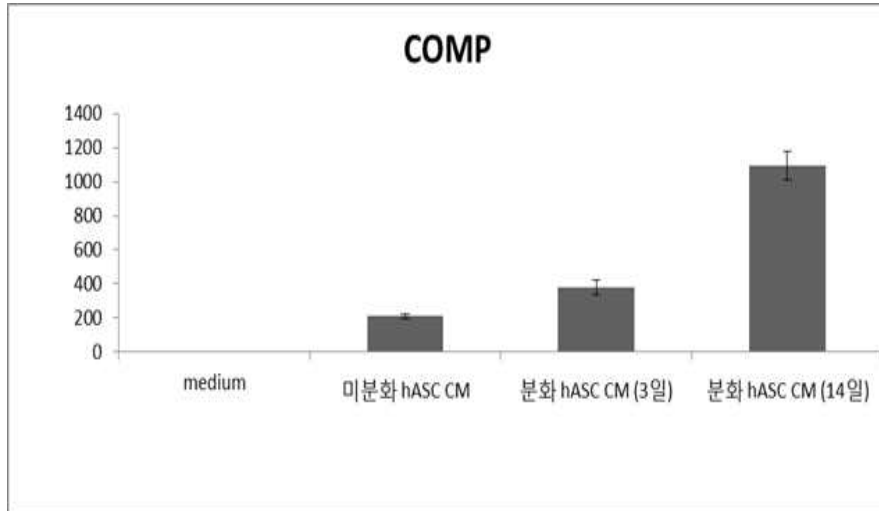


그림 204 사람유래 지방줄기세포의 연골세포분화 진행 중의 CM을 이용하여 Blank 대비 연골분화재생인자의 정량 값 (단위=pg)

시험 결과, COMP(cartilage oligomeric matrix protein)인자는 연골세포 전 분화과정에서 나타나는 연골재생기전 요소로써 연골세포 분화에 도움을 준다는 타 연구자의 결과를 확인하여 본 시험에 진행하였다. 그 결과 **분화 3일차, 14일차에서 control군(미분화hASC CM)에 비하여 유의성 있게 나타난 것을 확인**하였다.

제 7 절 세포공여견과 재복제탐지건의 지방줄기세포의 분화능 정량적 상대적 비교

1. 세포공여견과 재복제 탐지건의 지방줄기세포의 분화능 정량적 상대적 비교

가. 연구수행 방법

골세포분화능 염색확인법 및 추출법을 이용하여 원본견과 재복제건의 지방줄기세포의 분화능을 정량적으로 비교하도록 하였다.

나. 연구수행 결과

복제건 및 공여건 지방줄기세포의 수적 제한으로 인해 사람지방줄기세포를 이용하여 분화능 정량평가법을 개발하고 이를 개 지방줄기세포에 적용하고자 하였다.

(1) 지방세포 분화능 정량적 비교

개 지방줄기세포의 지방분화능 비교 시험결과 인간유래지방줄기세포의 지방분화능에 비해 분화유도능이 현저히 떨어지는 것이 확인이 되었고, 이에 여러 참고문헌을 바탕으로 지방유래 조건의 변화시험을 수행 하였다. 그 결과는 아래와 같다.

2x10⁴/cell 기준 분주 후 지방세포분화 유도시 사람유래지방줄기세포의 경우 매우 많은 지방세포가 생성되었음을 확인하였으나 개유래지방줄기세포의 경우 Oil Red O 염색을 통하여 분화의 양이 사람유래 지방줄기세포만큼 나타나지 않아 상대적으로 정량추출법이 용이하지 않아서, 지방세포분화 정량법이 아닌 골세포 분화능 정량법을 시험하였다.

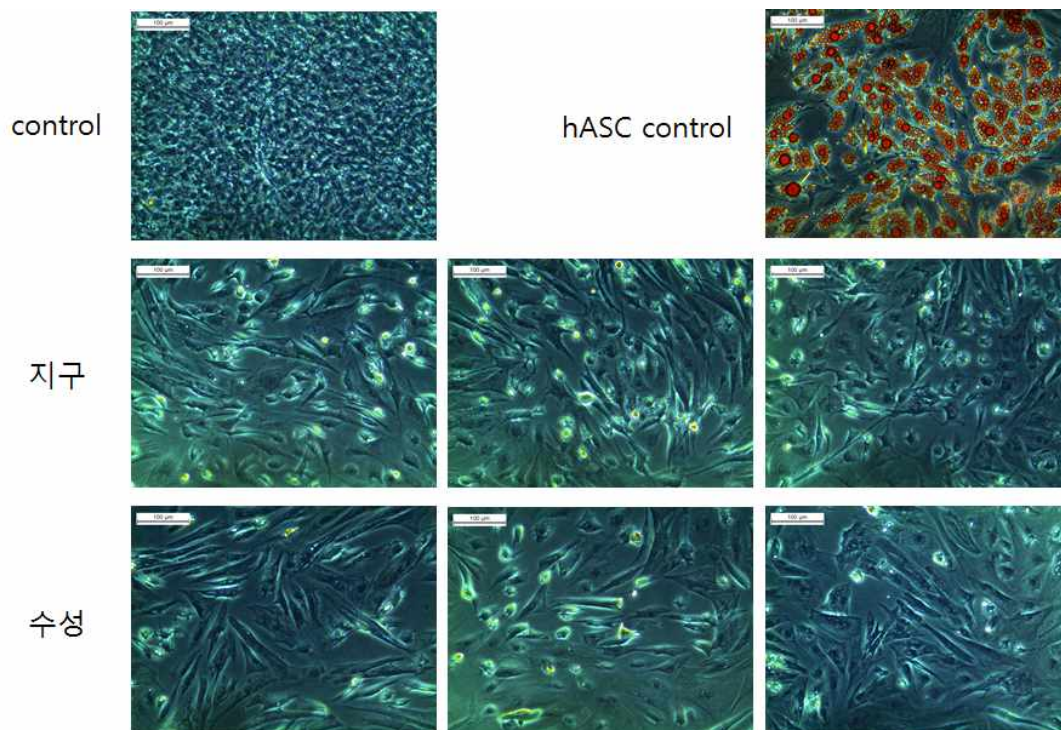


그림 205 사람유래 지방줄기세포의 골세포 분화 시험법을 적용한 개유래 지방줄기세포의 지방세포분화 시험법 결과.

(2) 골세포 분화능 정량적 비교

앞의 결과에 따라서 골세포분화능 정량화를 적용하였다. 개 지방줄기세포의 경우 사람 지방줄기세포와 달리 지방분화능이 보다 용이하지 않아 골세포분화능을 정량화 하도록 하였으며, 그 결과 사람 지방줄기세포의 골세포분화능과 동일한 결과를 얻었다.

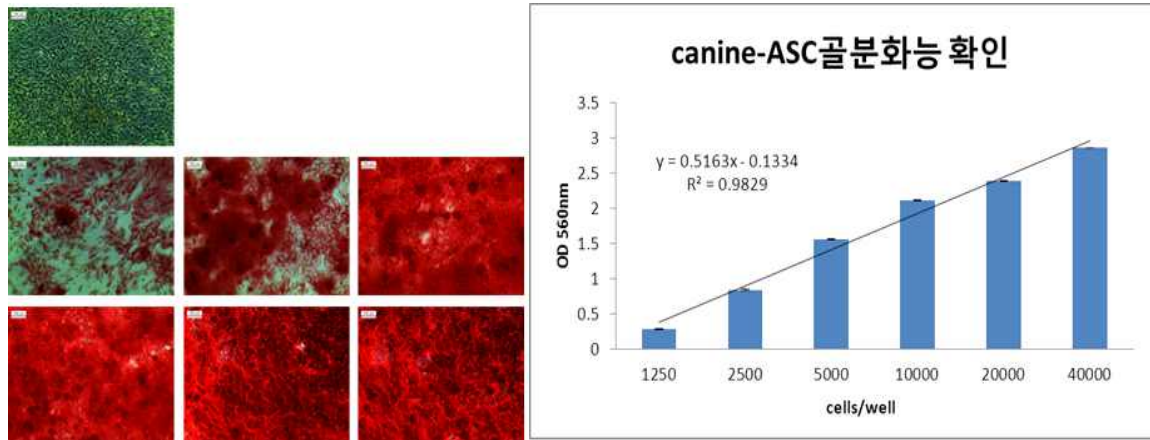


그림 206 사람유래 지방줄기세포의 골세포 분화 시험법을 적용한 개유래 지방줄기세포의 골세포분화 시험법 validation 결과. Oil Red O 염색 결과(left), 정량 추출 결과(right)

위 결과에 따라 개 지방줄기세포의 골세포분화능 정량법 진행이 가능함을 확인하였으며, 위 방법으로 세포공여건인 대니와 재복제건인 April의 골분화능 정량 평가를 진행하였다.

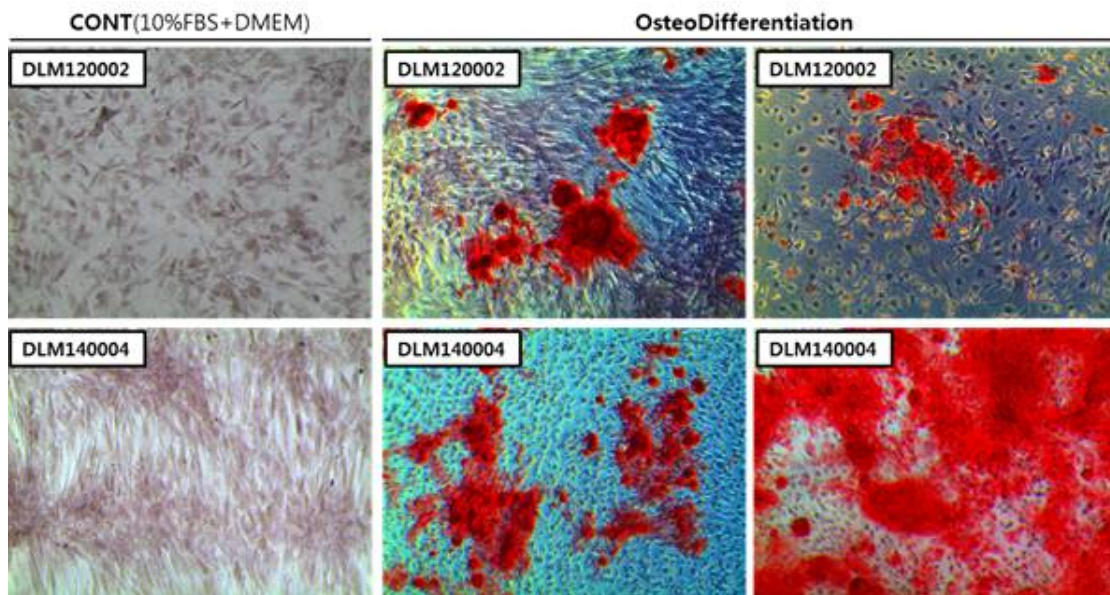


그림 207 골세포분화능 확인 사진. 공여건 대니(DLM120002)와 재복제건 April(DLM140004)의 Alizarin Red S stain 결과 모두 붉게 염색됨으로써 분화가 잘 진행되었음을 확인

각각의 줄기세포는 모두 골세포 분화가 잘 진행되어 확인 시험인 Alizarin Red S stain 을 통하여 붉게 염색된 것을 확인함으로써 골세포분화능이 잘 진행되었음을 알 수 있었다. 또한 이를 추출하여 560nm에서 측정 후 CONT값을 background(100%)로 두었을 때, 발현율을 확인 한 결과 모두 200% 이상 발현된 것으로 확인되었다. 다만, 원본건 대니의 줄기세포보다 April의 줄기세포에서 더 많은 분화가 이루어진 것을 확인하였다.

