

동물실험계획 승인신청서

접수일자 : 2023 . 09 . 07 .

연구 과제명	(국문) 광학 이미징 기기가 결합된 수술용 현미경을 이용한 3차원 종양 제거술 실시 및 잔여 종양 확인			
	(영문) Three-dimensional tumor margin detection with the guidance of optical coherence tomography integrated surgical microscope			
연구 책임자	성 명	정웅규	직 위	부교수
	소 속	UNIST / 바이오메디컬공학과		
	연락처	C.P)052-217-2542 TEL)010-8464-0110	E-mail	wgjung@unist.ac.kr
	동물실험윤리교육 이수번호		K-2021-46434636	

* 동물실험계획 심의 후 승인 된 것에 한해서만 승인번호를 부여합니다. *

[윤리적 동물실험 방법의 준수]

- 본인은 UNIST 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) 규정 및 동물실험 관련 법규를 준수할 것을 약속합니다.
- 본인은 제출한 계획서의 실험 방법을 준수할 것이며 방법 또는 실험동물 마리 수 등 계획을 변경할 경우 변경신청서를 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.
- 본인은 동물이 참을 수 없는 고통을 호소하거나 질병에 이환되었을 때 안락사를 포함한 수의사의 응급조치가 이루어지는 것에 동의합니다(응급조치 전에 수의사의 지시가 있을 것입니다).
- 생체효능검증실 시설을 이용하여 동물실험에 참여하는 경우, 해당 하는 모든 연구자는 생체효능검증실 이용자 교육과 동물실험윤리 교육을 이수하였습니다.
- 본 계획서와 연관이 있는 논문 발표 후 해당 논문에 대한 정보를 위원회에 제공할 것입니다.
- 과제 승인 기간은 최대 1년임을 확인하였으며, 1년이 초과할 경우 기간 만료 전 재승인(연장)신청을 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.

계획서에 기재된 사항들은 정확하며 위 사실의 위반 시 동물실험 및 동물실험시설의 이용 제한을 포함한 불이익을 감수할 것을 아래와 같이 서약합니다.

연구책임자

2023년 09월 07일

정웅규 (서명 또는 인)



1. 실험 수행 기본 정보 (Information of Investigators)

1-1. 동물실험 수행자에 대한 정보를 기입하여 주십시오.

성명 (Name)	소속 (Department)	직급 (Position)	연락처(Contact) (Cell-phone#)	동물실험윤리교육 이수번호	연구자의 역할 (Role) (담당연구자/참여연구자)
정용규	바이오메디컬공학과	부교수	010-8464-0110	K-2021-464346 36	실험디자인 (연구책임자)
백송이	바이오메디컬공학과	박사 후 연구원	010-3358-0455	BIC Study-202303-5 24	수술,조직채취,안락사 (관리담당연구자)
김명주	바이오메디컬공학과	대학원생	010-9380-8427	BIC Study-202303-5 72	수술,조직채취,안락사 (참여연구자)
이은지	바이오메디컬공학과	대학원생	010-3958-4420	BIC Study-202112-2 174	수술,조직채취,안락사 (참여연구자)

- * 동물실험을 수행할 모든 연구자를 기입하기 바라며, 각 연구자가 실험 중 어떤 역할을 하는지 기입해주십시오.
연구책임자가 직접 동물실험을 수행할 경우 아래와 같이 위 란에 해당 정보를 기입하여 주시기 바랍니다.
- * 관리담당연구자는 동물실험윤리위원회(IACUC) 및 생체효능검증실과 연락 및 관련 업무 관리를 담당해야 합니다.
반드시 한 명 이상 지정해야 합니다.

1-2. 실험수행 기간

동물실험윤리위원회 승인일 ~ 2024년 5월 30일 까지 / 총 (1)년 중 (1)년째

- * 1회 과제 승인 기간은 최대 1년이며, 1년을 초과하여 실험이 진행 될 경우, 반드시 기간 만료 전 재승인(연장) 신청이 이루어
져야 합니다.
- * 재승인 신청은 최대 2회(총 연구기간 3년)까지 가능합니다.

