공개( ), 비공개(√)발간등록번호(√)
농생명산업기술개발사업 제3차연도 최종보고서

발 간 등 록 번 호
11-1543000-002628-01

고양이 불임백신 개발 및 실용화 연구 최종보고서

2019. 2. 14.

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단
협동연구기관 / 서정대학교 산학협력단

농 림 축 산 식 품 부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "고양이 불임백신 개발 및 실용화 연구"(개발기간 : 2016. 05. 19. ~ 2018. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 02. 14.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 송 창 선 (인)
협동연구기관명 : 서정대학교 산학협력단 (대표자) 이 지 훈 (인)
참여기관명 : ㈜대성미생물연구소 (대표자) 조 항 원 (인)

주관연구책임자 : 최 인 수
협동연구책임자 : 한 진 수
협동연구책임자 : 조 윤 주
참여기관책임자 : 허 원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<요약문>

연구의 목적 및 내용	○ 길고양이 번식억제용 불임백신 개발 ○ 실험동물 및 목적동물을 이용한 불임백신 효능 평가 ○ 전임상 계획 수립 및 길고양이에 대한 불임백신 효능 평가 ○ 고양이 불임백신의 대량 생산기술 개발 ○ 고양이 불임백신 산업화 및 야외적용 관리방안 확립				
연구개발성과	○ 길고양이 번식억제용 불임백신 개발 ▪ 고양이 성 성숙 호르몬 기능을 차단할 수 있는 백신개발 ▪ 2회 접종으로 고양이의 번식능력을 억제할 수 있는 불임백신 개발 ▪ E. coli 단백질 발현 시스템을 이용한 GnRH 대량발현 및 이를 이용한 백신 개발 ▪ GnRH를 발현하는 재조합 Mycobacterium 제작을 통한 불임백신 개발 ○ 실험동물 랫트 및 고양이를 이용한 불임백신 효능 평가 ▪ 실험용 랫트 및 고양이를 대상으로 백신의 안전성 평가 ▪ 백신의 용량, 투여횟수 확립 ▪ 혈청 및 조직검사를 통한 수컷 랫트 및 고양이의 면역거세효과 평가 ▪ 암컷 고양이에 대한 번식능력 상실 검증 및 평가 ○ 전임상 계획 수립 ▪ 길고양이의 개체 수, 분포 및 서식환경 등에 관한 기초적 자료 확보 ▪ 길고양이 중성화 매뉴얼 제작 및 관리방안 수립 ○ 고양이 불임백신의 대량 생산기술 개발 및 야외적용 관리방안 확립 ▪ 단독 혹은 복합제 불임백신의 대량생산 기술개발 ▪ 기술이전과 산업화를 통한 백신의 대량생산 체계 확립 ▪ 서울시 및 전국적 길고양이 관리방안 마련				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	○ 고성능의 고양이 불임백신 개발 및 산업화 ○ 불임백신의 야외 적용을 통한 길고양이 개체수 조절 ○ 전국적 길고양이 관리방안 마련 ○ 불임백신 적용을 통한 길고양이 개체수 감소 결과 홍보 ○ 서울시 및 전국의 지자체를 통한 길고양이 불임백신 공급 및 적용 ○ 애완용 고양이에 불임백신 적용 ○ 고양이 불임백신의 수출을 통한 국익창출				
국문핵심어 (5개 이내)	길고양이	불임백신	면역거세	개체수	관리방안

〈Summary〉

Purpose	○ Development of immunocontraceptive vaccine for stray cats ○ Evaluation of the efficacy of immunocontraceptive vaccine to laboratory and target animals ○ Designing of pre-clinical experimental plans and evaluation of the efficacy of immunocontraceptive vaccine to stray cats ○ Large scale production of immunocontraceptive vaccine ○ Production of immunocontraceptive vaccine in company and application to field situation
Contents	○ Development of immunocontraceptive vaccine for stray cats ▪ Development of the vaccine which prevents the release of gonadotropin ▪ Development of single or double shot vaccine which inhibits feline fertility ▪ Development of the vaccine with the recombinant GnRH protein expressed in E. coli ▪ Development of the vaccine with Mycobacterium expressing GnRH on it ○ Evaluation of the efficacy of immunocontraceptive vaccine with rats and cats ▪ Evaluation of the safety of the vaccine to rats and cats ▪ Determination of doses and injection times of the vaccine ▪ Evaluation of vaccine efficacies by determining serological and histological parameters ▪ Evaluation of infertility rates to female cats injected with the vaccine ○ Designing of pre-clinical experimental plans ▪ Data collection about the numbers, distributions, and living environments of stray cats ▪ Making a neutralizing manuals for stray cat and management strategy ○ Production of feline immunocontraceptive vaccine and application of it to field situations ▪ Development of single or complex vaccines ▪ Establishment of large scale production system of the vaccine in company ▪ Management of stray cats in Seoul and other provinces
Development results	○ Development of high efficacy feline immunocontraceptive vaccines ○ Application of the vaccine in field situations and controlling the numbers of stray cats ○ Development of the strategy to control the numbers of stray cats in Korea
Expected Contribution	○ Promotion of good effects of the immunocontraceptive vaccine to reduce the numbers of stray cats ○ Distribution of the vaccine to Seoul and other provinces ○ Application of the vaccine to cats in homes ○ Exportation of the vaccine and making a national profits

Keywords	Stray cats	Immunocontraceptive vaccine	Immunocastration	Number	Controlling strategy

<본문목차>

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ····· 1
2. 연구 개발 대상의 국내외 현황 ····· 9
3. 연구수행 내용 및 결과 ····· 12
4. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 49
5. 연구결과의 활용 계획 등 ····· 51
6. 연구실 안전조치 이행실적 ····· 52
7. 참고 문헌 ····· 54

제 1장. 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발의 목적 및 목표

○ 길고양이 번식억제용 불임백신 개발

- 고양이 성 성숙 호르몬 기능을 차단할 수 있는 백신개발을 통한 도심의 길고양이 번식억제 방안 마련
- 2회 접종으로 암컷 및 수컷 고양이의 번식능력을 억제할 수 있는 불임백신 개발
- E. coli 단백질 발현 시스템을 이용한 고양이 GnRH 대량발현 및 이를 이용한 불임백신 개발
- 고양이 GnRH를 발현하는 재조합 Mycobacterium 제작을 통한 불임백신 개발

○ 랫트 및 고양이를 이용한 실험실내 불임백신 효능평가

- 실험용 랫트 및 고양이를 대상으로 백신의 안전성 평가
- 수컷 동물에 대한 백신의 용량, 투여횟수 확립, 혈청 및 조직검사를 통한 거세효과 평가
- 암컷 고양이에 대한 번식능력 상실 검증 및 평가

○ 전임상 계획수립

- 길고양이의 개체 수, 분포 및 서식환경 등에 관한 기초적 자료 확보
- 길고양이 중성화 매뉴얼 제작 및 관리방안 수립

○ 고양이 불임백신의 산업화 및 야외적용 관리방안 마련

- 단독 혹은 복합제 불임백신의 대량생산 기술개발
- 기술이전과 산업화를 통한 백신의 대량생산 체계 확립
- 국내 및 국외 수출 사업방안 마련
- 전국적 길고양이 관리방안 마련

제 2절. 연구개발의 필요성

<u>〈길고양이에 대한 사회적인 문제점〉</u>

서울시의 길고양이 개체 수는 약 20만 마리로 추정하고 있음. 발정기가 되면 암컷 고양이는 아기 울음소리를 내어 주거지역에서 민원을 발생시키며 수컷 고양이는 서열다툼으로 싸움을 일으키고 영역을 표시하기 위해 불쾌한 냄새가 나는 오줌을 뿌림. 고양이는 연 3~4회의 발정을 가지며 임신기간은 약 60~65일로 평균새끼 생산 마리 수는 3~5마리임. 고양이의 수명은 대략 10~15년 전후로 암컷 고양이 한 마리당 최대 200마리의 자묘를 생산하여 길고양이의 개체 수 조절이 어려움 (임신 가능시기 10년× 발정주기 년 3~4회 × 새끼 3~5마리 = 암 고양이 1

마리 약90~200마리 생산).

<현재 길고양이의 개체 수 조절을 위한 국내외 정책>

현재 국내의 길고양이 개체 수 조절을 위한 정책은 포획 후 중성화수술을 실시하여 방사하는 (TNR, Trap-Neuter-Return) 방식임. 연간 5,000-6,000마리를 대상으로 중성화수술을 하고 있으나 이는 현재 길고양이 수의 2-3% 수준이며 전체 길고양이 중 약 10%가 중성화되어있음. ‘Fibonacci’ s 70% rule’ 은 전체 길고양이의 70%를 중성화 시켰을 때 개체 수 증가가 멈추고 70%를 넘을 경우 개체수 감소 효과를 볼 수 있다는 수학적 이론임. 이는 단순히 수학적 이론이며 결국 최대한 많은 수를 중성화 시켜야 한다는 것이 최근 주장임. 지자체는 현재 길고양이로 인해 민원이 발생하면 해당 지역에 TNR을 실시함. 그러나 효과적인 TNR을 위해서는 현재와 같은 산발적인 TNR이 아닌 지역을 선정하여 집중적으로 TNR을 실시하여 고양이 군집(colony) 내에서 중성화된 개체를 늘리는 것이 필요함. 그러나 TNR은 제대로 된 효과를 보기위해서는 중성화 수술이 가능한 전문가와 막대한 인력 및 비용이 필요하며 한 군집의 길고양이 전체를 포획한다는 것이 현실적으로 불가능 함. 2014년의 MBN의 여론조사에서 중성화를 시켜야 한다는 의견이 42.8%로 안락사를 하여 개체수를 조절해야한다는 23.4%에 비해 높은 비율을 보이는 등 안락사에 대한 비판여론이 형성되어 현재에는 TNR이란 방식이 사용되고 있음.

<Trap-Neuter-Retern (TNR)의 개념도 및 비용>

포획 후 수술을 실시하는 것이 가장 확실한 중성화 방법이지만, 침습적인 접근법으로 인해 길고양이가 수술 후 회복 기간이 길다는 단점이 있음. 주사제를 사용한다면 비침습적이며 수술에 소요되는 비용을 줄일 수 있으며 수술 부작용으로 길고양이가 폐사하는 위험을 감소시키는 장점이 있음.

미국은 High-Quality, High-Volume Spay/Neuter Surgery (HQHVSN)라는 명칭으로 시민단체, 자원봉사자, 지자체의 지원으로 보다 많은 수의 길고양이를 중성화시키기 위해 노력하고 있음. 임신한 길고양이, 수유 중인 길고양이, 1kg의 어린 고양이 역시 중성화 수술의 대상이 되고 있음. 길고양이 개체수 조절을 위한 노력의 일환으로 비침습적인 중성화방법을 연구하고 있으며 이미 수컷의 중성화가 가능한 주사제가 사용되고 있음 (ZeuterinTM, Ark sciences). 또한 흰꼬리사슴(white-tailed deer)의 GnRH immunocontraceptive vaccine (GonaConTM, US Environmental Protection Agency)을 암컷 고양이에게 적용해본 결과, 길고양이 개체 수 조절에 유용할 것이라는 연구도 있음 (Theriogenology, 76, 1517-1525, 2011).

이러한 해외 국가들의 사례를 비추어볼 때 동물 복지와 시민의 윤리 의식이 높아가는 국내 여건상 국내의 유기묘 숫자 조절 정책도 안락사를 대체하고 저렴한 비용으로 효과가 높은 정책을 필요로 하고 있는 실정임. 따라서 동물복지 향상 및 동물 애호가들의 요구조건에 맞는 새로운 대안으로 불임 백신의 적용을 통한 유기묘의 숫자를 조절하는 것이 가장 적절한 정책으로 판단되고 있음. 아래 표는 TNR, 주사제 및 사료첨가형 불임 백신의 장단점을 비교 설명하고 있음.

	장 점	단 점
중성화 수술	• 한번에 완벽한 중성화가 가능함	• 수술이 가능한 전문인력이 필요함 • 수술에 필요한 시간 및 비용이 많이 필요함
주 사 제	• 수술이 가능한 전문인력이 없어도 시술이 가능함 • 저렴한 비용으로 중성화가 가능함	• 일부 면역학적으로 반응하지 않는 개체가 존재함

<u>〈불임백신 종류 및 개발의 필요성〉</u>

Gonadotrophin releasing hormone (GnRH)는 10 개의 아미노산 기로 이루어진 호르몬으로 시상하부에서 생성되어 뇌하수체에 작용함으로써 Follicle stimulating hormone (FSH) 및 Luteinizing hormone (LH)의 생성을 촉진시킴. FSH 및 LH는 수컷 및 암컷 동물의 성 성숙을 유도하는 호르몬임. 시상하부에서 GnRH의 생성을 원천적으로 차단하였을 경우에 거세효과가 발생한다는 연구 결과가 보고되고 있음. 따라서 GnRH를 항원으로 이용하여 동물에 접종하면 백신을 접종받은 동물에서는 GnRH를 인식하는 항체가 형성됨. GnRH를 인식하는 항체는 체내에서 생성되는 GnRH를 제거함으로써 수컷 및 암컷 동물의 성 성숙을 원천적으로 차단함으로써 거세효과를 발휘하게 됨 (그림 1).

그러나 GnRH는 동물에서 생성되는 자체 단백질이기 때문에 정상적인 동물의 면역체계에서는 GnRH를 자가 항원으로 인식하여 GnRH에 대한 항체를 형성하지 않음. 따라서 GnRH를 인식하는 항체를 형성시키기 위해서 인위적으로 과량의 GnRH를 투여하거나 GnRH의 항원성을 향상시키기 위해서 carrier 단백질과 융합시켜 투여하는 방법이 시도되고 있음. 최근에 호주에 있는 CSL이라는 회사에서 개발한 거세백신의 경우, carrier protein으로 KLH를 사용하여 거세백신을 개발하였음.

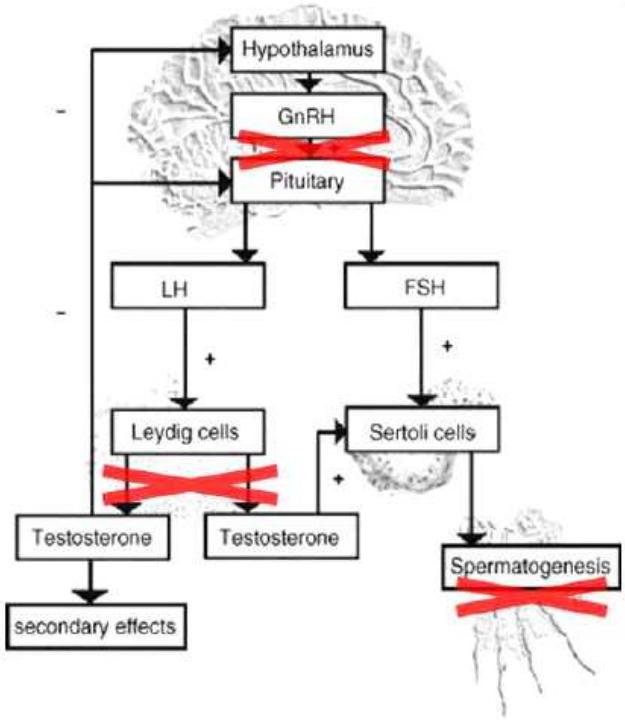


그림 1. GnRH의 생성 및 성 성숙 작용 기전.

본 연구진은 수년간의 선행연구를 통해 살모넬라균의 flagellin 항원(STF2)이 결합된 GnRH 중성화 주사제 백신을 개발하여 랫드와 돼지를 대상으로 면역거세 효과를 증명한 바 있음 (선행연구 결과 1, 2 참고). 살모넬라균의 flagellin을 carrier 단백질로 이용한 이유는 동물의 종 특이성에 따른 면역반응을 극복하고 모든 동물에서 면역학적 거세 효과를 유발하기 위함이었음. 10개의 아미노산으로 구성된 GnRH 또한 거의 모든 동물에서 보존된 아미노산으로 구성되어 있기 때문에 고양이에게 적용이 가능함. 선행연구를 통해 개발된 STF2-GnRH 백신을 개량함으로써 본 연구에서 제안하는 목적 동물인 길고양이에게 적용할 수 있음.

이에 본 연구진은 E. coli 단백질 발현 시스템을 통해 제작된 재조합 STF2-GnRH 단백질과 Mycobacterium 균체 표면을 통해 발현되는 STF2-GnRH를 이용하여 고양이 불임백신으로 개발함으로써 길고양이의 번식을 억제시킬 수 있는 근본적 기반을 확립하고자 함.

제 3절. 연구개발의 범위

<제 1 세부과제>

1. E. coli 발현 시스템을 이용한 고양이용 STF2-GnRH 불임백신 개발 및 랫트를 이용한 효능 평가
   - 대장균을 이용한 재조합 STF2-GnRH 단백질 발현 및 정제 시스템 확립
   - 백신 투여 랫트의 혈청분석을 통한 anti-GnRH 항체형성 및 성 성숙 호르몬 감소 증명
   - 랫트의 고환조직 분석을 통한 정자세포 무형성 및 고환의 위축 증명

2. Mycobacterium 발현 시스템을 적용한 고양이용 STF2-GnRH 불임백신 개발 및 랫트를 이용한 효능 평가
   - 유전자 조작을 통하여 Mycobacterium smegmatis 표면에서 재조합 STF2-GnRH 단백질이 발현되도록 함.
   - Mycobacterium smegmatis 표면에서 발현된 STF2-GnRH 단백질 확인
   - STF2-GnRH를 발현하는 Mycobacterium을 불활화시킴으로써 불활화 백신 제작
   - 불활화 백신을 랫트에 투여
   - 백신 투여 랫트의 혈청분석을 통한 anti-GnRH 항체형성 및 성 성숙 호르몬 감소 증명
   - 랫트의 고환조직 분석을 통한 정자세포 무형성 및 고환의 위축 증명

3. GnRH 불임백신을 접종한 고양이 감별용 ELISA 시스템 개발
   - GnRH peptide 및 재조합 단백질 제작
   - Anti-GnRH 항체 검출 ELISA 시스템 개발
   - 백신접종 고양이의 항체가 측정기반 확립

4. 대량생산 시스템 개발, 시제품 제작 및 산업화 기반 마련
   - 대량생산 시스템 개발 및 기술이전
   - 시제품 제작 및 산업화 기반 마련
   - 해외시장 분석 및 수출전략 마련

제 2 세부과제

1. 서울시 고양이 중성화 사업 (TNR) 실태조사 및 전임상 계획 수립
   - 서울시에서 수행 중인 길고양이 중성화 사업 분석을 통한 문제점 파악과 개선안 마련
   - 길고양이 개체 수, 분포도 및 서식환경 파악
   - 특정지역 길고양이 모집단 선정 및 야외실험 계획수립

2. 실험실 환경에서 실험용 고양이를 대상으로 제작된 STF2-GnRH 불임백신 효능평가
   - 수컷 실험용 고양이에 불임백신 투여 후 혈청분석을 통한 anti-GnRH 항체형성 증명, 성 성숙 호르몬 감소 및 고환조직의 위축 증명
   - 암컷 실험용 고양이에 불임백신 투여 후 혈청분석을 통한 anti-GnRH 항체형성 증명, 성

성숙 호르몬 감소 및 자묘생산 능력 불능 검증

3. 길고양이 중성화 매뉴얼 및 관리방안 수립
- 길고양이에 적용 가능한 중성화 매뉴얼 작성
- 서울시 및 전국적 길고양이 관리방안 수립

◎ 연구개발 기술 개요

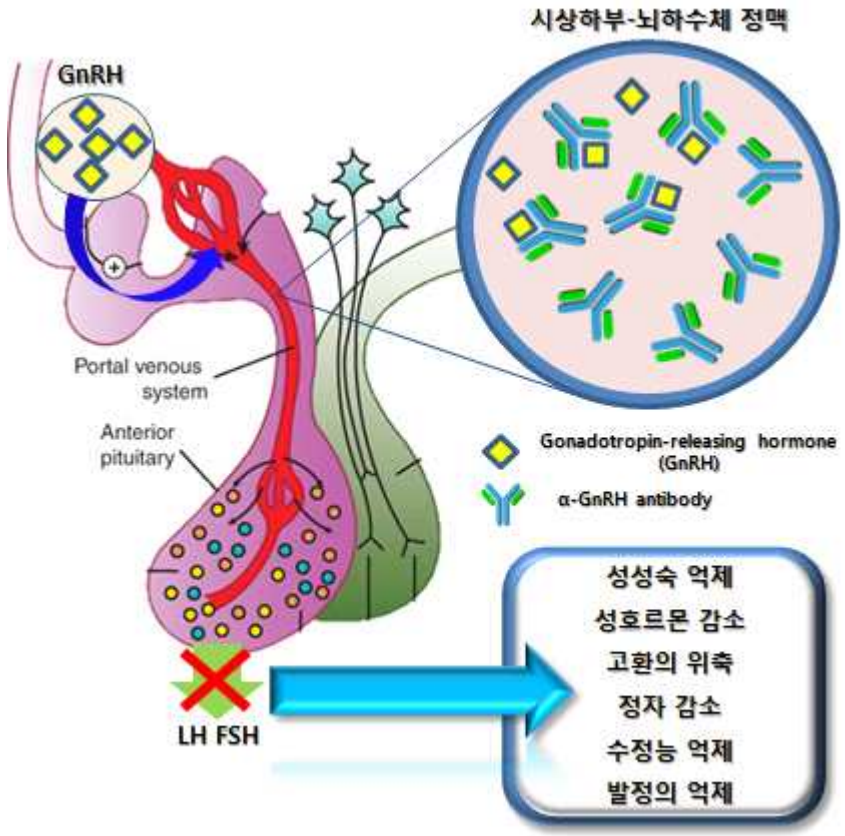
1. 불임백신의 개념 및 작용기전

- Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)은 뇌하수체에서 분비되어 수컷 및 암컷 동물의 성성숙 호르몬 방출을 촉진함으로써 성 성숙 및 번식기능을 촉진하는 호르몬임.

