

최 종
연구보고서

SPF(특정균 부재) 토끼
생산 및 생산체계 구축 연구
Production of specific pathogene free rabbit
and establishment of production system

연 구 기 관
연 암 축 산 원 예 대 학

농 립 부

최 종
연구보고서

SPF(특정균 부재) 토끼
생산 및 생산체계 구축 연구
Production of specific pathogene free rabbit
and establishment of production system

연 구 기 관
연 암 축 산 원 예 대 학

농 립 부
제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “SPF(특정균 부재) 토끼 생산 및 생산체계 구축 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 8월 21일

주관연구기관명 : 연암축산원에대학

총괄연구책임자 : 서 경 덕

세부연구책임자 : 서 경 덕

연 구 원 : 심 금 섭

연 구 원 : 김 광 식

협동연구기관명 : 한국화학연구원

협동연구책임자 : 하 창 수

요 약 문

I. 제 목

SPF(특정균 부재) 토끼 생산 및 생산체계 구축 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구과제는 미생물적으로 *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella spp.*, *Eimeria spp.*, *Ear/Body mange*, *Mycoplasma*, *Sendai virus(HVJ)*에 대하여 free한 SPF 토끼를 작출하는 것과 함께 이를 유지하고 번식 생산하기 위한 기술 및 barrier system의 효율적인 운영 기술을 확립하여 국제적으로 인정되는 고품질의 SPF 토끼를 안정적으로 공급할 수 있는 체계를 구축함으로써 국내의 동물실험에서 사용되고 있는 실험동물의 질적인 향상을 꾀하는 것이 본 연구의 최종목표이다.

실험동물을 이용한 생명공학의 발전에 따라 각종 동물실험의 중요성이 증대되는 것과 함께 그 질적 향상이 요구되고 있다. 지금까지 국내에서 정부출연 연구기관 및 제약회사 등에서 동물을 이용한 동물실험에서 토끼를 사용해야 하는 경우 선택 또는 공급되어지는 대부분의 동물이 conventional 수준의 사육시설에서 사육된 동물을 이용하고 있어 얻어진 결과가 일정하지 않아 실험의 빈도와 사용동물수를 늘려야만 하는 경우에 처하고 있어 품질적으로 보증할 수 있는 토끼의 공급이 절실하게 요구되고 있는 것이 사실이다. 국내에서도 mouse와 rat는 SPF 수준의 동물로서 생산하여 공급하고 있는 생산장이 존재하고 있으나 중동물 이상의 경우는 전무한 상태이다.

한편 2000년대 생명과학시대를 맞이하여 실험동물의 유용성 증대와 더불어 실험동물의 관리와 동물실험에 있어서 과학적이며 동시에 동물의 복지와 권리를 동시에 만족시킬 수 있는 시설과 연구자를 필요로 하고 있으며, 이러한 부분에서 국제적인 경쟁력을 위해서는 국제실험동물관리인증협회(AAALAC)로부터 시설과 동물실험 결과에 대한 신뢰성 등이 규정한 기준에 의해 인증을 받아야 한다. 현재 한국화학연구소 안전성센터(1999년)가 이 인증을 획득하였고 국립식품의약품안전처 독성연구

소, 삼성생명과학연구소, 성균관대학교 의과대학 등이 인증을 받기 위한 노력을 하고 있지만, 이러한 연구기관이 심사를 의뢰한 분야는 대부분 소형설치동물을 대상으로 행해지는 안전성 시험에 한정되어 있어 국내 동물실험의 경쟁력을 강화하기 위해서는 먼저 소형 설치동물 이상의 동물에 있어 유전적으로 표준화되고 미생물적으로 조절된 고품질의 동물을 안정적으로 공급할 수 있는 생산기반의 구축이 절실하게 요구된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 무균자토의 생산, 사육시설의 청정화 분야

본 연구의 가장 핵심적인 분야로서 일반사육시설에서 사육되고 임신시킨 conventional 토끼의 자궁적출기술을 이용한 무균자토의 생산기술과 인공포유기술을 이용하여 8가지의 미생물에 free한 SPF 토끼의 번식군을 확립하고 이에 대한 미생물 monitoring 기술 확립 및 Barrier 내에서의 동물을 사육관리하기 위한 환경 조절에 대한 기술을 확립하기 위해서 다음의 내용을 수행하였다.

- 1) 토끼의 자궁적출 기술 확립
- 2) 인공포유 기술개발
- 3) 환경 모니터링 기술 확립 및 SOP제작
- 4) 미생물 모니터링 기술 확립 및 SOP제작

2. SPF 토끼정액동결보존과 각종 모니터링법 확립 분야

유전적으로 확립된 계통을 폐쇄군으로 유지하면서 번식을 하는 윤환교배를 실험 동물에서 일반적으로 많이 사용하고 있으며, 또한 SPF 토끼가 barrier내에서 유지하므로 외부로부터 유전자를 반입한다는 것은 매우 어려운 일이므로 폐쇄군을 유지하면서 생산을 하면 수년 내에 근친번식에 따른 피해가 예상된다. 이와 함께 예기치 못한 사고로 barrier system이 파괴되었을 경우를 대비해서라도 동일한 유전자원을 장기간 보존할 수 있는 기술이 불가결하다. 따라서 확립한 SPF 토끼의 정액을 보존하는 기술을 개발할 필요가 있다고 판단하였으며, 동시에 현재 확립한 SPF 토끼의 유전적인 특징을 규명하는 증체 등에 관한 유전 monitoring도 함께 수행하였다.

- 1) 토끼정액의 채취와 동결보존의 가능성 검토
- 2) 각종 동해방지제의 유용성 검토
- 3) 동결정액을 이용한 인공수정기술 확립
- 4) 사육조건에 따른 미생물 오염측정
- 5) 유전모니터링 기술 확립 및 실시

3. SPF 토끼의 수정란 생산과 보존 기술의 확립, 월 350두 생산사육시설의 운영에 따른 지침서 작성 및 SPF 토끼의 생리적 특성에 대한 검토 분야

Barrier system의 예기치 못한 사고로부터 유지 생산되고 있는 유전자원의 보호와 근친교배에 의한 퇴화속도를 조절하기 위한 방법으로 수정란 이식기술이 확립되어야 할 것이며 이를 위한 수정란 확보 및 보존 기술의 확립 및 확립된 SPF 토끼를 이용한 번식생산에 있어 생산비용의 절감을 위한 시설운영 SOP 작성 및 개발된 SPF 토끼의 생리적인 특징을 규명하여 우수한 실험용 SPF 토끼를 안정적으로 생산, 공급할 수 있는 기반을 구축하기 위해 다음과 같은 내용에 대한 검토를 하였다.

- 1) 토끼의 효율적인 과배란 처리 기술 확립
- 2) 토끼 수정란의 동결보존 기술 확립
- 3) Barrier 내외 동물실내에서의 청정유지방법 확립
- 4) 시설유지 및 생산기기의 운영지침서 작성
- 5) Conventional 토끼와의 생리적 차이의 분석

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

각 분야별 연구결과를 요약정리하면 다음과 같다.

1. 무균자토의 생산기술, 사육시설의 청정화 분야

가. 토끼의 자궁적출기술 확립, 인공포유기술 개발 및 사육시설의 청정화

무균적으로 태자를 얻고 이를 이용하여 SPF 토끼의 번식군 확립을 위해 미경산의 New Zealand White 암컷을 자연교배 시키고 임신 30일에 자궁을 적출하여 수술용 isolator로 반입하고 조심스럽게 자궁을 절개하여 태자를 적출하고, 자궁과 태

반의 오염유무를 확인하기 위한 sample을 채취하였다.

태자를 적출하고 5시간 후에 인공유를 저온살균하고(65℃, 30분) 37℃로 가온하여, 태자적출 후 3일까지는 토끼의 초유만을, 4일부터 20일까지는 일반 젖만을, 21일부터 35일까지는 토끼 젖 50%와 산양유 50%를 혼합한 것을 1일 1회 체중의 10%에 해당하는 젖을 수유하는 것을 원칙으로 하고, 일령별 수유방법으로는 생후 7일까지는 내경 0.5mm, 외경 1.52mm, 두께 0.5mm, 길이 10cm의 microbore tube(Tygon[®])를 10ml의 주사기에 부착한 주사바늘과 연결하여 tube를 직접 신생자토의 위내로 약 5-7cm 밀어 넣고 서서히 주사기의 피스톤을 눌러 젖을 밀어 넣어 주는 방법을, 생후 8일부터는 4cm의 실리콘 튜브(내경 2mm, 외경 3mm) 끝에 작은 구멍(직경 0.1mm 이하)을 만든 plastic을 삽입한 것(인공유두)을 내경 4mm의 실리콘 튜브에 연결하고, 반대쪽은 37℃로 가온하여 젖을 넣은 50ml의 주사기와 연결하여 세우고 한 손에는 인공유두를, 다른 한 손으로는 신생자토를 고정하여 인공유두를 자토의 구강내에 넣어주어 스스로 젖을 흡입하도록 하여 인공포유를 하였다. 생후 20일부터는 고압멸균한 양배추를 자유롭게 채식하도록 하였으며, 36일에 이유하고 양배추와 산양유로 반죽한 분말사료를 생후 80일까지, 이후부터는 고품사료만을 급이하였다.

1차 실험에서는 101마리의 신생자토 중 이유 후 최종 생존율이 5%인 5두, 2차 실험에서는 147마리의 산자를 얻었으나 1차 실험과 같은 원인으로 대부분이 폐사되고 7(4.8%)마리만이 생존하였다. 폐사원인으로는 맹장과 대장에서 출혈병반이 확인되었으며, 이는 장내 유해 미생물의 정착이 불완전하고, 대장균 등과 같은 세균이 분비하는 세균독소가 영향을 미친 것으로 판단되었다. 따라서 3차 실험에서는 장내 소화관련 미생물의 정착을 위해 초회수유 전에 1차, 2차 실험에서 생존한 토끼의 분을 식염수에 녹여 먹인 후 포유한 결과 30마리 중 14(46.7%)마리가 생존하는 결과를 얻었으며, 2차 실험에서 살아남은 토끼에 대한 *Pasteurella multocida* (배양법), *Bordetella bronchiseptica* (배양법), *Salmonella spp* (배양법), *Eimeria spp* (현미경 검사)의 감염여부를 실시한 결과 모두 음성으로 나타나서 국내에서 처음으로 특정한 미생물에 대하여 free한 토끼가 확립되어 국내기술에 의해 생산한 SPF 토끼의 공급을 위한 기반을 구축하게 되었다.

나. 모토유 착유기술 확립

무균자토의 포유에 필요한 토끼 젖을 대량으로 확보하기 위한 착유기를 소형의

음압용(Rocket medical, England) 펌프를 응용하여 고안하였으며, 착유방법은 분만 당일에 모토에서 자토를 떼어내고 oxytocin(6.0 IU/kg)을 피하 주사하여 유즙분비를 자극시키고 20분후부터 약 30분간 착유를 하였다. 45마리 모토에서 분만 후 1일부터 시작하여 평균 20일간 착유하였으며 1회에 착유할 수 있는 젖의 양은 마리당 15-140ml로 평균 44.3ml이었으며, 착유가 가능한 기간은 분만후 17-33일로서 평균 20일 이었다. 따라서 분만모토에서 대량의 젖을 확보하게 되어 자궁적출술로 얻은 무균자토의 원활한 인공포유가 가능하게 되었고, 한편 실험동물의 비유생리 등의 연구를 위한 착유기술 개발에 유효한 자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

다. 환경 모니터링 및 미생물 모니터링 기술 확립과 관련 SOP 제작.

사육시설의 청정화를 위해서 생명공학 및 신약개발의 동물실험을 위한 SPF 토끼 생산기반 구축을 위한 연구의 일환으로서 SPF토끼의 생산과 유지를 위한 미생물, 환경 및 유전학적 모니터링 기술의 확립이 필수적인 과정이며 또 이를 위해서는 구체적으로 SPF토끼의 사육시설 과 SPF토끼의 미생물 모니터링이 가장 중요하다. 이러한 업무를 위해서는 그에 합당한 SOP제작이 우선되어야 체계적인 모니터링이 이루어진다.

따라서 현재 GLP시험기관인 한국화학연구원 안전성센터(현 안전성 평가연구소)에서 실시하고 토끼의 검역시스템을 도입하여 SPF토끼의 사육시설 과 SPF토끼의 미생물 모니터링 SOP를 국내 실정에 맞는 시스템으로 개발하여 SPF 토끼생산에 적용시키고자 하였다.

2. SPF 토끼정액동결보존과 각종 모니터링법 확립 부분

가. SPF 토끼정액동결보존기술 확립

Barrier system내에서 사육중인 SPF 토끼 정액을 자체 개발한 인공질을 이용하여 정액을 채취하고 다양한 동해방지제로 희석하고 program freezer를 이용하여 동결 보존하였으며, 냉각속도와 동해방지제의 종류가 토끼정자의 동결융해후의 생존성에 미치는 영향에 대하여 검토를 하였다. 인공질을 이용하여 채취한 정액을 37℃로 준비한 RMED 용액으로 1:1로 희석하고 50%의 percoll로 정자피를 회수하고, 정자피를 37℃로 가온한 희석액과 희석하였으며, 희석한 정액을 0.5ml straw에

분주하여 봉인하고 25℃에서 5℃까지는 program freezer에 의해 냉각하고, 5℃에서 -196℃까지는 액체질소 상면에서 냉각하였다. 실험 1에서는, 25℃에서 5℃까지의 냉각속도를 다르게 하였을 때 용해후의 정자의 생존율과 침체변화에 미치는 효과를 검토한 결과, 세포막을 투과하는 glycerol과 acetamide는 정자와 희석 후 1 시간 내에 냉각을 하는 것이 가장 높은 생존율을 나타내었으며($P < 0.05$), 냉각속도가 늦어질수록 오히려 정자의 생존율이 저하되었다. 불투과성인 methyl cellulose를 첨가한 희석액으로 희석한 경우에는 그 점진도에 관계없이 서서히(4시간) 냉각하는 것이 희석 후 빠르게 냉각하는 것보다 높은 생존율을 나타내었고($P < 0.05$), 정상 침체에 있어서는 서서히 냉각하는 것이 빠르게 냉각하는 것보다 높았다.

실험 2에서는, 세포막투과성 물질인 glycerol, acetamide와 불투과성 물질인 methyl cellulose, trehalose 와 raffinose를 단독 또는 2가지 이상의 조합으로 조절된 희석액으로 희석하여 25℃에서 5℃까지를 2시간에 걸쳐서 냉각한 경우, 생존율에 있어서는 세포막 투과성 또는 불투과성 물질을 단독으로 첨가한 희석액으로 희석한 구가 가장 낮았으며(2.5%~11.8%, $P < 0.05$), 다음으로 2가지 조합구가 낮았고(7.7%~16.0%), 가장 높은 생존율은 3가지를 혼합하여 첨가한 조합구가 가장 높았다. 실험 3에서는 동결정액의 정액주입시기를 결정하기 위해서 hCG를 투여하고, hCG의 투여직후(A 군, 15두) 및 투여후 10시간(B 군, 15두)에 양쪽자궁에 0.25ml (7×10^6 /sperm)씩 주입하여 인공수정을 실시한 결과, A 군은 14마리(93.3%)가 99마리(평균 7.1마리)의 자토를 분만하였으나, B 군은 6마리(40.0%)가 30마리(평균 5.0마리)의 자토를 얻었다.

따라서 토끼정액의 동결보존 기술 확립과 동결정액 주입시기를 결정함으로써 폐쇄군으로 유지·번식하는 SPF 토끼의 근친교배에 따른 피해를 감소시킬 수 있게 되었고, 유전자원의 반영구적인 보존이 가능하게 되어 매우 의미가 있는 결과라 할 수 있다. 또한 토끼를 이용한 생식독성시험 또는 최기형 실험에서 적용하고 있는 인공수정에 있어 액상정액만을 이용하던 종전의 정액공급방법에 있어 채취의 어려움과 정액의 질적인 부분에 의한 문제점을 해결할 수 있는 새로운 방법이라고 생각된다.

나. SPF 토끼의 증체속도 측정에 의한 유전 monitoring

확립하여 번식하고 있는 SPF 토끼의 유전 monitoring 방법의 하나로서 체중을 주령, 동복산자수, 성별에 대하여 조사하였다. 체중측정에 공시한 자토수는 26마리

의 어미에서 태어난 산자수중 포유개시한 183마리(평균 산자수: 7마리)를 대상으로 분만 후 1주부터 8주령까지는 복별로, 9주령부터 14주령까지는 개체별로 체중을 측정하였다. 주령에 따른 체중 변화에 있어서, 매 주령별간에는 유의한 증가($P<0.05$)가 인정되었으며, 생후 2주령에 분만 후 1주령의 체중에 비하여 약 2배의 증체가 인정되었으며, 생후 2주령까지의 일당 증체량은 약 12.8g였다. 분만 후 사료섭취가 시작되는 4주령부터는 체중이 급격하게 증가하여 분만 후 1주령 체중의 5배에 달하였으며, 분만 후 6주령인 이유시에는 분만 1주령 체중의 10배인 1,138g에 도달하였으며, 이후부터는 매주 200-300g의 증체를 나타내고 14주령에 $2,994.5\pm 44.0g$ 에 도달하였으며, 이것을 분만 1주부터 일당 증체량을 하면 약 28.9g이다.

동복산자수에 따른 증체량에 있어서는, 생후 3주까지에 있어 동복산자수가 8이상의 경우가 동복산자수 7이하의 경우보다 증체량이 낮게 나타나고, 사료섭취가 활발해지는 4주령부터 7주령까지는 동복산자수가 8 또는 9마리에 비하여 동복산자수 5 또는 6마리의 경우가 유의하게 증체되는 것이 인정되었지만($P<0.05$), 개별사육이 시작되는 9주부터는 비슷한 증체를 보였다.

9주령부터 성별간의 증체를 검토한 결과, 주령별 암수간의 체중증체에 따른 유의차는 체중 측정의 전 기간에 있어 인정되지 않았으나, 주령수가 증가함에 따라서 암컷이 수컷에 비하여 약간 높은 체중을 나타냈다. 한편 암수 모두 매 주령에 있어 전 주령에 비하여 유의하게 증가하는 것이 인정되었다($P<0.05$).

이상의 결과는 Barrier 시설내에서 사육한 SPF 토끼는 매 주령별로 유의한 체중증가가 인정되며, 포유개시두수를 7마리 정도로 조절하는 것이 어린 토끼의 초기발육에 유리하다는 것을 알 수 있었으며, SPF 토끼를 이용한 각종의 안전성연구에 있어 적합한 토끼의 체중과 주령의 선택을 위한 참고자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

다. 사육조건에 따른 미생물 오염 측정

사육중인 토끼의 Clean room과 Isolator의 오염정도의 측정을 위해서 사육조건에 따른 미생물 오염 측정을 효율적으로 하기위해서 동물실의 환경제어 지침서를 제작하였다. Clean room 이란 무균실, 청정작업실, 무진실 등을 호칭하며, 고성능 filter를 사용해 공기중의 먼지나 미생물을 제어하여 실내의 환경을 오염으로부터 안전하게 유지하고, 또한 청정도를 유지하기 위해 적극적으로 노력하는 공간이라고

할 수 있다.

따라서 감염경로 및 감염원을 줄이기 위한 대책으로서 기계적 공기정화와 진공 청소기와 소독수를 이용한 청소 등이 실시되지만 무엇보다도 오염의 정도를 측정할 수 있는 프로그램과 지침이 필요하다. 특히 여기서는 Clean room과 Isolator의 SPF토끼의 사육이 오염도에 미치는 영향을 비교하여 각각의 시설에서 주의할 부분을 정립하여 효율적인 유지방법을 확립하여야 할 것이다.

라. 사육조건에 따른 공조관련 소모품의 교체시기 결정

공기조화란 동물이 안락함을 느끼기 위해서는 온도, 습도, 공기유속, 청결도라는 네 가지의 요소가 적정하게 유지되어야 한다. 즉 공기조화란 인공적으로 실내 공기의 온도, 습도, 기류, 청결도를 인체 혹은 물품에 가장 적합한 상태로 유지시켜주는 것을 말한다. 아울러 음향과 진동까지 고려하는 것이 현대의 공기조화 개념이다. 보통 SPF 동물 사육실은 hepa filter를 통과한 무균청정공기가 항상 공급되어 사육실내부가 양압으로 유지되어서 외부로부터 오염된 공기가 차단될 수 있도록 시공된 시설이다. 일정한 사용기한이 지나면 공조관련 소모품의 교체가 필요하다. 특히 필터교체에 관한 지침서를 만드는 것이 중요하다.

마. 유전 모니터링 기술 확립 및 실시

현재 가장 많이 이용되고 있는 뉴질랜드 화이트와 일본 백색계의 유전적인 특징을 검토하고 세대변화에 따른 고유유전자를 결정한다.

3. SPF 토끼 수정란 생산과 보존 기술의 확립, 월 350두 생산사육시설의 운영에 따른 지침서 작성 및 SPF 토끼의 생리적 특성에 대한 검토 분야

가. SPF 토끼 수정란의 동결보존 기술 확립

무균동물 또는 SPF 동물의 생산시설 및 모델동물의 작출에 있어 수정란의 동결보존 기술의 확립은 유전자 도입동물 등의 특수한 계통작출, 생산조절 및 유지관리에서 뿐만 아니라 사육시설에 있어서 예기치 못한 오염 또는 화재 등의 재해로부터 사육하는 동물의 유전자를 보존하는 목적 등으로 수정란의 동결보존기술을 확립하기 위해 실시하였다. 생후 18주령, 체중 3.0kg 이상의 암컷에 생리식염수에 15%의 PVP(K-90)를 녹인 용액으로 FSH(Tenka, Japan)를 4.0 AU/ml로 조절한

것을 1마리당 1ml씩 근육주사하고 72시간 후에 미정맥으로 100IU의 hCG(대성미생물)를 주사하여 과배란을 유기하고 수컷 cage에 암컷을 옮겨 교배를 시켰다. 교배 후 70-72시간에 chlorpromazine HCl(Sepamine[®], Samsung Co, Korea)를 10mg/kg로 근육주사 하여 진정시키고 8Fr의 2-way catheter를 자궁각에 고정하여 자궁관류를 하여 상실배 또는 초기배반포배를 각각의 동결실험에 공시하였다.

유리화동결의 용액은, EFS-40(30% Ficoll+0.5M sucrose 함유 PBS, ethylene glycol 40%)을 이용하여 수정란을 PBS 용액으로 만든 23℃의 0.5M sucrose 용액에 옮겨 넣고, 이어서 20℃로 조절한 실내에서 0.25ml의 plastic straw에 0.5M의 sucrose 용액(~60mm), 공기(~20mm), EFS-40(~5mm), 공기(~5mm), EFS-40(~12mm), 공기(~5mm), EFS-40(1~2mm)을 흡입하여 수평으로 놓고, 유리 pipett에 EFS-40 용액을 흡입한 상에서 0.5M의 sucrose 용액중의 수정란을 흡입한 다음 이것을 EFS-40(~12mm)의 밑 부분에 도입하고 공기(~5mm)와 0.5M sucrose 용액(~10mm)을 흡입하고 straw를 열처리하여 cotton 반대쪽을 밀봉하는 것으로 수정란을 straw에 loading 하였으며, 액체질소 상면에 부유하여 준비한 스티로폼 plate 위에 straw를 올려 3분간 예비동결하고 곧바로 액체질소에 침지하는 것으로 유리화 동결을 시켰다. 직접동결은 10% ethylene glycol(EG)를, 완만동결은 10% glycerol(G)를 이용하였으며, 직접동결은 수정란을 0.25ml의 straw에 loading 후 -7℃로 준비한 program freezer 넣고, 완만동결은 20% 혈청을 첨가한 PBS 용액으로 만든 3.3%와 6.6%의 glycerol 용액에 각각 10분간 평형을 시킨 다음 10%의 glycerol 용액에 넣고 0.25ml의 straw에 loading 후 18℃로 준비한 program freezer에 10분 후에 넣고 -7℃까지 분당 1.0℃씩 냉각시킨 다음 -7℃에서 2분후 seeding하였고 -7℃에서 -30℃까지 분당 0.3℃ 속도로 냉각하고 -30℃에서 10분간 유지시킨 다음 액체질소용기에 넣어 동결을 완료하였다. 1주일 이후에 각각의 방법으로 동결한 수정란을 용해하여 생존율을 20%의 혈청을 첨가한 Medium 199(Cat. No. 12340-030, Gibco)에서 배양하여 확인하고 일부의 수정란은 발정 동기화시킨 토끼에 이식하였다. 상실배와 초기배반포배를 회수하여 유리화, 급속 및 유리화 동결을 한 다음 7일 이상 액체질소 중에 보존하고 용해하여 배양한 결과 어떠한 방법에 있어서도 용해하여 배양하면 85% 이상의 수정란이 확장된 배반포배 이상으로 발달되는 것이 인정되었고, 유리화 동결방법으로 동결한 수정란을 용해하여 형태적으로 정상인 것을 16마리의 암토끼에 320개를 이식한 결과 197마리(61.5%)의 산자를 얻어, 토끼의 수정란은 다른 동물종의 수정란과는 다르게 투명대 주위에 mucin coat이 있어

이것이 수정란의 동결융해과정에서 일어나는 수정란 내외로의 수분이동에 있어 완급을 조절하는 것에 의해 수정란의 세포질을 보호하는 것으로 생각되었으며, 이러한 기술을 이용하여 오염으로부터의 barrier system 보호 및 폐쇄균에 의한 번식에 따른 근친계수의 상승조절을 위해 정기적으로 수정란을 회수하여 동결보존하고 barrier 또는 isolator에서 수정란을 이식하는 방법으로 운영중인 barrier system을 안전하게 유지할 수 있을 것으로 생각된다.

나. 월 350두 생산사육시설의 운영에 따른 지침서 작성

20×20×2.7m의 동물사육을 위한 Barrier system에 번식을 위한 암컷 토끼 120두를 이용하여 월 350두를 생산하는 계획에 있어 품질을 유지하며 생산비를 절감할 수 있는 방법과 년중 일정한 환경조건을 유지하기 위한 설비된 시설의 운영을 위한 SOP를 작성하였다. 환경조건을 온도 22±2℃, 습도 55±5%, 환기회수 15이상/시간으로 유지하며 월 350두 생산을 위한 1년간의 생산비용을 각 항목별로 비용을 구분하면, 환경유지(온/습도)를 위한 에너지 비용이 29.2%로 가장 높았으며, 인건비가 25.8%, 시설유지보수비용이 20%, 사료비가 19.6%, 기타 5.4%로 나타났다. 생산비중 환경유지관련비가 전체의 약 50%에 이르므로 이에 관련된 부분에 있어 동물의 질적인 부분에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 가감할 수 있는 방법으로 공기의 온도와 습도의 기계적인 조절이 불필요한 봄, 가을에는 배기되는 실내공기의 환급량을 낮추고 온도와 습도면에서 불리한 여름과 겨울철에는 배기되는 공기를 최대 50% 정도 medium, hepa filter를 통하여 동물실내로 공급하는 방법으로 유지하였고 동물의 질적인 부분에서도 문제가 없어, 결론적으로 배기되는 공기를 동물의 생리적인 부분에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 재이용함으로써 에너지 비용을 20%까지 절감할 수 있는 효과를 얻을 수 있었다. 한편 매일 교체가 요구되는 동물실내의 환기구에 사용되고 있는 pre-filter의 동물실내 설치되어 있는 진공청소기를 이용한 재활용을 통하여 소모품비의 절감을 꾀할 수 있게 되었다. 또한 동물 생산에 있어, 번식회전율은 연간 7-8회(번식주기 7주)로 하고 1회 분만에 대한 평균이유두수는 5두로 하여 모토 1두당 연간 자토생산량이 35-40두를 유지하기에 이르렀다. 자토의 육성에 있어서는, 생후 3주에 포유중인 산자수가 5두 이하인 경우는 양자를 보내 모토의 번식으로의 회전율을 높였으며, 생후 6주에 이유하여 군사를 하고 9주령에 암수를 구분하여 개체 사육하는 것으로 분만과 육성 cage의 활용을 극대화 하였다.

다. Conventional 토끼와의 생리적 차이의 분석

생산된 SPF토끼를 각 주령별로(3주령, 9주령, 16주령, 27주령) 암수 각각 5마리에 대해서 각종 병리검사를 실시하였다. 여기에서 얻어진 혈액학적 검사, 혈액 화학적 검사, 장기중량측정, 및 미생물검사는 최초로 국내에서 생산된 SPF토끼에 관한 기초 자료로서 큰 의의가 있으며 SPF토끼를 이용한 안전성시험 및 약효약리시험의 신뢰성을 확보하는데 크게 기여할 것이다.

SUMMARY

Part I

A. Production of germ free rabbit.

In this study, we have attempted to establish of specific pathogene free(SPF) rabbit produced by hysterectomy and artificial nursing as *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella spp*, *Eimeria spp*, *Ear/Body mange*.

The fetal was take out from uterus at 30 day pregnancy of New Zealand White rabbit in the operating isolator and than nursed with rabbit milk according to body weight(10%) by artificial nipple(\varnothing 1.52mm) for 20 days after operated. From 36 days to weaning, autoclaved cabbage and assorted feed was feed to newborn rabbits. Fixing of microorganism in a digestive organ, dung of rabbit growth in the barrier system (temperature: $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, moisture: $50\pm 5\%$) was feed by mixed with saline at firstly nursing.

On the microbiological test, pathogens free as *Pasteurella multocida* (bacteriology), *Bordetella bronchiseptica*(bacteriology), *Salmonella spp* (bacteriology), *Eimeria spp*(parasitology), *Ear/Body mange*(parasitology) of rabbit produced by hysterectomy and artificial nursing. In the current report, we introduce SPF rabbit by hysterectomy and artificial nursing in the operating vinyl isolator.

B. Invention of milking device and milking method in rabbit.

Milk from laboratory animals is used in studies of mammary tumor virus, commercial feed production, and neonatal nutrition. Several investigators have reported devices for collecting milk from mice, rats, hamsters and guinea pig. However, the use of these devices for collection milk is impractical because these devices are too small, they collect very small volumes of milk, and they are difficult for one person to use.

We have designed a device and method for milking a rabbit without pain, which can be adjusted to fit the nipple of a rabbit, and milk a large volume of milk during a short period. In addition, this devices is constructed easily, requires little physical exertion, and can be used by one person or by two people for simultaneous collection from both milk lines of one rabbit.

To milk a rabbit(New Zealand White), the mother was separated from her litters immediately after delivery and oxytocin(6.0IU/kg) was injected to stimulate the milk letdown. The rabbit is placed on a restraining board and its nipples are cleaned with 70% ethyl alcohol. The milk was suctioned into the collection bottle by 400mmHG of continuous vacuum. Milking continued for approximately 30 minutes at which time milk flow decreased.

We recorded the volume of milk collected from each rabbit during each milking period, successful or unsuccessful, on collection period. On two occasions before perfecting the milking technique, milk was contaminated by blood, these contaminated samples were not used in the study.

Using this milking device, we collected a volume of milk ranging from 15 to 140ml with a mean of 44.3ml during 30 minutes of the milking period per rabbit. Successful milking continued for an average of 20 days among the 45 rabbits, with a range of 14 to 33 days.

The device and milking procedures are tolerated well by rabbits, as evidenced by the good quality of milk obtained. The device is also easy to construct and requires little physical effort to operate.

C. Environmental and microbiological monitoring technique with the relating SOPs for SPF rabbits

For the cleanness of the breeding facilities and the health of SPF rabbits, our continuous effort, and the construction of environmental and microbiological monitoring are essential parts. For these, we must construct good laboratories and make the SOPs of environment and microbiology to the facilities. To make SOPs means to accomplish the mile stone of good monitoring system.

Part II

A. Cryopreservation of SPF rabbit sperm.

Glycerol is not an effective cryoprotectant for rabbit spermatozoar; therefore, rabbit spermatozoa were used as a model for developing cryopreservation

procedures for other cell types which also freeze poorly when glycerol is used as the cryoprotectant. The objectives of this research were to compare extenders for freezing rabbit spermatozoa, to study the effect of freezing on the acrosome, viability on cooling rates at which the temperature fell down to 25°C from 5°C and to test the possibility that an effect on the acrosome could alter the optimal time for insemination relative to expected ovulation time.

In experiment 1, viability of the post-thawed sperm increased at the rapid cooling rates, with cell membrane penetrating in egg-yolk cryoprotective ($p < 0.05$): on the hand, sperm viability was shown high at slow cooling rates, with cell membrane non-penetrating in egg-yolk cryoprotective ($p < 0.05$).

Rates of normal acrosome of post-thawed sperm were higher when methyl cellulose among cell membrane non-penetrating cryoprotectants was added to the extender than when cell membrane penetrating cryoprotectives was added to egg-yolk extender.

In experiment 2, viability of sperm was higher when both cell membrane penetrating and non-penetrating cryoprotectives were added to the extender containing egg-yolk than when cell membrane penetrating or non-penetrating cryoprotectants alone ($p < 0.05$) were added to extender.

In experiment 3, 30 does were inseminated with frozen-thawed semen 0 or 10h after being given an ovulating dose of a hCG. The percentage of does pregnancy with frozen-thawed semen inseminated at 0 and 10 h after hCG injection was 93.3 and 40. Litter size and the number of young born was greater ($P < 0.05$) at 0h than at 10h, which was the expected time of ovulation.

The results of this experiment showed that cooling rates should be modulated according to physiological characteristics of cryoprotectives; and a combination of cell membrane penetrating and non-penetrating cryoprotectives had more synergistic effects in preserving rabbit spermatozoa than penetrating of non-penetrating cryoprotectives alone was used. And if freezing did reduce the time required for capacitation, it was not detectable by these experiments.

B. Effects of age, litter size and sex on bodyweight of newborn rabbits

in SPF New Zealand White rabbits(Yac:NZW).

This studies have investigated changes of the bodyweight according to week, litter size and sex after birth of the newborn SPF New zealand White rabbit breeding in the barrier system.

In 26 liters containing 183 young(average liter size:7) there were 91(49.82%) male and 92(50.18) female. The eyes do not open until day 10 after birth. The young being to emerge from the nest at about 3 weeks of age and take some solid food.

The change of bodyweight according to weeks, at 6(1,138.8±28.0g) weeks old were 10 times compared with bodyweight at first week old(112.10±4.10) and every weeks grown about 200~300g (P<0.05).

The bodyweight were significantly higher in below 7 litter size than above 8 litter size on 4 to 11 weeks old after birth(P<0.05). The bodyweight on the sex were higher in the female than male(P<0.05). These data provide select weight and weeks old for use in toxicological research with SPF New Zealand White rabbit.

C. Environmental control system and disinfection programs

For the environmental control of clean rooms and isolators we made the SOPs of the environmental control. High quality filters (hepa filters) are equipped in every rooms to maintain the cleanness of facilities. Physical cleaning of airs and effective control programs of disinfection are also another important essentials for good breeding.

Air ventilation must be constructed within the consideration of the meaning of proper temperature, humidity, flow, cleanness. And blocking system from the pollution of deteriorated air do work smartly with regular change of air filters and consumptions and operating of related SOPs.

Part III

A. Cryopreservation of SPF rabbit embryos

As an innovative method for embryo cryopreservation, vitrification not only reduced the cooling stage duration to a minimum, but also eliminated any injuries caused by extra cellular ice, which is a major cause of cell injury. As a component of a vitrification solution, a permeating cryoprotective agent is essential, and additional inclusion of a macromolecular and a small saccharide makes the solution more effective.

This study was carried out to investigate the effect of vitrification(40% ethylene glycol, 18% Ficoll, 0.3M sucrose; EFS-40), non-step(10% ethylene glycol, EG) and step wise(10% glycerol, G) freezing methods on the post-thaw developmental ability of SPF rabbit morulae and blastocyst embryos. In vitrification, equilibrate all the solutions and instruments at 20°C. Connect a 1ml syringe and the straw with a silicone tube. By aspirating the syringe carefully, load 60mm 0.5M sucrose solution, 15mm air, 3.0mm EFS-40, 4mm air, and 13mm EFS-40, successively into the 0.25ml straw. Exposure of embryos to EFS-40 and loading into the straw: Pour approx 0.2ml of EFS-40 into a watch glass. Prepare two pipets: one aspirated with PBS solution, and the other with EFS-40. Under a dissecting microscope, pick up about 10 embryos at the tip of the pipet with PBS solution, suspended the embryos in the EFS-40 in the watch glass with a minimal volume of PBS solution for 2.0min. Aspirate the embryos into the other pipet containing EFS-40 and transfer the embryos to the part of the EFS-40 in the watch glass to wash glass in the solution. Pick up the embryos in the pipet and transfer them into the 13mm EFS-40 column in the straw. pour liquid nitrogen into a dew flask and float a styrofoam on the liquid nitrogen. Two minutes after exposure of he embryos to EFS-40, place the straw on the styrofoam to allow it to cool slowly in the liquid nitrogen vapor. Leave it for at least 3 min and then store the straw in the liquid nitrogen tank.

The post-thaw development rates to expanded blastocyst of rabbit morulae was not different among the vitrification(86.5%), non-step(86.9%) and step-wise(89.2%). From this result, it was indicated that this methods using EFS-40(vitrification), 10% ethylene glycol and 10% glycerol solutions will be of

practical use for reduced breeding cost and conservation of strains in SPF rabbit.

B. Physiological values of SPF rabbit of the ages

At the ages of 3, 9, 16 and 27 weeks we sacrificed the SPF rabbits and checked and calculated the values of organ weights ,serum biochemistry, microbiology and hematology. These values are the first data of SPF rabbits produced in Korea and will be a meaningful reference for the area of safety test and pharmacological toxicology test.

CONTENTS

Chapter 1.	Introduction	1
1.	Objective of the project	1
1-1.	Technical aspects	1
1-2.	Economical and Industrial aspects	2
1-3.	Social and cultural aspects	3
Chapter 2.	Current status of the related technology	4
Chapter 3.	Contents and results of studies	5
1.	Production of germ free rabbits and cleaning of barrier system	5
1-1.	Production of germ free rabbits	5
1-2.	Invention of milking device and milking method in rabbit	21
1-3.	Environmental and microbiological monitoring technique with the relating SOPs for SPF rabbits	26
2.	Cryopreservation of rabbit sperm and establishing of monitoring	39
2-1.	Cryopreservation of SPF rabbit sperm	39
2-2.	Effect of age, litter size and sex on bodyweight of newborn rabbits in SPF New zealand White rabbit (Yac:NZW)	49
2-3.	Environmental control system and disinfection programs	57
3.	Cryopreservation of rabbit embryos, framing of managerial regulation in the production system and physiological values of SPF rabbit	147
3-1.	Cryopreservation of rabbit embryos	147
3-2.	Framing of managerial regulation in the production system	157
3-3.	Physiological values of SPF rabbit of the ages	159
Chapter 4.	Reach the goal and contribution to related the divisions	171
Chapter 5.	Application of results	175
Chapter 6.	References	176

목 차

제 1 장 서론	1
제1절 연구개발의 필요성	1
1. 기술적 측면	1
2. 경제·산업적 측면	2
3. 사회·문화적 측면	3
제 2 장 국내외 기술개발현황	4
제 3 장 연구개발수행 내용과 결과	5
제1절 무균자토의 생산기술, 사육시설의 청정화	5
1. 토끼의 자궁적출기술의 확립과 인공포유기술의 개발	5
2. 모토유 착유기술 확립	21
3. 환경모니터링 및 미생물모니터링 기술 확립과 관련 SOP 제작	26
제2절 SPF 토끼 정액 동결보존과 각종 모니터링법 확립	39
1. SPF 토끼 정액동결 보존기술 확립	39
2. SPF 토끼의 증체속도 측정에 의한 유전모니터링	49
3. SPF 토끼의 사육시설과 SPF 토끼의 미생물 모니터링	57
제3절 SPF 토끼의 수정란 생산과 동결보존 기술의 확립, 월 350두 생산사육시설의 운영에 따른 지침서 작성 및 SPF 토끼의 생리적 특성에 대한 검토	147
1. SPF 토끼 수정란의 동결보존	147
2. 월 350두 생산사육시설의 운영에 따른 지침서 작성	157
3. Conventional 토끼와 SPF 토끼의 생리적 차이 분석	159
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	171
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	175
제 6 장 참고문헌	176

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

인류의 복지에 공헌하는 생명과학은 여러 해를 걸쳐 많은 실험동물들에 의해서 뒷받침이 되어왔다. 그래서 점점 고도화하는 과학의 물결은 더욱 다품종, 고품질의 실험동물을 필요로 하고 있다. Foster(1956)는 세계에서 처음으로 미생물이 조절된 실험동물의 근대적 생산 시스템을 만들기에 성공했다. 이것은 제왕절개에 의해서 얻어진 무균동물을 미생물이 조절된 barrier 시스템 속에서 동물 colony를 유지하는 것으로서 오늘날 세계적으로 실험동물의 생산기준으로서 알려져 있는 시스템이다. 국내에서는 1978년에 가축위생연구소에서 우량종돈 생산을 위한 돼지의 SPF(specific pathogene-free animal, 특정균 부재 동물)에 관한 연구를 시작하였으나, 당시의 미흡한 주변 여건에 의해 만족할 만한 결과는 얻지 못하였고, 1982년도부터 과기부 과제에 의한 안전성연구사업의 일환으로 무균 실험동물 개발에 착수하여 1985년도에 무균 rat를 생산할 수 있는 기술적 기반을 구축하게 되었다. 1986년부터 본격적으로 mouse, rat를 중심으로 한국화학연구소에서 실험동물의 생산과 계통유지사업에 착수하게 되었다. 그러나 생명공학 및 신약개발 목적에 따라 실험대상이 되는 동물종도 다르므로 다양한 종류의 SPF 실험동물이 barrier system에 의해서 생산 공급되어야 한다고 생각된다. 그러나 국내에서 생산되고 있는 SPF 실험동물은 mouse와 rat 뿐이다. 따라서 의학연구와 독성실험에 가장 다양하게 활용되며 두 번째로 많이 사용되는 토끼의 SPF화가 시급히 요청되며 그러기 위해서는 역시 SPF토끼의 생산기술 구축이 선행되어야 한다고 할 수 있다.

1997년 국내실험동물의 사용량을 일본에 비교하여 보고한 자료에 의하면, 토끼(SPF)의 사용량이 일본의 11%에 지나지 않는다. 따라서 국내 생명공학의 진보와 더불어 토끼를 포함한 SPF 중동물의 수요는 급증할 것이고, 이에 대비한 SPF 실험동물 생산기술의 축적이 시급하다. 국내에서 사용되고 있는 SPF토끼는 전량 수입에 의존하고 있는 실정으로 국내에서 생산되는 토끼는 미생물적으로 조절된 것은 전무하다. 한편 최근 동물을 이용한 연구에 기준은 점점 더 엄격하여지고 있으며 사용되는 동물의 계통과 환경의 조건을 만족하지 않는 동물을 사용한 경우, 실험결과를 인정하지 않고 있다. 즉 실험에 공시하는 동물의 조건에 따라 그 결과는 항상 변할 수 있기 때문일 것이다. 따라서 동물사육시설의 기준을 미국의 ILAR 등 실험동물 사육기준에서 규정하고 있는 조건에 맞추어 새로운 의약품, 동물약품, 농약 등을 개발하기 위한 양질의 SPF 토끼를 포함한 중동물의 생산시스템이 확립되

어야 한다.

무균동물의 생산기술에는 제왕질개 또는 자궁적출법을 얻은 새끼를 인공유로 포유시키고, 환경이 조절된 시설에서 육성, 번식, 계통유지 등이 포함된다. 현재까지 국내에서는 SPF 생산기술은 mouse나 rat와 같은 소형 설치류에서는 확립되어 있으나 아직 중동물인 토끼의 SPF화 한 보고는 없다. 따라서 미생물적으로 조절된 환경내에서 생산한 유전적으로 조절된 SPF토끼를 생산하기 위해서는 토끼의 인공유 개발, 토끼의 생리를 충분히 고려한 것에 기초한 환경조절을 위한 설비의 개발, SPF토끼 생산을 위한 각종 오염정도를 측정하기 위한 모니터링 기술의 개발 및 효율적인 번식과 계통의 유지를 위한 인공수정 또는 수정란 이식 기술의 개발이 절실히 요구된다.

2. 경제 · 산업적 측면

국내의 각 연구소에서 사용하고 있는 실험토끼는 사육환경조건이 조절되지 않은 일반 사육시설에서 사육된 것이 대부분이고, 아직은 SPF토끼를 이용한 실험은 극소수에 지나지 않으며, 그 공급은 수입에 의존하고 있는 실정이다.

일반농가에서 생산한 conventional 토끼를 실험에 공시하여 여러 가지의 처치를 하는 도중에 폐사되는 경우가 빈번하여 새롭게 동물을 구입하여 실험을 다시 해야 하는 등의 경제적, 시간적 손실이 매우 크다고 할 수 있다. 만약 실험이 성공하였다고 하여도 실험에 사용된 토끼의 유전적 및 미생물학적인 기술이 확립되어 있지 않으면 연속적인 실험의 결과가 일정치 않고 실험의 재현성과 신뢰성이 떨어지게 된다. 이러한 시행착오를 해결하기 위해서는 ILAR에서 준하고 있는 조건으로 토끼를 생산하여야만 한다. 따라서 이러한 기준에 준한 설비를 국내에 갖추어 무균 실험토끼를 생산한다면 수입대체효과가 기대될 뿐만 아니라, 동물의 수입과정에서 발생하는 각종 생리적 변화를 제어함으로써 실험결과의 재현성도 높아질 것으로 기대된다. 또한 영세성을 면치 못하고 있는 국내의 실험동물 생산설비 업체도 실험동물 사육시설의 발전을 위하여 활발한 투자와 기술개발에 힘쓸 것이다.