2. 동물실험의 범주 및 종류 (Grade and Procedure of Study)

2-1. 동물실험의 범주를 선택하여 주십시오. (Level of Pain)	
	Grade A: 죽은 생물체를 이용하는 실험 또는 식물, 세균, 원충 또는 무척추동물을 이용한 교육 또는 연구
	Grade B: 척추동물을 사용하지만 거의 스트레스를 주지 않는 교육 또는 연구
	Grade C: 척추동물을 대상으로 단시간의 경미한 통증 또는 스트레스가 가해지는 교육 또는 연구
V	Grade D: 척추동물을 대상으로 중등도 이상의 고통이나 억압을 동반하는 교육 또는 연구
	Grade E: 척추동물을 대상으로 극심한 고통이나 억압 또는 회피할 수 없는 스트레스를 동반하는 교육 또는 연구

2-2. 동물실험의 종류를 선택하여 주십시오. (V) (Select Procedure)				
V	시료의 투여 및 접종 (Material injection or inoculation)	V	재료 및 시료의 채취 (Sampling)	유전 및 육종 (Genetics or Breeding)
V	외과적 처치 (Surgical procedure)		방사선 조사 (Irradiation)	감염 (Infection)
	생리적 상태 및 행동 관찰 (Observation of physical status or behavior)	V	발암 (Carcinogenesis)	기타 (Other)

3. 실험동물 (Laboratory Animals)

- * 생체효능검증실험을 동물에 반입할 경우, 지정된 동물생산회사에서는 신청 후 다음 주에 반입 가능합니다.
(대한바이오파마, 오리엔트바이오, 중앙실험동물)
- * 지정되지 않은 동물생산회사 및 연구협력기관(국내외)으로부터의 동물 반입을 원하실 경우 health report(최근 18개월 분량), SPF certification을 사전에 제출하셔야 합니다.

구분	1	2	3	4
품종(Species)	Mouse	Nude mouse		
계통명(Strain)	C57BL/6	Balb/c nu		
유전자형 (Genotype_)	Wild(V) GEM()	Wild(V) GEM()	Wild() GEM()	Wild() GEM()
성별(Sex)	M	M		
일령, 주령(Age)	12wks	6wks		

체중(Weight)	20~23g		20~23g					
수량(Numbers)	49		49					
미생물 성상 (Microbiological status)	germfree	SPF	germfree	SPF	germfree	SPF	germfree	SPF
	gnoto biotic	conventional	gnoto biotic	conventional	gnoto biotic	conventional	gnoto biotic	conventional
공급처(시설명) Source(vender)	Hyochang Science (Daehan Biolink)		Hyochang Science (Daehan Biolink)					

* 필요한 경우 동물정보 입력 칸은 추가하여 입력가능 하며, 추가하실 경우 위 표를 [복사]해서 이 줄에 [붙여넣기] 하시면 됩니다.

4. 동물실험 대체법과 불필요한 동물실험의 금지 (Alternatives and Rationale for Animal use)

* 가능하면 동물실험을 줄이기 위한 노력을 확인하고자 합니다.

4-1. 동물실험의 타당성을 확인하기 위한 것입니다. 다음 사항을 기술하여 주십시오.
(To verify the validity of animal experiments. Please describe the followings.)

정보 확인처 또는 데이터 베이스(Data References):

- Induction of colorectal carcinogenesis in the C57BL/6J and A/J mouse strains with a reduced DSS dose in the AOM/DSS model
- Mouse Models for Application in Colorectal Cancer: Understanding the Pathogenesis and Relevance to the Human Condition
- Anti-Cancer Effects of Zotarolimus Combined with 5-Fluorouracil Treatment in HCT-116 Colorectal Cancer-Bearing BALB/c Nude Mice
- FadA promotes DNA damage and progression of Fusobacterium nucleatuminduced colorectal cancer through upregulation of chk2

동물 중 선택의 적절성(Appropriateness of the selected species):

- C57BL/6은 성격이 온순하며 실험상 비교적 동일한 실험결과를 얻을 수 있음
- C57B/L6는 대장암에 적절한 민감성을 가지고 있어 암이 적당한 크기와 위치에 잘 자람
- Balb/c nu는 장에서 발생하는 암을 관찰하기에 좋은 모델임
- Balb/c nu는 인간과 유전적으로와 표현적으로 비슷한 모델임

사용동물 수에 대한 적절성(Appropriateness of the number of animals):

- Colon cancer model

: HCT-116이나 HT-29 cell을 주입하여 대장암 모델을 만드는데 이때 성공율이 약 80% 정도되며, mortality도 약 10% 된다. 따라서 수식은 목표n수/0.9(생존율)*0.8(모델형성율)이다.