- 정상 조건의 생체 내에서는 GnRH가 체내에서 생성되는 자가 호르몬이기 때문에 anti-GnRH 항체가 형성되지 않음.

- 그러나 과량의 재조합 GnRH 단백질을 포함한 백신을 동물에 투여하면 GnRH에 대한 항체 (anti-GnRH 항체)가 형성됨으로써 뇌하수체로부터 GnRH의 분비를 차단하게됨.

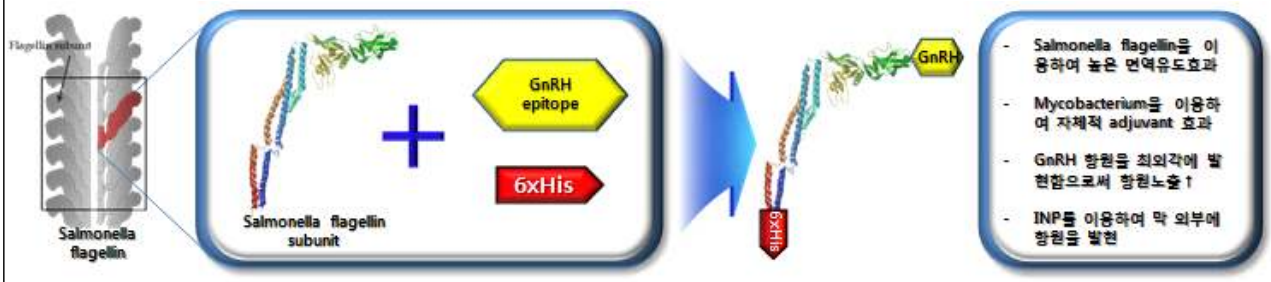
- GnRH의 분비가 차단되면 하위단계의 Luteinizing hormone (LH)과 Follicle-stimulating hormone(FSH)의 생성이 차단되어 결국 수컷 동물의 고환조직이 위축되고 정자생성 능력이 급감함. 또한 유사한 기전을 통하여 암컷 동물의 성성숙도 방해함으로써 번식능력을 저하시키는 것이 불임백신의 작용기전임.



<GnRH 작용기전 및 anti-GnRH antibody에 의한 성성숙 호르몬 작용저해 모식도>

2. E. coli를 통해 발현된 고양이용 재조합 STF2-GnRH 불임백신

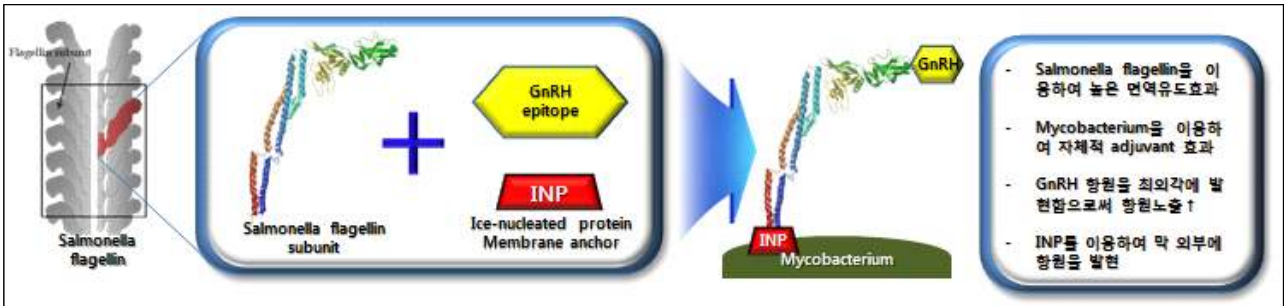
- 살모넬라균의 flagellin 단백질 중 하나인 STF2는 면역작용을 강하게 증대시키는 adjuvant 역할을 하는 단백질로 알려져 있음.
- STF2 단백질을 GnRH와 결합시킨 형태의 재조합 단백질을 E. coli 단백질 발현 시스템을 이용하여 발현시키며 정제된 단백질을 이용하여 백신을 제작함.
- GnRH에 대한 면역반응을 극대화시키기 위하여 GnRH의 epitope이 단백질 구조상 외부로 노출되도록 유전자 조작을 수행함.
- 반복적으로 항원을 노출시키는 개념으로 9-12 copy의 GnRH를 발현한 후 6 x His tag을 이용하여 단백질을 정제함.
- 정제된 단백질을 백신으로 조성함.



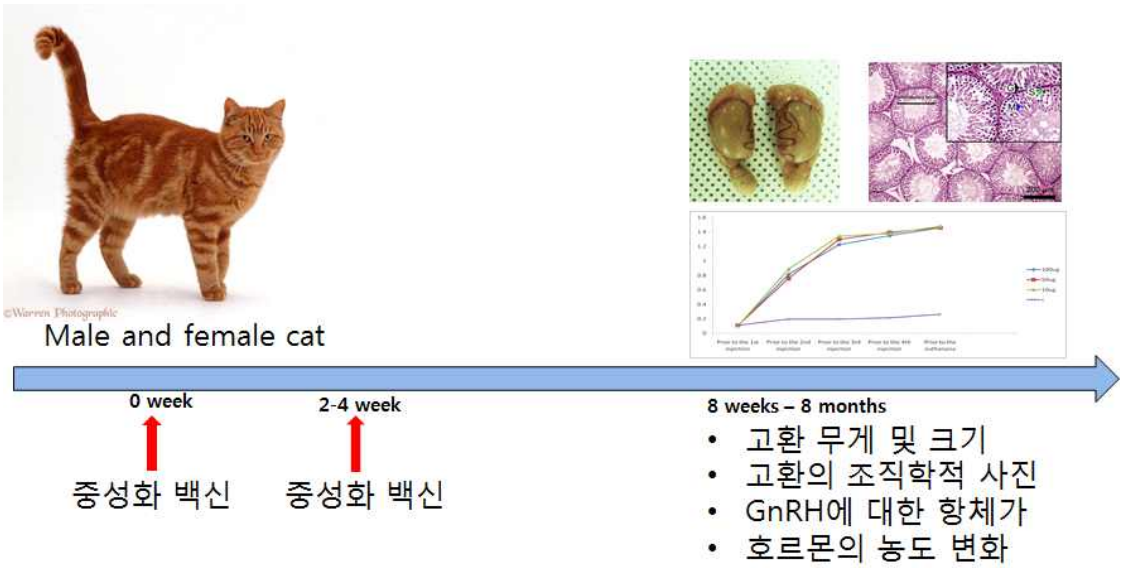
<E. coli 단백질 발현 시스템을 이용한 STF2-GnRH 재조합단백질 발현 모식도>

3. Mycobacterium 발현 고양이용 STF2-GnRH 불임 백신 개발

- 본 연구에 사용할 Mycobacterium smegmatis (M.smegmatis)는 비병원성 균주이기 때문에 안전하며 느리게 증식하는 다른 Mycobacterium 균주와 달리 단기간에 대량증식이 가능한 균주임.
- Mycobacterium은 E. coli에 비해 정상 구조 단백질의 발현율이 높고 내독소로 작용하는 LPS를 생성하지 않기 때문에 백신의 안전성 및 정제에 유리한 장점이 있음.
- Mycobacterium은 균체 자체로도 높은 면역자극 효과를 유발할 수 있으므로 최적의 백신 개발용 균주임.
- STF2-GnRH 항원을 Ice-nucleated protein (INP) anchor를 이용하여 mycobacterium의 표면에 발현시킴으로써 anti-GnRH 항체 생성을 극대화시킬 수 있음.
- STF2-GnRH 항원을 균체 표면에 발현하는 Mycobacterium smegmatis를 불활화 시킴으로써 불임백신을 제작함.



<Mycobacterium smegmatis 균체 표면에 발현되는 STF2-GnRH 항원 모식도>



<고양이를 이용한 중성화백신 실험의 진행도>

제 2장. 연구개발 대상의 국내외 현황

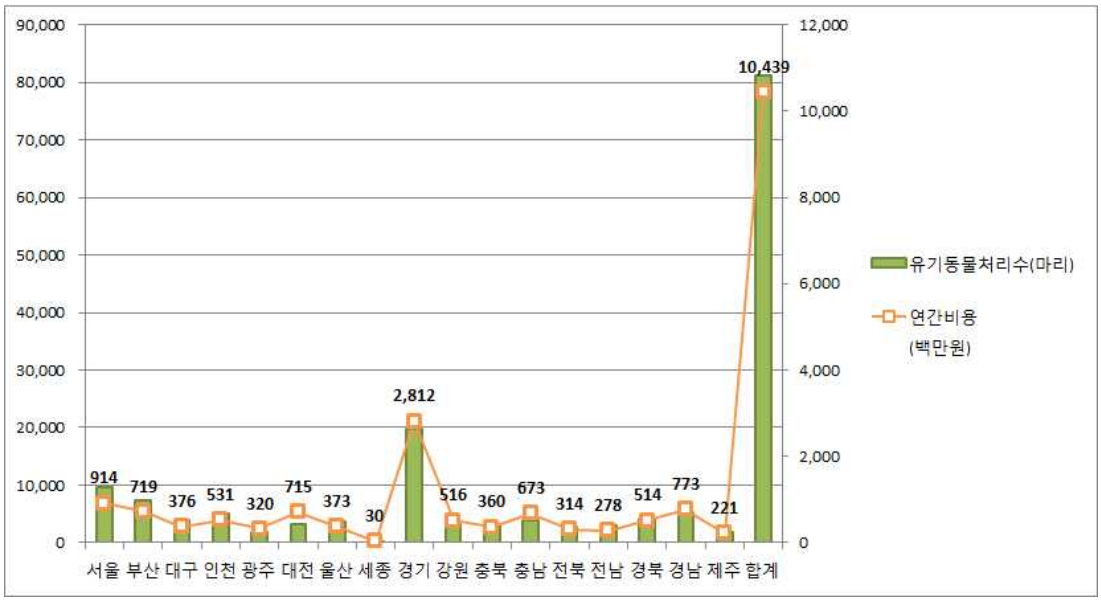
제 1절. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 국내 고양이 중성화 백신에 대한 연구는 진행되고 있지 않은 상태이며 국내 연구기관에서 시행한 중성화백신 효능 실험은 개, 돼지, 랫드에서의 실험만이 있음. 고양이에서의 새로운 중성화 백신에 대한 효능 연구는 국내 다양한 동물 종에 대한 중성화 백신 적용법을 구체화할 수 있을 것으로 보임.

○ 시장현황

- 서울시의 길고양이 개체 수는 약 20만 마리로 추산되고 있으며 전국에서 키우는 반려묘는 115만마리로 추산되고 있음. 일반적인 동물병원에서의 경우 중성화 비용이 수컷고양이의 경우 10만원대, 암컷고양이의 경우 40만원대인 것을 고려하였을 경우 서울시 길고양이를 모두 중성화 하였다고 가정하였을 때 약 500억원 정도의, 전국의 반려묘를 모두 중성화 대상으로 봤을 경우 약 2800억원 정도의 시장성을 가지고 있다고 볼 수 있음. 유기동물의 경우 최신자료인 2014년의 통계에 따르면 총 2만1천 마리의 유기묘가 발생하였고 유기묘만을 대상으로 추산하였을 때 무려 27억원 정도가 처리비용으로 발생하였음. 국내의 유기동물 개채수 대비 처리비용이 매년 12%정도 증가하는 것으로 추산됨에 따라 유기묘의 발생에 제동을 가하지 못한다면 2020년에는 약 53억원 가량의 처리비용이 발생할 것으로 보임. 길고양이와 유기묘의 개채수를 줄이기 위한 효율적이고 효과적인 방안이 필요한 실정임.



<국내 지역별 유기동물 처리비용>

○ 경쟁기관현황

- 현재 국내에서 시판중인 고양이 중성화 백신은 없는 실정이며 고양이 중성화백신을 개발 중인 기관도 알려져 있지 않음. 따라서 고양이 중성화 백신의 빠른 개발을 통해 국내 고양이 중성화 사업의 신속한 선점을 할 수 있음.

○ 지식재산권현황

- GnRH백신 특허는 국내에서 고려비엔피 주식회사와 건국대학교 산학협력단이 2011년에 출원한 STF2-GnRH에 대한 특허가 있으며 발명자는 건국대학교 소속의 최인수 교수임. 2009년에 출원된 CTLA-GnRH, GM-CSF-GnRH관련 특허도 마찬가지로 건국대학교 소속 최인수 교수가 발명하였음. 그 외에도 국내에 출원된 특허는 넥스젠바이오텍 주식회사의 재조합 폴리펩타이드 거세용 백신 특허로 2003년에 출원하였음.

○ 표준화현황

- 국내 고양이에 적용되는 중성화 백신은 없으며 길고양이의 개체 수 조절을 위해 포획한 고양이를 중성화하여 다시 놓아주는 TNR법이 시행되고 있음. TNR법을 대체할 쉽고 효율적인 방식의 고양이 개체 수 조절 방법의 개발은 전 국가적으로 활용될 수 있을 것으로 예상됨.

제 2절. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

-국외에서의 고양이 중성화 백신에 대한 연구는 미국의 플로리다 대학에서 KLH기반 GnRH 중성화백신 상품인 GonaCon에 대한 실험을 한 결과가 있으며 암컷과 수컷 모두에게서 실험을 하였음. GnRH백신과 다르게 Zona pellucida를 겨냥한 백신인 ZP 백신을 이용한 중성화 실험은 플로리다 대학과 호주의 머독 대학에서 시행되었었음. 앞에서 서술된 모든 실험들은 백신의 접종에 따른 중성화가 지속되는 기간과 조직학적 소견 등을 평가하였음. 하지만 중성화 백신의 적용과 그에 따른 개체 수 조절 효과에 대한 연구는 시행되지 않았음. 따라서 중성화 백신의 적용과 고양이의 개체 수 감소효과에 대한 연구가 필요함.

Pfizer 제약회사에서 개발된 Improvac 제품 모델

○ 시장현황

-길고양이는 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 문제시되고 있으며 특히 다른 야생동물들을 해침으로써 생기는 문제가 가장 심각한 문제로 대두되고 있음. 미국의 야생 고양이의 개체 수는 3천만~8천만 마리에 이를 것으로 2013년 보고된 바 있으며 호주의 야생 고양이의 개체 수는 1천8백만 마리가 되는 것으로 보고되었음. 호주의 보도 자료에 따르면 매일 야생 고양이가 매일 7천 5백만 마리, 그리고 매년 2백억 마리의 야생동물들을 먹어치우고 있을 것으로 추산하고 있음. ‘AGRICULTURE VICTORIA’의 자료에 따르면 호주 내 야생 고양이로 인한 경제적 손실은 1억 4천4백만 달러에 이를 것으로 추산되었으며 야생 고양이의 관리에만 2백만 달러가 사용되고 있음. 이에 따라 호주 정부는 2015년 말에 2020년이 될 때까지 2백만 마리의 야생 고양이를 죽이겠다고 발표했었음. 이렇듯 세계 각국에서 문제시

되고 있는 야생 길고양이에 의한 국가적인 직, 간접적 손해는 무시를 할 수 없는 수준에 이르렀으며 고양이의 개체 수 조절은 멸종 위기동물 및 야생동물의 보호와 이에 따른 국가적인 직, 간접적인 경제적 손해를 줄이기 위해 필수적임.

Fact check: Are feral cats killing over 20 billion native animals a year?

Updated 20 Nov 2014, 3:30pm

Environment Minister Greg Hunt has pledged new money to help community groups trap and eradicate feral cats.

"There are up to 20 million feral cats taking up to four native Australian animals a night. That is over 20 billion Australian native species being destroyed a year," Mr Hunt said on ABC's Landline on November 2.

It's well recognised that feral cats are a major threat to native wildlife, but are there really almost as many cats as people in Australia?

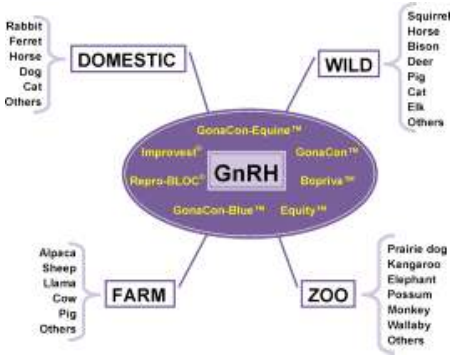
ABC Fact Check takes a look at the numbers.

PHOTO: The number of feral cats and how many native animals they kill is unverifiable. (Andrew Cooke, Invasive Animals CRC)

MAP: Australia

○ 경쟁기관현황

-국외 GnRH백신의 개발 경쟁기관으로는 Pfizer 제약회사가 있음. 현재 미국, 캐나다, 일본을 포함하여 국내에도 돼지 웅취 제거를 위한 Pfizer 제품인 Improvac이 판매 허가가 되어있음. 하지만 국내에서는 Improvac 접종 돼지의 등급판정관련 문로 인해 범용화에 어려움을 겪고 있음. 따라서 Pfizer 제약회사의 중성화 백신 분야에서의 국내 정착은 이루어지지 않았다고 볼 수 있음. 국외 중성화 백신 제품 중 고양이에게 적용될 것으로 유력한 제품은 GonaCon으로 미국 농무부의 연구기관인 National Wildlife Research Center(NWRC)에서 개발되었음. GonaCon은 현재 야생동물에서의 사용이 승인되었으며 고양이에게의 임상 적용은 승인이 되어있지 않음.



현재까지 시험 평가되었던 GnRH백신들과 적용 동물종들

○ 지식재산권현황

-국외 GnRH 중성화 백신 특허를 가장 많이 보유한 국가는 미국으로 Auburn University, Aphton Corp. 등에서 출원한 총 3가지 특허를 보유하고 있음. 그 외에도 캐나다와 칠레에서 1가지 특허를 각각 보유하고 있음.

○ 표준화현황

-현재 GnRH백신이 가장 많이 활용되고 있는 국가는 미국임. 미국에서 주로 활용되는 GnRH백신은 GonaCon으로 KLH와 결합된 GnRH백신임. 현재 GonaCon은 고양이에서의 효능 평가가 이루어지고 있지만 시판이 허용되어 있지 않은 상황으로 고양이 중성화 백신으로서 STF2-GnRH의 분석과 개발을 통해 미국에서 활용할 수 있을 것으로 예상됨.