결과적으로 국내에서 개발된 우수한 barrier system에서 생산한 SPF토끼를 안정적으로 공급받아 원활한 생명공학 및 안전성 연구가 활발하게 진행될 것으로 생각된다. 더불어 국내 축산업이 새로운 방향으로의 발전할 수 있으며 축산업의 첨단기술화 및 의약산업, 생명공학, 정밀화학 산업과의 연계를 형성하는 계기가 될 것이

다.

3. 사회 · 문화적 측면

세계에는 실험동물의 복지에 관한 활동을 하는 단체가 다수 있으며, 그들의 비난과 주장도 천차만별하며 행동범위와 수단 또한 다양하다. 앞으로 이러한 국제적 활동이 국내에서도 각종 실험동물을 이용한 연구에 큰 영향을 미칠 것이다. 따라서 동물의 생명을 소중하게 다루고 무분별한 도살처분을 피해야만 하며, 연구에 필요한 수만큼의 동물만을 사용하여야만 한다. 이렇게 하기 위해서는 사용되는 동물의 질이 대단히 중요하다고 할 수 있으며, 사용하는 동물의 사육에 있어서도 동물복지를 충분히 고려한 환경에서 사육된 동물을 이용하면 이들의 비난이 조금은 감소될 것으로 생각된다.

따라서 양질의 동물생산이라는 점에서는 식용 단백질과 모피 생산을 위주로 하여 1차 산업으로 분류되어 왔던 개괄적 의미에서의 축산업의 목표와 다를 바 없지만 보다 부가가치가 높은 기술을 제공하고 서비스를 판매할 수 있다는 점에서 실험 동물생산 기술의 확립 및 기반 기술구축은 매우 새로운 의미를 갖는 축산업이 될 수 있다고 본다.

대부분의 실험동물의 사육장은 비위생적이며, 각종 질병에 고통을 겪고 있는 것이 국내 실험동물 사육장의 현실이다. 이러한 여건에서 생산된 실험동물은 각종 연구에서 기대할 수 있는 결과를 제공할 수 없을 뿐만 아니라 혐오감까지 주게 된다. 그러므로 미생물적으로 조절된 환경을 이용한 실험동물의 사육이 가능하게 되면 이러한 것 또한 감소될 것이다. 생명공학 및 신약개발을 위한 각종 동물실험에서 필요로 하는 실험동물은 다양하고 또한 그 양도 적지는 않다. 따라서 이러한 분야의 발전을 위해서는 동물의 사육에 앞서 다양한 동물의 무균적 작출과 환경 조절된 시설에서 생산할 수 있는 체계가 갖추어져야 한다고 생각된다. 이렇게 함으로서 생명공학을 이용한 새로운 제품들이 꾸준히 개발되어 인류복지에 공헌할 수 있게 될 것이며, 이는 희생된 실험동물에 대한 인간이 베풀 수 있는 최소한의 보답일 것이다. 또 대학의 축산학과가 실험동물의 생산기술을 축적한다는 것은 앞으로 축산학의 새로운 발전 방향을 모색하고 산업현장과의 유기적인 연대를 갖는 전문대학의 위상을 재정립할 수 있는 연구라고 할 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내

SPF동물의 국내생산은 1976년에 수의과학연구소가 돼지를 이용하여 처음으로 국내에 소개하였으나, 농가의 호응을 얻지 못하여 무의미한 결과에 그쳤으며, 국제 수준에 맞는 실험동물의 본격적인 생산체제는 1986년부터 생명공학연구소에서 mouse와 rat 중심으로 시작하여 오늘에 이르고 있다. 그러나 그 이후의 국내 SPF동물의 생산은 대부분이 소형 설치동물에 국한되어 사육이 이루어지고 있는 것이 사실이며, 또한 SPF동물의 사육시설에 관련된 기자재의 개발도 미흡한 상태에 있다. 한편 SPF동물종류도 mouse나 rat에 국한되어 있어, 생명공학의 연구에서 필요로 하는 각종 동물을 생산 공급하기에는 아직 그 기술이 미흡한 실정이다.

각종의 실험동물에 따라 요구되는 시설과 사육방법이 다르고, 특히 토끼는 털 빠짐이 심한 것에 따른 사육시설내의 오염이 해결되어야 하는 문제로 되어 있고, 이것이 결국 사육관련 청정시설의 유지방법에 가장 큰 장애로 되어있다. 또한 자궁적출술, 제왕절개술로 얻은 산자의 포유를 위한 인공유 개발도 mouse나 rat에 한정되어 있어 이 또한 개발되어야 할 과제이며, 사육중인 SPF토끼의 각종 미생물에 대한 오염도를 측정하는 monitoring 기술 확립과 효율적인 번식과 육종을 위한 인공수정 및 수정란 이식기술도 아직 토끼에서는 적용되고 있지 않다. 또한 GLP 인증 등을 위해서 각종 안전성시험에 사용되는 동물의 수준이 SPF 수준의 동물이 요구되므로 SPF 토끼의 생산기술 확립이 시급한 실정이다.

2. 국외

일본의 경우, FUNABASHI와 KITAYAMA LABES 회사에서는 1970년대 SPF 토끼를 확립하여 일본에서 토끼를 이용한 각종 신약개발과 약물 안전성 시험에 60% 이상을 SPF 토끼로 공급하고 있다. 또한 이러한 동물에 대한 기초 자료도 충분하게 확보하여 이들의 동물을 이용하여 연구를 하는 연구자들에게 효율적인 자료를 제공하고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 무균자토의 생산기술, 사육시설의 청정화

1. 토끼의 자궁적출기술 확립과 인공포유기술 개발

본 연구는 자궁절단술을 이용하여 무균적으로 적출한 자토를 인공포유, 육성하고 *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella spp*, *Eimeria spp*, *Ear/Body mange*에 대하여 미생물학적으로 free한 토끼를 생산하는 기술을 확립하고자 실시하였다.

실험동물, 특히 포유동물의 미생물학적 품질을 높이기 위한 방법으로서 제왕절개(Caesarsotomy)와 자궁절단술(Hysterectomy)이 있다. 제왕절개술은 대부분 대동물을, 자궁절단술은 주로 소동물을 대상으로 하는 기술이다. 어느 것이나 태자를 특별하게 조절한 환경(Isolator)에서 무균적으로 적출하여 인공포유 또는 대리포유로 육성하는 것이다. 이러한 기술은 실험동물의 품질개량을 위해서는 반드시 필요한 기술이며, 태자가 출산직전까지는 무균상태에 있다고 하는 원리에 의해서 만들어진다(中尾, 1994). 그러나 태반을 통과하는 병원체가 있으므로(上村, 1994 와 Kitoh 등 1998) 모축이 이러한 병원체에 오염이 되지 않았다는 전제이거나, 태자적출이 완료되고 태자를 감싸고 있던 자궁과 태반에 대한 미생물학적인 검사를 통하여 태자가 오염되지 않았음을 반드시 확인해야 한다. 이를 보완하는 설명으로서, 무균동물과 gnotobiot의 초기연구는 태반전체가 고성능 filter 역할을 한다는 사실이 밝혀지고 난 다음부터 가능하게 되었으며, 이러한 태반은 많은 기생충과 원충에 의한 감염과 동시에 세균성질환의 수직감염을 막을 수 있으므로 가능하다고 할 수 있으나, 어떤 종의 유충기의 선충류는 태반을 통과하는 것도 있으므로 작출한 무균동물과 gnotobiot에 대한 감염여부를 반드시 확인해야한다는 것도 설명하고 있다.

본 연구에서는 자궁절단술을 이용하여 무균적으로 적출한 자토를 인공포유하고, 육성하여 *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella spp*, *Eimeria spp*, *Ear/Body mange*에 대하여 미생물학적으로 free한 토끼를 생산하는 기술을 확립하였다.

자궁절단술에 사용할 토끼는 미경산의 New Zealand White 암컷을 자연교배시키고 임신 여부를 확인하였다. 자궁절단술의 예정일 2주일 전에 무균조작을 위한 수술용 isolator를 무균상태로 유지시키기 위해 과초산을 분무하고, 자궁절단술 1주일 전에 오염여부를 검사하였다. 임신 30일된 모토를 자궁절단술 당일의 오전 중에 실험실로 옮겨 안정을 시키고 모토소독과 적출한 자궁의 소독을 위한 0.2% 과초산액을 37℃로 가온하여 준비하였다. 한편 수술용 isolator의 자궁반입용 트랩 내에도 2.0% micro quat 용액을 채우고 전기히터를 이용하여 37℃로 유지시켰고,

isolator 바닥에는 온도조절이 가능한 가온판을 깔고, 백열전구를 설치하여 수술 isolator내부가 37°C가 되도록 하였다. 임신모토를 셀렉탈(바이엘) 3ml를 이징맥에 주사하여 깊은 진정을 유지하고 준비한 37°C의 과초산 용액중에 2-3분간 넣어 체표소독을 실시한 후, 모축을 고정판 위에 올려 사지를 고정하고 자궁절단술을 위한 청정실로 옮겼다. 수술용 가위로 자궁정중선을 따라 외피를 절개하고 이어서 복근을 무균적으로 절개하여 자궁을 노출시켰다. 노출된 자궁의 상태를 확인하고, 자궁경과 양쪽의 난관자궁접합부를 절단하기 전에 forcep를 이용하여 결찰하여 태아가 감염되지 않도록 하고 수술용 가위로 결찰한 부위를 절단하여 태자가 들어 있는 자궁을 멸균한 자루에 담아 37°C로 가온한 micro quat(2.0%) 용액중에 넣었다. Pass box로 연결된 수술실로 절단한 자궁이 들어있는 용기를 반입하고, 이어서 자궁이 들어있는 자루를 조심스럽게 수술용 isolator의 micro quat가 채워져 있는 트랩을 통하여 수술용 isolator 내부로 반입시켰다. 반입한 자궁을 가온판 위에 올려 자궁표면에 묻은 소독액을 멸균한 거즈로 제거하고 가위와 핀셋을 이용하여 조심스럽게 자궁을 절개하고 태자를 적출하였다. 적출한 태자의 태반을 절단하고 체표의 혈액을 거즈로 제거한 다음, 가온판 위에 올려 보온하였다. 자궁내의 모든 태자를 적출한 후, 태자를 거즈로 닦았으며 이 자극을 통하여 태자를 소생시켰다. 적출한 모든 태자의 소생을 확인하고 깔집을 10cm 두께로 넣어 멸균한 mouse용 plastic cage에 태자를 옮기고 cage를 37°C의 가온판에 올리고, 자궁과 태반의 오염여부를 판정하기 위한 모니터링을 미리 멸균하여 isolator내에 반입하여 준비한 면봉을 이용하여 스미어법으로 실시하였으며, 가온을 위해 점등하였던 백열전구를 소등하여 안정을 시키는 것으로 자궁절단술의 모든 과정을 완료하였다(Fig. 1-6).

자궁절단술이 완료되고 5시간 후에 저온살균하고(65°C, 30분) 200 mesh의 망으로 여과하여 준비한 토끼 젖을 37°C로 가온하여, 태자적출 후 3일까지는 초유, 4일부터 20일까지는 일반 젖, 21일부터 35일까지는 토끼 젖 50%와 산양유 50%를 혼합한 것을 1일 1회 신생토끼 체중의 10%에 해당하는 량을 수유하였다.

수유방법은, 생후 7일까지는 내경 0.5mm, 외경 1.52mm, 두께 0.5mm, 길이 10cm의 microbore tube(Tygon®)를 10ml의 주사기에 부착한 주사바늘과 연결하여(Fig. 7), tube를 직접 신생자토끼의 위내로 약 5-7cm 밀어 넣고 서서히 주사기의 피스톤을 눌러 젖을 밀어 넣었다(Fig. 8).

생후 8일부터는 4cm의 실리콘 튜브(내경 2mm, 외경 3mm) 끝에 작은 구멍(직경 0.1

mm 이하)을 만든 플라스틱을 삽입한 것(인공유두)을 내경 4mm의 실리콘 튜브에 연결하고, 반대쪽에 50ml의 주사기와 연결하여 세워 고정하였다(Fig. 9). 37℃로 가온한 젖을 주사기에 담고 한 손에는 인공 유두를, 다른 한 손으로는 신생자토를 고정하고 인공 유두를 자토의 구강내에 넣어주어 스스로 젖을 흡입하도록 하였다(Fig. 10).

생후 20일부터는 고압멸균(121℃, 15분)한 양배추를 자유롭게 채식하도록 하였으며(Fig. 11), 36일부터는 수유를 중단하고 양배추와 산양유로 반죽한 분말사료를 급이하고 생후 80일부터는 고행사료를 급이 하였다. 신생자토의 포유를 진행하는 동안 자토관리에 있어 2일 간격으로 멸균한 깔짚으로 더러워진 깔짚을 교환했으며, 청정실내의 소독을 micro quat(2.0%), 차아염소산 소다를 매일 교환하면서 멸균한 청소도구를 이용하여 청결을 유지하고 매주 1회 낙하균 검사와 스미어 검사로 청정상태를 점검하였다.

2000년 3월부터 실시한 1차 실험에서 101마리의 신생자토를 적출하여 그 중 35마리가 이유(생후 35일)에 성공하였으나, 생후 7-8주, 체중 2kg에 도달하였을 때에 원인불명의 급성설사로 다량의 흑갈색상 수양변을 배설하고 심한 탈수증세를 보이다가 발병 48시간 이내에 대부분이 폐사되고 최종 5(5.0%)마리만이 생존하였다.

2000년 10월부터 실시한 2차 실험에서는 147마리의 산자를 얻어 인공포유를 개시하였으나 1차 실험과 같은 원인으로 대부분의 산자가 폐사되고 7(4.8%)마리만이 생존하였다. 따라서 폐사의 원인을 규명하기 위해 해부하고 미생물 monitoring하여 배양을 실시하였다. 그 결과, 임상적으로 맹장과 대장에서 출혈병반이 확인되었지만 미생물 배양에서는 SPF 토끼에서 규정하는 미생물은 확인되지 않았다.

이와 같은 증상에 의한 폐사의 원인으로는 유효 미생물의 장내정착이 불완전하고, 대장균 등과 같은 세균이 장내에 분비하는 세균독소가 영향을 미친 것으로 생각된다고 1974년도에 토끼의 SPF화에 성공한 일본의 北山(KITAYAMA LABES) 주식회사(SPF 토끼생산 농장)에서는 조언을 하고 있어, 이를 해결하기 위한 방법을 강구하여 3차 실험을 실시하였다.



Fig 3. Open the abdomen at 30 days of pregnancy.



Fig 2. Amputation of uterus.



Fig 5. Put into micro quat solution for disinfection.



Fig 6 Uterus in operating isolator



Fig 7. Extracted fetal from uterus in operating isolator.



Fig 8. Rest in warm cage at 37°C



Fig 9 Nursing catheter for rabbit.



Fig 10. Nursing by microbore tube with syringe.



Fig. 11. Nursing catheter for rabbit(to 8 day after).



Fig. 12. Nursing by artificial nipple.



Fig. 13. Feeding the autoclaved cabbage

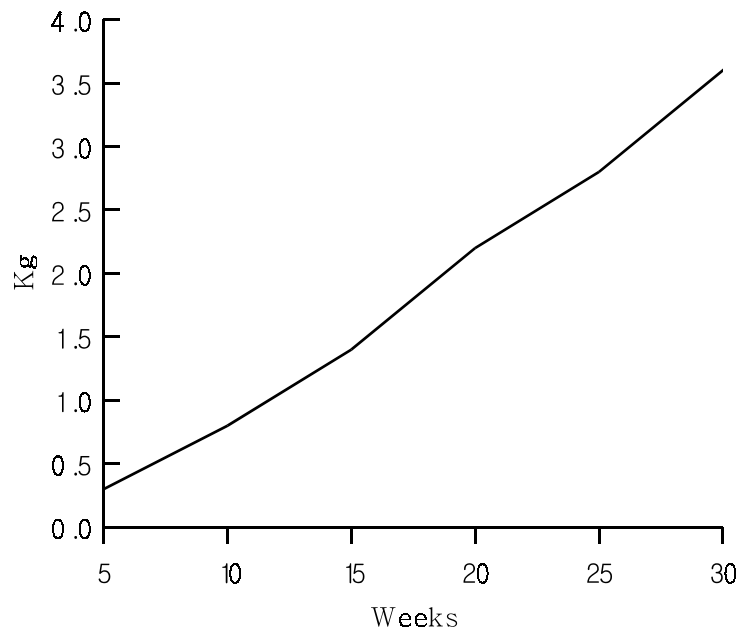


Fig. 12. Growth curve of rabbit produced by hysterectomy



Fig. 15. Newborn SPF Rabbit.

2001년 2월부터의 3차 실험에서는 작출한 신생토끼의 장내에 미생물을 접종하기 위해 처음 수유할 때 1차, 2차 실험에서 생존한 barrier 시설내(온도: 22±2℃, 습도: 50±10%)의 오줌과 털로 오염되지 않은 토끼 분을 젖으로 녹여서 인공포유를 개시하기 전에 먹였다. 이렇게 한 결과, 30마리의 신생토끼 중 14(46.7%)마리가 최종 생존하게 되었으며, 생존한 토끼의 체중을 매주 측정한 결과 Fig. 12와 같은 곡선으로 성장하는 것이 확인되었다.

2차 실험에서 최종 생존한 토끼에 대한 *Pasteurella multocida*(배양법), *Bordetella bronchiseptica*(배양법), *Salmonella spp*(배양법), *Eimeria spp*(현미경 검사)의 감염여부를 실시한 결과 모두 음성으로 나타나서 국내에서 처음으로 특정한 미생물에 대하여 free한 토끼가 확립되었으며, 확립된 모축을 이용하여 미생물적으로 조절된 양질의 SPF 토끼의 생산기반을 구축할 수 있게 되었다. 1, 2차 실험에서 생존한 토끼를 이용하여 자연교배를 시켜서 2001년 7월에 최초의 SPF 토끼의 산자를 얻게 되었다(Fig. 13).

2. 모토유 착유기술 확립

무균 동물 또는 특정균부재 동물을 만들기 위해 분만직전 모체의 자궁에서 꺼내어진 신생동물을 대리모 동물을 이용하거나 대리모가 없을 때는 인공포유를 통해 무균환경 하에서 양육하여야 한다. 그러나 현재 본 연구에서 목적으로 하는 SPF 토끼의 작출에 있어서는 반드시 인공유를 이용한 인공포유만이 가능하므로 인공유를 제조하기 위한 토끼 젖을 확보하는 것이 우선되어야 한다. 이를 위한 토끼 젖의 확보를 위해 직접 토끼의 유두를 통해 토끼에게 고통을 주지 않고 신속하게 젖을 착유할 수 있는 도구의 개발과 기술 확보를 위해 실험을 실시하였다. 또한 실험동물에서 젖을 착유하는 기술을 이용하여 유선암 바이러스(Nagasawa, 1979) 사료생산(Jenness 와 Sloan, 1970), 신생아 영양의 연구(Shum 등, 1989)등에 응용되고 있으며, 몇몇 연구자들에 의해, 마우스, 랫트, 기니아 피그(McBurney 등, 1967)에서 착유를 위한 도구가 개발되어 보고 되어 있다. 그러나 이러한 도구들은 토끼에 이용하기에는 너무 적어 비현실적이며 또한 착유과정이 번잡하다는 것이 해결되어야 하는 문제점으로 남아있다. 그리고 토끼의 착유법(Marcus 등, 1990)에 관한 보고에 있어서도 착유시 매회 진정제를 주사하는 방법을 택하고 있어 자연 상태의 착유와는 다르다고 할 수 있다.



Fig. 16. Device for milking rabbit.

따라서 본 연구실에서는 특정균 부재(specific pathogene free, SPF) 토끼를 확립하기 위해 제왕절개를 하여 얻어진 신생자토의 인공포유를 위해 요구되는 토끼 젖을 대량으로 확보하기 위해서 모토에게 stress가 적으며, 연속적이고 장기적으로 착유할 수 있고, 또한 간편하면서도 적은 노동력으로도 토끼로부터 착유가 가능한 도구의 고안과 착유방법을 확립하게 되었다.

고안된 착유기는 Fig. 14에서 보는 바와 같이 크게 진공펌프와 착유병으로 되어 있으며, 진공펌프는 소형의 음압용(Rocket medical, England) 펌프를 사용하였으며, 젖을 모으는 병은 100ml의 유리병으로 뚜껑에 실리콘 튜브를 연결할 수 있는 연결관을 두 개 설치하여, 하나는 착유병내의 진공을 형성하기 위해 진공펌프에 연결하고 다른 하나는 젖을 모으기 위해 유두에 밀착시키도록 하였다. 유두에 밀착시키는 튜브의 끝부분은 토끼 유두의 굽기에 맞추어 교체할 수 있도록 준비하였으며, 젖을 모으는 착유병과 실리콘 튜브 등은 사용직전 고압 멸균하여 사용하였다.

착유는 분만한 모토(New Zealand White)로부터 분만 당일에 자토를 분리하고 oxytocin(6.0 IU/kg)을 피하주사(Marcus 등, 1990)하여 유즙분비를 자극시키고, 착유관을 70% ethyl alcohol로 소독하여 준비한 다음, oxytocin 주사후 20분에 토끼를 복위로 하여 보정하고, 착유관을 유두에 끼워 보정하고 다른 한손으로는 유두기저부를 마사지하면서 음압펌프를 작동하여 약 30분간 착유를 하였다. 이 때에 진공펌프의 음압은 400mmHG이 유지되도록 하였으며, 유두의 모세혈관이 파열되어 혈액이 혼입되지 않도록 진공압을 조절하면서 착유를 하였다.

착유실험에 사용된 토끼는 45마리로, 분만 후 1일부터 시작하여 평균 20일간 착유하였으며, 두 당 착유기간에 따른 착유량과 유량변화는 Table 1과 Fig 15에서 보는 바와 같았다.

고안한 착유기를 이용하여 1회에 착유할 수 있는 젖의 양은 마리 당 15-140ml로 평균 44.3ml이었으며, 착유가 가능한 기간은 분만후 17-33일로서 평균 20일 이었다. 이러한 결과는 Marcus 등(1990)이 보고한 43.5ml의 평균 착유량은 비슷하였으나, 14일간의 착유기간에 비하여 본 착유방법이 1주일이상 길었다.

이상의 결과를 종합해보면, 본 착유기는 간단한 구조로 되어있으며, 모토에 대한 스트레스가 적어 분만 후 1개월 이상 매일 착유가 가능하여 토끼 젖 착유기로 적합한 것으로 판단되었다.

Table. 1 Volumes of milk collected during the 17 to 33-day study from 45

rabbits using our milking device.

No.	Volumes(ml)/ milking period(day)	No.	Volumes(ml)/ milking period(day)	No.	Volumes(ml)/ milking period(day)
1	1,039/17	16	881.6/23	31	1,179.9/23
2	429/14	17	1,003.7/27	32	1,304.1/27
3	1,261.9/33	18	574.6/17	33	499.8/17
4	938/21	19	1,349/31	34	1,360.1/31
5	494/14	20	1,063.2/24	35	1,082.4/24
6	645/23	21	622.9/19	36	917.7/19
7	769.5/19	22	1,460/30	37	1,329/30
8	845/26	23	1,144/22	38	1,058.2/22
9	1,475.1/33	24	1,077.3/27	39	1,204.2/27
10	1,158/25	25	456/16	40	398.4/16
11	1,212.3/27	26	1,137.6/26	41	1,235/26
12	1,457/28	27	974.6/22	42	987.8/22
13	800.8/28	28	808.2/18	43	792/18
14	312.6/15	29	1,076.4/23	44	1,173/23
15	1,137.8/24	30	1,217.7/27	45	1,339.2/27

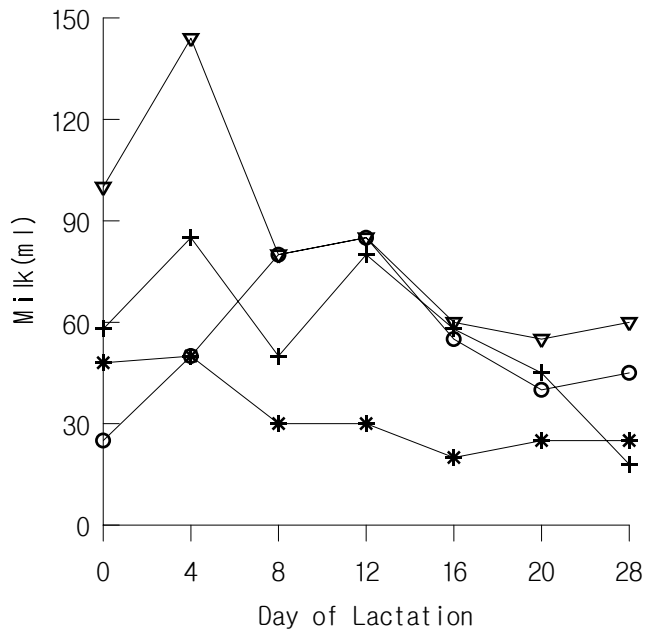


Fig. 15. Representative volumes of milk collected during the 28-day study from four of 45 rabbits using our milking device. Symbols represent four different rabbits.

3. 환경모니터링 및 미생물 모니터링 기술 확립과 관련 SOP 제작

가. 사육조건에 따른 미생물 오염 측정

1) 사육중인 Clean room과 Isolator의 오염정도의 측정

가) 동물실의 환경제어 지침서 제작

Clean room 이란 무균실, 청정작업실, 무진실 등을 호칭하며, 고성능 filter를 사용해 공기중의 먼지나 미생물을 제어하여 실내의 환경을 오염으로부터 안전하게 유지하고, 또한 청정도를 유지하기 위해 적극적으로 노력하는 공간이라고 할 수 있다. 따라서 감염경로 및 감염원을 줄이기 위한 대책으로서 기계적 공기정화와 진공 청소기와 소독수를 이용한 청소 등이 실시되지만 무엇보다도 오염의 정도를 측정할 수 있는 program과 지침이 필요하다. 특히 여기서는 Clean room과 Isolator의 SPF토끼의 사육이 오염도에 미치는 영향을 비교하여 각각의 시설에서 주의할 부분을 정립하여 효율적인 유지방법을 확립하여야 할 것이다. 이를 위해 동물실의 운영을 위한 환경제어 SOP를 각 항목별로 제작하여 운영 지침서로 하였다.

A. 동물실의 환경제어 SOP

1. 목적

본 SOP는 동물실의 환경제어의 실시방법, 유지관리 등에 관하여 구체적으로 정한 것으로 사육환경을 일정하게 하고 청정도를 유지하기 위하여 제정한다.

2. 해당구역

- 1) 토끼 사육실
- 2) 토끼 분만실

3. 환경제어에 관한 설정치의 의뢰, 승인, 변경

3.1. 의뢰

동물실의 환경제어에 대하여 변경요인이 발생하였을 경우 해당구역 동물관리책임자가 환경제어(신규, 변경) 의뢰서에 희망 설정치를 기입하고 운영책임자에게 제출한다.

3.2. 승인

운영책임자는 운영 위원회에서 협의하여 그 설정치를 승인한다. 동물관리책임자는 환경제어(신규, 변경) 승인서에 필요사항을 기입한 후 설비관리책임자 및 운영책임자에게 1부씩 제출한

다.

4. 설정치 및 제어법

4.1. 온도

1) 설정치 : 아래와 같이 정한다.

구역	설정치	허용한계치
토끼 사육실	23±3℃	상한 26℃, 하한 20℃
토끼 분만실	23±3℃	상한 26℃, 하한 20℃

2) 제어법

공조기에 집어넣은 신선공기는 공조기의 제어기에 의해 가온감온시켜 설정온도를 조정한다. 경보 설정치의 상한하한을 이탈하였을 때는 관리실 제어시스템의 경보 벨이 울린다. 설비관리 책임자는 즉시 적절한 조치를 실시하여 설정치 내로 복원시킨다.

4.2. 습도

1) 설정치 : 아래와 같이 정한다.

구역	설정치	허용한계치
토끼 사육실	50±10%	상한 60%, 하한 40%
토끼 분만실	50±10%	상한 60%, 하한 40%

2) 제어법

공조기에 집어넣은 신선공기는 공조기내의 제어기에 의해 가습/제습시켜 설정한 습도로 조정한다. 이하 4.1.2 항의 제어법에 기준한다.

4.3. 환기횟수

1) 설정치 : 아래와 같이 정한다.

구역	설정치
전동 동물실	10회/시~20/시

2) 제어법

공조기에 집어넣은 신선공기는 송풍다트 송풍조절 댐퍼를 통하여 동물실에 송풍된다. 환기횟수(풍량)의 증감을 할 필요가 생겼을 때는 송풍 조절 댐퍼 및 동물실의 댐퍼의 개폐조작에 의해 조절한다.

4.4. 실내차압

1) 설정치 : 아래와 같이 동물실과 (전,후실) 청정복도 압력의 차이를 정한다.

구역	기준치	허용한계치
토끼 사육실	(동물실압)-(전실압) = 2~3 mmH ₂ O	1~6 mmH ₂ O
토끼 분만실	(동물실압)-(청정로압) = 2~3 mmH ₂ O	1~6 mmH ₂ O

(2) 제어법 : 실내압의 제어법은 4.3.2항에 기준한다.

4.5. 취기

- 1) 설정치 : 전 동물실 암모니아가스 농도 20 ppm 이하로 정한다.
- 2) 제어법 : 분뇨의 제거, 사육상자 교환 또는 동물사육 마리수를 변경한다.

4.6. 조명

- 1) 설정치 : 전 동물실 150~300 Lux로 정한다.
- 2) 조명시간 : 6시~18시 (12시간)
- 3) 제어법 : 불량형광등의 교체, timer의 조절을 통하여 제어한다.

4.7. 소음

- 1) 전동 동물실 60 phone 이하
- 2) 제어법 : 공조 흡출구, 배기구 닥트 등의 느슨함, 진동, 기타 발생원인을 조사하고 설정이하로 되도록 한다.

5. 낙하세균의 검사

세균학적 사육환경을 낙하균의 정기검사에 관한 SOP에 의해 검사한다.

6. 청정도

- 1) 설정치 : 동물을 사육하고 있지 않은 조건에서 barrier 구역내 SPF 동물실의 공기청정도를 클래스 10,000 이하로 한다.
- 2) 제어법 : 공조계통을 중심으로 한 하드, 소프트의 양면의 철저한 관리로 한계치 이하로 한다.

7. 일상점검

각 동물실 각각의 설정치를 유지관리하기 위해 설비관리책임자 및 동물관리책임자는 다음에 관해서 일상점검을 한다.

7.1. 설비관리책임자

- 1) 점검기록표에 따라 각 항목별로 1회/일 공조실과 기계실을 순회점검을 하고 동 기록표에 점검결과를 기록한다. 특기사항 난에는 그 날의 필요사항을 기입한다.

- 2) 동물실 온습도 측정기록에 관해서는 24회 이상/일로 자동 기록한 것을 점검한다.
- 3) 공조기 등의 각종 환경관련기록은 컴퓨터 출력기록지로 자동 기록된 것을 점검한다.
- 4) 운전 관리기기의 운전상황을 파악하고 정상적으로 작동하도록 유지 관리하고 일상의 업무 및 환경관련 이상사태에 관한 모든 기록을 업무일지에 기록한다.

8. 필터의 교환

1) HEPA 필터의 교환은 설비관리책임자가 동물관리책임자에게 교환시기가 된 것을 알리면 동물관리책임자는 필터 교환의뢰서를 작성하여 설비관리책임자에게 송부한다. 단, 급기용 프리휠터 및 메디움 필터의 교환은 설비관리책임자의 판단에서 실시한다.

2) 동물실내의 배기 필터의 세정 교환은 청소, 소독에 관한 SOP에 따라 정기적으로 세정 또는 교환한다.

3) 실외에 설치되어있는 각동의 각종 배기 필터는 손상, 변형이 인정된 시점에서 설비관리책임자와 동물관리책임자가 협의하여 교환한다.

4) 떼어낸 낡은 필터는 분진 등의 비산을 방지하기 위해 떼어낸 후 즉시 비닐봉투 등에 넣어 소정의 장소에 정리 정돈하여 처리한다.

9. 환경측정시의 정기점검 방법

각 동물실의 환경측정 (온도, 습도, 환기횟수, 실내압, 취기, 조도, 소음 등)은 기준 측정기 의해 설비 관리책임자 및 동물관리책임자의 책임아래 3개월에 1회(분기별 1회)정기점검을 한다. 또 낙하균에 대해서는 연 2회 (2월, 8월)실시하되, 낙하균의 정기검사에 관한 SOP 에 따라 검사한다.

9.1. 의뢰

동물관리책임자는 사육시설의 환경측정 의뢰서를 작성하여 설비관리책임자에게 의뢰한다.

9.2. 계획

설비관리책임자는 사육시설의 환경측정 의뢰서에 의해 연간 구체적인 실시일정을 정하고 동물실의 환경측정예정표를 작성하여 동물관리책임자에게 송부한다.

9.3. 점검준비

설비관리책임자는 점검실시 2일전에 측정기기, 사육환경측정 기록표 및 필요공구의 동물실로 반입을 동물관리책임자에게 의뢰하고 환경측정책임자에게 준비를 의뢰한다.

9.4. 점검방법

점검은 설비관리책임자와 환경측정담당자가 함께 사육구역에 입실하여 실시한다.

1) 온도, 습도

각 동물실내에 설치되어있는 감지기 부착점 앞 30cm내에서 전자식 온습도계를 가지고 취급 방법에 따라 온습도를 측정함과 동시에 시설과 관리실의 기록치와 비교한다. 사육환경 측정표에 전자식 온습도계의 측정치를 기록하고 관리과 기록지와 대조 확인한다.

2) 환기횟수

동물실내의 흡기구, 배기구의 각각에 있어서 풍속계를 가지고 취급방법에 따라 풍속을 측정하여 사육환경 측정기록표에 기록한다.

[흡출면적 $m^2 \times$ 풍속 $m/s \times 3600 \text{ sec}$]의 계산식에 의해 흡출총량을 산출하고 그 동물실의 체적으로 나눈 값이 환기회수치이다(단위 회/시).

3) 실내압

동물실외에 설치되어있는 나노메타 게이지의치를 읽고 사육환경 측정기록표에 기록한다.

4) 취기

각 동물실내 사육상자에서 가장 가까운 배기구 1~2cm 앞에서 가스 점검기를 가지고 측정후 사육환경 측정기록표에 기록한다.

5) 조도

각 동물실의 바닥으로부터 85cm의 높이에서 조도계를 가지고 취급방법에 따라 측정하고 사육환경 측정기록표에 기록한다.

6) 소음 및 진동

동물실내 흡기구 바로 아래, 바닥으로부터 85cm의 높이에서 정밀소음계를 가지고 취급 방법에 따라 측정하고 사육환경 측정기록표에 기록한다. 진동은 일상의 동물관리자가 사육기 등에 진동을 발견하였을 경우는 즉시 지정업자 등에 의해 방진조치를 강구한다.

7) 분진

동물실내 중앙면적 부분의 지상 1m 높이에서 분진측정기를 가지고 취급 방법에 따라 측정하고, 사육환경 측정기록표에 기록한다.

8) 기타 설비

동물사육구역내의 조명장치, 급수장치, 건물의 상태 등을 점검하여 이상이 있거나 안전위생에 위험한 요인, 환경에 변화를 주는 요인 등의 유무를 점검하고 기록한다.

9.5. 정기점검후의 처치

1) 설비관리책임자는 각 동물실에서 각 항목별로 측정기록 한 사육환경 측정기록표를 중앙 감시반으로 가지고와 각각의 설정치를 유지하고 있는지 판단하고 부적합의 경우는 신속히 설정기준치에 적합하도록 개선조치를 한다.

2) 설비관리책임자는 각 측정결과표를 기준으로 정기 환경측정성적종합 보고서를 작성하고 날인 후 그 사본을 동물관리책임자에게 송부하고 중대한 이상이 발생한 경우에 운영책임자에게 보고한다.

10. 이상치

10.1. 온도

아래와 같이 정한다.

구역	기준치
토끼 사육실 토끼 분만실	허용한계치인 상한 26°C를 넘거나 하한 20°C가 되지 않는 상태가 2시간 이상 지속되었을 때

10.2. 습도

아래와 같이 정한다.

구역	기준치
토끼 사육실 토끼 분만실	허용한계치 상한 60%를 넘고, 하한 40% 미만을 각각 3시간 이상을 계속하였을 때 허용한계치 상한 70%를 넘거나 하한 40%가 되지 않는 상태가 3시간 이상 지속되었을 때

10.3. 환기회수

각 동물실 하한 10회/시 미만이나, 상한 20회/시 을 넘었을 때로 정한다.

10.4. 실내압

실내압 : 각동의 설정치를 벗어났을 때

10.5. 취기

암모니아 농도 : 20 ppm을 넘었을 때로 정한다.

10.6. 조도

조도 : 150 Lux 미만이거나, 300 Lux 을 넘었을 때로 정한다.

10.7. 소음진동

소음 : 60 phone을 넘었을 때로 정한다.

진동 : 기차재나 사육기 등에서 진동이 발생하였을 때로 정한다.

10.8. 분진

Class 10,000(동물을 수용하지 않은 상태에서)을 넘었을 때

11. 이상의 처치

온도, 습도, 환기회수, 실내압, 취기, 조명, 소음, 진동 등에 10항의 이상이 생겼을 경우 즉시 해당되는 관련 기기 등의 점검처치를 실시하고 신속히 정상복귀 시킨다. 이상치가 규정시간 이상 계속 되었다고 판단하였을 때는 동물관리책임자 및 운영책임자에게 경과설명하고 필요 처치를 강구한다.

12. 이상의 보고

이상치가 규정시간을 넘었을 경우는 이상사태에 관한 기록지에 필요사항을 기입하고 설비 관리책임 자가 날인하여 그 사본을 동물관리책임자에게 송부하면 동물관리책임자는 운영책임 자에게 이 사실을 통보한다.

13. 일반적 주의사항

1) 설비관리책임자는 아래의 사항을 실시한다.

(1) 공조기 등의 돌발수리, 점검정비 등의 발생이 생기고 10분 이상의 운전정지 할 때는 업무 일지에 모든 기록을 남긴다. 다만 사전에 2시간 이상의 운전정지를 실시할 경우는 3일 이상 전에 공조정지(연락)서에 각각 필요사항을 기입하고 동물관리책임자에게 송부한다.

(2) 공조기, 기타 본 SOP 에 관계되는 설비기기에서 고장수리를 하였을 때는 감시반 업무일지에 그 내용을 기록한다. 다만 외부인이 내사하여 수리하는 고장에 대하여는 고장수리 기록지를 기록한다.

(3) 전력공사 측의 돌발정전(순간포함) 및 기타 사고에 의해 정전이 발생하였을 때는 모든 내용을 감시반 업무일지에 기록한다. 그리고 사전에 알고 있는 2시간 이상의 변전설비의 정기점검 및 전기공사시는 정전(연락)서에 각각 필요사항을 기입하고 동물관리책임자에게 송부한다.

2) 환경측정기기는 유효기간 내의 것을 사용한다.

14. 보관기록

1) 설비관리책임자는 아래의 자료를 보관고의 서류철에 새 것이 위가 되도록 정리보관 한다.

(1) 환경제어(신규, 변경) 의뢰서

(2) 환경제어(신규, 변경) 승인서

(3) 사육시설의 환경측정 의뢰서

(4) 환경측정예정표

- (5) 사육환경측정 기록지
- (6) 측정결과지
- (7) 정기 환경측정성적 종합보고서
- (8) 공조정지(연락, 기록)서
- (9) 고장 수리 기록지
- (10) 이상사태에 관한 기록지
- (11) 정전(연락, 기록)서
- (12) 휠타 교환의뢰서
- (13) 동물실 온습도 자동 측정기록
- (14) 분진측정 인자테이프 부착지

B. 사육조건에 따른 공조관련 소모품의 교체시기 결정

공기조화란 동물이 안락함을 느끼기 위해서는 온도, 습도, 공기유속, 청결도라는 네 가지의 요소가 적정하게 유지되어야 한다. 즉 공기조화란 인공적으로 실내 공기의 온도, 습도, 기류, 청결도를 인체 혹은 물품에 가장 적합한 상태로 유지시켜주는 것을 말한다. 아울러 음향과 진동까지 고려하는 것이 현대의 공기조화 개념이다.

보통 SPF 동물 사육실은 HEPA filter를 통과한 무균청정공기가 항상 공급되어 사육실내부가 양압으로 유지되어서 외부로부터 오염된 공기가 차단될 수 있도록 시공된 시설이다. 일정한 사용기한이 지나면 공조관련 소모품의 교체가 필요하다. 특히 필터교환에 관한 지침서를 만드는 것이 중요하다.

1. 필터교환에 관한 지침서제작

- 공조기(Air Handling Unit) SOP

1. 형식

2. 제조회사명: 엠제이엘티디

1) 본사 및 공장 : 02-869-5253

2) 관리책임자

정	홍길동
부	이길동

3. 사용전원 : 3 상 220 V 60Hz
4. 규격 : 20RT 3 system
5. 크기 : 7750 × 1900 × 3150
6. 난방열량 : 200,000 kcal/hr
7. 냉방열량 : 168,000 kcal/hr
8. 지시유량 : 442 L/min
9. 제작연도 : 2001년도
10. 제조번호 : AHU - 202 : 1 호기, AHU - 203 : 2 호기
11. 풍량 : 540CMM
12. 전면풍속 : 7.87 m/sec
13. 송풍기 정압 : 110 mmAQ
14. 송풍기 회전수 : 1150 rpm
15. 풍속: 7.8 m/sec
16. COOLING CAP : 168,000 kcal/hr, CHILLER WATER : 7°C~12°C
17. COOLING COIL : 6 ROW 18 PASS 1600 L 2 STAGE
18. HEATING CAP : 43,300 kcal/hr 2kg/cm²
19. HEATING COIL : 2 ROW 18 PASS 1600 L 2 STAGE
20. HUMIDIFIER : 36 kg/hr 2kg/cm
21. ISOLATOR : YSC - 200 : 1EA, FIX : 2EA, MOVE : 2EA
22. PULLEY : MOTOR : C#2P(8.6"Φ), FAN : C#2P(13"Φ)
23. 3 상 유도 전동기
 - 1) 형식 : TBTE
 - 2) 용량 : 15 HP(11kW)
 - 3) 회전수 : 1750 rpm
 - 4) 전압 : 220 V
 - 5) 주파수 : 60 Hz
 - 6) 공칭효율 : 85.5 %
 - 7) 베어링 번호 앞 : # 6207, 뒤 : # 6309
 - 8) 전류 : 38.2/22.1 A
 - 9) 과부하율 : 1.6
 - 10) 절연계급 : B

- 11) 정격 : 연속
- 12) 중량 : 108 kg
- 13) 주위온도 : 40°C
- 14) 극수 : 4P
- 15) 기동계급 : G
- 16) 회전자 구조 : K2

24. 공조기의 운전

1) 운전준비

- (1) HEATING COIL DRAIN 밸브 내에 고인 물을 DRAIN
- (2) 보일러의 스팀라인 및 냉동기 냉수라인에 스팀 및 냉수가 공급되는지를 확인한다.
- (3) 사무실 FAN 셀렉타 스위치가 가동시키는 공조기에 셋팅 되었는지를 확인
- (4) 기계실 LOCAL 판넬에 습도 콘트롤러 JPF 및 CV 용 AF-130 이 원하는 온도에 setting 되었는지를 확인
- (5) 스팀라인 (HEATING 라인, 가습라인) 과 온수라인(가습탱크 수위라인) 수동 손잡이 밸브를 개도

2) 운전개시

- (1) 공조기를 ON
- (2) 공조기 ON 상태를 아난시에이터 램프 점등을 확인
- (3) 공조기를 ON
사무실 FAN 마그네트를 ON (이때 셀렉타 스위치의 위치는 HAND)
- (4) 사무실 FAN ON 상태를 아난시에이터 램프 점등을 확인

3) 운전중지

- (1) 공조기를 OFF
- (2) 공조기 OFF 상태를 아난시에이터 램프소등을 확인
- (3) 댐퍼가 조정 되었는지를(CLOSE)점검

25. 작업기록지

- 1) 공조기 점검일지

종류	항 목 / 날 짜	
일 일 점 점	1. 댐퍼 작동상태	
	2. 코일부분의 액셈터	
	3. 사무실 FAN 셀렉터 위치	
	4. 습도 컨트롤러 위치 확인	
	5. AF 130 CV 셋팅	
	6. Coil의 증기압 정상유지	
	7. 송풍기의 회전방향여부	
	8. 기계적인 정상상태	
	9. 가습 탱크 Level 여부	
	10. 송풍기의 운전전류	
	11. 에어콕, 드레인 밸브이상 유무	
	12. 수동손잡이 밸브의 개폐여부	
	13. V벨트 상태	
	14. FAN Shaft 상태	
	15. 카플링 접속상태	
3 개 월 점 점	1. Coil AL-FIN 세척	
	2. Pre Filter 세척	
	3. Motor 구리스 주입	
	4. Coil Cu Tube 관내청소	
비 고		

26. 고장수리 및 조치

고 장	원인 및 검사할 내용	조 치
1. 공기량이 적게 나올 때	1) AIR FILTER 의 막힘	털어낸다
2. 운전전류가 커질 때	2) COIL AL-PIN 의 막힘	깨끗이 세척한다
	3) DAMPER 의 막힘 및 파손	DAMPER 조정 및 수리
3. 열량이 적게 나올 때	1) COIL 의 파손 및 AL-PIN 의 막힘	파손부분을 수리
	2) COIL IN & OUT LET LINE 막힘	막힘 부분을 세척 LINE 점검 및 세척
4. FAN-PART CASING 진동	1) COUPLING 볼트 풀림	볼트 너트를 조여준다
	2) FAN BOSS 에 LOOK NUT 풀림	NUT를 조여준다
	3) SHAFT에 마모	교체한다
	4) V-BELT 가 늘어남	V-BELT를 교체한다
5. AIR COOK 및 DRIAN 이 작동 안될 때	1) 분순물에 의해 CU-TUBE가 막혔을 때	분해청소
	2) COIL에 수평이 안 맞을 때	수평 수정한다
6. Coupling에 열이 많이 생길 때	1) 결속이 불량할 때	Motor의 감속기의 고정 볼트를 확인하고 정확 하게 Shaft를 재결합한다
	2) coupling에 결점이 있을 때	Motor의 감속기와 Bearing이 마모되지 않 았나 확인하고 교환한다
	3) coupling의 clearancs 가 부적당할 때	
	4) bearing에 결함이 있을 때	
7. Shaft 진동이 생길 때	1) 불균형 Shaft 때문에 결속불량 발생	필요하면 coupling 혹은 Shaft를 교환, coupling 결속을 검사 수리
	2) coupling 이 손상 되었을 때	
	3) Bearing 의 마모 혹은 Motor pulley가 파손 되었을 때	

27. 소모자재 : 공조기 FAN V 벨트 : 동일 V 벨트 C TYPE 110~2794, 교환횟수 : 년 2 회

28. 공조기 부대설비

1) 외기 예열기(외기 - 예열기 - 전열교환기)

(1) 형식 : 논후리징 증기가열 코일

(2) 가열용량 : 58,090 [kcal/hr]

(3) 풍량 : 19,900 C.M.H

(4) 전연면적 : 2.2m²

(5) 열수 : 2 ROW

2) FILTER BOX(공조기 - FILTER BOX)

- (1) 고성능 휠타 크기 × 수량 : 762 × 610 × 292 , 1개
- (2) 풍량 (C.M.M) : 540
- (3) 재가열 코일 열량 kcal/hr : 1555(코일규격 - 400L × 385h × 2Row)
- (4) 열수 : 1[ROW]
- (5) 수량 : 6
- (6) 성능 : DOP 0.3μ 99.97 %
- (7) 풍량 : 18 C.M.M
- (8) 초기 압력 손실 : 25.4 mmAQ
- (9) 최종 압력 손실 : 50.8 mmAQ

2) FREE FILTER

- (1) 크기 : 610 × 610 × 18 × 9EA
- (2) 노재 면적 : 표시 크기
- (3) 초기 압력 손실 : 3.8 mmAQ
- (4) 최종 압력 손실 : 15 mmAQ
- (5) 중량법 : 95 %
- (6) 급, 배기 송풍기

명 칭	형 식	풍 량	정 압	용 량
공조기 급기 송풍기	에어호일 양흡입	332	110	15

제 2 절 SPF 토끼 정액동결 보존과 각종 모니터링법 확립

1. SPF 토끼 정액동결 보존 기술 확립

동물이 지니고 있는 유전능력의 사용빈도를 넓힐 수 있는 방법 중에 하나가 수컷의 수정기회를 넓히는 것이다. 또한 정액을 보존하는 방법에 따라서 정액의 보존성이 다르게 되며 현재 일반적으로 이용하는 방법은 동결보존법이라 할 수 있다. 그러나 동물종에 따라 사정의 방법이 다르고 그 정액의 성상 및 정자의 세포생리학적 성질도 현저하게 다르다. 따라서 각각의 동물종에 적합한 정자의 동결보존법이 개발되었다. 한편 동결 보존한 정액은 수정뿐만 아니라 체외수정에도 이용됨에 따라, 용해후의 정자활력 및 수정 능력의 향상을 위한 동결기술의 개선이 요구되게 되었다. 동물정액을 동결보존함에 있어 동해방지효과가 우수한 glycerol의 발견으로 정액의 장기보존이 가능하게 되었으며 동시에 동결 용해된 정액을 이용한 인공수정이 급속하게 발전하여 결과적으로 많은 가축의 우수유전자의 활용기회를 증가시키는데 커다란 공헌을 하였다. 한편 토끼정액의 동결보존은 가능하다고 보고되어 있으나, 결과적으로 glycerol이 포함된 동해방지제에 대해서 비교적 민감한 것이 알려져 있다. 따라서 Hanada 와 Nagase(1980)는 amid 또는 methyl 종류가 포함된 동해방지제가 토끼정액의 보존성을 향상시킨다고 하였고, 동해방지제로 사용되고 있는 물질중에는 세포막을 투과할 수 있는(glycerol, DMSO) 물질과 투과할 수 없는 물질(carbohydrate, methyl cellulose)이 있으며, 이것은 각각 세포내외의 물분자의 동결에 영향을 미치므로, 두 종류를 조합하여 동해방지제로 사용함으로써 동결용해후의 정자생존율이 개선되었다고 보고하고 있다.

