

RS-2021-
82107003
3SB010

피
내
접
종
용

PCV2
/
Mycoplasm
a

백
신
개
발

및
침
주
사
기

상
용
화

2024

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)

기술사업화지원사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004740-01

피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 개발 및 무침주사기 상용화

2024.07.29.

주관연구기관 / 미라클스코프(주)
공동연구기관 / (주)고려비엔피
공동연구기관 / 한국농수산대학교

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

< 요약 문 >

사업명	기술사업화지원사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)	민간중심R&D사업화지원			연구개발과제번호		821070031SB010	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0710	50%	2순위 LB0701	30%	3순위 LB0799	20%
	농림식품 과학기술분류	1순위 RB0201	50%	2순위 RB0102	30%	3순위 RC0202	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		-					
연구개발과제명		피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 개발 및 무침주사기 상용화					
전체 연구기간		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)					
해당 단계		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)					
총 연구개발비		총 1,078,000천원 (정부지원연구개발비:803,000천원, 기관부담연구개발비:275,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
해당 단계		총 686,000천원 (정부지원연구개발비:511,000천원, 기관부담연구개발비:175,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[✓] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점 기준(5) 종료시점 목표(9)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<p>□ 양돈백신은 국내 동물용 백신시장에서 큰 규모를 차지하고 있는데, 이 시장의 대부분을 다국적 수입제품이 장악하고 있는 실정임. 그 중에서도 돼지호흡기질병복합체 관련 백신은 국내 양돈농가에게는 거의 필수적일 뿐만 아니라, 양돈업의 경제성 지대한 영향을 미치는 중요한 백신임.</p> <p>□ 본 사업에서는 다음에 기술된 1) 무침주사기 상용화, 2) 피내접종용 PCV2와 Mycoplasma 혼합백신 개발 및 산업화를 추진하여, 국내·외 양돈백신 시장에 공격적으로 진출할 계획임.</p> <p>1. 무침주사기 상용화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기 개발된 무침주사기 제품은 다수의 목적동물을 대상으로 임상시험을 진행한 후 무침주사기 사업화에 필요한 자료를 확보함. 또한 본 사업에서는 사용자(농장,수의사)의 요구사항을 반영하여 기 제품의 사양과 성능을 개선할 예정임. 협동연구기관으로부터 무침주사기에 적용할 수 있는 백신을 제공받고, 동물실험을 통하여 신규 무침주사기의 유효성을 입증한 후, 무침주사기 국산화 및 산업화를 목표로 함. <p>2. 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신</p> <ul style="list-style-type: none"> - 국내 양돈장에서 경제적으로 심각한 피해를 유발하는 돼지호흡기질병복합체(PRDC)의 주요 원인체인 PCV2와 Mycoplasma 감염을 예방할 수 있는 피내접종용 형태의 PCV2/Mycoplasma 복합백신 개발 및 산업화 추진 					
	전체 내용	<p>□ 무침주사기 상용화</p> <p>① 개발 무침주사기 현장 적용 평가 및 사업화 기반 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구진은 농림축산식품부 연구개발지원사업(과제명: 구제역 백신 접종용 간편 무침주사기 개발 연구, 2018.04~2019.02)을 통하여 무침주사기 개발에 성공하였음. - 실험동물 구제역 백신 접종 평가에서 개발제품을 사용할 경우, 접종 항원이 보다 넓은 피내조직에 침투능, 접종부위의 이상육 미발생, 안정적인 면역유도능 등을 확인하였음. - 다만, 기 연구에서는 제한된 연구기간, 불충분한 연구비 규모, ASF 발생 등으로 대규모 목적동물을 대상을 진행되는 임 					

상시험 미진 등으로 개발된 무침주사기 사업화에 어려움이 있는 실정임.

- 본 사업에서는 참여연구기관에서 개발하는 피내접종용 양돈 백신에 적용하여 무침주사기 농장 임상시험을 통하여 사업화에 필요한 자료를 확보함.

② 개발 무침주사기의 성능개선

- 기 개발된 무침주사기로 구제역백신을 피내 접종할 경우, 피내조직에만 육아종이 관찰되었지만, 근육접종할 경우에는 근육조직에 육아종이 발생됨을 확인하였음. 이는 근육접종으로 가식부위에 발생하는 육아종 부위 폐기 문제를 예방할 있음을 확인하였음.
- 다만, 사용자(농장, 수의사)의 요구사항을 수용하여, 기 개발 제품의 성능을 다음과 같이 개선할 필요성이 있음.
 - ① 외관 사양: 무게, 그립감, 형상
 - ② 성능 사양: 완충 후 분사 횟수, 접종 소요시간, 품질보증
 - ③ 편의 사양: 보관법, 세척법, 약세서리
 - ④ 듀얼 헤드 개발: 동시에 2종 이상 백신 접종 가능. 분사 노즐의 세밀화를 통한 접종액의 흡수율 개선

③ 무침주사기 및 사용자 ICT 기술 적용

- 사용자 ID, 무침주사기 관리 ID, 사용횟수, 고장진단 관리 등에 필요한 서버구축 기반 기술 확보
- 백신접종 일정/과정을 모니터링할 수 있는 DB 구축 및 서버 프로그램 개발
- RFID, NFC, 블루투스를 통한 스마트폰 등에 백신접종 내역, 접종시간, 접종자 정보 등을 관리할 수 있는 애플리케이션 개발.

④ 개선 무침주사기 시제품 제작 및 효능평가

- 성능이 개선된 평가용 무침주사기 시제품 제작하여, 협동연구기관과 공유하면서 신규 제품의 성능을 평가함.
- 신규 제품의 기계적인 측면의 평가는 공인시험기관에 의뢰하여 실시하고, 시험성적서를 확보함.
- 신규 개발 제품 프로토타입을 제작한 후, 사용자 및 전문가의 평가의견을 취합
- 시험동물을 대상으로 피내 접종용 백신제품(공동연구기관 제공)을 신규 개발제품에 적용하여 그 효용성을 평가
- 사용자 측면: 효능, 안전성, 내구성, 사용 편의성
- 동물시험 적용 평가: 동물에 적용 후 접종부위 부작용 발생 여부, 접종액의 피내 분산성, 가식부위 육아종 형성 여부, 그리고 면역 유도능 등.

⑤ 무침주사기의 임상시험 적용

- 시험동물을 대상으로 신규 무침주사기를 적용하여 백신 시제품을 피내접종을 실시함.
- 피내접종 후 약물의 접종 부위에서 약문 분산성, 저류성 등을 확인
- 백신 시제품을 시험동물에 피내 접종한 후, 접종동물에서 접종 항원에 대한 면역유도능, 면역지속성을 평가.

⑥ 제품허가

- 제품허가를 위하여 기술자료 작성(제품명, 기기 성상, 제조방법, 성능 및 사용목적, 사용법, 시험규격 등)
- 농림축산검역본부의 동물용의료기기 품목허가 신청 및 획득

□ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신

1) PCV2, Mycoplasma 항원 대량 생산법 확립 및 경제성 확보

- 국내에서 유행하는 병원체 유래의 방어항원을 후보를 선발

		<ul style="list-style-type: none"> - 방어항원의 선발 및 항원 생산조건 확립 - 선발된 항원(PCV2 VLP, Mycoplasma 균체 또는 재조합 단백질)을 대량 생산법 확립 - 생산항원이 동물용의약품으로 적용될 수 있을 정도의 항원생산 경제성 확보 <p>2) 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신 시제품 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> - 각 항원의 최소함량결정시험 - 각 항원의 안전성 평가 - 피내접종용 면역증강제 후보 선발 및 평가 - 선발된 피내접종용 면역증강제의 안정성, 안정성 평가 - PCV2항원과 면역증강제 시제품의 면역원성, 안전성, 면역지속성 평가 - Mycoplasma 항원과 면역증강제 시제품의 면역원성, 안전성, 면역지속성 평가 - PCV2/Mycoplasma/면역증강제 조성비 결정시험 결과를 바탕으로 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신 시제품 제작 - 국가검정기준에 의거하여 시제품의 성상 안정성 평가 <p>3) 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신 유효성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시험동물(실험동물, 목적동물)을 대상으로 시제품의 안정성 자료 확보 - 시험동물을 대상으로 제품의 안전성 자료 확보 - 전임상시험으로, 시험동물에서 시제품의 면역원성 시험, 안전성 시험, 면역지속성 평가 - 시험동물을 대상으로 방어능 평가 시험(시제품을 용법용량에 따라 접종한 후 면역을 충분히 유도한 후, 병원체 공격접종을 통하여 백신접종으로 인한 방어효과 평가) <p>4) 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신 임상시험(계획서)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전임상시험 결과를 바탕으로 임상시험계획서를 작성한 후, 농림축산검역본부에 제출 - 농림축산검역본부로부터 임상시험 승인을 받을 경우, 3개 양돈장을 대상으로 계획서에 따라 임상시험을 실시 (임상시험 승인까지 상당한 기간이 소요됨). - 임상시험 결과를 확보 <p>5) 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신 제품화(추진)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수출용등록허가 추진: 외국에 동물용의약품을 수출하기 위하여 장기간 대상국가 등록절차가 요구되기 때문에 개발제품에 대하여 수출용등록허가를 우선적으로 추진. - 임상시험결과를 바탕으로 제품허가서 제출 - 제품허가 취득 				
	1단계[]	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%; text-align: center; vertical-align: middle;">목표</td> <td style="text-align: center;">피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 및 무침주사기 개발</td> </tr> <tr> <td style="width: 10%; text-align: center; vertical-align: middle;">내용</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> ○ 사용자 요구사항 분석 및 개발사양 확정 ○ 사용자 요구사항을 반영한 제품 디자인 ○ 피내접종용 무침주사기 핵심모듈 개발 및 원천기술확보 ○ IT기술을 활용한 무침주사기 성능 개선 ○ 개발된 핵심 모듈에 대한 평가기준을 확립 및 평가 ○ 무침주사기 및 사용자 관리를 위한 ICT 기술 개발 ○ 무침주사기 제품 디자인 확정 및 모델링 ○ 평가용 무침주사기 시제품 개발 ○ 시제품 평가 ○ 재조합 PCV2 항원의 대량 생산법 확립 및 경제성 확보 ○ 재조합 PCV2 항원의 면역원성 평가 </td> </tr> </table>	목표	피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 및 무침주사기 개발	내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 사용자 요구사항 분석 및 개발사양 확정 ○ 사용자 요구사항을 반영한 제품 디자인 ○ 피내접종용 무침주사기 핵심모듈 개발 및 원천기술확보 ○ IT기술을 활용한 무침주사기 성능 개선 ○ 개발된 핵심 모듈에 대한 평가기준을 확립 및 평가 ○ 무침주사기 및 사용자 관리를 위한 ICT 기술 개발 ○ 무침주사기 제품 디자인 확정 및 모델링 ○ 평가용 무침주사기 시제품 개발 ○ 시제품 평가 ○ 재조합 PCV2 항원의 대량 생산법 확립 및 경제성 확보 ○ 재조합 PCV2 항원의 면역원성 평가
목표	피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 및 무침주사기 개발					
내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 사용자 요구사항 분석 및 개발사양 확정 ○ 사용자 요구사항을 반영한 제품 디자인 ○ 피내접종용 무침주사기 핵심모듈 개발 및 원천기술확보 ○ IT기술을 활용한 무침주사기 성능 개선 ○ 개발된 핵심 모듈에 대한 평가기준을 확립 및 평가 ○ 무침주사기 및 사용자 관리를 위한 ICT 기술 개발 ○ 무침주사기 제품 디자인 확정 및 모델링 ○ 평가용 무침주사기 시제품 개발 ○ 시제품 평가 ○ 재조합 PCV2 항원의 대량 생산법 확립 및 경제성 확보 ○ 재조합 PCV2 항원의 면역원성 평가 					