제 3장. 연구수행 내용 및 결과

제 1절.E. coli 및 Mycobacterium 발현 고양이용 STF2-GnRH 불임 백신 개발

<제1 세부-건국대학교>

1. STF2-GnRH 유전자의 cloning 및 단백질 발현 E. coli주 선발

- STF2 단백질 구조 바깥쪽 domain의 유전자 위치 선별 후 pUC57 vector에 순차적으로 STF2 유전자와 GnRH유전자를 삽입하기 위한 primer를 제작하였음
- Salmonella typhimurium의 mRNA로부터 STF2의 DNA를 PCR기법으로 증폭한 후 pUC57 vector에 삽입하였음(그림 1.)
- STF2 단백질 구조의 바깥쪽 domain에 396bp 길이의 GnRH 유전자를 삽입하기 위한 제한효소 자리를 PCR기법을 통해 인위적인 mutation을 유도한 후 삽입하였음
- STF2 내부의 인위적인 mutation으로 인해 나뉜 705bp, 795bp의 fraction은 STF2-1, STF2-2로 새로 명명하였음(그림 1.)
- Mutation을 통해 만들어진 STF2 내부의 제한효소 자리에 GnRH 유전자를 삽입하기 위한 primer를 제작하였음
- 삽입된 제한효소 자리에 GnRH의 epitope sequence를 PCR기법으로 증폭한 후 클로닝하여 삽입하였음(그림 1.)
- Sequence가 확인된 STF2-GnRH 유전자는 PCR기법을 통해 pQE 6xHis 발현벡터에 삽입 후 M15 competent cell에 heat shock transformation을 이용하여 벡터를 삽입하였음

그림 1. STF2 및 GnRH클로닝 과정에 대한 모식도. 좌측 모식도: STF2와 GnRH gene의 pUC57 vector로의 cloning 과정; 우측 모식도: Cloning된 STF2-GnRH gene의 pQE 발현 벡터로의 삽입 과정

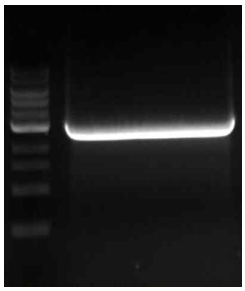


그림 2. STF2-GnRH유전자가 확인된 PCR사진(2,245 bp)

2. STF2-GnRH 발현

STF2-GnRH 단백질 발현벡터가 삽입된 M15 competent cell은 ampicillin(100 μg/ml)과 kanamycin(25 μg/ml)이 함유된 25ml의 LB broth에서 37℃에서 16시간 동안 배양하였음

- 배양된 cell은 ampicillin(100 μg/ml)과 kanamycin(25 μg/ml)이 함유된 1L의 LB broth에 1:40의 비율로 접종하여 OD가 0.8이상이 될 때까지 배양하였음
- OD가 0.8이상이 된 것을 확인 후 IPTG를 1mM이 되도록 분주하여 5시간동안 단백질을 발현함
- 발현된 단백질은 1시간 단위로 1ml씩 time course sampling한 후, SDS-PAGE를 통하여 72.49kda 위치의 밴드 발현을 확인하였음

3. 발현된 STF2-GnRH의 정제

STF2-GnRH 단백질 발현이 확인된 cell은 high centrifuge를 이용하여 6,000rpm으로 30분간 원심 분리하여 펠렛을 취하였음

- 펠렛은 -20℃에서 overnight하고, lysis buffer에 풀어 1시간 이상 반응시켜 충분히 용해시켰음
- 용해액은 high centrifuge를 이용하여 6,000rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층 액을 취하였음
- 취한 상층 액은 배양액 1L당 8ml의 Ni-NTA resin을 첨가 후 상온에서 1시간 30분간 반응시켰음
- 반응시킨 Ni-NTA resin을 column에 gravity flow를 통해 걸러 resin만을 분리하였음
- 분리된 resin은 washing buffer 10ml를 flow한 후, Elution buffer를 이용하여 추출하였음
- 추출된 STF2-GnRH는 각 fraction별 SDS-PAGE를 통하여 발현을 확인하였음(그림 3.)
- 발현이 확인된 fraction은 2 fold dilution후 Western blot을 이용하여 항원성을 검증하였음(그림 4.)
- 정제된 STF2-GnRH 단백질은 Protein A280 nanodrop을 통해 농도를 측정하였으며, STF2-GnRH 불임백신은 고양이와 Rat에서의 효능 평가를 위해 사용되었음

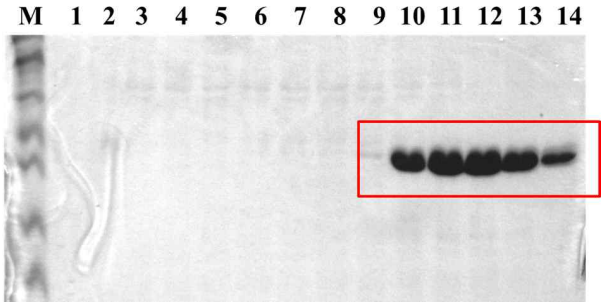


그림 3. 정제된 STF2-GnRH vaccine의 SDS-PAGE 사진. lane 1: washing buffer; lane 2: D buffer; lane 3-14: elution buffer fraction 1-12

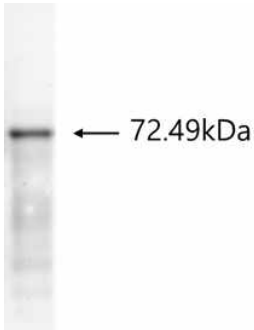


그림 4. 정제된 STF2-GnRH vaccine의 Western blot 사진

4. INP-STF2-GnRH 유전자의 cloning 및 단백질 발현 Mycobacterium 선발

- STF2 단백질 구조 바깥쪽 domain의 유전자 위치 선별 후 pUC57 vector에 순차적으로 STF2 유전자와 GnRH유전자를 삽입하기 위한 primer를 제작하였음
- Salmonella typhimurium의 mRNA로부터 STF2의 DNA를 PCR기법으로 증폭한 후 pUC57 vector에 삽입하였음(그림 1.)
- STF2 단백질 구조의 바깥쪽 domain에 396bp 길이의 GnRH 유전자를 삽입하기 위한 제한효소 자리를 PCR기법을 통해 인위적인 mutation을 유도한 후 삽입하였음
- STF2 내부의 인위적인 mutation으로 인해 나뉜 705bp, 795bp의 fraction은 STF2-1, STF2-2로 새로 명명하였음(그림 1.)
- Mutation을 통해 만들어진 STF2 내부의 제한효소 자리에 GnRH 유전자를 삽입하기 위한 primer를 제작하였음
- 삽입된 제한효소 자리에 GnRH의 epitope sequence를 PCR기법으로 증폭한 후 클로닝하여 삽입하였음(그림 1.)
- 제작된 STF2-GnRH gene의 5‘ 위치에 재조합 단백질을 세균의 세포막에서 발현되도록 유도하는 anchor protein인 INP gene을 PCR기법으로 증폭한 후 클로닝하여 삽입하였음(그림 1.)
- 백신으로 사용될 Mycobacterium은 체내 독성이 없으며 생체에 무해한 Mycobacterium smegmatis(M. smeg)를 선발하였으며 electroporation용 buffer로 washing 및 suspending을 통해 electroporation용 M. smeg를 제작하였음
- Sequence가 확인된 STF2-GnRH 유전자는 PCR기법을 통해 pST-KT 발현벡터에 삽입 후 M. smeg competent cell에 electroporation transformation을 이용하여 벡터를 삽입하였음

제 2절. 고양이용 STF2-GnRH 불임 백신의 Rat 효능 평가

- 각 군별 6마리의 5주령 male rat을 이용하여 음성 대조군에는 각각 PBS 100ul와 Montanide201R을 100ul를 heat inactivation된 10^5 CFU의 Mycobacterium smegmatis를 혼합한 대조군 백신을, GnRH 실험군에는 각각 500ug의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Montanide201R 100ul 그리고 heat inactivation된 10^5 CFU의 Mycobacterium smegmatis를 혼합한 GnRH 백신을 대퇴부에 근육접종으로 투여하였음. 실험군은 ①백신 1회 접종, ②백신 2회 접종, ③백신 3회 접종을 실시하는 총 세 가지 실험군으로 분류하였음
- 1차 백신 투여 후 매 2주마다(0주, 2주, 4주, 6주, 8주, 10주) 채혈을 하였으며 부검전 GnRH 항체가를 확인하기 위해 합성된 GnRH 단량체와의 반응을 통한 ELISA test를 하여 male rat에서의 백신에 대한 반응에 따른 GnRH 항체 생성에 대한 평가를 하였음(그림 3.). Rat의 실험군별 GnRH에 대한 항체 생성을 ELISA test를 통해 확인한 결과, OD값의 mean value가 음성군(0.11)에 비하여 실험군에서 백신 1회 접종군, 백신 2회 접종군, 백신 3회 접종군에서 각각 3.40, 3.63, 3.47의 월등히 높은 값이 측정되었음

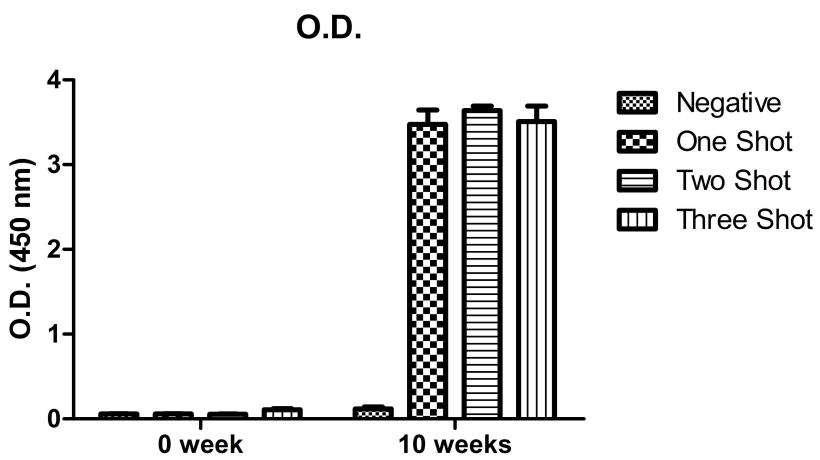


그림 3. GnRH 백신을 접종한 Rat의 항체가 결과. One Shot군: STF2-GnRH 백신 1회 접종; Two Shot군: STF2-GnRH 백신 2회 접종; Three Shot군: STF2-GnRH 백신 3회 접종

- 1차 백신 투여 후 10주가 되는 시기에 모든 Rat을 sacrifice하여 고환 및 부고환을 sampling하여 크기(그림 5.)와 무게를 측정한 후 10% 포르말린 용액에 고정하고 조직 슬라이드를 제작하여 고환과 부고환의 조직학적 변화를 평가하였음(그림 6.)
- 고환의 무게는 음성 대조군에 비해 백신 1회 접종군, 2회 접종군, 3회 접종군에서 각각 평균무게가 음성 대조군과 비교하여 24.99%, 52.40%, 42.73% 감소를 보였으며 각 그룹에서 고환의 무게가 30%이상 감소한 개체 수는 2마리, 4마리, 4마리로 각 군내에서 33.33%, 66.66%, 66.66%의 비율을 보였음(그림 4.).
- 고환 조직학적인 변화를 평가한 결과 음성 대조군 대비 전체적인 500ug GnRH백신 접종군에서 전반적으로 spermatocyte, spermatid가 소실되었고 sperm cell의 분화가 보이지 않았음(그림 6.). 정세관의 직경의 비교 결과 각각의 500ug GnRH백신 1회, 2회, 3회 접종군에서 음성 대조군 대비 51.78%, 56.03%, 55.32% 정도 감소한 것으로 평가할 수 있었음

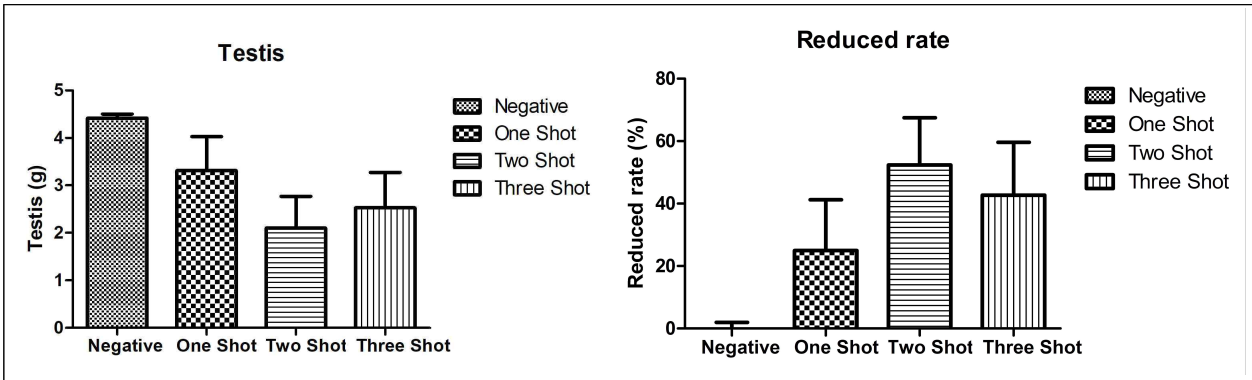


그림 4. 부검 진행 후 측정한 고환의 무게(좌)와 음성 대조군 대비 무게 감소율(우)을 나타내는 그래프. One Shot군: STF2-GnRH 백신 1회 접종; Two Shot군: STF2-GnRH 백신 2회 접종; Three Shot군: STF2-GnRH 백신 3회 접종

그림 5. Male rat 부검 후 고환 및 부고환 조직. 좌측부터 음성 대조군; 500ug GnRH 1회접종군; 500ug GnRH 2회 접종군; 500ug GnRH 3회 접종군

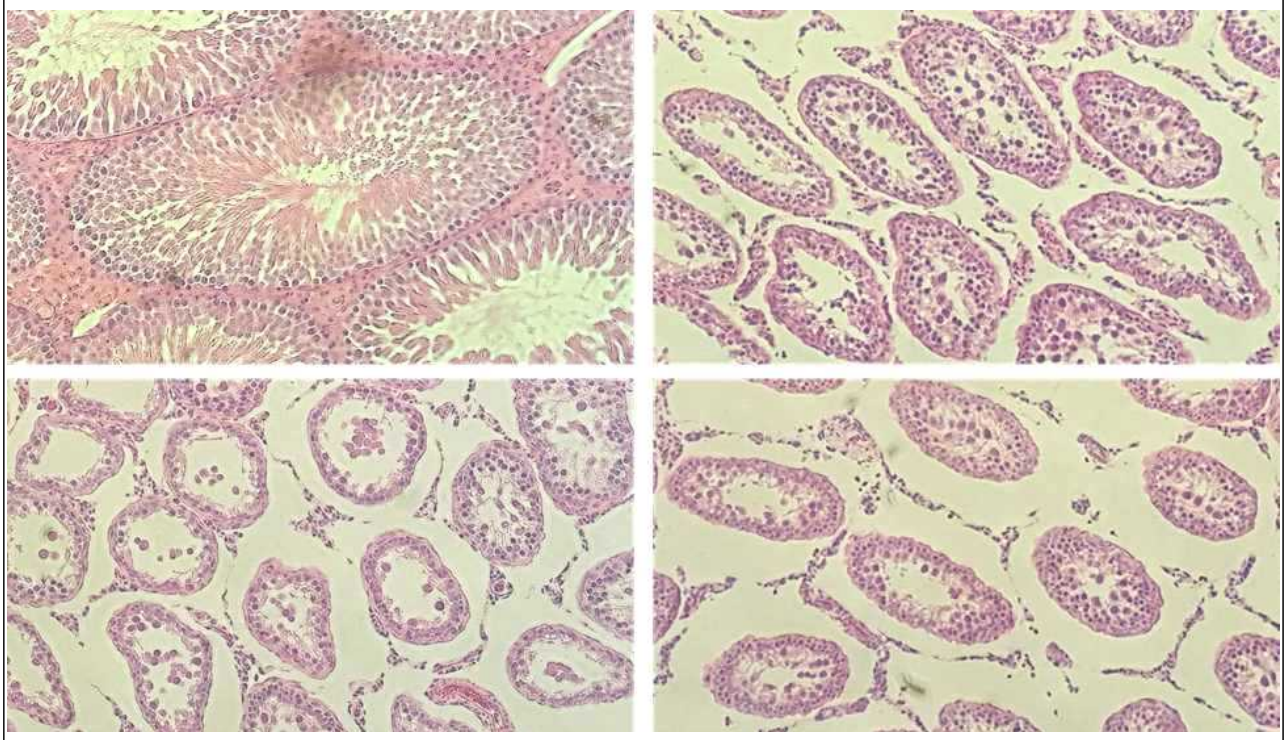


그림 6. Male rat 부검후 고환의 조직사진. 좌측상단: 음성 대조군; 우측상단: 500ug GnRH백신 1회 접종군; 좌측하단: 500ug GnRH백신 2회 접종군; 우측하단: 500ug GnRH백신 3회 접종군

• Rat 실험을 통해 최종적으로 E.coli에서 발현시킨 STF2-GnRH 500ug을 heat inactivation한 M.smeg와 혼합하여 2회 접종한 실험군에서 GnRH 항체가, 고환 무게 감소 및 조직학적 변화를 뚜렷하게 관찰할 수 있었음. 이 때, 접종군 6마리 중 2마리씩에서 다른 4마리와 다르게 GnRH 항체는 확인되어지나 고환 무게나 Testosterone level, 조직학적 변화가 없는 경우가 확인되었음(그림 7, 8, 9). 이를 Responder와 Non-responder로 명명하고, 나누어 정리하였을 때 고환 무게 감소율, Testosterone level이 더 극명하게 확인되어짐 (그림 8,9).

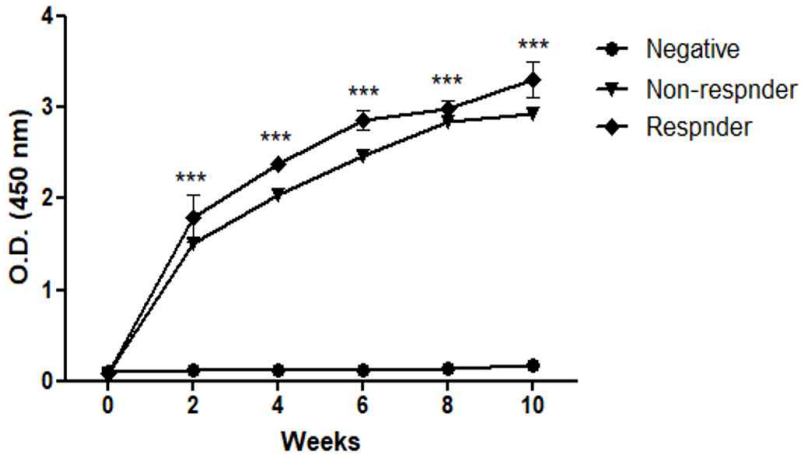


그림 7. GnRH 백신을 접종한 Rat의 항체가 결과. (***$P < 0.001$).