본 연도에는 barrier system내에서 사육중인 specific pathogene free(SPF) 토끼 정액의 이용확대를 위한 연구를 위해, 자체 개발한 인공질을 이용하여 정액을 채취하고(원정액) 이것을 다양한 동해방지제와 희석하고 program freezer를 이용하여 동결 보존하였으며, 냉각속도와 동해방지제의 종류가 토끼정자의 동결용해후의 생존성에 미치는 영향(생존율 또는 침체손상율)에 대하여 검토를 하고 이 정액을 이용한 인공수정을 실시하였다.

토끼정액은 락텍스와 내경 15mm의 PVC pipe로 이루어졌고, 전선을 연결하여져 있는 인공질(Fig. 16)을 만들고, PVC pipe와 락텍스 사이에 생리식염수를 적량 넣고 콘센트에 꽂아 식염수의 온도를 37℃로 맞추어 인공질을 준비하고 barrier system내에서 사육중인 SPF 토끼 10마리에서 매주 2회 채취하였다. 채취한 정액

중에 포함된 교질물은 동결에 사용하기 전에 멸균된 핀셋으로 제거하고 정액을 37°C로 준비한 RMED 용액(Table 2)과 1:1로 희석(1차 희석)하였다. 1차 희석한 정액을 15ml의 원심튜브에 담아 준비한 37°C, 50%의 percoll의 상층에 조용히 올리고, 37°C로 맞춘 원심분리기로 1,500 rpm, 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하여 정자만을 회수하였다(정자괴). 정자괴를 37°C로 가온한 희석액과 희석(2차 희석)하였으며, 2차 희석한 정액을 0.5ml straw에 분주하여 봉인하고 25°C에서 5°C까지는 program freezer에 의해 냉각하고, 5°C에서 -196°C까지는 액체질소 상면에서 냉각하였다. -196°C까지 냉각한 정액은 액체질소통에 넣어 보존하였으며, 동결 후 1주일에 정액을 용해하여 정자의 생존성과 침체변화를 검토하였다. 그리고 성숙숙된 암컷토끼에 성호르몬(hCG)을 투여하여 배란을 유도하고, 동결 보존한 정액을 용해하여 인공수정을 실시한 다음, 정액을 주입하고 30일에 분만여부를 확인하였다.

가. 냉각속도와 생존율

동결용 희석액은 Hanada 와 Nagase가 보고한 EHY 용액(125mM glucose, 105mM lactose, 91mM raffinose, 10mM hepes 와 20% egg yolk)에 최종농도가 glycerol 3%, acetamide 5%, 점조도가 각각 15, 400, 1,500(lg. cm⁻¹, sec⁻¹) 인 methyl cellulose(MC15, MC400, MC1,500)를 0.5%가 되도록 첨가한 것으로 하였다. 각각의 희석액과 정액의 비율이 6:1이 되도록 희석하고, 25°C로 조절된 program 동결기내에서 25°C에서 5°C까지 냉각속도(°C/min)를 1, 2, 3, 4시간으로 조절하여 냉각시켰다. 5°C까지 각각의 속도로 냉각시킨 후 0.5ml의 plastic straw에 주입하여 straw powder로 밀봉, 5°C의 물중에 넣어 powder를 굳히고, 액체질소 상면 5cm위에 수평으로 놓아 15분간 예비동결을 실시하였다. 15분 후에 액체질소중에 침적시켜 동결을 완료하였으며, 동결 후 1주 이상 경과 후에 37°C의 온수로 용해하고, 37°C로 미리 가온하여 준비한 RMED 용액과 1:1로 희석한 다음, 정자의 생존율과 침체변화를 관찰하였다.

동해방지제로 첨가한 물질을 분류하면 세포투과성(glycerol, acetamide)과 불투과성(methyl cellulose)으로 나눌 수 있다. 세포투과성이 있는 물질은 세포내의 자유수와 치환하는 것으로서 세포질을 보호하며, 불투과성 물질은 세포막 표면에 망상의 빙결정체를 형성시켜서 세포의 동결과 용해 과정에서 일어나는 급격한 세포내의 삼투압 변화에 의해 세포막에 가해지는 손상으로부터 세포막을 보호하는 기능을 하는 것으로 추측된다고 보고하였다. 이러한 각각의 성질을 갖고 있는 물질을

단독적으로 첨가하여 동결용 희석액으로 사용하고 25℃에서 5℃까지의 냉각속도를 다르게 하였을 때 용해후의 정자의 생존율과 침체변화에 미치는 효과를 검토한 결과는 Table 3 과 4와 같다. 세포막 투과성인 glycerol과 acetamide는 희석 후 1 시간내에 냉각을 하는 것이 가장 높은 생존율을 나타내었으며($P < 0.05$), 냉각속도가 늦어질수록 오히려 정자의 생존율이 저하되었다. 불투과성인 methyl cellulose로 희석한 정자에 있어서는 methyl cellulose의 점조도에 관계없이 서서히(25℃→5℃, 4 시간) 냉각하는 것이 희석 후 빠르게 냉각하는 것보다 높은 생존율을 나타내었다 ($P < 0.05$). 세포막 투과성인 물질(glycerol과 acetamide)은 정자와 희석 후 빠른 시간내에 정자의 세포막을 통과하여 세포내의 자유수의 탈수를 1시간 이내에 유기할 뿐만 아니라, 세포막 투과 후 시간이 경과함에 정자세포내의 자유수의 과탈수 또는 독성이 오히려 정자의 생존율을 저하시켰다고 생각된다. 따라서 세포막 투과성 물질을 이용한 토끼정자의 동결에 있어서는 동해방지제가 첨가된 희석액과 희석후 빠른 냉각속도로 냉각을 하는 것이 정자의 생존율에 있어서 유리한 것으로 생각된다. 한편 불투과성의 물질(methyl cellulose)은 세포막을 통과하지 않고 세포막의 표면에 결합하여 세포막을 보호하는 작용의 발휘에는 시간이 요구되므로 희석 후 느린 속도로 냉각을 하는 것이 정자세포막 표면에서의 보호능력이 충분히 발휘되는 것으로 생각된다. Dalimata 와 Graham은 3%의 glycerol을 첨가한 희석액으로 토끼정자를 희석 후 2시간에 걸쳐서 25℃에서 5℃까지 냉각하여 동결한 정자의 용해 후 생존율이 2%, acetamide를 첨가한 경우는 17%로 보고하였다. 본 실험에서는 냉각속도를 1시간으로 하였을 때 glycerol에서는 생존율이 25.7%, acetamide에서는 26.9%로 나타나 이들이 보고한 생존율보다 높아, 세포막 투과성인 물질을 동해방지제로 첨가한 경우는 냉각속도를 빠르게 하는 것이 용해후의 생존율에 있어서 유리한 것으로 생각된다. 또한 불투과성인 물질을 첨가하는 경우는 서서히 냉각을 하는 것이 이러한 물질이 세포막 표면에 충분히 결합하여 세포막을 동해로부터 보호하는 것으로 생각된다. 한편 용해후의 정상 침체율에 있어서는 methyl cellulose를 첨가한 구가 각각의 냉각속도에 있어서 glycerol과 acetamide에 비하여 유의적인 차이는 인정되지 않았으나 약간 높았으며, 서서히 냉각하는 것이 빠르게 냉각하는 것보다 높았다. 이러한 결과는 정자의 표면에 부착되어 있는 침체가 불투과성인 물질로 코팅되어지는 것에 의하여 보호되는 것으로 생각되어지고, 또한 침체는 온도변화에 대한 순응속도가 느리게 적응하는 것으로 생각되어진다.

Table 2. Composition of RMED solution

Reagents	Amounts(mM)
Fructose	84
Glucose	5.5
Sodium pyruvate	1.2
Sodium lactate	13.1
Hepes	10
Calcium chloride	1.7
Bovine serum albumin	6mg/ml
pH	7.2
mOsm	300



Fig. 16 Artificial vagina for collection of rabbit sperm

Table 3. Effects of cooling rates on the sperm viability of post-thawed frozen rabbit spermatozoa. (Unit : %)

Extenders	Cooling rates (from 25°C to 5°C)			
	1h	2h	3h	4h
EYH-Glycerol	25.7±4.3 ^a	12.7±4.0 ^a	14.7±4.5 ^a	3.7±1.2 ^a
EYH-Acetamid	26.9±2.6 ^a	16.2±2.8 ^a	7.6±0.9 ^a	5.7±4.2 ^a
EYH-MC15	6.6±0.8 ^b	8.2±0.9 ^a	7.0±1.0 ^a	16.7±6.8 ^b
EYH-MC400	3.2±2.2 ^b	8.6±2.7 ^a	8.9±0.9 ^a	21.2±10.8 ^b
EYH-MC1,500	5.5±3.3 ^b	9.8±1.2 ^a	7.4±0.7 ^a	20.0±5.7 ^b

^{a,b} Mean±SE with different superscripts in the same column are significantly different(P<0.05).

Table 4. Effects of cooling rates on the acrosome integrity of post-thawed frozen rabbit spermatozoa. (Unit : %)

Extenders	Cooling rates (from 25°C to 5°C)			
	1h	2h	3h	4h
EYH-Glycerol	53.1±14.7	52.1±16.7	63.5±6.9	69.8±7.9
EYH-Acetamid	61.5±0.4	64.2±1.1	61.5±1.3	71.7±5.5
EYH-MC15	67.5±0.3	63.6±0.7	72.4±2.9	78.9±0.2
EYH-MC400	65.5±4.2	69.9±3.7	79.8±12.4	70.9±5.1
EYH-MC1,500	69.6±0.1	70.8±0.7	73.2±2.0	79.5±1.0

정자의 생존율과 정상침체율의 개선을 위해서는 세포막의 투과성 물질과 불투과성의 물질의 혼합이 요구된다고 할 수 있으며, 동해방지제의 특성에 맞는 냉각속도의 조절이 필요하다고 생각되어진다.

Roy 와 Djerassi(1965)는 세포막투과가 가능한 물질인 demethylsulfoxide (DMSO) 와 불투과성 물질인 sucrose가 조합된 동해방지제는 혈소관의 동결에 있어서 상호상승작용의 효과에 의해 세포를 동해로부터 보호하는 능력이 있는 것으로 보고하였다. 또한 당류와 세포막 투과성인 물질과의 조합이 몇몇 종의 정자 동결보존에 이용되고 있어, 투과성의 물질은 정자세포내의 탈수를 조절하고, 불투과성 물질은 정자표면을 보호하는 작용이 있는 것으로 나타나 두 가지 이상의 조합으로 희석액을 만드는 것이 토끼정자의 동결과 융해과정중에 있어서 일어나는 충격으로부터 보호하는 능력이 증가될 것으로 생각된다.

나. 당류가 생존율과 침체변화에 미치는 영향

Raffinose가 제외된 EYH 용액에 MC15, 400과 1,500을 각각 0.5%, acetamide를 5.1%, raffinose를 91mM, trehalose를 91mM, glycerol를 3% 첨가하거나 2가지 이상을 조합으로 하여 첨가한 것을 동해방지제가 첨가된 희석액으로 사용하였다. 동결방법은 program 동결기에서 25℃에서 5℃까지 2시간에 걸쳐서 냉각을 하여 동결/융해후의 정자의 생존율과 침체변화를 관찰하였다.

융해후의 정자의 생존율은 Maxwell 과 Johnson(1997)의 방법에 준하여, 융해 희석한 정액 250 μ l에 형광염색 시약인 2.4mM의 Propidium Iodide(PI) 3 μ l와 DMSO로 희석한 100nM의 SYBR-14 5 μ l(LIVE/DEAD sperm viability kit, Molecular Probes, USA, L-7011)를 각각 첨가하여, 20분간 배양염색을 하고 형광현미경(Olympus, Japan)하에서 400배의 배율로 관찰한 정자중에 연녹색의 정자는 살아있는 정자로, 빨간색의 정자는 죽은 정자로 하였으며, 각각 실험구에 있어 3회 반복하여 관찰하였다.

각각의 희석액으로 동결한 정자의 융해후에 침체변화를 검사하기 위하여 융해한 정액을 10 μ l 취하여 slide에 도말 건조하고, 0℃의 100% methyl alcohol중에서 2분간 고정하고, 건조시킨 다음, 형광염색 시약인 FITC-PSA(Sigma, L-0770, 200 μ g/ml)를 75 μ l, PI(2.4mM) 18 μ l를 희석하여 20 μ l의 정자를 도말 건조한 slide위에 놓고 여기에 OHP 필름을 덮어 slide 전면에 염색시약이 퍼지도록 하고 어두운 곳에 방치하여 형광염색을 실시하였다. 염색개시 후 20분에 OHP 필름을 조심스럽게 제

거하고, 증류수로 10분간 세척한 다음에 건조하여 형광현미경하에서 1000배로 관찰하였다. 판단기준은 Pursel 등의 방법에 준하여 정상침체, 비정상 침체로 구분하였으며, 정상침체율은 관찰한 정자 중 정상침체만으로 하고 그 외의 정자는 모두 비정상인 상태의 정자로 하여 정상침체율을 계산하였다. 통계처리는 결과를 종합하여 분산분석(ANOVA)과 Fisher의 protected least significant difference (PLSD) test로 실시하였다.

세포투과성 물질인 glycerol, acetamide와 불투과성 물질인 methyl cellulose, trehalose 와 raffinose를 단독 또는 2가지 이상의 조합으로 조절한 희석액으로 희석하여 25°C에서 5°C까지를 2시간에 걸쳐서 냉각하여 동결보존한 토끼정자의 동결융해후에 있어서 생존율과 정상침체율에 미치는 효과를 검토하였다(Table 5).

생존율에 있어서는 세포막 투과성 또는 불투과성 물질을 단독으로 첨가한 희석액으로 희석한 구가 가장 낮았으며(2.5%~11.8%, $P<0.05$), 다음으로 2가지 조합구가 낮았고(7.7%~16.0%), 가장 높은 생존율은 3가지를 첨가한 조합구 중 MC15와 MC1,500에 acetamide, trhalose를 첨가한 구가 18.1%과 18.2%로 가장 높았다. 따라서 methyl cellulose와 같은 불투과성 물질은 세포의 표면 보호 작용으로 정자를 동결융해과정에 일어나는 충격으로부터 보호하고, 세포투과성 물질인 glycerol과 acetamide는 정자세포내의 자유수 탈수를 조절하는 것으로 동결에 의한 충격으로부터 보호하는 것으로 생각되며, 이러한 물질을 각각 첨가하는 것보다도 세포막 불투과성과 투과성의 물질을 혼합하여 첨가하는 것이 정자의 생존율에 있어서 유리한 것으로 생각된다. 양과 닭 정자의 동결에 있어서 methyl cellulose를 첨가하는 것에 의해서 정자의 생존율에 있어서 유의한 효과가 있다고 보고하였다(Schmehl 등, 1986, Phillips 등, 1996)). Dalimata 와 Graham(1997)도 토끼정자에 있어서 불투과성 물질인 methyl cellulose와 trehalose를 세포막 투과성 물질인 acetamide가 첨가된 희석액에 첨가하는 것이 trehalose 또는 methyl cellulose를 단독으로 첨가하는 것보다 융해후의 생존율이 높았다고 처음으로 보고하였으며, 이는 본 실험의 결과와 비슷하였다. 특히 세포막 불투과성 물질을 단독으로 첨가하는 경우, 생존율이 투과성 물질을 단독으로 첨가하는 것보다 저하되는 경향이 인정되어, 불투과성 물질을 첨가할 때에는 반드시 투과성 물질과 함께 조합으로 하여 첨가하는 것이 토끼정자의 동결융해 과정중에 일어나는 충격으로부터 정자를 보호하는 효과가 상승되는 것으로 생각된다.

Table 5. Effects of combinations with saccharides, glycerol and methyl cellulose in egg yolk based extender on the viability and acrosome integrity of post thawed frozen rabbit spermatozoa.(Unit : %)

Extenders	viability	normal acrosome
EYH-MC15	8.5±0.6 ^a	59.1±0.4
EYH-MC400	2.7±0.2 ^a	61.6±1.8
EYH-MC1,500	2.5±0.1 ^a	63.8±2.9
EYH-acetamide	10.2±2.0 ^g	62.1±7.1
EYH-raffinose	11.8±0.1 ^b	59.1±0.9
EYH-trehalose	6.9±0.4 ⁱ	61.3±2.8
EYH-glycerol	8.6±2.1 ^k	54.9±1.8
EYH-MC15+ glycerol	10.1±1.7 ^c	61.3±2.8
EYH-MC400+ glycerol	16.0±0.8 ^{b,j}	63.7±2.9
EYH-MC1,500+ glycerol	10.2±1.0	64.1±2.7
EYH-MC15+ acetamide	11.4±3.1 ^b	57.8±8.9
EYH-MC400+ acetamide	7.7±0.8 ^e	59.3±4.7
EYH-MC1,500+ acetamide	13.1±4.8 ^b	62.1±3.5
EYH-acetamide+ raffinose	10.6±0.8 ^b	58.9±0.5
EYH-acetamide+ trehalose	11.9±1.9 ^b	60.2±2.8
EYH-acetamide+ raffinose+ glycerol	14.1±4.8 ^b	60.3±9.6
EYH-acetamide+ glycerol+ trehalose	14.0±1.5 ^b	56.1±2.7
EYH-MC15+ acetamide+ trehalose	18.2±0.9 ^{b,d,h,l}	60.9±4.9
EYH-MC400+ acetamide+ trehalose	12.6±2.6 ^{a,f}	63.8±0.7
EYH-MC1,500+ acetamide+ trehalose	18.1±8.1 ^{b,d,j,l}	65.5±2.1

^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l} Mean±SE with different superscripts in the same column are significantly different(P<0.05).

다. 동결정액을 이용한 인공수정

동결정액을 이용한 인공수정에서 가장 적합한 정액주입시기를 결정하기 위해서 hCG를 투여하고, hCG의 투여직후(A 군, 15두) 및 투여후 10시간(B 군, 15두)에 동결정액을 용해하여 직접 양쪽자궁에 $0.25\text{ml}(7 \times 10^6/\text{sperm})$ 씩 주입하고 30일 후에 태어난 산자수를 확인하였다.

Barrier 시설중에서 번식하여 성숙한 생후 18주령의 암컷에 hCG를 이정맥에 주사하여 배란을 유기시킨 다음 37°C 로 용해한 동결정액을, hCG 주사직후(A 군) 및 10시간후(B 군)에 주입하여 인공수정을 시킨 결과, A 군은 14마리(93.3%)가 99마리(평균 7.1마리)의 자토를 분만하였으나, B 군은 6마리(40.0%)가 30마리(평균 5.0마리)의 자토를 생산하여 배란유기 직후에 인공수정을 시킨 A 군이 B 군에 비하여 임신율과 평균산자수에 있어 유의하게 높으며, Chen 등(1989)이 보고한 결과와 유사하였으나 평균산자수에서는 6.5마리에 비하여 7.1마리로 약간 높게 나타났다. 이러한 결과는 배란된 난자가 수정부위에 도달하기 전에 수정능을 획득한 정자가 도착하여 배란된 난자와 바로 수정되는 것이 퇴행되는 난자의 비율이 감소되어 수정된 난자율이 증가하게 되며, 또한 동결한 정액은 자성생식기내에서의 생존시간이 짧아 배란되는 난자를 수정부위에서 기다리는 것보다 수정부위에 도착하여 곧바로 수정되는 것이 유리한 것으로 생각된다. 한편 토끼에서의 배란은 자연상태에서는 교미자극이 있는 후 약 10시간에 일어나는 것으로 보아도 이러한 설명이 적합한 것으로 판단된다. 따라서 동결정액을 이용한 인공수정의 경우는 배란을 유기하는 것과 동시에 수정을 하는 것이 높은 수태율과 평균산자수가 증가시킬 수 있다. 그러나 본 실험의 경우 Barrier 시설에서 실시해야하는 경우이므로 정액주입 과정중에 정액의 용해 및 Barrier 시설내로의 정액 도입 등의 조작이 필요하므로 이 과정중에 미생물오염의 위험성이 있어 Barrier system에서의 적용에 있어 각별한 주의가 필요하다고 생각된다.

2. SPF 토끼의 증체속도 측정에 의한 유진monitoring

토끼는 인체와 생리적으로 매우 유사하기 때문에 옛날부터 실험에 사용되어 대사, 면역, 혈액, 병리, 내분비 등 여러 분야에서 연구용 또는 검정용 목적으로 많이 이용되고 있다. 생식 독성학적인 측면에서 살펴보면 토끼는 배란조절이 용이하고, 발생독성물질에 민감하게 반응하며, 태아의 크기가 다른 설치류에 비해 상대적으로 커서 형태학적 관찰이 매우 용이한 장점을 갖고 있다. 또한 생식과 관련된 실험 기

초 자료가 풍부하기 때문에 안전성 평가시 발생독성시험에 가장 많이 사용되고 있는 실험동물중의 하나이다. 특히 항체를 만드는 데에 이용되는 면역학 연구와 약품의 발열시험, 기형유발시험 등에 있어 그 유용성이 최근에 들어 점점 높아지고 있다.

일반적으로 토끼는 강한 근교퇴화 현상으로 번식력의 저하가 현저하기 때문에 유전적 조절의 부분이 뒤떨어져 있고, 또한 사육시설의 설치와 유지 등에 요구되는 경비가 크다는 등의 이유로 미생물 조절에 있어서도 뒤떨어진 상태에 있다. 그리고 농가에서는 생산중심으로 되어 있는 상황에서 생산량은 계절적인 요인의 영향을 받기 쉬워 봄철의 공급부족이 만성적인 현상이다. 뿐만 아니라 실험 전 또는 실험 중에 폐사와 도태 등으로 실험자는 실험에서 요구되는 실제 마리수보다 더 많은 토끼를 요구하게 되고 이로 인해 사육시설, 사육장비, 사료 및 관리인력 등이 더 많이 필요하게 된다. 이와 같이 국내에서 실험동물로서 토끼의 사용은 소형 설치류에 비해 실험의 정도와 경제적인 면에서 비효율적이다. 이를 극복하기 위해 토끼품질의 고급화와 함께 연중 안정적인 생산 공급체제 구축이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 1999년부터 대학 실습농장에서 사육중인 Newzealand white 임신토에서 자궁적출술 방식으로 Isolator에서 태자를 무균적으로 적출하고 인공포육한 뒤 Barrier 사육시설내에서 사육, 번식하여 *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella spp.*, *Eimeria spp.*, Ear mange, body mange, Sendai virus(HVJ), mycoplasma 에 대해 free한 SPF 토끼의 생산에 성공하였고, 이러한 토끼의 유전적인 특성을 명확하게 하기 위해 토끼의 체중 변화를 주령, 동복산자수, 성별로 구분하여 조사하였다.

번식군은 유통교배방식으로 교배하여 최대한 근교화를 억제하고, 후보 번식군은 산자수, 포유능력, 이유자토수, 연산력 등의 자료를 기초로 선발하여 우량한 후보토를 확보하였다.

실험토의 생산방식은 분만간격을 7주, 즉 분만후 3주에 교배하는 방식을 채택하여, 연간 7-8회 생산하며, 어린 토끼는 6주간 포유후 이유시키며, 8주령까지는 한 배새끼를 동일한 cage 내에서 사육하고 9주령에 개체별 사육을 실시하였다.

Barrier system 시설의 사육환경은 온도 $22\pm 4^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 15\%$, 환기회수는 15회/시간, 조명은 12시간 인공조명을 실시하였다.

Cage는 스텐인레스제로서 3주 간격으로 멸균하여 교체하고 있으며, 사료는 퓨리나 주식회사의 pellet 토끼사료(무항생제)를 121°C , 5분간 고압증기 멸균한 것을 제

한급식(체중 3kg 기준 1일 200g)시켰으며, 음수는 1차적으로 치아염소산으로 소독한 다음 사육실에 설치한 water filter(5 μ m)로 여과하고 이어서 자외선 유수살균기로 살균한 것을 nipple을 통하여 공급하였다.

체중측정에 공시한 자토수는 26마리의 어미에서 태어난 산자수중 포유개시한 183마리(평균 산자수: 7마리)를 대상으로 분만 후 1주부터 8주령까지는 복별로, 9주령부터 14주령까지는 개체별로 체중을 측정하고, 체중의 변화를 주령, 동복산자수, 성별로 구분하여 조사하였다.

체중측정에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 Fisher의 PLSD로 처리하였다.

가. 주령에 따른 체중의 변화

분만후 주령에 따른 체중 변화에 있어서, 각 주령별간에는 유의한 증가(Table 6. $P<0.05$)가 인정되었으며, 생후 2주령에 분만후 1주령의 체중에 비하여 약 2배의 증체가 인정되었으며, 일당 증체량은 약 12.8g 정도였다. 분만후 사료섭취가 시작되는 4주령부터는 체중이 급격하게 증가하여 분만 후 1주령 체중의 5배에 달하였으며, 분만후 6주령, 즉 이유시에는 분만 1주령 체중의 10배인 1,138g에 도달하였으며, 이후부터는 매주 200-300g의 증체를 나타내고 14주령에 $2,994.5\pm 44.0g$ 에 도달하였으며, 이것을 분만 1주부터 일당 증체량을 보면 1일에 약 28.9g씩 증가하는 것이 된다.

나. 동복산자수에 따른 체중 변화

동복산자수와 증체량의 관계를 검토하기 위해 26복의 동복산자수 7마리 이하(3-7마리), 8마리 이상(8-12마리)으로 구분하여(Table 7) 산자수가 같은 복수가 2복 이상의 산자에서 분만후 1주부터 14주까지 체중을 측정하였으며, 그 결과는 Table 8에서 보는 바와 같다.

산자수 7마리 이하의 주령별 증체율에서는 2주령이후 부터 매 주령간에 유의한 증체가 인정되었다($P<0.05$). 한편 산자수 8이상에 있어서는 3주령부터 매 주령간에 유의적인 증체가 인정되었다($P<0.05$).

동복산자수 처리간에 있어서의 증체율은, 분만후 3주까지는 유의차이가 인정되지 않았지만, 사료의 섭취가 활발해지는 4주부터 11주까지는 산자수 7마리 이하가 8마리 이상에 비하여 주령별 100g 이상 증체가 되어 유의한 차이가 인정되었고($P<0.05$), 12주부터 14주령까지는 비슷한 증체를 보였으며, 분만후 1주부터 14주까

Table 6. Body weight changes of newborn SPF rabbit with weeks old.
(Mean±S.D.)

Week after birth	Body weight(g)	Week after birth	Body weight(g)
1	112.10±4.10	8	1,747.6±36.6*
2	202.50±7.80*	9	1,964.0±37.0*
3	304.20±11.1*	10	2,210.7±31.8*
4	524.10±18.1*	11	2,431.1±34.8*
5	844.10±22.3*	12	2,621.8±34.3*
6	1,138.8±28.0*	13	2,775.6±37.7*
7	1,430.7±27.2*	14	2,944.5±44.0*

*:Significantly different at P<0.05 compared with before week, respectively.

Table 7. Distribution of litter size on the SPF rabbits

Litter size	No. of dam	Litter size	No. of dam
3	1	7	2
4	1	8	6
5	3	9	5
6	7	12	1

Table 8. Body weight changes of newborn SPF rabbit with litter size and weeks old.(Mean±S.D)

Week	7 below(g)	8 above(g)
1	120.90±6.40	101.9±3.1
2	223.50±10.2*	178.4±7.8
3	343.0±12.5*	259.0±6.9*
4	574.2±23.4* [‡]	465.7±16.8* [‡]
5	899.7±26.9* [‡]	779.5±27.3* [‡]
6	1,207.5±37.5* [‡]	1,058.9±28.7* [‡]
7	1,493.1±40.3* [‡]	1,357.9±22.4* [‡]
8	1,824.2±54.9* [‡]	1,654.6±32.1* [‡]
9	2,050.3±52.0* [‡]	1,863.2±36.1* [‡]
10	2,268.2±46.4* [‡]	2,143.7±35.4* [‡]
11	2,486.3±52.7* [‡]	2,366.8±37.8* [‡]
12	2,669.4±53.6*	2,566.3±36.3*
13	2,810.5±59.5*	2,740.2±44.1*
14	2,979.2±73.8*	2,904.0±41.7*

*: Significantly different at P<0.05 compared with before week, respectively.

[‡]: Significantly different at P<0.05 compared with same week, respectively.

지의 일당 평균 증체량은, 산자수 7마리 이하에서는 29.1g, 8마리 이상에서는 28.6g로 산자수가 적은 쪽의 일당 증체량이 0.5g 많았으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

다. 성별에 따른 체중 변화

성별간의 증체를 검토하기 위해 개체별 사육을 개시하는 9주령부터 암수를 구분하여 체중을 측정하였다(Table 9). 각 주령별 암수간의 체중증체에 따른 유의차는 체중 측정의 전 기간에서 인정되지 않았으나, 주령수가 증가함에 따라서 암컷이 수컷에 비하여 약간 높은 체중을 나타냈다. 한편 암수 모두 매 주령에 있어 전 주령에 비하여 유의하게 체중이 증가하는 것이 인정되었다($P < 0.05$).

Pasteurella multocida, *Bodetella bronchiseptica*, *Salmonella spp.*, *Eimeria spp.*, *Ear mange*, *body mange*, *Sendai virus(HVJ)*, *mycoplasma* 등 8가지 항목을 Barrier 내에서 사육하면서 통제하고 번식한 SPF 어린 토끼의 체중변화를 주령, 동복산자수, 성별로 측정하여 생산현장에서는 출하적기를 맞추기 위함과 연구자들에 있어서는 각종 안전성연구에 있어 적합한 주령과 체중을 사전에 파악함으로써 원활한 시험을 도모하기 위한 자료를 제공하기 위해 실험을 실시하였다.

Newzealand white와 Japanese white에 있어서 태어난 신생 토끼는 생후 1주에 체중의 2배가 되며, 3개월령까지는 1일 15-20g씩 증가한다고 보고하고 있으나(이영순, 1989), 본 연구에서는 분만후 14주령까지의 1일 증체량은 28.9g로 매우 높게 나타났으며, 생후 2주령에 분만후 1주령 체중의 약 2배, 사료섭취가 시작되는 4주령째에는 5배에 달하였으며, 분만후 6주령에는 10배인 1,138g에 도달하는 것으로 확인되었다. 이것은 아마도 사료의 질적 향상과 동물의 사육환경이 개선된 것에 의한 효과라고 생각된다.

현재 SPF 토끼의 사육과 번식을 위해 공급하는 사료의 구성성분을 보면, 조단백질 15.0% 이상, 조지방 2.0% 이상, 조섬유 15.0% 이상, 조회분 10.0% 이하, 칼슘 1.20% 이상, 인 0.5% 이상인 것을 사용하고 있으며, 이것은 일본의 오리엔탈효모 주식회사에서 육성용으로 생산하는 사료의 조단백질 21.02% 이상, 조지방 2.87% 이상, 조섬유 15.08% 이상, 조회분 8.59% 이하, 칼슘 1.38% 이상, 인 0.54% 이상인 것과 비교하여 조단백질과 조지방에서 다소 차이를 보이고 있으며, 이 사료를 급여하여 육성한 conventional의 Newzealand white가 13주령에 측정한 체중이 약 2.75 kg로서 2,775.6g인 본 실험의 결과와 유사하였으며, 이 사료를 SPF 토끼에 급여하

Table 9. Body weight changes of newborn SPF rabbit with sex and weeks old.

Week	Body weight(g, Mean±S.D.)	
	Male	Female
9	1,895.3±41.5	1,868.0±55.2
10	2,227.7±42.4*	2,212.2±33.9*
11	2,435.9±47.6*	2,428.1±31.2*
12	2,630.4±49.6*	2,644.7±33.4*
13	2,764.0±52.0*	2,825.2±35.3*
14	2,936.8±56.4*	3,013.3±35.7*

*: Significantly different at $P < 0.05$ compared with before week, respectively.

고 14주령에 체중을 측정한 결과 3.25kg에 도달하여 본 실험에서 얻은 2,944.5g에 비하여 약간 높았다(堀内 와 興水, 1989). 한편 NRC 사양표준(1977)에 의하면, 성장기에 필요한 영양소 요구량을, 조단백질 16.0% 이상, 조지방 2.0% 이상, 조섬유 10~12% 이상, 칼슘 0.4% 이상, 인 0.22% 이상의 영양소를 공급하는 것을 권장하고 있어, 본 연구에서 급여하고 있는 사료의 영양소 함량은 토끼성장에 있어서 요구되는 영양소를 공급하기에 적합한 사료인 것으로 생각된다.

동복산자수에 따라 7마리 이하 또는 8마리 이상으로 구분하여 체중을 측정한 결과, 분만후 3주까지는 유의차이가 인정되지 않았지만, 사료의 섭취가 활발해지는 4주부터 11주까지는 산자수 7마리 이하가 8마리 이상에 비하여 주령별 100g 이상의 증체가 인정되어, Newzealand white의 SPF 토끼의 모토 마리당 포유두수를 7마리로 조절하여 포유를 시키는 것이 어린 토끼의 발육에 유리하다고 판단되며, 이를 위해서 분만후 모토간에 양자를 들어거나 보내는 방법을 적용하는 것이 어린 토끼에게 충분한 수유가 가능하여 초기발육이 개선될 것으로 생각된다.

성별에 따른 증체를 검토한 결과, 체중 측정의 전기간에 있어 차이는 인정되지 않았으나, 주령수가 증가함에 따라서 암컷이 수컷에 비하여 높았다.

이상의 결과는 Barrier 시설내에서 사육한 SPF 토끼는 매 주령별로 유의한 체중증가가 인정되며, 포유개시두수를 7마리 정도로 조절하는 것이 어린 토끼의 초기발육에 유리하다는 것을 알 수 있었으며, SPF 토끼를 이용한 각종의 안전성연구에 있어 적합한 토끼의 체중과 주령의 선택을 위한 참고자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

3. SPF토끼의 사육시설 과 SPF토끼의 미생물 모니터링

생명공학 및 신약개발의 동물실험을 위한 SPF 토끼 생산기반 구축을 위한 연구의 일환으로서 SPF토끼의 생산과 유지를 위한 미생물, 환경 및 유전학적 모니터링 기술의 확립이 필수적인 과정이며 또 이를 위해서는 구체적으로 SPF토끼의 사육시설 과 SPF토끼의 미생물 모니터링이 가장 중요하다. 이러한 업무를 위해서는 그에 합당한 SOP 제작이 우선되어야 체계적인 모니터링이 이루어진다. 따라서 현재 GLP시험기관인 한국화학연구원 안전성센터에서 실시하고 토끼의 검역시스템을 도입하여 SPF토끼의 사육시설 과 SPF토끼의 미생물 모니터링 SOP를 국내 실정에 맞는 시스템으로 개발하여 SPF 토끼생산에 적용시키고자 다음과 같은 연구를 수행하였다.

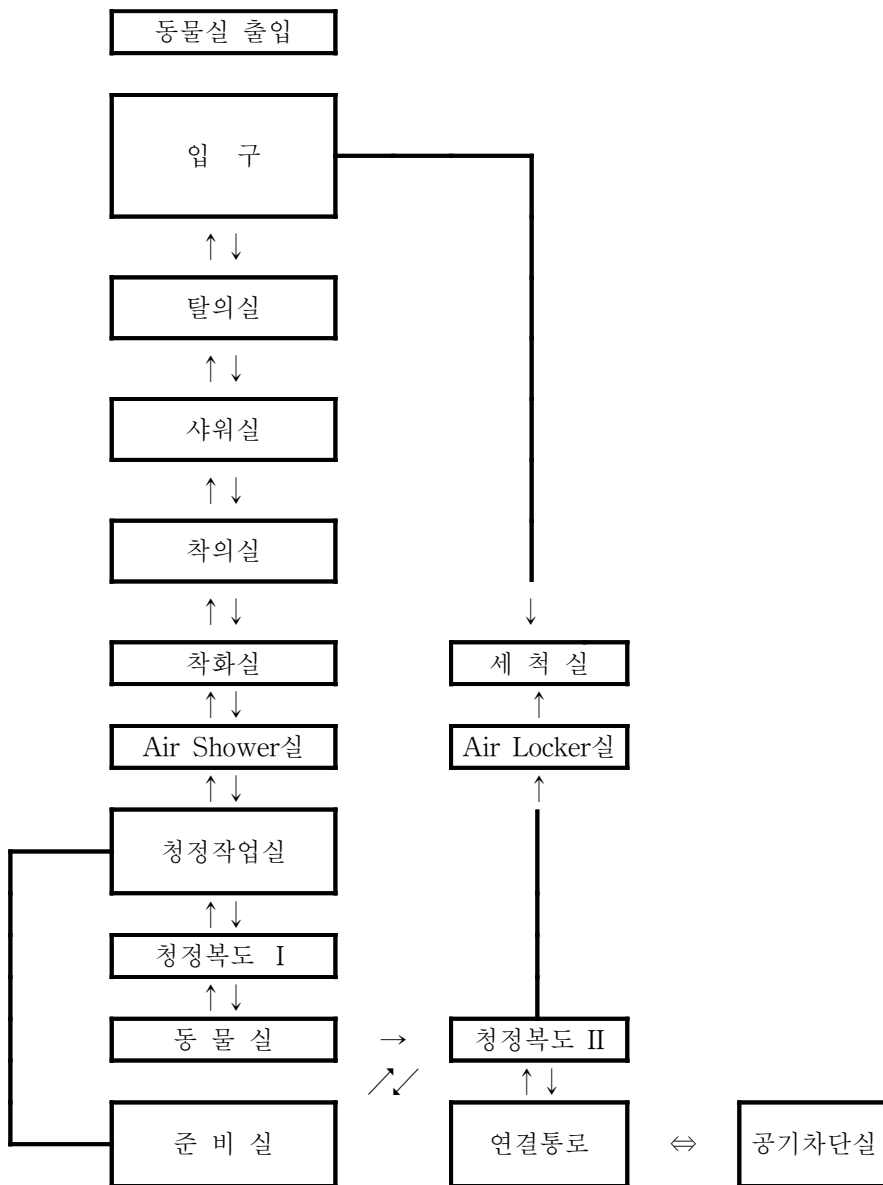
가. 동물 사육구역에서의 동물 취급에 관한 지침

A. 토끼의 반입과 반출 SOP

1. 목 적

본 SOP는 토끼사육 구역에서 사람의 입 퇴실법을 구체적으로 정한 것으로 오염을 방지하고 시험의 수행을 원활히 하도록 하기 위해 제정한다.

2. 작업모식도



3. 건물출입

3.1. 상시통행자 이외의 출입

상시 통행자 이외의 목적으로 출입할 경우에는, 사전에 동물관리책임자 혹은 시험책임자의 출입 승인을 얻고 출입을 한다. 업무상 급하게 출입을 하고자 하는 경우에는, 동물관리책임자와 사전 연락 후, 출입할 수 있다. 출입시 방문일지에 날짜, 방문자, 피방문자, 시간, 방

문내용을 기록하며 동물관리책임자가 확인한다.

3.2. 출입방법

1) 들어갈 때

(1) 외측 현관문을 열고 들어간다.

(2) 신발장에 있는 실내용 슬리퍼를 신고, 외부용 신발은 신발장에 넣고 슬리퍼 바닥을 발 소독조에 문지른다.

(3) 내측 현관문을 열고 들어간다.

(4) 내부에서 오랫동안 머물며 작업을 하는 경우에는 내부용 근무복으로 갈아입는다.

2) 나올 때: 1) 의 역순으로 실시한다.

4. 입실법 (동물실)

4.1. 탈의실의 입실준비

1) 몸 점검 : 몸이 아플 때 (감기, 설사, 상처 등) 는 미리 책임자에게 이야기를 한 후 될 수 있는 한 동물실 출입을 삼간다.

2) 휴대품 : 시계, 반지, 목걸이 등을 빼어 놓는다.

3) 세면 : 치솔질로 구강을 세척한다.

4.2. 입구

1) 일자, 소속, 입실시간, 방문내용을 입구에 있는 출입대장에 기록한다.

2) 손, 발소독 : 소독액을 이용하여 손을 소독하고 소독조에 발을 소독한다.

3) 전기 : 살균등은 소등, 켜의실 내에서 전등은 점등상태로 한다.

4.3 탈의실

1) 외부의 의복을 벗어 의복장에 넣는다.

4.4. 물 샤워실

1) 전신 물 샤워를 하고 멸균 타올을 이용하여 닦는다.

4.5. 착의실

1) 머리를 드라이기로 잘 말린 후 착의실에 준비된 멸균복으로 갈아입는다.(마스크, 모자, 멸균작업복, 양말, 장갑, 토시, 속옷(필요한 경우))

4.6. 착화실

1) 전용 신을 신는다.

5. 퇴실법 (동물실)

1) 작업에 대한 마무리가 잘 되었는가 확인한다. 반출할 물건, 서류, 동물 및 폐기물이 있는가를 확인하여 pass room를 통하여 반출한다.

2) 반출을 실시한 담당자는 재차 물품의 반출여부를 반드시 확인한다.

3) 사용한 고무장갑은 청정 작업실에 준비된 폐기물 처리함에 넣는다.

4) 최종퇴실자는 탈의실과 샤워실을 소독하도록 한다.

5) 탈의실에서 멸균복을 벗고 외부 옷으로 갈아입는다.

