

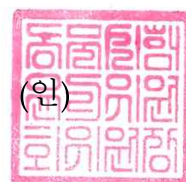
동물실험윤리위원회 실험계획서 승인서

과제명 및 과제번호	Host immune responses to bacteria in mouse models		
	2013-0197		
실험 기간	2013년 10월 28일 ~ 2014년 3월 31일 (약22주간)		
실험책임자	김 정 목	승인일	2013년 10월 6일
		(가)승인번호	2013-0197A

상기 동물실험계획서는 3R 정신에 입각한 동물실험의 윤리적 사항을 준수하고 있을 뿐 아니라, 동물실험윤리위원회의 검토 및 심의 과정을 통하여 동물복지 차원에서 합리적이고 적절한 방법에 따라 수행될 수 있을 것으로 확인되어 실험의 진행을 승인합니다.

2013년 10월 6일

동물실험윤리위원회 위원장 백두진 (인)



IACUC No.	17-012
-----------	--------

동물실험윤리위원회 심의결과 통지서

동물실험제목 : 세균대사물질에 의한 염증조절 기전 연구 / Research of Mechanism of Regulating Inflammation by Bacterial Metabolite

연구책임자(소속/직명/성명) 약학과 교 수 우 현 애 귀 하

심의의뢰자(소속/직명/성명) 약학과 박 지 영 귀 하

귀하가 신청하신 위의 동물실험계획에 대한 결과를 다음과 같이 알려 드립니다.

동물실험윤리위원회 개최일시 : 2017. 4. 11.

심사결과 ☒ 승인 ☐ 조건부 승인 ☐ 보완후 승인 ☐ 보완후 재심의
☐ 부결 ☐ 승인된 연구의 중지 또는 보류

2017 년 4 월 25 일

동 물 실험 윤 리 위 원 회 위 원 장 (인)



동물실험 계획서()

연구자	소속	직급	성명	E-mail 주소	연락처/휴대전화	확인
연구책임자	한양대학교	교수	김정목	jungmogg@hanyang.ac.kr	010-7232-9685	
공동연구자 및 연구원	한양대학교	대학원생	고수혁	ztizen@hanmail.net	010-9413-4939	Ko
과제명	마우스 모델에서 세균물질에 대한 숙주면역반응 연구					
총실험기간	6개월					
실험기간	2013. 10. 1. - 2014. 3. 31.					
<input type="checkbox"/> 대학과제 <input type="checkbox"/> 외부기관(공공/사적기관) <input checked="" type="checkbox"/> 개인학술과제 <input type="checkbox"/> 기타 ()						
지원기관	한국연구재단			실험구분	신규 (<input checked="" type="radio"/>) 계속 () 년도변경 ()	
실험동물	동물종	mouse	미생물학적 등급	<input type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> Conv. <input type="checkbox"/> 기타 ()		
	계통	C57BL/6	사육 희망 장소	<u>의과 대학</u>		
	유전자형		반입 예정 일	<input type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> Semi-SPF <input type="checkbox"/> 기타 ()		
	성별	<input checked="" type="checkbox"/> ♂ <input checked="" type="checkbox"/> ♀	구입업체명	2013 년 10 월 일		
	체중/주령	8 - 12 주령		(주) 중앙동물실험 (대학이나 연구소에서 분양을 받아 실험에 사용할 경우에는 미생물오염 방지를 위해 사전협의를 부탁드립니다)		
	수량	30 마리	반입관련 요청사항			
사육관리사항	동물실험 형태	<input checked="" type="checkbox"/> 구입 + <i>in vitro</i> 실험(시료채취 포함) <input type="checkbox"/> 구입 + <i>in vivo</i> 실험 <input type="checkbox"/> 번식 + <i>in vitro</i> 실험(시료채취 포함) <input type="checkbox"/> 번식 + <i>in vivo</i> 실험				
	특수사료	제조원 () 사료종류 ()				
동물 실험 형태 (해당사항에 모두 체크)		<input checked="" type="checkbox"/> 약리/독성시험 <input type="checkbox"/> 외과적 처치 <input type="checkbox"/> 유전/육종 <input type="checkbox"/> 방사선 조사 <input type="checkbox"/> 감염				
		<input checked="" type="checkbox"/> 단순 재료채취 <input type="checkbox"/> 행동관찰 <input type="checkbox"/> 위험물질 사용 <input type="checkbox"/> 발암물질 사용				
		<input type="checkbox"/> 기타 ()				
무마취하에서 동물이 느끼는 통증 및 스트레스의 정도						
<input type="checkbox"/> 원생동물, 무척추동물을 사용하는 실험 (고통등급 A) <input type="checkbox"/> 척추동물을 사용하지만 거의 고통을 주지 않는 실험 (고통등급 B) <input checked="" type="checkbox"/> 척추동물에게 약간의 스트레스 및 단기간의 적은 통증을 주는 실험 (고통등급 C) <input type="checkbox"/> 척추동물에게 피할 수 없는 상당한 고통을 주지만 고통 경감의 수단을 강구하여 실험동물의 고통을 줄여주는 실험 (고통등급 D) <input type="checkbox"/> 척추동물에게 무마취하에서 허용한계에 가깝거나 그 이상의 통증을 주는 실험 (고통등급 E)						
제출일 : 2013년 9월 일		접수		(인)	담당 확인	(인)