		<ul style="list-style-type: none"> ○ 피내접종용 신규 어쥘먼트의 선발 및 평가 ○ 피내접종용 PCV2 백신 시제품 제작 및 유효성 평가 ○ 개선된 피내 접종용 무침주사기의 효능, 안전성 및 농장적용 평가 ○ 피내 접종용 무침주사기의 개선 방향 제안 ○ 피내접종용 PCV2 백신의 효능 및 안전성 평가 ○ 피내접종용 PCV2 백신의 개선 방향 제안
	2단계[]	<p>목표</p> <p>피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 개발 및 무침주사기 상용화</p> <p>내용</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 피내접종용 무침주사기 상용 시제품 제작 ○ 피내접종용 무침주사기 상용 시제품 성능, 내구성 등 평가 ○ 인증용 공인시험기관에서 시험 실시 및 성적서 발급 ○ 피내접종용 무침주사기 제조업허가 및 품목허가 획득 ○ 마케팅 및 상용화 준비 ○ ○ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 시제품 제작 ○ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 시제품의 유효성 평가 ○ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 시제품에 대한 임상시험계획서 제출(농림축산검역본부) ○ (검역본부로부터 임상시험 허가를 받을 경우) 농장적용시험 진행 ○ 피내접종용 무침주사기의 효능 및 안전성 평가 ○ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 및 무침주사기 농장적용 평가 ○ PCV2 백신 효능평가를 위한 PCV2 공격접종 모델 확립

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> □ 무침 주사기 상용화 □ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신 개발
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> □ 연구개발성과 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> 1) 무침 주사기 상용화 <ul style="list-style-type: none"> - 피내접종용 동물용 백신 접종방법에 즉시 적용 - 양돈장에서 사용되는 다양한 약물 투여법으로 적용 - 차세대 피내접종용 동물백신 신규 개발의 플랫폼으로 활용 2) 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합 백신 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 현재 양돈장에서 다발하고 있는 백신 (근육)접종 부작용 문제를 해결할 수 있는 새로운 형태의 백신 보급으로 양돈농가의 불만 해소. - 기존의 근육접종 백신과 개발 백신의 효능평가를 통하여, 개발백신의 효능이 우수할 경우 국내의 다양한 동물용 백신 개발 방향을 선도함. - 백신제품의 피내 접종과 관련된 면역반응 기전의 연구에 기여 3) 피내접종용 무침주사기 및 복합 백신 농장 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 무침주사기 활용 백신 시험 : 구제역(백신 제조회사 변경에 따른 적용시험), PCV2 백신, Mycoplasma 백신 접종 시험 - 무침주사기 성능 개선을 위한 방안 제시 □ 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> 1) 무침주사기 상용화 <ul style="list-style-type: none"> - 피내접종용 백신 국산화를 위한 인프라 구축에 기여 - 안정적인 무침주사기 활용을 위한 토대 마련 - 직접고용 효과 - 제품 매출을 통한 경제적 효과 2) 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신

	<ul style="list-style-type: none"> - 차세대 동물용백신 플랫폼 기술 확보(피내접종용 동물 백신 제형 개발) - 단백질 항원 백신 개발 기술 확보(동물의약품업체의 기술 경쟁력 제고) - 양돈농가의 소득향상 (양돈산업에 경제적으로 막대한 피해를 유발하는 돼지호흡기질병복합체 질병의 발생을 저감) - 백신접종 부작용으로 발생하는 이상육으로 인한 피해 저감 - 수입대체 효과(국내 양돈백신 시장의 대부분을 점유하고 있는 다국적 기업의 PCV2/Mycoplasma 제품을 대체) - 수출 증대(새로운 형태의 양돈백신으로 수출 촉진) - 국민보건 향상에 기여 (동물산업에 사용되는 치료용 항생제 사용의 저감으로 안전한 식육제품 생산) - 무침주사기에 적용이 가능한 다양한 동물용 백신 개발 촉진 				
국문핵심어 (5개 이내)	피내	백신	무침주사기	돼지	돼지호흡기질병 복합체
영문핵심어 (5개 이내)	Intradermal	Vaccine	Needle-free Injector	Pig	PRDC

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

최종보고서						보안등급	
						일반[○], 보안[]	
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명		기술사업화지원사업	
전문기관명 (해당 시 작성)				내역사업명 (해당 시 작성)		[민간중심R&D사업화지원]- 지원분야:축산	
공고번호		제 농축2021-41호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
				연구개발과제번호		821070031SB010	
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0710	50%	2순위 LB0701	30%	3순위 LB0799	20%
	농림식품과학기술분류	1순위 RB0201	50%	2순위 RB0102	30%	3순위 RC0202	20%
총괄연구개발명 (해당 시 기재)		국문					
		영문					
연구개발과제명		국문		피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 개발 및 무침주사기 상용화			
		영문		Development of PCV2/Mycoplasma vaccine and commercialization of needle-free injector for intradermal vaccination			
주관연구개발기관		기관명		사업자등록번호		144-81-10393	
		주소		법인등록번호		131111-0335058	
연구책임자		성명		이계한		직위	
		연락처		직장전화		휴대전화	
				전자우편		국가연구자번호	
						1111 3097	
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)			
		단계		1단계[]		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)	
				2단계[]		2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(1년 0개월)	
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원		기관부담		그 외 기관 등의 지원금	
		연구개발비		연구개발비		지방자치단체 기타()	
		현금		현금		현금	
		현물		현물		현물	
		합계		합계		합계	
		현금		현금		현금	
		현물		현물		현물	
		합계		합계		합계	
		연구개발비 외 지원금					
총계		803,000	27,500	247,500		830,500	247,500
1단계		219,000	7,500	67,500		226,500	67,500
2단계		292,000	5,000	95,000		297,000	95,000
1년차		292,000	10,000	90,000		302,000	90,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위	
		휴대전화		전자우편		비고	
		역할		기관유형			
공동연구개발기관		(주)고려비엔피		이낙형		전무	
		한국농수산대 학교		박용수		부교수	
위탁연구개발기관							
연구개발기관 외 기관							
연구개발과제 실무담당자		성명		이돈우		직위	
		연락처		직장전화		휴대전화	
				전자우편		국가연구자번호	
						11721965	

이 단계보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 연구개발과제 중단, 협약 해약, 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024년 07월 29일

주 관 연구 책임 자 : 이 계 한 (인)
주관연구개발기관의 장: 미라클스코프(주) 이계한 (직인)
공동연구개발기관의 장: (주) 고려비엔피 민정훈 (직인)
공동연구개발기관의 장: 한국농수산대학교산학협력단 신용광 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

1. 연구개발과제의 개요

- 매년 양돈분야의 경구투여용 의약품 사용(예방접종) 규모는 2,220억원(2014년 기준) 고전적인 유침주사기 방식으로 백신 및 의약품을 주입하고 있는 실정이며, 원가 절감을 위해 보다 효율적이고 편리하게 투여할 수 있는 방법이 지속적으로 요구되고 있는 실정임.
- PRDC(Porcine Respiratory Disease Complex) 즉 돼지호흡기질병 복합체(호흡기복합감염증)는 단순하게 정의하면 한 가지 원인체가 아닌 세균, 바이러스 등 2종, 3종 또는 그 이상의 원인체가 복합 감염되어 발생하는 호흡기 질병이다. 국내에서도 1990년대 까지는 주로 한 가지 원인체에 의한 호흡기 질병이 대부분이었으나 2000년대에는 복합감염에 의한 증상을 보이는 경우가 절반을 넘어서는 등 호흡기복합감염증의 발생이 증가하는 추세이다. 그 중 PCV2와 MH의 복합감염이 가장 많이 관찰됨.
- 양돈분야에서는 구제역 백신 접종 등 백신의 근육 접종으로 인하여 출하되는 돼지의 47.4%에서 이상육이 발생하여 연간 1,324억원의 양돈농가 손실이 발생하고 있음 (대한한돈협회, 2013).

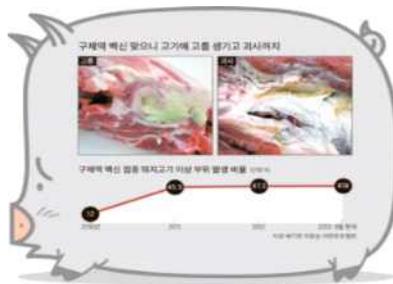


그림 1. 돼지 이상육 발생 비율

- 이상육 발생의 원인으로 구제역 백신 제조에 사용되는 오일 성분의 보좌제(adjuvant)와 주사침이 원인으로 제시되고 있음.
- 상기 원인으로 농림축산식품부와 대한한돈협회 등에서는 무침주사기 개발을 위하여 수년간 연구를 지속하였고, 그 결과 서울대학교(펜형 무침주사기), 국립수의과학검역원과 한국기계연구원 등에서 무침주사기를 연구하였으나, 상용화에는 실패함.
- 하지만, 본 연구진은 농림축산식품부 연구개발과제 지원으로 “구제역 백신 접종용 간편 무침주사기 개발 연구(’18.4-’19.12)”를 진행하여 무침주사기의 국산화에 성공하였고, 실험동물 접종에서 안정적인 항체 역가를 확인하여 상용화에 도전하고 있음.
- 본 기술 개발은 유침주사기 보다 백신 성분을 매우 미세한 입자의 형태로 피부와 조직에 넓게 침투하여 보다 많은 수의 백혈구와의 접촉이 가능하여 백신의 흡수율을 매우 높일 수 있고, 또한 침이 없으므로 고통이 적어 동물복지 측면과 고름과 괴사로 인한 이상육 발생을 예방할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 본 기기는 주사 부위의 피부조직의 손상을 최소화 하며, 주사바늘 교체 없이 연속적으로 사용할 수 있어 효율이 매우 높으며, 나아가 일회용 사용을 줄이고 환경오염을 줄이는데 일익을 담당할 것으로 예상됨.
- 선행 연구에서 무침주사기를 이용한 백신 및 치료약물 접종은 유침주사기에 비하여 효능이 좋은 것으로 판명 되었고, 미국 농무성의 발표에 따르면 무침주사기를 이용하는 경우 백신의 접종량을 줄이더라도 같은 효과를 얻을 수 있음을 입증하였으며, 이는 농장주들의 경영개선에 매우 큰 도움이 될 것으로 예상됨.
- 하지만, 선행 연구에서 “구제역 무침주사기”를 개발하고 실험동물에 적용은 완료하였으나, 제한된 연구기간과 연구비 규모 및 갑작스런 아프리카돼지열병(ASF)의 발생으로 인하여 상용화를 위한 대규모 농장 실험이 미진한 상태이며 무엇보다도 피내접종용 국산 백신의 부재로 인해 상용화에 어려움을 겪고 있음.
- 따라서 본 연구에서는 국내 양돈 산업에 큰 피해를 일으키고 있는 PCV2와 마이코플라즈마 감염을 예방할 수 있는 피내접종용 백신과 거기에 적합한 고성능 무침주사기를 개발하고 대규모 농장평가를 통해 성능을 고도화하여 백신과 무침주사기에 대한 인허가를 획득함으로써 사업화 기반을 확립하고자 함.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

[주관연구기관: 미라클스코프(주)]

□ 1차년도 연구개발 과제 수행 과정 및 수행내용 : 주관기관 미라클스코프(주)

1. 사용자 요구사항 분석 및 개발사양 확정

○ 사용자(농장, 수의사 등)의 요구사항을 파악하여 개발제품의 사양을 확정함.

표 1. 확정된 개발 사양

항 목	사 양
토출량	0.5mL
토출량 오차	±5% 이내
완충 시 분사 횟수	2,000회 이상
접종 간 소요시간	2초 이내
바이알 용량	20, 50, 100cc 모두 가능
무게	1.7kg 이하
악세서리	작업자 피로도 완화용 어깨끈
품질보증조건	1년 무상 A/S

2. 사용자 요구사항을 반영한 제품 디자인

○ 유사 제품 디자인을 참고로 사용자의 요구사항을 반영한 제품 디자인 시안을 작성함.

○ 차기년도에 제품 디자인을 확정하고, 이를 바탕으로 기구 설계 및 시제품 제작을 진행할 예정임.