타 줄기세포에서 분화한 골세포를 이용하여 재검증하기 위하여 **공여견 카이저와 복제견 수성, 지구의 골세포분화능 상대적 비교를 실시하였다. 그 결과 매우 유사한 패턴 및 결과**를 얻을 수 있었다.

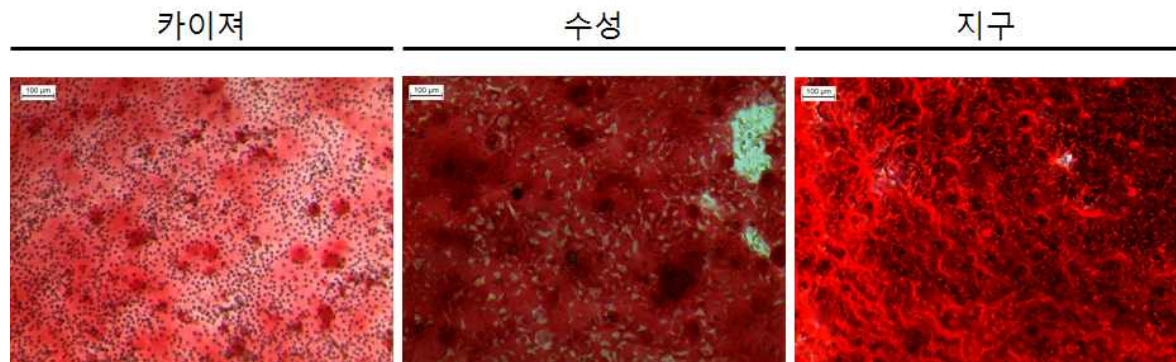


그림 208 타 개유래 지방줄기세포의 골세포 분화 확인. 카이저(left), 복제견 수성(center), 지구(right)

(3) 연골세포 분화능 정량적 비교

성립된 지방줄기세포의 연골세포 분화능확인법을 개 지방줄기세포에 적용한 결과 아래와 같이 15일 분화 진행 후 연골세포로의 분화가 진행되어 조직화 된 것을 확인 할 수 있었으며, 그 크기는 공여견 대니와 재복제견 April의 줄기세포 모두 비슷하였다.

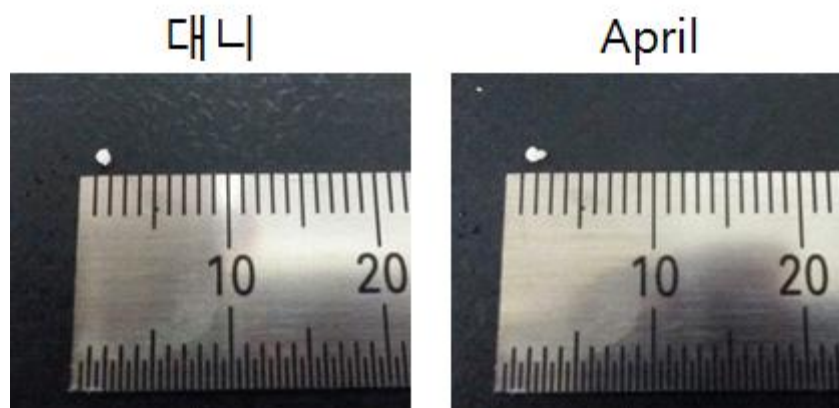


그림 209 대니와 April의 연골세포분화 후 생성된 연골조직 비교 결과. 대니(left), April(right)

이후 이 조직의 단편면을 Toluidine blue 염색을 하여 확인해 본 결과, 연골세포로의 분화가 잘 진행 된 것을 확인하였다.

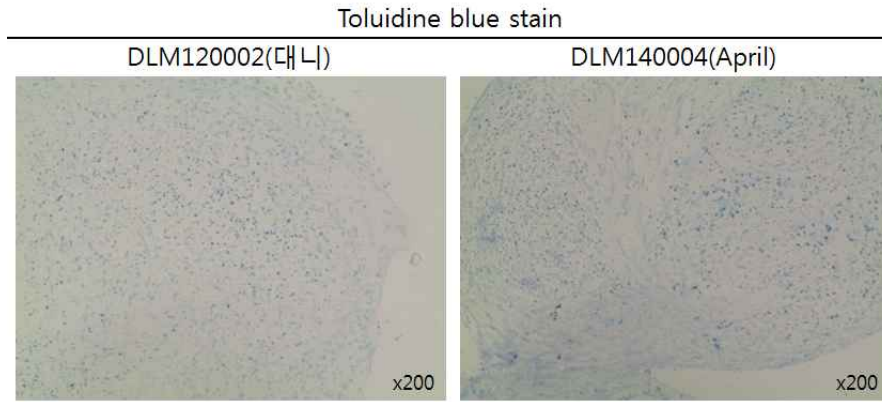


그림 210 개유래 지방줄기세포의 연골세포분화 결과. 공여견 대니의 연골조직 단편 염색 결과(left), 재복제견 April의 연골조직 단편 염색 결과(right)

또한 사람유래 지방줄기세포의 연골세포분화에서 이용되었던 정량법을 개유래 지방줄기세포의 연골세포분화에 적용하였다.

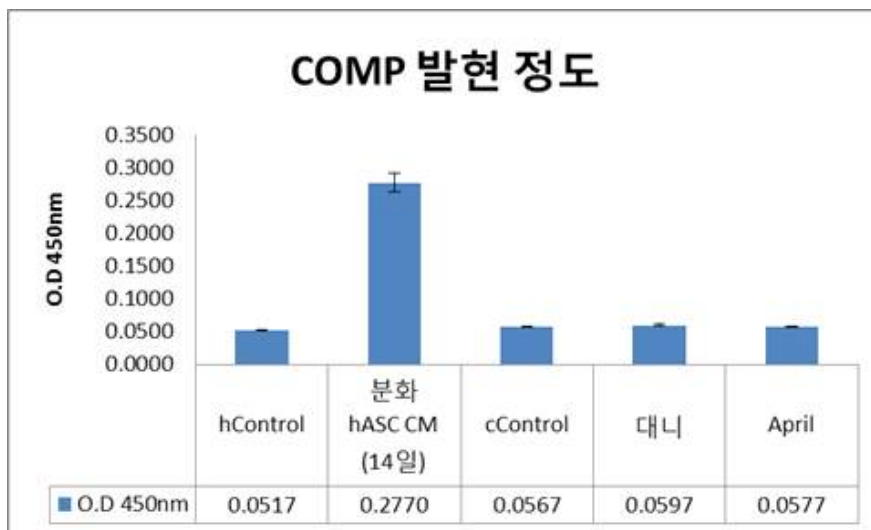


그림 211 hCONT.과 positive control (hASC시험군CM), cCONT. 와 공여견 대니 CM, 재복제견 April의 CM을 이용하여 시험 한 결과

COMP(cartilage oligomeric matrix protein)인자는 연골세포 전 분화과정에서 나타나는 연골재생기전 요소로써 연골세포 분화에 도움을 준다는 타 연구자의 결과를 확인하여 본 시험에 진행하였다. 분석 결과, 연골재생 COMP 인자가 사람유래지방줄기세포의 값만큼 나타나지 않았다. 개 유래 지방줄기세포의 연골세포 분화 과정에서 연골조직이 생성되었으나 정량과정에서 Control군과 비교하여 유의성이 나타나지 않은 것으로 보아 Elisa kit가 개유래 에서는 작용하지 않은 것으로 보인다.

본 연구의 결과 **공여견과 복제견간의 지방줄기세포의 성장패턴과 분화능은 유사한 결과**

를 보여주었다. 따라서 향후 복제견과 재복제견간의 지방줄기세포의 특징을 분석하여 복제한 개체를 다시 복제하였을 때 그로부터 분리된 지방줄기세포들간에 유사성이 어떻게 나타나는지를 관찰하고, 우수 개체의 지방줄기세포를 지속적으로 banking하고자 하였다.

제 8 절 지방줄기세포주 배양기술의 산업화

1. 지방줄기세포주 배양기술의 산업화

가. 연구수행 방법

특허는 출원을 완료하고 특허 획득을 진행하도록 하였고, 홍보는 5건 이상을 진행하도록 하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 특허: 특허에 대한 등록이 완료되었다.

특허명: 개과 동물 복제용 핵 공여 세포 배양용 배지 및 이의 이용 (등록번호: 제 10-1523141호)(A Medium for culturing Donor cells on preparation of cloned canidae Using Somatic Cell Nuclear Transfer and The Use theweof)

Our Ref.	CP14-153	Your Ref.	-
등록일	2015.05.19	등록번호	10-1523141
출원번호	10-2013-0134602	출원일자	2013.11.07
출원인	(주)케이스템셀	발명자	이병천/오현주/김민정/ 김건아/조영광/강성근 /고명순/이항영
발명의 명칭	개과 동물 복제용 핵 공여 세포 배양용 배지 및 이의 이용		

(2) 홍보

‘2014년도 국가연구개발 우수성과 수여식 및 전시회’에 따른 뉴스 보도

No.	매 체	제 목
1	한국경제	케이시스템셀, 복제검역 탐지건 생산 특허 출원
2	헤럴드경제	“검역탐지건 14마리 복제 성공”... 서울대 이병천교수팀과 케이시스템셀 공동성과
3	파이낸셜뉴스	케이시스템셀, 복제검역 탐지건 생산 특허 출원
4	연합뉴스	이병천 교수팀 “검역탐지건 14마리 복제”
5	머니투데이	케이시스템셀, 검역탐지건 14마리 복제 성공
6	아주경제	케이시스템셀, 복제검역 탐지건 생산 특허 출원
7	문화일보	케이시스템셀, 복제 검역탐지건 생산 실용화 성공
8	뉴스1	케이시스템셀, 복제 검역탐지건 생산 실용화에 성공
9	뉴스타운	케이시스템셀, 복제검역 탐지건 생산 특허출원
10	약업신문	케이시스템셀, 복제검역 탐지건 생산 실용화 성공

본과제의 결과가 2014년 정부연구개발 우수성과 100선에 선정되어, 본 과제의 실용화 및 사업화 가능성을 홍보하였다.