1. 연구제목 (국문 또는 영문)

마우스 모델에서 세균물질에 대한 숙주면역반응 연구
(Host immune responses to bacteria in mouse models)

2. 연구목적 (비전문가도 이해할 수 있도록 평이하게 기술)

- 본 연구의 목적은 세균에서 분리되는 대사물질을 실험동물(마우스)에서 분리해 낸 상피세포, 면역세포 및 장관에 작용시킨 후 세포반응 기전을 밝히는데 있음.
- 본 연구는 established cell line을 이용해 얻은 연구결과를 primary cell을 이용해 확인하기 위한 실험임.
- 실험동물에서 이용할 조직은 골수(bone marrow), 장(intestine), 비장(spleen)이며, 이 조직으로부터 수지상 세포(dendritic cells), 장상피세포(intestinal epithelial cell) 및 면역세포를 분리할 계획임.
- 본 연구를 통해 세균대사물질에 의한 염증조절 기전을 밝히는데 중요한 정보를 얻을 것으로 기대함.

3. 동물실험을 대체할 수 있는 방법의 유무



검토하였으나, 동물실험을 대체할 수 있는 방법이 없었다.



검토하였으나, 대체수단으로는 연구목적을 충분히 달성하기가 어려웠다.



기타 (검색자료 : Medline ☐, Current Contents ☐, Science Citation Index ☐)
(Key words :)

4. 해당 동물종을 선택한 합리적 이유

세균분비물질에 대한 동물연구는 마우스를 이용하는 것이 보편적이고, 본 연구실에서는 이전에도 동일한 동물종을 이용하여 연구를 시행하였음.

5. 사용 동물수에 대한 합리적 근거 사유 (가능하면 동물수를 산출한 통계적 근거를 제시)

- 1회 실험을 위한 세트는 ① 실험군 (필요 개체수=2), ② 대조군 (필요 개체수=2) 으로 구성함.
- 총 6회 실험 을 위하여 **6회 x 4 마리 = 24 마리** 가 필요할 것으로 예상함.
- 1회 실험에서 분리한 세포를 이용하여 *in vitro* 실험을 수행하려면 약 1개월이 소요됨.
따라서 매달 4마리의 동물이 필요하고, 총 실험기간도 6개월이 필요할 것으로 예상됨.

6. 실험방법 (프로토콜) 개요 (가능한 별도의 용지를 사용하여 정확한 내용을 기술)

1. 마우스로부터 세포분리

- 마우스를 마취시킨 후 경추탈골법(cervical dislocation)으로 안락사 시킨 뒤, 골수줄기세포(bone marrow stem cell)를 분리하여 면역세포로 분화시킴.
- 동시에 장으로부터 장상피세포, 비장으로부터 면역세포를 분리하여 실험에 이용함.

2. 세균물질 처리

- 분리한 마우스 세포에 세균물질을 처리한 후, 배양상청액을 회수하고 RNA와 세포질, 핵추출물을 분리함.
- RT-PCR, ELISA, Western blot 등을 이용하여 발현된 염증성 매개체를 측정함.
- 세포표면항체로 염색하여 FACS, Immunofluorescence 등을 시행함
- 실험에 이용할 세균물질은 *Helicobacter pylori*의 vacuolating cytotoxin, *Bacteroides fragilis*의 enterotoxin, *Clostridium difficile*의 분비물질 독소A 임.