5.4. 입 구

1) 출입대장에 퇴실시간을 기록한다.

2) 벗은 멸균복류를 세탁기옆 바구니에 넣는다.

3) 마지막 퇴실자는 강의실내의 형광등을 소등하고 자외선 등을 점등시킨다.

6. 입퇴실시의 전반적인 주의사항

1) 출입 후 모든 문은 반드시 완전하게 닫도록 한다.

2) 마주보는 문 2개가 동시에 열려서는 안 된다.

3) Pass room은 동물출하와 퇴실시 폐기물을 반출할 때 외에는 입실을 삼간다.

7. 멸균복류의 보충, 교환

1) 한번 사용한 작업복류는 세탁, 건조, 멸균하여 착의실에 재 비치한다.

2) 낡은 것들은 수리하거나 폐기시켜 새로운 것으로 교체한다.

8. 자료의 정리와 보관

발생한 자료는 자료 보관고에서 일시적으로 보관하다가 매년 초에 그 전체에 발생한 모든 자료를 동물관리책임자의 지휘아래 자료보관실로 이관한다.

9. 보관기록

1) 출입대장

B. 토끼생산에 필요한 사료와 물의 사용

1. 목 적

토끼에 공급되는 사료, 물이 병원미생물, 기생충 또는 그 외 매개체나 유해한 오염물질을 동

물군에 전과하는 경로가 되지 않도록 이들의 제조, 구입, 보존, 사용방법 등에 주의하여, 품질 보증 된 사료, 물을 동물시험에 사용하여 동물을 건강한 상태로 유지하기 위하여 제정한다.

2. 사료

2.1. 사료의 일반적 조건

- 1) 성숙하기 전의 동물이 정상으로 발육하고 또는 성숙한 동물이 정상체중을 유지할 수 있도록 충분한 양을 제공할 것
- 2) 사료는 청결하고 오염물질을 포함하지 않고 기호성이 높고 충분한 영양소가 있을 것
- 3) 사료분석에 있어서 미생물기준치 및 사료의 오염물질 허용기준에 적합할 것
- 4) 사료, 물의 정기검사에 관한 SOP에 기준하여 로트별로 분석검사를 실시할 것

2.2. 사료중 오염물질 기준치

사료중에 함유되어있는 오염물질의 허용기준은 사료중 오염물질 허용한계치를 가지고 설정한다.

2.3. 검사성적서의 확인

동물관리책임자는 사료의 로트마다 사료성분분석성적서, 오염물질 또는 미생물검사성적서가 첨부되어 있는지 확인한다. 만일 오염물질이나 미생물검사 성적서가 첨부되지 않은 사료는 동물관리책임자의 관리 아래 그의 분석을 의뢰한다.

2.4. 사료구입

- 1) 사료사용 부문은 사료 구입시에 구매요구서를 작성하여 결제를 받는다.
- 2) 구매요구서에는 의뢰 년월일, 구입희망일, 사료명, 제조자명, 구입량 등을 기입한다.
- 3) 관리과담당자는 구매요구서에 의해 발주한다.
- 4) 관리과담당자는 발주 후 각 의뢰처에 연락하여둔다.

2.5. 사료의 납입

- 1) 사료구입담당자는 사료납품의 도착연락을 받으면 납입장소를 지시한다.
- 2) 사료구입의뢰부부는 품명, 제조일, 수량, 로트번호 등을 확인하고 구입사료 검수서에 기록한다.

2.6. 사료의 보관 방법 및 보관 장소

- 1) 재고 및 제조년월일은 항상 파악하고 사용유효 기한 내에 소비할 수 있도록 조치한다.
- 2) 사료는 5℃ 냉장창고에 두고 직접 바닥에 닿지 않도록 한다.
- 3) 부패하기 쉬운 사료는 항상 냉장보존 한다.
- 4) 미생물의 증식, 해충의 발생, 부패 등을 막기 위해 2주 이내에 사용하지 않는 것은 냉장

보관한다.

- 5) 보관 장소는 항상 청결히 하고 질병의 매개체(해충 등) 등의 침입을 막는다.
- 6) 보관 장소는 반입출 하지 않을 시는 항상 잠구어 둔다.

2.7. 사료의 사용유효 기한

사료의 사용유효 기한은 제조후 3개월로 한다.

2.8. 사료의 취급

- 1) 사료의 멸균은 고압증기멸균용으로 특별히 조제된 사료를 제외하고는 방사선 멸균을 실시하는 것을 원칙으로 한다.
- 2) 멸균반입 된 사료는 사료명, 로트번호, 제조일 외에 멸균일 및 사용기한을 추가로 표시한다.
- 3) 사료의 방사선 멸균은 사료를 포대채로 비닐포장을 실시한 후 외부 전문회사에 의뢰한다. 방사선 조사량은 25 kgy 가 되도록 의뢰한다.
- 4) 방사선 멸균된 사료는 사료를 포장한 외부비닐의 외측을 소독한 후 사육구역으로 반입한다.
- 5) 사육구역으로 반입된 방사선 멸균사료는 사료명, 로트번호, 제조일, 멸균일 등의 표시가 된 사료운반용 차에 충전하여 사용한다.
- 6) 멸균하지 않고 사용되는 사료는 필요수량을 입출에 관한 SOP에 기준하여 동물실 또는 사료조제실에 반입한다.

2.9. 사료 사용상황표의 작성

사료사용부문별 사료의 로트번호별로 잔여 사료량을 보관장소에서 사료를 꺼낼 때마다 확인하여 사료 사용 상황표를 작성하여 사료공급에 차질이 없도록 한다.

3. 물

3.1. 물의 일반적 사용조건

- 1) 동물이 매일 자유롭게 물을 마실 수 있도록 할 것.
- 2) 물은 유해한 물질이 오염되어있지 않은 것으로 오염되지 않는 방법으로 줄 것.
- 3) 물의 수질검사에 있어서 각 종류의 시험항목에 따라 검사에 이상이 없고, 음료기준에 적합할 것.
- 4) 정기적으로 분석검사를 실시하여 기준치 범위 안에 들어가 있을 것

4. 이상시의 처치

4.1. 사료의 이상

1) 검사결과에 있어서 이상이 인정될 경우는 사용을 금지하고 제조판매업자와 연락을 하여 사료의 교환 등을 실시한다.

2) 사용유효기간이 지난 사료를 발견하면 폐기처분한다.

3) 사료의 사용시, 구입, 취급, 보관 등에 있어 문제(이상)가 있을 경우는 즉시 동물관리책임자에게 연락하여 지시를 받는다.

4.2. 물의 이상

물의 사용시, 취급에 있어서 이상이 인정될 경우는 즉시 동물관리책임자에게 연락하여 지시를 받는다.

5. 자료의 보관

사료 및 물의 사용에 관련하여 발생하는 자료는 월별로 모아 정리하고 각 부문에서 보관토록 하며 매년 초에 전년도에 관한 기록을 자료보관실로 이송한다.

6. 보관기록

1) 구입사료 검수서

2) 사료사용 상황표

3) 사료성분분석성적서

4) 사료중 오염물질 분석성적서

5) 사료중 미생물검사 성적서

6) 물의 수질검사 성적서

C. 토끼의 일반증산관찰

1. 목적

본 SOP는 동물을 사육할 때 나타나는 일반증상을 정확하고 일관성있게 관찰하고 기록하여 사육 상태를 평가하는 데에 신뢰성 있는 자료를 얻기 위하여 제정한다.

2. 준비

다음과 같은 관찰용기와 기록할 도구들을 준비한다.

시계, 검안경, 사진기, 돋보기, 자, 필기구, 작업기록지, 컴퓨터 및 주변기기, 멸균가제, 생리식염액, 저울

3. 일반적인 관찰방법

3.1. 일반적인 주의사항

- 1) 일반증상관찰에 관한 SOP를 항상 옆에 비치해 놓고 관찰한다.
- 2) 동물의 선별을 확실히 하고 기록지에 기록 또는 컴퓨터의 입력은 정확히 한다.
- 3) 증상을 관찰할 때에는 행동 및 외관의 이상뿐만이 아니라 접촉하거나 자극을 주어 반응을 살펴본다. 분변과 뇨의 배설상태 또한 중요한 관찰항목 중의 하나이다.
- 4) 분비물에 의하여 신체가 더럽혀진 경우에는 다음 증상관찰에 방해를 주지 않기 위하여 생리식염액 또는 증류수와 거즈를 이용하여 닦아준다.
- 5) 동물을 관찰하는 것 뿐 아니라 동물실의 사육환경과 주변의 기자재까지 고려하면서 관찰한다.

3.2. 관찰방법과 판정기준

- 1) 일반증상의 분류는 첨부자료에 첨부된 일반증상 관찰 기준표에 따라 실시한다.
- 2) 증상의 관찰
 - (1) 매일 동물의 생사와 일반상태에 대하여 사육상자 밖에서 또는 사육상자를 열고 관찰한다. 동물상태의 전반적인 변화 또는 사망동물의 발생여부를 관찰한다.
 - (2) 동물의 관찰은 사육상자에서 꺼내어 촉진하거나 자극을 주어 실시하고 필요한 경우 돋보기, 자 등의 기구를 이용하여 필요한 관찰을 행한다. 증상이 관찰되면 첨부자료의 시험동물의 일반증상관찰 기준표를 사용하여 증상을 기록한다.
 - (3) 증상관찰부위의 넓이를 기술할 경우는 대략의 직경을 장축 × 단축 (cm)으로 표시한다. 결절이 관찰되었을 경우에는 경도, 색깔, 위치 및 표면상태를 기록하며 대략의 크기를 장축×단축×두께(cm)로 나타낸다.
 - (4) 관찰방법과 그 항목의 개요
 - ① 사육실에 들어서서 사육환경, 탈출동물의 유무 및 사료와 물의 급여상태를 전반적으로 관찰한다.
 - ② 사육상자 밖에서 동물의 상태를 조용히 관찰한다(전신적 상태와 행동에 관한 관찰, 배뇨상태, 배변상태, 발성, 호흡 등)
 - ③ 사육상자를 두들기거나 손뼉으로 쳐서 관찰한다(놀라는 반응, 안검하수, 보행장애 등 관찰항목).
 - ④ 동물을 사육상자에서 꺼내어 자극을 주거나 촉진한다(부종, 감각기의 이상, 공격성, 근육의 긴장도, 외상, 탈모, 유루 등 검사항목).
 - ⑤ 수치로 표현할 수 있는 것들을 자로 측정하여 크기를 기록(외상, 탈모)

⑥ 증상의 발현, 소실시간을 시계나 타이머를 이용하여 측정하고 기록한다.

(5) 증상관찰도중 감염성 질환이 인정되는 소견이 관찰된 경우 검역책임자 또는 동물관리책임자에게 알리고 해당 SOP에 따라 처리한다. 특이한 소견이나 분별이 곤란한 소견이 관찰되는 경우에는 검역책임자와 동물관리책임자에게 연락하여 지시를 받는다.

(6) 이상, 사망 및 빈사동물의 발견시에는 이상, 빈사 및 사망동물의 취급에 관한 SOP에 따라 처리한다.

4. 사진촬영

증상이 관찰되어 사진으로 보관할 필요가 있는 경우 사진촬영을 한다.

5. 보관기록

- 1) 일반 증상 관찰기록지
- 2) 사진촬영 기록지

<일반증상관찰 기준표: 용어의 정의, 약어 Code 번호>

Code	전신적 증상		해설
A	외관	General appearance	
A01	사망 또는 폐사	Death	생물본래의 대사기전이나 기능이 완전히 정지한 상태를 말한다. 호흡, 순환 및 중추신경의 정지를 사망으로 본다. 임상적으로는 심장박동의 정지 또는 호흡정지를 사망으로 본다. 사망개체는 발견시 사망, 절박도살(빈사상태에서의 도살), 계획도살, 공식(cannibalism), 자가용해(Autolysis)에 대해서 기록한다.

Code	전신적 증상		해 설
A02	빈사	Moribund	동물이 사망직전에 이른상태, 대부분의 경우 자발운동이 정지하고 호흡이나 맥박의 이상, 여윈, 탈수상태, 빈혈 또는 체온저하 등을 보이는 경우가 많다. 또한 황와나 복와 등의 자세를 취하고 소리등 외부로 부터의 자극에 대한 반응이 매우 저하되어 있음
A03	쇠약	Weakening	쇠약 또는 빈사전 상태로서 자발운동의 감소, 외부자극에 대한 반응이 둔해지며 피부색이 퇴색하고 호흡수 및 심박수의 상태도 변화되어 있는 상태를 가리킨다. 통상 야위어 있는 상태가 많다.
A04	야윈	Emaciation	신체가 현저히 가느다랗게 된 상태로 지방조직이 현저히 감소되어 있는 일이 많다.
A05	비만	Obesity	피하지방이 매우 증가되어 있는 상태
A06	식욕부진	Anorexia	사료에 대하여 의욕을 보이지 않고 섭취량이 감소된 상태
A07	거식	Refusal to feed	완전히 사료를 먹지 않는 상태
	섭식행동	Eating and drinking	사료 및 물을 먹거나 마시는 행동은 일상의 관찰만으로는 충분히 파악할 수 없기 때문에 물 및 사료섭취량을 측정해야 한다. 사료 또는 물의 냄새, 맛(기호성, Palatability)에 따라 섭취량에 영향을 미치게 된다.
	사료섭취량의 증감	Increase or decrease in food consumption or food intake	사료섭취량의 증가 또는 감소는 소화기 기능과 중추신경 특히 시상하부 기능의 변화가 중요한 요소이지만 기타 전신적인 이상도 관여될 수 있다.
	물섭취량의 증감	Increase or decrease in water consumption	물섭취량의 증감은 신장의 기능, 하수체의 기능이 관여하지만 기타 전신적인 이상도 관여될 수 있다.

Code	전신적 증상		해 설
B	체위, 자세	Posture, Body position	
B01	복와위	Prone position	체중의 대부분을 배로 떠받치고 있는 상태. 동물을 일으켜 세워도 다시 복부를 아래로 하고 고개를 숙인 상태로 되 돌아온다. 정상적인 상태일때의 자세(예를들면, 정지해 있을 때 복와에 가깝고 수면중에는 횡와)와 혼동하지 않도록 한다.
B02	기느자세	C r a w i n g position	배를 바닥에 대고 거의 팔꿈치로 몸을 지지하고 있는 상태
B03	측와, 횡와 위	Lying on side	옆으로 누워 있으며 동물을 일으켜 세워도 다시 횡와자세(체중의 대부분을 어깨 및 몸통의 측면으로 받치고 있는 상태)로 돌아온다.
B04	배와위, 양 위	Dorsal position	누워있는 상태
B05	입위(立位)	S t a n d i n g position	후지로만 서있는 상태가 오랜 동안 지속된다.
B06	좌위	Sitting position	후지를 구부리고 허리를 아래로 하여 상반신을 세운자세
B07	굴곡위	Hunchback position	등중양을 둥그렇게 웅크린 자세
B08	웅크린 자세	C r o u c h i n g position	사지를 구부리고 몸을 작게 하여 웅크린 자세
B09	강직(強直)	Catalepsy	근육의 경직을 특징으로 부자연스런 자세를 일정시간이상 계속 유지하며 자세를 바꾸어주면 그 자세를 계속 유지한다.
B10	기대어 있는 상태	Leaning	평형감각에 장애가 있는 경우에 보이는 증상
B11	기립불능	Ananastasia	일어서려고 하지만 불가능한 상태
C	의식,태도	Consciousness Attitude	
	[의식]정상	Normal	의식이 정상인 동물은 주변에서 발생하는 일에 민감하게 주의를 기울이며 자기의 환경을 잘 파악하고 있다.

Code	전신적 증상		해 설
C01	흥분	Exitement	정신적으로 활동성이 고양된 상태, 자발운동이 항진되며 심화되면 발성도 한다. 중추신경자극에 의한 흥분으로는 주위에 대한 이해, 반응성이 오히려 나빠진다.
C02	의식고양	Elation	환희, 기대 등 정도의 중추흥분약의 영향으로 정신적 활동성이 높아져 있음. 대개 생리적인 흥분상태를 고양(高揚)이라고 한다. 자발운동이 항진되고 사람이나 다른 동물에 대한 반응이 활발하다.
C03	불안	Restlessness	안정되어 있지 않고 안절부절 하는 상태가 계속된 상태, 중추신경의 자극, 신체 특히 내장의 동통, 이상, 변의(便意) 등을 반영한다. 경련의 전구증상이 있음
C04	과민	Hypersensitivity	불안과 같이 이상한 흥분을 나타내는 증상. 불안은 사유상자 밖에서 관찰되지만 과민은 조작에 의해서 유발되는 피자극성이 항진된 상태. 만지거나 빛, 소리 등의 자극에 대하여 발성, 공격 등을 나타낸다.
C05	공격성	Agression	흥분이 고조된 상태, 손을 내밀면 물거나 하는 공격성을 보인다.
C06	투쟁	Fighting	동물끼리 공격하는 것을 말함. 복수동물이 동거할 경우 볼 수 있으며 수컷동물에서 많다.
C07	생기저하	Inanimation	비교적 정도의 정신적 또는 신체적 이상 때문에 활동이 억제되어 자극에 대한 반응 또는 원기도 없는 상태, 생기 없음.
C08	의식장애	Cloudiness	주변상황에 대한 이해 및 반응이 저하된 상태. 자주 조는 듯한 상태를 동반. 또한 장애의 종류와 정도에 따라서는 반사기능이나 호흡, 순환기능의 이상도 나타날 수 있다.
C09	무관심	Indifference	자극에 대한 민첩한 반응성이 없는 상태. 사료 및 물섭취, 사회적 행동에 의욕이 없음
C10	혼미	Stupor	자극에 대한 반응성이 저하되어 강한 자극 외에는 반응하지 않는 상태
C11	혼수	Coma	강한 자극에도 반응하지 않는 가장 심한 의식장애

Code	전신적 증상		해 설
C12	수동성	Passivity	조작 등에 저항하지 않고 조작된 상태 그대로를 유지하고 있는 상태. 의식혼탁의 상태에 따라 수동성의 정도가 다르게 나타난다.
C13	착란	Confusion	의식이 혼탁한 상태에서의 행동, 특히 주위환경에 대한 이해 없이 무의미한 행동을 하는 상태를 말한다.
	수면	Usual sleep	생리적 수면은 원칙적으로 일정주기로 나타나고 적당한 자극에 의해 각성할 수 있다. 또한 수면중에는 각종 반사 및 호흡순환 등은 정상상태에 있다. 그러나 중추신경기능의 억제가 수면의 형태로 나타나는 병적인 경우에는 자극의 반응성저하 등 의식장애를 나타낼 수 있다.
C14	졸음	Somnolence	잠이 들어 꾸벅 꾸벅거리고 있는 상태, 잠이 얕고 자극에 대하여 둔하지만 쉽게 반응한다.
C15	혼면(昏眠)	Sopor	깊이 잠든 상태. 자극에 대해 각성하지 못함
C16	기면(嗜眠)	Lethargy	잠이 지속되는 상태. 자극에 대해 각성하지만 바로 잠이 든다.
C17	진정	Sedation	진정은 수면상태로 이행하기 쉽지만 원칙적으로 각성되어 있고 통증이나 공포에 의한 불만이 억제되어 있는 상태다. 이런 상태에서는 자발운동은 저하되며 자극에 대한 반응도 둔해진다.
D	행동	Behavior	
	사회적행동	Social behavior	사육상자내 여러 동물이 있을 때 동물들 간에 대하는 태도
	접촉행동	Contact behavior	새로운 동물이 2마리가 같은 사육상자내 있을 때 서로 냄새를 맡고 가볍게 서로 접촉하는 행동

Code	전신적 증상		해 설
T05	무뇨	Anuria	배뇨가 완전히 보이지 않는 상태. 정의에서는 무뇨는 신장에서뇨가 생성되지 않는 것을 말한다. 신혈류량의 현저한 감소, 고도의뇨세관장애에 의해 일어난다.뇨는 생성되나뇨로 통과장애에 의해 일어나는뇨폐와는 구별된다.
T06	혈뇨	Hematuria	이상적으로 다수의 적혈구가 혼입해있는뇨로 방광, 사구체 또는뇨세관장애때의 적혈구가 누출되어 일어난다.
T07	적색뇨	Reddish urine	적색의뇨로적혈구 또는 혈색소가 없는 것을 확인한다. 피검물질에 의한 적색착뇨의 경우도 있다.
T08	혈색소뇨 헤모글로빈 뇨	Hemoglobinuria	무언가의 원인으로 대량의 적혈구가 파괴되 유리한 혈색소가 간장, 비장중에 모두 수용하지 못해뇨중에 배설된 것.뇨는 적갈색 내지 암갈색을 띠고 다량의 단백질을 포함하나 적혈구는 없다. 그러나 혈색소의 침전이 과립상, 괴상 또는 원주상으로 존재한다. 물과 같은 정장액을 정맥내 투여하면 혈관내 용혈 때문에 혈색소뇨가 보이나 이것은 신질환은 아니다.
T09	녹색뇨	Glucosuria	트립토판의 장관내 분해물 때문에 녹색의 색조를 띠는뇨.
T10	착색뇨	Chromaturia	뇨중에 이상한 색소가 배설되어 생긴다.
T11	농뇨	Pyuria	농이 혼입된뇨. 농은 농장 및 농구로 되어있고 농장은 삼출된 혈장성의 체액성분으로 항체 또는 단백분해효소를 포함하고 농구는 세포성분으로 주로 백혈구 및 그들이 변성한 것이다.

Code	진신적 증상		해 설
T12	농축뇨	Oligohydruria	농도가 이상하게 높은뇨. 즉 고비중 뇨이고 열성병, 신염 등의 경우에 뇨량은 감소해 비중이 높아진다. 당뇨병의 경우에는 뇨량도 많아지고 비중도 높아진다.
T13	혼탁뇨	Cloudy urine	뇨가 흰것같이 혼탁해있다. 백탁뇨(white turbid urine)이라고도 한다. 토끼에서는 정상이다. 토끼의 뇨에는 결정성의 성분으로 triple phosphate, calcium, carbonate을 함유한다.
T14	대변실금	Involuntary defecation	대변의 배설억제가 불가능한 상태. 척추질환에 의한 직장점막의 자각장애, 항문반사장애, 괄약근의 손상 등의 원인에 의해 일어난다.
T15	탈분	Defecation	처치후에 보이는 배변행동으로 정상적인 것이 아닌 변화가 발생한 경우를 말한다.
T16	연변	Soft stool	정상변보다도 부드러운 설사로는 되지 않는 정도의 변. 변은 일단 형태를 형성하고 있다. 부드러움은 하나 일부원형을 지키는 상태.
T17	설사	Diarrhea	수분이 많은 액상 또는 액상에 가까운 변을 배설하는 것으로 항문주위에 변이 부착해 있는 것으로도 확인된다. 장관내에 흡수되기 힘든 고침투압성의 물질이 다량으로 존재하는 경우, 장관으로의 분비가 이상으로 항진한 경우, 장관점막의 투과성이 이상적으로 항진한 경우 장관운동의 이상에 의한 경우등이 있다.
T18	수양변	Watery diarrhea	물과 같은 변,대량의 장액에 의해 부드럽게 된 분변이 배설된다.
T19	죽상변 니상변	Pasty stool Muddy stool	액상변과 연변의 중간상태
T20	점액변	Mucous stool	다량의 점액을 포함한 끈적한 변. 붕등으로 찍으면 묻어나는 상태
T21	포말변	Spluttery stool	기포가 혼입한 상태의 변

Code	전신적 증상		해설
T22	혈변	Bloody stool	혈액이 혼입한 상태의 변
T23	점혈변	Mucous and bloody stool	점액과 혈액이 부착된 분변
T24	적색변	Reddish stool	붉은색을 띤 변(혈구가 확인된 경우는 혈변으로 한다) 시험물질 또는 그 대사물 등의 영향 때문에 혈변처럼 보이는 경우가 있다.
T25	흑색변	Blackish stool	흑색점조(콜타르상태)를 띤 변으로 소화관의 출혈을 의심시킨다. 토끼의 점막피막변(토끼의 연분)은 정상이므로 제외한다.
T26	회백변	Grayish stool	회거나 회색같은변. 시험물질이 혼입한 경우 또는 담도 폐색의 때에도 보인다. 토끼에서는 백탁뇨로 오염되어 보여진다.
T27	녹색변	Greenish stool	녹색을 띤 변,담즙을 많이 포함한 분변, 공복상태가 길면 보인다.
T28	무변	No stool	트레이 등에 장시간 변이 보여지지 않는 상태. 공복상태가 길면 보인다.
T29	제리상변	Jelly like stool	제리상의 부드러운 변. 장에서 담즙색소를 혼입하지 않고 배변된 것. 젤라틴 캡슐이 분해되지 않고 배설되는 경우에 제리상변에 유사한 경우가 있다.
T30	약물 혼입 변	Compound-colored feced	시험물질이 원인으로 착색된 변. 배변후 시간의 경과에 따라 변색하는 경우 또는 분무된 소독액과 피검물질이 반응하여 발색하는 것도 있다.
T31	이취	Odor	항문선으로부터 분비하는 불쾌한 냄새. 예를들어 개에서는 흥분 또는 경악한 때에, 토끼(음부의 양측의 서경선 inuinal glands)에서는 변식기에 이취를 발산한다.

D. 사료급여 및 사료 섭취량의 측정

1. 목적

본 SOP는 사료 급여작업 및 사료섭취량 측정을 보다 정확히 실시하여 재현성 있는 정확한 자료를 얻기 위하여 제정한다.

2. 사료급여 작업

2.1. 준 비

사료, 급이기, 운반차, 식별용품을 준비한다. 이 때 사료는 유효기간과 종류를 확실히 확인하고 기저재들도 멸균후 사용기간 이내의 것들을 사용한다.

2.2. 실시순서

1) 분말사료의 경우

- (1) 사육실에 사료를 운반해 놓고 급여한다.
- (2) 사료를 급이기에 충전후 1일 이상 보관할 경우는 동물번호를 기입한 카드 또는 식별테이프를 이용하여 구분한다.
- (3) 급이기에 사료를 충분히 넣어 다음 급여 때까지 급이기에 사료가 고갈되지 않도록 한다.
- (4) 작업종료 후 주변을 청소하고 정리, 정돈한다.

2) 고형사료의 경우

- (1) 사료를 사료운반차를 이용하여 사육실 안으로 운반한다.
- (2) 급이기에 고형사료를 충전하고 사육상자에 넣어준다.
- (3) 작업종료 후 주변을 청소하고 정리, 정돈한다.
- 3) 사료의 충전기록: 사료급여 기록지에 급여일을 기입하고 서명한다.

3. 사료섭취량 측정작업

3.1. 정량급여 및 잔량측정

사료섭취량을 측정할 필요가 있을 경우는 사료를 사육상자에 넣기 전에 급이기와 함께 중량을 측정하여 정량을 급여한 후 익일에 사육상자에서 꺼내면서 잔량을 측정한다.

3.2. 사료가 다량으로 흘러질 경우의 처치

- 1) 사료의 급여후는 잘 관찰하여 사료의 흘림이 적도록 주의한다.
- 2) 흘림이 과다하게 많을 경우는 동물관리책임자에게 연락하고 아래의 보정을 행한다.
- 3) 섭취량의 보정
 - (1) 분, 뇨 또는 물의 혼입이 없이 회수 가능한 경우는 흘러진 사료를 회수하여 저울을 가지고

그 양을 측정한다. 또는 기록을 남긴다.

(2) 분, 뇨 또는 물이 혼입되어 회수 불능인 경우는 흘러진 사료를 잘 말린 후 분변을 분리하고 남은 잔량을 측정한다.

(3) 잔여량 측정시에 이 흘러진 양을 잔여량에 가산시킨다.

4. 자료의 처리 및 순서

1) 통계학적 방법에 따라 사육상자별 섭취량, 개체별 섭취량 또는 군별 섭취량을 계산한다.

2) 위의 각 항목에 대해서 계산하고 사육상자별 섭취량, 군평균 섭취량 및 기타 통계학적 해석시에 발생하는 각종 장표를 출력한다(사육상자별 측정시).

3) 장표의 각 수치와 기록지의 수치를 대조 확인하고 데이터가 합리성이 부족하거나 잘못되었으면 동물관리책임자에게 보고하고 그 지시에 따른다.

5. 자료의 정리와 보관

5.1. 사료급여기록지

자료의 발생순으로 철하여 보관한다.

5.2. 급여량 및 잔여량 측정기록지 (사료 섭취량측정 인자데이프 부착지)

1) 기록지를 측정순, 군번호순 및 자료의 발생순으로 철한다.

2) 기록지를 2개 이상으로 절단할 경우는 각 절단부분의 각각에 측정일을 기재한다.

3) 컴퓨터로 직접 입력한 경우에는 출력장표를 기초자료로 사용한다.

6. 이상시의 처치

6.1. 측정치의 이상

전후의 측정치와 비교하여 또는 체중증가량 및 일반상태 등에서 비교하여 측정치가 타당성이 결여된 경우는 그 내용을 동물관리책임자에게 보고하고 지시를 받는다.

6.2. 기기의 이상

전자저울의 이상을 발견하였을 경우는 그 내용 및 발견일을 기기 및 설비 사용기록지에 기록함과 동시에 해당사육구역의 관리책임자에게 보고하고 지시를 받는다.

7. 보관기록

1) 사료급여 기록지

2) (체중, 사료 섭취량, 물 섭취량)측정 인자데이프 부착지

- 3) 컴퓨터 출력장표
- 4) Balance 정도관리 인자테이프 부착지

E. 물의 급여 및 물 섭취량의 측정 SOP

1. 목적

본 SOP는 물 급여작업 및 물섭취량 측정을 보다 정확히 실시하여 재현성 있는 정확한 자료를 얻기 위하여 제정한다.

2. 물 급여 작업

2.1. 준비

물(자외선 유수살균장치 및 미세여과기를 통과한 것을 20초 정도 흘러 버린후 사용), 물병, 노즐(멸균후 3개월 이내의 것)

2.2. 실시순서

- 1) 새로운 물병 또는 사용중인 물병을 수도꼭지가 있는 곳까지 운반한다.
- 2) 물을 물병에 가득 채운다.
- 3) 물이 가득찬 물병을 사육상자 있는 곳까지 운반하여 각각의 사육상자에 꽂아준다.
- 4) 작업종료후 주변을 청소하고 정리, 정돈한다.

3. 물 섭취량 측정 작업

3.1. 정량급여 및 잔량측정

시험계획서에 따라서 물 섭취량을 측정할 필요가 있을 경우는 급여 작업시에 충전된 물병을 사육상자에 꽂아주기 전에 물병을 노즐과 함께 정량을 측정한 후 급여하고 익일에 잔량을 측정한다. 전자저울의 사용전에는 반드시 체중측정에 관한SOP에 따라 calibration을 실시한다.

3.2. 다량의 누수 혹은 노즐이 막힌 것이 관찰된 경우의 처치

동물관리책임자에게 연락하고 지시에 따라 조치한다. 이상이 있는 물병 및 노즐은 폐기처분한다.

4. 자료의 처리 및 순서

- 1) 통계학적 방법에 따라 사육상자별 섭취량 또는 군별 섭취량을 계산한다.
- 2) 위의 각 항목에 대해서 계산하고 사육상자별 섭취량, 평균 섭취량 및 통계학적 해석시에 발생하는 각종 장표를 출력한다(사육상자별 측정시).

3) 자료의 대조, 확인 : 장표의 각 수치와 기록지의 수치를 대조 확인하고 데이터가 합리성이 부족하거나 잘못 입력되었으면 시험책임자에게 보고하고 그 지시에 따른다.

5. 자료의 정리와 보관

5.1. 급여량 및 잔여량 측정기록지 (물 섭취량측정 인자테이프 부착지)

1) 기록지를 측정순, 군번호순 및 발생순으로 철한다.

2) 기록지를 2개 이상으로 절단할 경우는 각 절단부분의 각각에 측정일 동물번호를 기재한다.

3) 컴퓨터로 직접 입력한 경우에는 출력장표를 기초자료로 사용한다.

6. 이상시의 처치

6.1. 측정치의 이상

전후의 측정치와 비교하여 또는 체중증가량 및 일반상태 등에서 비교하여 측정치가 타당성이 결여된 경우는 그 내용을 동물관리책임자에게 보고하고 지시를 받는다.

6.2. 기기의 이상

이상을 발견하였을 경우는 그 내용 및 발견일을 기기 및 설비사용기록지에 기록함과 동시에 해당 사육구역의 관리책임자에게 보고하고 지시를 받는다. 컴퓨터의 이상이 발견되면 컴퓨터실의 전산담당자에게 연락하여 지시를 받는다.

7. 보관기록

1) (체중, 사료섭취량, 물섭취량)측정 인자테이프 부착지

2) Balance 정도관리 인자테이프 부착지

F. 토끼의 체중측정 SOP

1. 목적

본 SOP는 전자저울과 Terminal computer를 이용한 체중측정 작업 및 전자저울을 이용한 체중측정 작업에 대하여 정한 것으로 보다 정확한 자료를 얻기 위하여 제정한다.

2. 준 비

컴퓨터, 전자저울, 전자저울용 프린터, 필기용구, 소독용품, 분동

3. 측정의 실시

3.1. 주의사항

1) 모든 기기의 연결이 확실하게 되어있는지 확인한다.

2) 측정전에 저울이 정상적으로 작동하는가 확인하기 위하여 분동을 이용하여 calibration을 반드시 실시한다. 측정전 calibration은 0점을 tare key를 눌러 확인하고 분동을 올려놓아 분동의 무게가 정확히 읽혀지는 것을 확인한다. 증거의 기록을 남기기 위해 0점 조정된 taring상태를 3회, 분동을 측정할 것을 5회 출력한다.

3) 만일 측정중에 전자저울의 plate가 움직였거나 전자저울의 위치를 옮겼을 경우에도 영점과 calibration을 다시 확인한다.

4) 측정시에는 측정일, 동물번호, 각각의 출력치를 확인하여 정확하고 타당한가를 항상 확인한다.

3.2. 측정순서

1) 동물을 사육상자에서 꺼내어 전자저울에 올려놓는다.

2) 전자저울 또는 컴퓨터의 키를 눌러 저울에 읽힌 체중을 출력시키거나 컴퓨터로 읽어들이는다.

3) 동물을 원래의 사육상자에 위치시키고 다음의 동물을 꺼내어 저울에 올려놓고 측정 작업을 반복하여 실시한다.

4) 측정이 종료되면 모든 사육상자가 제 위치에 놓여있고 동물이 탈출하지 못하게 되어있는 것을 확인하고 기기를 소독하여 정리 정돈한다. 소독시 열선용 인자테이프의 경우 알코올이 접촉되지 않도록 특별히 주의한다.

4. 자료의 정리

4.1. 인자테이프

인자테이프에 기재되어있는 사항을 확인하면서 측정일, 군번호 순으로 정리하여 체중측정 인자테이프 부착지에 부착하여 보관한다. 컴퓨터를 이용하여 입출력한 경우 인자테이프는 필요하지 않다.

4.2. 장표

인자테이프와 정합성을 확인한 후 각 장표 (개체별 data 및 군별 data)를 장표 file 목차에 따라 정리, 편집하여 보관한다.

5. 이상시의 처치

5.1. 측정치의 이상

측정치가 전회 측정치 또는 여러 상황을 비교하여 타당하지 않을 경우는 동물관리책임자에게 보고하고 그 지시를 받는다.

5.2. 저울의 이상

저울의 이상이 발견되면 기기 점검표에 기록, 서명하고 신속하게 동물관리책임자에게 보고하고 그 지시를 받는다.

5.3. 컴퓨터의 이상

이상이 발견되면 컴퓨터실의 전산담당자와 동물관리책임자에게 보고하고 지시를 받는다.

6. 보관기록

- 1) (체중, 사료 섭취량, 물 섭취량)측정 인자테이프 부착지
- 2) Balance 정도관리 인자테이프 부착지
- 3) 컴퓨터 출력장표

G. 토끼의 사육관리작업 SOP

1. 목 적

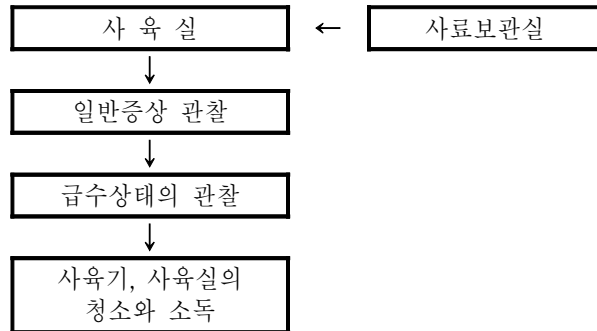
본 SOP는 토끼의 사육관리를 원활히 수행하기 위하여 제정한다

2. 작업모식도

2.1. 사람의 입, 퇴실 작업공정 모식도



2.2. 사육 작업공정 모식도



3. 사람의 입퇴실 방법

3.1. 입퇴실

입출에 관한 SOP에 따른다.

3.2. 주의사항

1) 세탁, 소독

- (1) 동물실내의 작업복, 모자는 사용후 반출하여 세탁한다.
- (2) 마스크는 일회용을 사용하는 것을 원칙으로 한다.
- (3) 각 출입구에 있는 소독용 세면기와 소독액은 매일 교환한다.
- (4) 갱의실의 청소는 주 1회 이상 한다.

2) 금지사항

- (1) 동물실내 작업의를 착용한 채 사무실의 출입은 금지한다.
- (2) 검역실의 문은 동물입하, 사육상자 교환을 하기위한 것의 반입, 반출 등의 특별한 경우를 제외하고는 개방을 금지한다.

4. 사육 작업의 방법

4.1. 사육환경과 동물의 관찰

- 1) 사육실에 입실하고 이상음의 유무, 공조의 상태, 취기의 유무, 온·습도, 사육상자, 사육상자대의 세트상태를 점검한다.
- 2) 급수 노즐에서의 누수, 사료의 흩어짐 등을 관찰한다.
- 3) 이상이 인정된 동물의 처치는 이상동물의 처치법에 따른다.

4.2. 급 이

- 1) 사료는 사료통을 이용해 누수와 먼지에 의한 오염이 되지 않는 장소에 보관한다.

- 2) 사료통은 청소하여 청결히 하여야 한다.
- 3) 필요에 따라서 사료 보관실에서 사료 운반차로 사료를 사육실로 운반한다.
- 4) 바닥에 흘린 사료를 청소한다.
- 5) 사료는 성분변화 방지를 위해 제조일부터 1년 이내에 소비한다.

4.3. 사육실, 사육기 및 각종 기구의 청소와 소독

1) 사육실

- (1) 실내의 청소는 매일한다. 바닥과 배수통을 청소하고 소독액(마이크로과트 300배 희석액, 락스 200배 희석액, 볼텍스 200배 희석액)을 살포한다.
- (2) 사육실 입구에는 소독조와 소독용 세면기를 설치하여 질병의 전파를 방지한다.

2) 사육기(자동 수세식)

- (1) 사육상자대의 청소는 매일한다(털, 노 및 기타의 오염).
- (2) 급수탱크의 세척은 월 1회 실시한다.
- (3) 사육 상자대 전체의 청소, 소독은 6개월마다 실시한다.

3) 사육상자

- (1) 동일 사육상자 의 연속사용은 3주간 이하로 한다.
- (2) 오염의 정도에 따라 즉시 교환하여 동물의 체모가 더럽혀지지 않도록 주의한다.
- (3) 사육상자의 세정은 솔로 오염물을 제거시키고 소독액을 분무하고 (30~60분 방치) 세정한다.

4) 주의사항

- (1) 토끼는 가능한 한 시험목적별로 정돈한 사육상자에 수용한다.
- (2) 사육실 입구 문의 개폐는 최소한으로 줄인다.
- (3) 외부자의 사육실로의 출입은 원칙으로서 금지하고 어쩔 수 없을 때는 동물관리책임자의 허가를 받고 입퇴실의 순서에 따른다.

5. 사육상자대의 사용방법 및 공조기 점검

5.1. 사육상자대(자동수세식)

- 1) 사육상자대의 상태와 수세기능의 여부를 확인하며 1일 6~8회 수세시킨다.
- 2) 급수탱크에 물이 충만되어 있는지 어떤지를 확인한다.
- 3) 급수탱크에는 언제나 완전히 뚜껑을 닫는다.

5.2. 공조기

- 1) 공조상태를 점검한다(작동유무, 상태 등).

2) 공조기의 이상에 관해서는 시설과에 수리를 의뢰한다.

6. 사육기재의 점검방법

6.1. 점검해야할 사육기재

- 1) 사육환경기재 : 흡기구, 배기구 등의 상태를 점검한다.
- 2) 소독, 살균기재 : 분무기, 살균등, 각종 소독액
- 3) 사육기재 : 자동수세 사육기, 사육상자, 먹이통, 급수병, 사육카드, 저울, 점검표, 필기구.

6.2. 점검방법

점검은 동물실 사육기재 점검표에 따라서 매월 1회 보수, 동물실 사육기재 점검표에 점검한다.

6.3. 기록

- 1) 점검일, 점검자명을 기입한다.
- 2) 정비 불량, 고장시는 점검표에 기입하고 동물관리책임자에게 즉시 보고하고 지시를 받는다.

7. 사육시의 제검사법

7.1. 섭이상태

매일 먹이통의 오물, 변 등에 의한 오염유무를 조사하고 오염되어 있으면 교환한다.

7.2. 일반증상의 검사

섭이상태의 관찰 후 각 사육상자의 문짝을 열고 아래의 표를 참고로 하여 관찰한다(토끼 : 일 1회, 기타 : 필요시).

검사부위	이 상
체모	입모, 탈모, 더러움
비공	콧물, 출혈
안구	눈꼽, 눈의 백탁
귀	외상, 이개염
사지	만곡, 뒷꿈치의 외상
항문	하리, 혈변
복부	팽만
치아	부정교합

7.3. 이상동물의 범위

1) 검사시기

- (1) 검역 및 순화기간에 검사한다.
- (2) 순화기간 이후에 발생한 이상은 포함하지 않음.

2) 검사항목

- (1) 기형이나 대사이상 등의 유전적 소인에 의한 것 : 소안, 백내장 등
- (2) 사료 및 물의 공급 실수 등의 영양학적 장애에 의한 것 : 빈약
- (3) 물리화학적 인자에 의한 것 : 사육상자 등에 의한 상해, 취급실수 등에 의한 상해
- (4) 기생충이나 미생물에 의한 것 : 각종 질병

7.4. 이상동물의 처치방법

1) 살처분 동물의 항목

시험전의 동물로 아래의 항목이 인정되는 것.

- ┌ 이개염, 슬관절 탈구
- └ 다리의 손상, 섭식불량에 의한 고도의 체중감소.

2) 기타 처치를 하는 동물

시험중의 동물에 질병 등이 인정될 경우는 동물관리책임자 또는 검역책임자와 협의하여 처치를 결정한다.

3) 기록과 보고

- (1) 사망이나 기타 이상소견이 발견되었을 경우는 사망·빈사동물 기록지에 기입한다.
- (2) 사망이나 기타 이상소견은 즉시 동물관리책임자에게 보고한다.

7.5. 시험동물의 도태방법

1) 주의사항

시험동물의 도태는 시험동물의 마취 및 안락사에 관한 SOP에 따라 실시한다. 동물의 도태는 가능한 한 단시간내에 동물에게 고통을 주지 않는 방법으로 실시한다.

2) 약제 주사법

염산 프로카인의 15% 수용액 2ml를 이정맥이나 심장내에 주입하면 급사한다.

3) 마취제에 의한 안락사

마취제를 과량 정맥내 투여하여 안락사 시킨다.

8. 보호구의 종류와 취급방법

8.1. 각 작업에 사용하는 보호구

1) 동물의 취급작업과 사육실의 청소 : 수술의, 모자, 작업복, 장화, 수술용 고무장갑이나 면장갑, 마스크

2) 사육상자 등의 세척작업 : 모자, 장화, 방수에프론, 면장갑

3) 사육상자 의 멸균작업 : 면장갑, 장화

8.2. 사용후의 처치

1) 수술의, 작업복, 바지, 모자

한 번 사용한 모든 의복 및 보호구는 세탁하고 멸균을 실시한다.

2) 수술용 고무장갑

일회용으로 사용후 폐기처분한다.

3) 장화, 방수앞치마, 면장갑

세척후에 건조하여 소정의 위치에 놓는다.

4) 마스크

일회용을 사용하므로 한 번 사용하고 버린다.

9. 보관기록

1) 동물실 사육기재 점검표

H. 이상사태 발생시 조치 SOP

1. 목적

본 SOP는 동물사육구역에서 정진, 단수 및 화재 등의 사고가 발생하였거나 천재지변으로 인한 재앙이 발생하여 사육환경의 이상과 동물관리자의 안전을 위협하게 되었을 때 경제적인 피해를 적게 하고 동물애호적인 차원에서 정확하고 신속한 조치를 취하기 위하여 제정한다.

2. 이상사태의 종류

1) 사고 : 정진, 단수, 화재, 환경의 이상, 사료의 이상, 곤충 또는 외부동물의 침입, 동물관리의 다침

2) 천재지변 : 침수, 지진

3. 사육환경

온도, 습도, 환기횟수, 실내압, 소음, 암모니아 취기 및 조도 등에 이상이 생겼을 경우는 설비 관리담당자에게 연락하여 조치를 취하도록 한다. 상세한 내용은 동물실의 환경제어에 관한

SOP를 참조한다.

4. 사료, 물

사료, 물에 이상이 발생하였을 경우 동물관리책임자에게 연락하여 조치를 취한다. 이러한 이상이 관찰된 사료와 물을 급여하였다면 발견 즉시 다시 수거하여 동물이 가능한 섭취를 못하도록 한다. 상세한 사항은 시험동물의 사료와 물의 사용에 관한 SOP를 참조한다.