그림 2. 제품 디자인 시안

3. 피내접종용 무침주사기 핵심모듈 개발 및 원천기술확보

○ 토출압력 및 토출량 시뮬레이션

- 압축실린더 내의 유체(백신)흐름에 대한 시뮬레이션을 통해 실린더 내부의 직경/길이(6.2mm/7.5mm) 및 노즐 직경(0.3mm)을 확정함.

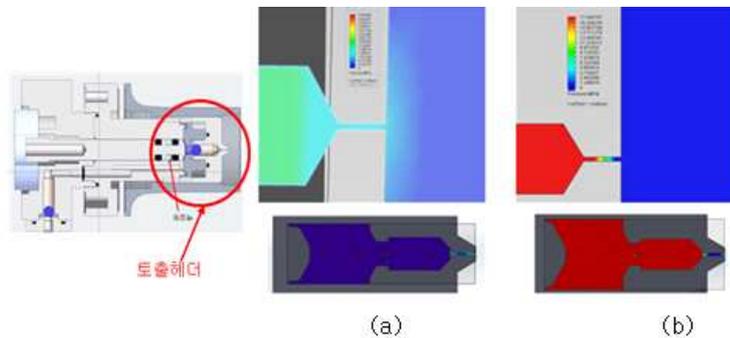


그림 12. 시뮬레이션 결과; (a)실린더 내부 직경/길이=6.2mm/7.5mm, 노즐 직경=0.3mm (b)실린더 내부 직경/길이=8.8mm/7.0mm, 노즐 직경=0.3mm

○ 압축 실린더 모듈화

- 내구성, 경량화, 생산성을 고려한 구조 설계 및 모듈 제작을 수행함.
- BLDC 구동모터, 캠(CAM), 캠 팔로워(CAM Follower), CAM하우징 파손방지 PIN, 스프링, Shaft Guide Block, 회전방지 베어링 등으로 구성됨.

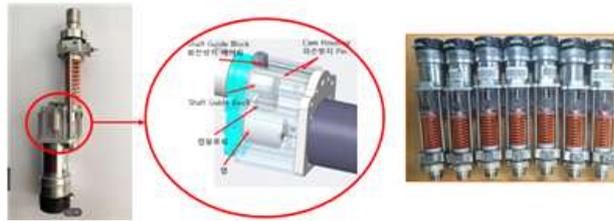


그림 13. 압축 실린더 모듈

○ 듀얼 노즐 무침주사기 헤드(Head) 개발

- 동시 2종의 백신 접종을 가능하게 하고, 동일 백신 접종 시 백신 흡수율을 높일 수 있는 듀얼 노즐 헤드에 대한 설계를 완료함.

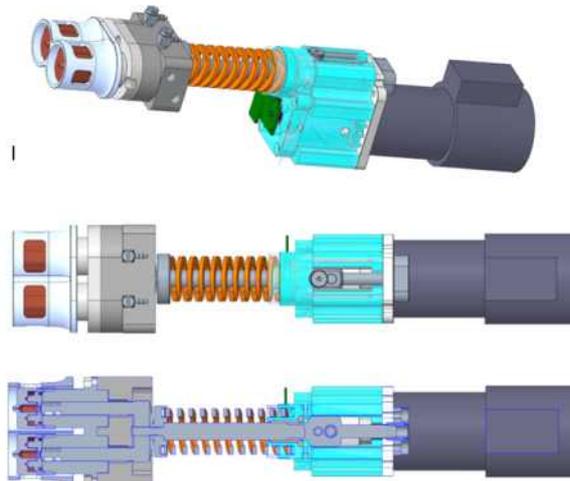


그림 14. 듀얼 노즐 무침주사기 헤드 설계 도면

4. IT기술을 활용한 무침주사기 성능 개선

○ 약물 센싱 기술

- 무침주사기는 약물투입구와 약물전달부인 노즐에 약물이 없는 상태에서 토출하면 백신 역가(항체가)가 형성되지 않고 기기에는 매우 큰 압력이 전달되어 기기 고장의 원인이 된다.
- 이를 방지하여 하기 위해, 타사는 광 센서로 불투명한 약액의 유무를 감지하는 반면, 당사는 **임피던스의 측정값을 통해 약액의 유무를 감지함**.
- 본 과제에서 제안 약물 센싱 회로는 전원부, 측정전압생성부, 임피던스(저항값) 측정부 등 3개부로 구성되며, 임피던스(저항값) 측정부는 12-bit의 고성능 ADC(Analog-to-Digital) IC를 사용함.

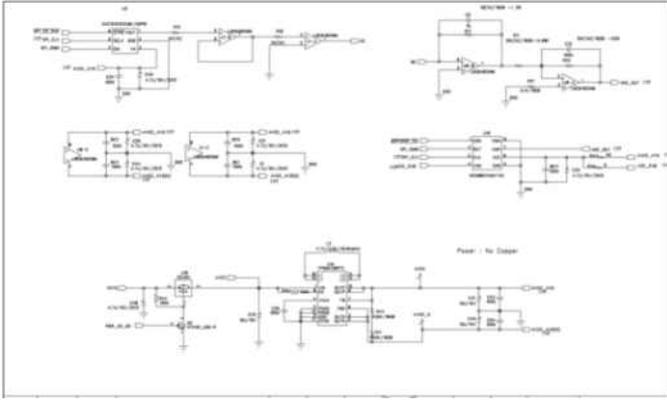


그림 15. 약물 센싱부 회로도

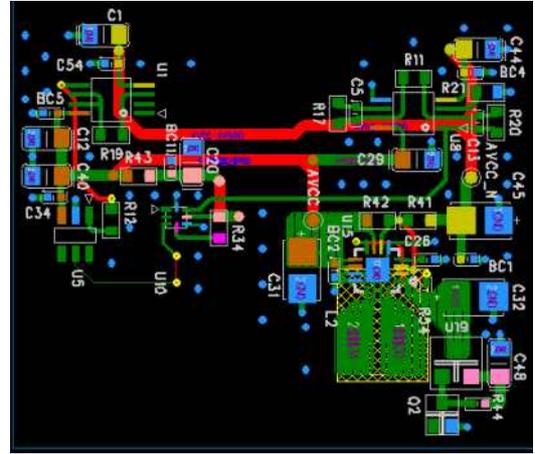
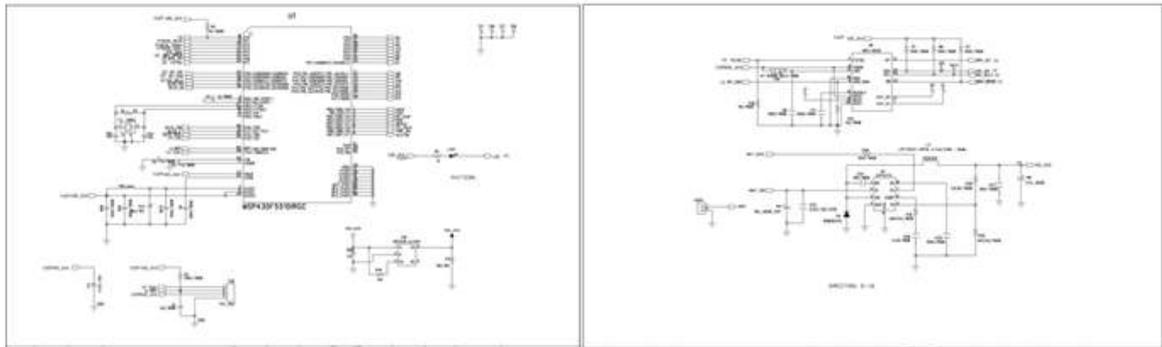


그림 16. 약물 센싱부 PCB 아트웍

○ 모션 제어 기술 : 오동작 방지

- 축산 농가에서 사용 시, 무침주사기의 모션에 따라 약물전달이 원활하지 않을 수 있으며, 특히 접종 시 무침주사기가 기울질 경우 약물이 약실이 전달되지 않아 공타가 발생할 수 있음.
- 본 과제에서는 이러한 문제를 해결하기 위해, MEMS gyroscope인 TDK사의 MPU-9250 IC를 사용하여 무침주사기의 자세를 센싱하였음.
- 본 과제에서 사용된 MPU-9250은 X-축, Y-축, Z-축 등 3축의 각 속도 값을 디지털로 출력하고, MCU는 이 값들을 입력받아 알고리즘을 사용하여 자세를 판단하게 되고 판단된 무침주사기의 자세가 비정상일 때 약물 토출을 막아주어 공타를 방지함.



(a)

(b)

그림 17. 모션 센싱부 회로도; (a)MCU 회로도, (b)모션 측정부 회로도

○ 백신 온도 제어 기술 : 저온에서 접종특성개선

- 동절기(저온)에는 백신의 특성이 변화하여 약액 전달이 잘 안되어, 축산농가에서는 약액을 실내에서 해동 후 백신 접종을 하고 있음.
- 이러한 문제를 해결하기 위해, 본 과제에서는 온도 센서부와 히터부로 구성하여 백신 온도를 제어함.
- 온도 센서는 PT-100이면, 측정 IC는 PT-100온도 센서 전용 IC인 "MAX-31865"를 사용함.

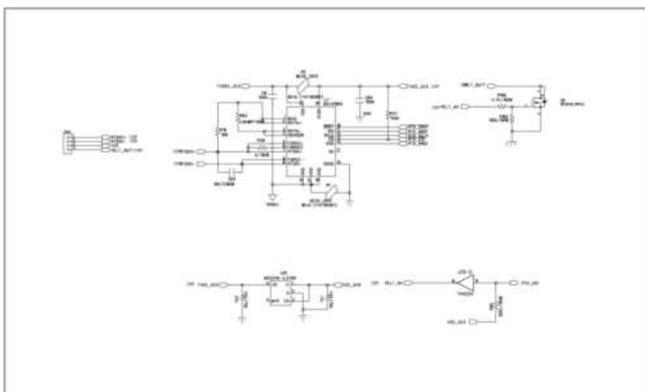


그림 18. 백신 온도 제어부 회로도

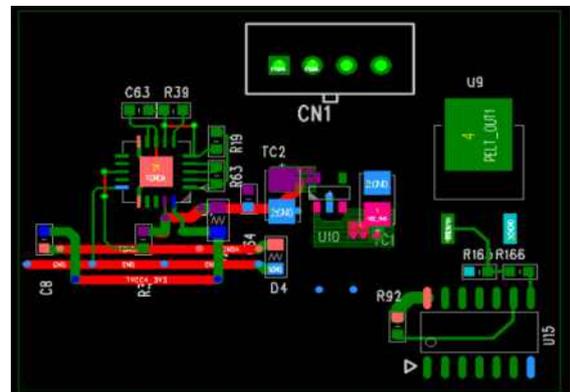


그림 19. 백신 온도 제어부 PCB 아트웍

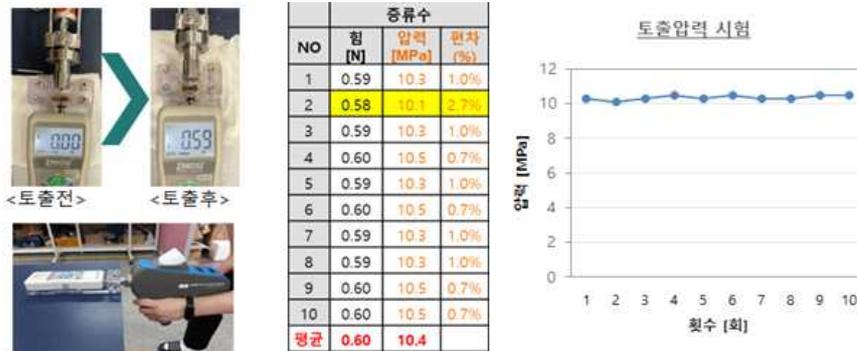
5. 개발된 핵심 모듈에 대한 평가기준 확립 및 평가

○ 토출압력 및 토출량 평가방법 및 평가기준을 확립함.

