

## 동물실험계획 승인신청서

접수일자 : 2025. 01. 09.

<b>연구 과제명</b>	(국문) 맞춤형 생체조직 재생을 위한 in-situ 바이오프린팅 로봇 펜 기술 개발			
	(영문) Development of 3D Bioprinting Robot Pen Technology for Personalized Tissue Regeneration			
<b>연구 책임자</b>	<b>성 명</b>	강현욱	<b>직 위</b>	부교수
	<b>소 속</b>	UNIST / 바이오메디컬공학과		
	<b>연락처</b>	052-217-2527	<b>E-mail</b>	hkang@unist.ac.kr
	<b>동물실험윤리교육 이수번호</b>		202107-1416	

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

### [ 윤리적 동물실험 방법의 준수 ]

1. 본인은 UNIST 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) 규정 및 동물실험 관련 법규를 준수할 것을 약속합니다.
2. 본인은 제출한 계획서의 실험 방법을 준수할 것이며 방법 또는 실험동물 마리 수 등 계획을 변경할 경우 변경신청서를 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.
3. 본인은 동물이 참을 수 없는 고통을 호소하거나 질병에 이환되었을 때 안락사를 포함한 수의사의 응급조치가 이루어지는 것에 동의합니다(응급조치 전에 수의사의 지시가 있을 것입니다).
4. 생체효능검증실 시설을 이용하여 동물실험에 참여하는 경우, 해당 하는 모든 연구자는 생체효능검증실 이용자 교육과 동물실험윤리 교육을 이수하였습니다.
5. 본 계획서와 연관이 있는 논문 발표 후 해당 논문에 대한 정보를 위원회에 제공할 예정입니다.
6. 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.

2025. 01. 09.

연구책임자 \_\_\_\_\_ 강현욱 (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)
강현욱	바이오메디컬공학과	부교수	010-3375-4101	202107-1416	<b>(연구책임자)</b>
김현서	바이오메디컬공학과	대학원생	010-2543-2830	202211-2675	<b>수술, 조직채취 (관리담당연구자)</b>

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

1-2. 실험수행 기간

동물실험윤리위원회 승인일 ~ 2026년 3월 10일 까지 / 총 ( 3 )년 중 ( 1 )년째

- \* **1회 과제 승인 기간은 최대 1년**이며, 1년을 초과하여 실험이 진행 될 경우, 반드시 **기간 만료 전 재승인(연장) 신청**이 이루어져야 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
V	Grade C: 척추동물을 대상으로 단시간의 경미한 통증 또는 스트레스가 가해지는 교육 또는 연구
	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)		발암 (Carcinogenesis)	기타 (Other)

**3. 실험동물 (Laboratory Animals)**

- \* 생체효능검증실험로 동물을 반입할 경우, 지정된 동물생산회사에서는 신청 후 다음 주에 반입 가능합니다.  
(대한바이오링크, 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	
품종(Species)	Rat		Mouse		Mouse	
계통명(Strain)	Sprague-Dawley		BALB/c-nude		C57BL/6	
유전자형 (Genotype_)	Wild( V ) GEM( )		Wild( V ) GEM( )		Wild( V ) GEM( )	
성별(Sex)	M & F		M & F		M & F	
일령, 주령(Age)	6~8wks		5-10 wks		3-6 wks	
체중(Weight)	180~300g		10-25 g		10-25 g	
수량(Numbers)	60		90		60	
미생물 성상 (Microbiological status)	germfree	SPF <b>V</b>	germfree	SPF <b>V</b>	germfree	SPF <b>V</b>
	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional
공급처(시설명) Source(vender)	Hyochang Science		Orient Yeungnam branch (Orient)		Hyochang Science	

\* 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):

1. Journal of Advanced Research, (2021) DOI <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.11.011>
2. ACS Applied Material & Interfaces, (2023) DOI <https://doi.org/10.1021/acsami.3c02825>
3. Acta Biomaterialia, (2021) DOI <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.009>
2. ACS Applied Bio Material, (2020) DOI <https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.9b01176>

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

Sprague-Dawley (SD) rat

SD rat은 생명공학 및 의생명 연구에서 혈관 유도 및 재생 연구의 모델로 널리 사용되어 왔고, 이 계통의 쥐는 체구가 커서 수술 및 조직 샘플 채취가 용이하고, 혈관 구조가 인간과 유사하여 실험 결과의 신뢰성을 높인다는 점에서 이 계통을 선택하게 됨. SD rat을 이용한 선행 연구에서는 바이오프린팅 기술을 통해 혈관 유도 및 재생 능력을 확인한 바가 있음. 본 연구에서는 세포를 포함한 바이오 잉크를 SD rat의 피하나 피부에 도포하거나 주입하여 혈관을 유도하는 실험을 계획하고 있고 이는 선행 연구를 바탕으로 한 연구이기 때문에 실험을 위한 동물 종으로서 Sprague-Dawley rat 이 적합함.