7. 수술적 처치가 이루어지는 경우

☐ 항생제 투여 ☐ 진통제 투여 ☐ 수액 처치 ☐ 기타 ()

8. 동물의 통증 혹은 스트레스 경감을 위한 방법

- ☒ 단시간의 보정·구속·주사로 고통이 경미하기 때문에 특별한 조치를 강구할 필요가 없다.
- ☐ 마취제·진통제 등을 사용
(약물명, 투여량, 경로를 기입 :)
- ☐ 연구 목적상 약제를 투여할 수가 없거나, 고통경감을 위한 방법이 없기 때문에 별도의 처치를 할 수가 없다.
- ☐ 연구 목적상 인도적 기준에 의한 안락사 기준을 채택하지 않고 동물의 사망을 endpoint로 하여 실험을 실시한다.
- ☐ 기타 : (구체적인 내용을 기입)

9. 윤리적 측면에서 실험도중에 안락사를 실시할 경우의 기준 및 안락사 방법

업체에서 구입한 마우스를 대상으로 하는 in vitro 실험이므로, 실험과정에서 특별히 안락사를 실시할 일이 발생치 않으리라 예상함. 그러나 실험대상 마우스가 마우스 평균 체중보다 20%이상 감소한 경우에는 건강상태가 악화된 것으로 판단하여 인도적인 차원에서 경추탈골 및 CO₂를 이용한 안락사 방법을 취함.

☐ 약제 (사용약물 :) ☒ CO₂ 가스 ☒ 경추탈골
☐ 기타 ()

10. 시험물질의 위해성 여부 및 특이사항 (유해물질인 경우에는 시험물질의 MSDS를 첨부)

- 본 실험에 이용할 독소는 *Helicobacter pylori*의 vacuolating cytotoxin, *Bacteroides fragilis*의 enterotoxin, *Clostridium difficile*의 toxin으로, 이들은 모두 '유전자변형생물체 바이오안전성 관련 법령'에 규정된 심사대상 독소에 해당되지 않음.
- 본 실험계획서는 위의 세균물질들을 마우스에 직접 투여하는 것이 아니라, 분리한 세포에 첨가시키는 실험임.
- 그러나 실험자의 안전을 위해 마스크와 이중 글로브를 사용하도록 함

11. 실험책임자 및 종사자의 교육, 훈련 및 자격에 관한 사항

성명	역할	전공/학위	실험동물실 교육 여부			실험동물기술원 자격증 종류
			IACUC 윤리교육*	실험동물실 안내교육	기술교육	
김정목	연구책임자	의학/박사	■ (제2012-329호)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 1급, <input type="checkbox"/> 2급
고수혁	연구원	의생명공학/석사	■ (제2012-005호)	■	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 1급, <input type="checkbox"/> 2급
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 1급, <input type="checkbox"/> 2급
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 1급, <input type="checkbox"/> 2급
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 1급, <input type="checkbox"/> 2급

IACUC 및 실험동물실 안내교육은 필수과정입니다.
IACUC 윤리교육을 이수한 분은 이수증 번호를 반드시 기재하여 주시기 바랍니다.

1. 본 연구는 동물복지 차원에서 윤리적 사항을 준수하고, 3R원칙에 따라 합리적 방법으로 디자인되었으며,
2. 실험자들이 한양대학교 동물실험지침을 준수하도록 책임·지도하겠습니다,
3. 실험동물실 운영자 및 동물실험윤리위원회의 결정에 적극 협조하고 따를 것을 서약합니다.

2013년 9월 일

연구책임자 : 김 정 목 (서명)

J. M. J. 程

연구 및 교육, 시험을 위한 동물 사용에 대한 연구자의 서약서
이화여자대학교 동물실험윤리위원회 (EWha IACUC)

계획서 제목:

세균 대사물질에 의한 염증조절 기전 연구

본인은

1. 동물보호법 및 실험동물에관한법률 등 모든 정부의 법규와 규정을 따르며, 이화여자대학교 동물실험윤리규정을 따름에 동의합니다.
2. 동물이 승인된 실험계획안에 명시되어 있지 않는 통증이나 질병을 겪을 경우, 실험에 관계없이 긴급 수의학적 처치 및 적절한 수의학적 치료를 허용하겠습니다. 만일 이러한 수의학적 조치가 실험결과에 영향을 미칠 가능성에 대한 최신 정보를 제공할 책임이 본인에게 있음을 숙지합니다.
3. 살아있는 동물을 직접 접촉하는 모든 실험참여자자들이 인도적, 과학적으로 승인받은 동물 취급법, 조작기술, 마취제 및 진통제, 안락사 제제 투여에 관한 교육을 받았거나 예정이며, 살아있는 동물이나 그 조직의 취급에 관련된 위험성에 대해 주지하고 있음을 확인합니다.
4. 모든 실험과정 및 수술이 본인 또는 이 계획서에 기술된 책임자의 관리감독하에 이루어짐을 보증합니다.
5. 승인된 계획서의 사본을 모든 실험참여자자들이 열람할 수 있도록 보증하겠습니다.
6. 본인을 포함한 모든 실험참여자자들이 본교 실험실생물안전관리 및 직업건강프로그램의 권장안에 따를 것을 확인합니다.
7. 본 계획서에서 제시된 모든 내용이 본인이 아는 한 최대한 정확한 것이며, 본 프로젝트가 (교내, 교외)연구비 신청에 활용될 경우, 본 계획안의 기술된 동물실험방법과 연구비신청서의 내용과 동일함에 책임을 집니다.
8. 본 프로젝트의 모든 연구자들이 IACUC 및 동물실 의무 안내교육에 참여할 것임을 확인합니다.

불필요한 중복실험에 관한 고려

9. 아래의 학술 사이트를 통해 본인이 아는 한 최신의 정보와 자료를 참조하였고, 본 계획안의 실험절차는 이전에 수행되었던 실험의 불필요한 중복이나 동물의 사용이 아님을 확인합니다. (모든 참조 사이트에 표시하고 검색 시 핵심단어 기재)

☒ Pubmed/Medline ☐ Web of Science ☐ EMBASE ☐ 기타_____

(핵심단어 : Nrf2 , 수지상 세포주(DC2.4 cell line), 장상피세포주(CMT-93 cell line) 세균대사물질 (B. fragilis와 H. pylori의 enterotoxin과 outer membrane vesicle protein, vacuolating cytotoxin)

연구책임자 이름: __우 현 애__ 서명: 우현애 날짜: __2017/03/20__

연구 및 교육, 시험용 동물 사용에 관한 계획서

일반사항

IACUC 승인번호	17-012	승인날짜	2017. 4. 11.		
승인기간	2017. 4. 26 ~ 2019. 4. 25				
과제구분	<input checked="" type="checkbox"/> 신규 <input type="checkbox"/> 계속 (구계획서 승인번호 : IACUC)				
종류	<input checked="" type="checkbox"/> 연구(01) <input type="checkbox"/> 학위논문실험(02) <input type="checkbox"/> 실습/교육(03) <input type="checkbox"/> 번식(04) <input type="checkbox"/> 기타(05) : _____				
연구비지원	<input type="checkbox"/> 교내연구비 또는 실습비 <input checked="" type="checkbox"/> 교외연구비 (기관명: 한국연구재단)				
실험예정기간	실시일	2017/04/20	종료일	2019/04/19	
연구과제명 (국문/영문)	세균대사물질에 의한 염증조절 기전 연구 / Research of Mechanism of Regulating Inflammation by Bacterial Metabolite				
연구책임자					
소속	직급	성명	연락처	비상연락처	전자메일
약학과	교수	우현애	4654	010-7393-1257	hawoo@ewha.ac.kr
동물실험수행자 ¹⁾ (우선연락처는 굵은색으로 표기 ²⁾)					
소속	직급	성명	연락처	비상연락처	교육이수여부 ³⁾ / 동물실험경험 ⁴⁾
약학과	대학원생	박지영	4656	010-3800-4068	2012-052(이화여자대학교)/충분
약학과	대학원생	김남희	4656	010-9505-9904	2016-108(이화여자대학교)/부족
사용시설 (시설의 위치 및 명칭 기재)					
사육장소	이화여자대학교 실험동물 유전체 연구센터				
실험장소	이화여자대학교 실험동물 유전체 연구센터				

¹⁾ 계획서 제출자는 상단에 이름을 표기하고 비상연락처에 전자메일계정 입력

²⁾ 긴급상황에 대비하여 사육동물에 대한 조치에 대응할 수 있는 지정 책임자가 24시간 전화연락 가능해야함. 수의사(또는 관리자)는 동물이 통증이나 고통이 있으면 매번 지정책임자에게 연락함. 연락이 되지 않으면 지정책임자의 승인 없이 증상에 따라 동물이 처치를 받거나 안락사될 수 있음.