5. 동물

1) 검역 혹은 순화기간 중에 있어서 이상동물, 빈사, 사망동물을 발견하였을 경우는 동물관리책임자에게 연락하고 동물관리책임자가 검역책임자에게 연락하여 처치에 대한 협의를 마친 후 처치에 대한 지시를 한다. 상세한 내용은 빈사, 사망 및 이상동물의 취급에 관한 SOP를 참조한다.

2) 동물이 사육상자를 탈출하였을 경우 동물실 외부로 나가지 않았다면 바로 본래의 사육상자에 원위치 시킨다. 동물실 외부로 탈출한 경우는 격리하여 도태시킨다. 상세한 내용은 사육관리 작업에 관한 SOP를 참조한다.

6. 상해발생시 조치

시험동물을 취급하는 사람이 사육구역 내에서 상처를 입거나 또는 신체에 변화를 가져왔을 경우는 응급처치를 실시하고 각 동물관리책임자에게 연락하고 증상이 심하면 지정병원으로 후송한다. 상세한 내용은 시험동물을 취급하는 사람의 안전위생에 관한 SOP를 참조한다.

7. 정전

갑작스런 정전이 발생하면 모든 작업을 중지하고 당황하지 말고 다시 전기가 들어올 때까지 기다린다. 정전상태가 5분 이상 지속되면 사육구역 내에 비치된 손전등을 이용하여 동물의 탈출을 막는 임시조치를 취하고 사육구역 외로 나온다. 정전상태를 설비관리담당부서에서 알고 있는 지를 확인하고 전파한다.

정전중에는 사육구역내로의 출입을 삼가 하며 동물관리책임자 또는 시험자는 10분 이상 정전되면 이상사태 기록지에 그 내용을 기록하여 보관한다.

8. 단수

작업도중에 단수가 발생하면 사용중인 모든 수도꼭지를 잠그고 기다린다. 단수상태가 10분

이상 지속되면 후속조치를 취하고 물의 급여작업을 중지한다. 만일 물병에 물이 없는 사육상자가 있어 급수될 때까지 물을 먹지 못할 것이 예측되면 물이 가득 찬 물병에서 반으로 나누어 급여한다. 이러한 조치로도 물의 양이 부족하면 외부에서 물을 멸균 반입하여 급여한다.

9. 화재

9.1. 발견, 연락, 소화, 피난

1) 화재가 발생하였을 경우 발견자는 즉시 부근 사람에게 연락하고 초기진화 하도록 노력하고 화재경보기를 작동시킨다.

2) 주변사람은 소화에 협력하고 화재가 확산하지 않도록 노력한다.

3) 소화작업시에는 냉정히 행동하고 사람의 안전에 힘을 기울이며 제 2차 화재방지에 노력하여야 한다.

4) 화재가 확산되어 초기진화가 어렵다고 판단되면 인명의 피해를 줄이기 위해 대피한다.

5) 동물실내에서 작업중에 화재발생시 출구가 막혔을 경우 피난시에 망치와 사육상자 혹은 사다리 등으로 비상용 유리창을 깨고 유리파편에 상처를 입지 않도록 주의하면서 대피한다.

9.2. 동물의 처치

1) 화재발생시는 주위에 혼란을 가져올 염려가 있으므로 우선 동물이 사육상자 밖으로 나오지 못하도록 단속을 실시한다.

2) 사람의 대피가 완료되고 동물을 구할 수 있는 기회가 생기면 화재진압자(소방대원)와 협력하여 최대한 동물을 구출하도록 노력한다.

3) 진화후 동물의 상태와 수를 관찰, 대조하고 다치거나 이상이 관찰된 동물이 발생한 경우 안락사 시킨다.

9.3. 사육구역의 복구

사육구역의 복구 작업은 동물관리책임자와 설비관리담당자를 포함하여 위원회를 열고 그 결과를 부문 동물관리자에게 지시를 한다.

9.4. 보고

1) 해당구역의 동물관리책임자는 이상사태의 내용 및 그 처치에 관한 내용을 이상사태에 관한 기록지에 작성하고 기관장에게 제출한다.

2) 기관장은 이 기록에 확인을 하는 날인을 하고 날짜를 기입하고 재발방지에 대한 조치를 취한다.

10. 침수

1) 폭우나 배관의 이상으로 인해 갑작스럽게 지하의 기계실이 침수가 되면 설비관리담당자 또는 첫 발견자는 안전관리과에 연락하여 조치를 취하도록 한다. 이 때 전원이 차단된 것을 확인할 때까지 침수된 곳의 물에 들어가지 않도록 한다.

2) 침수된 곳의 배수작업은 소방차와 양수기를 설치하여 실시하고 배수작업을 완료하면 깨끗한 물로 기기와 바닥의 더러운 곳을 청소 세척한다.

3) 청소세척후 환풍기 등을 설치하여 기기와 시설을 건조시키고 건조가 완료되었다고 판단되면 전원을 넣어 기기를 가동시킨다.

4) 설비관리담당자는 내용을 이상사태 발생기록지에 작성하고 기관장에게 제출한다.

11. 곤충의 발생

바퀴벌레, 파리, 모기 등의 곤충이 사육구역 내에서 발견되면 동물관리책임자와 협의하여 사용 살충제를 정하고 소독약 및 살충제의 사용에 관한 SOP에 의해 구제한다.

12. SOP에서 이탈되었을 경우

중요한 사항에서 SOP에서 이탈되어 시험동물의 환경에 영향을 미치는 변화가 발생하였을 경우 동물관리책임자는 동물실책임자에게 보고하고 동물실책임자의 지시에 따라 이탈의 내용 및 그 이유를 SOP 이탈기록지에 기록하고 필요한 경우 기관장에게 보고한다.

13. 기타 이상사태

상기 이외의 이상사태가 생겼을 경우는 각자는 독단으로 처치방법을 결정하는 일없이 동물관리책임자, 동물실책임자에게 또는 기관장의 그 지시에 따라 처치를 하고 기록을 남긴다. 다만 긴급을 요하는 경우에는 사람의 안전을 우선으로 고려하고 차선으로 동물의 안전을 고려하여 응급조치를 취한 후 각 책임자와 협의한다.

14. 자료의 정리, 보관

작성된 기록은 사태발생 작성부문에서 보관하고 필요시 사본을 필요한 부문으로 송부한다. 기록은 매년초 동물관리책임자가 취합하여 자료보관실로 이관한다.

15. 보관기록

- 1) 이상사태에 관한 기록지
- 2) SOP 이탈 기록지

나. 동물의 사육 및 위생에 관한 지침

A. 물품의 반입과 반출

1. 목적

본 SOP는 동물동의 사육구역내로 물품을 반입하고 반출하는 방법을 정한 것으로 사육구역 내의 오염을 방지하고 작업을 원활히 수행하기 위하여 제정한다.

2. 반입법

2.1. 반입시의 소독, 멸균의 종류

동물실내의 물품반입의 경우 물품의 종류에 따라서 적절한 방법을 사용하여 반입하도록 실시한다.

- 1) 고압증기에 의한 멸균법
- 2) 소독액 분무, 표면소독법
- 3) 소독액 침적법
- 4) 기타

2.2. 반입경로

반입경로는 착의실을 통한 입구 및 검역실을 통하는 2가지 경로가 있다.

2.3. 고압증기에 의한 멸균법

통상적으로 의류물은 정기적으로 (년 4회 정도) 고압증기 멸균을 시켜 착의실로 반입하여 사육시설 내에서 사용한다. 의류물은 멸균복, 양말 등 섬유류를 칭한다. 멸균된 물품의 보관 장소는 청결히 유지하고 작업후의 의류는 오염정도에 따라 반출, 세탁하거나 재 사용한다.

2.4. 소독액분무, 표면소독법 또는 소독액 침적법

대상시험기자재로는 사육상자, 수세식 사육기, 먹이통류, 초자기구류, 장화, 수세 가능한 실험기구 등에 한한다. 소독실시방법은 분무기 또는 침적할 수 있는 세척실 썩크조, 그 외 소독조 등에 의해 표면소독 또는 소독액을 분무한다. 통상적으로 소독용 약제는 부롬셋트, 파콤 A 락스를 이용하며 가능한 한 소독조에 침적 소독시는 충분한 시간을 유지하며, 특히 오염이 되기 쉬운 사육상자는 청소 세척 후 충분히 소독하여 건조시킨 후 반입한다.

2.5. 실험용 검사기기 또는 측정기기의 반입, 기타의 방법

실험용 검사기기 또는 측정기기와 같은 중요 검사기기 등의 반입시에는 가능한 한 청결을 유지하며, 표면이 알코올 등으로 처리 가능한 경우 기기에 손상을 주지 않는 범위에서 처리한다. 또한 반입 및 반출을 최대한 억제하고 가능하면 동물시설내에 청결히 하여 보관한다.

기타 책상, 대형기구 등의 반입은 분무 소독 등을 실시하여 표면 소독 후 반입한다.

3. 반출법

3.1. 각종 물품의 반출방법

각 실험실에서 사용이 완료된 것 또는 반출을 요하는 물품, 채취한 Sample, 문구류, 자료 및 폐기물 등의 오물은 다음과 같은 요령으로 반출한다.

1) 사육상자대 또는 동물사육기기

대부분의 경우 사육시설은 고정되어 있어 정기적 반출 소독이 어려운바 시험실내에서 청소소독을 실시하며, 경우에 따라 반출하는 경우는 검역실을 통해 반출한다.

2) 사육상자 및 먹이통류

실험기자재 운반기를 통하여 검역실을 통해 세척실로 반출한다.

3) 작업용 서류, 자료 및 시료

가능한 한 탈의실로 입실의 역순으로 반출하며 부득이 소독 등을 요하는 경우는 검역실로 반출한다.

4) 오물 및 폐기물

비닐봉투에 포장하여 검역실을 통해 반출하며 가능한 신속하게 폐기물 보관장으로 이송한다.

5) 대형기기류

검역실로 통한다.

3.2. 반출입경로

검역실 또는 탈의실로 한다. 또한 반출된 물품은 지정장소 (세척실, 검역실, 폐기물 처리 보관소)에 신속히 이송시킨다.

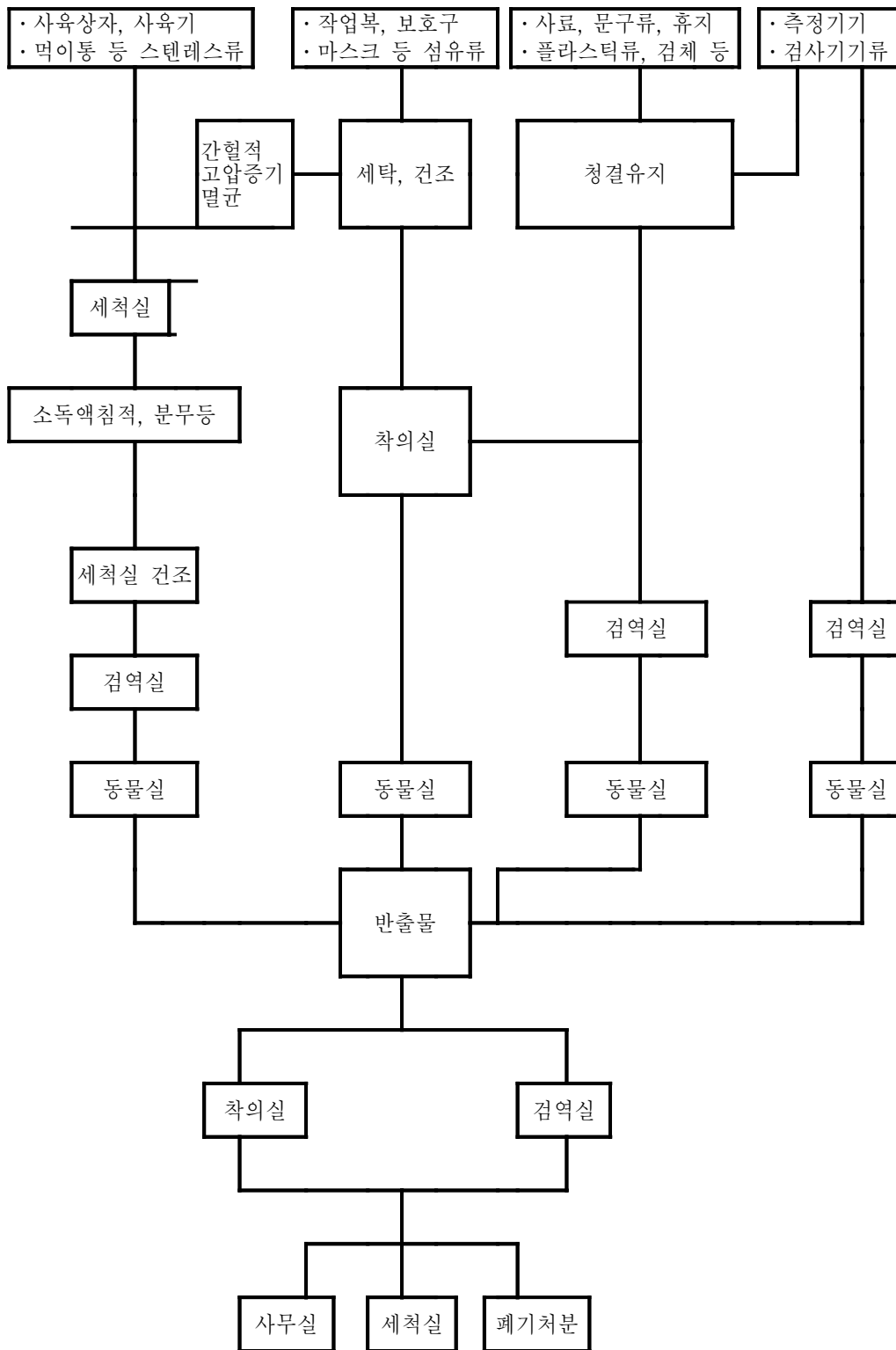
4. 검역시의 반출입

검역기간에 필요한 물건은 미리 준비하여 놓고 부득이 검역기간 중에 반출입하는 경우에는 검역실을 이용한다.

5. 자료의 정리 및 보관

발생한 관련 자료는 동물동의 자료보관함에 종목별로 정리, 보관한다. 또는 필요에 따라 다른 부문에 송부하는 경우도 있다.

<작업모식도>



6. 보관기록

- 1) 기기, 설비 사용 기록지

B. 동물사육구역의 청소, 소독 SOP

1. 목적

본 SOP는 동물실의 환경오염과 악취발생 등을 방지하고 청결하고 깨끗한 환경을 유지하기 위해 제정한다.

2. 정상시의 청소소독법

2.1. 준비물

- 1) 칠망사육상자의 경우 : 멸균된 신문지 혹은 이에 상당하는 것을 사용한다.

- 2) 폴리카보네이트 사육상자의 경우 : 멸균된 대패밥 또는 이에 상당하는 것을 사용한다.

- 3) 청소기, 빗자루, 쓰레받기, 대걸레 및 손걸레

빗자루, 대걸레 및 손걸레는 2주에 1회 멸균하여 사용한다.

- 4) 비닐봉투

오물 및 폐기물의 양에 따라 판단하고, 적당한 것을 사용한다(내용량은 약 5kg 이내로 한다.).

- 5) 소독약

해당구역의 동물관리책임자가 지정한 소독약을 이용한다.

- 6) 플라스틱제 양동이

- 7) 세정제 및 세정 브리쉬류

- 8) 관련기록용지

사육기재의 교환 기록지

청소, 소독 관계 기록지

- 9) 필기용구

검정볼펜을 사용한다.

2.2. 실시방법

- 1) 오물 수거물 교환

(1) 오물 수거물의 교환일의 간격은 사육상자 당 동물수에 따라 다르지만 최소한 3일에 1회, 폴리카보네이트 사육상자에 사용한 깔짚은 최소한 7일에 1회 이상 교환한다.

(2) 사용한 깔짚은 분변이 주변에 분산되지 않도록 주의하면서 비닐봉투에 수집하고, 깔짚을

깔아 놓는다.

(3) 깔짚의 경우에는, 새 깔짚을 깔은 새 사육상자에 동물을 옮기는 방법으로 교환한다.

2) 청소

(1) 진공청소기 또는 빗자루를 이용하여 바닥의 오물을 우선 제거하고 소독액을 묻힌 마대걸레를 이용하여 바닥을 닦아준다.

(2) 잘 지워지지 않는 오물이 부착되어 있는 경우에는 브리쉬류를 사용하거나 세정제를 이용한다.

(3) 당일에 사용된 운반상자, 저울 등의 기자재는 70% alcohol 용액을 이용하여 닦아준다.

3) 소독

(1) 일상적인 소독은 별도로 하지 않고 청소를 소독액을 이용함으로써 실시한다.

(2) 소독액에 담근 대걸레 및 손걸레를 적당히 짜서 동물실의 바닥면 및 기구·기재를 소독한다.

3. 정기적인 청소소독법

정기적인 청소소독은 매일 바닥을 청소하는 것 이외에 벽과 천정을 소독하고 배기 프리휠타를 청소하고 교환해 주는 작업을 의미한다. 일반적으로 배기 프리휠타는 2주에 1회 실시하고 벽과 천정을 1개월에 1회 또는 시험이 종료되면 실시한다.

3.1. 준비물

1) 접착테이프 : 종이 제품 또는 형질 제품을 사용한다.

2) 수송상자 : 비닐봉투 또는 종이제품을 사용한다.

3) 분무기 : 어깨걸이식, 핸드식 또는 기계식을 이용한다.

3.2. 실시방법

1) 동물의 처리 및 온습도 감지기의 보호

동물이 소독액 등에 접촉되지 않고 작업이 용이하도록 사육실의 중앙에 사육상자대를 위치시킨다. 온습도 감지기는 비닐과 접착테이프를 이용하여 소독액 등이 들어가지 않도록 한다.

2) 오물 및 폐기물의 수집

특수한 사육상자의 오물 및 폐기물 (잔여사료) 등을 비닐봉투에 수집한다.

3) 배기 프리휠타의 세척 및 교환

급배기 프리휠타를 떼어내기 전에 진공청소기를 이용해 먼지를 모두 제거한 후 시험실내의 싱크대 있는 곳까지 운반하여 소독액을 이용하여 세척하여 물기를 닦고 건조시킨다. 프리휠타의 손상이 있으면 새로운 것으로 교환한다.

4) 청소

바닥청소는 본 SOP의 2.2에 따라 실시하고, 벽과 천정은 손걸레를 소독액에 적셔서 닦아준다. 이 때 흡기구 주위, 차압덤편, 문틀 등을 함께 닦아준다.

3.3. 동물사육구역내의 복도 등의 청소소독

청정복도는 주 1회 동물사육실의 바닥청소와 같은 방법으로 실시한다. 청정복도의 벽 및 천정은 4주에 1회 소독액을 분무하여 소독한다.

4. 전 사육구역의 대대적 청소소독법

동물사육구역의 전체를 운영책임자의 판단에 의해 매 5년 단위로 대대적인 청소소독을 실시한다. 이때 약 2주간 동안 동물의 사육을 멈추고 필요에 따라 공조체계도 중지한다. 동물의 감염이나 이상사태가 발생한 경우에 검역책임자의 판단으로 대대적인 청소소독을 실시한다.

4.1. 준비

- 1) 집착테이프, 수송상자, 분무기
- 2) 소독약 : 소정의 소독약 및 포름알데히드
- 3) 방독마스크 : 고장 나지 않은 방독면, 간이형 또는 중장비형

4.2. 실시방법

1) 동물의 처리

계획적으로 실시하는 대대적인 청소시에는 해당 사육구역에 동물이 없도록 한다. 이상사태 발생시에는 해당 사육구역의 모든 동물을 반출하여 안락사 시킨다.

2) 사육기자재, 오물 및 폐기물의 처리

동물 사육실내의 모든 물품은 외부로 반출한다.

3) 배기 프리휠타의 세정 및 교환

본 SOP의 3.2.(3)에 따라서 실시한다.

4) 청소

본 SOP의 3.2.(4)에 따라서 실시한다. 다만 분무기를 이용하여 사육실의 전기시설을 제외하고 소독액을 분무한다. 이 때 온습도 감지기는 비닐과 집착테이프를 이용하여 소독액이 들어가지 않도록 한다.

5) 소독

소독액에 적신 걸레로 닦아주고 소독액을 분무한 후 아래와 같은 formalin 훈증 소독을 실시한다.

6) 훈증소독

훈증소독 실시전에 설비관리책임자에게 연락하여 공조 및 배기 체계를 조절한다. 훈증소독 2일째까지 입실시에는 방독마스크를 하도록 하고 이때 사용한 작업복은 버리도록 하여 손발의 소독에 더욱 철저한 주의를 기울인다. 또 훈증기간은 사육구역의 문에 "훈증중" 이라는 표시를 하고, 가능한 한 사육구역내의 출입을 금지한다.

(1) 배기뱃퍼를 닫고 밀폐하며 동시에 배기구를 비닐봉투와 접착테이프를 가지고 봉한다. 더욱, 훈증기간 중은 밀폐상태로 놓아둔다.

(2) 포르말린 포화용액과 과망간산칼륨을 반응시켜 가스를 발생시키는 방법으로 훈증소독을 실시한다.

(3) 가스를 발생시킨 후 외측문을 비닐테이프 등으로 밀폐시킨다.

(4) 24시간 이상 방치시킨다.

(5) 종료후 가스마스크 등의 보호구를 착용하고 급기구의 접착테이프와 비닐봉투를 제외시킴과 동시에 뱃퍼를 개방한다.

6) 수세

소독액을 고압분사하여 바닥, 벽면 및 천정의 잔류된 가스를 제거하고 살균된 상수도수를 이용하여 다시 한 번 세척한다.

4.3. 동물사육구역내의 복도 등의 청소소독

동물사육실과 같은 방법으로 실시한다.

5. 보관기록

1) 청소, 소독 관계 기록지

2) 정기적인 청소, 소독에 관한 기록

3) 이상 발생시의 청소, 소독에 관한 기록

C. 사육기재의 세척, 멸균, 취급 SOP

1. 목적

본 SOP는 토끼의 사육관리에 사용되는 사육기자재에 대하여 세척, 멸균 또는 소독 및 취급법에 대하여 기술한 것으로 사육기자재를 항상 청결히 유지하고 소독되고 멸균된 기자재를 사용하기 위하여 제정한다.

2. 사용기자재

사육기자재의 세척, 소독, 멸균 등에 사용되어지는 기자재는 다음과 같다.

2.1. 세척, 소독, 멸균용 기기

자동 사육상자 세척기, 고압증기 멸균기(E.O. gas 멸균기)-1, 전기 세탁기, 전동식 분무기, 충전식 배부 분무기, 수동식 분무기

2.2. 사육기자재 및 세척, 소독제

1) 사육상자

토끼 사육상자

2) 먹이통

토끼용 먹이통

3) 급수노즐,

직선형 또는 곡선형노즐

4) 운반차, 기타

운반차, 운반용 테이블, 먹이통 운반차, 깔개, 신문지, 카트

5) 보호구

작업복, 두건, 보안경, 속내의 상·하, 양말, 장갑, 고무장갑, 고무장화, 마스크, 타올, 슬리퍼, 방독면

6) 청소도구

플라스틱 사각대야, 플라스틱 양동이, 스텐 대야, 빗자루, 수세미, 비닐봉투, 걸레, 쓰레기 받이, 세탁용 세제, 세탁비누, 세척용 브러쉬, 앞치마, 전기청소기

7) 목욕용품, 화장품

헤어샴푸, 헤어린스, 스킨밀크, 목욕비누, 타월

8) 사육기자재, 세척제 : 인체에 무해한 세제(풍풍)

9) 소독, 살균제

마이크로콰트, 볼텍스, 포르말데히드, 치아염소산소다, 포르말린 가스, E.O. gas

10) 사 료

고형사료, 분말사료

3. 사육기자재의 세척, 멸균, 준비과정

3.1. 세척실의 입실법

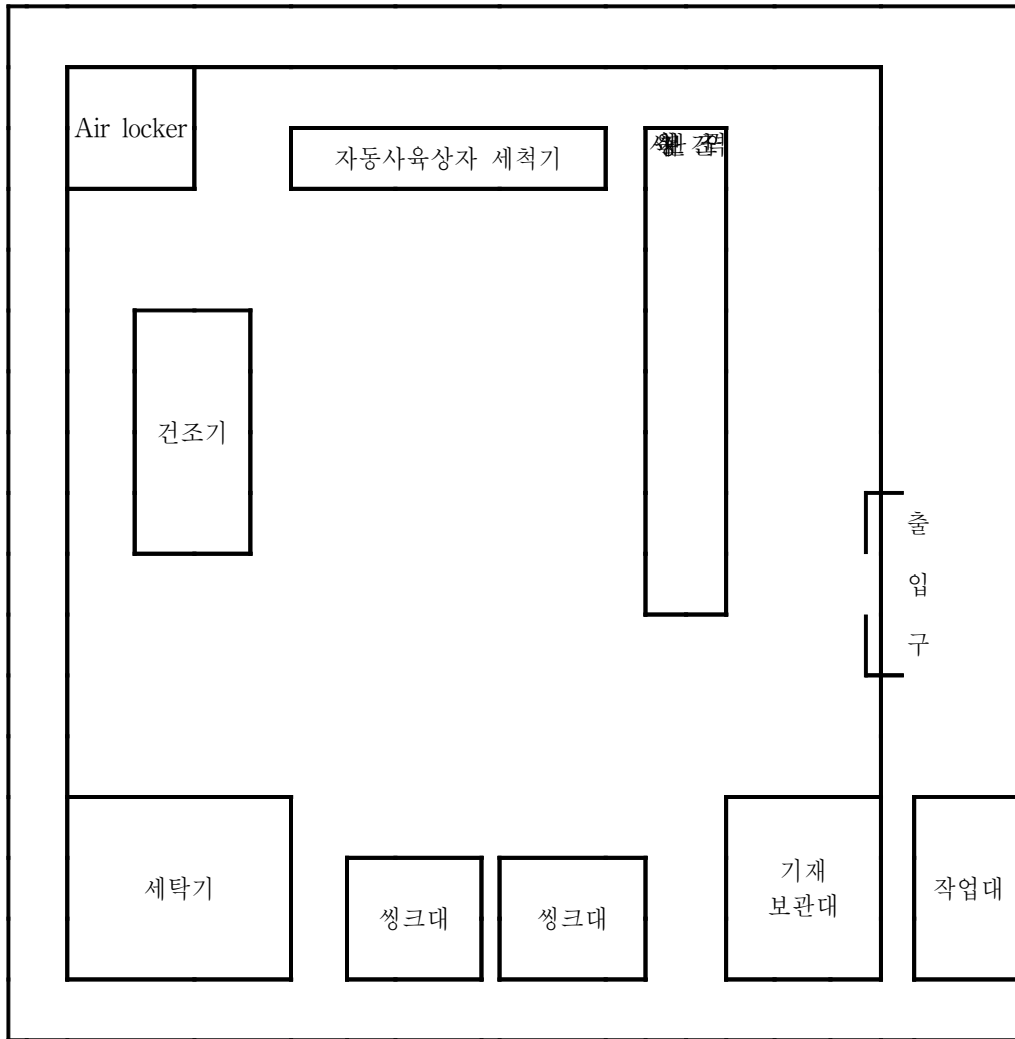
- 1) 입구의 형광등 스위치를 ON 으로 하고 형광등을 점등한다.
- 2) 중앙홀로 입실하여 문을 닫는다
- 3) 작업대 앞에서 외부 작업복(상, 하), 작업모자, 운동화 등을 벗고, 작업대에 정돈하여둔다.
- 4) 작업복, 흰 작업모자, 고무장화 등을 착용한다.

- 5) 고무장갑 또는 면장갑을 착용한다.
- 6) 세척실에 입실하고 형광등을 점등한다.
- 7) 배기용 fan 의 스위치를 ON 으로 한다.
- 8) 창문의 개폐는 실내온도, 습도에 따라서 적당히 실시한다.
- 9) 세척실 입구의 문은 개방을 엄금한다.

3.2. 세척실의 준비작업

1) 기자재의 보관장소

세척실에 있어서 기자재의 보관 장소를 다음 그림에 나타내었다.



2) 소독약의 조제

(1) 300배 소독액 : 소독약(1 리터용)을 70 ml을 취하여 넣어 이것을 양동이 20리터용 에 넣은 후 수도물을 양동이에 채워 희석시킨다. 또는 소독약 20 ml을 6리터의 물에 희석한다.

(2) 200배 희석액 : 소독약 100 ml을 취하여 양동이 20리터용에 넣은 후 수도물을 양동이에 채워 희석시킨다. 또는 소독약 30 ml을 6리터의 물에 희석시킨다.

3) 소독약 희석 조제액의 교환

(1) 300 또는 200배 희석 조제액을 소정의 세면기, 양동이, 분무기 등으로 보급한다.

(2) 세면기, 양동이 등의 희석 조제액의 교환에 매일 1회를 원칙으로 하지만, 사용빈도가 많은 경우 또는 혼탁해져 있을 경우는 그 때마다 교환하고 소독수 교환기록지에 기입한다.

(3) 분무기의 소독액은 주 1회 이상 교환한다.

4. 사육기자재의 세척공정

4.1. 기자재의 반출

1) 기자재의 반출은 물품의 반입출에 관한 SOP 및 입출에 관한 SOP에 기준하여 반출한다.

2) Air locker의 형광등, 살균등을 소등한다.

3) 창문을 통해 사용된 사육기자재의 유무를 확인한다.

4) Air locker로의 입실 전에 고무장갑, 장화, 마스크를 착용하고 지정소독약 희석 조제 액으로 손발을 담그고 소독한다.

5) 사용한 기자재를 신속하게 air locker 에서 꺼낸다.

6) Air locker 내외의 청소, 소독을 하고, air locker 내측에 설치된 분무기의 소독액이 충분한 가를 확인하고 문을 닫는다.

7) Air locker 외측벽에 설치된 분무기용 자동절환 스위치를 5분 정도로 조절하여 분무기를 작동시킨다.

8) 분무가 종료되면 형광등을 소등하고 살균등을 점등한다.

9) 반출한 기자재는 소정의 장소에 정리, 정돈하여 둔다.

4.2. 사육기자재의 세척

사육기자재의 세제는 [퐁퐁]을 사용한다.

1) 사육상자의 세척

(1) 반출된 토끼의 사육상자 받침대 및 깔판의 오물을 제거한다.

(2) 퐁퐁으로 세척한다.

(3) 퐁퐁으로 제거한 후 소독액으로 닦는다.

(4) 충분히 말린 다음 동물실에 반입한다.

(5) 다시 분무 소독후 물로 닦아낸다.

2) 먹이통의 세척

(1) 먹이통내의 남은 사료는 비닐봉투에 회수하고, 먹이통은 수조에 담근다.

(2) 하나씩 꺼내어 브러쉬와 수세미를 이용하여 세척한다.

(3) 세척이 끝난 먹이통은 철망상자 또는 먹이통 보관용 철망상자에 넣어 소정의 선반에 보관한다.

(4) 회수된 사료는 폐기물 보관 장소로 운반한다.

3) 시험기구의 세척

(1) 유리기구의 세척에 있어서 먼저 순서를 숙지하여 사고재해를 일으키지 않도록 주의하여 세척한다.

(2) 세척 브러쉬를 가지고 수조중에 잠겨있는 비이커, 실린더, 바이알병, 피펫트, 주사통, 원심분리관등의 용기 또는 기구를 세척한다.

(3) 세제로 씻은 용기 또는 기구는 방수중인 수도물로 충분히 씻어 내고 금속제 상자 또는 바구니에 넣어서 물기를 완전히 건조시킨다.

(4) 상기의 기구이외의 세척에 대해서는 그 때마다 동물관리책임자의 지시에 따라서 실시한다.

4.4. 전기세탁기의 취급

1) 운전 및 세탁

(1) 콘센트와의 접속을 확인하고 코드를 콘센트에 꽂는다.

(2) 소정의 장소에 놓여있는 세탁의뢰의 사육작업복, 타올 등의 세탁물을 세탁기에 넣고 전원스위치를 ON 시킨 다음 작동스위치를 누른다.

(3) Timer, 수세, 배수, 탈수 등의 자동 타이머를 set시킨다.

(4) 세탁, 탈수후의 건조는 건조기를 이용한다.

(5) 건조후 세탁물을 걸어 정리하고 소정의 장소에 보관한다.

5. 고압증기멸균기의 취급

5.1. 고압증기 멸균기

1) 점검

(1) 파손이 있는지 또는 기름기가 없는지를 확인한다.

(2) 문걸이 부착 핸들을 시계방향으로 돌리고, 딸각하고 정지할 때까지 돌아가는지 확인한다.

(3) 통체 내부에 녹이 슬거나 구멍 또는 금이간 것이 있는지 확인한다.

(4) 개폐표시 등의 점등을 확인한다. 표시등이 소등되어 있을 경우는 문의 개폐는 절대로 해서는 안된다.

(5) 문의 파킹이 틈에 확실히 들어있는지 확인한다.

(6) 파킹의 부착 상태와 손상 상태를 확인한다.

(7) 기록용지를 항상 비치한다.

2) 가동

(1) 동력 Main switch 를 ON 시킨다.

(2) 기계실내 시수라인 (청색띠)과 스팀라인 (적색띠) 밸브를 OPEN 시킨다. 완전 개방후 1/4 정도 닫아 놓는다.

(3) 코스선택(1, 2)을 멸균하고자 하는 성질에 따라서 선택한다.

- 코스 1 : 옷, 사료, 사육상자

- 코스 2 : 물병, 배지

(4) 멸균온도를 setting 한다.

(5) 멸균시간을 setting 한다.

(6) 건조시간을 setting 한다.

(7) 증기멸균 또는 gas 멸균 여부를 선택한다.

(8) E.O. gas 멸균할 경우 배기횟수를 10회에 놓는다.

(9) 전원 reset에 놓은 후 내측과 외측문이 완전히 닫힌 것을 확인한다.

(10) 모든 선택을 확인한 후 전원을 "입" 위치에 놓은 후 가동 스위치를 ON 시킨다.

(11) Autoclave 가 끝나면 부자소리를 확인하여 전원을 reset를 경유해서 차단한다.

(12) 시수라인과 스팀라인 밸브를 잠근다.

(13) 동력 main switch를 OFF 시킨다.

4) 멸균물품의 반입

(1) 멸균물품의 반입은 멸균기의 통 내로 정돈하여 반입한다.

(2) 반입시 통체내면에 부딪히거나 마찰 등 상처를 내지 않도록 할 것.

(3) 문걸이 핸들을 꼭 잡고 발밑을 주의하면서 문을 조용히 닫는다.

(4) 고압증기 멸균기 사용 기록, 정리

사용기록은 매회 사용시 기록하여야 하며 반입 및 반출자의 서명을 한다.

6. 준비작업

6.1. 기자재의 준비작업

1) 기자재의 준비

- (1) 사육기자재의 점검정비를 항상 실시하고, 파손된 것은 사용하지 않는다.
- (2) 사육기자재의 보관 장소를 항상 정리. 정돈하여 재고상황을 파악하여 둔다.
- (3) 동물수 및 측정항목에 기준하여 멸균, 반입 준비를 실시한다.
- (4) 고압증기 멸균기에 사육기자재를 반입할 경우는 규정량을 엄수한다.

2) 고행사료의 준비

지대포자된 고행사료는 고압증기 멸균하여 반입하고 이중 비닐 포장하여 방사선 멸균된 고행사료 또는 분말사료를 소독액을 이용하여, 비닐포장 표면을 소독시켜 pass box 또는 pass room으로 반입한다.

3) 급수병, 급이기의 준비

급수병과 급이기를 수용 용기 또는 철망 사육상자에 넣어 고압증기 멸균하여 반입한다.

4) 사육 작업복 및 기타 섬유류의 준비

세탁 .건조가 끝난 사육 작업복 및 타월 등은 의류 멸균용 운반대에 정리하여 고압증기멸균기로 멸균하여 반입후 착의실로 이용하여 정리, 보관한다.

6.2. 사육기자재의 멸균작업

- 1) 준비완료 된 사육기자재를 고압증기 멸균기에 반입한다.
- 2) 본 SOP 5항의 고압증기 멸균기의 취급에 기준하여서 사육기자재의 멸균을 실시한다.

7. 세척실의 청소. 소독업무 또는 퇴실

7.1. 세척실의 청소

- 1) 사육기자재의 정리. 정돈을 하고, 불필요하다고 생각되는 기자재가 있으면 동물관리책임자에게 보고하고 지시에 따라 조치한다.
- 2) 세척기기를 청소하고, 점검정비를 한다.
- 3) 바닥의 오물을 제거하고, 물로 씻는다.
- 4) 대걸레, 브롬셋트 또는 파콤-A 및 락스 200~300배 희석 조제액으로 바닥을 소독한다.
- 5) 문, 벽, 창, 배기구 등은 월 2회 청소한다.

7.2. 창고의 청소

- 1) 사료보관 장소 및 소모품 보관 장소를 정리. 정돈한다.
- 2) 바닥의 오물을 제거하고, 소독약 희석 조제액으로 청소한다.
- 3) 문, 벽, 선반 등의 청소를 월 1회 실시한다.

7.3. 살충제의 살포

- 1) 살충제는 원칙적으로 살포하지 않는다.
- 2) 단, 해충이 침입하여 동물실의 오염이 우려되는 경우는 사육구역 외부에서 살충제를 살포한다.
- 3) 살포할 때에는 가능한 한 사육기자재에 직접 닿지 않도록 주의하여 실시한다.
- 4) 살포기록은 살충제 및 살서제 사용에 관한 기록지를 이용한다.

7.4. 세척실에서의 퇴실법

- 1) 배기팬의 스위치를 "OFF"로 한다.
- 2) 사육상자 세척기, 전기세탁기 등의 전원 및 밸브를 "OFF"로 한다.
- 3) 출구문, 창 등을 닫고 확인한다.
- 4) 화기 등을 점검, 확인한다.
- 5) 착의장소에서 작업복을 탈의하여 소정의 장소에 보관한다.
- 6) 외부 작업복, 실내용 슬리퍼를 착용한다.
- 7) 형광등을 소등, 살균등을 점등하고 확인한다.
- 8) 세척실 문을 닫는다.

8. 일반적 주의사항

8.1. 사육상자 세척기의 취급

- 1) 사육기자재의 세척작업은 2인 작업으로 하고, 세척기의 시동 및 정지시는 반드시 신호 응답하고 확인한다.
- 2) 운전중에 이상이 인정될 경우는 즉시 기계를 정지하고 이상한 장소를 확인 후 기기관리 담당자에게 연락한다.
- 3) 정비, 점검 등을 실시할 경우는 반드시 기계의 정지를 확인하고 난후 실시할 것.
- 4) 전원 스위치의 조작은 젖은 장갑으로 절대로 실시해서는 안된다.
- 5) 바닥이 젖어 있으므로 미끄러지지 않도록 발밑을 주의할 것.
- 6) 세척기 주변은 항상 정리, 정돈해 둔다.

8.2. 고압증기 멸균기의 취급

- 1) 고압증기 멸균기는 고압 또는 고온증기 이므로 취급에 임해서는 본 SOP를 숙독하고 난 후 신중히 실시할 것.
- 2) 멸균종료 또는 폐문. 개문의 연락은 청정 준비실내 작업자와 정확히 연락을 취하고, 신호. 응답을 확인할 것.
- 3) 월 1회 반드시 담당자가 점검하며, 이상의 유무를 점검표에 기입한다.

4) 통체 및 계기 등에 이상이 인정될 경우는 즉시 운전을 중지하고 동물관리책임자에게 연락하여 지시를 받는다.

8.3. 세척작업

1) 세척작업 담당자는 정해진 보호구(작업복, 작업모자, 고무장갑, 고무장화, 수술용 마스크 등)를 반드시 착용할 것.

2) 세척실내, 창고 및 사육기자재의 보관 장소 등은 항상 정리. 정돈에 신경을 쓸 것.

3) 소독약 조제액의 교환은 원칙적으로 매일 행한다. 더러움이 현저할 경우는 그때마다 교환

4) 고압증기 멸균기에 의한 사육기자재의 반입출 작업시에는 멸균기의 고압, 고열 등에 의한 화상이 생기지 않도록 충분히 주의한다.

5) 사용이 끝난 기자재는 가능한 한 바로 세척하여 다음날까지 방치하지 말 것.

6) 멸균용 운반대는 항상 정비점검하고 안전한 상태에서 사용할 것.

7) 위험이 생기는 경우는 반드시 동물관리책임자에게 연락하고, 지시를 받을 것.

8) 세척기의 조작은 원칙적으로 2인 작업으로 하고, 시동 또는 정지시는 반드시 신호응답 확인을 취하며 행할 것.

9) 오물 등의 회수시에는 내용물이 포장 밖으로 나오지 않도록 이중으로 할 것.

10) 세척실은 항상 청소. 소독에 신경쓰며, 안전위생에 유의할 것.

9. 이상시의 처치

1) 정전의 경우는 즉시 시설과에 연락하여 조치한다.

2) 고압증기 멸균기의 원증기 압력계가 2 kg/cm² 이상을 가르키고 있을 때, 아니면 온도 기록계가 130 °C 이상을 가르키고 있을 경우는 즉시 기기관리 담당자에게 연락한다.

3) 고압증기 멸균기의 통체에 이상 음이 났을 때, 아니면 안전변이 2 kg/cm²에서 작동하지 않을 경우는 전원을 끄고 기기관리 담당자에게 연락한다.

4) 자동 사육상자 세척기 조작시에 있어서 이상이 인정될 경우는 즉시 세척기를 정지시키고, 기기관리 담당자에게 연락한다.

10. 자료의 정리.보관

관련 기록은 자료 보관고에 임시 보관하였다가 1 년에 1 회 자료보관실로 이관한다.

11. 보관기록

- 1) 소독수 교환 기록지
- 2) 살충제 및 살서제 사용에 관한 기록
- 3) 기기, 설비사용 기록지 : 멸균기, air locker 등과 같은 기기, 설비를 이용할 때 사용한다.

D. 멸균, 소독한 물품의 취급 SOP

1. 목적

본 SOP는 토끼사육구역에 멸균 또는 살균되어 반입된 물품과 사육기재의 취급에 대하여 정한 것으로 사육환경을 청정하게 유지하기 위하여 제정한다.

2. 멸균 또는 소독(살균)과 사육구역내로의 반입

청소, 소독에 관한 SOP, 사육기재의 세척, 멸균, 취급에 관한 SOP 및 소독약 및 살충제의 사용에 관한 SOP에 따라 멸균 또는 소독(살균)하고 물품의 반입출에 관한 SOP에 따라 사육구역내로 반입한다.

3. 멸균된 물품의 취급

3.1. 멸균복, 두건, 타월, 마스크 및 양말 등의 보호구

고압증기멸균기에서 꺼낸 보호구들은 바로 착의실의 캐비닛에 비치하도록 한다. 새로 멸균된 것들은 안쪽으로 비취하고 기존의 것들이 밖으로 위치하도록 하여 멸균기간이 오래 지난 것부터 사용되도록 한다.

3.2. 사육상자

고압증기멸균기에서 꺼낸 사육상자는 준비실에 멸균된 순으로 적재해 놓는다. 적재시에는 바닥과 3cm 이상 떨어져 있어 공기의 순환이 유지되도록 한다. 각각의 적재 단위마다 멸균 표시표를 붙인다.

3.3. 사료

방사선 멸균되어 동물실로 반입된 사료는 사료운반차에 보관한다. 사료운반차에는 최대 20 kg 이하로 채우며 한 번 채운 사료는 완전히 다 사용할 때까지 새로운 사료를 추가하지 않는다. 냉장고 또는 사료보관고에서 반출되어 사용되기 시작한 사료는 사육구역에서 2주 이상 방치되지 않도록 한다.

3.4. 노즐 및 급이기

멸균된 노즐 및 급이기는 사육상자에 담아 멸균 표시표를 붙인 후 보관한다. 사육상자를 적재할 때에는 바닥에서 3 cm 이상 거리를 두어 적재하며 새로 멸균된 것을 안쪽으로 적재하여

멸균된지 오래된 것부터 사용되도록 한다. 각각의 기자재는 멸균된 지 3개월 이내의 것을 사용한다.

3.5. 사육상자와 사육상자대

철망 사육상자는 사육상자대에 조립을 한 상태로 보관한다. 철망 사육상자 만을 보관할 때에는 바닥에서 3cm 이상 떨어져서 10개 이하로 적재한다. 각각의 사육상자대 또는 적재단위마다 멸균 표시표를 붙인다.

4. 동물실 내의 각종 측정기구

동물실 내에 반입되어 사용되고 있는 각종 측정기구는 청결하고 소독된 상태를 유지하기 위하여 측정 작업전과 작업이 끝난 후에 반드시 70% 알코올 용액으로 소독을 실시한다.

5. Sheet류

E.O. gas로 멸균되어 반입된 종이류는 소정의 장소에 불과 접촉되지 않도록 보관하면서 사용하고 항상 먼저 멸균된 것을 우선 사용하도록 보관방법을 고려해야 한다.

E. 사료, 물의 정기검사 SOP

1. 목적

본 SOP는 토끼에게 제공되는 사료와 물이 미생물, 기생충 및 유해물질 등에 오염되지 않은 것을 확인하는 정기적인 검사를 실시하므로써 토끼가 항상 건강하고 청결한 상태를 유지하도록 하기 위해 제정한다.

2. 연간정기검사실시계획의 입안과 작성

- 1) 매년 12월말까지 명년의 환경제어의 정기검사실시계획표를 동물관리책임자가 작성한다.
- 2) 계획표에는 검사항목, 내용, 실시예정일 등을 구비함을 원칙으로 한다.
- 3) 사료의 오염물질 분석 성적서는 사료의 로트별로 실시하는 것을 원칙으로 한다.
- 4) 멸균사료의 무균검사는 방사선 멸균 Lot 마다 실시하는 것을 원칙으로 한다.
- 5) 외부기관의 검사에 의한 수질시험을 연 2회, 6개월마다 1회 실시한다.
- 6) 사료 및 물의 분석검사기관은 다음과 같다.