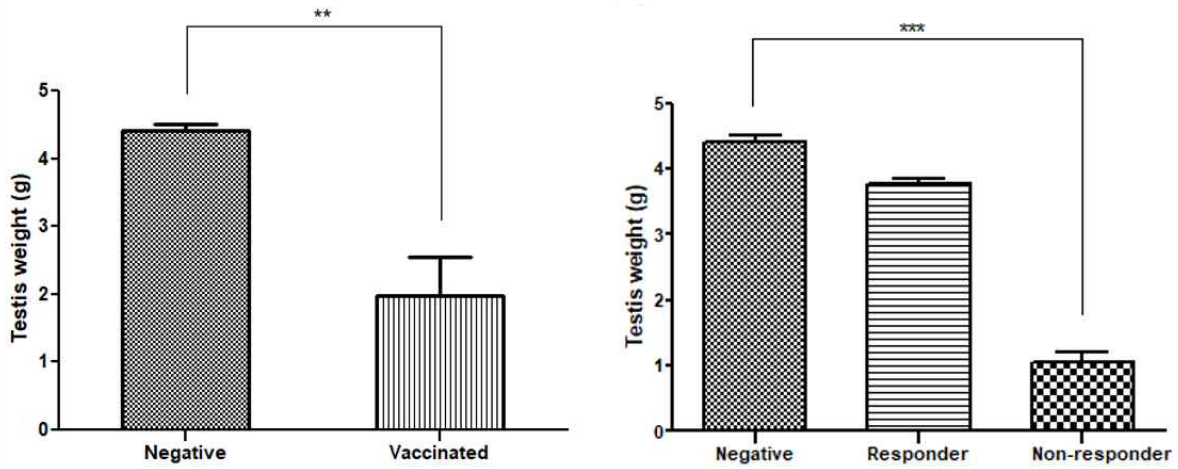


그림 8. 부검 진행 후 측정한 고환의 무게(좌), Responder와 Non-responder로 분류 후 고환의 무게(우) (***$P < 0.001$)

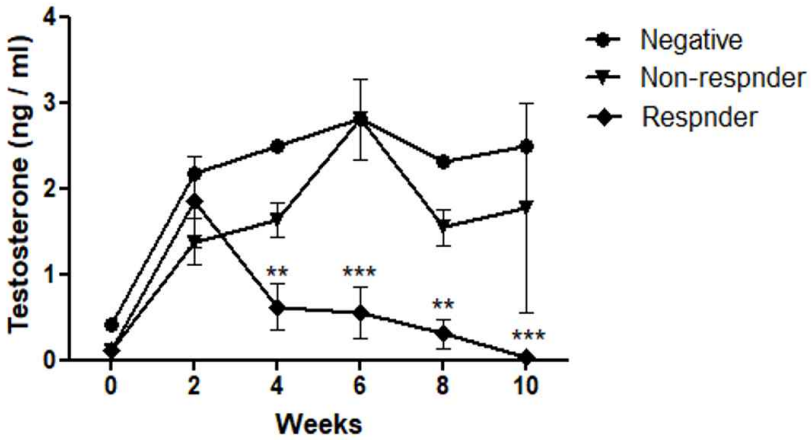


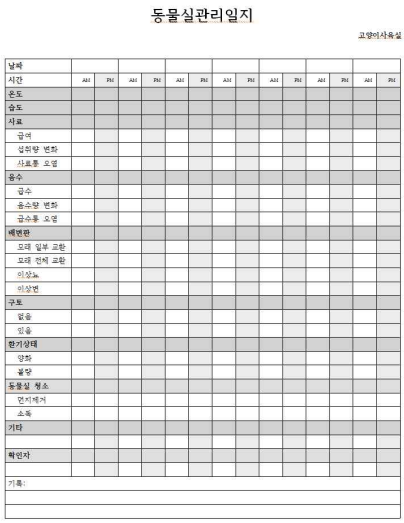
그림 9. Responder와 Non-responder로 분류 후 GnRH 항체가. (***$P < 0.001$)

제 3절. 고양이의 GnRH 접종 실험을 위한 실험실적 환경 조성

<제 2 세부-건국대학교>

1. 수컷 고양이의 GnRH 접종 실험을 위한 실험실적 환경 조성

- 가로 9m, 세로 3m 컨테이너 내에 냉난방기를 설치하여 온도가 23±2℃가 유지되도록 조절하였으며 대각선 방향으로 급기구와 배기구를 설치하였음(그림 11, 12.)
- 물(tap water)과 사료는 자유롭게 섭취(*ad libitum*)할 수 있도록 각각 8개의 물통과 사료통을 배치하였음
- 사료는 Royal Canin Kitten과 Iskhan Cat Kitten을 혼합 급여한 후 Iskhan Cat Kitten을 단독투여하고 전체 고양이의 체중이 2kg이 넘었을 때 Iskhan Cat All Life 사료로 단계적으로 변경하였음
- 캣 타워와 캣 터널, 각종 장난감을 통하여 행동 풍부화를 수행하였음(그림 13.)
- 사육환경의 관리 및 이상 발생을 알아보고 그에 따른 대처가 가능하도록 아래와 같은 동물실 관리일지를 매일 작성하였으며 행동학적 관찰을 위한 폐쇄회로 카메라를 설치하였음(그림 13, 14.)
- 입수 후 개체입수일지를 작성하고 그 이후 매일 개체관찰일지를 작성하였음(그림 17.)
- 고양이들은 각각 개체구분이 가능하도록 개체입수일지에 고양이의 품종 및 외견에 따른 상태를 기입하였음(그림 17.)



동물실관리일지

고양이사육실

날짜														
시간	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM
온도														
습도														
사료														
급여														
섭취량 변화														
사료통 오염														
음수														
급수														
음소량 변화														
급수통 오염														
배변판														
모래 일부 교환														
모래 전체 교환														
이상뇨														
이상변														
구토														
없음														
있음														
환기상태														
양호														
불량														
동물실 청소														
먼지제거														
소독														
기타														
확인자														

기록:

그림 10. 동물실 관리 일지

그림 11. 여름철 내부 온도 유지를(23±2℃) 위하여 그물망을 설치한 모습

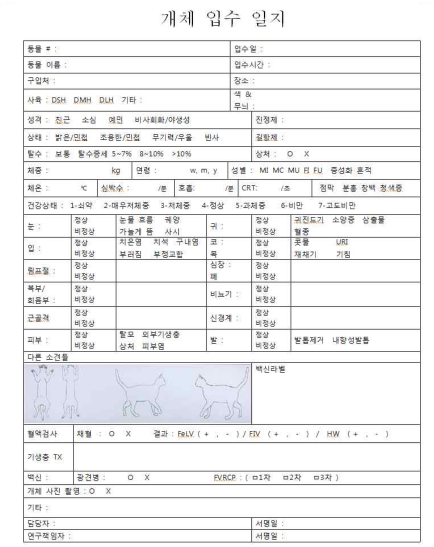
그림 12. 컨테이너 내부의 모습. 장판과 단열실 내벽, 냉난방기와 공기청정기 및 자연채광을 위한 창문을 설치하였음

그림 13. 행동 풍부화를 위한 기구 설치 모습

그림 14. 행동학적 관찰을 위한 폐쇄회로 카메라 장치

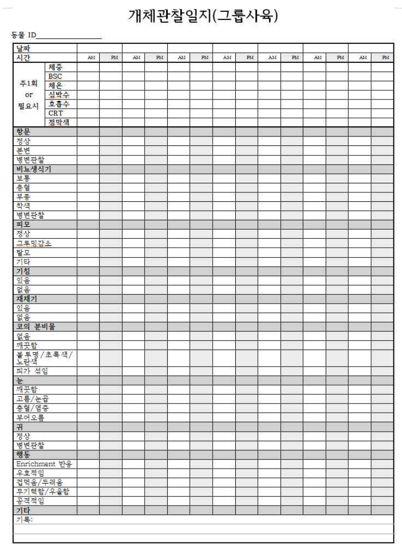
그림 15. 사육관리 시행 사진. 모든 사육관리는 SOP에 따라 시행함

그림 16. 1차 백신접종 시행 사진



개체 입수 일지

동물 # :			입수일 :		
동물 이름 :			입수시간 :		
구입처 :			장소 :		
사육 : DSH DMH DLH 기타 :			색 & 무늬 :		
성격 : 친근 소심 예민 비사회화/야생성			진정제 :		
상태 : 밝은/민첩 조용한/민첩 무기력/우울 빈사			길항제 :		
탈수 : 보통 탈수증세 5~7% 8~10% >10%			상처 : O X		
체중 : kg	연령 : w, m, y		성별 : MI MC MU FI FU 중성화 흔적		
체온 : ℃	심박수 : /분	호흡: /분	CRT: /초	점막 분홍 창백 청색증	
건강상태 : 1-쇠약 2-매우저체중 3-저체중 4-정상 5-과체중 6-비만 7-고도비만					
눈 :	정상 비정상	눈물 흐름 궤양 가늘게 뜸 사시	귀 :	정상 비정상	귀진드기 소양증 삼출물 혈종
입 :	정상 비정상	치은염 치석 구내염 부러짐 부정교합	코 : 목	정상 비정상	콧물 URI 재채기 기침
림프절 :	정상 비정상		심장 : 폐	정상 비정상	
복부/회음부 :	정상 비정상		비뇨기 :	정상 비정상	
근골격	정상 비정상		신경계 :	정상 비정상	
피부 :	정상 비정상	탈모 외부기생충 상처 피부염	발 :	정상 비정상	발톱제거 내향성발톱
다른 소견들					
			백신라벨		
혈액검사	채혈 : O X 결과 : FeLV (+ , -) / FIV (+ , -) / HW (+ , -)				
기생충 TX					
백신 :	광견병 : O X		FVRCP : (◻1차 ◻2차 ◻3차)		
개체 사진 촬영 : O X					
기타 :					
담당자 :			서명일 :		
연구책임자 :			서명일 :		



개체관찰일지(그룹사육)

동물 ID__________

날짜															
시간		AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM
주1회 or 필요시	체중														
	BSC														
	체온														
	심박수														
	호흡수														
	CRT														
	점막색														
항문															
정상															
분변															
병변관찰															
비뇨생식기															
보통															
충혈															
부종															
착색															
병변관찰															
피모															
정상															
그루밍감소															
탈모															
기타															
기침															
있음															
없음															
재채기															
있음															
없음															
코의 분비물															
없음															
깨끗함															
불투명/초록색/노란색															
피가 섞임															
눈															
깨끗함															
고름/눈곱															
충혈/염증															
부어오름															
귀															
정상															
병변관찰															
행동															
Enrichment 반응															
우호적임															
겁먹음/두려움															
무기력함/우울함															
공격적임															
기타															
기록:															

그림 17. 개체입수일지 및 개체관찰일지.

2. 고양이 행동 풍부화와 사회화 실시

- 표준 SOP에 따라 행동 풍부화와 사회화를 실시함
- 입수 시 사람을 경계(hissu-spitty behavior)하며 실험에 비협조적인 개체가 총 2마리 있었으며 사회화를 위해 하루 2회 이상 행동 풍부화를 실시한 결과 현재 사람에 대한 경계가 없으며 실험 보정에 협조적임

• “고양이 행동풍부화와 사회화(Cat Behavioral Enrichment & Socialization)” SOP

□ 일반사항

1. 고양이와 매일 놀아주기 위한 장난감을 준비한다.
   가. 매주 월요일, 금요일 점심시간에 모든 장난감들을 정리하고 새롭게 일주일동안 사용할 장난감들을 꺼내놓는다. 인형들은 세탁실안의 더러운 장난감 통에 넣어두고 그 외의 장난감들은 세척을 위해 세척실에 둔다.
2. 고양이를 위해 매일 이루어지는 행동 풍부화
   가. 시작하기 전, 각각의 고양이를 만지는 사이, 끝난 후에 손을 소독한다.
   나. 개체별 행동 풍부화 활동 기록을 확인한다.
   다. 요일별로 지정된 장난감이나 필요한 다른 물품들을 보관함에서 고른다.
   라. 날마다의 행동 풍부화 활동과 특이사항, 관찰 내용을 기록한다.
   마. 고양이가 좋아하는 장난감은 일주일간 놔둘 수 있지만 고양이의 관심을 끌지 못하는 장난감은 빼도록 한다.
      1) 정해진 행동 풍부화 물품들만 제공한다. 지시 되지 않은 다른 물품은 주지 않는다.
   바. 새끼 고양이들은 다른 행동 풍부화 활동과 상관없이 매일 최소 15분간 사람과 상호작용을 하도록 한다.
3. 고양이의 행동양상을 확인하여 각각에 맞는 행동 풍부화 및 사회화를 실시한다.

구분	특 징	활 동
초록	행동학적인 문제없음	하루 1회 이상 행동풍부화 활동을 제공하고 활동사항을 기록
검정	정상이나 잠재적인 문제파악. 놀이 활동이 과격하거나 쓰다듬을 때 물려는 행동을 보임	하루 2회 이상 행동풍부화 활동을 제공하고 활동사항을 기록
노랑	중등도의 문제행동. 사람을 약간 경계하는 표정과 소리를 냄 (hissy-spitty behavior)	하루 3회 이상 행동풍부화 활동을 제공하고 활동사항을 기록
빨강	심각한 문제행동. 사람에게 공격성을 보임	개별 사육을 고려하고 사회화를 위한 프로그램 시행

□ 실험용 고양이의 환경 풍부화

Enviromental enrichment for laboratory cat

사육 실 환경

- 편안하고 건조한 잠자리를 제공한다.

그룹 사육

- 계획되지 않은 그룹 사육은 스트레스와 불안을 유발 할 수 있다.
- 계획된 그룹 사육은 장기적인 거주를 하는 고양이에게 적합하다.
- 그룹사육 시 고양이 한 마리당 하나의 선반(휴식처)가 필요하다.
- 그룹사육 시 정기적으로 고양이 모두를 재검사해야 한다.

사람과의 상호작용
- 조용한 시간에 쓰다듬기, 마사지, 훈련, 놀이를 포함 할 수 있다.

장난감
- 고양이는 새로운 장난감을 선호한다.
- 부드러운 장난감을 많이 공급한다.
- 장난감은 2~3일 마다 새로운 것으로 교체해준다.

물리적인 운동
- 낚싯대 형 장난감을 쫓는 놀이, 다른 고양이와의 장난, 공놀이 등

음식 풍부화
- 사료 디스펜서는 매우 활동적인 고양이와 과체중의 고양이에게 유용하다. 이 경우 고양이는 장난감을 사용하는 방법을 배울 수 있으나 사람과의 상호작용이 더뎌 질 수 있다.

감각 풍부화
- 청각 : 클래식 음악은 진정효과가 있으며, 책읽이와 같은 사람의 음성
- 후각 : 카모마일, 라벤더 향은 동물을 안정시킬 수 있다. 또는 외부 냄새(잔디, 흙, 무독성의 허브 등)
- 촉각 : 그루밍, 마사지
- 시각 : 흥미로운, 그러나 좌절감을 주는 것은 보여주지 않는다.

□ 고양이 행동풍부화 프로토콜
Enrichment protocol for cats

행동풍부화는 정신적, 신체적 활동과 관련이 있다. 동물의 입장에서 생각하고, 배우고 탐구하는 것을 허용하면 실험실에서 행동학적인 건강을 유지 할 수 있다.
본 실험의 고양이는 실험종료 후 각 가정으로 분양될 예정이므로 반려동물과 같이 매일 행동풍부화를 제공하는 것을 원칙으로 한다.

▷ 후각 자극

- 고양이들은 후각이 뛰어나며, 매일 후각을 자극해 주어야 한다. 그러나 불쾌한 냄새는 고양이에게 스트레스를 줄 수 있다.
- cat nip 을 조금 집어 매일, 또는 하루걸러 제공한다. 일부 고양이들은 cat nip 에 별 반응이 없고, 일부는 즐거워한다. cat nip 을 먹은 대부분의 고양이는 그윽하게 있으며 만약 cat nip에 의해 과하게 자극이 됐다면 그 고양이를 한동안 주의 깊게 관찰하고 기록하도록 한다.

▷ **청각 자극**

- 연구결과에 따르면 동물들이 특정 음악에 편안한 상태가 된다고 알려져 있다. 클래식 음악, 뉴에이지 음악 등은 동물실에 작은 소리로 주간에 들려줄 수 있도록 한다.
- 고양이가 잠을 잘 시간엔 음악을 꺼야 하며 또한 고양이들은 몇 분간 새소리가 녹음된 CD를 재생해 주는 것을 좋아한다.

▷ **시각 자극**

- 그룹 사육 시, 많은 시각 자극을 받게 된다. 고양이는 종종 다른 고양이들을 보고 스트레스를 받기 때문에, 만약 그렇다면 몸을 숨길 수 있는 장소를 제공한다.
- 겉보기에 자극을 주는 지속적으로 움직이는 장난감, 자동차, 수족관, 창문에서 볼 수 있는 흥미로운 것들을 고양이에게 제공할 수 있다.

▷ **촉각 자극**

- 많은 고양이들은 인간의 촉각 자극에 긍정적으로 반응한다. 쓰다듬기와 빗질이 포함된다. 따라서 촉각자극은 사회적 상호 작용과 간접 상호 작용을 겪으며 동물들 간의 상호작용에 도움을 준다.
- 고양이들을 만질 때, 싫어하는 부위를 파악한다.
- 예를 들면 배와 꼬리, 뒷다리를 만졌을 때, 고양이들이 싫어하는 것을 알 수 있다.

▷ **미각 자극**

- 간식을 일주일에 여러 번 제공하여 고양이의 미각을 자극할 수 있도록 한다.

▷ **정신적 자극**

- 고양이는 동물실에서 행동적으로 건강한 정신적 자극을 필요로 한다. 정신적 자극은 위에서 언급한 자극을 포함한다. 그러나 추가적으로 자극을 제공 해 주어야 하며 아래는 추가적인 아이템이 있다.

1) 먹이채집 풍부화

Kong 안에 음식을 넣고 먹이 공이나 컨테이너를 이용해 고양이가 열심히 참여하게 한다.

2) 클리커 훈련

Clicker 훈련은 동물들이 생각할 수 있도록 돕는다.

(www.clickertraining.com)

▷ **놀이 자극**

놀이는 동물들이 긍정적인 마음을 유지하는 최고의 방법이다. 의기소침해 보이는 각각의 고양이에게 연구 기간 동안 적어도 일주일에 여러 번 제공하도록 한다.

장난감은 고양이들이 동물실에 있을 때 스스로 놀이를 하며 자극 할 수 있다.

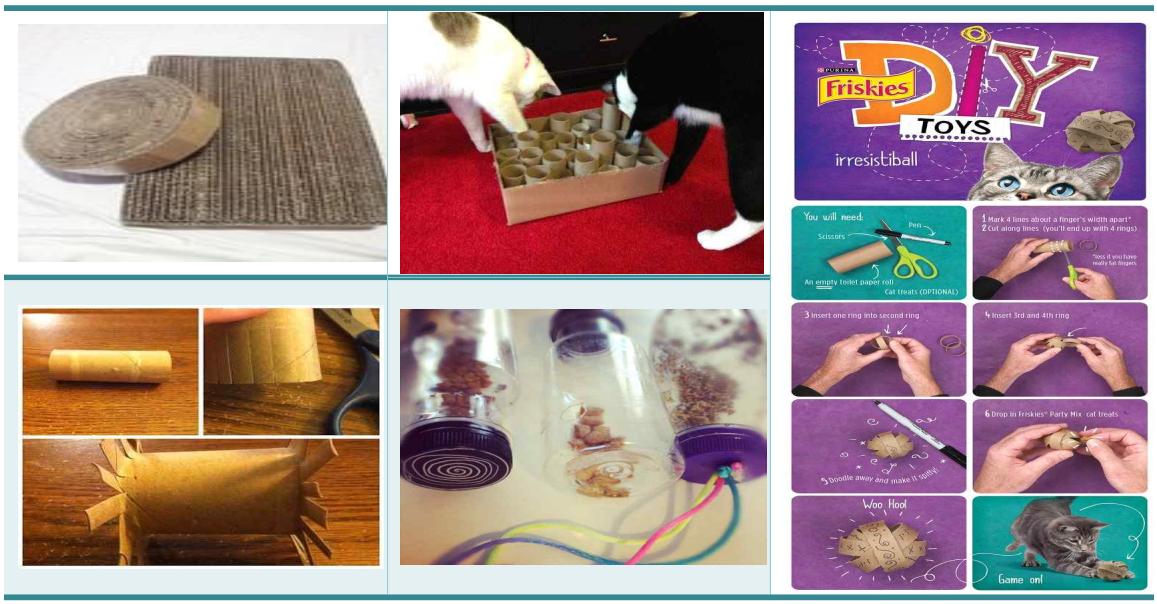
□ **고양이 행동풍부화 프로토콜의 예**

	내용	예
정신적 자극 클리커 트레이닝 Kong 속 음식 찾기	간식을 줄 때 클리커를 활용한다. Kong 속에 간식 등을 넣고 찾는 것을 유도한다.	
청각 자극 클래식 음악 새 소리	주간에 적당한 볼륨으로 클래식 음악과 새 소리 CD를 재생해준다.	
후각 자극 Cat nip	이틀에 한번씩 Cat nip을 조금씩 집어 향을 맡게 한다.	
시각 자극 지속적인 장난감 수족관	지속적으로 움직이는 장난감이나 수족관 속 물고기들을 보며 시각적으로 자극을 느끼게 한다.	