³⁾ 윤리교육(동물실험교육 및 워크샵) 이수번호 및 기관명을 기재. 교육 미이수자는 '미이수'로 기재

⁴⁾ 동물실험의 경험도를 '충분' 또는 '부족'으로 기재 (충분: 동물실험 1년 이상 경험)

1. 연구의 타당성

다음 사항에 대해 간단히 요약 기술하시오(반드시 일반인이 알아들을 수 있도록 쉽게 설명)

a) 연구나 교육 계획 및 목표

b) 사람, 동물 또는 과학적 지식의 진보의 측면에서 본 연구의 이점

- 본 연구의 목적은 세균에서 분비되는 대사물질을 실험동물(마우스)에서 분리해 낸 세포에 작용시킨 후 세포반응 기전을 밝히는데 있음.
- 이미 wild-type 마우스로부터 얻은 수지상세포와 장상피세포, 그리고 established cell line (마우스 수지상세포주인 DC2.4 cell, 마우스 장상피세포주인 CMT-93 cell, 사람 상피세포주) 실험을 통해 B. fragilis 와 H. pylori의 분비물질(enterotoxin 및 outer membrane vesicle protein)이 Nrf2 시그널에 관여한다는 결과를 확보하였음. 본 실험은 Nrf2-transgenic mouse를 이용하여 Nrf2에 의한 세포반응 효과를 확인하기 위한 목적임.
- 실험동물에서 채취할 조직은 골수 및 장조직이며, 이 조직으로부터 수지상세포(dendritic cells)와 장상피세포(intestinal epithelial cell)를 분리할 계획임.
- 본 연구를 통해 세균대사물질에 의한 염증조절 기전을 밝히는데 중요한 정보를 얻을 것으로 기대함.

2. 살아있는 척추동물에서의 시험방법 (복수선택)

<input checked="" type="checkbox"/> 혈액/조직 채취	<input type="checkbox"/> 보정기구 사용	<input type="checkbox"/> 사료/음수 제한	<input type="checkbox"/> 실험용 약제 투여
<input type="checkbox"/> 형질전환동물제작	<input type="checkbox"/> 교배	<input type="checkbox"/> 행동학 연구	<input type="checkbox"/> 만성질환 연구
<input type="checkbox"/> 위험 물질 취급	<input type="checkbox"/> 종양 성장	<input type="checkbox"/> 면역억제(화학적,방사선적,유전학적)	
<input type="checkbox"/> 소생존수술	<input type="checkbox"/> 대생존수술*	<input type="checkbox"/> 다중(multiple) 대생존수술	
<input type="checkbox"/> 기타 비수술 처치	<input type="checkbox"/> 비생존수술**	<input type="checkbox"/> 실험종점으로서의 폐사	
단크론항체 생산/채취: <input type="checkbox"/> 복막염 유발법 <input type="checkbox"/> 복막염 비유발법 <input type="checkbox"/> 다크론항체 생산/채취			
<input type="checkbox"/> 기타: ()			

* 복강을 열거나 일부 장기기능을 훼손하는 큰 수술, ** 수술후 생존시키지 않는 수술

3. 실험동물의 통증 및 스트레스의 정도

동물종	strain/stock	성별	연령/체중	구입/분양 희망처	통증 범주				전체 마리수
					B	C	D	E	
<실험군>									
mouse	C57BL/6	Male	8wk/25g	자체보유 및 번식(IACUC_15-055)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	36
mouse	C57/BL/6/Nrf2	Male	8wk/25g		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	36
합계: 마우스 총 72마리 (통증범주 C 72 마리)									

합계: 마우스 총 72마리 (통증범주 C 72 마리)

범주 "B": 일반적인 사육이나 교배만 하고 실험하지 않는 경우

범주 "C": 무독성, 비자극성 물질을 주사하거나, 정맥투여하는 등의 최소한의 일시적 통증이 유발되거나 통증, 스트레스가 없는 경우

범주 "D": 범주 C보다 큰 통증, 스트레스가 유발되나 적절한 마취제, 진정제, 진통제의 처치가 이루어지는 경우.
예) 생존수술, 비생존수술, 관류, 생검, 질환유발, 방사선조사 등

범주 "E": 범주 C보다 큰 통증, 스트레스가 유발되고, 마취나 진통의 처치가 이루어지지 않는 경우.