제 9 절 원본건-복제건-재복제건의 특성 비교확인

1. 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포를 배양하여 세포의 표면항원형의 변화, 분화능 비교 확인

가. 연구수행 방법

(1) 재복제 탐지건의 지방줄기세포 추출 및 배양, बैं킹

우수 검역건 카이저의 재복제건 월요일과 일요일의 지방줄기세포주의 확립 및 보관하였다. 월/일의 복부의 피하지방조직에 1: 4 ~ 1: 5 비율로 4% antibiotics를 포함한 멸균생리식염수 (PBS)를 넣고 흔들어 혈액 및 지방과립 등을 세척하여 지방조직만을 남게 하

였다. 이를 3회 반복하였다. 세척된 개 지방조직을 60 mm petridish에 옮기고, 1mg/ml collagenase를 넣고, 멸균된 미세가위를 이용하여 조직을 잘게 자른다. 이를 50ml conical tube에 옮긴 후, 지방조직 1g 당 4ml의 1 mg/ml collagenase 를 넣은 후, 37°C의 항온교반기에서 60분간 교반하면서 조직을 처리하였다. 100 μ m striner를 이용하여 걸러내어 분해 되지 않은 조직을 걸러내어 버리고 나머지 분해된 조직을 원심 분리하여 세포 분획을 얻었다. 상층액을 제거하고 세포분획을 회수하고, 배양배지 (RCME-P)에 넣어 잘 부유시킨 후, 배양 flask에 옮기고, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 다음 날 배양접시에 부착되지 아니한 세포 또는 프리오일을 제거 한 후 동물 지방줄기세포 배양배지 (RCME-P : high glucose DMEM 및 10% FBS 등 함유하는 배지)를 추가한 후, 컨플루언시 80 ~ 90%까지 2~3일 간격으로 배지를 교환하면서 배양하였다. 유세포 분석기 (BD, FACSCalibur)을 이용하여 줄기세포 표지자인 CD44와 CD90과 면역세포 표지자인 CD34를 확인하여 줄기세포의 특징표지인자를 확인하였다. 이렇게 확립한 세포주는 10% DMSO가 첨가된 지방줄기세포 배양배지(RCME-P)에 부유시킨 후, 2 ~ 3 × 10⁶ cell/1ml/1vial로 분주하였다. controlled rate freezer에서 이용하여 동결한 다음 액체 질소탱크에 보관하였다.

(2) 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포를 배양하여 세포의 표면항원형의 변화, 분화능 비교 확인

분리 보관중인 우수검역건의 지방줄기세포 중 원본건 카이저, 복제건 수성, 재복제건 일요일을 RCME-P 배지를 이용하여 passage 3까지 계대배양을 하여 세대 간의 면역표현형 확인을 실시하였다. 또한 원본건-복제건-재복제건의 karyotyping을 확인하여 배양 후의 유전자 변이 검사를 통하여 유전자의 변이를 확인하도록 하였다.

나. 연구수행 결과

(1) 재복제 탐지건의 지방줄기세포 추출 및 배양, बैं킹

2015년 2월 우수검역건 카이저의 재복제건 일요일의 지방이 입고되었다. 이후 지방줄기세포주의 분리, 배양 및 보관을 통하여 बैं킹을 진행하였다. 또한 주관기관에 약 3차례 배양배지인 RCME-P를 공급(회당 2500ml)하였다.

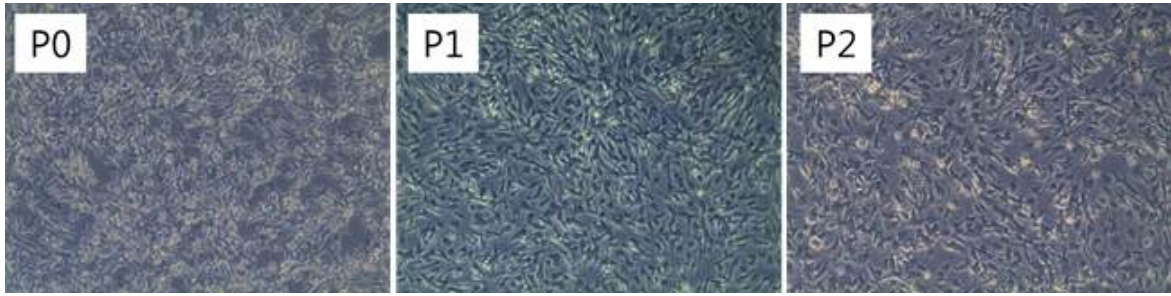


그림 212 원본건 카이저의 재복제건 일요일의 지방줄기세포 passage 별 배양 모습

(2) 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포를 배양하여 세포의 표면항원형의 변화, 분화능 비교 확인

2012년도에 분리, 보관한 원본건 카이저의 지방줄기세포 (passage 3)와 복제건 수성의 지방줄기세포 (passage 3), 재복제건 일요일의 지방줄기세포 (passage 3)를 RCME-P 배지를 이용하여 배양, morphology를 비교 확인하였다.

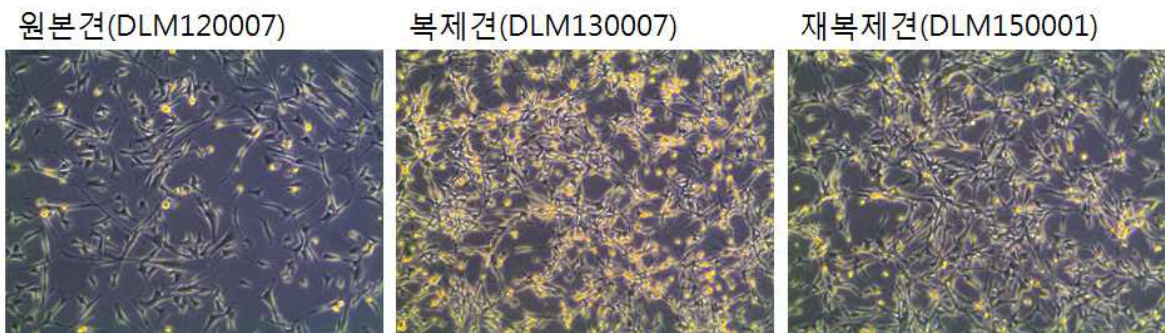


그림 213 Passage 3에서의 morphology. 카이저(left), 복제건 수성(center), 재복제건 일요일(right)

각 세대 간 지방줄기세포의 morphology간 유의성 있는 차이는 보이지 않았다.

또한 배양 전과 배양 후의 품질관리 성적을 확인하여 적합한 결과를 확인 후 시험을 진행하도록 하여 보다 객관적으로 시험을 진행하였다.

표 87 품질관리성적서 결과

개체	무균시험	마이코플라스마	엔도톡신시험
카이저	적합	적합	적합
수성	적합	적합	적합
일요일	적합	적합	적합

이후 유세포 분석기 (BD, FACS Calibur) 분석을 통하여 각 세대간의 줄기세포 특이적

인 면역표현형의 변화 유무를 비교/확인하였다.

유세포 분석기를 이용한 면역표현형을 확인을 진행하였다. 줄기세포 표지자는 다음의 표의 항체들을 이용하였다.

표 88 개 지방유래 줄기세포의 세포 면역표현형 확인에 이용한 항체 정보

	CD Marker	Cat. No
CD 29	Anti Rat - CD29 (F)	BD 555005
CD 44	Anti canine - CD 44 (F)	11-5540-42 (eBioscience)
CD90 (Thy 1.1)	Anti canine - CD 90	MCA1036G
CD 31	Anti canine - CD 31 (F)	orb15291
CD 34	Anti canine - CD 34 (P)	BD 559369
CD 45	Anti canine - CD 45 (F)	11-5450-42 (eBioscience)
CD 105	Anti canine - CD 105 (F)	orb102264

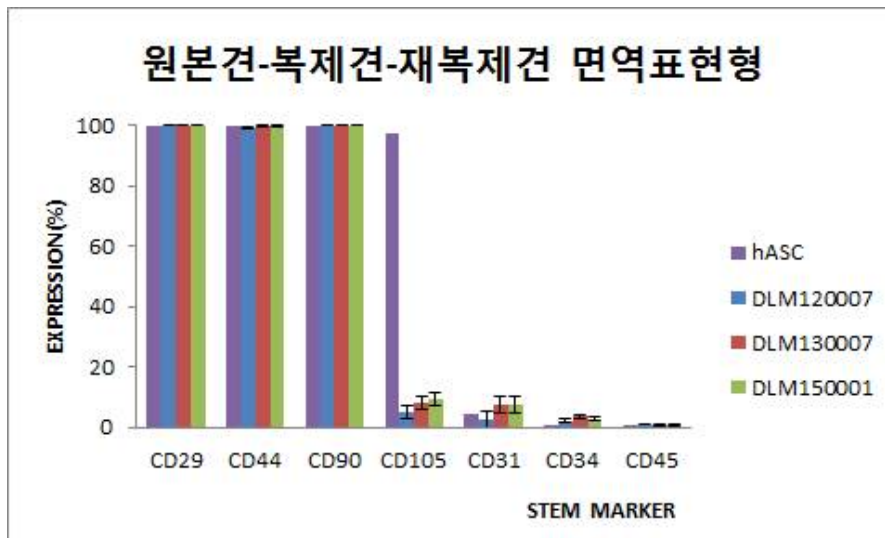


그림 214 사람의 지방줄기세포(purple)와 카이저(blue)-수성(red)-일요일(green)의 지방줄기세포 면역표현형.

원본건 카이저와 복제건 수성, 재복제건 일요일의 지방줄기세포는 분석 시 줄기세포 표지자인 CD29에서 99.95% 이상, endoglin receptor인 CD44에서 99.70%, 줄기세포 표지자인 CD90에서는 99.99% 이상의 양성을 보였다. 조혈모 세포 표지자인 CD34에서는 2.93% 이하의 반응을 보였다. leukocyte 표지자인 CD45에서는 0.82% 이하로 반응하였다. 또한 CD31에서 5.90% 이하로 반응함을 확인하였다. 그러나 이러한 패턴은 지난 연차에 보고하였던 것과 마찬가지로 사람의 줄기세포와 특이적으로 CD105에서 차이남을

확인하였다. 하지만 원본건-복제건-재복제건 간 지방줄기세포의 면역표현형은 매우 유사함을 확인 할 수 있었다. 각 시험의 결과를 보다 객관적으로 줄기세포의 핵형 이상 유무를 확인함으로써 신용할 수 있도록 핵형분석을 진행하였다. 핵형분석은 염색체의 손실 등을 확인하는 시험법으로써 원본건-복제건-재복제건의 유전학적 형상이 동일하여야 하였다.