촉각 자극	고양이가 좋아하는 부위를 부드럽게 쓰다듬는다. 전체적으로 부드럽게 빗질한다.	
쓰다듬기 빗질하기		
미각 자극	고양이의 기호성을 고려해 양질의 간식을 준다.	
간식 주기		

□ 주간 Enrichment 계획표

요일	종류	내용
월	간식주기	▷ 준비물 : 양질의 간식 ▷ 방법 : 영양과 기호성을 고려해 간식을 준다. 간식을 주며 부드럽게 쓰다듬어 준다.
화	낚싯대	▷ 준비물 : 고양이용 낚싯대 (깃털 , 볼 , 벌 등 다양) ▷ 방법 : 낚싯대를 이용해 패턴을 다르게 해 흔들어 주어 고양이의 놀이를 유도한다.
수	레이저	▷ 준비물 : 레이저 포인터 ▷ 방법 : 레이저를 이용해 패턴을 다르게 하여 바닥에 레이저를 쏴준다.
목	브러쉬	▷ 준비물 : 브러쉬 ▷ 방법 : 부드럽게 털을 빗어주며 상호 교감한다.
금	비눗방울	▷ 준비물 : 무독성/무색소 제품의 비눗방울 용액 (코스믹 캣닢 버블스), 비눗방울 막대 ▷ 방법 : 비눗방울을 만들어 날려주며 호기심을 유발한다.
기타	캣닢 볼, 바스락 볼, 스크래쳐, 해먹 등	*** 고양이 스스로 놀이가 가능한 장난감** ▷ 컨테이너 안에 배치하여 상시 놀이를 할 수 있도록 한다. ▷ 장난감은 재활용품(요플레통, 휴지심, 박스, 신문지 등)을 이용하여 만들 수 있도록 한다.



3. 예방접종 및 구충

- 입수한 고양이들은 행동순화 후 주요 질병에 대한 예방접종(1~2차) 및 구충을 진행(표 1.)

종류	접종 시기	접종 방법
FVRCP	- 최소 접종 연령 4주령 : 16주령이 될 때까지 3주마다 접종 - 20주령 이상 : 3주 간격, 2회 접종	- 각 투여마다 다리쪽 피하에 접종 - 투여 차수별로 접종 위치 기록
Rabies	- 최소 접종 연령 12주령 - 1차 접종 후 1년마다 추가 접종	- 피하접종 - 투여 시 접종 위치 기록
Ivomec®	- 10mg/mL, 100배 희석 후 사용 - 한 달에 한번 주사 - 심장사상충 예방	- 0.024mg/kg, 피하접종 - 귀진드기 (0.2mg/kg), 이 (0.4mg/kg) 외부기생충 감염의 경우 필요한 치료 용량만큼 접종

표 1. 고양이 예방접종 및 구충 프로토콜

- 입수 당일 FVR-CP종합백신을 투여하고 2-3주 간격으로 총 3회 접종을 실시하였음
- Panacur 50mg/kg 3일 투약
- Ivermectin 0.5mg/kg 2주 간격 2회 피부도포

제 4절. 실험실 환경에서 수컷고양이를 대상으로 E.coli 및 Mycobacterium 발현 STF2- GnRH 중성화 백신 효능평가

1. 실험실 환경에서 수컷고양이를 대상으로 E.coli 발현 STF2-GnRH 중성화 백신

효능평가

가. E.coli 실험군을 저농도(100ug), 중농도(400ug), 고농도(1000ug) 세 그룹으로 나누어 실험

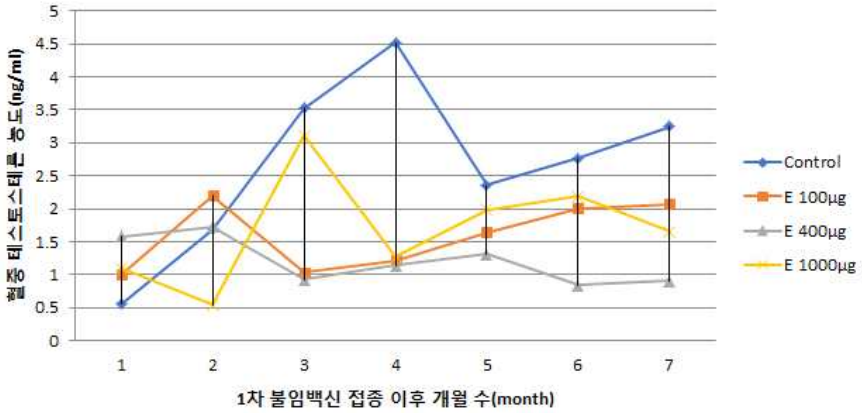
E.coli		개체수	1차 투여 (대퇴 네갈레근에 근육접종)	2차 투여(1차 투여로부터 4주 후) (대퇴 네갈레근에 근육접종)
실험군	저농도 (100ug)	n=7	100ug의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신	100ug의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신
	중농도 (400ug)	n=7	400ug의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신	400ug의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신
	고농도 (1000ug)	n=7	1000ug의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신	1000ug의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신
대조군	대조군	n=4	PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 대조군 백신	PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 대조군 백신

- 연구에 사용된 수컷고양이는 DSH와 품종묘가 혼합된 4~6개월령, 1.5kg~3kg 몸무게의 고양이로 코사바이오를 통해 공급을 받았고, 건국대학교 동물실험윤리위원회를 통해 실험을 승인받음 (승인번호 : KU16135, KU17134-1)
- 1차 백신 접종 후부터 3주마다 채혈(총 7회)을 하여 혈청 내 Testosterone 수치 검사와 ELISA test를 통한 GnRH 항체가 검사를 실행하였음
- 1차 백신 접종으로 부터 6개월 후, 수컷 고양이의 중성화 수술을 통한 고환 및 부고환의 크기, 무게, 조직학적 변화(H&E 조직 염색을 통한 Johnsen's Testicular Biopsy Score(JTBS) 대입)의 확인을 통해 백신의 효능을 검증하였음

Johnsen's Testicular Biopsy Score(JTBS)	
Score	Explanation of situation of tissue
1	No germ cells and no Sertoli cells present.
2	No germ cells but only Sertoli cells present
3	Only spermatogonia present
4	Only a few spermatocytes present
5	No spermatozoa or spermatids but many spermatocytes present
6	Only a few spermatids present
7	No spermatozoa but many spermatids present
8	Only a few spermatozoa present
9	Many spermatozoa present and disorganized spermatogenesis
10	Complete spermatogenesis and perfect tubules

나. 실험실 환경에서 수컷고양이를 대상으로 E.coli 발현 STF2-GnRH 중성화 백신 효능평가 결과

- 혈청 내 Testosterone 수치 검사 결과



→ 혈청 내 Testosterone 수치 검사 결과, E.coli 실험군 중 400ug을 접종한 실험군의 Testosterone 수치가 가장 낮게 유지되는 것을 볼 때 불임효과가 제일 큰 것으로 확인됨

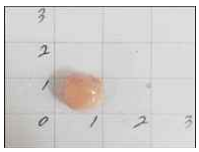
• ELISA test를 통한 GnRH 항체가 검사 결과

→ 혈청 내 GnRH 항체가를 측정한 결과, E.coli 실험군 중 400ug을 접종한 실험군의 항체가가 제일 높고 일정하게 유지되는 것으로 확인됨.

• 고환 및 부고환의 크기, 무게, Penile spine(음경가시돌기)의 활성도 결과

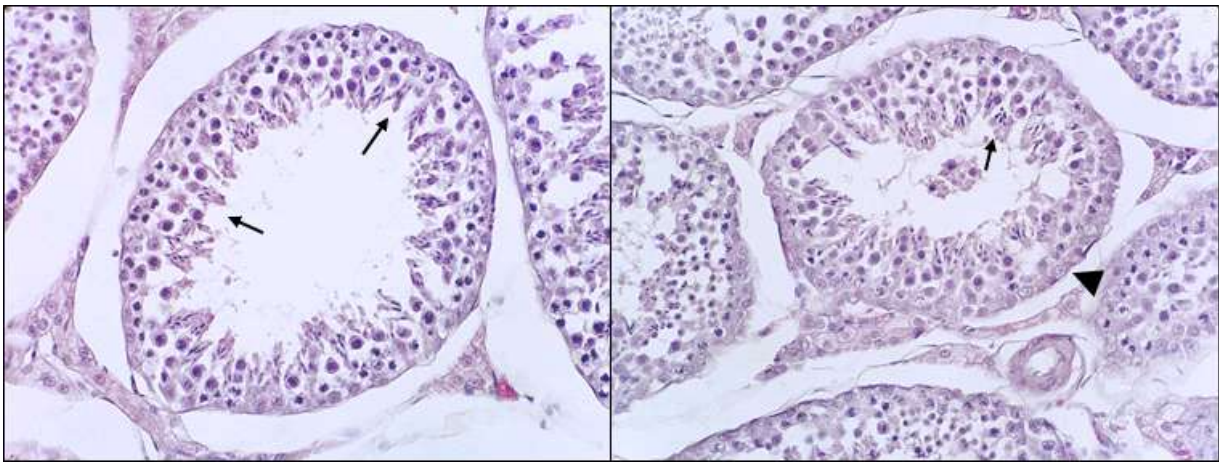
E.coli	개체수	Penile spine	Size (Lt,Rt)	Weight(Lt+Rt) (g)	Average (g)
대조군	1	++	++	2.1045	2.1331
	2	++	++	3.1751	
	3	++	-	1.3803	
	4	+	+	1.8726	
100ug	1	++	++	2.1528	1.9687
	2	+	-	1.2342	
	3	++	+	1.9682	
	4	++	++	2.4424	
	5	+	-	1.1929	
	6	+	++	2.7051	
	7	+	++	2.0854	
400ug	1	++	++	2.1707	1.6710
	2	+	+	1.8767	
	3	-	-	0.8424	
	4	+	++	2.9721	
	5	-	+	1.6856	
	6	-	+	1.6738	
	7	-	-	0.476	
1000ug	1	+	++	2.1524	2.1552
	2	+	+	1.8171	
	3	++	++	2.2416	
	4	++	++	3.2837	
	5	+	++	2.4675	
	6	-	-	1.2799	
	7	+	+	1.8447	

→ 대조군과 비교해 봤을 때 400ug을 접종한 실험군에서 고환 및 부고환의 무게가 효과적으로 줄어든 것을 확인할 수 있고, Penile spine의 경우도 400ug을 접종한 실험군에서 활성도가 많이 떨어져지므로, E.coli 실험군 중에서는 400ug을 접종한 실험군이 불임효과가 제일 큰 것으로 확인됨

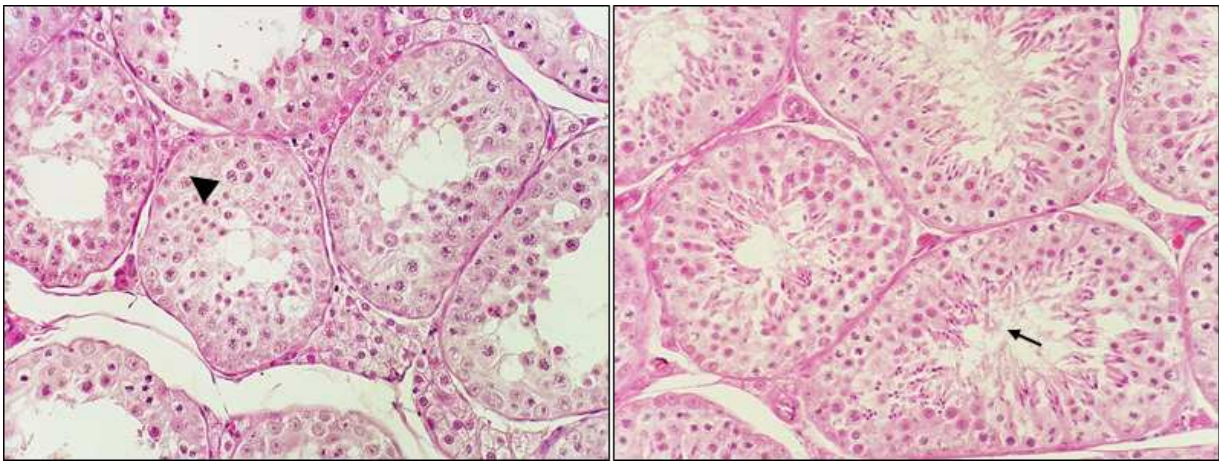
	-	+	++
Penile spine			
Size(Lt,Rt)			

고환 및 부고환의 크기 및 Penile spine(음경가시돌기)의 활성도 평가 기준

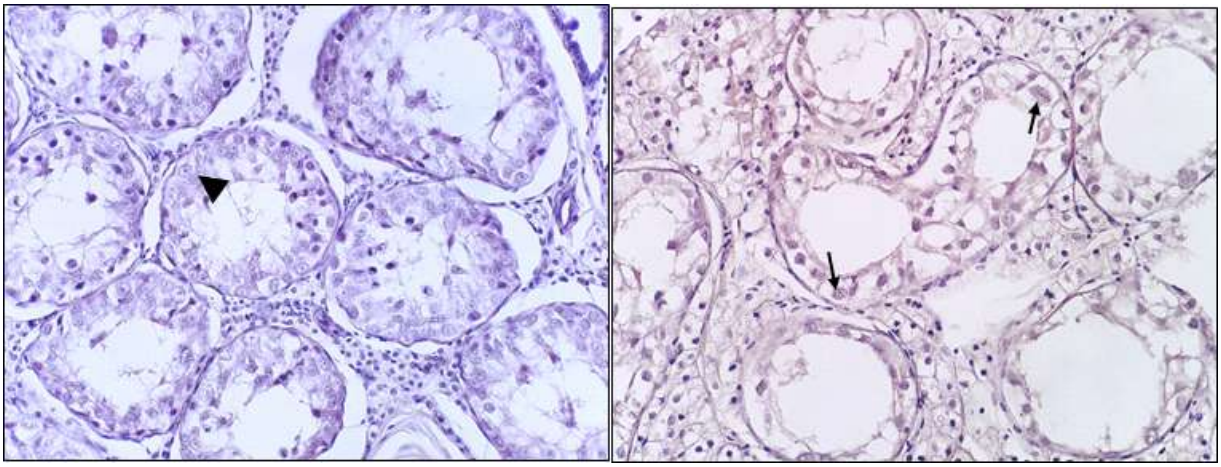
- 고환의 조직학적 변화 결과(H&E 염색, 현미경 X400)



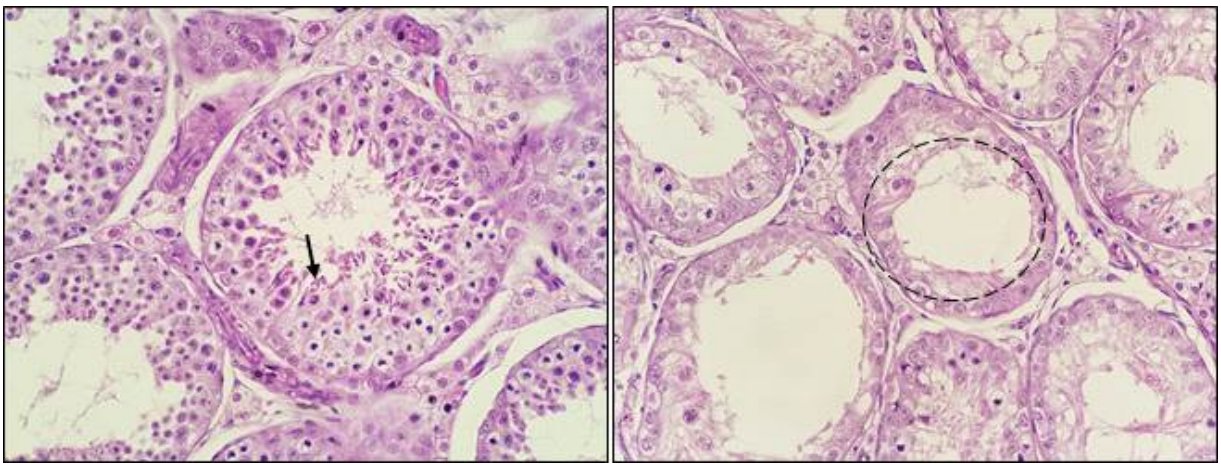
→ 대조군 : n=4 , 4마리 모두 활발한 정자 생성



→ E.coli 저농도(100ug) : n=7 , 7마리 중 2마리에서 정자생성 억제



→ E.coli 중농도(400ug) : n=7 , 7마리 중 4마리에서 정자생성 억제, 나머지 3마리에서도 생성능 저하



→ E.coli 고농도(1000ug) : n=7 , 7마리 중 1마리에서만 정자 생성이 억제

→ 고환의 조직학적 변화 결과를 보았을 때 E.coli 중농도(400ug)에서 정자 생성 억제가 많이 나타나기 때문에 불임효과가 가장 크다고 볼 수 있음

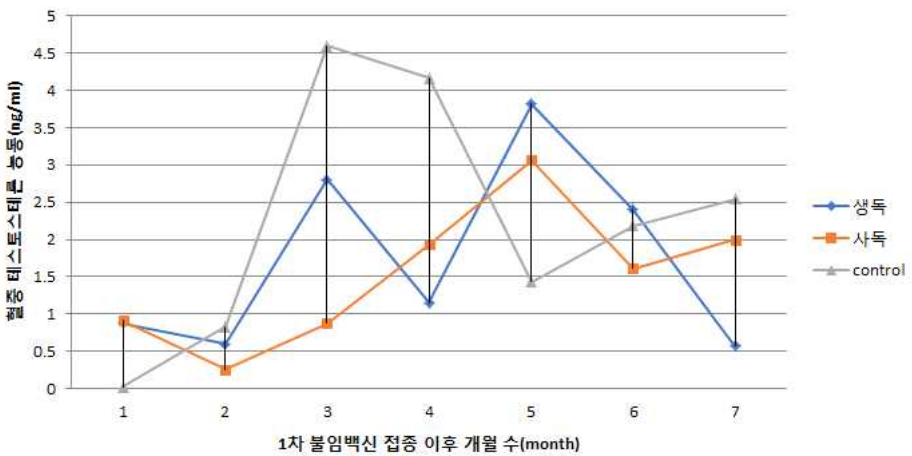
2. 실험실 환경에서 수컷 고양이를 대상으로 Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 중성화 백신 효능평가

가. Mycobacterium 실험군을 생독, 사독으로 나누어 실험

Mycobacterium		개체수	1차 투여 (대퇴 네갈레근에 근육접종)	2차 투여(1차 투여로부터 4주 후) (대퇴 네갈레근에 근육접종)
실험군	생독	n=4	Mycobacterium(생독)의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신	Mycobacterium(생독)의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신
	사독	n=2	Mycobacterium(사독)의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신	Mycobacterium(사독)의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신
대조군	대조군	n=2	PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 대조군 백신	PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 대조군 백신

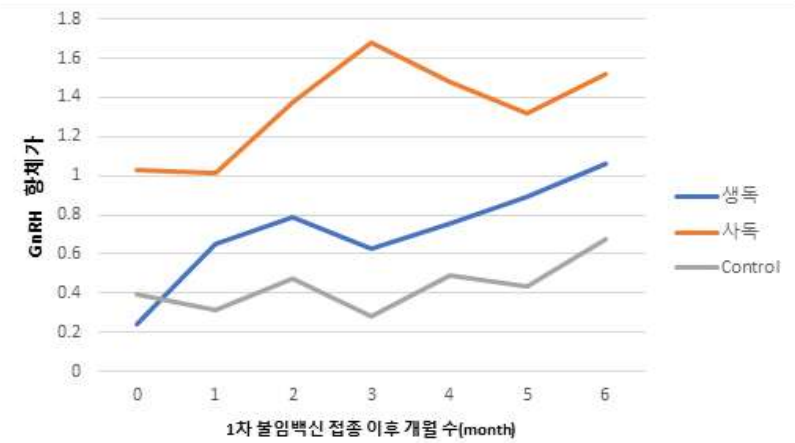
나. 실험실 환경에서 수컷고양이를 대상으로 Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 중성화 백신 효능평가 결과

- 혈청 내 Testosterone 수치 검사 결과



→ 혈청 내 Testosterone 수치 검사 결과, Testosterone 수치가 사독과 생독에서 모두 낮아짐이 확인되어지나, E. coli 백신 그룹보다는 뚜렷하지 않음.