범주 E는 과학적 타당성을 기술해야 함.

4. 동물 사용에 관한 정당성 및 동물 수에 대한 타당성

a) 이 연구 프로젝트에서 살아있는 척추동물을 사용하는 이론적 근거 기술

- 본 연구 프로젝트에서 살아있는 척추동물을 사용해야 하는 근거:

본 연구는 in vitro 실험에서 증명된 내용을 생체에서도 동일하게 나타낼 수 있는지를 증명하기 위해 계획된 내용임. 즉, 마우스 수지상 세포주(DC2.4 cell line)와 마우스 장상피세포주(CMT-93 cell line)에 세균대사물질(B. fragilis와 H. pylori의 enterotoxin과 outer membrane vesicle protein, vacuolating cytotoxin)을 자극한 결과 Nrf2 시그널에 의해 염증관련 매개체와 수지상세포 성숙을 조절한다는 결과를 확보하였음. 이와 같이 마우스 세포주를 이용한 in vitro 실험 결과가 생체에서도 동일하게 나타낼 수 있는지 확인할 필요가 있음. 따라서 세균대사물질에 의해 wild-type mouse에서 나타나는 현상들이 Nrf2 시그널을 차단시켰을 때의 변화된 현상을 관찰할 필요가 있다는 점에서 Nrf2 Knockout mouse의 사용 필요성이 제기됨.

b) 각각의 종의 동물을 선택한 이유를 기술 (구입비용 단독으로는 선정이유가 될 수 없음)

- 기존에 얻은 in vitro 실험 결과를 확인하기 위해 *Nrf2 knockout*인 마우스를 이용할 필요가 있음. 생체 내에서 다양한 작용을 하는 활성산소의 기능을 연구하기 위해 활성산소를 생성하거나 제거하는 여러 단백질의 유전자 결핍 마우스를 활용한(여기서는 Nrf2 knockout mice를 말함) 실험이 필수적임. 이와 같은 in vivo 실험을 위해 활성산소를 조절하는 단백질들의 knockout 마우스를 사용하고자 함.

c) 사용 동물 수량에 대한 타당성 기술

- 통계처리를 위한 최소한의 개체수를 위해 실험 세트는 ① 세균대사물 처리군(필요 개체수=9), ② 대조군(필요 개체수=9) 아래의 1)수지상세포, 2)장상피세포로 나누어 구체적 기술하였음.으로 구성함.

1) 수지상세포

- in vitro 실험 (RT-PCR, ELISA, EMSA, flow cytometry)을 위해 확보해야 하는 최소한의 세포수는 1×10^8 개로 예상하고 있음.
- 마우스 한 개체에서 분리할 수 있는 골수세포수(bone marrow cell)는 약 5×10^6 개임. 골수세포로부터 수지상세포로 분화/증식시키면 약 5×10^7 개의 수지상세포를 얻을 수 있음. 따라서 1.5×10^8 개 이상의 세포를 확보하여 세균대사물을 농도별[0/100/500ng/ml], 시간별[0/3/6/12/24/48 hr]로 처리를 위해서는 최소 3 개체가 필요함.
- 3 개체 x 3번 반복실험 = 9 개체(WT/KO 각각)로 선정하였음. 통계적 유의성을 확인하기 위해서 최소 3번이상의 반복실험이 필요함.

2) 장상피세포

- in vitro 실험 (RT-PCR, ELISA, EMSA, flow cytometry)을 위해 확보해야 하는 최소한의 세포수는 1×10^8 개로 예상하고 있음.
- 마우스 한 개체에서 분리할 수 있는 골수세포수(bone marrow cell)는 약 5×10^6 개임. 골수세포로부터 수지상세포로 분화/증식시키면 약 5×10^7 개의 수지상세포를 얻을 수 있음. 따라서 1.5×10^8 개 이상의 세포를 확보하여 세균대사물을 농도별[0/100/500ng/ml], 시간별[0/3/6/12/24/48 hr]로 처리를 위해서는 최소 3 개체가 필요함.
- 3 개체 x 3번 반복실험 = 9 개체(WT/KO 각각)로 선정하였음. 통계적 유의성을 확인하기 위해서 최소 3번이상의 반복실험이 필요함.