시험체	결과
카이저 P3 (원본건)	정상
수성 P3 (복제건)	정상
일요일 P3(재복제건)	정상

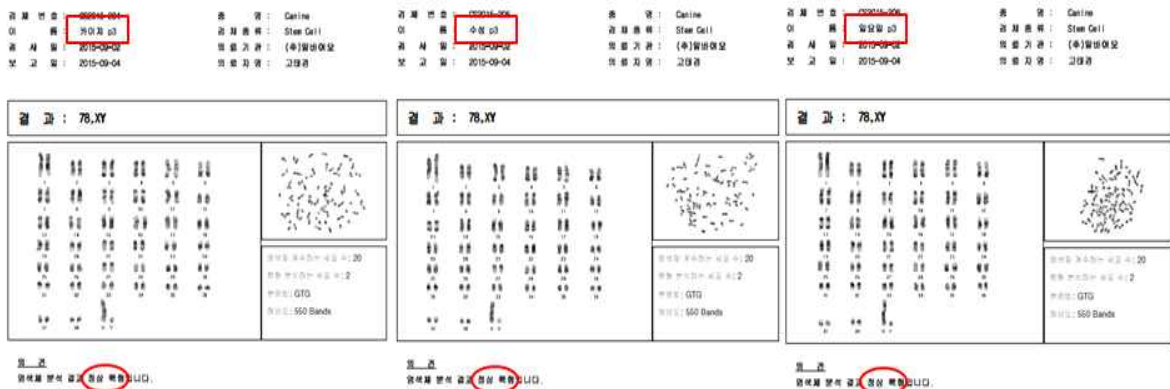


그림 215 핵형분석 결과. 카이저(left), 복제건 수성(center), 재복제건 일요일(right)

원본건 카이저, 복제건 수성, 재복제건 일요일의 지방줄기세포 유전학적 변이를 검사하기 위하여 karyotyping을 진행한 결과 모두 정상임을 확인하였다.

제 10 절 원본건-복제건-재복제건의 줄기세포를 이용한 다능성 확인

1. 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포의 다능성 확인

가. 연구수행 방법

원본건-복제건-재복제건 간의 지방줄기세포를 이용하여 3가지 이상의 분화법을 진행 후 이를 비교/분석하였다. 정상적인 지방줄기세포의 경우 다능성이 특징으로 확인되었다.

나. 연구수행 결과

(1) 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포를 이용한 골세포 분화능 비교/분석

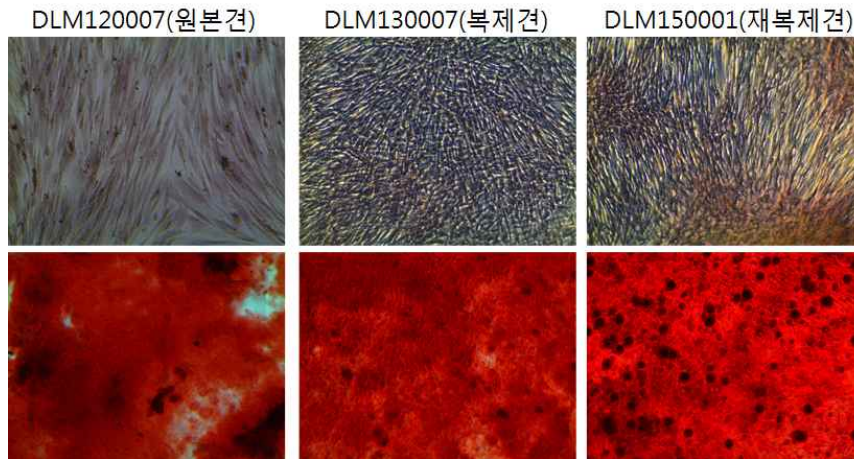


그림 216 골세포 분화능의 Alizarin Red S 염색 확인. 카이저(left), 복제건 수성(center), 재복제건 일요일(right)

골세포 분화능을 Alizarin Red S로 염색 확인 결과, 대조군(top-line)의 경우 모두 염색이 되지 않았으나 분화군(bottom-line)의 경우 모두 염색이 잘 진행된 것이 확인된 것으로 보아 골세포 분화가 잘 진행되었음을 확인하였다. 또한 원본건-복제건-재복제건 간의 차이는 나타나지 않는 것이 확인되었다.

(2) 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포를 이용한 연골세포 분화능 비교/분석



그림 217 연골 세포 분화 사진. 카이저(left), 복제건 수성(center), 재복제건 일요일(right)

연골세포 분화능 확인 결과 원본건-복제건-재복제건 간의 차이는 나타나지 않았으며, 각 시험군의 사이즈 또한 유사하게 나타났음을 확인하였다.

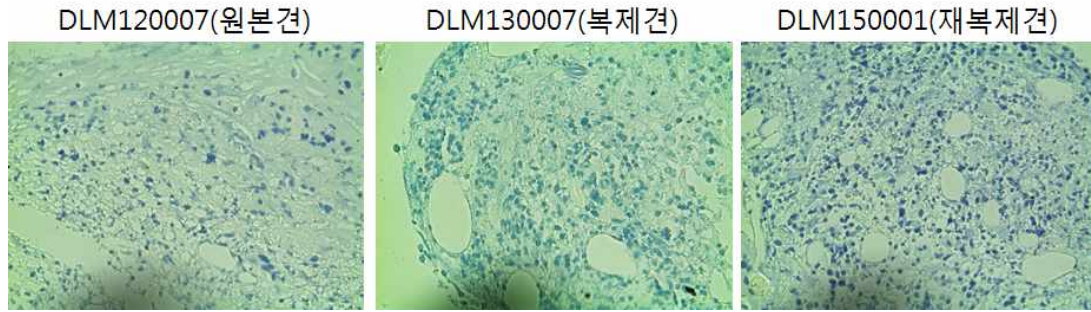


그림 218 연골세포 분화 후 Toluidine blue 염색 결과. 카이저(left), 복제견 수성(center), 재복제견 일요일(right)

이후, 연골세포 분화 조직을 Toluidine blue 염색 확인 결과 원본견-복제견-재복제견 간의 차이는 나타나지 않았다.

- (3) 원본견과 복제견, 재복제 견의 지방줄기세포를 이용한 신경세포 분화능 비교/분석
 신경세포 분화능을 확인하기 위하여 신경세포 분화를 진행 한 결과 모든 군에서 동일한 결과를 확인하였다. GFAP, MAP2, Nestin, Tuj1 의 neurogenic marker가 발현된 것을 확인함으로써 신경분화능을 확인하였다.

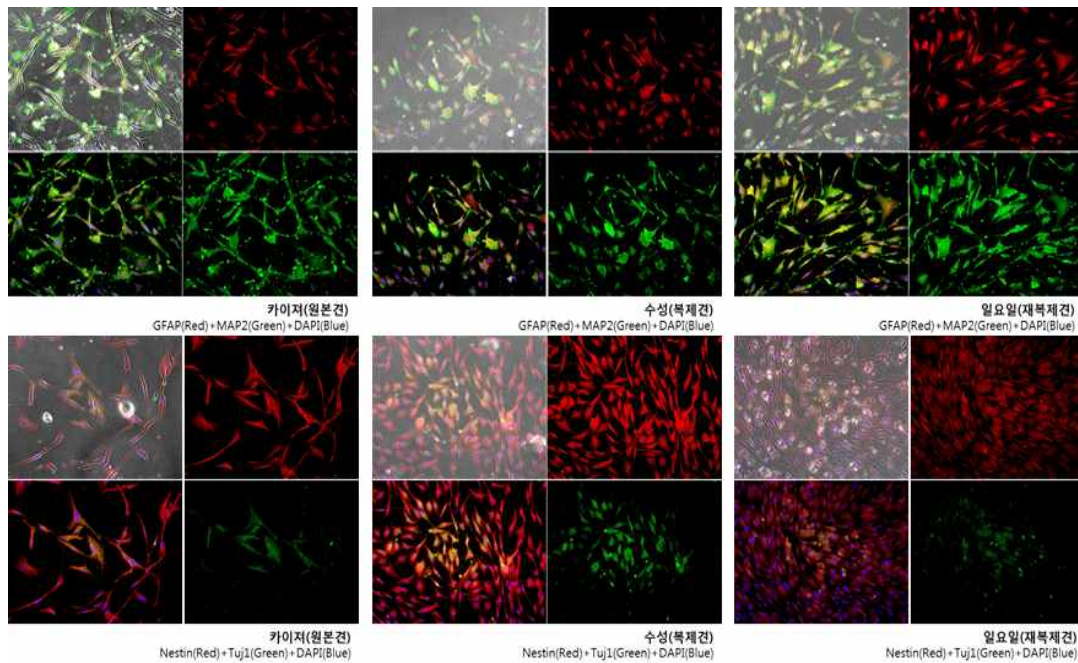


그림 219 신경세포 분화능 확인.

공여견과 복제견, 재복제견간의 지방줄기세포의 성장패턴과 분화능은 유사한 결과를 보여주었다. 따라서 향후 복제견과 재복제견간의 지방줄기세포의 특징을 분석하여 복제한 개체를 다시 복제하였을 때 그로부터 분리된 지방줄기세포들간에 유사성이 어떻게 나타나는지를 관찰하고, 우수 개체의 지방줄기세포를 지속적으로 बैं킹하고자 하였다.

제 11 절 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포 골세포 분화능 정량 비교

1. 수립된 정량화 평가방법을 이용한 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포의 골세포분화능력의 정량적 평가

가. 연구수행 방법

수립된 정량화 평가방법을 이용하여, 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포의 골세포분화능력을 정량적으로 평가하고 개 유래 지방줄기세포의 골세포분화능 시험법을 정립하였다. 3차년도 보고서에서 이미 골세포분화능을 정량적으로 평가하기 위하여 세포의 수를 달리하여 분화를 확인 후 염색을 하여 Alizarin Red S 염색이 되는지를 확인하였다. 이후 이 염색약을 추출하여 측정, 수치화 하도록 하였다. 이러한 시험방법을 통하여 원본건-복제건-재복제건 간의 세대별 분화 능력을 비교 하였다.

나. 연구수행 결과

수립된 정량화 평가방법을 이용하여, 원본건과 복제건, 재복제 탐지건의 지방줄기세포의 골세포분화능력을 정량적으로 평가하고 개 유래 지방줄기세포의 골세포분화능 시험법을 정립하였다. 이전 연차에서 개발한 골세포 분화능 정량비교법에 따라서 골세포분화능 정량화를 적용하였다. 지방줄기세포에서 분화한 골세포를 염색 후 이를 추출하여 확인한 결과 복제건과 재복제건의 분화능 비교에서 높은 분화능을 확인할 수 있었다.