BALB/c-nude mouse

BALB/c-nude mouse는 면역 결핍 상태를 가지고 있어 이종 또는 동종 세포 및 조직 이식 실험에 적합한 모델임. 본 연구에서는 혈관 유도를 위해 혈관성장인자를 방출하는 이종 세포를 사용하기 때문에, 면역 거부 반응을 최소화하고 혈관 재생 능력을 평가하기 위해 BALB/c-nude mouse의 사용이 필요함. BALB/c-nude mouse는 이종 세포를 이용한 혈관 유도 및 재생 연구에서 널리 사용됨. 참고 문헌에 따르면, 면역 결핍 상태에서 다양한 세포 및 조직 이식 연구가 성공적으로 수행되었으며, 이는 본 연구에서 혈관 유도 및 재생을 연구하는 데 필요한 신뢰성을 제공할 것으로 기대함. BALB/c-nude mouse는 면역 거부 반응이 적어, 세포가 포함된 바이오 잉크의 효과를 보다 명확하게 관찰할 수 있고, 이를 통해 혈관 유도 및 재생에 대한 정확한 데이터를 얻을 수 있을 것이기 때문에 BALB/c-nude mouse 계통을 선택함.

C57BL/6

본 연구에서는 개발한 바이오잉크의 체내에서의 프린팅 성능, 적층성 등을 검증해야 하기 때문에 C57BL/6의 사용이 필요함. C57BL/6는 바이오잉크의 성능 평가 연구에서 널리 사용됨. 참고 문헌에 따르면, 바이오잉크이 체내 적합성 연구가 성공적으로 수행되었으며, 이는 본 연구에서 In-situ 바이오프린팅 용 잉크를 개발하는 데 필요한 신뢰성을 제공할 것으로 기대함.

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

##### 실험1 <바이오잉크의 프린팅 성능 및 체내적합성 검증 >

총 실험기간 : 2025년 3월 10일-2026년 3월 10일

1) control: Saline을 투여한 후 시간별(7day, 14day, 21day)로 조직염색을 통해 변화를 알아봄.

각각 n=5 일 경우 : 5(마리수)X3(시간별)=15 마리

2) Experiment group : 세포가 없는 구조체 이식 후 시간별(7day, 14day, 21day)로 조직염색을 통해 변

화를 알아봄.

각각 n=5 일 경우 : 5(마리수)X3(시간별)=15 마리

⇒ 실험을 SD rat과 C57BL/6에서 각각 2회 반복 시행 한다면 각 실험동물 당 60마리가 필요함

**실험2 <바이오잉크의 혈관재생 성능 검증 >**

총 실험기간 : 2025년 3월 10일-2026년 3월 10일

1) control: Femoral Artery/vein을 제거하고 다른 처치를 하지 않고, 시간별(7day, 14day, 21day)로 조직염색을 통해 혈관 재생 여부를 확인함.

각각 n=5 일 경우 : 5(마리수)X3(시간별)=15 마리

2) Experiment group 1 (2M/mL) : 세포가 2M/mL의 농도로 들어있는 구조체 이식 후 시간별(7day, 14day, 21day)로 조직염색을 통해 변화를 알아봄.

각각 n=5 일 경우 : 5(마리수)X3(시간별)=15 마리

3) Experiment group 2 (5M/mL) : 세포가 5M/mL의 농도로 들어있는 구조체 이식 후 시간별(7day, 14day, 21day)로 조직염색을 통해 변화를 알아봄.

각각 n=5 일 경우 : 5(마리수)X3(시간별)=15 마리

⇒ 실험의 재현성 확인을 위해 2회 반복 시행 한다면 90마리가 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	V	Return animal zone
BSL-2 zone		Others ( _____ )

\* 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)**

5-2. 실험에 필요한 특수한 반입 물품 (Special Materials)	No search remarks (v)
생체효능검증센터에 반입이 필요한 장비 및 도구: 수술 도구, 마취제 (Isoflurane), 3D 바이오펜	
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:		
105동 줄기세포관 1층 실습실		
사용장비:		V
실험내용:		

- \* 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)	1. Isoflurane / 2-2.5% of isoflurane in oxygen / respiration / 1회	김현서	
진통(Analgesics)			V