사료중의 미생물 : 한국화학연구소 안전성연구부 검역실

사료중의 곰팡이독소 : (주)제일사료 분석실 (사료와 함께 제공)

사료중의 중금속, 농약 : 한국화학연구소 분석실
물 : 대전광역시 보건환경연구원

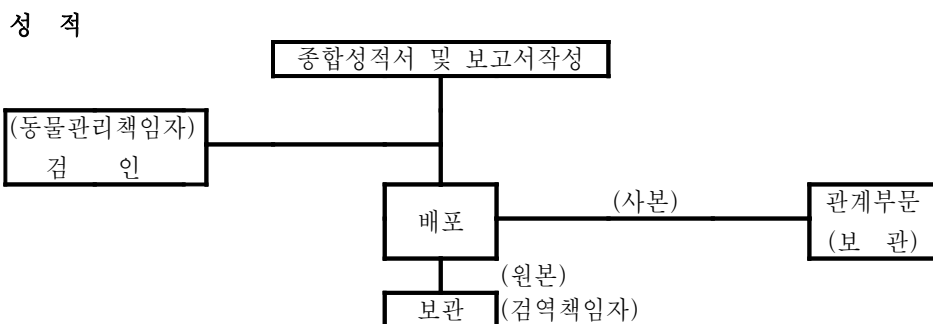
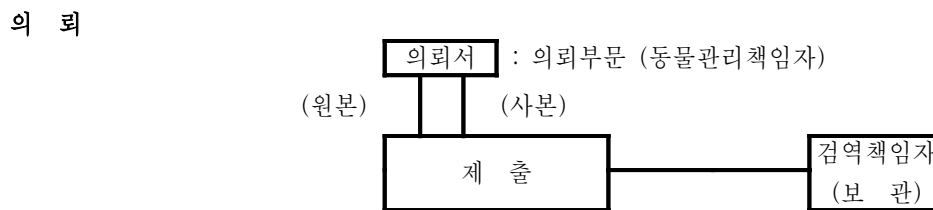
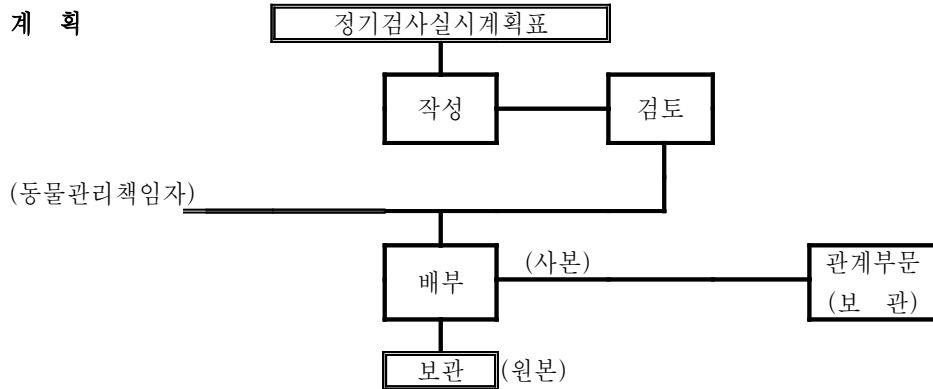
3. 사료의 분석검사 성적서

3.1. 사료중 오염물질의 기준치

1) 사료는 각 포장마다 제조일, 멸균일, 유효기간 등이 필히 기재되어 있어야 하며, 사료종류별 구분도 명확히 실시되어야 한다. 이러한 사료중에 포함되어있는 오염물질의 허용기준은 EPA의 사료중의 허용한계치(첨부자료 참조)를 가지고 결정한다.

2) 사료중 미생물은 병원성이 없거나 사료성분을 크게 변화시키지 않아야 한다.

4. 작업모식도



5. 사료의 정기검사

5.1. 분석의뢰

1) 사료구입담당자는 새로운 로트의 사료가 입수되면 사료회사에서 제공되지 않은 항목에 대하여 사료분석의뢰서를 에게 제출한다.

2) 동물관리책임자는 제출된 사료분석의뢰서를 확인하고 검사를 실시하거나 분석검사 기관에 분석검사를 의뢰한다.

5.2. 사료분석의뢰서의 기입법

- 1) 의뢰자를 기입한다.
- 2) 검체난에는 사료명, 사료조제일, 로트번호, 고압증기 멸균일, 방사선 조사일, 방사선조사량, 검체채취일, 채취자명 등을 기입한다.
- 3) 분석검사항목에는 희망하는 분석검사 항목을 기입한다.
- 4) 기타 특기사항에 관해서는 비고란에 기입한다.

5.3. 검체의 제출

- 1) 동물관리책임자는 제출된 사료분석의뢰서에 준하여 즉시 분석의뢰를 한다. 검체수, 분석검사항목, 검사일, 시간 등을 연락하여 둔다.
- 2) 의뢰자는 검체를 채취하고 검체에 사료명, 사료제조일, 로트번호, 멸균채취일, 채취자명 등의 표시를 한다. 시험물질 조제분석책임자에게 제출한다.
- 3) 시험물질 조제분석 책임자는 제출된 검체와 사료분석의뢰서를 대조확인하고 검사기관으로 송부한다.
- 4) 시험물질 조제분석책임자는 각 의뢰부문으로부터 제출된 검체를 바로 검사하지 않을 경우 냉장고에 보관한다.
- 5) 사료의 무균검사는 국립보건원 내규 식품사료 검사법에 따른다.

5.4. 사료의 분석검사성적서와 종합보고서

동물관리책임자는 분석검사기관으로부터 분석검사 성적서를 받아 원본은 보관하고 사본은 각 동물관리자에 발송한다.

6. 물의 수질검사 기준치

- 1) 물의 수질검사는 연 2회 하는 것을 원칙으로 한다.
- 2) 물의 수질검사 기준치는 음수 기준표에 따라서 실시한다.

7. 물의 정기검사

7.1. 분석의뢰

- 1) 의뢰자는 환경 제어의 정기검사실시계획표에 준하여 정기검사실시일의 1주전까지 물 분석의뢰서를 동물관리책임자에게 제출한다.
- 2) 동물관리책임자는 제출된 물 분석의뢰서를 확인한다.
- 3) 동물관리책임자는 분석검사처로 분석검사를 의뢰한다.
- 4) 물 분석의뢰서는 동물관리실에서 보관한다.

7.2. 물 분석의뢰서의 기입법

- 1) 의뢰자를 기입한다.
- 2) 검체난에는 건물번호, 채수일, 채수시각, 채수자명 등을 정확히 기입한다.
- 3) 분석검사 항목난은 '보건환경연구원' 이라고 기입한다.

7.3. 검체의 제출

- 1) 동물관리책임자는 제출된 물 분석의뢰서에 기준하여 검체를 채취하여 검체에 건물번호, 채수일, 채수시각, 채수자명 등의 표시를 하고 동물관리책임자에게 송부한다.
- 2) 검체는 각 동물사육구역의 동물실 수도꼭지에서 멸균된 용기에 나오는 물을 받아 최소한 3리터씩 채취한다.
- 3) 검역담당자는 각 의뢰부문으로부터 제출된 검체를 바로 검사하지 않을 경우에는 냉장고에 보관한다.
- 4) 검체의 제출시에 검체의 표시와 음수분석의뢰서를 대조확인한 후 분석부문으로 보낸다.

7.4. 물의 수질검사 성적서

- 1) 동물관리책임자는 분석검사기관으로부터 수질검사성적서를 받는다.
- 2) 동물관리책임자는 원본은 조제 분석실에 사본은 복사하여 각 동물관리자로 송부한다.

8. 이상시의 처치

8.1. 사료

사료의 분석검사에 있어서 이상이 인정될 경우, 즉시 동물관리책임자에게 연락하고, 지시를 받는다.

8.2. 물

수질분석검사에 있어서 이상이 인정될 경우, 즉시 동물관리책임자에게 연락하고 지시를 받는다.

9. 자료의 보관

동물관리책임자는 분석의뢰서, 분석검사 성적서, 환경의 검사 종합보고서 등의 원본을 각각 화일에 철하여 매년 1월중에 전년도의 자료를 자료 보관실에 이송하여 보관한다. 사본의 보관은 5년으로 한다.

10. 보관기록

- 1) 환경제어의 정기검사 실시 계획표

- 2) 사료분석 의뢰서
- 3) 오염물질 분석결과 보고서 (사료)
- 4) 미생물 검사 보고서 (사료)
- 5) 물 분석의뢰서
- 6) 수질검사 성적서

<첨부자료-1.>

각 기관의 사료중 오염물질의 허용한계치

오염물질	최대허용기준(EPA)	참조용(NCTR)
Total Aflatoxin (B1, B2, G1,G2)	5 ppb	1.00 µg/kg
Total DDT(DDE, DDT, TDE)	100 ppb	0.05 µg/g
Estrogenic agents(as DES)	1 ppb	2.00 µg/kg
Polybiphenyl chloride	50 ppb	0.50 µg/g
Heptachlorine	20 ppb	0.01 µg/g
Lindene	20 ppb	0.01 µg/g
Deldrine	20 ppb	0.01 µg/g
Arsenic	1 ppm	0.25 µg/g
Lead	1.5 ppm	1.00 µg/g
Mercury	1.5 ppm	0.05 µg/g
Selenium	0.1~0.6 ppm	0.50 µg/g
Cadmium	160 ppb	0.05 µg/g
Marathione	2.5 ppm	0.50 µg/g
Nitrosoamines	10 ppb	*

<첨부자료-2.>

검사항목	기 준	검사항목	기 준
1. 일반세균	100CFU/ml이하	24. 벤젠	0.01mg/ℓ 이하
2. 대장균군	음성/50ml	25. 톨루엔	0.7mg/ℓ 이하
3. 납	0.05mg/ℓ 이하	26. 에틸벤젠	0.3mg/ℓ 이하
4. 불소	1.5mg/ℓ 이하	27. 크실렌	0.5mg/ℓ 이하
5. 비소	0.05mg/ℓ 이하	28. 1,1-디클로로에틸렌	0.03mg/ℓ 이하
6. 세레늄	0.01mg/ℓ 이하	29. 사염화탄소	0.002mg/ℓ 이하
7. 수은	불검출	30. 경도	300mg/ℓ 이하
8. 시안	불검출	31. 과망간산칼륨 소비량	10mg/ℓ 이하
9. 6가크롬	0.05mg/ℓ 이하	32. 냄새	무취
10. 암모니아성질소	0.5mg/ℓ 이하	33. 맛	무미
11. 질산성질소	10mg/ℓ 이하	34. 동	1mg/ℓ 이하
12. 카드뮴	0.01mg/ℓ 이하	35. 색도	5도이하
13. 페놀	0.005mg/ℓ 이하	36. 세제(음이온계면활성제)	0.5mg/ℓ 이하
14. 총트리할로메탄	0.1mg/ℓ 이하	37. 수소이온농도	5.8~8.5
15. 다이아지논	0.02mg/ℓ 이하	38. 아연	1mg/ℓ 이하
16. 파라티온	0.06mg/ℓ 이하	39. 염소이온	150mg/ℓ 이하
17. 말라티온	0.25mg/ℓ 이하	40. 증발잔유물	500mg/ℓ 이하
18. 페니트로티온	0.04mg/ℓ 이하	41. 철	0.3mg/ℓ 이하
19. 카바릴	0.07mg/ℓ 이하	42. 망간	0.3mg/ℓ 이하
20. 1,1,1-트리클로로에탄	0.1mg/ℓ 이하	43. 탁도	2도이하
21. 테트라트리클로로에틸렌	0.01mg/ℓ 이하	44. 황산이온	200g/ℓ 이하
22. 트리클로로에틸렌	0.03mg/ℓ 이하	45. 알루미늄	0.2mg/ℓ 이하
23. 디클로로메탄	0.02mg/ℓ 이하		

F. 동물취급자의 안전위생 SOP

1. 목 적

본 SOP는 토끼 육종번식 업무에 종사자들의 안전위생을 위하여 갖추어야 할 설비, 인수공통전염병에 대한 예방, 각종 신체사고에 대한 예방 및 처치, 그리고 알레르기성 질병에 대한 대책에 대하여 제정한 것으로 개인의 위생관리와 건강의 유지를 위해 노력하여야 한다.

2. 구역의 지정 및 안전표지판의 부착

2.1. 구역의 지정

동물을 이용한 시험을 실시하는 사육구역, 검역구역, 각종 처치구역 및 육종번식구역이 해당된다.

2.2. 안전표지판의 부착

1) 동물관리책임자는 각 구역별로 금지, 유의사항 (음식물 섭취금지, 금연, 출입금지 및 방사능물질 사용실) 등을 기재한 표지판을 부착하고 관계자 이외의 부주의한 출입 및 행동을 방지하도록 한다.

2) 각 구역별로 화기단속 책임자를 명시한 표지판을 부착한다.

3) 이상사태 발생시의 연락처 (책임자명, 전화번호 등)를 명시한다.

3. 안전위생을 위한 설비 및 기자재

3.1. 설비

1) 동물관리자의 안전위생을 확보 하기위해 동물 사육구역에는 다음과 같은 설비를 갖추어야한다(갱의실, 샤워실, 필요한 경우 욕실, 소독실, 살균실).

2) 상기의 설비에는 동물관리자가 충분히 이용할 수 있도록 사용방법을 부착한다.

3.2. 작업복 및 보호 장비

동물관리자는 구역별로 정해진 멸균복과 보호 장비(장갑, 마스크, 모자 및 장화 등)를 착용하고 업무를 수행한다.

3.3. 세탁 및 소독, 멸균

각 구역별 작업복 혹은 보호 장비는 세탁, 소독 멸균 및 청결을 유지하고 정해진 보관 장소에 비치하여 둔다.

4. 구급상자

4.1. 설치장소

1) 각 사육구역별로 정해진 장소, 위치에 비상용 구급상자를 설치한다.

2) 구급상자는 담당자를 정해 명시하고 1년에 2회 그 내용물을 점검 보충하고 유효기간을 파악하여 필요한 것들은 교환을 실시해 준다.

3) 각 구역에서는 구급상자의 설치장소 혹은 사용방법을 숙지하도록 한다.

4.2. 내용품목

1) 구급약품 : 소독약(povidone, 과산화수소액), 진통해열제(Aspirin정), 상처보호연고 외용살포 소독제(설파닐라미드)

2) 구급용품 : 살균 또는 멸균되어 있는 것으로 일회용 밴드, 붕대, 탄력붕대, 솜, 거즈, 반창고, 면봉, 바세린 거즈, 체온계, 지혈대, 삼각포, 가위

3) 구급장비 : 손전등, 산소마스크

5. 건강관리

5.1. 건강진단

모든 동물관리자가 1년에 1회 정기적인 건강진단을 받도록 건강진단기관을 지정하고 비용을 제공한다. 모든 동물관리자는 의무적으로 정기적인 건강진단을 받아야 한다.

5.2. 특정진단

유해작업 동물관리자는 정해진 시기에 특정 항목에 관하여 검사를 받아야한다.

5.3 예방접종

동물관리책임자는 질환의 발생상황에 따라 특정 질병에 대하여 동물관리자에게 예방접종을 받도록 해야 한다. 예를 들어 동물의 교상이 우려되면 과상풍예방접종을 받도록 하며 광견병이나 B형 간염 등의 바이러스에 대한 시험을 수행한다면 이들 질병에 대하여 예방접종을 받도록 해야 한다.

5.4. 사육관리 업무 정지

1) 동물관리자의 신체에 이상이 있을 경우 (임산부 포함)는 담당구역의 책임자에게 신고하고 사육구역의 출입에 대한 허가를 받는다.

2) 신체의 이상이란 다음의 경우를 말한다.

(1) 공·사립 병·의원에 통원치료를 받고 있을 때

(2) 다음과 같은 증상이 있을 경우 : 두통, 복통, 설사, 발열, 기침, 발진, 습진 혹은 신체 노출부(얼굴, 손발 등)의 외상, 화농성 상처 등

(3) 임신

5.5. 건강관리 기록

1) 각 동물관리자 및 동물관리책임자의 정기적인 건강진단기록을 보관한다.

2) 신체이상이 있어 일시적인 업무정지를 명받은 동물관리자에 대하여는 업무정지 기간 및 그 후 4주간 1주에 1회 그 경과를 기록하여 보관한다.

3) 기록방법은 의사의 진단서 (사본도 가능)를 첨부하는 것을 우선으로 하고 진단서가 없는 경우에는 그 내용을 상세하게 책임자가 기록하고 신중히 대처한다.

4) 건강진단기록과 건강관리기록의 보관은 관리실에서 실시한다.

6. 무리한 작업의 강행 방지

실험동물이 감염성 질병 및 기타 다른 질환에 이환되지 않도록 동물관리자는 동물사육구역으로 입퇴실법을 SOP에 따라 정확히 지키고, 불필요하게 무리한 작업일정을 계획하여 수행하지 않도록 한다.

7. 다쳤을 경우의 처치 및 업무정지

7.1. 상처를 입었을 경우

1) 동물 사육관리 중에 동물에게 물리거나 기자재에 의해 외상을 입었을 경우 혹은 세척, 멸균중에 사육상자 등으로 화상이나 상처를 입었을 때나 동료가 다친 것을 발견하였을 경우 즉시 응급처치(소독, 지혈 등)를 하고 빨리 의사의 치료를 받을 수 있는 조치를 취하고 동물관리 책임자에게 상기의 사실을 알린다.

2) 외상뿐만이 아니라 갑자기 신체에 이상이 발생하거나 동료의 이상이 발견되면 무리하게 작업을 진행하지 말고 사육구역 밖으로 나와 동물관리책임자에게 연락하고 휴식을 취하거나 의사의 진찰을 받도록 한다.

7.2. 업무정지

1) 의사의 진단결과에 따라 운영책임자는 동물관리자의 건강이 회복될 때까지 동물사육 관리 업무를 중지시킨다.

2) 기타 건강관리에 대하여는 안전위생 관리규칙 및 직장작업 안전수칙에 따라 실시한다.

7.3. 지정병원

응급처치후의 치료는 원칙적으로 지정 병원에서 수진하도록 한다.

7.4. 사고 발생시의 연락

1) 평상시의 연락처 : 우선 동물관리책임자에게 연락한다.

2) 휴일(시간외 포함) : 당직실에 연락을 한다.

8. 인수공통전염병

8.1. 일반적인 사항

일반적인 전염병의 예방은 '인수공통 전염병 예방법' 및 '가축전염병 예방법'에 따라 실시한다.

8.2. 질병의 종류

실험동물을 포함하여 사람에게 감염할 가능성이 있는 인수공통 전염병은 첨부자료-1에 기재된 바와 같다.

8.3. 질병의 중요도

질병의 중요도는 A, B, C의 3구분으로 분류시켰다.

A : 사람에게 감염력이 강하고 특히 주의를 필요로 하는 질병

B : 발생빈도는 낮지만 사람이 감염하였을 경우 증상이 심한 질병

C : 사람에게 대한 병원성은 약하지만 동물에서 동물로의 감염력이 강하므로 2차적으로 감염될 기회가 많은 질병.

8.4. 시험담당자의 주의

동물관리자는 인수공통 전염병에 대하여 병명, 등급, 병원체, 감염경로, 동물의 증상, 병리소견, 사람에게 나타나는 증상 및 예방방법 등에 대하여 숙지하고 실행하도록 한다.

8.5. 인수공통전염병에 이환되었을 경우

인수공통전염병에 이환된 것이 확인되면 동물관리책임자는 업무정지를 명하고 가능하면 발병경위, 전과상태 등을 조사하여 더 이상의 확산을 방지하도록 노력한다. 동물에게 전염병이 발생하였다고 판단되면 해당 동물사육구역의 모든 동물을 살처분하고 사육시설 및 기자재를 청소, 소독 멸균한다.

9. 알레르기성 질병

9.1. 알레르기성 질병의 정의

어떠한 물질(알레젠)에 접촉하였을 때, 이미 그 물질과 접촉하여 반응을 일으켰던 생체의 증가된 면역반응이 일시적으로 과다하게 일어나 여러 가지 급성, 만성증상을 유발하는 질병을 말한다.

9.2. 엘러젠(알레르기를 일으키는 원인이 되는 물질)

1) 실험동물과 직접 관련된 것들 : 털, 비듬, 뇨, 혈청

2) 실험동물 사육투여와 관련된 것들 : 깔짚의 먼지, 사료가루, 약물성 세제, 소독액, 시험물질

3) 기타 환경요인 : 오염된 환경의 곤충, 환절기의 꽃가루, 특정 음식물

9.3. 엘러젠과 환경조건

실험동물로부터 발생하는 엘러젠과 동물관리자와의 접촉 기회는 환경조건과 밀접한 관계가 있다. 따라서 가능하면 엘러젠과 동물관리자간의 접촉을 줄일 수 있는 방법으로 공조법을 유지하고 청결한 상태로 사육구역을 유지하도록 한다.

9.4. 알레르기 증상

1) 코의 증상 : 코의 충혈, 재채기, 콧물

- 2) 내부 호흡기계 증상 : 기관지천식, 가래
- 3) 눈의 증상 : 눈물, 눈의 가려움, 눈의 혈관 부종, 충혈
- 4) 피부증상 : 발적, 가려움증, 발진, 습진
- 5) 소화기계 증상 : 일시적인 복통, 설사
- 6) 전신적 증상 : shock, 체온하강, 혈압저하

9.5. 예방대책

- 1) 시험담당자는 보호 장구를 완벽하게 착용하여야 한다.
- 2) 환기시설을 완전하게 갖추고 분진 등과 시험담당자와의 접촉을 줄이도록 설계한다.
- 3) 동물관리자를 채용할 때에 알레르기성 질환여부, atopy성 질환 여부에 대하여 검사한다.
- 4) 동물관리책임자는 알레르기 증상이 있는 시험담당자의 경우 부서를 결정하는 데에 고려해야 한다.
- 5) 알레르기 증상이 없었던 동물관리자도 빈번한 동물 접촉에 의해 증상이 유발되므로 항상 건강관리에 주의해야 한다.

10. 안전위생 교육훈련

동물관리책임자는 동물관리자의 교육훈련에 관한 SOP에 안전위생 교육훈련에 관한 내용을 포함시켜, 각 동물관리자가 응급처치요령, 인수공통전염병, 각종 유해물질의 취급요령 및 알레르기성 질병에 대하여 정기적으로 교육훈련 받도록 해야 한다.

11. 기타 주의사항

11.1. 음식물 섭취 및 흡연

각 구역에서의 금지사항은 동물의 관리에 관한 각각의 SOP에 기재되어 있지만 특히 규제 구역에서 의 음식물 섭취와 흡연은 절대 금지한다.

11.2. 동물유래 검체에 관한 취급

1) 동물유래검체(혈액, 뇨, 분변 및 도말표본 등)는 엘러젠이 되며, 질병의 매개체 역할을 할 수 있으므로 구역의 반입출에 관한 SOP에 따라 정확히 실시해야 한다.

11.3. 사육, 시험 중의 동물(곤충도 포함)의 침입에 대한 처치

1) 병원체를 매개하는 곤충류의 발생을 막고 들쥐, 개, 혹은 고양이가 사육구역 근처에 서식하지 못하도록 조치를 취한다. 살충제나 살서제를 사용하였을 경우 그 기록을 남긴다.

2) 곤충 등의 침입을 방지하기 위해 창문이나 문의 지속적인 개방을 금한다.

11.4. 유해화학물질의 취급

유해화학물질을 사용하는 경우에는 유해화학물질의 취급에 관한 SOP에 따른다.

12. 기록의 보관

- 1) 건강진단서
- 2) 건강관리기록
- 3) 살충제 및 살서제 사용기록
- 4) 화학물질 폐기물 반출기록

<첨부자료 -1. 인수공통 전염병 일람표>

동물	병원체	감염경로	동물의 주요증상	병리소견	검사시기	사람의 주요증상	예 방
토끼 · 가축	Lymphocytic choriomeningitis	피부	통상 불현성감염	예외적인 흉복강액 증가, 지방간, 비중	(이상발생시 검사)	인프랜자성 발열, 드물게 치사적인 뇌막염	손을 잘 씻고 장갑을 착용
	Listeria monocytogenes	안, 비, 구강 등의 점막	유약동물 : 식쇄, 사망, 임신동물 : 유산	유약동물 : 간, 심, 비장의 소상괴사 임신동물 : 자궁염, 복막염	(필요에 따라 검사)	수막염, 뇌염, 폐혈증, 불현성 감염이 많음	손을 잘 씻고 마스크, 장갑을 착용
	Samonella sp.	경구	급성 : 체중감소, 입모, 사망 만성 : 설사, 체중감소	급성 : 폐혈증 만성 : 간, 비장 종대, 괴사소	응집반응, 배양(입하검수시)	설사, 장염	손을 잘 씻고 마스크, 장갑을 착용
	Toxoplasma gond II	경구	뇌염, 기생충 증	간, 비장 괴사, 각 장기에 충체 존재	(이상발생시 검사)	발열, 설사, 뇌염	손을 잘 씻고 마스크, 장갑을 착용
	Fransisella tularensis(야토병)	진드기, 벼룩 → 토끼 접촉, 경구, 교상	무증상	임파선염, 위 농포	(이상발생시 검사)	두통, 오한, 발열	토끼(산토끼) 취급자 예방접종

G. 격리동물의 사육 SOP

1. 목적

지정병원체가 검출된 동물 또는 감염성 질병으로 판단된 동물은 즉시 도살처분 한다. 그러나 시험상 또는 기타 이유에 의해 격리사육하지 않으면 안 될 경우가 있다. 본 SOP는 이러한 감염성 질병에 걸린 동물의 격리, 사육에 있어서 감염병의 전파 및 주위의 오염을 방지하기 위하여 제정한다.

2. 동물의 격리

1) 감염성 질병에 걸린 동물로 판정된 동물을 질병의 확인을 위해 도태시키지 않고 계속 하여 사육할 필요가 있을 때는 별도의 동물실에 격리하여 사육한다. 격리사육실은 SPF 구역외 부에 둔다.

2) 감염성 질병에 걸린 동물과 함께 사육되던 동물을 다른실로 이동시켜서는 안 된다.

3) 동물을 이동시킬 때에는 주위를 오염시키지 않도록 주의한다.

4) 격리동물실의 문의 외측에는 빨간 글씨로 "격리 동물실"이라고 명기하고 개체식별카드에도 빨간 글씨로 "격리동물"이라고 기재한다.

3. 보호구

보호구는 격리 동물실 전용으로 하고, 격리 동물실에서 착용하였던 모든 보호장구는 멸균하여 재사용한다.

4. 입실

동물관리자는 격리 동물실 전용의 보호구를 착용하고 입실한다.

5. 기재 및 물품 등의 반입

사육기재 등의 물품은 물품의 반입과 반출에 관한 SOP에 따라 동물실로 반입한다.

6. 사육법

사육작업은 각 동물의 사육작업에 관한 SOP에 따라서 사육하지만, 다음에 유의할 것.

1) 물병, 급이기는 개체별로 사용한다.

2) 동물은 개체별로 사육하고, 오염물을 담은 분변 받침대에는 동물에게 자극이 적은 소독액을 높이 2 cm 이상으로 채운다. 오물 받침대는 매일 교환한다.

3) 사용한 물병, 사육상자, 받침대 (오물이 들은 채로) 및 사육기재 등은 교환시 비닐봉투에 넣어 세척구역으로 반출하여 세척하고 소독한 후 고압증기멸균을 실시한다.

7. 퇴실

1) 사용한 보호구중 장갑, 마스크 및 두건은 폐기처분하고 장화는 소독액으로 세척 소독한다. 멸균복은 별도로 세탁하여 고압증기멸균 하도록 한다.

2) 퇴실후 손과 발을 소독액에 담귀 소독한 후 물샤워를 실시한다.

3) 외부용 작업복을 착용하고 이후의 작업을 실시한다.

H. 동물 및 관련기자재의 식별 SOP

1. 목적

본 SOP는 동물 및 관련기자재의 식별방법을 구체적으로 정하여 토끼의 사육 관리작업 및 시험도중에 혼동을 방지하기 위하여 제정한다.

2. 토끼의 식별

1) 순화기간

동물을 수용한 사육상자에 부착된 개체식별카드와 적색의 유성펜으로 좌측이개부 안쪽에 동물번호를 아라비아 숫자로 직접 표시한다.

2) 사육기간

군 분리 후 사육상자에 부착된 개체식별카드와 흑색의 유성펜으로 우측이개부 안쪽에 동물번호를 아라비아 숫자로 표시한다.

3. 사육상자의 식별

군 번호, 성별, 예비 동물번호(Pre-number)등을 기재한 순화 기간중 개체식별카드를 사육상자에 부착한다.

4. 먹이통, 급수병의 운반상자의 식별

사료소비량 또는 음수소비량을 측정하지 않는 경우에는 표식은 필요 없지만 특정물질을 사료에 혼합 또는 혼수 투여할 경우는 군을 표식한 라벨을 운반상자에 첨부하거나 유성펜으로 기록하여 식별한다.

5. 동물실의 식별

동물실 사용기록지에 동물실 번호, 군 번호, 표제, 사용기간, 동물관리책임자, 종사원을 기입하고 사용 동물실 문에 표시함에 따라 다른 동물실과의 구별을 명확히 한다. 검역중의 동물실에는 그 내용을 문에 표시하고 관계자 이외의 출입을 금지한다.

6. 사육상자대의 식별

사육상자대의 좌측상단에 사육상자대 고유번호를 기재한 라벨을 부착한다.

7. 보관기록

- 1) 개체식별방법 기록지
- 2) 동물실 사용기록지
- 3) 사육동물, 사육상자 배열기록지
- 4) 사육상자대 위치 교환기록지

다. 미생물 모니터링 기술 확립 및 SOP제작

A. 토끼의 검역 SOP

1. 목적

본 SOP는 토끼의 검역에 있어서 서류상의 수속, 검수방법, 미생물 검사법, 이상동물의 처치법 등에 관해서 구체적으로 정하여 건강한 동물을 시험에 제공하고 사육구역의 오염을 방지하기 위하여 제정한다.

2. 동물생산자 검역검사 성적서의 점검

검역책임자는 동물생산자의 검역성적을 입수, 점검하고 이상의 유무를 파악한다.

3. 검역대상동물

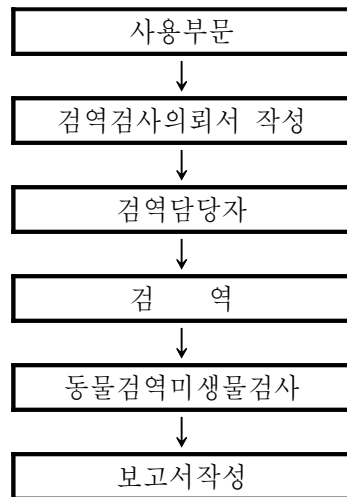
1) 검역의 대상이 되는 동물중 계통, 검역기간, 검역횟수, 검사 동물수, 검사항목 등은 검역책임자의 수의학적 판단에 의해 결정된다.

2) 검역책임자는 구입하는 동물의 미생물학적 품질에 문제가 없다고 판단되고 그것을 증명하는 성적서가 확보되어 있으면 검역을 생략할 수 있다.

3) 임신용 토끼는 동물관리책임자가 피모상태, 변의 형태 및 뇨의 색조 등을 고려하여 외관검

사를 실시한 후 건강하다고 인정되는 동물에 한하여 인공수정을 실시하며 교배된 동물의 수령시에는 검역담당자는 시험별로 3마리 이상의 동물을 미생물학적으로 검사한다.

4. 작업모식도



5. 검역검사 의뢰서

- 1) 의뢰서는 동물사용부문에서 작성하여 검역책임자에게 송부한다.
- 2) 의뢰서는 가능한 한 동물입하 1주일 전까지 제출한다.

6. 검수

- 1) 검역책임자는 동물수송차 도착시, 수송도중에 있어서 이상 유무를 확인하고 동물수송상자의 파손유무를 조사한다.
- 2) 검역책임자는 실험동물 공급표 또는 수송상자에 첨부되어 있는 명세서에 기재된 내용을 확인, 대조한다.
- 3) 동물실 구역내에 지정된 반입장소에 수송상자를 반입할 경우에는 동물의 반입과 반출에 관한 SOP에 따라 실시한다.
- 4) 검역책임자는 반입된 수송상자를 개봉하고 동물의 마리수, 성별 및 동물의 영양상태, 피부, 눈, 입, 코, 사지, 꼬리 등에 관하여 동물의 외관을 검사한다.
- 5) 검역책임자는 이상의 성적을 검수 성적서에 기입한다.

7. 이상발견시의 처치

- 1) 동물수송상자의 파손, 명세서와의 부적합, 동물의 일반상태, 외관의 이상 등이 발견되었을 경우 검역책임자는 관계자에게 연락하고 적당한 대책을 취한다.
- 2) 감염성 질병으로 진단되면 모든 사육구역으로의 반입을 금한다.
- 3) 검역책임자는 이상의 내용을 검수성적서 및 이상동물 기록서에 기록한다.

8. 검역

8.1. 검역기간

검역기간은 동물의 주령과 체중범위를 고려하여 도입 후 7일 이상을 원칙으로 한다.

8.2. 일반증상관찰

일반증상관찰은 매일 실시한다.

8.3. 미생물검사

1) 미생물학적 검사는 입수동물 중 별당 3마리 이상에 관해서 실시한다. 단, 신뢰할만한 공급처의 성적이 얻어지는 경우 및 그 동물이 사용되는 시험의 종류에 따라 검역담당자 및 동물관리책임자의 판단하에 검사를 생략할 수도 있다.

2) 검사항목

세균 검사: *Pasteurella pneumotropica*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella* spp.

기생충 검사: *Eimeria* spp. Ear/Body mange

8.4. 부검, 채혈

부검과 채혈이 필요한 경우 검역, 정기검사를 위한 SOP에 따라 실시한다.

8.5. 배양검사

1) 검사방법 및 검사항목은 검역담당자의 수의학적 판단에 기준하여 결정되지만 원칙적으로는 8.3의 검사항목에 준한다.

2) 구강 혹은 기관을 멸균면봉으로 내면을 닦고 혈액한천, 기타 필요한 배지에 도말, 배양하여 전술한 검사항목에 관하여 검사한다.

3) 분변 혹은 맹장내용물을 DHL 한천 배양하여 전술한 검사 항목에 관하여 검사한다.

8.6. 수의학적 검사

1) 검사항목에는 체온, 체중, 외관 또는 기타 필요한 검사 등이 포함된다.

2) 수의사는 검사결과를 수의학적 검사용지에 기재한다.

3) 검사중 질병이나 이상 등을 발견시에는 바로 격리시키고 생산자에게 반환하도록 조치를 취한다.

4) 치료 가능한 가벼운 질환을 앓고 있을 경우 수의사가 시험 개시 전까지 치료 가능하다고 판단될 경우 치료방법들을 수의학적 검사용지에 기입한다. 그리고 최종 사용여부를 결정하기 전에 다시 수의학적 검사를 실시한다. 만일 치료를 실시해도 증세가 호전되지 않을 경우 생산자에게 반환한다.

9. 검역중에 있어서의 이상동물의 처리

검역 및 부검시에 이상이 발견되었을 경우 검역책임자의 판단에 의해 그 소견에 맞는 가장 적절하다고 생각되는 검사를 아래와 같이 실시한다.

1) 검역책임자는 필요에 따라서 관계자에 연락하여 관계자와의 협의에 기준하여 가장 적절하다고 생각되는 대책을 취하도록 한다.

2) 검역책임자는 협의의 결과에 기준하여 공급업자에게 검사결과를 연락하여 입하의 정지, 지정검사의 요구, 검사용 동물의 청구 등을 행한다.

3) 검역책임자는 토끼에 있어서 기생충 등 질병이 확인되면 동물관리책임자와 상의한 후 도태시킨다. 만일 치명적인 감염성 질병이 아닌 경우 항생제 처치나 기생충 박멸약 처치로 완치가 될 수 있다고 판단되면 치료를 실시한다.

10. 보고

1) 검역담당자는 미생물학적, 혈청학적 검사 성적서를 작성한다.

2) 동물검역미생물 검사성적서는 검역담당자가 날인한 후 의뢰부문에 송부한다.

11. 자료의 보관

관련 기록의 원본은 검역부문의 보관고에 보관하고 연말에 자료 보관실로 이관한다.

12. 보관기록

1) 검역(정기, 임시)검사 의뢰서

2) 검수성적서

3) 이상동물 기록지

4) 검역용 부검소견 기록지

5) 동물검역미생물 검사 성적서

6) 수의학적 검사 성적서

B. VITEK을 이용한 균 동정 SOP

1. 목적

본 SOP는 미생물 모니터링과정 중 생화학적 성상을 확인하여 균명을 알고 처치하여 실험동물을 청결한 상태로 유지하고 시험자의 안전위생을 확보하기 위하여 제정한다.

2. 준비

2.1. 사용기기

- 1) VITEK (Bio-Merio)
- 2) Colorimeter (Bio-Merio)
- 3) Vortex mixer (VISION)

2.2. 사용시약

- 1) 0.45% Saline
- 2) Vitek Card (GNI, GPI)

3. 실험 방법

3.1. 균 부유액 만들기

균 부유액 만들기 전에 Gram stain로 그람양성균 인지 그람음성균 인지 확인하고 그람양성균은 Catalase test 하고, 그람음성균은 Oxidase test 하여 Vitek Card에 결과를 기입한다. Gram stain, Oxidase Test, Catalase Test는 SOP를 참조한다

1) Colorimeter의 Calibration하기

(1) 0%T : 6ml Tube에 2ml의 Crystal Violet이나 그 밖에 빛을 차단하는 것을 넣어 Colorimeter의 Holder 안에 넣고 0%T를 맞춘다.

(2) 100%T : 6ml Tube에 2ml의 D.W를 넣어 Colorimeter의 Holder안에 넣고 100%T를 맞춘다.

2) 동정한 균의 수에 맞게 6ml Tube에 0.45% Saline 2ml씩 분주 한다.

3) 독립 콜로니를 멸균 면봉으로 따서 Saline을 넣은 Tube에 넣고 Mix한다. Tube의 입구주위가 오염되지 않게 한다.

4) Colorimeter로 일정 농도에 들어가게 만든다. 우선 Gram 염색을 한 후 GPI, GNI Card를 선택한다. Gram염색은 Gram염색 SOP를 참조한다.

(1) GPI(그람양성균) : Red 구역 80~88%에 들어가게 독립된 콜로니를 풀어 농도를 맞춘다.

(2) GNI(그람음성균) : BLUE 구역 67~77%에 들어가게 독립된 콜로니를 풀어 농도를 맞춘다.

3.2. Card에 번호 작성하기

Card에 VITEK 전용 펜을 이용하여 번호와 Oxidase Test, Catalase Test 결과를 기입한다.

3.3. Card에 균 부유액 넣기

- 1) FILLING STAND에 연결관을 끼운 Card와 균 부유액을 꽂는다.
- 2) FILLING STAND를 VITEK의 Filler안에 넣는다.
- 3) FILLER ON를 누른다. 그러면 CYCLE READY에 불이 들어온다.
- 4) FILL Switch를 누른다.
- 5) CYCLE READY에 불이 꺼진다.
- 6) Filling Stand를 꺼내고 FILLER OFF Switch를 누른다.
- 7) Card의 연결관을 떼어내고 주입구를 밀봉한다.

4. VITEK 기기 작동

밀봉한 Card를 Incubator에 번호대로 넣고 다음에 따라 기기를 작동한다.

4.1. System start

1) Reader battery switch → reader AC power switch → printer → AVR → UPS → Monitor 순으로 기기를 켜다.

2) 워크스테이션(컴퓨터)의 전원 스위치를 켜다.

3) 잠시후 bioMerieux화면이 나타나면,

Login : supv <Enter>

Password : supv<Enter>

4.2. Log off

프로그램의 재시작 하는 기능으로 소프트웨어 작업 기능이 원활하게 이루어지지 않을 경우 전원은 끄지 않은 상태에서 작업 중이던 프로그램만을 종료했다가 다시 개시한다.

1) bioMerieux 바탕화면으로 마우스의 포인터를 이동시킨다. (포인터는 바탕화면에서 "X"로 표시된다.

2) 마우스의 왼쪽버튼을 클릭 하여 루트메뉴를 연다.

3) 루트 메뉴에서 "End Session"을 선택한다.

4) 대화화면이 열리면 "OK"를 선택한다.

5) 화면이 꺼졌다가 잠시 후 Log in 화면이 다시 나타나면 "supv"로 Log in 한다.

4.3. System off

1) 먼저 Reader에서 진행중인 작업을 종료하여야 한다. VTK프로그램으로 간다.

- 2) 작업 메뉴바에서 Reader → Status를 선택한 다음 "Progress off" 버튼을 누른다.
- 3) VTK프로그램을 나와서 메인 메뉴에서 System → System maintenance → Stop the system을 선택한다.
- 4) Reboot여부, Shutdown 유예 시간 등을 선택한다.
- 5) "Excute"버튼을 클릭한다.
- 6) 장비의 전원을 끄는 순서는 System on 할 때의 순서와 반대로 실시한다.
 워크스테이션 → Monitor → UPS → AVR → printer → reader AC power switch → Reader battery switch

4.4. READER내의 카드 위치 및 검사 진행 상태 확인

- 1) bioMerieux 화면에서 VITEK 버튼을 클릭 하면 VITEK STATUS화면이 열린다.
- 2) 화면 왼쪽의 reader/try 버튼을 클릭하면 원하는 reader 전체의 카드상태를 볼 수 있다.
- 3) System 버튼을 클릭하면 reader 전체의 카드 상태를 볼 수 있다.
- 4) Scroll Bar를 클릭하여 상하로 끌어주면 화면의 directory를 위, 아래로 이동 할 수 있다.

4.5. 카드의 검사 결과 조회 및 출력

- 1) Vitek Status 화면의 디렉토리와 원하는 카드를 마우스로 클릭한다.
- 2) 하단의 "Select All" 버튼을 누르면 모든 카드가 선택되고, "Deselect All"버튼을 누르면 선택한 것이 취소된다.
- 3) 결과 출력시 출력하고자 하는 카드를 선택하고 "Print" 화면상 조회만을 원하면 "View" 버튼을 누른다.

4.6. QUALIFIER button

카드의 검사가 종료되었으나 다음과 같은 상태로 사용자의 관여가 필요한 경우엔 검사결과 는 환자 파일로 전송되지 못 하고, 카드 검사만 종료된 상태로 남아있는 카드를 관리하는 곳 이다. 문제가 발생한 카드의 갯수가 해당 버튼 윗부분에 숫자로 표시되며 사용자가 직접 해결 하여야 한다. 일단 Qualifier button에서 해제되어야 결과가 LSN에 있는 환자의 기록으로 전 송된다.

1) CORRECT

Reader가 Card에 표시된 번호를 인식 할 수 없는 경우

- (1) "Correct"버튼을 누른다.
- (2) 디렉토리 화면에서 "Select All"버튼 또는 직접 카드를 선택 → "View" 버튼을 눌러 VITEK result 화면을 연다.
- (3) VITEK-ID 부분에 가서 "?"로 표시된 번호를 정정한다.

(4) "Save"버튼을 클릭 한다.

2) ADD ORGANISM

Slash Line, GemS, ID 카드 없이 감수성 카드만 넣었을 경우 ID 입력

1) "Add Organism"버튼을 클릭한다.

2) "Select All" 버튼 또는 특정카드를 선택하고 "view"버튼을 눌러 VITEK result화면을 연다.

3) Organism부분에서 "?"버튼을 클릭하여 POP-UP 메뉴가 열리면 균명을 선택하고 "OK" 버튼을 클릭한다. 또는 Organism에 직접 균명 코드를 입력한다.

4) "Save" 한다.

3) ADD OXACILLIN

Staph에 대해 Oxacillin이 들어있지 않은 Card를 사용한 경우

(1) "add Organism"버튼을 누른다.

(2) 디렉토리 화면에서 "Select All"버튼 또는 특정 카드 선택 → "View"버튼

(3) Oxacillin test 결과를 입력한다.

(4) "Save"한다.

4) REVIEW : Insufficient growth, non viable organism, serology confirm, final unidentification 등 모든 exceptional conditions 카드의 관리

(1) "Review" 버튼을 클릭한다.

(2) "Select All"버튼 또는 카드 선택 → "View" 버튼 눌러 VITEK result화면을 연다.

(3) Message field의 내용을 확인한 다음 그대로 LSN에 결과를 전송하기 원하면 "Not Reviewed" 버튼을 클릭하여 "Reviewed"로 바꾼다.

(4) "Save"하고 Operation → Transfer Test로 환자 파일에 전송한다.

(5) "Review"의 내용이 환자 리포트에 전송하기를 원하지 않는다면 qualifier 버전에서 해제하지 않고 단지 카드를 reader에서 제거하면 된다.

※Vitek Status 윈도우의 디렉토리 메뉴에서 Operations → Remove Test하여 제거된 카드는 "Hold"에서 3일간 내용을 조회 할 수 있다.

5) CREAT AUTOLINK

Card와 match되는 환자 파일이 없는 경우

(1) "Creat Autolink" 버튼을 누른다.

(2) 디렉토리 화면에서 "Select All" 버튼 또는 특정 카드만 선택 → "View" 버튼을 클릭하여 VITEK result 화면을 연다. Message Field 위의 Demographics에서 autolink가 되지 않은 원인을 확인한다.