항 목	평가방법	평가기준
토출압력	<ul style="list-style-type: none"> • Push-Pull Force Gauge로 토출 힘을 측정 • 환산식을 이용 압력 계산 #. 압력[MPa]=힘[N]/(π*(노즐직경/2)²) • 상기 과정을 5회 이상 실시하여 계산 값 확인 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 토출압력 > 8 MPa ▪ 토출압력 편차 ≤ ±5%
토출량	<ul style="list-style-type: none"> • 정밀 저울에 플라스크를 올려 영점 초기화 • 플라스크 안으로 증류수를 5회 발사한 뒤 저울에 올려 무게 측정(증류수 밀도≈1)하여 1회 토출량 계산 • 상기 과정을 5회 이상 실시하여 측정치 확인 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 토출량 = 0.50mL ▪ 토출량 편차 ≤ ±5%

○ 토출압력 및 토출량 평가 결과

- 토출압력: 10회 시행 평가 결과, 평균 10.4MPa, 최대 편차 2.7%로 확인됨.



- 토출량: 10회 시행 평가 결과, 평균 0.50mL, 최대 편차 0.8%로 확인됨.



6. 약물 전달 시 페인팅 기능 추가

○ 접종 실시 여부 확인을 위해 접종 실시 후 표식을 할 수 있는 페인팅 기능을 추가함.

○ 기기 본체에 탈부착이 가능한 페인팅 모듈에 대한 설계를 완료함.



그림 22. 페인팅 모듈의 장착 모습

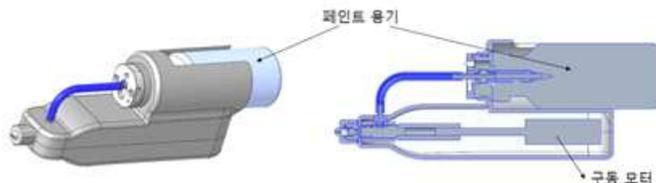


그림 23. 페인팅 모듈 설계 도면

□ 2차년도 연구개발 과제 수행 : 주관기관 미라클스코프(주)

기관명	2차 연도 개발 목표 (2022.01.01 ~ 2022.12.31)
주관연구기관: 미라클스코프(주)	<ul style="list-style-type: none"> • 무침주사기 및 사용자 관리를 위한 ICT 기술 개발 • 무침주사기 제품 디자인 확정 및 모델링 • 평가용 무침주사기 시제품 개발 • 시제품 평가

1. 무침주사기 및 사용자 관리를 위한 ICT 기술 개발

- 무침주사기 및 사용자 관리를 위한 ICT구성요소는 서버, 백엔드 서버프로그램 및 프론트엔드 웹/앱 프로그램으로 구성된다.
- 본 과제의 2차년도에 자체 서버를 구축하고, 아래 그림과 같이 서버프로그램을 설계하고 구현하였으며, 프론트엔드 웹/앱 프로그램을 개발완료하였으며, 3차년도에 이들을 농장에 적용할 예정이다.

① 서버 시스템 구조

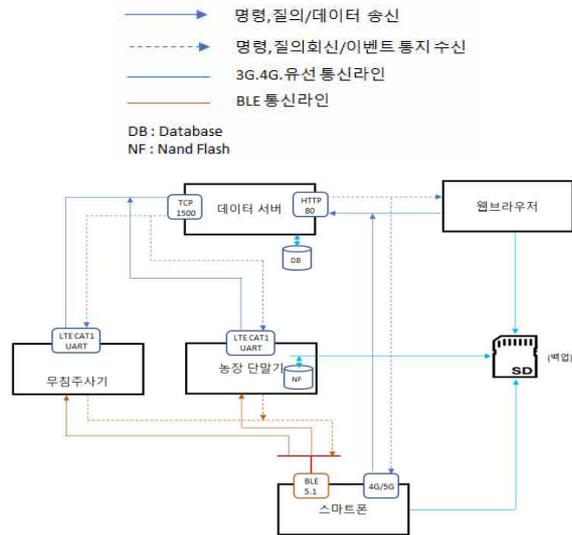


그림 24. 서버 시스템 구조

② 서버 문서 구조

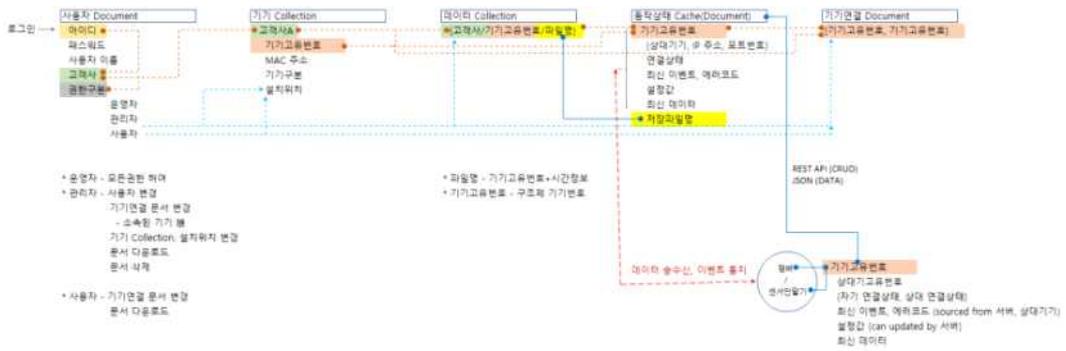


그림 25. 서버 문서 구조

③ 서버 통신 규격

2. 무침주사기 제품 디자인 확정 및 모델링

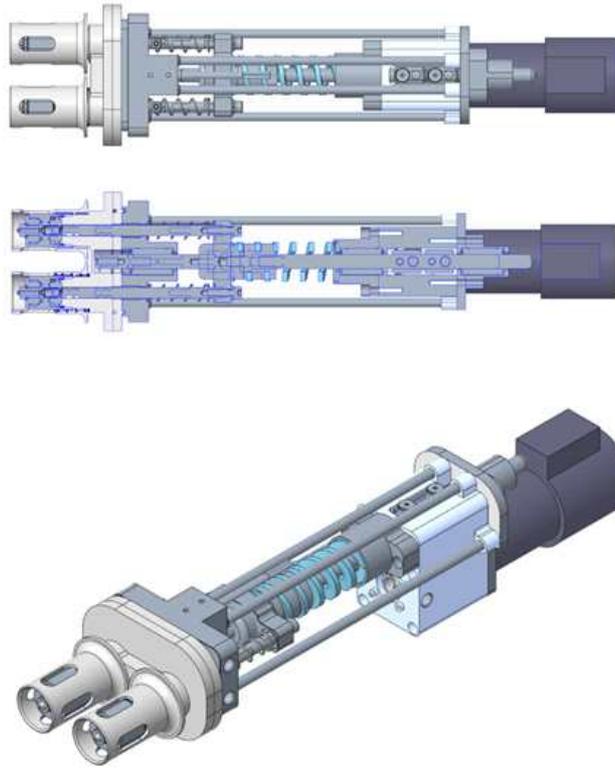


그림 28. 3차년도에 개발될 듀얼 노즐형태의 구동모듈

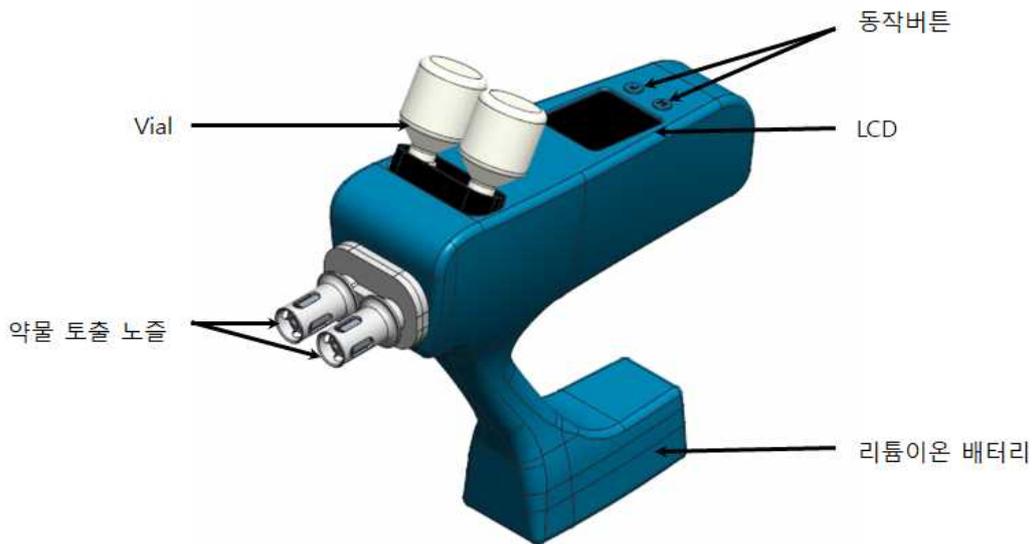


그림 29. 3차년도에 제작할 무침주사기 제품 디자인 확정 및 모델링

3. 평가용 무침주사기 시제품 개발

- 평가용 무침주사기 시제품은 농장현장에서의 요구조건 및 불편사항들을 반영하여 개발되고 제작되었음.
- 농장현장의 요구조건들은 (1) 토출압력 높일 것 (1) 사용횟수 문제 해결, (2) 노즐 막힘 최소화, (4) 사용자 UI인터페이스 간편화 등이 었음

(1) 토출압력 높일 것

- 주사 약물 역류 용량 줄이기 위해서는 토출 압력을 높여야 함

- 토출 압력을 높이기 위해 내부사양 및 구조를 변경하였음.
- ① 약물 밀어내는 힘,속도를 높이기 위하여, 코일 스프링 사양 변경:
 (변경전) SWS21-70(스프링정수:1.54 kgf/mm)
 (변경후)SWL22-60 (스프링정수:2.79 kgf/mm)
- ② 코일 스프링 길이 변경에 따른 조립부 치수 수정



그림 30. 토출압력 변경을 위한 스프링 및 내부 구조 변경

- 압력측정 결과 : 시험결과에 의하면 변경전에 비해 변경후 압력이 약 60%향상되었음

표 9 . 구조개선 전후 압력 측정 결과

No	변경 전		변경 후		비고
	N	MPa	N	MPa	
1	0.55	7.3	0.88	11.7	약 60% 향상
2	0.54	7.2	0.88	11.7	
3	0.54	7.3	0.87	11.5	
4	0.55	7.3	0.88	11.7	
5	0.55	7.2	0.87	11.5	
평균	0.546	7.24	0.876	11.61	

(2) 노즐 막힘 최소화

- 농장현장에서 사용시 노즐 막힘 문제를 해결하기 위해 노즐구조를 개선하였음

① 노즐 구조 개선

- ✓ 노즐 막혔을때 농가에서 즉시 조치 가능한 구조로 개선하였음
- ✓ 변경 사항 : 약물 분사부 탈착 가능 구조



그림 31. 노즐 구조 개선

(3) 사용횟수 문제 해결

- 농장현장에서 사용시 공타 및 이물에 의한 밸브의 잦은 파손 문제를 해결하기 위해 역류방지 밸브 구조 및 내부 파손 부품 구조 등 내부구조를 개선하였음