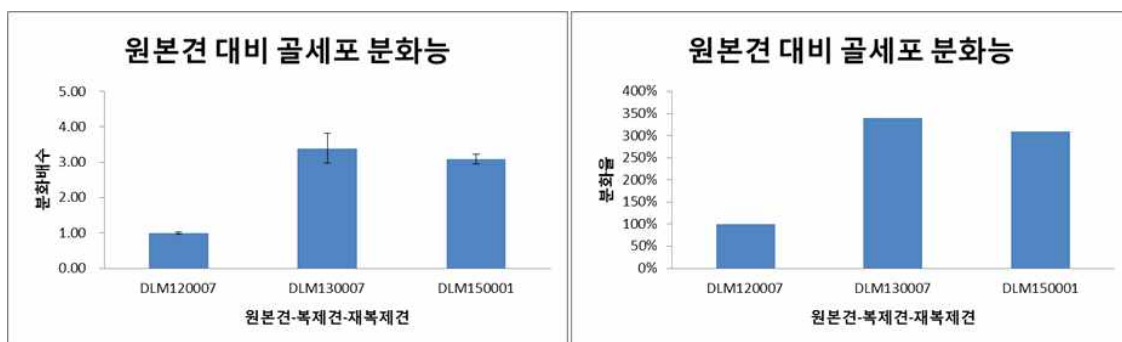


그림 220 원본건 대비 복제건, 재복제건 분화능의 분화 배수 및 분화율

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전의 기여도 등을 기술

구분 (연도)	연차별 목표	세부연구내용	달성도 (%)
1차 년도 (2011)	복제 탐지건 생산 및 우수한 검역탐지건의 분석을 통한 객관적 지표 제시	- 검역탐지건의 유전학적 평가 위한 객관적 지표 제시	100
		- 검역탐지건의 영상학적 평가 위한 객관적 지표 제시	
		- 검역탐지건의 행동학적 평가 위한 객관적 지표 제시	
		- 복제 검역탐지건 생산	
		- 검역탐지건의 객관적 평가 및 체세포 및 생식 세포 बैं킹을 위한 검역탐지건 공급	100
		- 우수 검역탐지건의 체세포 및 생식세포 बैं킹	100
<p>※ 1차년도 달성 및 기술발전의 기여도</p> <p>1차년도 목표인 검역탐지건 복제와 우수탐지건의 객관적 지표 제시를 위한 연구를 완전하게 수행을 완료하였다. 유전학, 영상학 및 행동학적 객관적 지표를 선별하였으며, 이중 특히 행동학적 지표는 1차년도에 확립되어진 지표들을 과제 4년간의 진행동안 지속적으로 적용하였다. 따라서 탐지건 선발을 위한 행동학적 지표를 마련하는 성과를 도출하여 현재 특허 등록 출원을 완료하였다. 또한 개유래 지방줄기세포의 추출 및 배양 조건을 확립하여 개유래 지방줄기세포에 특화된 배지를 개발하여 특허를 출원하였다.</p>			
2차 년도 (2012)	복제 탐지건 생산 및 우수한 탐지능력의 유전학적, 행동학적 평가 및 분석	- 복제 검역탐지건(1차년도)의 유사성 및 정상성 분석	100
		- 복제건(1차년도)과 세포공여건간의 유전학적 분석	
		- 복제 검역탐지건(1차년도)의 영상학적 분석을 통한 유사성 및 차이점 분석	
		- 복제건(1차년도)과 대조군과의 행동학적 분석	
		- 2차년도 복제 검역탐지건 생산	
		- 복제건의 집중훈련시 복제건 및 후보	100

		건간의 훈련결과를 행동학적 객관적 지표를 이용 비교 분석	
		- 검역 탐지 복제건의 지방줄기세포 배양 및 특성 검증	100
		- 지방줄기세포 banking 표준화	
	<p>※ 2차년도 달성 및 기술발전의 기여도</p> <p>2차년도 목표인 복제 검역탐지건을 지속적으로 생산하였으며, 1차년도에 개발되어진 유전, 영상, 행동평가를 위한 지표들을 복제건들에 적용하여 일반건과 복제건간의 차이를 분석하였다. 또한 탐지건에 있어 우수한 자질은 후각능력보다 집중력과 학습능력이 영향을 미치는 것을 해부학적 유전학적 연구를 통해 검증하였다. 이러한 결과를 과학적으로 추가 검증하기 위하여 3차년도에 지속적으로 연구를 실시하였다. 마지막으로 복제건과 원본건 유래지방줄기세포들 간의 비교를 통하여 줄기세포능의 유사함을 검증하였다.</p>		
3차 년도 (2013)	재복제 탐지건 생산 및 유전학적/영상학적 객관적 지표와 탐지능력과의 연관관계 분석과 복제건의 탐지건 선발을 비교	- 탐지능력과 유전학적 객관적 지표와의 연관관계 분석	100
		- 복제건과 세포공여건간의 영상학적 분석; 복제 검역 탐지건의 후각기능 및 뇌기능 평가	
		- 훈련종료시 복제건과 대조군의 행동학적 분석	
		- 복제 검역탐지건의 노화 관련 정상성 분석	
		- 재복제 검역탐지건의 생산	100
		- 선발된 복제 검역탐지건의 현장적응능력 비교 조사	
		- 재복제탐지건의 지방줄기세포의 분리, 배양 및 줄기세포 검증	100
		- 세포공여건과 재복제탐지건의 지방줄기세포의 능력의 정량적 상대적 비교	
		- 세포공여건과 재복제탐지건의 지방줄기세포의 분화능 정량적 상대적 비교	
		- 지방줄기세포의 분화능 정량평가법 개발	
- 지방줄기세포주 배양기술의 산업화			
<p>※ 3차년도 달성 및 기술발전의 기여도</p> <p>3차년는 기년도의 결과를 바탕으로 우수한 능력을 지닌 복제탐지건의 뇌의기능 및</p>			

탐지능력에 직접적으로 영향을 미치는 유전학적 지표의 분석을 완료하였다. 또한 복제견간의 행동의 유사성을 평가하여 행동에 있어 유전적 영향의 여부를 검증하였다. 그리고 재복제견과 원본견 간의 줄기세포능이 유사함을 확인하였고, 정량법을 개발을 통하여 정확하고 객관적인 줄기세포능 판단 기법을 개발하였다. 또한 가장 중요한 복제견의 인천공항의 성공적인 적용을 통해 개체세포복제기술의 실용화를 성공시켰다. 따라서 **2014년 미창부 우수성과100선에 선정되어 본 과제결과의 우수성을 평가받았다.**

4차 년도 (2014)	복제·재복제 탐지견의 산업화 및 우수한 탐지능력의 다각적 지표 제시	- 기년도 확립한 검역탐지견 스프링거스파니엘의 복제 생산	100
		- 탐지능력과 인지행동학적 연관관계 분석을 통한 객관적 지표 제시	
		- 복제 검역탐지견 (재복제견과 기복제견)의 유전학적 평가 및 분석; 복제 검역탐지견의 인지능력 관련 유전자 분석	
		- 복제 검역탐지견 (재복제견과 기복제견)의 영상학적 평가 및 분석; 복제 검역탐지견의 뇌의 형태학적 평가	100
		- 선발된 복제 검역탐지견의 현장적응능력 비교 조사	
		- 원본견-복제견-재복제견의 특성 비교확인	
		- 원본견-복제견-재복제견의 줄기세포를 이용한 다능성확인	
		- 원본견과 복제견, 재복제 탐지견의 지방 줄기세포의 골세포분화능 정량비교	
- 지방줄기세포주 배양기술의 산업화			

※ 4차년도 달성 및 기술발전의 기여도

4차년도는 본 과제를 통해 생산되어진 복제된 개체들중 best of the best 를 선정하여 재복제를 시도하였다. 4차년도 결과에서와 같이 우수한 복제견을 다시 복제하였을 때 역시 그 능력이 유지됨을 검증하였다. 지방줄기세포 연구에 있어서는 원본견-복제견-재복제견 간의 유사성을 객관적이고 정량적으로 평가하였다. 또한 산업화를 진행하기 위하여 개 유래 지방줄기세포 특허 배지의 특허 등록을 완료하였다. 4차년을 마무리하면서 우수 탐지견을 위해 필요한 자질이 집중력과 기억력임을 검증하게 되었으며, 이러한 요소들이 유전적인 영향을 받음을 확인하였다. 이러한 결과는 새로운 우수한 탐지견 개발과 개의 탐지능 분석을 위한 기초자료로 유용하게 이용될 것이다.

최종적으로 본 과제는 우수 검역탐지견의 세포주를 확립, 체세포핵이식기법을 이용 탐

지건의 복제 생산하였으며, 탐지견들의 행동·유전·영상의 분석을 통해 탐지견 선발을 위한 객관적 다각적 지표를 개발하여 우수 복제 탐지견의 실용화를 위한 체계를 구축하여 최종 목표를 성공적으로 달성하였다.

본 연구를 통하여 세계최초로 우수한 능력을 지닌 검역탐지견을 체세포복제방법을 통해 지속적으로 유지 및 생산하여 현장에 투입하는데 성공함으로써 개과 동물의 복제 기술의 산업현장에 활용가능함을 과학적으로 입증 하였다.

세계 최초로 유전학적, 행동학적, 해부학적 분석을 통하여 우수한 탐지능력과 다양한 인자들간의 상관관계를 분석하였으며, 과제의 시작시 주요하게 판단되었던 후각능력보다 인지 능력과 관련된 요소들이 우수한 탐지견의 능력과 관련 있음을 검증하였다. 본 연구결과로부터 도출된 인지능력과 우수한 개의 탐지능력과의 상관관계를 통해 영상학적, 유전학적 연구 분야에 새로운 연구를 제시할 것이다. 특히 사람에서 인지 능력과 유전적 관계의 연구는 제약이 많으나, 개는 이러한 연구분야에 새로운 돌파구가 될 수 있을 것이다.

생산되어진 복제견의 세포를 이용하여 재복제하는데 성공하였으며, 재복제견의 지방줄기세포를 이용하여 재재복제하는데 성공하였다. 뿐만 아니라 여러세대를 걸쳐 생산되어진 복제견들도 모두 우수한 검역탐지견이 되어 실용화 가능성을 입증하였다. 무엇보다도 우수한 자질을 가지고 태어난 복제견은 훈련기간의 단축으로 기존 1년에서 1년6개월에 걸쳐 실시하는 훈련을 8개월 단기로 모두 이수하고 8개월령-10개월령 사이 현장에 투입되어 실제로 공항에서 운용되는데 성공하였다. 따라서 2014년도 국가연구개발 우수성과에 “우수 검역탐지견의 복제 효율 향상 및 실용화 성공” 으로 선정되었다.