5. 모든 비 외과적(수술) 처치에 대한 설명 (해당없음 □)

살아있는 척추동물에서 비외과적 처치를 수행하고자 하는 경우 아래 해당 항목에 모두 체크하고 상세 정보 제공.

구분	내용
<input checked="" type="checkbox"/> 혈액 및 조직 채취	채취 방법, 부위, 채취 빈도와 양, 보정기구 또는 마취제 사용 기재 CO2 가스를 사용하여 안락사 후, 골수와 장 조직을 채취함
<input type="checkbox"/> 행동 관찰	동물에게 수반되는 감각 또는 식이 제한 및 기타 실험적 자극 설명
<input type="checkbox"/> 위해물질을 포함한 생물학적제제 또는 실험물질의 투여(예: 종양세포주, 약물, 바이러스)*	
<input type="checkbox"/> 보정용(restraining) 기구의 사용	
<input type="checkbox"/> 영상획득 (CT, Sono, MR, PET 등)	처치 기간 및 동물의 보정 방법 설명. 특히 마비제를 사용할 경우 약물 투여 후 및/또는 처치시의 동물 모니터링 방법 상세 설명
<input checked="" type="checkbox"/> 번식	자체 보유 마우스 사용 계획, 번식은 IACUC_15-055에 따라 할 예정임 Nrf2 WT male/female 끼리, Nrf2 KO male/female 끼리 1:1로 mating하며, mating을 위한 부모 쥐들은 출생 후 2주 후에 꼬리 조직을 일부 잘라 genotyping을 통해 유전형을 확인한 것을 사용할 예정임. 출생 후 3주 후 이유하고, 모체의 유전형이 이미 검증되었으므로 산자에 대한 genotyping은 생략함. 추후 조직에서 세포를 얻은 후, q-PCR과 western blotting 실험을 통해 유전형을 다시 규명할 예정임. 잉여 산자는 이유시 따로 분리하여 CO ₂ 가스를 이용하여 안락사함.
<input type="checkbox"/> 기타	수행하고자 하는 기타 다른 실험 절차에 대하여 설명

* 위해물질 사용의 경우, “[별첨1] 살아있는 동물에서의 위해물질 사용 계획서” 작성

6. 치료 약물 (해당없음 ■)

동물을 다루는데 마취제, 진통제, 안정제 또는 다른 치료약물을 사용하고자 하는 경우 정보 제공

약제명	용량(mg/Kg 체중)	투여경로	빈도 및 기간	목적

7. 외과적(수술) 처치 (해당없음 ■)

모든 외과적 처치에 대하여 구체적인 설명 기재. 한 동물종 이상에서 한 가지 이상의 외과적 처치를 수행할 경우 각 동물종별 또는 외과적 처치별로 분리하여 기재

8. 인도적 종료시점 (해당 없음 ☐)

실험과정에 수반되는 동물에서 예상되는 잠재적인 불편, 동통, 통증 및 손상을 포함한 어떠한 임상 증상 또는 병변(예: 식욕부진, 파행, 무기력, 창상, 약물독성, 종양, 정상 호흡의 변화, 체중변화 등)에 대하여 설명 또는 평가할 수 있는 항목(예: 체중/운동성 감소, 몸다듬기 불이행, 비정상적 자세, 핏거나 물어뜯음으로 인한 상처 등)을 제시하고 하고 관리 방안 및 언제 실험을 중단하거나 동물을 안락사 할 것인지 기술

9. 사육실 외의 구역으로의 동물 이동 (해당 있음 ☐)

IACUC는 살아있는 인정된 실험구역 이외에서의 동물실험은 원칙적으로 불허하며, 어떠한 경우에도 사육 외 구역에서의 8시간 이상 사육을 금함(사유서 별도 제출)

10. 실험의 종료 또는 안락사에서의 동물의 처리

■ CO2 가스 안락사 (IACUC 권장)

☐ 화학적 방법 (약제명: , 용량: , 투여경로:)

☐ 물리적 방법

(마취제가 없어서 경추탈골 또는 단두를 실시하는 것은 허용되지 않음. 그럼에도 불구하고 실험의 과학적 목적에 따라 필요한 경우 그 사유를 명백하게 제시)

☐ 기타