① 역류방지 밸브 구조 개선

- ✓ 테프론 와셔 구조를 Oring 적용 구조로 변경

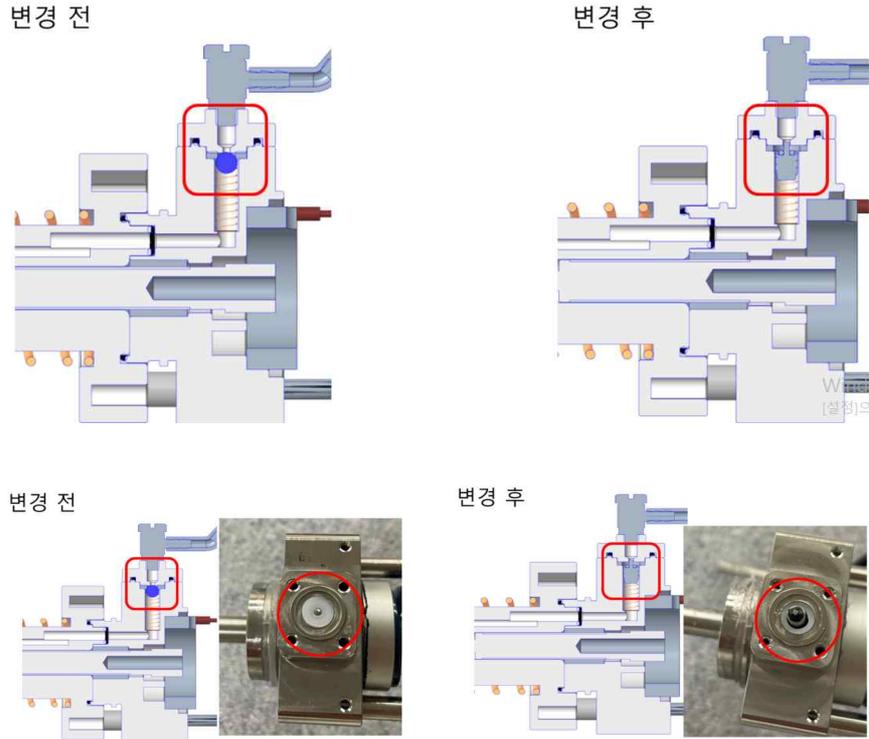


그림 32. 역류방지 밸브 구조 개선

② 내부 파손 부품 (캠하우징) 구조 개선

- ✓ 토출 압력 증가로 인한 내부 부품 내구성 저하 되어 구조 개선
- ✓ 변경 사항

Cam Housing 특정부 파손 문제 개선 : Cam Housing 재질 변경 : 수지(PC) →알루미늄
 Plunger 끝단 뭉개짐 개선 : Plunger 길이 조정(축소)



그림 33. 내부부품 캠 하우스 구조 개선

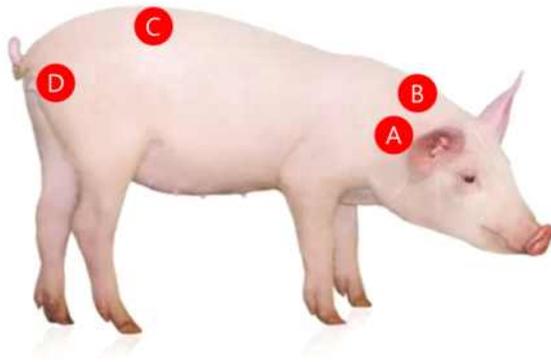
4. 시제품 평가

- 개발된 시제품은 자체 또는 실험농장시험을 실시하였음
- 실험 농장 시험은 미라젯-100 기기 사용 농장 뿐만아니라 한돈혁신센터에서 검역본부와 공동으로 실시하였음
- 시험 항목은 효능, 안전성, 내구성, 사용편리성 등 평가하였음

(1) 돼지 연령별 및 부위별 주입 시험

- 시험자 : 검역본부와 공동실시
- 농장농장 : 한돈혁신센터
- 농장방법
 - ✓ 돼지 무게(주령), 부위별 주입 시험

- ✓ 주사부위 : 목(귀뒤), 등상부, 등하부, 엉덩이
- ✓ 무게 구분 : 8주령 20~25kg, 12주령 48Kg, 14주령 55Kg



부위	명칭
A	목(귀 뒤)
B	등 상부
C	등 하부
D	엉덩이

그림 34. 주사부위 구분

- 무침주사기 연령별/부위별 시험결과는 다음과 같다.

- ① 목(귀뒤) : 무게(주령)에 상관없이 일정한 주입 깊이, 약물 역류하여 흐르는 정도 미약 함
- ② 등 상부 : (앞다리부위) : 목부위와 비슷한 수준, 무게(주령)에 상관없이 일정한 주입 깊이, 약물 역류하여 흐르는 정도 미약 함
- ③ 등 하부 : (뒷다리부위) : 주령에 상관 없이 주입이 잘 안되며, 되더라도 깊이가 낮고(표피~진피수준) 약물 역류량도 많음
- ④ 엉덩이 : 주령에 상관 없이 위치에 따라 주입 편차 심함. 주입 안되거나, 진피층, 피하층 주사 할때마다 다름

A 목(귀뒤)			
구분	주입 사진	절개 사진	결과
8주령(20~25Kg)			약물 역류 : 미량(살짝 묻어나는 정도) 약물 주입 깊이 : 피하층
12주령(45Kg)			
14주령(55Kg)			

그림 35. 목(귀뒤) 연령별/부위별 시험결과

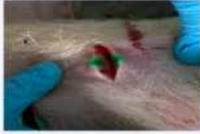
B 등 상부(앞다리 부위)			
구분	주입 사진	절개 사진	결과
8주령(20~25Kg)			약물 역류 : 미량(살짝 묻어나는 정도) 약물 주입 깊이 : 피하층
12주령(45Kg)			
14주령(55Kg)			

그림 36. 등 상부(앞다리 부위) 연령별/부위별 시험결과

C 등 하부(뒷다리부위)			
구분	주입 사진	절개 사진	결과
8주령(20~25Kg)			약물 주입 안됨
12주령(45Kg)			약물 역류 : 많음(약물 흐르는 수준) 약물 주입 깊이 : 표피~진피 수준
14 주입 안되거나, 주입이 되더라도 소량만 주입 되며, 깊이는 표피~진피층정도 수준임			

그림 37. 등 하부(뒷다리 부위) 연령별/부위별 시험결과

D 엉덩이			
구분	주입 사진	절개 사진	결과
8주령(20~25Kg)			* 판차 심함 * 약물 역류 : 미량(주변 맺혀있는 수준) 약물 주입 깊이 : 진피~피하층
12주령(45Kg)			* 판차 심함 * 약물 역류 : 미량(주변 맺혀있는 수준) 약물 주입 깊이 : 진피~피하층
14주령(55Kg)			* 판차 심함 * 약물 역류 : 많음(약물 흐르는 수준) 약물 주입 깊이 : 표피~진피 수준

그림 38. 엉덩이 연령별/부위별 시험결과

(2) 성능 시험

- 시험자 : 미라클스코프(주)
- 농장방법
 - ✓ 미라클스코프(주) 자체 성능 시험 실시

✓ 시험 항목 :

- ① 배터리 전압별 토출압력 시험
- ② 배터리 전압별 토출용량 시험
- ③ 배터리 전압별 토출시간 시험
- ④ 배터리 전압별 충전시간 시험

- 성능시험 결과

✓ 시험 조건 : 배터리 완충후 500회 사용후 항목별 측정

✓ 성능시험 결과에 의하면 배터리 전압이 변경되더라도 토출압력, 토출용량, 토출시간 및 충전시간은 동한하였음.

No	배터리 전압	토출 압력	토출 용량	토출 시간	장전 시간
1	16.63v	0.97N	0.52ml	120ms	1.26s
2	16.05v	0.98N	0.52ml	120ms	1.26s
3	15.63v	0.97N	0.518ml	120ms	1.26s
4	15.20v	0.97N	0.52ml	120ms	1.26s
5	14.80v	0.97N	0.52ml	120ms	1.26s

그림 39. 배터리 전압별 토출압력/토출용량/토출시간 결과

① 배터리 전압별 토출압력 시험에서 토출압력은 약 0.97N임.



그림 40. 배터리 전압별 토출압력 시험

② 배터리 전압별 토출용량 시험에서 토출용량은 약 0.52ml임.

배터리 전압 측정



계측기 : 디지털 멀티미터

토출 용량 측정(5회 발사 용량 측정)

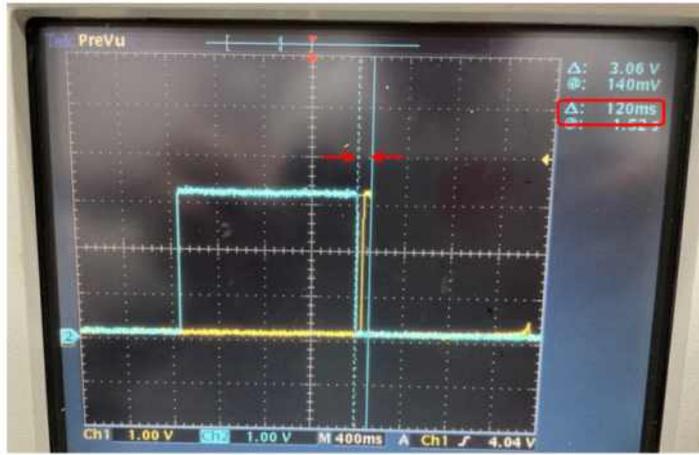


계측기 : 저울

그림 41. 배터리 전압별 토출용량 시험

③ 배터리 전압별 토출시간 시험에서 토출시간은 약 0.12sec임

토출 시간 측정



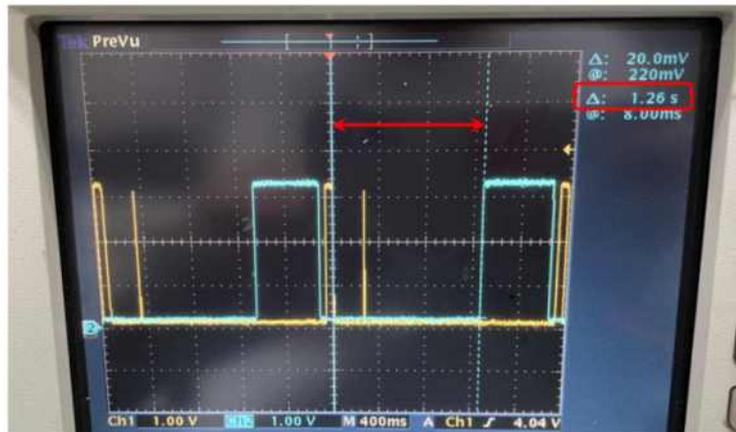
장전 위치 제어 센서 및 토출 완료 위치 센서 신호 측정 하여, 시간 확인
(장전 신호에서 토출 신호 까지 시간 측정)

청색 : 장전 위치 센서
노란색 : 토출 위치 센서

그림 42. 배터리 전압별 토출시간 시험

④ 배터리 전압별 장전시간 시험에서 장전시간은 약 1.26sec임

토출 시간 측정



장전 위치 제어 센서 및 토출 완료 위치 센서 신호 측정 하여, 시간 확인
(토출 신호에서 장전 신호 까지 시간 측정)

청색 : 장전 위치 센서
노란색 : 토출 위치 센서

그림 43. 배터리 전압별 장전시간 시험

□ 3차년도 연구개발 과제 수행 : 주관기관 미라클스코프(주)

기관명	3차 연도 개발 목표 (2023.01.01 ~ 2023.12.31)
주관연구기관: 미라클스코프(주)	<ul style="list-style-type: none"> • 피내접종용 무침주사기 상용 시제품 제작 • 피내접종용 무침주사기 상용 시제품 성능, 내구성 등 평가 • 인증용 공인시험기관에서 시험 실시 및 성적서 발급 • 피내접종용 무침주사기 제조업허가 및 품목허가 획득 • 마케팅 및 상용화 준비

1. 피내접종용 무침주사기 상용 시제품 제작

1) 상용 제품 디자인 및 모델링

○ 무침주사기는 고객의 요구사항들을 반영하여 5개 이상의 제품 디자인 중에서 아래 디자인으로 선정

하여 모델링함

○ 고객의 요구조건

- ① 제품 경량화 및 기기 무게 중심
- ② 높은 압력에서 사용에서 낮은 고장을
- ③ 점성이 있는 백신에서 일정한 압력 유지
- ④ 손이 두레가 얇아 그립감이 좋아야 함
- ⑤ 백신 접종시 피로감을 최고화하기 위한 사용의 편리성 보완
- ⑥ 사용시 팔목에 안착
- ⑦ 방수/낙하 등 파손
- ⑧ 20/50/100ml 등 다양한 바이알 사용가능
- ⑨ 토출구 막힘 최소화 및 A/S 용이
- ⑩ 공타에 의한 기기 고장 최소화



그림 44. 제품 디자인

○ 선정된 제품 디자인을 사용된 부품을 실장하여 모델하였으며, 전체 크기는 약 353x291x68mm임.