• ELISA test를 통한 GnRH 항체가 검사 결과



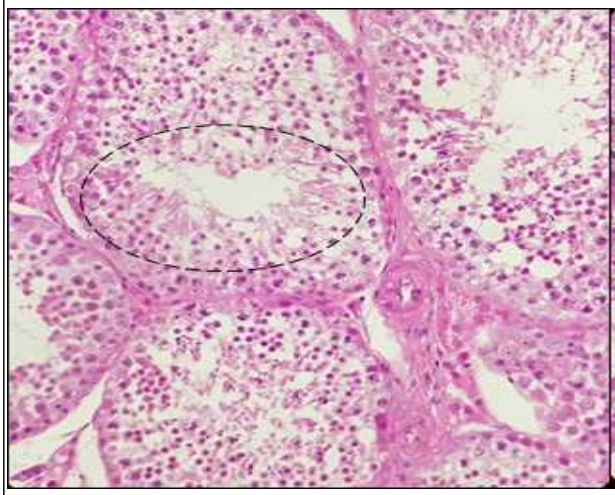
→ 혈청 내 GnRH 항체가를 측정한 결과, 항체가는 사독 실험군에서 더 높게 유지되는 것으로 확인됨.

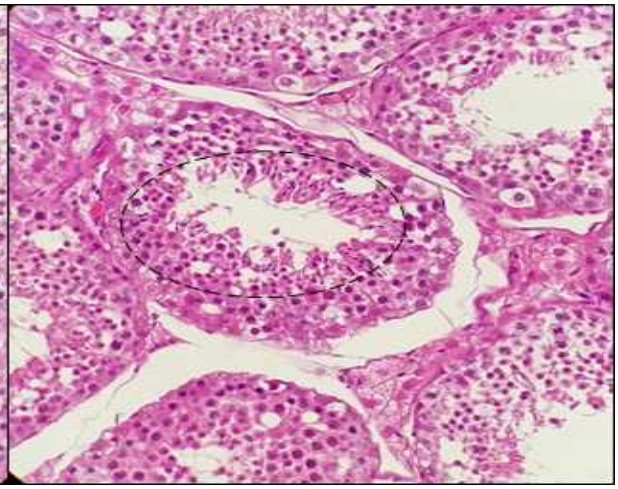
• 고환 및 부고환의 크기, 무게, Penile spine(음경가시돌기)의 활성도 결과

Mycobacterium	개체수	Penile spine	Size	Weight(Lt+Rt) (g)	Average (g)
대조군	1	++	++	2.1406	2.5464
	2	++	++	2.9521	
생독	1	+	++	2.2288	1.7426
	2	+	++	2.454	
	3	++	-	1.4722	
	4	-	-	0.8153	
사독	1	-	++	2.2039	2.3175
	2	+	++	2.4311	

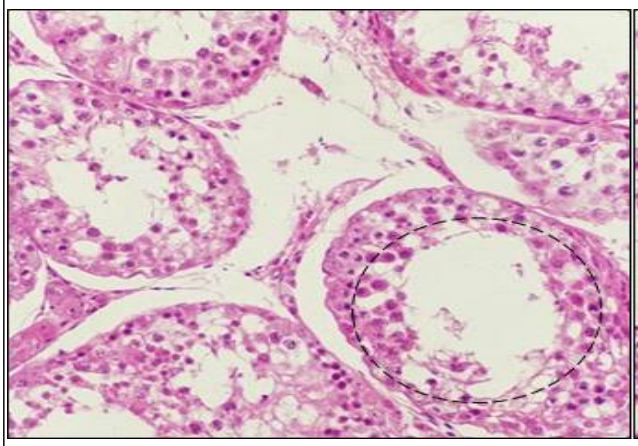
→ 대조군과 비교해 봤을 때 생독을 접종한 실험군에서 고환 및 부고환의 무게가 효과적으로 줄어든 것을 확인할 수 있고, Penile spine의 경우는 생독을 접종한 실험군의 경우 1마리에서 활성도가 떨어지는 것을 볼 수 있으므로, 사독보다 생독에서 불임효과가 잘 나타날 것으로 보임

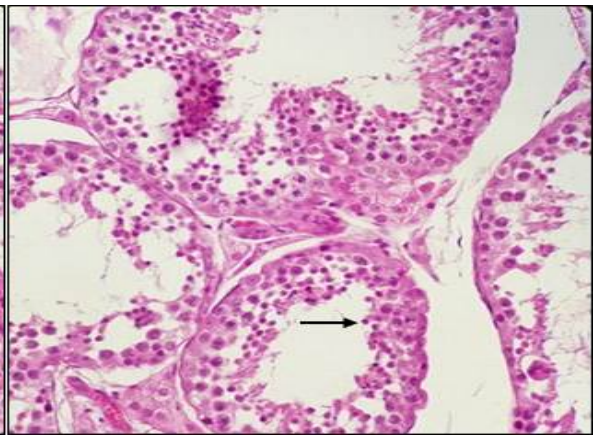
• 고환의 조직학적 변화 결과(H&E 염색, 현미경 X400)





→ 대조군(좌) : n=2 , 모두 활발한 정자 생성 → 사독(우) : n=2 , 모두 활발한 정자 생성





→ 생독 : n=4 , 4마리 중 2마리에서 정자생성 억제, 1마리에서 생성능 저하

→ 고환의 조직학적 변화 결과를 보았을 때 Mycobacterium 생독 백신에서 정자 생성 억제가 많이 나타나기 때문에 사독보다는 불임효과가 높다고 볼 수 있음

→ 그러나 Mycobacterium 생독 백신보다 혈청 내 Testosterone 수치 감소, GnRH 항체가 증가, penile spine 활성도 감소 정도가 E.coli 중농도(400ug)에서 확연히 관찰됨.

※실험실 환경에서 수컷고양이를 대상으로 E.coli 및 Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 중성화 백신 효능평가 결과, E.coli 중농도(400ug)에서 불임 효과가 가장 좋은 것으로 나타남

제 5절. Field test : 가이드라인 작성

동물보호단체의 반대로 인해 실험실에서 자체적으로 고양이를 틀에 넣어서 예행연습을 진행하는 방법으로 필드테스트 가이드라인 제작(숙련자의 경우 포획 후 부터 방사까지 10분 정도 소요됨)

1. 준비물

○ 포획 틀

- 철망재질로 양쪽에 출입구가 있도록 제작
- 입구 중 하나는 반드시 위아래로 밀고 닫을 수 있는 guillotine 타입으로 제작하여 고양이를 다른 케이지에 옮길 때 용이한 구조로 제작되어야 함
- 크기: 길이 76-91cm (30-36 inch), 넓이 25-30cm (10-12 inch), 높이 30cm (12 inch)
- 포획 틀은 여러 브랜드에서 제작하여 판매하고 있음
- 필요한 개수는 포획 대상 마리수의 2-3배수로 준비하는 것을 권장

○ 포획 틀 칸막이 (trap divider, trap isolator)

- 포획 틀 칸막이 역시 제작 판매하고 있으며 포획틀 밖에서 빗 또는 포크처럼 꽂아서 동물을 보정할 수 있음
- 칸막이를 만들어 물과 사료를 공급하거나 두 마리 고양이가 포획될 경우 분리하는 역할도 함
- 포획 틀 안에서 고양이를 한쪽으로 몰아서 칸막이로 보정하면 간단한 주사 처치가 가능함
- 적절한 보정을 위해서는 2개의 칸막이가 필요함

○ 미끼

- 두 가지 종류의 미끼를 준비할 것을 권장
- 생선류와 육류의 미끼를 준비

○ 종이접시와 플라스틱통

- 미끼를 올려놓을 수 있는 종이접시 필요
- 가능하면 물을 제공하는 것도 좋으나, 고양이가 움직이며 물통을 엎지르지 않도록 철망에 케이블타이(cable tie) 등으로 고정하는 것이 좋음

○ 포획 틀 덮개

- 포획된 길고양이를 진정시킬 수 있는 덮개 천을 준비
- 투약 준비를 하는 동안 포획 틀을 덮어 안정을 취할 수 있도록 함

○ 투약 준비물

- GnRH 백신, 1mL 주사기, 보냉 가방

○ 개인 보호 장구:
- 장갑, 마스크 등
- 교상 등에 대비한 소독약(과산화수소), 반창고 등을 준비

○ 기타
- 투여 기록지, 개체 특이사항 기록지, 필기구
- 개체 사진촬영용 카메라

2. 길고양이 포획

○ 길고양이 먹이 급여 중단
- 포획 틀을 설치하기 하루 전부터 먹이 급여를 중단하여 길고양이가 허기를 느끼는 상태에서 포획률을 높일 수 있음
- 포획이 하루 뒤로 연장되더라도 별도의 사류를 급여하지 않는 것이 포획률을 높이는데 도움이 됨
- 포획 일정 동안 포획 틀에 들어오지 않는 개체가 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 해야 함

○ 포획 틀 설치
- 길고양이가 평소에 사료를 먹던 곳을 중심으로 벽이나 울타리 등의 구조물과 평행하게 설치하여 입구의 접근성을 높임
- 해당 지역의 캣맘과 연계할 수 있으면, 고양이가 자주 다니는 곳의 정보를 얻을 수 있고, 고양이의 포획 수를 효과적으로 높일 수 있음
- 선택한 장소에 한 번에 포획 틀을 일괄적으로 설치하여 길고양이의 영역 안에 접근하는 횟수를 최소화하도록 함

○ 포획 확인
- 30분(최대 2시간) 간격으로 포획틀을 확인
- 포획을 확인하고 덮개를 덮어 고양이를 진정시킴

3. GnRH 백신접종

- 고양이의 건강상태를 육안으로 확인
- 고양이의 패턴 등을 확인
- 포획 틀 칸막이를 이용하여 고양이를 한쪽 방향으로 몰아 보정함

- 이 때 고양이가 움직이지 못하도록 최대한 공간을 작게 만드는 것이 중요함
- 2인1조로 한사람은 계속 칸막이를 이용해 고양이의 몸을 고정하고, 다른 한사람은 백신을 근육 내 투여함 (대퇴네갈래근육, 등근육 longissimus muscle, erector spinae)

4. 방사

- 접종 후 고양이의 상태를 확인한 후 방사
- 포획틀 입구를 도로와 반대편으로 열어 사고를 예방

5. 개체 표식

○ 귀끝 절개
- 중성화 수술을 실시할 경우 마취 후 왼쪽 귀 끝을 잘라 중성화된 고양이를 표시하는 방식을 사용함
- 이는 중성화 수술 동안 지혈이 가능하고 진통제 처치를 하기 때문에 가능하나 백신접종 후 귀 절개는 불가능함

○ 이어태그
- 주로 산업동물의 개체표식을 위해 귀에 태그를 부착하는 것으로 알려져 있음
- 소형동물 특히 토끼, 설치류 등을 위한 이어태그도 상용화되어 있음
- 그러나 길고양이에게 이어태그를 부착하기 위해서는 보정의 기술이 필요하며 이어태그 부착에 대한 반대여론이 있을 것으로 예상함

○ 색소 도포법
- 털에 페인트를 도포하여 단기적으로 개체표식을 하는 방식
- 영구적이지는 않으나 특정 지역의 고양이 군집에 백신을 접종한 후 색소를 도포한다면 해당 프로젝트 기간 내에는 (2-3일) 식별이 가능할 것으로 사료됨
- 2차 투여의 경우 지역 내 군집을 대상으로 접종하는 것이므로 1차에 도포한 색소가 없어지더라도 접종을 실시하는데 우려되는 점은 없음

○ 모색, 패턴을 이용한 분류
- 특이적인 패턴을 보이는 개체에게 사용할 수 있는 개체 구분법
- 그러나 단일 색, 고등어무늬 등 구별이 어려운 개체가 대부분임
- 색소도포법과 같은 단기 식별법과 병행할 수 있는 보조적인 개체 구분법으로 활용 가능
- 얼굴과 몸을 구별하여 확대 사진을 촬영해두면 개체확인에 유효할 것으로 판단됨: 이는 2014년도 서울시 용역과제를 통하여 서울시 길고양이 개체수 조사 시 활용한 사항임

그림 18. 불임백신 투여를 위한 길고양이 포획 및 투여 방법

제 6절. 암컷 고양이의 GnRH 접종 실험을 위한 실험실적 환경 조성

<제3 협동-서정대학교>

1. 고양이의 접종 실험을 위한 실험적 준비

(1) 고양이사육환경

○ 컨테이너 두 대(가로 12m x 세로 3m, 가로 9m x 세로 3m)에 냉난방기를 설치하고 급기구와 배기구를 대각선 방향으로 설치함

○ 온도는 24±4℃가 유지되도록 냉난방기를 자동 조절함

○ 물(tap water)과 사료는 두 마리 당 1개의 음수와 사료(이즈칸 캣 그레인프리 올라이프, Iskhan Cat All Life, ㈜대한사료, 한국)에 접근할 수 있도록 배치하고 자유롭게 섭취(*ad libitum*)할 수 있도록 함

(2) 고양이 개체표식

○ 고양이는 개체별로 고유번호(이름)를 부여하고 개체를 식별할 수 있는 사진을 촬영하여 자료화함

○ 모든 정보(입수 나이, 성별, 품종, 털색, 입수일, 예방접종)는 개체 카드에 기록

○ 종이 팔찌에 고유번호와 이름을 유성 펜으로 적고 고양이의 목에 이름표를 걸어줌

  ○ 종이팔찌는 고양이들이 스스로 뺄 수 없도록 조여져야 하지만 목 밑에 손가락 두 개가 들어갈 정도의 공간이 남아있도록 함

○ 매일 개체관리를 하면서 이름표가 떨어졌는지 고양이를 살피고 없어진 것을 확인하는 즉시 새로운 것으로 교체

○ 털색, 무늬 등으로 개체구분이 가능한 시점부터는 고양이의 외형으로 개체를 식별함

2. 실험실 환경에서 암컷 고양이의 발정 유도

○ 암컷 고양이 도입 후 명주기를 8시간으로 40일간 유지시켜 발정을 억제시킨 후 명주기를 16시간으로 늘려줌

○ 발정주기에 영향을 주는 요인은 품종, 광주기, 사회적 환경, 건강상태, 영양 상태에 따라 달라질 수 있으며 3.5개월부터 18개월까지 다양할 수 있으나 주로 5-9개월령에 첫 발정이 시작되며, 체중은 2kg인 경우 발정주기가 시작됨,

○ 명주기를 늘려준 후 약 15일 내로 발정이 시작되는 선행연구결과에 따라 발정행동을 확인하고 채혈을 하여 Estradiol-17β와 Progesterone 수치를 측정함

○ 암컷고양이의 전형적인 발정행동 관찰

- 사람이나 사물에 얼굴을 문지름
- 바닥을 구름
- 허리를 낮추고 엉덩이를 드는 lordosis 자세를 취함
- 꼬리를 옆으로 기울임
- 발정 울음

○ 혈청 내 Estradiol-17β와 Progesterone의 수치가 각각 20pg/mL, 2ng/mL 이상인 경우 발정주기가 정상적으로 발현되고 있다고 판단함
○ Estradiol-17β와 Progesterone 수치를 통해 발정주기를 확인한 개체만 실험에 사용함

3. 실험실 환경에서 암컷 고양이를 대상으로 E.coli 발현 STF2-GnRH 중성화 백신 효능평가

(1) 연구내용

○ **음성대조군**
- 4마리의 음성대조군을 분류하여 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 대퇴 네갈레근육 내 투여함
- 체중 2.37-3.48kg, 1-3년령

○ **E.coli 발현 STF2-GnRH 100ug 중성화 백신 투여**
- 7마리의 실험군(T1-T7)에는 각각 100ug의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신을 대퇴 네갈레근육 내 접종함
- 체중 2.16-3.70kg, 1-3년령

○ **E.coli 발현 STF2-GnRH 1000ug 중성화 백신 투여**
- 7마리의 실험군(ET1-ET7)에는 각각 1000ug의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신을 대퇴 네갈레근육 내 접종함
- 체중 2.38-3.45kg, 1-3년령

○ 주사 부위 감염으로 인한 부작용을 최소화하기 위해 모든 동물은 진정제(Domitor®, medetomidine, 100mcg/kg)를 투여하고 주사 부위를 제모하고 알코올 솜으로 3회 이상 소독 후 주사함
○ 1차 백신 투여 4주 후 동일 용량의 백신투여 (반대쪽 다리 이용)
○ 명주기를 8시간으로 암주기를 16시간으로 조정하여 발정기를 4개월간 억제시킨 후 다시 명주기를 16시간으로 늘려 발정을 유도시킴
- 발정휴지기를 유도한 4개월은 연중 낮의 길이가 10시간 미만으로 줄어드는 11-2월의 기간을 의미함

○ 명주기를 14시간으로 연장한 시점에 수컷 고양이를 합사(breeding trial)하여 불임여부를 확인함
○ 투여 후 3-4주 간격으로 경정맥에서 혈액을 채취하고 혈청분리 후 Estradiol-17β, Progesterone, GnRH antibody 정량분석을 실시할 때까지 -20℃에 보관함
○ 초기 임신 시 채혈로 인한 스트레스를 최소화하기 위해 예상 임신기간 동안 혈액 샘플링을 중단함
○ 분만한 개체는 산자수를 확인하고 분만일과 임신기간(63일)을 계산하여 수정일을 예측함
○ 대조군과 실험군의 난소를 채취하여 무게를 측정하고 조직학적 검사를 실시함

○ C1이 실험 중 FIP의심 질환으로 실험을 조기종료함. 실험 중 건강한 개체로 대조군(C1’)을 변경하여 수컷과 합사함

(2) 연구결과

○ 교배실험

- 대조군 4마리(100%)과 E.coli 발현 STF2-GnRH 100ug 중성화 백신을 투여한 군 중 5마리(T군, n=5/7, 71%), E.coli 발현 STF2-GnRH 1000ug 중성화 백신을 투여한 군 중 4마리(ET군, n=4/7, 57%)가 발정행동을 보였고 임신한 것으로 확인됨 (그림 19, 표 6)
- T4는 분만이 임박한 상황에서 급성 폐렴으로 인해 폐사함에 따라 폐사 일을 분만일로 갈음하여 수정일을 예측함
- 수컷과 합사 후 대조군은 평균 34±17일 이내, GnRH 100ug 투여군은 평균 22±4일 이내, GnRH 1000ug 투여군은 평균 93±26일 이내에 수정됨. 통계학적인 유의성은 없었으나, GnRH 1000ug 투여군의 평균 합사 후 수정일이 대조군에 비해 약 2.7배 긴 것으로 확인됨

표 1. 대조군(n=4)과 E.coli 발현 STF2-GnRH 투여군(n=14)의 수정기간, 사산자수

처치	Cat	수정기간	산자수	사산수
Control	C1‘	28	4	0
	C2	17	4	0
	C3	84	6	0
	C4	6	4	1
GnRH 100ug	T1*	-	-	-
	T7	-	-	-
	T2	33	1	0
	T3	22	5	1
	T4†	14(추정)	5	-
	T5	29	4	0
	T6	13	5	1
GnRH 1000ug	ET1	-	-	-
	ET5	-	-	-
	ET7	-	-	-
	ET2	166	2	0
	ET3	85	4	2
	ET4	90	3	1
	ET6	31	2	1