결론적으로 본 연구의 결과는 한 마리의 검역견을 배출하기 위한 사회적 비용이 체세포 핵이식 기법을 통하여 절감될 수 있음을 보여줌으로써, 특수동물복제 시장규모가 산업화될 수 있음을 시사한다. 따라서 본 연구는 다양한 특수목적견특수견 (맹인견, 경찰견, 인명구조견, 검역탐지견 등)의 우수한 유전자원 보존과 유전자원을 개발하기 위한 밑거름이 될 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 추가연구의 필요성

본 연구를 통하여 개 체세포복제를 이용한 복제 검역 탐지건의 실용화 시스템을 확립하고 검역건의 우수한 능력에 영향을 주는 요소들을 분석하였다. 이러한 기술력과 정보력을 바탕으로 우수한 능력에 영향을 주는 인자들을 이용하여 현재의 능력을 뛰어넘는 새로운 품종의 탐지건을 생산하는 연구 수행이 필요하다.

현재까지는 훈련과 현장 활동의 경험을 통해 탐지건 중에서도 top of the top을 선발하고, 선발된 개체를 유지하는 수준에서 검역 탐지건을 생산하였다. 그러나 앞으로는 검역탐지건의 top of the top 의 능력을 가지는 개체들을 분석하여 획득한 본 과제와 결과들 특히 유전적 요인과 관련된 결과를 바탕으로 새로운 품종의 우수 검역 탐지건을 개발해야 한다.

검역 현장에서 운용되어지는 개체들의 한계점인 체력과 훈련을 위해 꼭 필요한 학습능력을 유전적으로 보완한 탐지건을 생산하기 위해서 1) 개의 체세포 복제 효율 향상에 관한 연구가 향후에도 지속되어야 하고, 2) 목적 유전자를 제거하거나 도입한 체세포를 이용하여 목적 유전자의 발현을 제거하거나 (knock-out) 또는 조직 또는 세포 특이적으로 유전자의 발현을 유도할 수 있는 복제동물의 생산이 효율적으로 이루어져야 한다. 또한, 3) 생산된 형질전환복제개에서 행동/영상학적 모니터링법 개발 및 검역현장으로의 안정적이고 안전한 적용을 위한 시스템 도입이 필요하다.

2. 타 연구에의 응용

본 과제에서 분석된 개의 인지 능력에 영향을 주는 요인들을 보다 구체적이고 객관적으로 분석하는 연구를 할 수 있을 것이다. 특히 이번 연구에서 분석된 몇가지 유전자는 이미 인지와 관련된 퇴성성 뇌질환 또는 집중력장애와 같은 질환과 관련 있음이 밝혀져 있다. 따라서 이러한 유전자들의 발현이 높은 우수 검역탐지건들을 역으로 이용하면 관련 유전자들의 발현 기전 또는 이들과 관련된 환경 또는 물리적인 요소들에 대한 연구에도 응용이 가능할 것이다.

또한 본 과제에서 개발된 개 지방줄기세포의 정량법과 개 지방줄기세포 배양을 위한 배양액들은 보다 다양한 성체줄기세포의 연구 분야에도 적용 가능하여 다양한 성체줄기세포의 배양능과 분화능의 발달에 일조할 것으로 기대된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 체세포 핵이식을 통한 복제 동물생산

가. 체세포 핵이식의 효율 향상 연구

체세포 핵이식의 효율 향상에 관한 연구는 해외에서도 다양한 각도에서 활발하게 연구가 이루어지고 있다. 특히 체세포 핵이식에 이용되어지는 공여세포에 관한 연구가 가장 많은 부분을 차지하고 있다.

체세포 핵이식에 있어서 공여 체세포의 세포주기 동기화에 대한 연구는 Dolly의 생산 이후로 계속 이어져 왔다. 1998년 Cibelli외에도 공여 체세포의 G0/G1으로의 동기화가 이루어진 경우 체세포 복제의 효율이 향상되었음을 보고하였고 같은 해에 Wakayama는 마우스에서 체세포 복제 개체의 생산성 공여 세포의 세포 주기가 동기화되었을 때 산자의 효율이 증대되는 것으로 보고하였다. 이듬해에 돼지 복제에 있어서 세포 주기의 동기화가 요구된다는 사실을 Onish 그룹이 밝혔다. 세포주기 동기화의 방법으로 기존에 이용되었던 serum starvation, contact inhibition방법 외에도 최근에는 cycloheximide, DMSO와 roscovitine이 보고되고 있으며 Roscovitine을 소의 공여세포에 처리한 경우 serum starvation방법에 비해 복제 수정란의 생존율이 향상되는 것을 2002년 Gibbon이 보고하였고, 2008년 Sun등이 Roscovitine이 소의 세포 주기의 동기화를 적절히 유발한다는 연구를 수행하였다. 개에서는 2009년 본 연구팀에 의해 Roscovitine의 체세포 적용을 통한 세포주기 동기화 유도 및 복제효율 향상 결과를 보고하였다.

핵이식시 이용되어지는 핵 공여세포의 분화정도에 따른 결과도 다양한 각도에서 보고되어지고 있다. 마우스의 줄기세포를 핵 공여세포로 사용시 산자 생산 효율이 증가하였으며, 이는 공여세포의 미분화된 상태가 복제수정란 생산시 효율적인 reprogramming에 의한 것이라고 1999년 일본의 Wakayama가 보고한 이후, 2000년 Rideout, 2002년 Jeanish와 Eggan 등이 동일한 결과를 보고하였다. 다양한 유래의 줄기세포가 핵이식을 위한 공여세포로 검증 또는 평가를 받았으며, 그 중 지방줄기 세포는 해외의 연구에서 현재까지 복제를 위해 이용되어진 보고는 없다. 그러나 지방줄기세포의 경우 회수할 수 있는 양에 있어서 비교적 제한적이지 않고 회수하기가 용이하기 때문에 유도 만능줄기세포의 연구에는 흔히 이용되고 있다.

나. 난자공여개체 및 대리모 조건

체세포 핵이식 기법에서 난자공여개체와 대리모는 중요한 실험체로서, 체세포 핵이식을 위한 난자공여조건과 대리모의 조건에 대한 연구는 최근까지도 지속되고 있다. 2004년 스

페인에서 Antonio 등이 산양과 면양에서 복제 수정란의 이식 과정과 대리모의 산자 착상에 영향을 끼칠 수 있는 요소에 대한 사항을 정리하였고, 2008년에 Jones와 Labm가 소에서 대리모의 발정주기동기화에 대해 보고하였다. 같은 해에 Petersen 등도 peripubertal gilts에서 대리모에 배아를 이식해야 하는 시점에 대한 연구를 진행했었다. 2006년에는 Li 등이 페렛에서 체내 배아를 이식하였을 때, 대리모가 경산보다는 미경산이었을 때 더 높은 태아 형성률을 보였음을 보고하였다.

개에서도 다른 동물과 마찬가지로 복제 효율에 대해 대리모의 수술여부 및 산차 등이 영향을 미치는 것으로 확인되는 것으로 2010년 본 연구팀에 의해 보고되었다. 또한 난자공여개체의 경우 난자 회수율이 수술하지 않은 개체가 수술한 경험이 있는 개체에 비해 유의적으로 높았다.

다. 복제견의 생산

체세포 핵이식기법을 이용한 개의 복제는 미국에서 수백만달러의 기금을 조성하여 1997년 Missy project가 시작되었으나 실패하였고 이종간 핵이식을 통해 개의 체세포 복제를 시도하였으나 임신 23일 만에 유산하였고 이는 개 복제에 대한 이종간 핵이식의 가능성을 제시하였다 (Westhusin et al, J Reprod Fertil Suppl. 2001). 반려동물로서 세계 최초로 복제고양이 “Copy Cat (CC)”를 생산하는데만 성공하였으며 (Shin et al, Nature, 2002) 이후로 Domestic Cat & African Wild cat에 대한 연구가 보고되었다 (Gomez et al, Biol Reprod., 2003). 해외에서는 현재까지 개의 체세포를 이용한 복제견의 생산에 관한 보고는 없으며, 한국만이 유일하게 보고하고 있다.

2. 탐지견 선발의 지표개발 연구

가. 탐지견 선발의 유전, 영상, 행동학적 지표 개발연구

탐지견 선발에 관한 연구는 해외에서도 다양한 각도에서 활발하게 연구가 이루어지고 있다. 특히 다양한 목적의 탐지견이 전세계 곳곳에서 활용되고 있으며 각 특정 목적을 위한 적절한 탐지견의 선발에 대한 연구가 진행되고 있다.

탐지견의 이용은 사람보다 3-400 배 뛰어난 후각 신경을 활용한 것이며 연구자들은 당시 발달하고 있는 유전자 분석 기술과 더불어 그를 통해 개의 후각 수용체 유전자의 정보를 분석함으로써 그 비밀을 밝혀낼 수 있을 것으로 추정하고 연구를 시작하였다. 2000년대 초반부터 해외의 여러 연구팀에 의해 개의 후각 수용체 유전자의 염기서열을 분석하였고 이들의 유전자 서열은 품종 및 개체에 따라서 다형성을 높게 띄고 있음을 보고하였다. 특히 2000년대 이후부터 차세대 유전자 서열 분석법의 등장 등 초고속으로 각 개체의 유전자 염기서열 분석이 가능해짐에 따라서 탐지견의 적절한 선별을 위한 지표

유전자를 찾기 위한 연구가 지속되었다. 하지만 각 연구에서 지적하고 있듯이 한 연구자가 회수할 수 있는 샘플 개수의 한계, 지역적인 특수성을 고려하여 지속적인 연구가 필요하다고 결론을 내렸다.

2010년 이후로는 이러한 유전자의 다형성 및 특정 염기서열이 사람에서 질환의 발병에 영향을 미치는 것처럼 행동학적 양상에도 끼칠 수 있는 것으로 가정하여 개에서도 유전자 지표와 행동의 상관성에 관한 많은 연구들이 진행되기 시작하였다. 특히 마우스에서 옥시토신 수용체 및 옥시토신의 양이 기억력, 학습 능력에 영향을 끼칠 수 있음이 2004년 보고되었고 이러한 사실이 사람에서도 유사한 연구 결과를 도출함에 따라 더욱이 이러한 연구는 활발하게 진행되었다. 해외에서는 각국의 특수목적견을 대상으로 하여 허스키, 벨지안 마르노이, 셰퍼드 등의 품종에서 특정 유전자의 다형성이 개체의 행동 양상과 관련이 있음을 보고하였다.