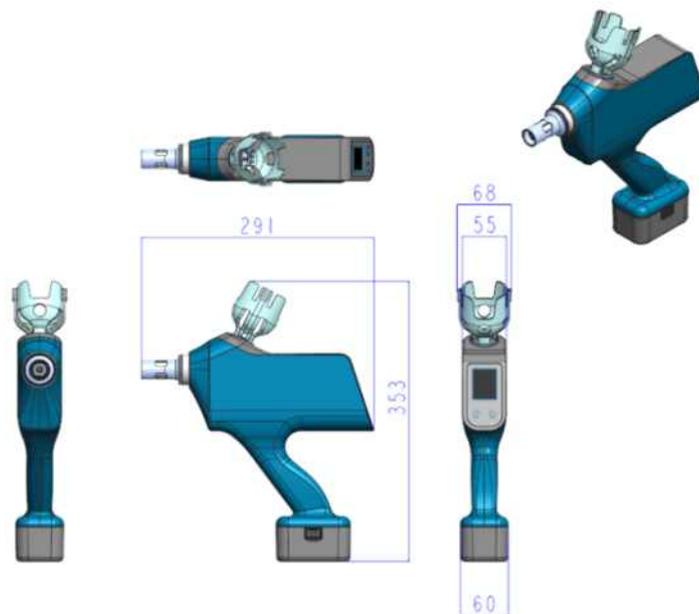


그림 45. 디자인 모델링

2) 핵심 모듈 및 내부 구조

- 양산 시 원가절감과 고장을 줄이기 위해, Nozzle Part와 구동 Part(Cylinder Part)는 모듈형태로 개발함
- Nozzle Part는 약물을 토출하는 부분으로, 트리거 스프링, 노즐팁, 노즐 등으로 구성된다.
- 실린더 구동부와 약물 토출부가 분리되는 “분리형 압축실린더 모듈” 개발되었으며, 장점은 다음과 같다.
 - ① 모듈교체로 토출되는 약물량 조절이 가능하므로, 다양한 축종 및 다양한 백신에 활용할 수 있음
 - ② 내부 고장시 모듈 교체로 고장을 해결할 수 있어 현장수리가 가능함. 또한 해외 수출시 고장문제를 해결할 수 있음
- 구동 Part(Cylinder Part)는 약물 토출에 필요한 높은 압력을 발생하는 부분으로 BLDC Motor, 스프링, Plunger, Cam, Cam Shaft, Cam Follower, Stopper 등으로 구성.



그림 46. 핵심 모듈. (a) Nozzle Part, (b) Cylinder Part

- 개발된 무침주사기 내부는 Nozzle Part와 구동 Part(Cylinder Part)로 구성되며, 세부 구조는 아래 그림과 같다.

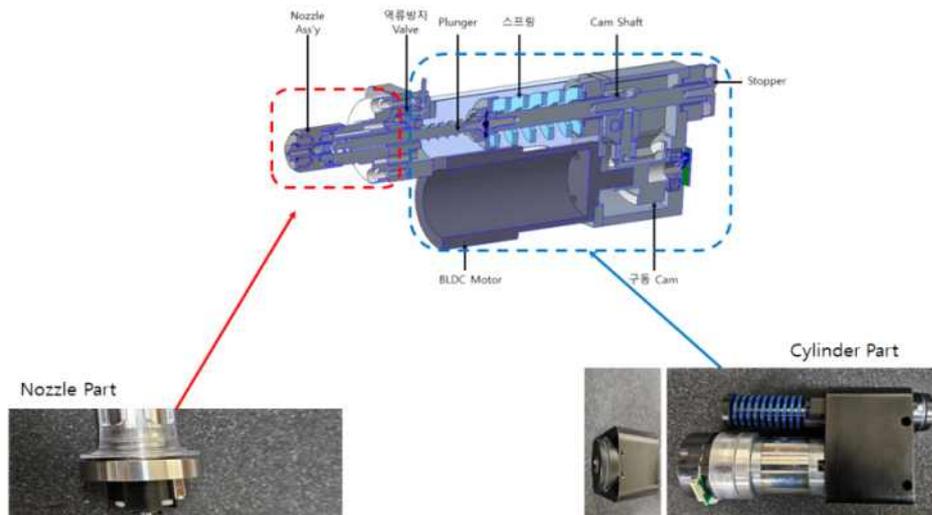


그림 47. 무침주사기 내부 구성

- 아래 그림은 핵심 모듈(Nozzle Part, Cylinder Part)과 외관 Case로 구성된 무침주사기 내부.



그림 48. 무침주사기 내부조립도

3) 시제품 제작

○ 본 과제에서 시제품은 6대 제작하여 인증 시험용, 백신개발용, 효능 및 안전성 평가용 등으로 활용함.



그림 49. 본 과제에서 제작된 시제품

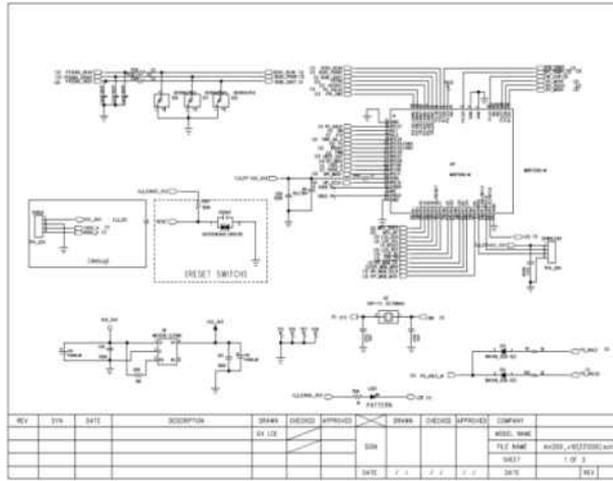
4) 제어 및 구동 보드 개발

- 무침주사기 보드는 전체를 제어하는 메인보드와 모터구동과 전원을 공급하는 모터구동보드로 구성됨.
- 메인보드는 시스템 동작을 제어하는 보드로서, MCU를 내장하고 있어 대기모드, 주입모드, 세척모드 등 모드를 선택하며, 전체 사용횟수와 현재 사용횟수를 관리하고, 포지션제어와 온도 제어등을 수행한다.
- 모터구동보드는 고효율 MOSFET과 DC-DC 등을 내장하고 있어, 메인보드에 +5.0V DC 전원을 공급하고 모터에 14.5V DC를 공급하고, 모터를 구동한다.

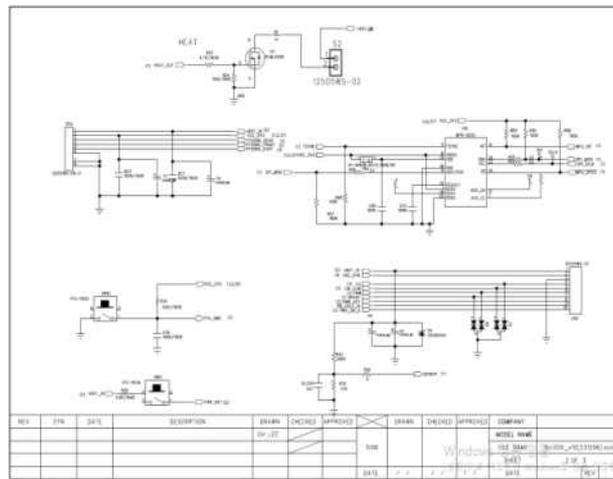
(1) 메인 모드

가) 회로도

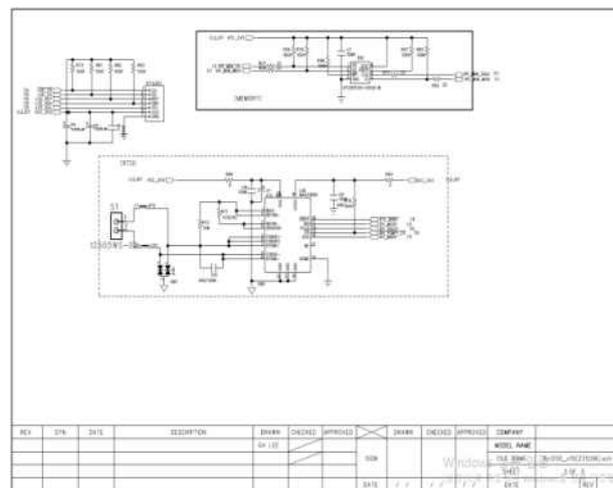
① Main MCU 회로부



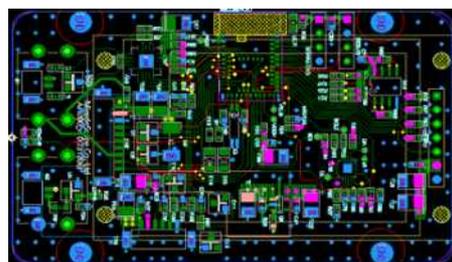
② 모터인터페이스, 히터, 자이로센서 회로부



③ 외부메모리, 온도센서



나) PCB 도면

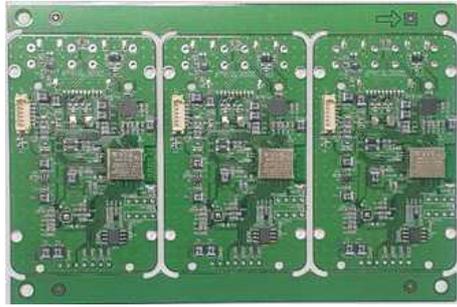


다) PCB 제작

○ 제작 사양

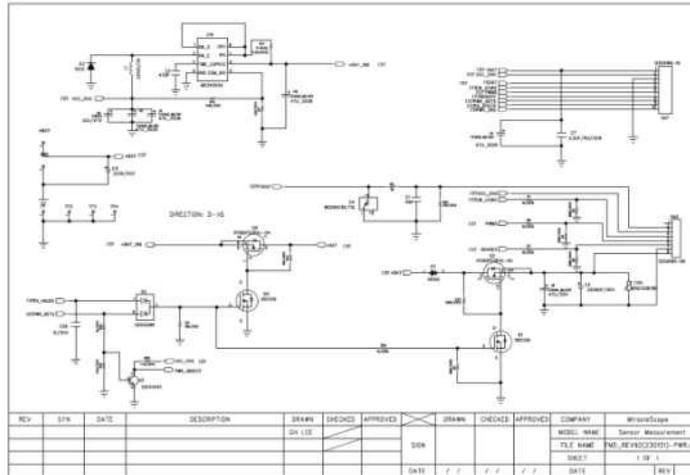
- 두께 : 1.0t

- Layer : 4층

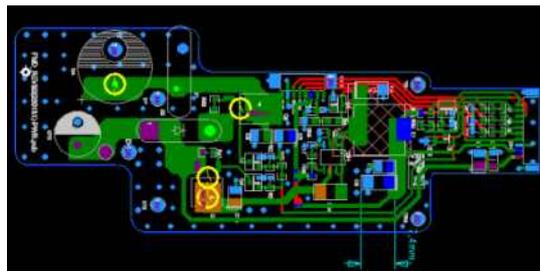


(2) 모터 구동 모드

가) 회로도



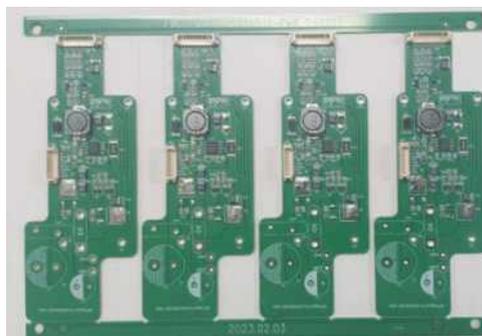
나) PCB 도면



다) PCB 제작

○ 제작 사양

- 두께 : 1.6t
- Layer : 2층



2. 피내접종용 무침주사기 상용 시제품 성능, 내구성 등 자체 평가

1) 개선 제품에 대한 자체 평가

○ 무침주사기의 주요 변수인 토출압력, 토출량, 배터리 사용횟수 등을 평가하기 위해 평가 방법 및 기준을 설정하고 자체 평가를 실시함

(1) [자체 평가] 토출압력 시험

- 토출압력 시험에서 토출압력 범위는 0.80N ~ 0.82N (11.32Mpa)이고, 그 평균값의 0.81N(11.45Mpa)이다. 토출압력은 약 11.45Mpa로 매우 크며, 오차율은 약 0.61%로 매우 안정적임