- (3) VTK software 윈도우를 닫고 bioMerieux 화면으로 나와서 LSN의 "Daily" → "Enter"
- (4) Patient Info 화면을 연다.
- (5) 환자 파일이 아직 작성되지 않았다면 환자 파일을 만든다.
- (6) 이미 환자 파일이 작성 되었으면 Exam block에서 "Save" 버튼을 클릭한다.
- (7) 단, Exam field에 카드 번호를 넣을 때 앞의 "0"은 입력하지 않아야 한다.
- (8) 같은 Exam이 복수로 입력되었을 경우 Exam block의 "Delete" 버튼으로 삭제하고 하나만 남겨둔다.
- (9) Exam 번호가 기존에 있던 다른 Exam 번호와 중복되었을 경우는 기존의 Exam들은 Finalize 시킨다.

6) EXPERT

- (1) "Expert" 버튼을 클릭한다.
- (2) "Select All" 버튼 또는 특정 카드 선택 → "View" 버튼
- (3) Message field 내용을 확인하고 "Detain Result"로 바꾼다.
- (4) 추가 검사를 실시하여 VITEK 결과를 정정할 필요가 있는 경우에는 "Instrument" 버튼을 "User"로 바꾸고 추가 검사 내용을 입력한 다음 "Accept Result"로 바꾼다.
- (5) "Save"하고 Operation → Transfer Test

※QUALIFIER 버튼을 해결하고 나면 디렉토리 화면에서 카드 status가 FINIS에서 TRANS 로 바뀌었는지 확인 한다. Transfer 되지 않은 카드는 디렉토리 메뉴바에서 "View" → "Filter data" → OK 하여 FINIS 상태의 카드만 고른 다음, 다시 디렉토리 메뉴바에서 "Operation" → "Transfer test"를 선택하면 카드는 일괄적으로 LSN의 환자파일에 전송된다.

4.7. 검사가 끝나지 않은 카드를 제거 할 때

Jamming, Power failure로 인해 검사할 수 없게 된 카드 제거

- 1) 디렉토리에서 즉시 삭제하려는 카드를 선택한다.
- 2) 메뉴바에서 "Operation" → "Remove Test"

4.8. READER 상태 확인

Reader의 온도, 다음 입을 차례인 tray번호와 입을 시간등을 확인, VTK "Reader" → "Status"

4.9. JAM제거후 READING을 다시 시작 할 때

Reader의 reading 재개시

VTK "Reader" → "Status" → "GO" 버튼 클릭

4.10. ANI, NHI 카드 결과 입력

ANI-NHI 카드의 visual reading 결과 입력

- 1) 메뉴바에서 bioanalysis를 선택한다.
- 2) Product 메뉴에서 검사 카드 종류를 선택한다.
- 3) Visual reading 결과를 화면의 버튼들을 클릭하여 입력한다.
- 4) "Analyzer"버튼을 눌러 ID 결과를 확인한다.
- 5) "Operation" → "Transfer Test"

5. 검사보고서의 작성

- 1) 검역담당자는 동정된 결과에 따라 '동물검역미생물성적서'에 결과를 기입하고, 검역책임자가 날인한 후 복사본을 해당구역의 동물관리책임자에게 송부한다.
- 2) 검사결과가 불량인 경우에는 검역담당자는 검역책임자와 동물관리책임자에게 보고하고 협의하여 그 대책을 이행 후 일반적으로 재검사를 원칙으로 한다.

6. 자료의 보관

관련기록은 원본은 보관고에 보관하고 연말에 자료보관실로 이관한다.

7. 보관기록

- 1) 검역(정기, 임시)검사의뢰서
- 2) 동물검역미생물검사성적서

C. ELISA 법을 이용한 미생물검사 SOP

1. 목적

본 SOP는 미생물 모니터링과정 중 ELISA법을 이용하여 토끼 혈액 중 미생물이 있는지 확인하고, 처치하여 실험동물을 청결한 상태로 유지하고 시험자의 안전위생을 확보하기 위하여 제정한다.

2. 규제 대상미생물

- 1) MP (*Mycoplasma Pulmonis*)
- 2) HVJ (Sendai Virus)

3. 준비

3.1. 사용기기

- 1) ELISA Reader
- 2) Minishaker

3.2. 사용시약

- 1) MP Control Serum
- 2) HVJ Control Serum

4. 실험방법

- 1) Serum은 검체 희석액으로 10배 희석한다.
- 2) Stock washing solution을 DW로 10배 희석한다.
- 3) 각 Well안에 들어있는 Preservation solution을 버린다.
- 4) Washing solution 90 μ l과 희석한 Serum10 μ l을 Well에 분주 한다. Blank에는 검체 희석액 100 μ l를 넣는다.
- 5) 15~30초간 Minishaker로 Mix한다.
- 6) 밀봉한 Plate를 실온(15~30 $^{\circ}$ C)에서 1시간 동안 밀봉하여 방치시킨다.
- 7) Plate의 well내 solution을 버리고 washing solution 200 μ l씩 넣어 3회 washing한다.
- 8) 표식항체를 washing solution으로 용해하여 well에 표식항체 solution을 100 μ l씩 넣고 15초간 Mix하여 밀봉하여 1시간 방치한다. 표식항체 solution용해는 미리 준비하는 것이 좋다.
- 9) Plate의 well내 solution을 버리고 washing solution200 μ l씩 넣어 3회 washing한다.
- 10) Substrate A vial에 Substrate B solution을 넣어 용해하여 Well에 100 μ l를 넣고 15초간 Mix한다.
- 11) 밀봉한 Plate를 실온(15~30 $^{\circ}$ C)에서 30분간 밀봉하여 방치시킨다.
- 12) Stop solution 100 μ l를 넣고 15초간 Mix한다.
- 13) ELISA READER로 492nm에서 OD값을 측정하다. ELISA READER 작동 법은 SOP에 따른다.

5. 검사보고서의 작성

- 1) 검역담당자는 동정된 결과에 따라 ‘동물검역미생물성적서’에 결과를 기입하고, 검역책임자가 날인 한 후 복사본을 해당구역의 동물관리책임자에게 송부 한다.
- 2) 검사결과가 불량인 경우에는 검역담당자는 검역책임자와 동물관리책임자에게 보고하고 협의하여 그 대책을 이행 후 일반적으로 재검사를 원칙으로 한다.

6. 자료의 보관

관련기록은 원본은 보관고에 보관하고 년말에 자료보관실로 이관한다.

7. 보관기록

- 1) 검역(정기, 임시) 검사의뢰서
- 2) 동물검역 미생물검사성적서

D. Gram 염색법 SOP

1. 목적

본 SOP는 미생물 VITEK을 이용하기 전 그람 염색성으로 균의 분리를 용이하게 하기 위한 감별염색으로 실험실을 청결한 상태로 유지하고 시험자의 안전위생을 확보하기 위하여 제정한다.

2. 준비물

- 1) Gram Cristal Violet (Difco, 같은 성분이면 타사제품도 이용 가능하다.)
- 2) Gram Iodine (Difco, 같은 성분이면 타사제품도 이용 가능하다.)
- 3) Gram Decolorizer (Difco, 같은 성분이면 타사제품도 이용 가능하다.)
- 4) Gram Safranin O (Difco, 같은 성분이면 타사제품도 이용 가능하다.)
- 5) 알코올 램프
- 6) 백금이
- 7) 슬라이드
- 8) 증류수
- 9) 광학현미경
- 10) Immersion oil
- 11) 기록용지, 필기도구

3. 실시방법

- 1) 청결한 슬라이드를 불꽃에 2~3회 통과시킨 후 슬라이드에 증류수를 한 방울 놓는다.
- 2) 멸균된 백금기로 콜로니를 따서 증류수와 Mix한다.
- 3) 공기 중에서 건조시키고 불꽃으로 2~3회 고정한다.
- 4) Gram cristal viole 용액으로 1분간 염색하고 수돗물로 약하게 뒷면에 흘리며 수세한다.

- 5) Gram iodine 용액으로 1분간 작용시킨다. (매염제)
- 6) Gram decolorizer 용액으로 슬라이드에 남아있는 염색액을 10초~1분정도 탈색하고 흐르는 물로 수세한다.
- 7) 대조염색액인 Gram safranin O액으로 30초간 염색하고 흐르는 물로 수세한다.
- 8) 공기 중에서 건조시키거나 또는 여과지로 여분의 수분을 제거한다.
- 9) Immersion oil을 슬라이드에 적하하여 1000배로 검경한다.

4. 결과

1) Gram 양성

탈색제에 탈색이 안 된 것은 흑자색으로 염색된다.

2) Gram 음성

탈색제에 탈색되어 후염색에 염색된 것은 후염색의 색 종류에 따라 색의 차이가 있을 수 있다. Safranin O와 희석된 carbol fuchsin에 의해서 적색으로 염색된다.

5. 주해

1) 탈색시간을 너무 오래하면 Gram 양성균이 Gram 음성으로 나타날 수 있다.

2) 도말 한 후 완전건조가 되기 전에 열로 건조시키면 후에 탈색이 어렵고, 찌꺼기 같은 것으로 잘못 판단할 수 있다.

3) 도말이 고르지 못하고 너무 두텁거나 조밀하면, 탈색시 Gram cristal violet이 남아서 나타날 수 있고 이런 때 Gram reaction에서 Gram 양성이 Gram 음성으로 나타날 수 있다.

4) Gram 양성균이 배양이 너무 오래되면 자가용해 되어 Gram 음성균으로 나타날 수 있으므로 Gram 염색에서 가장 적당한 배양시간은 18~24시간 배양인 것이 가장 좋은 결과를 가져온다.

6. 자료의 보관

관련기록의 원본은 검역실의 보관고에 보관하고 년말에 자료보관실로 이관한다.

7. 보관기록

- 1) Gram 염색 기록지

E. Caltalase 시험 SOP

1. 목적

Catalase는 색소생성능이 불명확할 때 Staphylococcus와 Streptococcus의 감별을 용이하게 하기 위한 것으로 본 SOP는 시험방법과 실험실을 청결한 상태로 유지하고 시험자의 안전위생을 확보하기 위하여 제정한다.

2. 준비물

- 1) 3% H₂O₂
- 2) 알코올램프
- 3) 백금이 (Nichrome 선)
- 4) 슬라이드

3. 실시방법

- 1) 멸균된 백금으로 혈액이 포함되지 않도록 균을 채취하여 슬라이드에 놓는다.
- 2) 3% H₂O₂를 한 방울 적하한다.

4. 결과

- 1) 양성 : 거품이 난다.
- 2) 음성 : 거품이 없다.

5. 주 의

- 1) 혈액성분이 포함되지 말아야 한다.
- 2) Loop로써 백금선은 위양성 반응이 나타나므로 반드시 Nichrome 선을 사용하여야 한다.
- 3) H₂O₂도 신선하게 제조된 것을 사용해야 된다.

6. 자료의 보관

관련기록의 원본은 검역실의 보관고에 보관하고 년말에 자료보관실로 이관한다.

7. 보관기록

- 1) Catalase 시험기록지

F. Oxidase 시험 SOP

1. 목적

본 SOP는 Oxidase 효소 존재여부를 검사하는 것으로 Oxidase 시험은 Gram 음성균의 감별을 용이하게 하기 위한 시험이며 실험실을 청결한 상태로 유지하고 시험자의 안전위생을 확보하기 위하여 제정한다.

2. 준비물

- 1) Differentiation Disks Oxidase (Difco, 같은 성분이면 타사제품도 이용 가능하다.)
- 2) 알코올램프
- 3) 백금이

3. 실시방법

- 1) 배양된 균을 멸균한 백금으로 채취하여 Differentiation disks oxidase위에 놓는다.
- 2) 증류수를 한 방울 적하한다.
- 3) 양성은 10~30초에 반응이 나타난다.

4. 결 과

- 1) 양성 : 적자색으로 변화한다.
- 2) 음성 : 집락색의 변화가 없다.

5. 자료의 보관

관련기록의 원본은 검역실의 보관고에 보관하고 년말에 자료보관실로 이관한다.

6. 보관기록

- 1) Oxidase 시험기록지

G. 녹농균 검사법 SOP

1. 목적

본 SOP는 환경관리에 필요한 항목중의 하나인 사육구역의 청결도에 대한 Indicator로 정한 녹농균 유무에 대하여 검사하는 것으로 동물을 청결한 상태로 유지하고 종사자의 안전위생을 확보하기 위하여 제정한다.

2. 검사의뢰서

1) 검역담당자는 년초에 년2회 기준으로 정기검사실시계획서를 작성하고 각 부문 담당자에게 배포한다.

2) 정기검사 또는 비정기 검사가 필요한 때에 동물관리책임자는 동물실 녹농균 및 스미어 검사의뢰서에 검사호실 및 구역등의 필요 사항을 기입하고 검사실시 1주전까지 검역담당자에게 송부한다.

3. 준 비

3.1. 배 지

1) Nutrient broth (Difco제품)

2) NAC agar (Eiken제품)

상기 배지는 동일성분이면 타사 제품도 이용 가능하다.

3.2. 기구, 기자재

1) 전자저울, 메스실린더(100~1000ml), 삼각플라스크(300~1000ml)

2) 멸균샤레(직경 9cm), 솜마개

3) 유산지(약 20 × 20cm), HOT PLATE STIRRER, 고압증기멸균기, 세균배양기

3.3. 배지의 제조

1) Nutrient broth 8g에 대하여 증류수를 1리터의 비율로 첨가하여 삼각플라스크에 넣어 Hot plate에서 가온 용해 후 121°C, 15분간 고압증기 멸균한다. 배지 약 5 ml 씩을 시험관에 분주하여 실온에서 고형화 시킨다.

2) NAC agar 35.8 g에 대하여 증류수를 1리터의 비율로 첨가하여 삼각플라스크에 넣어 Hot plate에서 가온 용해 후 121°C, 15분간 고압증기 멸균한다. 배지 약 20ml 씩을 샤레에 분주한다.

4. 녹농균 검사순서

1) 배지의 배송

검역담당자는 검사의뢰서에 기준하여 필요 배지수를 검사 전날 또는 당일 오전에 해당 구역의 담당자에게 배송 한다.

2) 동물실내의 노즐, 음수, 분변, 바닥, 하수구에 대해 각 3개씩 면봉으로 Sampling한다.

3) Sampling한 면봉은 Nutrient broth에 담가 37°C Incubator에 Overnight시킨다.

- 4) NAC agar에 다시 Incubation에 Overnight한다.
- 5) 형광빛 녹색집락 유무 관찰하고, 녹색집락이 있으면 VITEK으로 녹농균인지 확인한다.

5. 검사보고서의 작성

- 1) 검역담당자는 동물실 녹농균검사 성적서에 검사결과를 기입하고, 검역책임자가 날인한 후 복사본을 해당구역의 동물관리책임자에게 송부 한다.
- 2) 검사결과가 불량인 경우에는 검역담당자는 동물관리책임자와 협의하여 그 대책을 지시하며, 지시사항을 이행 후 일반적으로 재검사를 원칙으로 한다.

6. 자료의 보관

관련기록의 원본은 검역실의 보관고에 보관하고 년말에 자료보관실로 이관한다.

7. 보관기록

- 1) 동물실 녹농균 및 스미어 검사의뢰서
- 2) 동물실 녹농균검사 성적서

H. 스미어 검사 SOP

1. 목적

본 SOP는 환경관리에 필요한 항목중의 하나인 사육구역의 스미어 검사에 대하여 정한 것으로 실험동물을 청결한 상태로 유지하고 종사자의 안전위생을 확보하기 위하여 제정한다.

2. 검사의뢰서

- 1) 검역담당자는 년초에 년2회 기준으로 정기검사실시계획서를 작성하고 각 부문 담당자에게 배포한다.
- 2) 정기검사 또는 비정기 검사가 필요한 때에 동물관리책임자는 동물실 녹농균 및 스미어검사 의뢰서에 검사호실 및 구역 등의 필요 사항을 기입하고 검사실시 1주일까지 검역담당자에게 송부한다.

3. 준비

3.1. 배 지

- 1) Nutrient broth (Difco제품)

2) Blood agar plate (KOMED 제품)

상기 배지는 동일성분이면 타사 제품도 이용 가능하다.

3.2. 기구, 기자재

1) 전자저울, 메스실린더(100~1000 ml), 삼각플라스크(300~1000ml)

2) 멸균 샤프레(직경 9cm): 솜마개

3) 유산지(약 20×20cm), Hot plate stirrer, 고압증기멸균기, 세균배양기

3.3. 배지의 제조

1) Nutrient broth 8g에 대하여 증류수를 1리터의 비율로 첨가하여 삼각플라스크에 넣어 Hot plate에서 가운 용해 후 121°C, 15분간 고압증기 멸균한다. 배지 약 5ml 씩을 시험관에 분주하여 실온에서 고형화 시킨다.

2) BAP 배지는 상품화 되어있는 것을 사용한다.

4. 스미어 검사순서

1) 배지의 배송

검역담당자는 검사 의뢰서에 기준하여 필요 배지수를 검사 전날 또는 당일 오전에 해당 구역의 담당자에게 배송 한다.

2) 동물실내의 Rack, 벽, 바닥, 흡기구, 배기구, 소독조에 대해 3개씩 면봉으로 Sampling 한다.

3) Sampling한 면봉은 Nutrient broth에 담가 37°C Incubator에 Overnight하여 증균 시킨다.

4) BAP 배지에 다시 도말하여 Overnight하여 배양한다.

5) 콜로니 모양과 특성에 따라 독립콜로니를 따서 BAP 배지에 계단희석하고 overnight하여 배양한다.

6) Gram 염색, Oxidase 시험, Catalase 시험을 실시하여 해당 VITEK card를 선택하여 VITEK으로 동정하여 해당균을 확인한다.

5. 검사보고서의 작성

1) 검역담당자는 스미어 검사 성적서에 검사결과를 기입하고, 검역책임자가 날인 한후 복사본을 해당 구역의 동물관리책임자에게 송부 한다.

2) 검사결과가 불량인 경우에는 검역담당자는 동물관리책임자와 협의하여 그 대책을 지시하며, 지시사항을 이행 후 일반적으로 재검사를 원칙으로 한다.

6. 자료의 보관

관련기록의 원본은 검역실의 보관고에 보관하고 년말에 자료보관실로 이관한다.

7. 보관기록

- 1) 동물실 녹농균 및 스미어 검사의뢰서
- 2) 동물실 스미어 검사성적서

I. 총관검사 SOP

1. 목적

본 SOP는 소화관내 있어서 기생충의 기생유무를 검사하기 위해 분변에서 총관을 검사하는 방법에 대하여 정한 것으로 시험동물의 건강한 상태를 유지하기 위하여 제정한다.

2. 포르말린 에테르법(M.G.L.법)에 의한 검사

2.1. 준비

- 1) 신선변
- 2) 약 10ml 정도의 시험관
- 3) 생리식염수
- 4) 스페츨라 (분변 채취용 도구)
- 5) 거즈
- 6) 원심관(10ml)
- 7) 원심분리기
- 8) 10% 포르말린완충액
- 9) 에테르
- 10) KI 용액 (KI₂g + I₂1g + 50ml의 D.W.)
- 11) 매스핏셋 (10ml x 2, 5ml x 1)
- 12) 캐필라리 피펫
- 13) 슬라이드글라스
- 14) 커버글라스 (18×24mm)
- 15) 광학현미경
- 16) 기록용지, 필기도구

2.2. 실시

- 1) 검사당일의 신선변을 채취한다.
- 2) 약 5g 정도의 변을 시험관내에 넣고 7ml의 생리식염수를 첨가하고 스페큘라로 충분히 저어 용해시킨다. 거즈로 여과시켜 원심관에 넣는다.
- 3) 2000rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버린다. 침사된 양이 많으면 생리식염수를 첨가하여 원심 세정한다.
- 4) 침전물에 10% 포르말린 완충액을 약 7ml 넣어 스페큘라로 충분히 저어준 후 10~30분간 방치하고 에테르를 약 3ml 첨가한 후 뚜껑을 덮고 힘차게 흔들어준다.
- 5) 2000rpm으로 2~3분간 원심분리 후 상층액을 버리고 침전물을 잘 섞은 다음 캐필러리 피펫으로 따서 슬라이드 글라스 위에 1방울 점적한 다음 커버글라스로 덮어 표본을 제작한다. 원충 cyst를 관찰할 때는 KI용액을 1방울 염색한다.
- 6) 상기표본을 100배로 확대하여 검경한다.

2.3. 판정

- 1) 판정기준
 - : 전시야내에 충란이 없음
 - + : 전시야내에 충란이 1~10개 정도
 - ++ : 전시야내에 충란이 11~20개 정도
 - +++ : 전시야내에 충란이 21개 이상
- 2) 상기 기준에 따라 판정 결과를 기록용지에 기록한다.
- 3) 검사 종료후 기록용지에 날짜를 기입하고 서명한다.

3. 기록의 보관

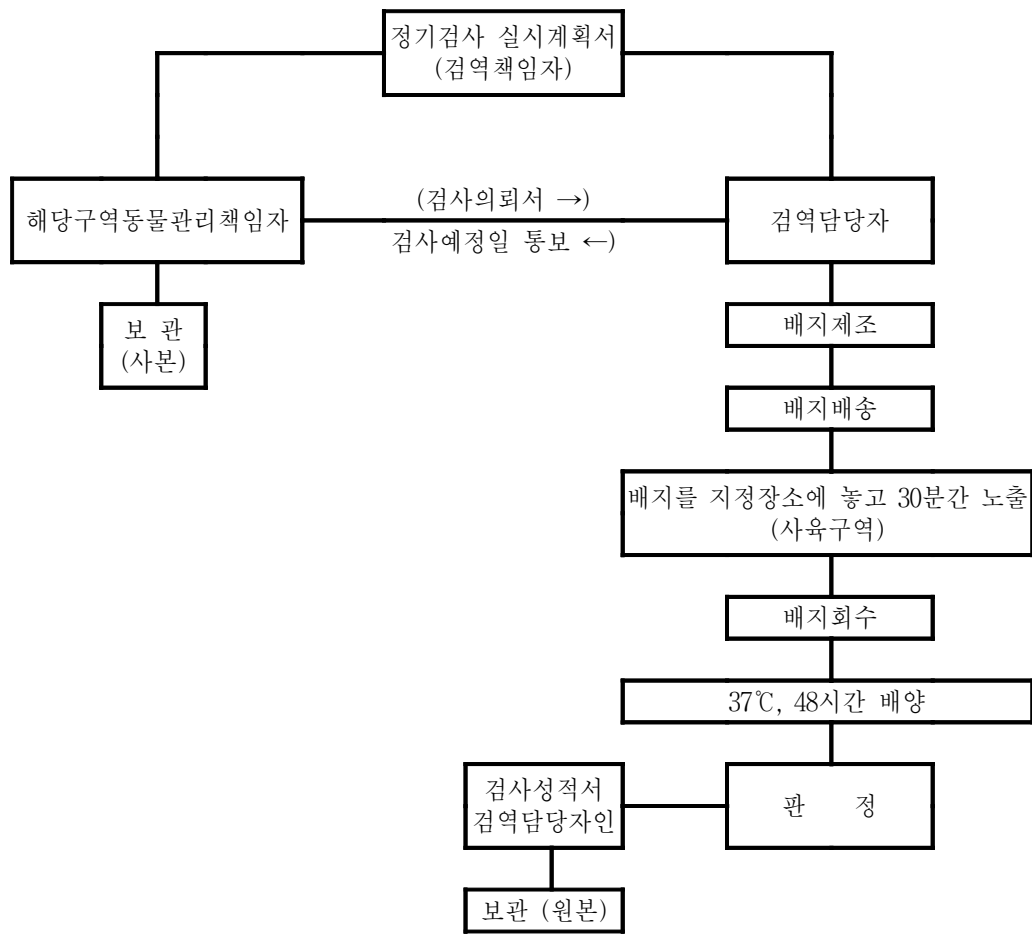
- 1) 동물검역·충란검사 성적서

J. 낙하균의 정기검사 SOP

1. 목 적

본 SOP는 환경관리에 필요한 항목중의 하나인 사육구역의 낙하균검사에 대하여 정한 것으로 실험동물을 청결한 상태로 유지하고 시험자의 안전위생을 확보하기 위하여 제정한다.

2. 작업모식도



3. 정기검사 실시계획서

- 1) 동물사육구역의 정기 낙하균 검사는 1년에 2회로 한다.
- 2) 검역책임자는 매년 12월에 검사를 필요로 하는 동물구역을 조사하여 명년의 정기검사실시계획서를 작성한다.
- 3) 정기검사 실시계획서는 검역책임자의 서명을 실시한 후 그 사본을 해당구역의 동물관리책임자에게 송부한다.
- 4) 정기검사와는 별도로 동물입수예정 동물실의 청정도를 확인하기 위해 필요한 경우 비정기적으로 동물입수 3일전에 필히 낙하균 검사를 실시한다.

4. 검사의뢰서

- 1) 정기검사 또는 비정기검사가 필요한 때에 동물관리책임자는 검사의뢰서에 검사장소 등

의 필요사항을 기입하고 검사실시 1주전까지 검역담당자에게 송부한다.

2) 검역담당자는 상기 검사의뢰에 대한 검사예정일을 동물관리책임자에게 통보한다.

5. 준비

5.1. 배지

1) Trypticase Soy Agar(Difco)

2) MacConkey Agar(Difco)

상기 배지는 동일성분이면 타사 제품도 좋다.

5.2. 기구.기자재

1) 저울, 메스실린더(100~1000ml), 삼각플라스크(300~1000ml)

2) 멸균샤레(직경9cm), 솜마개

3) 유산지, 항온수조, 고압증기멸균기, 세균배양기

5.3. 배지의 제조

1) Trypticase Soy Agar 배지 40g에 대하여 증류수를 1리터의 비율로 첨가하여 삼각플라스크에 넣어 항온수조 안에서 가온 용해 후 121°C, 15분간 고압증기 멸균한다. 배지 약 20ml 씩을 샤레에 붓고 실온에서 고형화 시킨다.

2) MacConkey Agar 배지 50g에 대하여 증류수를 1리터의 비율로 첨가하여 삼각플라스크에 넣어 항온수조안에서 가온용해 후 121°C, 15분간 고압증기 멸균한다. 배지 약20ml 씩을 샤레에 붓고 실온에서 고형화 시킨다.

6. 낙하균 검사순서

6.1. 배지의 배송

검역담당자는 검사 의뢰서에 기준하여 필요배지수를 검사 전날 또는 당일 오전에 해당 구역의 담당자에게 배송한다.

6.2. 배지의 노출

배지를 받아놓은 해당구역담당자는 비작업시에 검역담당자로부터 지정된 장소에 샤레를 놓고 30분간 노출한다.

6.3. 배지의 회수 및 검사

1) 검역담당자는 노출 배지를 실시당일의 오후, 각 구역의 담당자로부터 회수한다.

2) 검역담당자는 회수한 배지를 37°C 세균배양기에서 48시간 배양후 발육 코로니수를 계산하고, 낙하균검사 보고서에 기록한다.

7. 판정

직경 9cm의 샤레에서 30분 동안의 총 생균수(Trypticase Soy Agar)와 그람 음성균수(MacConkey Agar)를 산출하고, 낙하균 검사 보고서에 기록한다.

1) Barrier 구역의 판정기준

(1) 깔집을 사용하지 않은 경우

< 10개/30분/9cm ϕ 샤레 : 양호

> 10개/30분/9cm ϕ 샤레 : 불량

(2) 깔집 사용의 경우

< 50개/30분/9cm ϕ 샤레 : 양호

> 50개/30분/9cm ϕ 샤레 : 불량

2) 일반동물실 구역의 판정기준

< 150개/30분/9cm ϕ 샤레 : 양호

> 150개/30분/9 cm ϕ 샤레 : 불량

3) S.P.F 구역, 일반동물실 구역모두 균수의 다소에 관계없이 검역부문에서 설정한 지정 병원체의 출현 또는 그람 음성균수(MacConkey Agar)가 총 생균수의 반수이상의 경우는 불량한 것으로 한다.

8. 검사보고서의 작성

1) 검역담당자는 낙하균검사 보고서에 검사결과를 기입하고, 검역책임자가 날인한 후 복사본을 해당구역의 동물관리책임자에게 송부한다.

2) 검사결과가 불량인 경우에는 검역담당자는 동물관리책임자와 협의하여 그 대책을 지시하며, 지시사항을 이행 후 일반적으로 재검사를 원칙으로 한다.

9. 자료의 보관

1) 검사의뢰서와 검사보고서의 원문은 각각 화일에 철하고, 시험조정실에서 보관한다.

2) 동물실 사용부문의 동물관리책임자 및 검역책임자는 검사보고서 복사본을 소정의 장소에 보관한다.

10. 보관기록

1) 동물실 낙하균 정기검사 실시계획서 및 사육구역의 낙하균 검사 의뢰서

2) 사육실 낙하균 검사 보고서

K. 검역검사용 분변채취 SOP

1. 목적

본 SOP는 장내세균총 검사를 실시하기 위한 시험동물의 분변을 채취하는데 있어서 그 방법을 구체적으로 정해놓아 작업을 수행하는데 정확하고 편리하도록 하기 위하여 제정한다.

2. 준비

멸균된 무구핀셋, 뚜껑이 있는 원심분리관(50ml), 비닐봉투, 멸균된 깔개, 표지라벨 등을 준비하고 시험자는 멸균복, 마스크, 두건 및 멸균된 고무장갑을 착용한다.

3. 방법

깔개를 사육상자 밑에 깔고 자연 배설된 분변을 채취하여 원심분리관에 채취한다.

4. 마무리

각각의 원심분리관은 표시를 한후 투명한 비닐봉투에 넣고 봉한다. 비닐봉투에도 표시를 한다. 사용한 기구는 반출하여 세척한다.

5. 분변의 반출

비닐봉투에 봉한 분변은 곧바로 시험실 밖으로 물품의 반출에 관한 SOP에 따라 반출한다. 이때 반출하는 사람은 그 내용을 정확히 전달하고 비닐봉투의 외부를 70% 알코올로 소독한 후 검역검사의뢰서와 함께 미생물검사실로 송부한다.

6. 이상시의 처치

설사 등의 이상이 생겼을 경우는 미생물 검사 부문에 연락한다. 설사변 등의 채취는 스포이드 등 적당한 기구를 가지고 실시한다. 채취시 및 운반시에 분변이 섞이거나 주변에 떨어지지 않도록 주의한다. 작업 과정에서 이상이 생겼을 경우는 동물관리책임자에게 연락하고 그 지시에 따라 행동한다.

7. 기록의 보관

1) 검역검사 의뢰서

L. 사료 미생물검사 SOP

1. 목적

본 SOP는 시험동물에게 제공되는 입수시 사료가 미생물 등에 오염되지 않은 것을 확인하는 검사를 실시하여 시험동물이 항상 건강하고 청결한 상태를 유지하도록 하기 위해 제정한다.

2. 준비물

2.1. 배지

1) Nutrient broth

Distilled Water ······100ml

Nutrient broth suspend ··0.8g를 혼합하여 Autoclave 121℃ 20분간 고압멸균 시킨다.

2) Nutrient agar

Distilled Water ······200ml

Nutrient broth Suspend ······1.6g

Bacto agar ······3g

3) MacConkey agar

Distilled Water ······100ml

MacConkey agar suspend ··5g

4) EMB agar ······100ml

Distilled Water ······100ml

EMB agar suspend ······3.6g를 혼합하여 Autoclave 121℃ 20분간 고압멸균 시킨다.

2.2. 사료 부유액

1) 고품사료

고형사료 8~10개를 무균조작 하여 50ml Falcon tube에 넣고 멸균 생리식염수 40ml까지 채운 후 Vortex mixer로 혼합한다. 상청액을 이용한다.

2) 분말사료

분말사료를 무균조작 하여 50ml Falcon tube에 5ml까지 넣고, 멸균 생리식염수 40ml까지 채운 후 Vortex mixer로 혼합한다. 상청액을 이용한다.

3. 실시방법

1) 사료 검체는 Sample 3개를 만든다.

2) 평판배지는 사료 부유액 상청액 1ml을 페트리디쉬에 넣고 고압멸균 시킨 배지(Nutrient agar)는 50~60℃일 때 사료 부유액을 넣은 페트리디쉬에 20ml 넣어 Mix한다.

3) 액체배지는 사료 부유액 상청액 1ml을 14ml tube에 넣고 고압멸균 시킨 배지(Nutrient broth)는 50~60℃일 때 사료 부유액을 넣은 Tube에 5ml넣어 Mix한다.

4) Nutrient agar, Nutrient broth는 Incubator에 Overnight 시켜 다음날 균이 자랐는지 확인한다.

5) Nutrient broth에서 균이 자랐으면 MacConkey agar, EMB agar에 다시 배양시켜 집락수를 세어 사료미생물검사 성적서에 작성하고, 검역책임자에게 보고한다.

4. 자료의 보관

관련기록의 원본은 검역실의 보관고에 보관하고 년말에 자료보관실로 이관한다.

5. 보관기록

- 1) 사료분석의뢰서
- 2) 사료미생물 검사성적서

M. 자료의 정리, 편집 SOP

1. 목적

본 SOP는 시험 동물사육 관리에 필요한 각종 자료의 목록을 열거하여 각 시험별 자료의 정리, 편집이 용이하도록 하는 데에 목적이 있다.

2. 작업모식도



3. 사육기초자료 및 증거기록

3.1. 사육기초자료

사육기초자료는 다음과 같다.

- 1) 실험동물 공급표
- 2) 명세서 (공급체 제공)

- 3) 동물구입 청구서
- 4) 동물실 사용기록지
- 5) 순화기간 개체식별 카드
- 6) 개체식별 카드
- 9) 검수성적서
- 10) 검역용 부검소견 기록지
- 11) 동물검역·미생물검사 성적서
- 12) 군 분리 Work Sheet
- 13) 개체식별 방법기록지
- 14) 개체식별 방법 기록지
- 15) 사육동물, 사육상자 배열기록지
- 16) (체중, 사료소비량, 음수소비량)측정인자테이프 부착지
- 17) (Balance 정도관리) 인자테이프 부착지
- 18) Balance 정도관리 기록지
- 19) 순화 기간중 일반증상 관찰기록지
- 20) 일반증상 관찰기록지
- 21) 사진촬영 기록지
- 22) 안검사 기록지
- 23) 뇨검사 계획서
- 24) 뇨시험지 검사 인자 테이프 부착지
- 25) 뇨량 기록지
- 26) 사료급여 기록지
- 27) 사육기재의 교환기록지
- 28) 청소, 소독관계 기록지
- 29) (사망, 빈사)동물 기록지
- 30) 일반증상 사진 부착지

3.2. 증거기록

증거기록은 동물을 사육하는데 있어서 부대적으로 발생하는 것으로서, 동물실 환경측정 기록과 사료 및 음수의 오염물질 분석시험 성적서와 같이 시험이 실시되는 주변 환경의 질적 증명을 할 수 있는 증거가 되는 기록이다. 관련된 증거기록은 다음과 같다.

- 1) 출입대장

- 2) AUTOCLAVE 사용기록지
- 3) 기기, 설비 사용기록지
- 4) (정기, 이상발생시) 청소, 소독에 관한 기록지
- 5) 살충제 및 살서제 사용에 관한 기록지
- 6) 소독액 사용기록지
- 7) 사육시설의 환경측정 기록지
- 8) 풍량, 환기회수 측정결과지
- 9) 정기 환경측정성적 종합보고서
- 10) 감시반 업무일지
- 11) 고장수리 기록지
- 12) 휠타(filter) 교환의뢰서
- 13) 동물실 온습도 자동측정기록 부착지
- 14) 동물실의 낙하균 정기검사 실시계획서
- 15) 사육구역의 낙하균 검사의뢰서
- 16) 사육실 낙하균 검사성적서
- 17) 구입사료 검수서
- 18) 사료사용 상황표
- 19) 환경제어의 정기검사 실시 계획표
- 20) 멸균 명시표
- 21) 사료분석 의뢰서
- 22) 검체표시표(사료)
- 23) 검체표시표(물)
- 24) 사료분석결과 보고서
- 24) 사료미생물 검사 성적서
- 25) 물분석 의뢰서
- 26) 시험동물 운송기록지
- 27) 동물입수 상황표
- 28) 실험동물 양도, 이동허가원
- 29) 검역(정기, 임시) 검사의뢰서
- 30) 정기검사 계획서
- 31) 동물사육구역 점검표

- 32) SOP 이탈기록지
- 33) 냉장고 온도측정기록
- 34) 화학물질 폐기물 반출기록
- 35) 실험동물 마취 및 안락사기록
- 36) 수의학적 검사
- 37) 이상사태기록지
- 38) 사진촬영표시표
- 39) 일반증상 사진부착지
- 40) 군 분리기록지

4. 사용기재 및 실시방법

4.1. 사용하는 기구, 기재

- 1) 바인더
- 2) 펀치
- 3) 견출용지
- 4) 필기구 및 작업기록지

4.2. 실시방법

1) 작업기록지의 기록방법

모든 작업기록지는 검정색의 볼펜 또는 물이나 유기용매에 번지지 않고 지워지지 않는 검정색(젤러펜 등)의 필기구를 사용한다.

2) 시험 기초자료

- (1) 각 부문 담당자 및 책임자 확인이 완료된 기록지에 구멍을 뚫어 바인더에 철한다.
- (2) 발생된 자료는 동물관리책임자에게 기록지 작성후 1주일 이내에 송부하여 확인 받는다.

3) 증거기록

- (1) 각 부문별 담당자 및 책임자의 확인이 완료된 기록지에 구멍을 뚫어 바인더에 철한다.
- (2) 관련자료 중 공통자료는 매년 1월에 동물관리책임자가 전년도에 발생한 자료를 수집하여 자료보관실로 이관한다.

4) 기초자료 또는 증거기록이 자동적으로 컴퓨터에 직접 입력되는 경우에는 컴퓨터에 연결된 프린터에서 출력된 기록을 기초자료로 사용한다. 이 경우에 수정된 기록도 컴퓨터에 입력되고 출력되어야 하고 최종적으로 Back-up된 디스켓을 보관한다.

제 3 절 SPF 토끼의 수정란 생산과 동결보존 기술의 확립,
월 350두 생산사육시설의 운영에 따른 지침서 작성 및
SPF 토끼의 생리적 특성에 대한 검토

1. SPF 토끼 수정란의 동결보존

무균동물 또는 SPF 동물의 생산시설 및 모델동물의 작출에 있어 수정란의 동결 보존 기술의 확립은 유전자 도입동물 등의 특수한 계통작출, 생산조절 및 유지관리에서 뿐만 아니라 사육시설에 있어서 예기치 못한 오염 또는 화재 등의 재해로부터 사육하는 동물의 유전자를 보존하는 목적 등으로 활용할 수 있다.

현재의 포유동물 수정란의 동결보존기술은 Whittingham 등(1972)이 mouse를 이용하여 동결보존, 융해 및 이식의 성공이후 다양한 동물종에서 수정란 동결보존기술의 발전과 함께 융해 및 동결보존액에 관련된 연구가 활발하게 진행되고 있다. 지금까지 보편적으로 포유동물의 수정란 동결보존에 사용되어지고 있는 방법으로는 glycerol를 포함한 ethylene glycol DMSO 등의 동해방지제를 이용한 완만동결법(step-wise method), 직접 또는 급속동결법(non-step method) 및 최근 동결작업의 간편화를 목적으로 활용되고 있는 유리화 동결법(vitrification method) 등이 실용화되고 있다. 각각의 동해방지제 및 동결방법에 따라 동결·융해에 있어 수정란의 생존율에 있어 다소의 차이를 보이고 있는 것이 사실이다. 본 연구에서는 국내 최초로 SPF 토끼를 계통을 확립하고 이를 생산하기 위한 barrier system을 운영하여 번식군을 유지하면서 SPF 토끼의 생산과 공급을 하고 있지만, 만약에 있을지도 모르는 barrier system의 오염으로부터 유전자의 보호와 폐쇄군을 유지하면서 번식을 하는 것에 따른 근친계수의 상승을 조절하기 위한 수단으로서 수정란의 동결보존 기술을 활용하고자 SPF 토끼 수정란의 동결보존기술을 확립하고자 실시하였다.

실험에 사용한 토끼는 Newzealand white 임신토에서 자궁적출술 방식으로 Isolator에서 태자를 무균적으로 적출하고 인공포육한 뒤 Barrier system에서 사육, 번식하고 *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella spp.*, *Eimeria spp.*, Ear mange, body mange, Sendai virus(HVJ), mycoplasma 에 대해 free한 토끼(NZW:Yac)로서, Barrier system의 사육환경은 온도 22±4℃, 습도 50±15%, 환기회수는 15회/시간, 조명은 12시간 ON/OFF로 인공조명을 실시하였다. 사료는 퓨리나 주식회사의 펠렛형 토끼사료(무항생제)를 121℃, 5분간 고압증기로 멸균한 것을 제한급식(체중 3kg 기준 1일 200g)시켰으며, 음수는 1차적으로 치아염소산으로 소독한 다음 사육실에 설치한 water filter(5μm)로 여과하고 이어서 자외선 유수살균기로 살균한 것을 nipple을 통하여 공급하였다. 실험을 위한 동물은 생후 18주령, 체중 3.0kg 이상의 암컷과 생후 20주령, 체중 3.5kg 이상의 것을 선발하여 사용하였다.

토끼의 과배란 유기는 암토끼에 생리식염수에 15%의 PVP(K-90)를 녹인 용액으로 FSH(Tenka, Japan)를 4.0 AU/ml로 조절한 것을 1마리당 1ml씩 근육주사하고 72시간 후에 미정맥으로 100IU의 hCG(대성미생물)를 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG 주사와 함께 수컷 cage에 암컷을 옮겨 교배를 시켰다. 수정란의 채란은 채란하기 24시간 전에 절식시키고 상실배 이상의 수정란을 얻기 위해 교배 후 70~72시간에 진정제인 chlorpromazine HCl(Sepamine[®], Samsung Co, Korea)를 10 mg/kg로 근육주사하고 배위로 고정시킨 다음 질을 통하여 자궁에 8Fr의 2-way catheter(Fig. 17)를 삽입하고 3~5cc의 공기를 넣어 자궁각에 catheter를 고정하여 자궁관류를 준비하였다. 35℃로 가온하여 준비한 PBS+BSA(3mg/ml) 용액을 10ml 주사기를 이용하여 catheter에 주입/회수를 3회 반복하여 자궁내의 수정란을 회수하였다. 회수한 수정란을 실험현미경하에서 상실배 또는 초기배반포배로 발생한 것을 정상적으로 발생한 수정란으로 판단하고 PBS+BSA(3mg/ml) 용액으로 3회 세척하여 각각의 동결시험에 공시하였다(Fig 18).

유리화동결에 있어서 용액의 준비와 동결은 Kasai(1997)가 보고한 방법을 수정하여 실시하였다. 먼저 EFS-40 용액의 제작을 위해 35.1ml의 PBS에 Ficoll(F-2878, Sigma)을 15.0g 넣고 완전히 용해시킨 다음 여기에 Sucrose를 8.56g를 첨가하여 완전하게 녹이면 50ml이 된다. 다시 BSA 105mg을 첨가하여 녹인 다음, 거품이 생기지 않도록 혼합하여 FS액(30% Ficoll+0.5M sucrose 함유 PBS)을 만든 다음 18G의 주사침을 부착한 1ml의 주사기 2개를 이용하여 ethylene glycol과 FS액을 용적비가 2:3이 되도록 희석하여 EFS-40 용액을 만들고 이 용액을 0.45 μ m의 membrane filter로 여과하여 냉동보존 하였다. 회수한 수정란을 PBS 용액으로 만든 23℃의 0.5M sucrose 용액에 옮겨 넣고, 이어서 20℃로 조절된 실 내에서 0.25ml의 plastic straw에 0.5M의 sucrose 용액(~60mm), 공기(~20mm), EFS-40(~5mm), 공기(~5mm), EFS-40(~12mm), 공기(~5mm), EFS-40(1~2mm)을 흡입하여 수평으로 놓고, 유리 pipette에 EFS-40 용액을 흡입한 상에서 0.5M의 sucrose 용액중의 수정란을 흡입한 다음 이것을 EFS-40(~12mm)의 밑부분에 도입하고 공기(~5mm)와 0.5M sucrose 용액(~10mm)을 흡입하고 straw를 열처리하여 cotton 반대쪽을 밀봉하는 것으로 수정란을 straw에 loading 하였으며, 액체질소 상면에 부유하여 준비한 스티로폼 plate 위에 straw를 올려 3분간 예비동결하고 곧바로 액체질소에 침지하는 것으로 유리화 동결을 시켰다. 이때 수정란을 EFS-40에 도입하고 액체질소 상면에서 예비동결하기까지의 시간은 1분 30초로 하였다.

직접동결은 10% ethylene glycol(EG)를, 완만동결은 10% glycerol(G)를 이용하였다. 직접동결은 수정란을 20% 혈청을 첨가한 PBS에서 세척하고, 20% 혈청, 10% EG를 첨가한 PBS에 옮기고 0.25ml의 straw에 loading 후 -7℃로 준비한 program freezer 넣고 10분간 유지하였으며, 이때 -7℃에 넣은 다음 2분후 seeding 하였다. 이어서 -7℃에서 -30℃까지 분당 0.3℃ 속도로 냉각하고 -30℃에서 10분간 유지시킨 다음 액체질소용기에 넣어 동결을 완료하였다. 완만동결은 20% 혈청을 첨가한 PBS 용액으로 만든 3.3%와 6.6%의 glycerol 용액에 각각 10분간 평형을 시킨 다음 10%의 glycerol 용액에 넣고 0.25ml의 straw에 loading 후 18℃로 준비한 program freezer에 10분 후에 넣고 -7℃까지 분당 1.0℃씩 냉각시킨 다음 이하의 과정은 EG의 방법과 동일하게 하여 동결을 완료하였다.