$N=5(\text{목표수}) / \{0.9(\text{생존율}) \times 0.8(\text{모델형성율})\} = 6.94\text{마리}(\text{약 } 7\text{마리}), 12\text{주령}$

N 수로 5마리를 잡은 이유는, cancer cell injection 시 생존율이 높지 않으며, 생존 시간에 따른 결과

관찰이 필요하기 때문에 최소한 5개의 샘플이 필요하다.

다양한 종양 단계에서의 관찰을 위해서 크기 별로 5개의 샘플을 만들예정이라

7*5=35마리

추가로 조직병리, 생화학적 실험 등에서 통계를 추산하기 위해 N수가 5이상 필요하여

14마리를 추가하였음.

H&E staining	7
Biochemical assay	7

총 35+14 = 49마리

C57BL/6 종과 Balb/c nu 종에서의 차이점을 관찰하는 실험 수행을 위해서

각각 49마리가 필요함.

5. 실험동물의 사육관리 (Husbandry Management)

- * 생체효능검증실 이용자 교육을 이수하지 않은 연구자는 생체효능검증실에 출입할 수 없습니다.
- * 생체효능검증실에서 사육되는 실험동물은 수의사와 실험동물 기술사에 의해 사육관리가 수행됩니다.
- * 생체효능검증실에서는 정기적으로 미생물 모니터링과 환경모니터링을 실시합니다.

5-1. 실험동물 사육장소 (V) (Housing Zone)

Small animals zone		Return animal zone
BSL-2 zone	V	Others (유니스트 110동 709호 의광학 연구실)

* 생체효능검증실 이외 시설에서의 사육 또는 실험 시 해당 건물명, 층호수, 연구실 명 등을 기재하여 주시기 바랍니다.

5-2. 실험에 필요한 특수한 반입 물품 (Special Materials)

	No search remarks (v)
생체효능검증센터에 반입이 필요한 장비 및 도구:	V
특정사료 공급:	V
그 외 기타:	V

* 생체효능검증실에서 제공하는 물품 이외의 장비 및 도구를 연구자가 실험실 내로 직접 반입하고자 하는 경우, 사전에 담당자와 협의 후 멸균하여 반입

5-3. 실험동물 사육구역 이외의 장소로 실험동물 이동(Relocation)

	No search remarks (v)
장소:	
110동 709호	
사용장비:	
Surgical OCT, Serial OCM	

실험내용:

Surgical OCT를 통해 대장암 제거 수술을 진행하고 채취한 대장암 샘플에서 종양이 깨끗하게 제거되었는지 확인하기 위해 더 고해상도 장비인 Serial OCM으로 3차원 이미징을 진행할 예정
후에 조직병리, 생화학적 실험으로 종양의 단계나 종류를 판별할 예정

- * 생체효능검증실 SPF 구역 내의 mouse, rat은 외부 반출 후 SPF zone으로의 재반입이 불가능합니다.
- * 동물이 반출되는 모든 경우, 반출되기 최소 2일전에 허가를 받아야 합니다. (반출신청서 작성하여 제출)
- * 실험동물 사육구역(4zone) 내에서 해당 구역 이외의 장소로 동물을 이동시켜 실험할 경우 장소, 이용 장비 및 연구 내용을 기재하여 주십시오. (생체효능검증실 지하층 영상분석실은 사육구역에 포함되지 않습니다.)

5-4. 사료 및 음수 제한 (실험과정 중 실험동물의 사료 및 음수 섭취를 강제적으로 제한 할 경우) (Restriction of Feed and Water)		No search remarks (v)
실험기간		V
방 법		V
1회 처치 시간		V
반복 횟수		V
제한 사유		V

5-5. 실험 기간 중 운동제한 (실험과정 중 실험동물의 운동을 강제적으로 제한할 경우) (Require of Mechanical Restraint)		No search remarks (v)
실험기간		V
방 법		V
1회 처치 시간		V
반복 횟수		V
제한 사유		V

6. 실험동물의 수의학적 관리 (Veterinary care)

- * 실험과정 중 또는 종료 시에 실험동물의 고통을 줄이기 위해서 적절한 조치를 취해야 합니다.
- * 해당 약제에 표시하여 주십시오. 기타 약제일 경우 기타 난에 기입하여 주십시오.
- * 약품 구입시 처방전이 필요할 경우 생체효능검증실에서 발행해 드립니다.
(문의 : 생체효능검증실 수의사 이윤진, T.5214, leeyj0926@unist.ac.kr)