기타방법(Others)			V
--------------	--	--	---

6-2. 안락사 방법 (Method of Euthanasia)	Operator
CO <sub>2</sub>	김현서

- \* 일반적으로 물리적 방법(경추탈골, 단두)보다 화학적 방법(흡입약제, 주사제, CO<sub>2</sub>)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)		V
진통제 투여 (Analgesics Therapy)		V
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 임상 증상의 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)
본 연구의 주된 목적은 맞춤형 생체조직 재생을 위해 in-situ 바이오프린팅 로봇 펜 기술을 개발하는 것으로서, 조직에 바로 바이오 잉크를 프린팅 하여 신속하게 맞춤형 조직을 재생하는 것을 목적으로 하고 있음. 3D 펜을 이용한 바이오프린팅 기술에 적용할 수 있는 맞춤형 바이오 잉크를 개발하고, 이를 통해 혈관 유도과 기능성 조직 재생을 할 수 있을 것으로 기대함.

8-2. 동물실험 계획 및 방법 (구체적인 기술) (Schedule and Methods of Animal Study (Describe detail))
<p><b>실험1 &lt;바이오잉크의 프린팅 성능 및 체내적합성 검증 &gt;</b>  <b>총 실험기간 : 2025년 3월 10일-2026년 3월 10일</b></p> <p><b>1. 실험 목적</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이오잉크의 생체적합성 평가</li> <li>- 프린팅된 조직의 구조적 안정성 확인</li> <li>- 면역반응 및 생분해성 분석</li> </ul> <p><b>2. 수술 및 프린팅 과정</b>          실험 동물의 준비</p>



큰 구조체 프린팅의 경우 랫드(Sprague-Dawley)를 사용하고, 작은 구조체 프린팅의 경우 마우스 (C57BL/6)를 사용함.

마취 및 수술:

수술 전 동물은 Isoflurane 500-1000ml/min, 2%, facial mask를 이용하여 전신마취를 시행한다. 대퇴부를 베타딘으로 소독한 후, 절개하여 Femoral Artery/Vein이 노출되도록 한다. 준비한 바이오잉크를 대퇴근 위에 프린팅한 후, 가교잉크를 도포하여 구조체를 완전히 가교한다. 구조체가 가교된 후, 절개한 피부를 봉합한 후, 드레싱으로 마무리한다.

### 3. 조직학적 평가

수술 2~3주 후 안락사 시킨 각 실험 동물의 대퇴근과 프린팅된 구조체를 함께 채취한후, 10% phosphate buffered 포르말린에 고정한다. 이후, H&E 염색을 통해 체내 독성 평가와 구조체의 유지 여부를 확인한다.

## 실험2 <바이오잉크의 혈관재생 성능 검증 >

총 실험기간 : 2025년 3월 10일-2026년 3월 10일

### 1. 실험 목적

- 바이오잉크의 혈관 재생능 평가

### 2. 실험군 설계

혈관생성인자를 방출하는 바이오잉크의 혈관 재생능을 비교 검증 및 세포 농도를 최적화 하기 위해 세포 농도를 2M/mL~5M/mL로 다르게 한 실험군과 세포가 들어있지 않은 대조군으로 나누어 실험을 진행함



### 3. 수술 및 프린팅 과정

실험 동물의 준비

혈관재생 성능 검증 실험의 경우 이중 세포가 포함된 바이오잉크를 사용하기 때문에 면역이 없는 BALB/c-nude를 사용함

마취 및 수술:

수술 전 동물은 Isoflurane 500-1000ml/min, 2%, facial mask를 이용하여 전신마취를 시행한다. 대퇴부를 베타딘으로 소독한 후, 절개하여 Femoral Artery/Vein이 노출되도록 한다. Femoral Artery/vein 양 끝단을 결찰한 후, 결찰된 사이의 혈관은 Monopolar를 사용하여 제거한다. 준비한 바이오잉크를 혈관이 제거된 대퇴근에 프린팅한 후, 가교잉크를 도포하여 구조체를 완전히 가교한다. 구조체가 가교된 후, 절개한 피부를 봉합한 후, 드레싱으로 마무리한다.

### 4. 조직학적 평가

수술 2~3주 후 안락사 시킨 각 실험 동물의 대퇴근과 프린팅된 구조체를 함께 채취한후, 10% phosphate buffered 포르말린에 고정한다. 이후, H&E 염색과 CD31 면역형광 염색 (immunohistochemical)을 통해 체내 독성 평가와 혈관 재생 여부를 함께 관찰한다.