* 고양이 전염성 복막염으로 안락사, 비임신 상태 (수컷 합사 87일 후)

† 급성폐렴으로 폐사 (수컷 합사 77일 후)

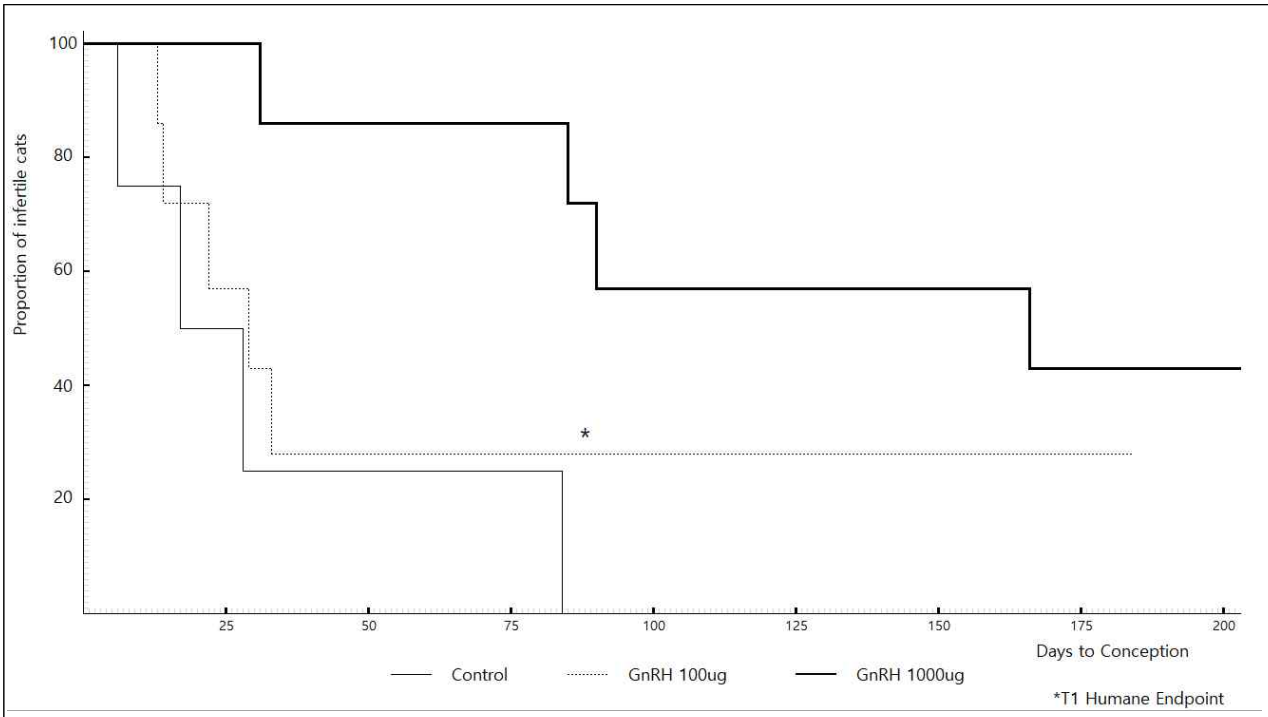


그림 19. 암컷 고양이 불임 비율. 수컷 합사 이후 E.coli 발현 STF2-GnRH 100ug 투여군은 185일, 1000ug 투여군은 203일까지 교배실험을 진행

- 산자수(litter size)는 대조군은 평균 4.5±0.5마리, GnRH 100ug 투여군은 평균 4.0±0.8마리, GnRH 1000ug 투여군은 평균 2.8±0.7마리. 대조군과 GnRH 1000ug 투여군의 산자수는 통계학적으로 유의한 차이를 보임 ($p < 0.05$) (그림 2)

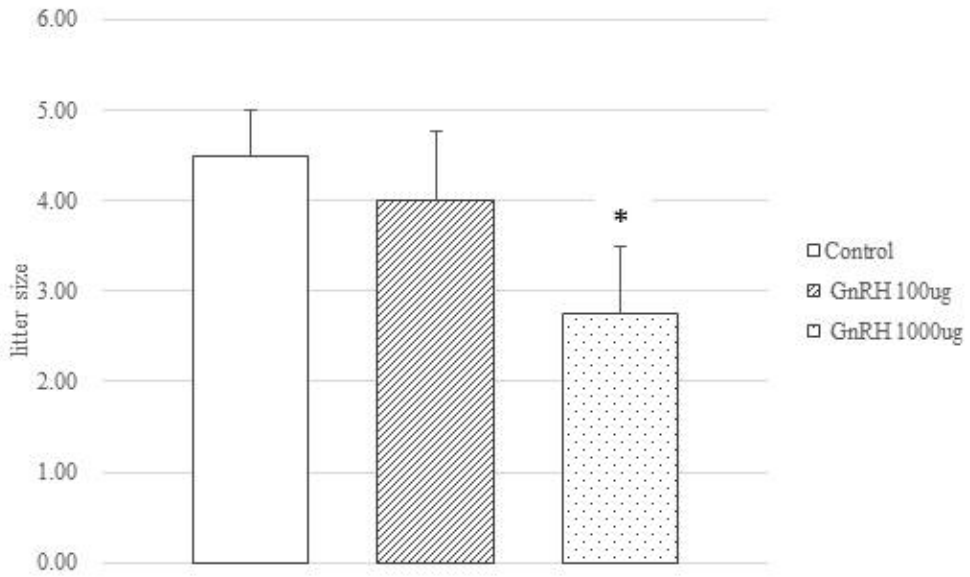


그림 20. 대조군과 E.coli 발현 STF2-GnRH 투여군의 산자수 비교 * p = 0.04 (대조군 4.5±0.5마리와 GnRH 1000ug 투여군 2.8±0.7마리, mean ± SEM)

○ 발정행동

- 발정행동은 동물을 관리하는 동안 관찰하였으며 GnRH 100ug 투여군 중 임신을 하지 않은 개체 2마리 중 한 마리(T7)에서는 발정 행동이 관찰되지 않았음. 그러나 나머지 한 마리(T1)는 발정 행동을 보였으며 Estradiol-17β도 높은 수치를 보였으나 임신은 확인되지 않았음

○ 혈청 내 호르몬 수치

- GnRH 100ug 투여군의 혈청 내 estradiol-17β 및 progesterone 검사 결과 T1, T2는 명주기를 8시간으로 줄여도 estradiol-17β 수치가 높게 나타났고(T1 28.44±6.05pg/mL, T2 46.46±9.96pg/mL, mean±SEM) T3-T7은 광주기 조절에 발정이 억제되는 경향을 보였음. 명주기를 14시간으로 연장하고 합사 3주 후 혈청 내 estradiol-17β (20pg/mL 이상) 및 progesterone(2ng/mL 이상)의 수치가 T7을 제외하고 발정 또는 배란을 의미하는 수치로 확인되었음
- GnRH 1000ug 투여군의 혈청 내 estradiol-17β 및 progesterone 검사 결과 ET1은 명주기를 8시간으로 줄여도 estradiol-17β 수치가 높게 나타났고(17.63±2.93pg/mL, mean±SEM), 명주기를 14시간으로 연장하고 수컷과 합사한 이후에도 발정기를 의미하는 estradiol-17β과 progesterone의 수치(19.96±1.04pg/mL, 21.95±8.15ng/mL)를 보였으나 임신을 하지는 않음
- GnRH 1000ug 투여군에서 실험기간 중 불임상태를 유지한 세 마리의 고양이 중 ET1을 제외한 두 마리(ET5, ET7)는 실험 기간 중 발정기를 의미하는 estradiol-17β 수치를 보이지 않음. 그러나 ET과 ET5는 수컷과 합사한 지 40일째에 progesterone이 위임신 상태를 의미하는 수치까지 증가함(>2ng/mL)

○ 혈청 내 GnRH 항체가 수치 평가

- 실험 기간 동안 채혈한 혈청을 가지고 GnRH 항체가를 측정하였음. 불임효과가 나타는 백신에 반응한 개체(responders)군과 나타나지 않는 백신에 반응하지 않은 투여군(non-responders)군으로 나누어 측정하였음.
- 대조군과 다르게 높게 나타나는 경향성을 보이지만 Responder군과 Non-responder군에 차이는 확인되지 않음. 이는 렛에서도 보이는 현상이며, 항체가는 확인되어도 불임효과가 타나지 않는 개체들이 생기는 것으로 보임(그림 21)

○ 난소 무게 및 조직학적 평가

- 실험종료 시점에 암컷 고양이는 마취 후 중성화 수술을 진행하였으며 적출한 난소의 무게를 측정하고 생식기의 조직학적 특징을 확인하였음
- 난소의 무게는 개체별 발정주기에 따라 성숙난포가 형성되어 있거나 황체가 형성되어 있는 경우 무게가 증가하기 때문에 실험군에 따라 경향성을 확인하기는 어려웠음
- 대조군 및 백신에 반응하지 않은 투여군(non-responders)의 경우 난포가 다양한 단계로 성숙하고 있고 황체가 뚜렷하게 관찰됨 (그림 22)
- 반면 조직학적 검사에서 GnRH 백신에 반응한 개체(responders)는 황체가 퇴화하거나 퇴축난포가 관찰되고 간질세포가 현저하게 관찰됨 (그림 23)

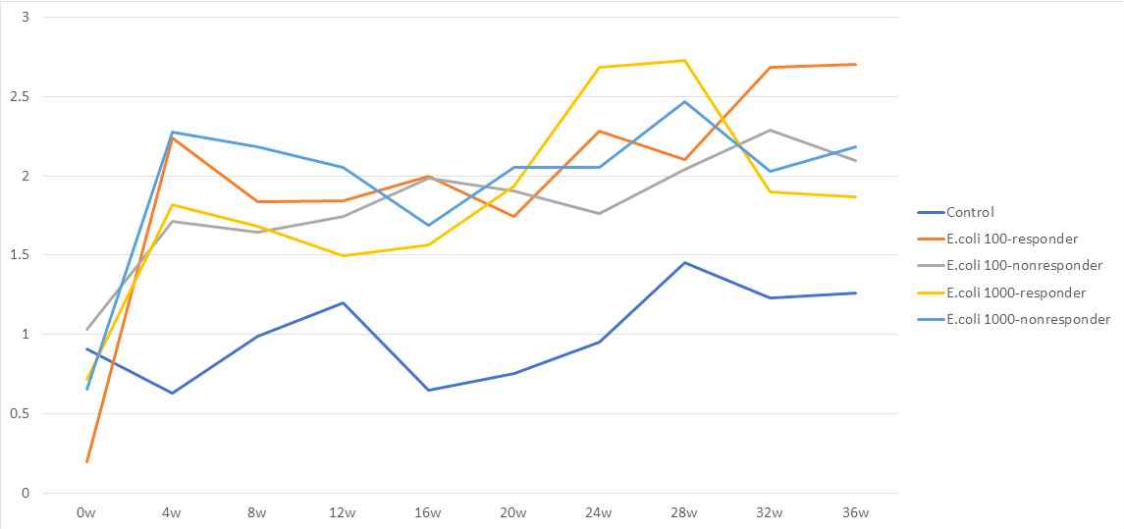


그림 21. E.coli 발현 STF2-GnRH 투여군 GnRH 항체가 수치

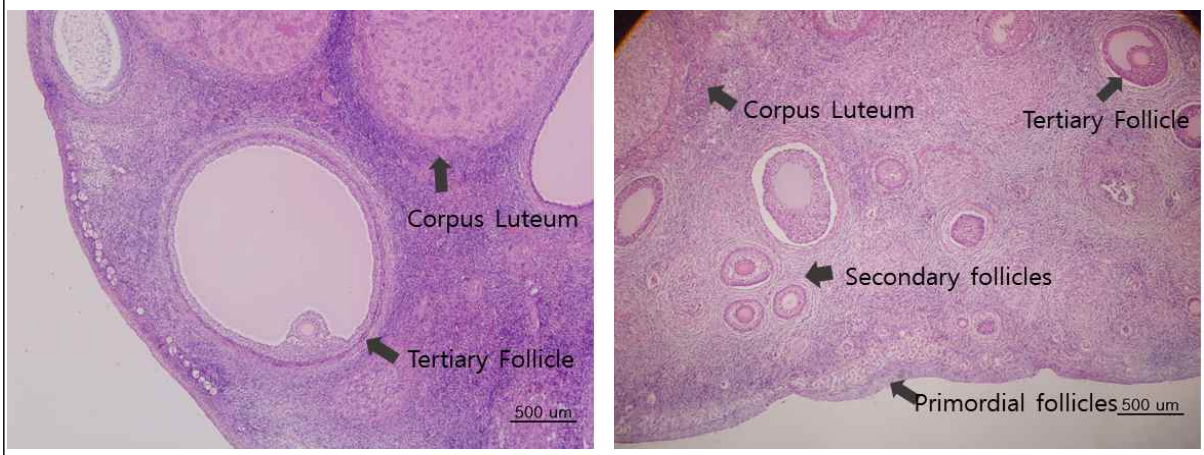


그림 22. 대조군(좌)과 E.coli 발현 STF2-GnRH 1000ug 투여군(non-responders, 임신개체, 우)의 난소 조직

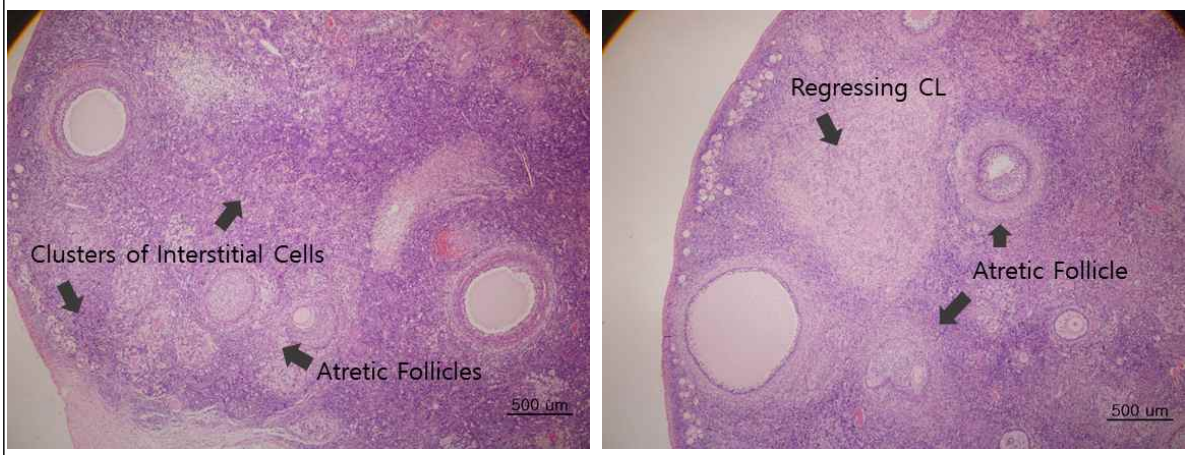


그림 23. E.coli 발현 STF2-GnRH 1000ug 투여군(responders, 비임신개체)의 난소 조직

○ 주사부위 안전성

- 주사는 뒷다리 대퇴네갈레근육에 접종하였으며, 감염으로 인한 주사반응(injection-site reaction)을 배제하기 위해 털을 제거하고 알코올 소독을 실시하고 주사하였음
- 주사 후 2일간 주사 부위 열감과 발적 등과 같은 부작용은 확인되지 않았음

4. 실험실 환경에서 암컷고양이를 대상으로 Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 불임 백신 효능평가

(1) 연구내용

○ 음성대조군

- 3마리의 음성대조군을 분류하여 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 대퇴 네갈레근육 내 투여함
- 체중 2.81-3.92kg, 1-3년령

○ Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 100ug 중성화 백신 투여

- 7마리의 실험군(MT1-MT7)에는 각각 1000ug의 STF2-GnRH 단백질이 포함되도록 PBS 100ul와 Freud's adjuvant(incomplete)를 100ul를 혼합한 GnRH 백신을 대퇴 네갈레근육 내 접종함
- 체중 2.05-4,23kg, 1-3년령

○ 주사 부위 감염을 방지하기 위해 모든 동물은 진정제(Domitor®, medetomidine, 100mcg/kg)를 투여하고 주사 부위를 제모하고 알코올 솜으로 3회 이상 소독 후 주사함

○ 1차 백신 투여 4주 후 동일 용량의 백신투여 (반대쪽 다리 이용)

○ 명주기를 8시간으로 암주기를 16시간으로 조정하여 발정기를 4개월간 억제시킨 후 다시 명주기를 16시간으로 늘려 발정을 유도시킴

- 발정휴지기를 유도한 4개월은 연중 낮의 길이가 10시간 미만으로 줄어드는 11-2월의 기간을 의미함

○ 명주기를 14시간으로 연장한 시점에 수컷 고양이를 합사(breeding trial)하여 불임여부를 확인함

○ 투여 후 3-4주 간격으로 경정맥에서 혈액을 채취하고 혈청분리 후 Estradiol-17β, Progesterone, GnRH antibody 정량분석을 실시할 때까지 -20℃에 보관함

○ 초기 임신 시 채혈로 인한 스트레스를 최소화하기 위해 예상 임신기간 동안 혈액 샘플링을 중단함

○ 분만한 개체는 산자수를 확인하고 분만일과 임신기간(63일)을 계산하여 수정 일을 예측함

○ 대조군과 실험군의 난소를 채취하여 무게를 측정하고 조직학적 검사를 실시함

(2) 연구결과

○ **교배실험**

- 대조군 3마리(100%)과 Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 1000ug 중성화 백신을 투여한 군 중 5마리(MT군, n=5/7, 71%가 발정행동을 보였고 임신한 것으로 확인됨 (그림 24, 표 2)
- MT3은 분만이 임박한 상황에서 호흡곤란을 보이며 폐사함에 따라 폐사 일을 분만일로 갈음하여 수정일을 예측함
- 수컷과 합사 후 대조군은 평균 60±16일 이내, GnRH 1000ug 투여군은 평균 42±12일 이내에 수정됨.