6-1. 실험 중 실험동물의 고통 관리(마취제/ 용량/투여방법/횟수) Pain Control (description of agent name, dose and route)		실시자 (Operator)	No search remarks (v)
진정/마취제 (Tranquilization/Anesthesia)	Isoflurane 2% 호흡마취기	김명주	
진통(Analgesics)			V
기타방법(Others)			V

6-2. 안락사 방법 (Method of Euthanasia)	Operator
CO ₂	김명주

- * 일반적으로 물리적 방법(경추탈골, 단두)보다 화학적 방법(흡입약제, 주사제, CO2)을 권장합니다.
- * 안락사에 대한 2007년 미국 수의사회 가이드라인(AVMA Guideline on Euthanasia : Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia, 2007) : <http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf> 참고

6-3. 수술 후 관리(*생존성 수술인 경우, 약제종류/용량/투여방법/횟수 등) (Postoperative Care (Describe agent name, dose and route in the survival surgery))		실시자 (Operator)	No search remarks (v)
항생제 투여 (Antibiotics Therapy)	Enrofloxacin/2.5~5mg/kg/ 피하투여/ 3일에 한 번	김명주	
진통제 투여 (Analgesics Therapy)	Acetaminophen/110~350mg/kg /PO/ 3일에 한 번	김명주	
기타 (Others)			V

6-4. 인도적인 실험 종료의 기준 (*만약 인도적인 안락사 기준이 필요 없을 시라도 그 사유에 대하여 기술해 주십시오.) (Criteria of Endpoint in Animal study (*If don't need criteria, describe what the reason))	No search remarks (v)
실험 중 임상증상의 발현 등이 관찰되거나 감염 등으로 인해 비슷한 주령의 정상동물의 체중과 비교하여 20%이상의 체중감소가 있을 시 실험을 중단하고 안락사 예정	

- * 동물에 극도의 통증 또는 스트레스를 가하는 결과가 예상되는 경우, 적절한 중재, 인도적인 실험종료(humane endpoint) 또는 안락사를 취하기 위한 기준을 제시하여 주십시오. (예: 통증으로 인한 사료섭취량의 감소나 정상 체중의 20% 이상 체중감소 시, 정상 체중의 10%를 초과하는 종양의 형성, 발암 실험의 경우 암 병소의 지름이 20mm이상 발생 시 등)

7. 생물학적 위해 물질 실험 (Animal Study using Biohazards)

- * 안전성 관련 서류를 계획서에 첨부해 주십시오. (예: RI 동위원소의 경우 “방사성동위원소 사용허가증” 첨부, 생물학적 안전도에 대한 근거자료 및 LMO신고서류 등)
- * Infectious agent의 경우 미국 CDC의 Biological level을 참조하시기 바랍니다. 판매처에 근거자료를 요청하시면 편리합니다.
- * 생체효능검증실은 BSL 1~2 등급의 생물학적 위해물질을 이용한 동물실험이 가능한 시설입니다. 그 외 병원균을 이용한 실험은 생체효능검증실로 문의해 주십시오. (이용 가능 물질 : 유전자재조합지침 별표2 참고)

7-1. 실험과정 중 방사선 핵종, 생물학적 물질, 위험 화학물, 재조합 DNA 등을 투여하는 경우 (Injection of Radionuclides, Biological agents, hazardous chemicals, recombinant DNA and Others)	No search remarks (v)
투여 물질(Agent):	V
용량 및 횟수(Dose):	
투여 방법(Route):	
처리 방법(Disposal Method):	
위해도 유무 및 정도(Infectious potential of Biohazards):	

동물 → 사람 전염 가능성 (Animal to person)	동물 → 동물 전염 가능성 (Animal to Animal)
생물 유해 물질이 동물에서 배출될 가능성 (Excretion)	배출 경로(Excretion route) :

7-2. 생물학적 안전도 (생물학적 물질을 투여하는 경우)(v) (Bio-safety Level)					No search remarks (v)
Grade	BS- I	BS- II	BS- III	BS- IV	V

8. 동물실험의 내용 (Outline of Animal Study)

- * 실험동물에 행해지는 동물실험의 내용에 관하여 상세히 기술해 주십시오.
 특히 실험동물을 각 군으로 나눌 경우 이에 관하여 상세히 기술하십시오.
- * **비전문가도 이해할 수 있는 용어**로 써주시고, 인간과 동물복지, 학문 및 사회발전에 미치는 영향에 대해 설명하여 주십시오.
- * 필요한 만큼 칸을 확장하여 기술해 주십시오.
- * 필요한 경우, 관련 서류를 첨부해 주십시오.