그림 58. 토출압력 시험

No	토출 압력		No	토출 압력	
	N	Mpa		N	Mpa
1	0.80	11.32	11	0.80	11.32
2	0.81	11.46	12	0.81	11.46
3	0.80	11.32	13	0.82	11.61
4	0.82	11.61	14	0.81	11.46
5	0.81	11.46	15	0.82	11.61
6	0.80	11.32	16	0.80	11.32
7	0.81	11.46	17	0.81	11.46
8	0.80	11.32	18	0.82	11.61
9	0.82	11.61	19	0.81	11.46
10	0.81	11.46	20	0.80	11.32
			평균	0.81	11.45

그림 59. 토출압력 측정값

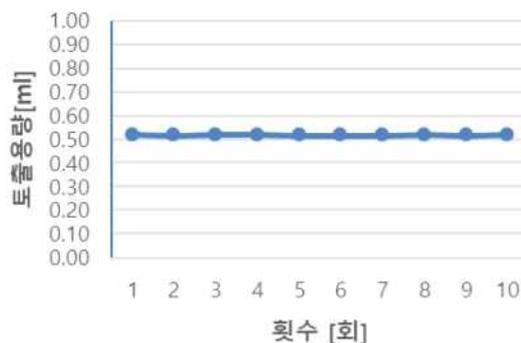
(2) [자체 평가] 토출량 및 편차

- 토출량 측정 방법은 삼각플라스크에 5회발사하여, 미세저울을 이용하여 용량을 측정하여 1회 토출량과 편차를 계산함.
- 1회 토출량은 시뮬레이션값과 유사한 0.52ml이었고, 편차는 0.2%내외로 매우 안정적임.



NO	증류수 (비중=1)		
	5회토출무게	1회 토출량	편차(%)
1	2.60	0.520	0.2%
2	2.59	0.518	0.2%
3	2.60	0.520	0.2%
4	2.60	0.520	0.2%
5	2.58	0.516	0.2%
6	2.59	0.518	0.1%
7	2.59	0.518	0.2%
8	2.60	0.520	0.2%
9	2.58	0.516	0.2%
10	2.60	0.520	0.1%
평균	2.59	0.52	

토출용량 시험



(3) [자체평가] 배터리 사용횟수

- 배터리 사용횟수는 만충전후 완전히 방전될때까지 토출 횟수이다.
- 타사는 약 800회~1,000회이나, 본 과제에서 개발된 제품은 4,000회 이상으로서, 배터리 사용횟수는 전 세계에서 가장 길다.



No	토출 횟수
1	4,198
2	4,287
3	4,293
4	4,465
5	4,285
6	4,311
7	4,295
8	4,287
9	4,324
10	4,358
평균	4,310

(4) [자체평가] 무게 측정

- 제품의 무게는 17.55Kg으로 목표 무게 16.0Kg보다 조금 무겁다. 하지만 손잡이 부분의 두께를 최소로 하여 무게감을 최소화하였다.



그림 63. 무침주사기 무게 측정

2) 농장 시험

- 양돈농장에서 주로 사용되는 백신(구제역, 돼지열병, PRRS)에 대한 농장시험을 검역본부, 한돈협회 혁신센터, 실제 사용농장에서 농장시험을 실시함

(1) 구제역 백신 농장시험

○ 구제역 바이러스 PI(%) 양성 판정 기준 : 50%이상 양성

- 한돈혁신센터 구제역 역가 및 이상육 발생현황 농장시험

- 접종기기 : 미라클스코프 무침주사기기
- 농장시험 방법 : 월 500두 출하농장으로 2021년전에는 유침주사기 접종, 2022년이후 무침부사기 접종
- 유침/무침주사기 구제역역가 비교 : 유침/무침주사기 접종시 구제역역가는 90% 양성
- 이상육 발행 현황 : 유침주사기 접종시 이상육은 30%였으나, 무침주사기 접종시 이상육은 2.2%로 떨어져, 이상육에 의한 경제적 손실은 년 2,000만원 절약

발행 : 이상육 발생 자료

한돈혁신센터 이상육 발생 현황

구분	구제역	구제역 발생(건)	이상육 발생(%)	이상육 발생(건)	이상육 발생(%)	이상육 발생(건)	이상육 발생(%)	
2021	1	636	1,372	310	24.7	3,190,000	13,000	
	2	582	1,164	389	33.4	3,290,000	-	
	3	183	1,164	295	25.3	2,430,000	150,000	
	4	458	1,256	368	29.3	3,440,000	60,000	
	5	471	1,342	251	18.7	3,440,000	160,000	
	6	799	1,390	433	31.1	4,710,000	39,000	
	계	3,886	7,792	2,114	27.1	20,930,000	860,000	
	2022	1	822	1,244	393	31.6	3,000,000	15,000
		2	821	1,242	253	20.4	2,680,000	75,000
		3	543	1,098	266	24.2	1,880,000	120,000
		4	608	1,218	162	13.3	1,750,000	-
		5	982	1,326	111	8.4	1,990,000	30,000
		6	999	1,292	128	10.0	1,200,000	90,000
계		4,833	7,466	1,313	17.6	13,420,000	685,000	
2023		1	483	956	27	2.8	430,000	165,000
		2	471	942	17	1.8	100,000	15,000
		3	598	1,190	27	2.3	280,000	30,000
		4	766	1,532	70	4.6	300,000	270,000
		5	661	1,322	36	2.7	300,000	30,000
	계	7,083	14,166	2,043	14.4	13,840,000	875,000	
	2024	1	483	976	12	1.2	0	60,000
		2	558	1,116	2	0.1	0	10,000
		3	704	1,408	0	0	0	0
		4	529	1,058	7	0.6	0	35,000
		5	487	974	50	5.1	390,000	60,000
		6	537	1,074	20	1.8	190,000	3,000
계		3,777	7,554	96	1.3	200,000	100,000	
2025		1	535	1,070	40	3.7	260,000	20,000
		2	721	1,442	62	4.3	630,000	0
		3	565	1,130	22	1.9	110,000	55,000
		4	542	1,084	18	1.6	20,000	80,000
		5	604	1,208	14	1.1	20,000	60,000
	계	6,457	12,914	283	2.2	2,070,000	365,000	

그림 64. 년도별 구제역 역가 및 이상육 발행 현황

- 일반농자(대저농장) 구제역 역가 시험
 - 접종기기 : 미라클스코프 무침주사기
 - 결과 : 평균 90%로서, 100%양성을 유지

옵티칼 Opti-Cal

접수번호 : 23-07464

혈청 검사 결과서

[주소] 56 경북 용주사 용주사 동물위생시험소 4층 433 동물실험실
Tel: 043-249-7500 Fax: 043-249-7535

접수일자	2023년 9월 19일 화요일	의뢰정보	드림벳 (안용석 님)
사료내역	항역 20 점	농장정보	대저농장

계통 구분	FMDV-O Type	
	PI(%)	결과 판독
1-1	94.78	양성
1-2	93.94	양성
1-3	95.44	양성
1-4	98.00	양성
1-5	88.50	양성
1 평균	93.13	100%
2-1	91.89	양성
2-2	71.77	양성
2-3	94.61	양성
2-4	94.94	양성
2-5	87.72	양성
2 평균	88.19	100%
3-1	91.22	양성
3-2	91.44	양성
3-3	94.61	양성
3-4	98.33	양성
3-5	99.28	양성
3 평균	94.98	100%
4-1	87.94	양성
4-2	85.05	양성
4-3	99.06	양성
4-4	81.05	양성
4-5	96.50	양성
4 평균	90.72	100%

본 결과서는 의뢰된 시료에 한하며, 검사 결과는 소송 및 법적인 용도로 사용할 수 없습니다.
재 2016-15 호가 축병성감정심사기관 ㈜옵티칼

그림 65. 일반농장 구제역 역가 시험

(2) PRRS(돼지 생식기 호흡기 호흡증후군) 백신 농장시험

○ PRRS S/P ratio 양성 판정 기준 - S/P ratio 0.4 이상 양성

○ 일반농자(청학농장) PRRS 역가 시험

- 접종기기 : 미라클스코프 무침주사기

- 결과 : 40일령부터 S/P ratio 0.4 이상 (양성) 유지하였으며, 100일 S/P ratio 평균은 2.05, 130일령 S/P ratio 평균은 1.47였음



(3) CSFV(돼지열병) 백신 농장시험

○ CSFV(돼지열병) Blocking 양성판정기준 : Blocking % 40% 이상

○ 일반농자 CSFVS 역가 시험

- 접종기기 : 미라클스코프 무침주사기

- 결과 : 평균 85.73%으로 양성판정기준인 40%이상 유지

4. 피내접종용 무침주사기 제조업허가 획득 및 상용화 준비

○ 미라클스코프(주)는 피내접종용 분사식 무침주사기의 제조업을 보유하고 있으며, 제품 양산을 위한 원가분석, 양산 시설 투자 및 생산인력을 충원함.

1) 피내접종용 분사식 무침주사기의 제조업

허가번호 제 298 호

동물용의료기기 제조업 허가(신고)증

1. 업 종 : 동물용의료기기 제조업

2. 업 소 명 : 미라클스코프(주)

3. 소 재 지 (본 사) : 경기도 성남시 분당구 판교로 700 (아람동, 분당테크노파크) D동 310-2호
(제조소) :

4. 대 표 자 성 명 : 이계한

5. 대 표 자 생 년 월 일 : 1967년01월27일

6. 허 가 조 건 :

7. 최 초 허 가(신고) 연 월 일 : 2020.11.20

「동물용의약품등 취급규칙」 제 11 조의 규정에 따라 위와 같이 허가(조건부허가, 신고수리)합니다.

2020년 11월 20일

농림축산검역본부장



5. 마케팅 준비

1) 해외 마케팅 전문가 충원

○ 20년 이상 외국계 회사에서 한국지사장을 역임한 해외마케팅 전문가 충원

(1) 전문가 핵심역량

- 조선/해양/오일&가스/EPC/식품산업 분야에서 다져진 마케팅 및 기술영업
- 외국계회사 한국지사장을 역임하며 쌓은 영업, 소통력, 친화력 및 인력관리능력
- 자기 주도적이고, 적극적이며 신규시장개척 및 영업목표를 설정하여 나아가는 추진력
- MS Office, Word, Excel, PowerPoint, Outlook, ERP, CRM 사용가능
- 영어능력 상(Fluent in English, Verbal and written)

(2) 전문가 주요 경력

기 간	회 사 명	근무부서	직급	담당업무
2023.12 ~ Present	미라클스코프(주)	마케팅부	부사장	동물용 무침주사기(의료기기) 해외 마케팅 및 대리점 관리
2017.03 ~ 2023.11	에콜린코리아(주)	마케팅	지사장	스웨덴회사 한국법인 영업 및 관리
2004.08 ~ 2016.12	록스텍코리아(주)	마케팅, 생산관리	지사장	스웨덴회사 한국법인, 현대중공업, 대우조선해양, 삼성중공업, EPC회사, Rotem등에 Cable sealing system을 영업

2) 농기평 “우수 상용화 컨테스트” 우수상 수상

○ 2023년 농식품 R&D “기술상용화 우수상용화 컨테스트” 에서 우수 수상



3) 특허 등록 (2건)

① 특허등록번호: 제 10-2610301호



② 특허등록번호: 제 10-2463473호



4) 제주도 납품 및 세미나

- 사업명 : 제주특별자치도 양돈농가 보급 사업
- 수량 : 56대 납품
- 농가 지원 : 전문가 세미나 개최 및 2개월 이상 상주하여 개발 농가 방문교육 실시.