표 2. 대조군(n=3)과 Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 투여군(n=7)의 수정기간, 사산자수

처치	Cat	수정기간	산자수	사산수
Control	MC1	79	4	0
	MC2	29	4	0
	MC3	72	6	0
GnRH 1000ug	MT1	-	-	-
	MT7	-	-	-
	MT2	80	3	0
	MT3*	61	5	0
	MT4	17	4	0
	MT5	16	3	0
	MT6	38	2	0

* 급성폐렴으로 폐사 (수컷 합사 111일 후)

- 산자수(litter size)는 대조군은 평균 3.3±0.7마리, Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 투여군은 평균 3.4±0.5마리로 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않음

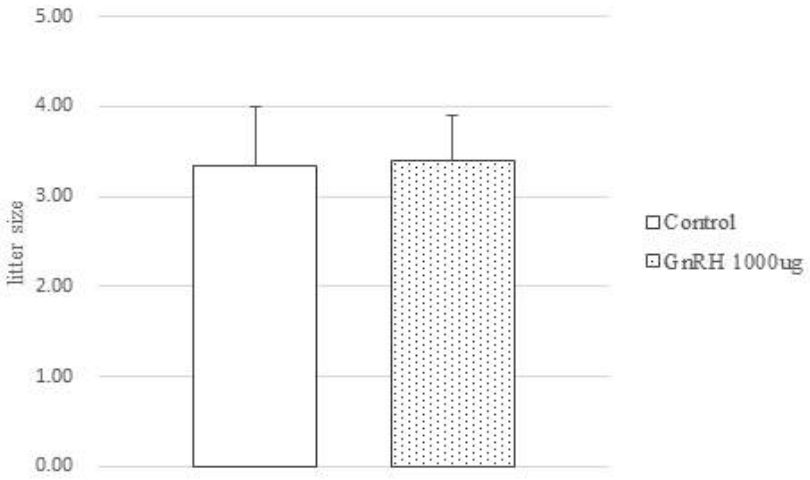


그림 24. 대조군과 Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 1000ug 투여군의 산자 수 비교(대조군 3.3±0.7마리와 GnRH 1000ug 투여군 3.4±0.5마리, mean ± SEM)

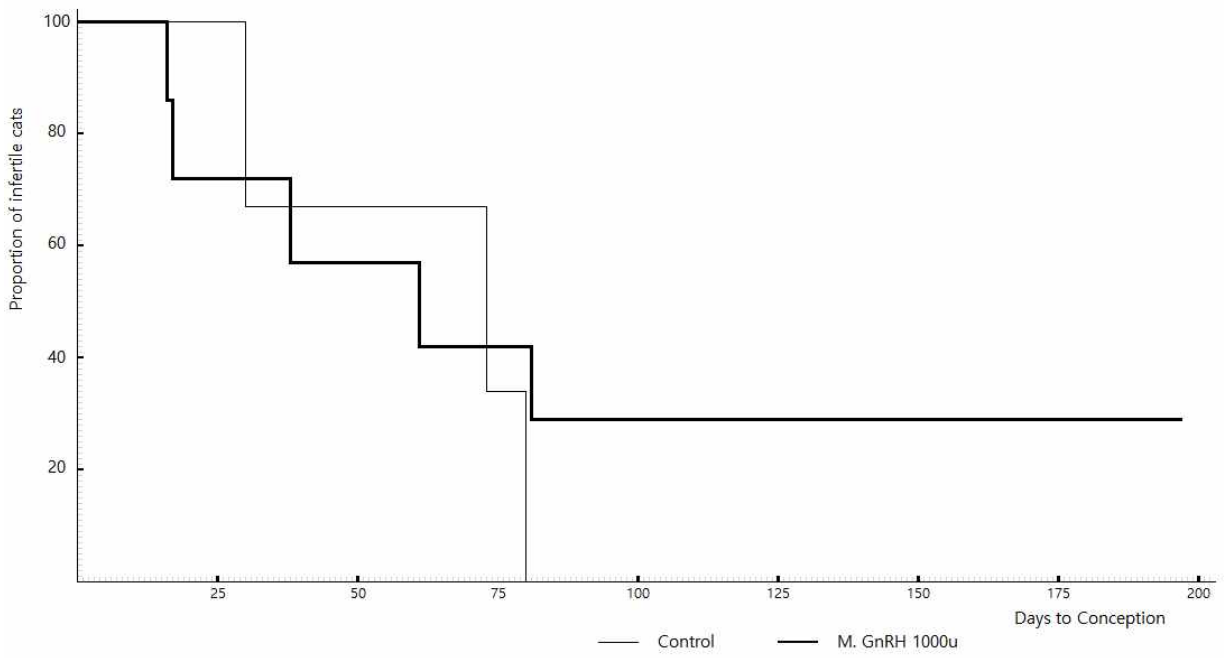


그림 25. Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 1000ug 투여 암컷 고양이 불임 비율. 수컷 합사 이후 196일까지 교배실험을 진행

○ **발정행동**

- 발정행동은 동물을 관리하는 동안 관찰하였으며 Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 투여군 중 임신을 하지 않은 개체 2마리에서 발정 행동이 관찰되지 않았음

○ **혈청 내 호르몬 수치**

- MT3, MT5는 명주기를 8시간으로 줄여도 각각 progesterone(MT3 41.4ng/mL)과 estradiol-17β(MT5 40.8pg/mL)의 수치가 높게 나타남. 명주기를 14시간으로 연장하고 합사 3주 후 혈청 내 estradiol-17β (20pg/mL 이상) 및 progesterone(2ng/mL 이상)의 수치가 MT1을 제외하고 발정 또는 배란을 의미하는 수치로 확인되었음
- 실험기간 중 불임상태를 유지한 두 마리의 고양이 중 MT7은 실험 기간 중 estradiol-17β 수치가 11.5pg/mL이하로 낮게 확인되었으나 수컷과 합사한 지 18일, 54일, 109일에 progesterone이 위임신 상태를 의미하는 수치까지 증가함(>2ng/mL)
-

○ **혈청 내 GnRH 항체가 수치 평가**

- 실험 기간 동안 채혈한 혈청을 가지고 GnRH 항체가를 측정하였음. 불임효과가 나타는 백신에 반응한 개체(responders)군과 나타나지 않는 백신에 반응하지 않은 투여군(non-responders)군으로 나누어 측정하였음.
- 두 군이 큰 차이를 보이지는 않았지만, 대조군과 다르게 Responder군은 좀 더 높게 나타는 경향성을 보였으며, Non-responder군에 대조군과 큰 차이가 확인되지 않음. (그림 21)

○ **난소 무게 및 조직학적 평가**

- 실험종료 시점에 암컷 고양이는 마취 후 중성화 수술을 진행하였으며 적출한 난소의 무게

를 측정하고 생식기의 조직학적 특징을 확인하였음

- 난소의 무게는 개체별 발정주기에 따라 성숙난포가 형성되어 있거나 황체가 형성되어 있는 경우 무게가 증가하기 때문에 실험군에 따라 경향성을 확인하기는 어려웠음
- 대조군 및 백신에 반응하지 않은 투여군(non-responders)의 경우 난포가 다양한 단계로 성숙하고 있고 황체가 뚜렷하게 관찰됨
- 반면 조직학적 검사에서 GnRH백신에 반응한 개체(responder)에서 난소간질세포가 난모세포 아래에 분포하고 있음 (그림 26)

그림 25. Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 투여군 GnRH 항체가 수치

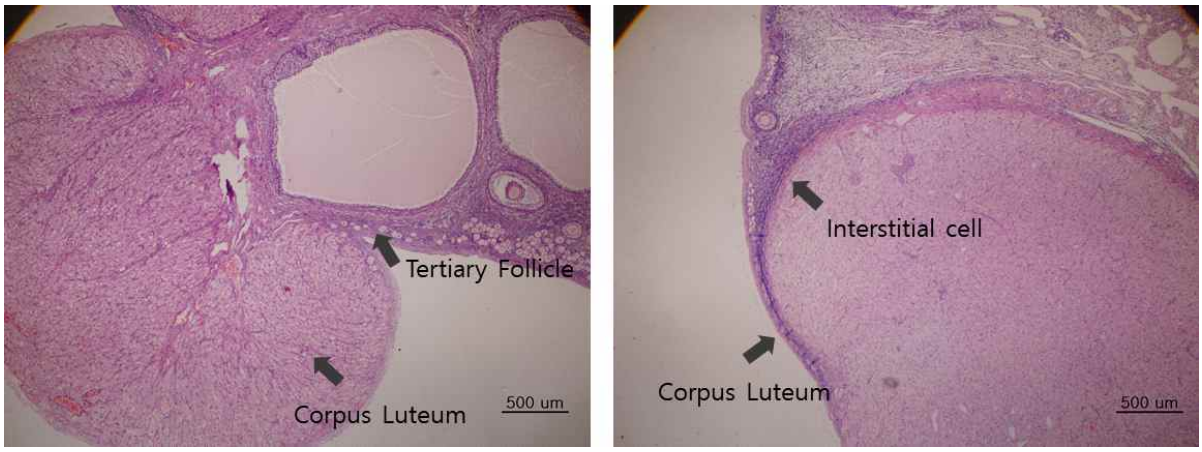


그림 26. 대조군(좌)과 Mycobacterium 발현 STF2-GnRH 1000ug 투여군(responders, 비임신개체, 우)의 난소 조직

○ **주사부위 안전성**

- 주사는 뒷다리 대퇴네갈레근육에 접종하였으며, 감염으로 인한 주사반응(injection-site reaction)을 배제하기 위해 털을 제거하고 알코올 소독을 실시하고 주사하였음
- 주사 후 2일간 주사 부위 열감과 발적 등과 같은 부작용은 확인되지 않았음.

제 4장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1절. 목표달성 및 달성여부

1. 길고양이 번식억제용 불임백신 개발 (100%)

가. E.coli 발현 고양이용 STF2-GnRH 불임백신 개발

- E. coli 발현 시스템을 통하여 재조합 STF2-GnRH 단백질 발현 시스템 구축 완료
- STF2-GnRH 불임백신의 생산 및 정제 완료
- SDS-PAGE 및 Western blot을 이용하여 STF2-GnRH 백신의 성상 및 항원성 확인

나. Mycobacterium 발현 고양이용 STF-GnRH 불임백신 개발

- Mycobacterium INP-STF2-GnRH 발현을 위한 pST-KT 발현벡터 제작 완료
- INP-STF-GnRH 발현 Mycobacterium pST-KT tetracycline induction 시스템 구축 완료
- 발현벡터인 pST-KT transformation 후 발현 균주를 선별하여 백신 개발

2. 실험동물 및 목적동물을 이용한 불임백신 효능 평가 (100%)

가. E. coli 및 Mycobacterium 발현 고양이용 STF2-GnRH 불임 백신의 Rat 효능 평가

- 수컷 Rat을 이용한 백신 투여 실험 실시
- 백신투여군 혈청 내 STF2-GnRH에 대한 항체 형성 및 항체의 지속적 증가 확인
- 최종적으로 500ug의 E.coli 발현 백신과 heat inactivation된 M.smeg 혼합백신의 2회 접종에서 가장 큰 효과를 확인.
- 고환의 무게 및 크기 감소 확인
- 고환 조직을 통해 조직학적으로 정자 감소를 확인
- Responder군에서는 더 확연한 불임효과가 확인되어짐.

나. 실험실 환경에서 수컷 고양이를 대상으로 E. coli 및 Mycobacteria 발현 STF2-GnRH 중성화 백신 효능평가

- 수컷 고양이 실험 시설 및 환경 구축
- 표준 SOP 적용 수컷 고양이 사회화 완료
- 수컷 고양이에 STF2-GnRH 불임백신 1차, 2차 접종 완료
- 혈청 분석을 통해 수컷 고양이에서 GnRH 항체가 증가를 확인
- 혈청 분석을 통해 수컷 고양이에서 Testosterone 감소를 확인
- 중성화 수술을 통한 고환의 형태 변화 확인과 조직학적 검사를 통해 정자 형성 억제를 확인
- 최종적으로 400ug의 E.coli 발현 백신과 heat inactivation된 M.smeg 혼합백신의 2회 접종에서 가장 큰 효과를 확인.

다. 실험실 환경에서 암컷 고양이를 대상으로 E. coli 및 Mycobacteria 발현 STF2-GnRH 중성화 백신 효능평가

- 암컷 고양이 실험시설 및 환경 구축
- 표준 SOP 적용 암컷 고양이 사회화 완료

- 광주기 조절을 통한 암컷 고양이 발정 동기화 완료
- 암컷 고양이에 STF2-GnRH 불임 백신 1차, 2차 접종 완료
- 접종 후 혈청 분석을 통해 암컷 고양이에서 GnRH 항체가 증가를 확인
- 광주기 조절을 통해 발정 유도 후 수컷 고양이와 합사하여 임신 여부 확인
- 출산개체의 수 및 사산자 확인
- 대조군 및 실험군 암컷 고양이 중성화를 진행하여 난소의 조직학적 변화를 확인

3. 전임상 계획 수립 : 달성률 80%

- 길고양이에 대한 불임백신 효능 평가를 위해 동물 보호 단체와의 회의 진행 후 길고양이용 매뉴얼을 작성하여 소규모 길고양이 집단을 확보하고 실험을 진행하려 하였으나 동물보호단체 반대로 인하여 길고양이 백신 실험이 어려워짐.
- 길고양이에 대한 불임백신 효능 평가를 실시하지 못하였으나, 길고양이 백신 접종 시행 시 사용될 매뉴얼을 작성하여 실제 길고양이를 포획하여 접종하고 개체 확인까지의 과정을 정립함.

4. 고양이 불임백신 산업화 및 야외적용 관리방안 확립 : 달성률 100%

- E. coli 발현 고양이용 STF2-GnRH 불임백신을 heat inactivaion된 M.smeg와 혼합한 백신의 효과가 Rat과 고양이에서 모두 확인되어 백신 대량 생산 기술을 보유한 ㈜카브에 기술 이전을 실시하였음. 기술이전 완료 후 ㈜카브에 대량 생산 기술과 접목하여 백신 생산에 활용 예정.
- 실제 야외적용 및 관리를 위해 지속적인 서울시 반려동물 및 반려묘 정책 활용 활동을 수행하여 서울시의 길고양이 문제 해결에 참여. 불임백신을 통한 반려묘 개체 수 조절을 위한 매뉴얼

5. 정량적 성과 : 달성률 95%

- 이 과제에서 개발한 STF2 재조합 단백질 발현용 유전자 카세트를 특허 출원하였으며, 등록까지 완료함. 또한 GnRH가 삽입된 재조합 단백질 또한 특허 출원을 완료하였으며, 현재 등록 진행 중.
- 3건의 학술발표를 수행하였으며, 1건의 논문을 대한수의학회지에 출간하였음. 2건의 논문이 현재 투고 중에 있음.
- 서울시에서 시행하는 반려동물 및 길고양이 관련 정책에 참여하여 정책 활용 2건을 달성하였으며, 신문 및 인터넷 기사를 통해 3건의 홍보실적 또한 달성
- E. coli 발현 고양이용 STF2-GnRH 불임백신을 heat inactivaion된 M.smeg와 혼합한 백신의 효과가 Rat과 고양이에서 모두 확인된 백신을 시제품 제작을 하였으며, ㈜카브에 기술 이전 1건을 실시.

제 5장. 연구결과의 활용 계획

고양이 불임백신 산업화 및 야외적용 관리방안 확립

- E. coli 발현 고양이용 STF2-GnRH 불임백신을 heat inactivation된 M.smeg와 혼합한 백신의 불임효과가 Rat와 고양이에서 확인되었음.

- ㈜ 카브에 기술 이전을 실시하였으며, 이를 통해 백신 대량 생산 및 상품화를 위한 기반이 확립되었음

- 실험동물을 통해 확인된 약 70%의 불임효과를 야외에 적용한다면 현재 사용되는 중성화수술로 처치할 수 있는 한계보다 월등히 많은 개체에 불임을 유발하여 개체수를 조절할 수 있을 것임

- 기존 주사제에 이어 미끼백신 등을 개발하여 고라니, 멧돼지 등의 위해동물 및 야생고양이의 개체 수 조절에 활용 할 수 있을 것으로 예상됨

- flagellin을 면역 증강 단백질로 이용한 epitope 백신은 다양한 유전적 질환에 사용 가능한 기술로 추가적인 연구를 통하여 다양한 적용분야를 개척할 예정임

제 6장. 연구실 안전조치 이행실적

가. 연구실 안전조치 이행계획

코드번호	B-12-01

1. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

1) 실험실 안전 점검

위험등급	점검주기	분류 기준
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

2) 실험실 정밀안전진단 실시

실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험정도에 따라, A,B,C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전무기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시함.

2. 교육 훈련

1) 관련근거 : 연구실 안전 환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제 17조 및 실행규칙 제 9조 실험실 안전관리 규정 제 16조(안전교육), 제 17조(안전교육의 관리)

2) 교육대상 : 실험실을 출입하는 모든 이용자 (교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등

3) 안전교육 시간 및 수료인정기간

- 출입하는 실험실의 위험등급(A,B,C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받아야 하며, 1년에 8시간 이상 교육이수 필수
- 수료인정기간은 수료증의 수료인정기간 까지(유효기간이 지나면 재교육 이수)

4) 안전교육 과정

- 전공특성에 따라 A,B,C 코스로 구분하여 교육 실시
- A코스 : 생물・방사선 취급
- B코스 : 화학・가스 취급
- C코스 : 전기・기계 취급

5) 안전교육절차

3. 안전관리추진계획
   - 각 실험 단과대학별 안전관리실무위원회 구성 및 운영
   - 교내 전체 건물 소방시설 통합관리체계(FMS) 구성
   - 실험실 내부 점검실시 후 실험등급 지정표찰 부착
   - 건물별 복도 및 비상계단 통로 확보와 불법 사무실 철거
   - 사이버 안전 교육 훈련

제 7장. 참고문헌

1 Conn PM, Crowley WF, Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. N Engl J Med 1991, 324, 93-103.

2. Council NR. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academies Press, 2010.

3. Dunshea FR, Colantoni C, Howard K, McCauley I, Jackson P, Long KA, Lopaticki S, Nugent EA, Simons JA, Walker J, Hennessy DP. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. J Anim Sci 2001, 79, 2524-2535.

4. Franca LR, Parreira GG, Gates RJ, Russell LD. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. J Androl 1998, 19, 335-340; discussion 341-332.

5. Janett F, Stump R, Burger D, Thun R. Suppression of testicular function and sexual behavior by vaccination against GnRH (Equity) in the adult stallion. Anim Reprod Sci 2009, 115, 88-102.

6. Jaros P, Bürgi E, Stärk K, Claus R, Hennessy D, Thun RJ. Effect of active immunization against GnRH on androstenone concentration, growth performance and carcass quality in intact male pigs. 2005, 92, 31-38.

7. Jessup DA. The welfare of feral cats and wildlife. J Am Vet Med Assoc 2004, 225, 1377-1383.

8. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1970, 1, 2-25.

9. Killian G, Miller L, Rhyan J, Doten H. Immunocontraception of Florida feral swine with a single-dose GnRH vaccine. Am J Reprod Immunol 2006, 55, 378-384.

10. Levy JK, Crawford PC. Humane strategies for controlling feral cat

populations. J Am Vet Med Assoc 2004, **225**, 1354-1360.

11. **Levy JK, Friary JA, Miller LA, Tucker SJ, Fagerstone KA.** Long-term fertility control in female cats with GonaConTM, a GnRH immunocontraceptive. Theriogenology 2011, **76**, 1517-1525.

12. **Levy JK, Miller LA, Cynda Crawford P, Ritchey JW, Ross MK, Fagerstone KA.** GnRH immunocontraception of male cats. Theriogenology 2004, **62**, 1116-1130.

13. **Levy JK.** Contraceptive vaccines for the humane control of community cat populations. American Journal of Reproductive Immunology 2011, **66**, 63-70.

14. **Miller LA, Johns BE, andKillianGJ.** Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. Am J Reprod Immunol 2000, **44**, 266-274.

15. **Nogales M, Martín A, Tershy BR, Donlan CJ, Veitch D, Puerta N, Wood B, andAlonsoJJ.** A review of feral cat eradication on islands. Conservation Biology 2004, **18**, 310-319.

16. **Purswell BJ, Wilcke JR.** Response to gonadotrophin-releasing hormone by the intact male dog: serum testosterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. J Reprod Fertil Suppl 1993, **47**, 335-341.

17. **Robbins SC, Jelinski MD, Stotish RL.** Assessment of the immunological and biological efficacy of two different doses of a recombinant GnRH vaccine in domestic male and female cats (Felis catus). J Reprod Immunol 2004, **64**, 107-119.

18. **Schmidt PM, Swannack TM, Lopez RR, Slater MR.** Evaluation of euthanasia and trap-neuter-return (TNR) programs in managing free-roaming cat populations. Wildlife Research 2009, **36**, 117-125.

19. **Slater MR.** Understanding issues and solutions for unowned, free-roaming cat populations. J Am Vet Med Assoc 2004, **225**, 1350-1354.

20. **Song YJ, Kim DG, Nam HM, Lee JB, Park SY, Song CS, Seo KH, Kim HM, Choi IS.** Evaluation of the efficacy of immunocastration vaccine composed of

gonadotrophin-releasing hormone conjugated with *Salmonella typhimurium* flagellin in rats. Reprod Domest Anim 2012, **47**, e47-50.

21. **Thompson DL.** Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). Anim Reprod Sci 2000, **60-61**, 459-469.

22. **Vansandt LM, Kutzler MA, Fischer AE, Morris KN, Swanson WF.** Safety and effectiveness of a single and repeat intramuscular injection of a GnRH vaccine (GonaCon) in adult female domestic cats. Reprod Domest Anim 2017, **52 (Suppl 2)**, 348-353.

23. **Westropp JL, Kass PH, Buffington CA.** Evaluation of the effects of stress in cats with idiopathic cystitis. Am J Vet Res 2006, **67**, 731-736.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.