8-1. 동물실험의 목적과 예상되는 성과 (Objective and Expected Results of Animal Study)

기존 대장암 제거술에서 수술 후 남은 종양이 없이 깨끗하게 제거되었는지를 확인하려면 수술실에서 임상병리실로 조직을 보내 3~4일이 소요되는 조직 병리 슬라이드를 만들어 확인하게 된다. 이 과정에서 많은 시간이 소요되고 슬라이드는 종양의 일부분만을 2차원으로 확인하기 때문에 다른 부분에서의 재발 가능성이 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해 OCT (광학 이미징 기기)를 수술용 현미경에 결합한 새로운 시스템을 개발하였다. 실제 마우스 수술에 이 현미경을 사용하게 된다면 조직 표면뿐만 아니라 내부 구조까지 관찰이 용이하여 최소한의 마진을 남겨 수술 후 재발율을 크게 낮춰줄 것이다. 또한, 채취한 종양을 고해상도 Serial OCM을 통해 3차원 이미징을 진행하여 진단 및 정량화를 진행하고자한다. 이는 보다 정확한 수술을 가능하게 하고 수술 도중 종양의 3차원 이미지를 획득하여 추가 수술을 진행하거나 진단을 내리는 등 대장암 제거술의 발전에 많은 도움이 될 것이다.

8-2. 동물실험 계획 및 방법 (구체적인 기술)
 (Schedule and Methods of Animal Study (Describe detail))

총 실험기간 : 2023년 5월 - 2024년 05월

2023년 실험승인일~ : 실험동물에 테렐액을 이용해 호흡 마취시킨 후 수술한다. 마취 횟수는 수술 시 1회이며 수술이 종료될 때까지이다.

- 대장암 동물모델 제작

Colon cancer model (control): Surgical OCT를 이용한 대장암 제거 수술을 진행하기 위해 대장암 모델이 필요하다. 사람의 대장암 연구에 주로 이용되고 있는 C57BL/6 와 Balb/c nu를 동물모델로 선정하였다. 우리의 실험에서는 크기별로의 암 발생이 필요하여 일반 C57BL/6 마우스와 Balb/c nu 마우스도 암 제작에 사용될 예정이다.

각각 n=5일 경우: $5(\text{목표수}) / (0.9(\text{생존율}) * 0.8(\text{모델형성율})) = 7\text{마리}$

12주령 mouse를 3%의 isoflurane에 chamber 안에서 마취 시킨 후 마스크를 씌워 2%의 isoflurane으로 호흡 마취를 진행한다. 주사할 부위를 75% 에탄올로 소독한 후, HCT-116 100 μ L (4×10^6 cell/mL)을 27G 0.5인치 바늘 주사기로 옆구리에 피하 주사한다. 세포액을 주입한 후 몇 초간 멈춘 뒤, 바늘을 수직으로 조심스럽게 제거한다.

- 대장암 제거 수술

수술 전에 수술 도구들을 살균한다. mouse를 3% isoflurane에 chamber 안에서 마취 시킨 후 마스크를 씌워 2% isoflurane으로 호흡마취를 진행한다. 마취된 mouse를 heating pad 위에 올려둔다. 절개 부위를 75% 에탄올로 소독한 후, fine-iris scissors를 사용하여 대장암 부분의 피부를 절개한다. 대장암을 제거한 뒤 피부를 봉합한다.

2023년 5월 - 2024년 1월 : 실험진행

2024년 2월 - 2024년 5월 : 위 실험 샘플로 데이터 분석 및 논문 작성

-광학 이미징 및 분석

Colon cancer model을 크기별로 만드는 것과 동시에 Surgical OCT를 이용한 수술, Serial OCM을 이용한 3차원 이미징을 진행할 계획이다. 크기별로 Surgical OCT를 이용해 우선 대장암 제거 수술을 진행한 뒤, 채취한 샘플을 아가로즈에 임베딩한다. 임베딩한 샘플을 OCM으로 이미징한 뒤 vibratome을 이용하여 150 μ m 로 sectioning 하고 다시 이미징하는 과정을 반복하여 전체 종양 3차원 이미지를 획득한다. 획득한 이미지에서 종양 크기를 정량화하고 조직병리 및 생화학적 실험으로 정확한 단계와 질병을 진단할 예정이다.