복제동물의 유전학적, 행동학적 유사성 연구는 해외에서도 다양한 각도에서 활발하게 연구가 이루어지고 있다. 특히 행동은 유전적인 소인과 환경적 요인의 상호작용에 의해 나타나는 것이기 때문에 일반 번식에 의해 생산되는 개체들에 비해 행동학적 유사성이 나타나는지의 여부에 대해 관심을 두고 연구를 진행하였다. 해외에서의 연구 결과에 따르면 복제소에서의 운동, 소리반응, 사회적 행동 반응 등을 비교한 연구에서 복제소에서의 행동학적 유사성을 강조하였다. 복제견에서의 행동학적 유사성 연구는 본 연구팀에 의해 보고된 것이 첫 번째이다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

모두 3천만원 이하 장비임

품 명	수 량
영상행동추적장치	구입
소형배양기	구입
서터	구입
실체현미경	구입

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

(1) 연구활동종사자 환경안전교육 실시

- (가) 정기 교육 - 이공계 및 미술대 대학원 신입생을 대상으로 년2회 집체교육
- (나) 온라인 교육 - 연구활동종사자를 대상으로 온라인 안전교육 실시
- (다) 수시 교육 - 실험실 사고 발생, 신입 연구원 채용 등 실험실 안전교육이 필요시 기관의 요청에 의해 실시

(2) 실험실 안전점검 실시

- 연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 의거 이공계 대학, 연구소 실험실 및 미술대학 작업장을 실험 특성에 따라 유형별로 분류하여 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀 안전진단을 실시

- (가) 일상점검 - 연구개발활동 전 연구개발활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검
- (나) 정기점검 - 실험실 안전점검 체계에 따라 매년 정기점검 실시하고, 그 결과 「서울대학교 실험실안전 白書」를 배포하여 부적합 사항에 대하여 개선요구
- (다) 특별안전점검 - 폭발사고, 화재사고 등 연구활동종사자의 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 총장의 지시에 의해 실시
- (라) 정밀안전진단 - 정기점검 실시 후 도출된 위해요인에 대하여 외부 전문기관에 진단을 의뢰하여 위해 요인의 개선방향 및 안전관리방안 수립

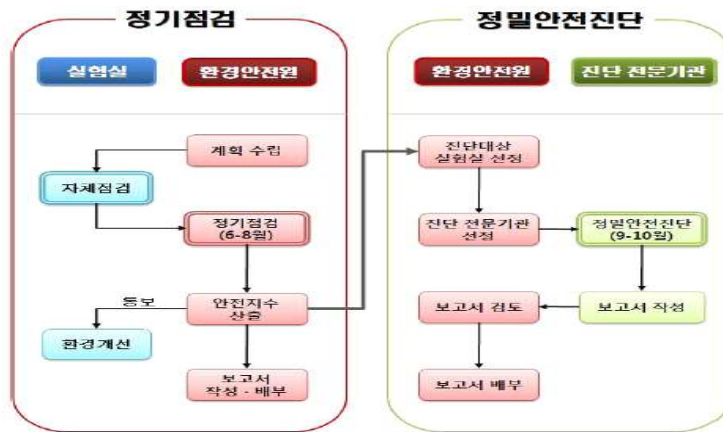


그림 221. 실험실 안전점검 체계

(3) 실험실 안전사고 대응 및 예방

- 완전밀폐형시약장 설치, 실험실 안전사고 대응 및 처리 매뉴얼 보완 및 사고 대응 훈련

실시, 실험실 사고사례 전파, 실험실 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작 배포 등이 대응 조직에 의해 진행

(4) 유전자 변형 생물(LMO) 실험실 안전관리

- 「유전자변형생물체 국가간 이동 등에 관한 법률」(2008.1)과 보건복지부 「실험실 생물 안전지침」(2006.12)에 따라 실험실내 생물안전 확보를 위하여 생물실험에 대한 신고·허가/안전교육/안전점검을 「서울대학교 생물안전관리」 체계로 운영

(가) 병원체 및 LMO 실험실 안전교육

(나) LMO 실험실 안전점검 - 2등급 이상 생물안전연구시설(LMO)에 대하여 미래창조과학부와 공동으로 점검실시 및 점검 후 개선여부 확인

(5) 연구활동종사자 특수건강검진 실시

- 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제18조 4항에 따라 「산업안전보건법 시행령」 제29조 및 동법 시행규칙 별표 12의2 「특수건강진단 대상 유해인자」 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자를 모니터링하여 특수건강검진 실시

(6) 연구활동종사자 보험가입

(가) 매년 정기적으로 보험가입 및 갱신처리를 지속적으로 이행함

(나) 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제14조 제1항 및 시행령 제15조 제1항에 의거 의무적 가입

(다) 가입회사: 교육시설재난공제회

(라) 가입대상: 학부생, 대학원생, 연구원 (보조연구원 포함)

제 9 장 참고문헌

* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

1. Horvath G, Andersson H, Paulsson G. Characteristic odour in the blood reveals ovarian carcinoma. *BMC Cancer*. 2010 24;10:643.
2. Oh HJ, Hong SG, Park JE, Kang JT, Kim MJ, Kim MK, Kang SK, Kim DY, Jang G, Lee BC. Improved efficiency of canine nucleus transfer using roscovitine-treated canine fibroblasts. *Theriogenology*. 2009 1;72(4):461-70.
3. Choi J, Lee JH, Oh HJ, Kim MJ, Kim GA, Park EJ, Jo YK, Lee SI, Hong do G, Lee BC. Behavioral analysis of cloned puppies derived from an elite drug-detection dog. *Behav Genet*. 2014 44(1):68-76.
4. Quignon P, Kirkness E, Cadieu E, Touleimat N, Guyon R, Renier C, Hitte C, André C, Fraser C, Galibert F. Comparison of the canine and human olfactory receptor gene repertoires. *Genome Biol*. 2003 4(12):R80.
5. Chen WK, Swartz JD, Rush LJ, Alvarez CE. Mapping DNA structural variation in dogs. *Genome Res*. 2009 19(3):500-9.
6. Robin S, Tacher S, Rimbault M, Vaysse A, Dréano S, André C, Hitte C, Galibert F. Genetic diversity of canine olfactory receptors. *BMC Genomics*. 2009 14;10:21.
7. Hayden S, Bekaert M, Crider TA, Mariani S, Murphy WJ, Teeling EC. Ecological adaptation determines functional mammalian olfactory subgenomes. *Genome Res*. 2010 20(1):1-9.
8. Berglund J, Nevalainen EM, Molin AM, Perloski M; LUPA Consortium, André C, Zody MC, Sharpe T, Hitte C, Lindblad-Toh K, Lohi H, Webster MT. Novel origins of copy number variation in the dog genome. *Genome Biol*. 2012 23;13(8):R73
9. Karyadi DM, Karlins E, Decker B, vonHoldt BM, Carpintero-Ramirez G, Parker HG, Wayne RK, Ostrander EA. A copy number variant at the KITLG locus likely confers risk for canine squamous cell carcinoma of the digit. *PLoS Genet*. 2013 9(3):e1003409.
10. Kanemaki N, Tchedre KT, Imayasu M, Kawarai S, Sakaguchi M, Yoshino A, Itoh N, Meguro A, Mizuki N. Dogs and humans share a common susceptibility gene SRBD1 for glaucoma risk. *PLoS One*. 2013 11;8(9):e74372.
11. Forman OP, De Risio L, Mellersh CS. Missense mutation in CAPN1 is associated with spinocerebellar ataxia in the Parson Russell Terrier dog breed. *PLoS One*. 2013 31;8(5):e64627.
12. Vernau KM, Runstadler JA, Brown EA, Cameron JM, Huson HJ, Higgins RJ, Ackerley C, Sturges BK, Dickinson PJ, Puschner B, Giulivi C, Shelton GD, Robinson BH, DiMauro S, Bollen AW, Bannasch DL. Genome-wide association analysis

- identifies a mutation in the thiamine transporter 2 (SLC19A3) gene associated with Alaskan Husky encephalopathy. *PLoS One*. 2013 8(3):e57195.
13. Parasuraman R, Greenwood PM, Kumar R, Fossella J. Beyond heritability: neurotransmitter genes differentially modulate visuospatial attention and working memory. *Psychol Sci*. 2005 16(3):200–7.
 14. Hejjas K, Vas J, Kubinyi E, Sasvari-Szekely M, Miklosi A, Ronai Z. Novel repeat polymorphisms of the dopaminergic neurotransmitter genes among dogs and wolves. *Mamm Genome*. 2007 18(12):871–9.
 15. Greenwood PM, Sundararajan R, Lin MK, Kumar R, Fryxell KJ, Parasuraman R. Both a nicotinic single nucleotide polymorphism (SNP) and a noradrenergic SNP modulate working memory performance when attention is manipulated. *J Cogn Neurosci*. 2009 21(11):2139–53.
 16. Espeseth T, Sneve MH, Rootwelt H, Laeng B. Nicotinic receptor gene *CHRNA4* interacts with processing load in attention. *PLoS One*. 2010 22;5(12):e14407.
 17. Greenwood PM, Parasuraman R, Espeseth T. A cognitive phenotype for a polymorphism in the nicotinic receptor gene *CHRNA4*. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012 36(4):1331–41.
 18. Genetic variation in nicotinic receptors affects brain networks involved in reorienting attention. Giessing C, Neber T, Thiel CM. *Neuroimage*. 2012 2;59(1):831–9.
 19. Kubinyi E, Vas J, Hejjas K, Ronai Z, Brúder I, Turcsán B, Sasvari-Szekely M, Miklósi A. Polymorphism in the tyrosine hydroxylase (TH) gene is associated with activity–impulsivity in German Shepherd Dogs. *PLoS One*. 2012 7(1):e30271.
 20. Craven BA, Neuberger T, Paterson EG, Webb AG, Josephson EM, Morrison EE, Settles GS. Reconstruction and morphometric analysis of the nasal airway of the dog (*Canis familiaris*) and implications regarding olfactory airflow. *Anat Rec (Hoboken)*. 2007 290(11):1325–40.
 21. Craven BA1, Paterson EG, Settles GS. The fluid dynamics of canine olfaction: unique nasal airflow patterns as an explanation of macrosmia. *J R Soc Interface*. 2010 6;7(47):933–43.
 22. Berns GS, Brooks AM, Spivak M. Functional MRI in awake unrestrained dogs. *PLoS One*. 2012;7(5):e38027.
 23. Buschhüter D, Smitka M, Puschmann S, Gerber JC, Witt M, Abolmaali ND, Hummel T. Correlation between olfactory bulb volume and olfactory function. *Neuroimage*. 2008 15;42(2):498–502.
 24. Hummel T, Damm M, Vent J, Schmidt M, Theissen P, Larsson M, Klussmann JP.