유리화 동결법으로 동결한 수정란의 용해는 먼저 실온을 25℃로 조절하고 액체질소에서 straw를 꺼내 공기중에서 10초 유지시킨 다음 실온의 물에 침지하여 10초간 용해시켰다. straw의 sucrose 용액부분이 녹기 시작하면 곧바로 straw를 꺼내 거즈로 straw의 표면을 닦고 sucrose용액의 부분을 잡고 straw를 평형으로 유지하고, EFS-40 측의 끝과 cotton을 자른 다음 EFS-40 측의 끝을 배양접시의 위로 되도록 하여 straw를 조금 기우려 반대측(sucrose용액) 끝에서 sucrose 용액을 18G 주사침이 부착된 주사기로 밀어 넣어 straw의 내용물을 배양접시에 관류하고 수정란을 찾아 배양접시에 준비한 0.5M sucrose 용액에 옮겨 2분 30초간 유지하고 정상적인 수정란만을 회수하여 배양용 용액으로 세척하고 배양을 하였다. EG와 G의 경우는 35℃의 온수에서 15초간 용해시킨 후, EG는 곧바로 배양용 용액으로 세척을 하여 배양에 공시하였으며, G의 경우는 동결과 역순으로 각각의 농도용액 중에서 5분간 유지하여 glycerol를 수정란으로부터 제거한 다음 배양을 하였다(Fig 19, 20). 배양을 위한 용액은 20%의 혈청을 첨가한 Medium 199(Cat. No. 12340-030, Gibco)를 사용하였다. 각각의 방법으로 동결한 수정란을 용해하고 용해 직전에 투명대의 손상율과 24시간 배양후의 확장된 배반포배로의 발달율을 검토하고, 이식하는 수정란과 동기화시키기 위해 100IU의 hCG를 이정맥으로 주사하고



Fig. 17. 2-way foley catheter for recovery of embryos (8Fr).

이식전일에 절식시켜 수정란의 채란시와 동일한 방법으로 마취를 시킨 다음 내경 0.5mm, 외경 1.52mm, 두께 0.5mm의 microbore tube(Tygon[®])를 1.0ml의 주사기에 연결한 것으로 한쪽 자궁각 심부에 20개의 수정란을 이식하였다.

각각의 동결방법으로 동결하고 융해하여 체외에서 배양한 결과는 Table. 10과 같다. 상실배와 초기배반포배를 회수하여 유리화, 급속 및 유리화 동결을 한 다음 7일 이상 액체질소 중에 보존하고 융해하여 배양한 결과 어떠한 방법에 있어서도 융해하여 배양하면 85% 이상의 수정란이 확장된 배반포배 이상으로 발달되는 것이 인정되었다(Fig. 20). 토끼의 수정란은 다른 동물종의 수정란과는 특이하게 난관에서 분비되는 당단백질 성분인 mucin 이 Fig 18과 같이 투명대 주변에 균질하게 층을 이루어 부착되어 있다(mucin coat). Murakami 와 Imai(1996)에 의하면 토끼 수정란의 mucin coat은 수정란의 부화부터 자궁에 착상하기 전까지 수정란을 자궁의 해로운 환경으로부터 보호하는 기능을 발휘하며 이 층은 산자수에 영향을 미치는 것으로 보고하고 있으며, 또한 본 실험에서 정상적인 수정란의 배양후 확장된 배반포배 이상으로의 발달율이 높은 것은 투명대 주변의 mucin coat이 동해방지제에 노출하여 탈수를 유지하는 과정 동안과 융해후 수정란으로의 재급수가 일어나는 동안에 있어 급격한 변화를 완만하게 조절하기 때문이라 생각된다. 강 등(1998)도 토끼의 수정란을 18%의 ficoll과 40%의 ethylene glycol를 혼합하여 제조한 용액을 이용한 유리화 또는 1.8M의 ethylene glycol과 20% FBS를 첨가하여 제조한 용액으로 완만동결하고 융해하여 배양한 결과 유의한 차이가 없이 83.3-85.0%의 수정란의 부화배반포배로 발달하였다고 보고하고 있어 본 실험의 결과도 이와 유사하였다. Kasai 등(1992)도 EFS 용액으로 토끼 상실배를 20℃에서 2분간 평형시킨 다음 액체질소에 침지하는 것으로 동결보존한 수정란의 융해후 확장 배반포배로의 발달율이 87%에 달하였다고 보고 하였다. 이와 같이 토끼의 수정란이 다른 동물종에 비하여 동결융해후의 생존율 및 발달율이 높은 것은 투명대 주변을 둘러싸고 있는 mucin coat이 존재하기 때문이라 생각된다. 한편 표에는 나타나지 않았지만 유리화 동결방법으로 동결한 수정란을 융해하여 형태적으로 정상인 것을 16마리의 암토끼에 320개를 이식한 결과 197마리(61.5%)의 산자를 얻어 Landa(1982a)가 보고한 37개의 수정란을 5두에 이식하여 21(56.8%)마리의 산자수를 얻었다고 보고한 것보다 높았다. 이상의 결과를 종합해 보면, 토끼의 수정란은 다른 동물종의 수정란과는 다르게 투명대 주위에 mucin coat이 있어 이것이 수정란의 동결융해과정에서 일어나는 수정란 내외로의 수분이동에 있어 완급을 조절하

는 것에 의해 수정란의 세포질을 보호하는 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서 확립한 수정란의 동결·융해 기술을 이용하여 오염으로부터의 barrier system 보호 및 폐쇄균에 의한 번식에 따른 근친계수의 상승조절을 위해 정기적으로 수정란을 회수하여 동결보존하고 barrier 또는 isolator에서 수정란을 이식하는 방법으로 운영중인 barrier system을 안전하게 유지할 수 있을 것으로 생각된다.



Fig 18. Recovered rabbit embryos



Fig 19. Frozen-thawed rabbit embryos.

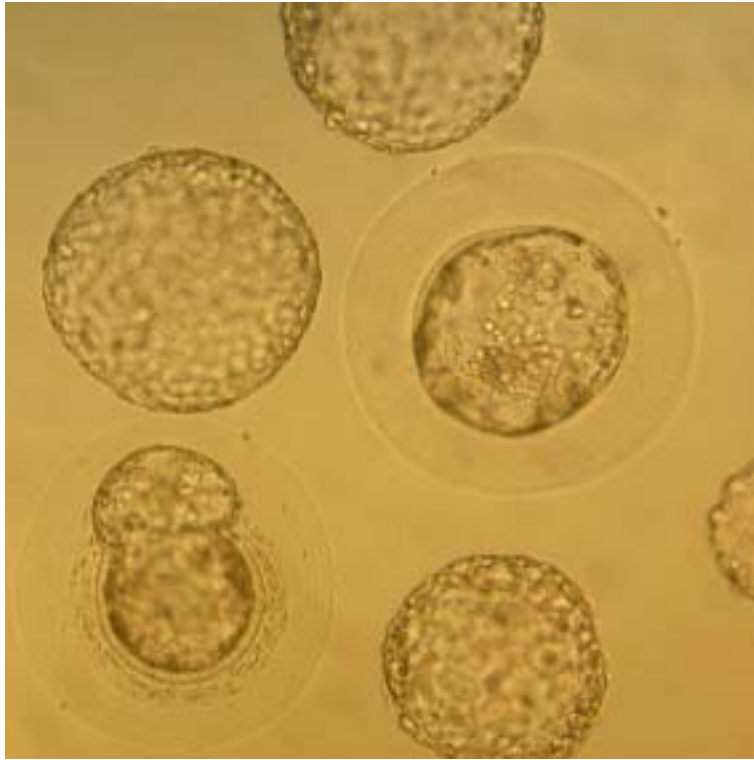


Fig 20. Embryos of Cultured frozen-thawed rabbit embryos.

Table 10. Effect of freezing methods on development of SPF rabbit embryos frozen-thawed

Methods of freezing	No. of embryos	Z.P. cracked(%)	Normal(%)	Develop to expanded blastocyst(%)
Vitrification	787	70(8.89)	717(91.1)	681(86.5)
Non-step	634	54(8.51)	580(91.5)	551(86.9)
Step-wise	465	32(6.88)	433(93.1)	415(89.2)

2. 월 350두 생산사육시설의 운영에 따른 지침서 작성

본 연구과제의 성과로서 국내에서 최초로 자체 확립한 *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella spp.*, *Eimeria spp.*, *Ear mange*, *body mange*, *Sendai virus(HVJ)*, *mycoplasma*에 대하여 free한 SPF 토끼를 운영중인 barrier system을 이용하여 번식·육성하고 삼성생명연구소 등 20여개의 연구소에 동물을 공급하였다. 주된 사용은 피부자극시험과 생식독성시험 등의 각종 안전성 시험연구에 활용이 되고 있는 것으로 조사되었고 개발한 SPF 토끼를 이용한 연구자들은 한결같이 동물이 온순하여 각종의 처치가 용이하며, conventional 토끼를 이용하는 경우는 각종 처치중 폐사되는율이 20%전후 발생하여 시험에 필요한 두수를 추가적으로 준비해야하는데 SPF 토끼는 폐사율이 없어 필요한 두수만으로도 시험이 가능하였다고 전하고 있어 SPF 토끼의 효과가 나타나고 있다. 그러나 일본의 경우, 토끼를 이용한 시험에서 SPF 토끼가 차지하는 비율이 60%인 점은 감안할 때 아직 국내의 경우는 이제 시작인 것이다. 보다 많은 SPF 토끼를 연구자들이 사용하도록 하기 위해서는 유전적, 미생물학적인 보증과 함께 동물의 가격을 낮추어서 염구비의 부담을 경감시키는 생산단가의 절약을 꾀하는 것이 필요하다고 판단되었다. 이렇게 함으로서 보다 많은 SPF 토끼가 각종의 연구시험에 사용될 것이며 결과적으로 외국으로부터의 수탁시험을 의뢰받게 될 것이며 이로서 국내 동물시험의 국제 경쟁력이 강화되게 될 것이다. 따라서 본 실험에서는 SPF 토끼의 품질보증과 함께 생산단가를 절감할 수 있는 방안에 대하여 검토하였다.

현재 SPF 토끼의 생산을 위해 운영중인 시설은 토끼 생산 전용의 시설로서 20×20×2.7m(1,080m³)의 면적에 전외기(全外氣) 방식의 barrier이다. SPF 동물의 생산·유지를 위해 필수적인 barrier는 시설내의 환경은 모두 기격적인 조절에 의해 유지되도록 이루어져 그 운영에 있어 세심한 주의와 기계적인 부분에 대한 전문지식을 요구한다고 할 수 있다.

동물의 생산에 있어서는, 번식 cage 120개와 육성 cage 504개를 운전하여 월 350두를 생산하는 계획으로 번식관리를 하고 있다. 모축의 번식은 윤환교배를 원칙으로 하고 번식회전율은 연간 7-8회(분만후 3주에 교배, 임신기간 4주; 번식주기 7주)로 하고 평균 산자수는 7두, 1회 분만에 대한 평균이유두수는 5두로 하여 모토 1두당 연간 자토생산량이 35-40두를 유지하기에 이르렀다. 자토의 육성에 있어서는, 생후 3주에 포유중인 산자수가 5두 이하인 경우는 산자간(産仔間)에 양자를 보내 모토의 번식으로의 회전율을 높였으며, 생후 6주에 이유하여 공간을 가변(可變)

할 수 있도록 제작한 육성 cage에 10-12마리씩 군사를 하고 9주령에는 암수를 구분하여 개체 사육하는 것으로 분만과 육성 cage의 활용을 극대화 하였다.

사육시설내의 환경조절에 있어서는, 연중 균등한 환경을 동물에게 제공하기 위해 시설내 청결을 위한 소독과 관련된 SOP 등 수종의 SOP를 정하여 운영하고 있다. 환경조건을 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$, 환기회수 15이상/시간으로 유지하며 환기량은 계절에 준하여 변화를 가할 수 있도록 공조기(A.H.U; air handling unit)의 배기구 말단에 비레제어식 댐퍼를 설치하고 외기조건에 맞추어 온도와 습도에 변화가 적은 봄, 가을에는 재 이용률을 0% 으로 하고, 외기의 온도와 습도변화가 심한 여름과 겨울철에는 배기되는 공기의 30-50%를 medium, hepa filter를 통하여 다시 동물실로 공급하도록 하였다. 한편 공기여과를 위한 filter류의 교체에 있어서는, A.H.U.의 구조에서 외기가 최초로 흡입되는 위치에 60%의 분진제거가 되는 두께 20mm의 부직포(pre-filter)를 장치하고 매주 2-3회의 교체를 하도록 하였으며, A.H.U. 내로 들어온 공기의 온도와 습도를 조절하도록 되어 있는 곳의 직전에 분진제거율이 80%인 medium filter를 설치하고 이것을 3개월 주기로 교체를 하도록 하였다. 최종 동물실에 공급되는 공기는 99.97%의 분진제거가 가능한 hepa filter를 설치하였으며, hepa filter의 frame은 습기 등에 의한 부패의 염려가 있어 알루미늄으로 된 것을 사용하도록 하였다. 또한 hepa filter는 교체를 년 2회하였고, 교체를 하기 전에 반드시 포르말린 훈연소독을 하여 동물실내로의 filter에 부착된 미생물의 혼입을 억제하였으며, medium 및 hepa filter를 교체할 때는 A.H.U.를 정지시킨 상태에서 작업을 행하였으며, 이때에는 보조발전기에 연결되어 있는 비상용 소형 A.H.U.를 가동시켜 동물에 영향이 미치지 않도록 배려를 하였다.

한편 월 350두 생산을 위한 1년간의 생산비용을 각 항목별로 비용을 구분하면, 환경유지(온/습도)를 위한 에너지비용이 29.2%로 가장 높았으며, 다음으로 인건비가 25.8%, 시설유지보수비용이 20%, 사료비가 19.6%, 기타 5.4%로 순으로 나타났으며, 환경유지관련비가 전체의 약 50%에 해당되었다. 따라서 생산단가를 절감하기 위해서는 동물의 질적인 부분에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 환경유지관리비를 절약이 필요하며 이를 위해, 공기의 온도와 습도의 기계적인 조절이 불필요한 봄, 가을에는 배기되는 실내공기의 환급량을 낮추고 온도와 습도면에서 불리한 여름과 겨울철에는 배기되는 공기를 최대 50% 정도 medium, hepa filter를 통하여 동물실내로 공급하는 방법으로 에너지비용을 20%까지 절약할 수 있는 효과를 얻었다. 한편 매일 교체가 요구되는 동물실내의 환기구에 사용되고 있는 pre-filter의

동물실내 설치되어 있는 진공청소기를 이용한 재활용을 통하여 소모품비의 절약을 피할 수 있게 되었다.

Barrier 시설내의 소독에 있어서는, 현재 운영중인 시설의 청정을 유지하기 위해 현재 사용하고 있는 소독용액은 3종(블텍스, 치아염소산 소다, micro quat)을 선택하여 사용하고 있으며, 매일 순서에 의해 소독용액을 교체하여 사용하는 것을 원칙으로 하고 있다. 또한 매일 정기적으로 동물실 전역에서 낙하균(落下菌) 검사를 실시하여 미생물의 오염정도를 측정하고 이 결과에 따라 소독 및 청소방법 등의 문제점을 개선하는 자료로 활용하고 있다.

결론적으로, 동물의 질병인 부분에 영향을 미치지 않은 범위에서 에너지 비용을 절감하여 생산단가를 낮추도록 하여야 하며, 번식효율을 극대화시키기 위해 번식모토의 회전율을 양자 보내기 등의 방법을 통하여 상승시키는 것이 생산시설의 이용효율을 극대화하여 저렴한 단가의 양질의 동물을 여러 연구 분야에서 손쉽게 선택할 수 있어 생명과학 연구 등의 발전에 기여할 것으로 생각한다.

3. Conventional 토끼와 SPF 토끼의 생리적 차이분석

- 임상병리 검사에 의한 자료-

가. 장기중량

3, 9, 16, 27주령 SPF 토끼의 측정된 장기의 절대 중량치를 평균 및 표준편차로 나타내었다(Table 11, 12). 각 장기에서 3주령의 부신을 제외하고는 수컷의 장기중량이 암컷보다 더 무거웠다. 3주령의 수컷의 부신좌, 우측은 각각 0.013g, 0.011g 이었고, 암컷의 부신좌, 우측은 각각 0.022g, 0.019g이었다. 16주령의 연암SPF 토끼와 4개월령의 JW-NIBS계 토끼와 비교했을 때 간과 비장의 무게는 무거웠고, 신장의 무게는 가벼운 것으로 나타났다^{a)}.

16주령의 SPF 토끼의 간과 비장은 각각 78.450g, 0.949g이었고, 4개월령의 JW-NIBS계 토끼의 간과 비장은 각각 59.0g, 0.6g이었다(Yamada 등, 1989). 16주령의 SPF 토끼의 신장좌, 우측은 각각 6.467g, 6.378g 이었고, 4개월령의 JW-NIBS계 토끼의 신장좌, 우측은 각각 7.2g, 7.1g이었다(Yamada 등, 1989). 3, 9, 16, 27주령별 장기의 무게변화는 흉선을 제외하고는 주령이 지날수록 증가하였다. 9주령의 수컷의 흉선이 16, 27주령의 수컷의 흉선보다 무거웠다. 9주령 수컷의 흉선은 4.033g이었고, 16주령과 27주령 수컷의 흉선은 각각 3.119g, 3.774g이었다. 또한 16주령 암컷의 흉선이 27주령의 암컷의 흉선보다 무거웠다. 16주령 암컷의 흉선

Table 11. Organ weight of 3, 9, 16 and 27 weeks male SPF rabbits.

	Male(g)			
	3W	9W	16W	27W
Spleen	0.27±0.107	0.82±0.223	0.94±0.134	1.10±0.230
Liver	8.52±1.491	68.66±8.104	78.45±16.281	78.60±18.325
Adrenal-left	0.01±0.004	0.05±0.015	0.08±0.024	0.17±0.052
Adrenal-right	0.01±0.003	0.06±0.012	0.09±0.022	0.17±0.049
Kidney-left	1.83±0.459	5.73±1.009	6.46±0.445	7.57±0.947
Kidney-right	1.83±0.475	5.74±1.032	6.37±0.649	7.66±1.131
Heart	1.14±0.101	4.34±0.899	5.25±0.473	6.86±1.551
Lung	2.12±0.347	8.11±0.638	9.24±0.978	12.06±2.868
Ovary-left	0.01±0.004	0.31±0.053	1.59±0.167	3.42±0.805
Ovary-right	0.01±0.004	0.32±0.083	1.61±0.142	3.45±0.863
Thymus	0.92±0.326	4.03±0.845	3.12±0.554	3.77±0.801

Table 12. Organ weight of 3, 9, 16 and 27 weeks female SPF rabbits.

	Female(g)			
	3W	9W	16W	27W
Spleen	0.15±0.021	0.797±0.216	0.923±0.189	1.059±0.201
Liver	6.40±0.300	48.632±4.303	64.299±3.966	72.726±9.753
Adrenal-left	0.02±0.006	0.035±0.012	0.052±0.008	0.116±0.023
Adrenal-right	0.02±0.003	0.040±0.007	0.060±0.024	0.099±0.014
Kidney-left	1.54±0.133	4.610±0.796	5.457±0.521	6.419±0.492
Kidney-right	1.52±0.108	4.535±0.675	5.613±0.522	6.414±0.683
Heart	1.13±0.081	3.264±0.352	4.795±0.502	6.178±0.242
Lung	2.23±0.359	7.882±1.032	8.509±0.655	9.069±0.977
Ovary-left	0.02±0.006	0.017±0.005	0.028±0.010	0.139±0.025
Ovary-right	0.02±0.003	0.018±0.005	0.030±0.007	0.142±0.014
Thymus	0.61±0.124	3.169±0.509	4.551±0.439	3.051±1.800

은 4.551g이었고, 27주령 암컷의 흉선은 3.051g이었다. 암컷의 흉선 무게의 변화는 수컷과 비교했을 때 16주령의 흉선이 비정상적으로 무게가 많이 나가고, 27주령의 흉선은 무게가 적은 것으로 생각된다.

이상의 장기중량은 동물시험에 영향을 주는 정도의 심각한 변화가 아니고 오히려 절대체중이 낮기 때문에 발생한 정상적인 변화로 본다.

나. 혈액학적 검사

3, 9, 16, 27주령 SPF 토끼의 혈액학적 분석한 결과를 평균 및 표준편차로 나타내었다(Table. 13, 14, 15, 16).

주령에 따라 크게 차이가 난 항목은 WBC, PLT, PDW, Neutrophil, Reticulocyte였다. 16주령 암컷의 WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)는 6.06 ± 1.25 , 3, 9, 27주령 암컷의 WBC는 각각 2.23 ± 0.16 , 5.24 ± 0.73 , 4.00 ± 1.65 로 16주령의 수치가 다른 주령에 비해 높은 수치를 보였다.

PLT($\times 10^3/\mu\text{L}$)는 3, 9, 16, 27주령 수컷에서 각각 507.00 ± 103.44 , 644.80 ± 253.86 , 380.00 ± 89.01 , 375.80 ± 185.54 , 3, 9, 16, 27주령 암컷에서 각각 487.00 ± 252.79 , 548.60 ± 110.37 , 334.80 ± 107.43 , 347.80 ± 49.46 으로 3, 9주령에서 증가하다가 16주령에서 감소하였다.

3주령 수컷, 암컷의 PDW(%)는 각각 83.88 ± 28.89 , 85.36 ± 24.77 로 다른 주령에 비해 높은 수치를 보였다. 27주령 수컷과 암컷의 Lymphocyte(%)는 각각 61.54 ± 9.05 , 56.76 ± 11.28 로 3-5kg의 New Zealand young adult white rabbits의 수컷과 암컷의 평균치인 39.0, 41.8보다 높았다(Mitruka, 1981).

반면에 27주령 수컷과 암컷의 Neutrophil(%)는 각각 25.90 ± 7.29 , 28.98 ± 7.67 로 3-5kg의 New Zealand young adult white rabbits의 수컷과 암컷의 평균치인 46.0, 43.4보다 낮았다(Mitruka, 1981)

이상 혈액학적 소견도 임상적으로 문제가 없는 정상적인 수치를 나타냈다고 보며 단지 새로운 스트레인에 의한 생물학적인 차이 때문으로 본다.

Table 13. Hematological values of 3, 9, 16 and 27 weeks male SPF rabbits.

	Male			
	3W	9W	16W	27W
WBC (x103/uL)	3.84±0.44	4.79±1.05	3.75±0.42	3.72±0.61
RBC (x106/uL)	5.09±0.19	4.75±0.22	5.13±0.17	5.69±0.59
HGB (g/dL)	11.00±0.90	10.60±0.35	11.48±0.38	12.64±0.67
HCT (%)	35.62±2.60	33.80±1.85	36.60±1.54	40.32±2.45
MCV (fL)	70.00±3.27	71.20±3.06	71.38±1.54	71.16±3.80
MCH (pg)	21.58±1.17	22.32±0.70	22.42±0.11	22.30±1.41
MCHC (g/dL)	30.84±0.47	31.40±1.14	31.36±0.75	31.32±1.08
CH _{cm} (g/dL)	28.50±0.85	28.80±1.24	28.50±1.36	28.44±1.26
CH (pg)	20.06±1.15	20.44±0.46	20.30±0.55	20.16±1.35
PDW (%)	19.78±3.59	12.82±0.49	13.56±0.56	13.44±0.64
HDW (g/dL)	3.61±0.65	1.69±0.06	1.65±0.06	1.92±0.25
PLT (x103/uL)	507.00±103.44	644.80±253.86	380.00±89.01	375.80±185.54
MPV (fL)	8.04±1.28	6.58±0.37	6.76±0.09	6.76±0.11

Table 14. Hematological values of 3, 9, 16 and 27 weeks female SPF rabbits.

	Female			
	3W	9W	16W	27W
WBC (x103/uL)	2.23±0.16	5.24±0.73	6.06±1.25	4.00±1.65
RBC (x106/uL)	4.45±0.67	5.74±0.46	6.46±0.30	6.19±0.14
HGB (g/dL)	10.36±2.17	12.02±0.61	13.82±0.33	13.62±0.49
HCT (%)	33.42±6.72	37.14±2.66	41.58±1.26	40.30±1.00
MCV (fL)	74.72±4.36	64.76±3.30	64.42±3.30	65.18±1.65
MCH (pg)	23.06±1.69	20.98±0.95	21.38±0.57	22.04±0.63
MCHC (g/dL)	30.86±0.83	32.40±0.90	33.24±0.90	33.80±0.79
CH _{cm} (g/dL)	29.56±0.79	31.36±1.08	32.68±1.31	33.48±0.99
CH (pg)	22.18±1.36	20.26±0.75	20.96±0.47	21.72±0.70
PDW (%)	16.04±3.83	12.44±0.68	13.38±1.08	12.30±0.91
HDW (g/dL)	2.91±0.56	1.92±0.18	2.14±0.11	2.16±0.14
PLT (x103/uL)	487.00±252.79	548.60±110.37	334.80±107.43	347.80±49.46
MPV (fL)	8.32±0.95	7.24±0.38	6.82±0.56	6.18±0.35

Table 15. Hematological values of 3, 9, 16 and 27 weeks male SPF rabbits.

	Male			
	3W	9W	16W	27W
PDW (%)	83.88±28.89	50.02±4.74	60.82±10.03	54.26±14.56
NEUT (%)	28.16±4.40	24.74±7.99	24.28±5.78	25.90±7.29
LYMPH (%)	56.82±6.64	60.22±11.87	62.78±7.70	61.54±9.05
MONO (%)	7.64±2.07	5.86±2.16	5.62±1.79	4.40±1.83
EOS (%)	4.02±1.92	2.40±0.50	2.10±0.35	2.50±0.34
BASO (%)	8.30±2.05	6.60±2.66	4.98±1.36	7.70±2.86
LUC (%)	0.18±0.13	0.20±0.07	0.28±0.13	0.30±0.12
RETIC (%)	9.28±2.50	7.26±1.27	4.10±0.32	3.68±1.33
RTC-RBC (x106/uL)	5.01±0.16	4.70±0.25	5.08±0.27	5.59±0.59
CH _{cmr} (g/dL)	27.68±0.40	27.42±0.97	27.22±0.68	27.62±0.48
CH _r (pg)	20.92±0.75	21.94±0.86	21.98±0.32	22.18±0.82
RDW _r (%)	13.58±0.75	10.38±0.23	10.66±0.55	11.14±1.00
HDW _r (g/dL)	3.63±0.34	2.12±0.05	2.19±0.04	2.39±0.22

Table 16. Hematological values of 3, 9, 16 and 27 weeks female SPF rabbits.

	Female			
	3W	9W	16W	27W
PDW (%)	85.36±24.77	60.24±9.97	55.88±9.30	50.68±6.19
NEUT (%)	22.92±3.36	27.94±7.88	42.44±15.84	28.98±7.67
LYMPH (%)	64.34±1.73	58.28±4.80	46.48±17.28	56.76±11.28
MONO (%)	3.58±1.61	4.46±2.70	5.02±2.50	4.46±2.71
EOS (%)	3.14±1.14	1.82±0.28	1.12±0.29	2.02±0.43
BASO (%)	5.76±2.45	6.90±2.97	4.70±1.37	7.48±1.57
LUC (%)	0.28±0.13	0.58±0.29	0.24±0.09	0.30±0.10
RETIC (%)	8.64±2.33	2.68±0.36	2.02±0.41	2.40±0.17
RTC-RBC (x106/uL)	4.39±0.68	5.66±0.46	6.35±0.32	6.08±0.22
CH _{cmr} (g/dL)	25.30±0.96	27.46±0.63	28.22±0.44	28.64±0.44
CH _r (pg)	18.84±2.89	20.12±0.61	21.64±0.48	22.40±0.72
RDW _r (%)	13.72±3.38	10.92±0.38	10.98±0.52	10.36±0.71
HDW _r (g/dL)	3.09±0.49	2.49±0.21	2.57±0.13	2.51±0.14

다. 혈액화학적 검사

3, 9, 16, 27주령 SPF 토끼의 혈액화학적으로 분석한 값을 평균 및 표준편차로 나타내었다(Table 17, 18).

주령에 따라 크게 차이가 난 항목은 PL였다. 3, 9, 15, 24주령 수컷의 PL은 각각 318.80 ± 23.12 , 124.20 ± 28.12 , 100.40 ± 14.12 , 97.60 ± 24.73 , 3, 9, 15, 24주령 암컷의 PL은 각각 135.40 ± 17.59 , 102.60 ± 18.04 , 87.00 ± 13.44 , 44.80 ± 13.37 로 주령이 지날수록 감소하였다.

이상 혈액화학적 소견도 임상적으로 문제가 없는 정상적인 수치를 나타냈다고 보며 단지 새로운 스트레인에 의한 생물학적인 차이 때문으로 본다.

Table 17. Serum biochemical values of 3, 9, 16 and 27 weeks male SPF rabbits.

	Male			
	3W	9W	16W	27W
AST	23.20±7.42	35.20±27.86	23.50±7.46	21.30±2.34
ALT	15.18±1.88	28.62±9.04	32.16±11.08	52.16±±14.80
ALP	893.20±91.49	466.00±117.92	500.60±122.34	503.00±75.80
BUN	18.2±2.24	15.60±3.04	17.34±0.70	19.54±2.33
CREA	0.56±0.07	0.64±0.05	0.86±0.11	1.12±0.05
GLU	161.54±4.85	147.62±9.27	142.24±2.88	135.50±12.31
TCHO	410.34±39.46	94.14±24.13	79.54±22.07	79.90±23.81
A/G	5.06±0.42	9.22±2.63	55.42±100.96	8.58±1.59
TP	4.37±0.24	4.56±0.21	4.81±0.28	5.21±0.39
ALB	3.65±0.23	4.09±0.12	4.45±0.25	4.65±0.30
CPK	3600.40±2603.05	2404.80±1857.02	3845.20±2554.90	2687.20±766.97
TG	71.66±22.14	151.10±85.52	69.90±9.80	63.74±30.72
CA	1.97±0.66	11.79±0.42	11.81±0.51	12.14±0.67
IP	9.03±0.45	9.22±0.43	8.32±0.21	7.02±0.51
PL	318.80±23.12	124.20±28.12	100.40±14.12	97.60±24.73
TBIL	0.04±0.03	0.06±0.04	0.10±0.01	0.10±0.04

Table 18. Serum biochemical values of 3, 9, 16 and 27 weeks female SPF rabbits.

	Female			
	3W	9W	16W	27W
AST	24.64±4.61	22.96±4.38	23.80±3.23	18.46±8.11
ALT	12.42±1.30	40.16±13.47	42.74±9.72	62.04±30.20
ALP	837.40±70.63	711.20±67.89	481.40±174.36	345.40±239.39
BUN	15.06±4.29	14.44±2.53	22.60±2.60	21.94±2.52
CREA	0.68±0.11	0.87±0.07	1.21±0.22	1.23±0.03
GLU	193.16±27.80	167.30±13.69	162.34±14.68	138.86±12.18
TCHO	227.70±22.74	80.92±17.63	51.86±9.89	50.60±8.09
A/G	4.28±0.36	5.93±1.61	5.16±0.94	5.99±1.24
TP	4.35±0.63	4.95±0.27	5.50±0.44	5.40±0.31
ALB	3.52±0.50	4.15±0.20	4.58±0.22	4.61±0.18
CPK	2732.20±1369.96	1680.80±813.99	1287.40±407.08	687.40±294.79
TG	81.14±29.84	87.94±9.12	116.70±83.46	53.54±38.03
CA	13.09±0.67	12.91±0.54	13.19±0.57	13.17±0.45
IP	9.12±0.33	8.64±0.46	8.25±0.98	6.21±0.38
PL	135.40±17.59	102.60±18.04	87.00±13.44	44.80±13.37
TBIL	0.08±0.05	0.03±0.03	0.08±0.05	0.09±0.02

라. 동물검역 미생물검사

Pasteurella multocida, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhimurium*을 culture의 방법으로 *Eimeria spp*는 현미경으로 검사하였으나 3, 9, 16, 27주령 수컷과 암컷 모두 음성으로 나왔다. 따라서 본시험에 사용된 토끼는 동물실험에서 가장 문제가 되는 미생물로부터 자유로운 품질이 우수한 SPF 토끼로 볼 수 있다고 본다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년 도	연 구 목 표	연구개발 목 표 의 달 성 도	관련분야의 기술발전예의 기여도
1차년도	SPF자토의 생산 기술 확립 및 사 육시설의 청정화	100%	<p>본 연구의 가장 핵심적인 분야로서 이부분이 달성되지 않으면 이후의 과제는 수행 불가능한 것이다. 자궁적출술로 conventional 토끼에서 무균 isolator와 clean room을 이용하여 최종 미생물 monitoring에서 <i>Pasteurella multocida</i>, <i>Bodetella bronchiseptica</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>Eimeria spp.</i>, <i>Ear mange</i>, <i>body mange</i>, <i>Sendai virus(HVJ)</i>, <i>mycoplasma</i>이 부재한 토끼를 인공유제조를 위한 모토착유법 개발과 인공 포유기술 확립으로 국내에서 최초로 작출을 성공하였다. 이러한 성과는 기존의 국내 실험동물의 SPF화 기술이 소형설치동물인 mouse, rat에 한정되어 있던 것을 중동물 이상으로 발전할 수 있는 가능성을 시사했다고 할 수 있다. 또한 실험동물인 토끼에서 안정적이며 장기적으로 착유를 할 수 있는 방법을 고안 하였으므로, 이 기술이 또한 실험동물을 이용한 비유생리, 유즙성분관련 연구, 질병연구 및 신생동물의 영양 등에 관련한 연구의 중요한 재료를 확보할 수 있는 기술로서도 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 결과적으로 국내에서도 각종 안전성연구를 위해 요구되는 SPF 토끼를 생산 공급할 수 있는 기반과 기술이 확보가 되어 이 동물을 이용한 각종 연구의 새로운 발전기회를 제공하게 되었다.</p>

년 도	연 구 목 표	연구개발 목 표 의 달 성 도	관련분야의 기술발전에의 기여도
2차년도	동결정액의 보존 기술 확립 및 각 종 모니터링 기술 확립	100%	<p>가축의 인공수정 기술의 발전은 정액동결 보존기술이 발전함에 따라 그 효용가치가 증가되었다고 할 수 있다. 그러나 동물의 종에 따라 현재 개발되어 사용되고 있는 동해방지제인 glycerol 첨가가 적합하지 않은 경우가 있고 특히 돼지, 닭 및 토끼의 경우 glycerol 농도를 소에 비하여 1/3-1/2의 비율을 첨가하고 있다. 본 연구에서는 토끼를 이용하여 첨체손상과 생존율에 미치는 세포막투과성, 비투과성 또는 다양한 당류에 대한 영향을 검토하였고 얻어진 결과는 정자의 동결과정 중에 발생하는 세포막 외로의 수분이동 정도와 속도를 조절하는 glycerol 이외의 물질에 대한 역할을 확인 할 수 있었고, 이를 돼지 정자에서 세포막 비투과성인 methyl cellulose를 첨가한 예비실험에서 그 효과를 확인하였다. 또한 동결정액을 이용한 인공수정 기술을 확립하였으므로 토끼를 이용한 생식독성 또는 최기형시험에서 액상정액만을 사용한 인공수정을 동결정액을 이용하여 수정을 할 수 있게 되어 실험수행에 있어 정액공급의 어려움으로부터 자유롭게 되었다. 또한 SPF 토끼의 체중증가에 대한 자료를 산자수, 성별에 따라 확보하였기에 토끼를 이용한 각종 시험에서 중시되고 있는 동물체중과 주령에 있어 그 선택을 위한 중요한 기준으로 활용될 수 있어 불필요한 동물사용을 억제할 수 있고 체중조절을 위한 예비사육이 불필요하게 될 것으로 생각된다.</p>

년 도	연 구 목 표	연구개발 목 표 의 달 성 도	관련분야의 기술발전예의 기여도
3차년도	수정란 이식을 이용한 번식체계 확립, 월 350두 생산 시설의 운영지침서 작성 및 SPF와 conventional 토끼의 생리적 특성 입증	100%	<p>실험동물에서 번식에 있어 폐쇄군으로 유지함에 있어 근친에 의한 피해와 SPF 동물의 사육에 필수적으로 요구되는 barrier 시설의 파괴로부터 사육동물의 유전자원 보존 등을 목적으로 수정란의 회수와 동결보존 및 수정란이식 등에 관한 자료를 토끼를 이용하여 얻게 되어, 이를 이용하여 가축의 과배란 처리실시의 단순화, 유리화 동결방법을 이용하여 간편한 수정란 동결보존이 가능하게 될 것으로 생각된다. 또한 barrier 시설을 이용한 SPF 동물의 생산에 있어 동물생산원가를 시설내의 환경유지에 관련한 에너지 비용을 절약할 수 있는 방법을 제시하였기에 이를 기준으로 점차 증대되고 있는 SPF 동물의 생산장 신설에 있어 A.H.U.의 사양의 결정에 중요한 자료로 활용될 수 있을 것이며, 이를 통한 생산원가가 절감에 의해 양질의 동물을 사용할 수 있는 기회를 확대시킬 수 있을 것으로 생각된다. 또한 현재 생산·공급되고 있는 SPF 토끼의 생리적인 자료를 확보하여 본 동물을 이용하여 연구를 하는 사용자에게 제공하게 됨으로서 사용자가 사용하는 동물에 대한 기초 자료를 얻기 위한 예비실험이 필요 없게 되었고 동물의 생리적인 특성에 대한 변화를 예측할 수 있어 실험이 원활하게 진행될 수 있어 불필요한 동물의 사용이 억제될 것으로 생각되어진다.</p>

년 도	연 구 목 표	연구개발 목 표 의 달 성 도	관련분야의 기술발전예의 기여도
최종평가	국제적으로 통할 수 있는 질의 SPF 토끼 생산 및 원활한 SPF실험토끼의 생산체제 확립	100%	<p>본 연구를 통하여 국제적으로 통용될 수 있는 SPF 토끼의 생산기반을 국내의 기술력으로 구축하게 되었다.</p> <p>현재 수입되어 사용되고 있는 SPF 토끼는 대부분 일본이나 미국에서 수입되고 있으며 마리당 40-50만원 정도로 알려지고 있으며, 사용자가 필요한 동물을 공급받기 위해서는 공급받기 1개월 이전에 주문을 해야 하며 운송 과정중에 문제가 발생되어도 조치가 쉽게 되지 않은 등의 비용과 시간적인 어려움이 있었으나, 1년간 본 연구과제의 결과로서 공급되는 SPF 토끼의 가격은 수입되는 SPF 토끼의 20%내외이며, 이는 수입대체 효과 뿐 만아니라 연구자의 연구비 절감효과는 물론이고 원활한 동물공급이 가능하므로 연구자의 입장에서도 연구계획 수립, 확인시험 및 문제 발생시 동물교환 등에 있어 시간적인 여유가 생겼다고 말할 수 있게 되었다. 또한 토끼를 이용한 각종 안전성 시험에 있어서, 국내에서도 SPF 토끼가의 생산기반이 구축되어 있고, 저렴한 가격으로 공급되고 있으므로 외국으로부터 의뢰되는 수탁연구를 받아들일 수 있는 조건이 확립되었기에 동물실험분야에서의 국제 경쟁력을 향상시키는 결과를 가져오게 되었으며, 본 동물의 사용이 증가됨에 따라 이를 관리하는 인력이 새롭게 요구되게 될 것으로 생각된다.</p>

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 현재의 진행상황

SPF 토끼의 생산기반이 구축되었고 이미 이를 생산할 수 있는 전문 barrier 시설을 연암축산원예대학에 2001년도에 신축하였으며, 본격적인 SPF 토끼의 생산은 2002년부터 시작되었고 2003년 6월 현재 국내 20여개의 정부출연연구소, 일반기업의 연구소, 병원의 동물실 및 대학 연구소 등에 수입 SPF 토끼의 20% 가격으로 공급을 하고 있으며, 동물이 온순하고 시험도중에 폐사되는 동물이 없어 연구진행이 용이하며, 얻어진 결과가 안정되어 결과에 대한 신뢰도가 향상되어 추가적인 시험이 불필요하다고 말하고 있다.

앞으로 성력관리를 통하여 현재의 품질을 유지하는 동시에 생산원가를 절감시키는 SOP를 강화하여 질적으로 만족하며 가격적으로 부담이 적은 SPF 토끼를 원활하게 공급할 수 있는 체제를 유지하도록 할 것이며 이를 통한 동물실험분야에 있어 국제 경쟁력 강화를 위한 소중한 재료를 공급하도록 할 것이다.

2. 향후 계획

본 연구에서 얻은 경험과 기술을 바탕으로 중동물 이상의 SPF 동물 작출과 이를 공급할 수 있는 시설의 운영 등을 추진할 것이다.

제 6 장 참고문헌

Abdelhakeam AA, Graham EF and Vazquez IA(1991). Studies in the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*. 28:36-42.

Allen CH and Almquist JO(1981): Effect of bulk freezing straws of bovine spermatozoa in a programmed freezer on post-thaw survival. *J. Anim. Sci*, 53:1423-1436.

Almlid T and Johnson LA(1988): Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci*, 66:2899-2905.

Amann RP and Pickett BW(1987): Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci*, 7:173-183.

Roy AJ and Djerassi I(1965): Prevention of freezing injury by simultaneous use of glycerol with different models of action. *Cryobiology suppl*, 1:20.

Arriola J(1982): Interaction of formaldehyde and of sodium and triethanolamine lauryl sulfate on the motility and fertilizing ability of rabbit and bull spermatozoa frozen in egg yolk and milk extenders. Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, New York.

Chen Y, X. Yang and RH Foote(1989). Timed breeding of rabbits with fresh and frozen-thawed semen and evidence of acrosome alteration following freezing and thawing. *Animal Reproduction Sci*. 18:35-41

Dalimata AM and Graham JK(1997): Cryopreservation of rabbit spermatozoa

using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Teriogenology*, 48:831-841.

Demik DS, Vos JL and Pickett BW(1976). Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal number on equine fertility. *J. Anima. Sci.* 43:633-637.

Fiser PS and Fairful RW(1990): Combined effect of glycerol concentration, cooling velocity on motility and acrosome integrity of boar spermtozoa frozen in 0.5ml straws. *Mol. Reprod. Dev*, 25:123-129.

Graham EF, Schmehl ML and Deyo RCM(1984): Crypreservation and fertility of fish, poultry and mammalian spermatozoa. *Proceedings of the 10th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*. pp. 4-29.

Hammerstedt RH and Graham JK(1992). Cryopreervation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology*. 29:26-38.

Hanada A and Nagase H(1980): Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Feretil*, 60:247-252.

Jenness R, Sloan RE(1970): The composition of milks of various species: a review. *Dairy Sci. Abst* 32(10:599-612).

Kasai M(1997): Cryopreservation of mammalian embryos. *Mole. Biotech.* 7:173-179.

Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Sakura T and Machida T(1992): High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biol. Reprod.* 46:1042-1046.

Kitoh M, Hayashi N, Katayama K(1998): Production of SPF mice by embryo transfer. ソフトサイエンス社(東京), p 2-7.

Maxwell WMC and Johson LA(1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling of crypreservation. Theriogenology, 48:209-219.

Landa V(1982a): Rapid thawing of rabbit embryos after storage at -196°C. Folia Biologica(Praha):28:67-73.

McBurney JJ, Meier H, Hoag WG(1967): Device for milking mice. J. National Cancer Inst. 38:11-17.

Marcus GE, Shum FTF, SL Goldman(1990): A device for collecting milk from rabbits. Lab. Anim. Sci. 40:219-221.

Mazur P(1984): Freezing of living cells: Mechanism and implications. AM. J. Physiol, 247: 125-142.

MITRUKA. BRIJ M(1981): Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans(Second)

Murakami H and Imai H(1996): Successful implantation of in vitro cultured rabbit embryos after transfer: A role for mucin. Mol. Reprod. Dev. 43:167-170.

Nagasawa H(1979): A device for milk collection from mice. Lab. Anim. Sci. 29:633-635.

National Research Council(1977): Nutrient requirements of rabbits. pp. 14, National Academy Press, Washington, D.C.

Parrish JJ and Foote RH(1986). Fertility of cooled and frozen rabbit sperm

measured by competitive fertilization. *Bio. Reprod.* 35:253-257.

Persel VG, Johnson LA and Rampacek GB(1972): Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* 34:278-283.

Philips JJ, Bramwell RK and Graham JK(1996): Cryopreservation of rooster sperm using methyl cellulose. *Poult. Sci.* 75:915-923.

Polge C, Smith AU and Parkes AS(1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164:666.

Sawanda Y and Chang MC(1964). Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethyl sulfoxide. *Fertil. Steril.* 15:222-229.

Schmehl MK, Vazquez IA and Graham EF(1986): The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 23:512-517.

Shum FTF, Marcus GF, Chiang MHC(1989): Does parenteral nutrition prevent intestinal atrophy in newborn rabbit?. *Pediatr. Res.* 25:269A.

Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P(1972): Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*. 178:411-414.

中尾博之(1994): Mouse, Rat의 자궁절단술. 소프트サイエンス社(東京), p 56-59.

上村文雄(1994): 代理母による無菌mouse作出法. ソフトサイエンス社(東京), p 60-68.

田博司(1996). 家畜, 家禽の精液の凍結に関する最近の知見. 日本胚移植研究會誌

. 18: 67-73.

山田淳三(1989), Biological reference data book on experimental animals, 56-57p

堀内茂友, 輿水馨(1989): 實驗動物の生物學的データ. pp. 462. ソフトサイエンス社, Tokyo.

이영순(1989): 실험동물의학. pp. 181-183. 초판, 서울대학교 출판부, 서울.

강다원, 최창용, 하관조, 강태영, 심보웅, 최상용, 이효중, 박충생(1998): 토끼의 정상 및 핵이식배의 유리화 및 완만동결에 따른 융해 후 발달률. 한국수정관아식학회지 13:1-9.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.