- Depth of olfactory sulcus and olfactory function. *Brain Res.* 2003 13;975(1-2):85-9.
25. Shatz CJ. Dividing up the neocortex. *Science.* 1992 9;258(5080):237-8.
 26. Draganski B, May A. Training-induced structural changes in the adult human brain. *Behav Brain Res.* 2008 1;192(1):137-42.
 27. Ilg R, Wohlschläger AM, Gaser C, Liebau Y, Dauner R, Wöller A, Zimmer C, Zihl J, Mühlau M. Gray matter increase induced by practice correlates with task-specific activation: a combined functional and morphometric magnetic resonance imaging study. *J Neurosci.* 2008 16;28(16):4210-5.
 28. Driemeyer J, Boyke J, Gaser C, Büchel C, May A. Changes in gray matter induced by learning--revisited. *PLoS One.* 2008 23;3(7):e2669.
 29. Seubert J, Freiherr J, Frasnelli J, Hummel T, Lundström JN. Orbitofrontal cortex and olfactory bulb volume predict distinct aspects of olfactory performance in healthy subjects. *Cereb Cortex.* 2013 23(10):2448-56.
 30. Delon-Martin C, Plailly J, Fonlupt P, Veyrac A, Royet JP. Perfumers' expertise induces structural reorganization in olfactory brain regions. *Neuroimage.* Mar;68:55-62.
 31. Yao L, Yi X, Wei Y. Gray matter alteration in isolated congenital anosmia patient: a voxel-based morphometry study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013 270(9):2569-73.
 32. Tapp PD, Head K, Head E, Milgram NW, Muggenburg BA, Su MY. Application of an automated voxel-based morphometry technique to assess regional gray and white matter brain atrophy in a canine model of aging. *Neuroimage.* 2006 1;29(1):234-44.
 33. Lee EY, Eslinger PJ, Du G, Kong L, Lewis MM, Huang X. Olfactory-related cortical atrophy is associated with olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2014 29(9):1205-8.
 34. Gazit I, Terkel J. Domination of olfaction over vision in explosives detection by dogs. *Appl Anim Behav Sci.* 2003 32(1):65-73.
 35. Maejima M, Inoue-Murayama M, Tonosaki K, Matsuura N, Kato S, Saito Y, Weiss A, Murayama Y, Ito S. Traits and genotypes may predict the successful training of drug detection dogs. *Appl Anim Behav Sci.* 2007 107(3-4):287-98.
 36. Zahid I, Grgurinovic C, Zamana T, Keyzer RD, Cayzer L. Assessment of technologies and dogs for detecting insect pests in timber and forest products. *Scand J Forest Res.* 2012 27(5):492-502.
 37. Sinn D, Gosling SD, Hilliard S. Personality and performance in military working dogs: Reliability and predictive validity of behavioral tests. *Appl Anim Behav Sci.* 2010 127(1-2):51-65.
 38. Fukuhara R, Yamaguchi T, Ukuta H, Roy S, Tanaka J, Ogura G. Development and

- introduction of detection dogs in surveying for scats of small Indian mongoose as invasive alien species. *J Vet Behav.* 2010 5(2):101-11.
39. Adamkiewicz E, Jezierski T, Walczak M, Górecka-Bruzda A, Sobczyńska M, Prokopczyk M, Ensminger J. Traits of drug and explosives detection in dogs of two breeds as evaluated by their handlers and trainers. *Anim Sci Pap Rep.* 2013 31(3):205-217
 40. Salvin HE, McGrath C, McGreevy PD, Valenzuela MJ. Development of a novel paradigm for the measurement of olfactory discrimination in dogs (*Canis familiaris*): A pilot study. *J Vet Behav.* 2012 7(1):3-10.
 41. Oh HJ, Park JE, Kim MJ, Hong SG, Ra JC, Jo JY, Kang SK, Jang G, Lee BC. Recloned dogs derived from adipose stem cells of a transgenic cloned beagle. *Theriogenology.* 2011 15;75(7):1221-31.
 42. Yin XJ, Lee HS, Yu XF, Kim LH, Shin HD, Cho SJ, Choi EG, Kong IK. Production of second-generation cloned cats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology.* 2008 69(8):1001-6.
 43. Cho SK, Kim JH, Park JY, Choi YJ, Bang JI, Hwang KC, Cho EJ, Sohn SH, Uhm SJ, Koo DB, Lee KK, Kim T, Kim JH. Serial cloning of pigs by somatic cell nuclear transfer: restoration of phenotypic normality during serial cloning. *Dev Dyn.* 2007 236(12):3369-82.
 44. Kubota C, Tian XC, Yang X. Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol.* 2004 22(6):693-4.
 45. Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA, Westhusin ME. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod.* 2000 62(5):1135-40.
 46. Wakayama T, Shinkai Y, Tamashiro KL, Niida H, Blanchard DC, Blanchard RJ, Ogura A, Tanemura K, Tachibana M, Perry AC, Colgan DF, Mombaerts P, Yanagimachi R. Cloning of mice to six generations. *Nature.* 2000 21;407(6802):318-9.
 47. Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH, Waddington D, Wilmut I, Colman A, Schnieke AE. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature.* 1999 27;399(6734):316-7.
 48. Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, Mak J, Schertzer M, Chavez EA, Sawyer N, Lansdorp PM, West MD. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science.* 2000 28;288(5466):665-9.
 49. Tian XC, Xu J, Yang X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat Genet.* 2000 Nov;26(3):272-3.

50. Miyashita N, Shiga K, Yonai M, Kaneyama K, Kobayashi S, Kojima T, Goto Y, Kishi M, Aso H, Suzuki T, Sakaguchi M, Nagai T. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol Reprod.* 2002 66(6):1649-55.
51. Betts D1, Bordignon V, Hill J, Winger Q, Westhusin M, Smith L, King W. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 30;98(3):1077-82.
52. Jeon HY, Hyun SH, Lee GS, Kim HS, Kim S, Jeong YW, Kang SK, Lee BC, Han JY, Ahn C, Hwang WS. The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows. *Mol Reprod Dev.* 2005 71(3):315-20.
53. Konishi K, Yonai M, Kaneyama K, Ito S, Matsuda H, Yoshioka H, Nagai T, Imai K. Relationships of survival time, productivity and cause of death with telomere lengths of cows produced by somatic cell nuclear transfer. *J Reprod Dev.* 2011 57(5):572-8.
54. Xia L, Wang XX, Hu XS, Guo XG, Shang YP, Chen HJ, Zeng CL, Zhang FR, Chen JZ. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2008 155(3):387-94.
55. Dashinimaev EB, Muchkaeva IA, Faizullin RR, Yegorov YY, Akimov SS, Terskikh VV, Vasiliev AV, Kirpichnikov MP. Induction of telomerase activity increase reprogramming efficiency of human dermal fibroblasts. *Moscow Univ Biol Sci Bull.* 67(1);6-12.
56. Kwak SS1, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology.* 2012 1;78(1):86-101.
57. Craven BA, Paterson EG, Settles GS, Lawson MJ. Development and verification of a high-fidelity computational fluid dynamics model of canine nasal airflow. *J Biomech Eng.* 2009 131(9):091002.
58. Bartlett M. A novice looks at puppy aptitude testing. *Am Kennel Gazette.* 1979
59. Rooney NJ, Bradshaw JW, Almey H. Attributes of specialist search dogs--a questionnaire survey of UK dog handlers and trainers. *J Forensic Sci.* 2004 49(2):300-6.
60. Lesniak A1, Walczak M, Jezierski T, Sacharczuk M, Gawkowski M, Jaszczak K. Canine olfactory receptor gene polymorphism and its relation to odor detection performance by sniffer dogs. *J Hered.* 2008 99(5):518-27.

61. Lit L, Belanger JM, Boehm D, Lybarger N, Oberbauer AM. Differences in behavior and activity associated with a poly(a) expansion in the dopamine transporter in Belgian Malinois. *PLoS One*. 2013 23;8(12):e82948.
62. Tillerson JL, Caudle WM, Parent JM, Gong C, Schallert T, Miller GW. Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. *Behav Brain Res*. 2006 15;172(1):97–105.
63. Kis A, Bence M, Lakatos G, Pergel E, Turcsán B, Pluijmakers J, Vas J, Elek Z, Brúder I, Földi L, Sasvári-Székely M, Miklósi A, Rónai Z, Kubinyi E. Oxytocin receptor gene polymorphisms are associated with human directed social behavior in dogs (*Canis familiaris*). *PLoS One*. 2014 15;9(1):e83993.
64. Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*. 2004 3(5):291–304.
65. Braga-Neto P, Felício AC, Pedroso JL, Dutra LA, Bertolucci PH, Gabbai AA, Barsottini OG. Clinical correlates of olfactory dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011 17(5):353–6.
66. Radvány J, Camargo CH, Costa ZM, Fonseca NC, Nascimento ED. Machado-Joseph disease of Azorean ancestry in Brazil: the Catarina kindred. Neurological, neuroimaging, psychiatric and neuropsychological findings in the largest known family, the "Catarina" kindred. *Arq Neuropsiquiatr*. 1993 51(1):21–30.
67. Klinker I, Minnerop M, Schmitz-Hübsch T, Hendriks M, Klockgether T, Wüllner U, Helmstaedter C. Neuropsychological features of patients with spinocerebellar ataxia (SCA) types 1, 2, 3, and 6. *Cerebellum*. 2010 9(3):433–42.
68. Pedroso JL, Braga-Neto P, Felício AC, Dutra LA, Santos WA, do Prado GF, Barsottini OG. Sleep disorders in machado-joseph disease: frequency, discriminative thresholds, predictive values, and correlation with ataxia-related motor and non-motor features. *Cerebellum*. 2011 10(2):291–5.
69. Doty RL. Olfaction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 13 Suppl 3:S225–8.
70. Tillerson JL, Caudle WM, Parent JM, Gong C, Schallert T, Miller GW. Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. *Behav Brain Res*. 2006 15;172(1):97–105.
71. Poulin MJ, Holman EA, Buffone A. The neurogenetics of nice: receptor genes for oxytocin and vasopressin interact with threat to predict prosocial behavior. *Psychol Sci*. 2012 1;23(5):446–52.
72. Gordon I, Vander Wyk BC, Bennett RH, Cordeaux C, Lucas MV, Eilbott JA,

- Zagoory-Sharon O, Leckman JF, Feldman R, Pelphrey KA. Oxytocin enhances brain function in children with autism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 24;110(52):20953–8.
73. Kis A, Bence M, Lakatos G, Pergel E, Turcsán B, Pluijmakers J, Vas J, Elek Z, Brúder I, Földi L, Sasvári-Székely M, Miklósi A, Rónai Z, Kubinyi E. Oxytocin receptor gene polymorphisms are associated with human directed social behavior in dogs (*Canis familiaris*). *PLoS One*. 2014 15;9(1):e83993.
74. Kang JW, Kang KS, Koo HC, Park JR, Choi EW, Park YH. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008 17(4):681–93.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업(해당사업 표기)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업(해당사업 표기)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.