피내접종용 국산무침주사기 - 혁신제품 애니젯(ANIJET)-100 제주특별자치도 양돈 농가 보급

■ 제주도 양돈농가 보급

- 2023년 5월 30일 제주도 지방보조금 지원사업의 일환으로 제주도 내 양돈농가 44개농장에 무침주사기 '애니젯(Anijet)-100' 56대를 보급

■ 사업 설명회 개최

- 제주양돈농협 회의실에서 한돈협회 제주특별자치도 지부 및 도내 32개 양돈농가들이 참석한 가운데 '애니젯-100' 설명회도 개최
- 사업의 취지와 '애니젯-100' 사용법, 효과 등 설명

■ 전문가 세미나 개최

- 전문가 : 국립한국농수산물대학교 박용수교수
- 주 제 : '애니젯-100' 개발 배경, 사용 가능한 백신 및 경제적 효과 등 설명



■ 사용 농가지원

- 미라클스코프(주) 직원들이 제주도에 2개월 이상 상주하여 개별농장 방문하여 사용법 교육 실시
- 농장 요청 시 항체가 분석 서비스를 지원(한국농수산물대. 전북대학교)

5) 국내 전시회 참가 및 계획수립

① 2022년/2023년 한국국제축산 박람회 참가



② 농림축산식품 과학기술대전



③ 2024 스마트 축산 K-FARM 페어 (kolef.net) 참가 예정



6) 해외 전시회 참가 계획수립

○ 수출인프라 구축

- 국내 축산박람회에 꾸준히 참석하며 외국방문객들을 통해 해외축산시장트렌드를 파악하고자 노력해 왔으며 외국바이어들을 통해 당사제품의 품질경쟁력에 대한 확신을 얻었으며 20년 이상의 해외영업경력과 유럽회사의 한국영업이사 및 지사장을 역임한 영업직원을 채용, 해외메일 및 서류번역, 비즈니스 회화 가능하며, 외국문화에 대한 이해와 시장개척 및 도전의식확고, 외국어 홈페이지/카탈로그 추진중, 영어, 베트남어, 태국어등의 사용설명서 보유, 수출대상 지역분석완료

○ 중국

- 전세계에서 가장 큰 축산업시장이며 외국산 무침주사기와 중국제 무침주사기가 각축을 벌이고 있음, 외국제의 경우 높은 기술력을 바탕으로 대리점들을 통해 대형농가를 공략하고 있으나 높은 가격대비 A/S가 낮아서 불만을 사고있음, 중국제의 경우 가격경쟁력으로 승부하고있으나 잦은 고장으로인해 고장이 나면 A/S보다는 신규구매를 하는등 소비자의 불신이 높음.
- 베트남
 - 유럽제품과 중국제품이 각축을 벌이고 있어서 중국시장과 비슷한 면이 있지만 중국제품에 대한 불신이 높고 한국산에 대한 신뢰도가 있어서 시장진출에 기대가 높음
- EU
 - 현재 전세계(유럽, 한국포함)에 사용되는 무침주사기는 펄스사의 가스방식 무침주사기, MSD사와 Hipra사의 모터구동 무침주사기들이 있으나 펄스사는 가스통을 들어야하는 불편함과 위험성이 있고, MSD사나 Hipra사 제품의 경우 자사의 백신만 사용할수 있고 상용백신의 사용이 불가능하며 고가임.
- 자체진행현황
 - 호치민 축산업전시회(ILDEX, 5/29~5/31, Vietnam), 남경 국제 축산박람회(VIV China, 9/5~9/7, China), 하노버 축산업전시회(EuroTier, 11/12~ 11/15, Germany)등 해외전시회참가를 통해 홍보, 시장동향파악 및 고객사발굴예정
- 목표고객군
 - 유럽 및 중국 그리고 동남아지역에 대리점네트워크를 구축하고있는 대형축산기자재업체와 백신공급업체들중 무침주사기에 대한 필요성을 가진 고객사를 목표로 함, 이들업체를 통해서 직접적으로 해외바이어들에게 제품홍보하고 이들회사 영업직원들 제품교육을 실시하여 제품장점홍보, 정확한 사용법, 신속한 A/S대응 등을 진행하려고 함.

7) 해외 마케팅 주요 성과

④ 중국

- 대리점 판매계획 : 중국내 농축산기자재업체와 판매계약
- 수량 : 12대 납품(2023년 기준)
- 진행현황 : 운스집단(모돈30만두의 대형농장)과의 구제역백신 임상시험에서 합격함으로 인한 2024년 대량 판매전망
- 남경 국제 축산박람회(VIV China, 9/5 ~ 9/7) 참가 예정



⑤ 태국

- 대리점 판매계획 : 대형농축산기자재업체(UAP, Union Agriphar Co)와 판매계약 추진중
- 수량 : 2대 납품예정
- 진행현황 : 국제농장체인 대기업인 CP사와 King Mongkut's Institute of Technology

Ladkrabang(KMITL)와 돼지백신 임상시험준비중

- 이시험에 합격하면 CP사에서 대량 구매 예상.

Research Proposal (UAP trial)

Application of Needle-free Injection (Anijet-100) for Carbomer and Phosphate Buffer Saline Base Vaccine in Pig

Objective

1. To test the effectiveness of using needless syringes (brand name) in conjunction with subunit vaccine with a carrier of the carbomer type (Pro-Vac Circomaster One-Shot) for pigs.
2. To test the effectiveness of using needless syringes (brand name) in conjunction with attenuated vaccine with a carrier of the phosphate buffer saline type (Pro-Vac CSF) for pigs.

Research facility and location.

The research will be carried out at Animal Research and Innovation Center (ARIC) and Laboratory of Molecular Genetics and Cellular Biotechnology, School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Bangkok, Thailand (<https://www.agri.kmitl.ac.th/main/>).

Experimental budget

Items	Expenses (USD)
21 piglets after weaning (21x 1,800)	1,166.67
Feed for pigs throughout the experiment	3,888.89
Laboratory testing material and expenses	1,805.56
Labor costs for pig rearing	833.33
Expenses for consumable materials and chemicals	277.78
Anijet-100 Injector	(one device) ???
Total	7,972.23 + Anijet-100 device cost

[공동연구기관1: (주)고려비엔피]

□ 1차년도 연구개발 과제 수행 : 공동연구기관1 (주)고려비엔피

기관명	1차 연도 개발 목표 (2021.01.01 ~ 2021.12.31)
공동연구기관1: (주)고려비엔피	<ul style="list-style-type: none"> • 재조합 PCV2 항원 단백질 대량 생산법 확립 및 경제성 확보 • 재조합 PCV2 항원의 면역원성 평가 • 피내 접종용 PCV2 백신 어쥬번트 선발 • PCV2 피내 접종용 백신 시제품 제작 및 유효성 평가

1. 재조합 PCV2 항원 단백질 대량 생산법 확립 및 경제성 확보

1) 재조합 PCV2 항원 단백질 발현

(1) PCV2 캡시드 단백질 발현 벡터의 제작

○ PCV2 캡시드 단백질 발현 유전자 확보

- PCV2 캡시드 단백질을 coding하는 유전자는 선행연구를 통하여 확보하였고, 이 유전자 서열을 곤충세포에서 단백질 발현효율을 높일 목적으로 유전자 서열을 변경(codon optimization)한 후, 전문기관에 의뢰하여 합성하였음. 곤충세포에 최적화된 염기서열과 원래 바이러스 유전자 서열의 비교 결과는 아래와 같음. 유전자 서열비교(그림 1 A), 아미노산 서열 비교(그림 1,B)

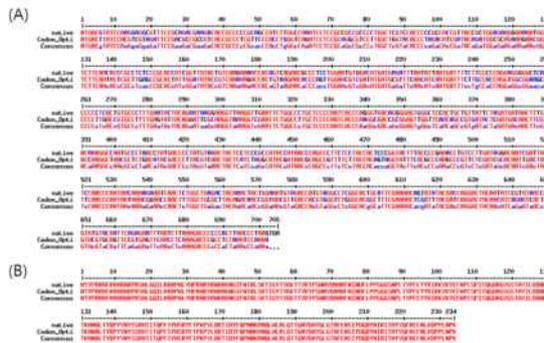


그림 1. PCV2 캡시드 단백질 codon optimization. (A) native strain과 codon optimized strain 유전자 염기서열 상동성 비교. (B) native strain과 codon optimized strain 유전자 아미노산 서열 상동성 비교

○ 재조합 Baculovirus 제작

- Codon optimization된 목적 유전자를 제한효소 BamHI/KpnI를 처리하여 전이벡터 (transfer vector)에 클로닝 하였고, 목적 유전자의 삽입여부를 동일한 제한효소로 처리하여 확인하였고(그림 2), 그리고 유전자 염기서열 분석을 통하여 유전자의 삽입을 재확인하였음.

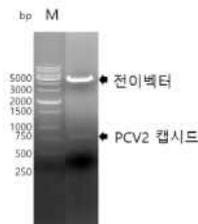


그림 2. 제한효소 처리에 의한 cloning 확인

- 유전자의 삽입이 확인된 전이벡터는 단층으로 배양된 곤충세포 Sf9에 baculovirus DNA와 co-transfection시켜 상동재조합 전이를 유도하였음. Co-transfection 후 5일이 경과하였을 때, 세포 배양 상층액을 수확하여 master seed(P0)로 확립하였음. 단층 배양된 곤충세포 Sf9에 P0 접종액을 재

접종한 후 5일간 배양하였으며, 세포배양 상층액만을 수거하여 P1 접종액으로 확보하였음. 확보한 P1 접종액은 plaque assay 방법으로 역가를 측정하였고, 측정된 역가는 1.46×10^8 pfu/ml로 확인되었음(그림 3)

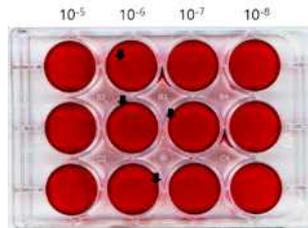


그림 3. Plaque assay 방법에 의한 재조합 baculovirus 역가 측정

2) PCV2 항원 대량 생산 조건 설정

○ PCV2 캡시드 단백질 항원 발현

- 재조합 Baculovirus에서 PCV2 캡시드 단백질의 발현을 확인하기 위하여, 단층으로 배양된 곤충세포 Sf9 1×10^6 cells/ml에 재조합 바이러스를 5 multiplicity of infection (MOI) 농도로 접종한 후, 접종 후 5일차에 세포를 수거하여 발현을 확인하였음. 단백질 발현은 단백질 전기영동법, 그리고 PCV2 캡시드 단백질을 인식할 수 있는 항체를 사용한 Western blot법으로 분석하였음. 발현된 단백질은 약 27 kDa 위치에서 높은 발현 양상을 확인할 수 있었음(그림 4)

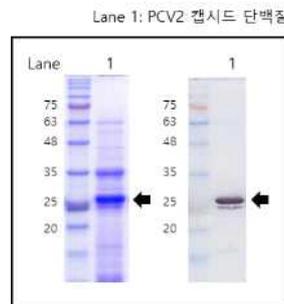


그림 4. PCV2 캡시드 단백질 발현 확인

- PCV2 캡시드 단백질은 곤충세포에서 발현된 후 Virus-like particle (VLP)가 형성되며, 백신 항원으로써의 역할이 가능한 것으로 알려져 있음. 본 연구에서 발현된 PCV2 캡시드 단백질의 VLP 형성 유무를 확인하기 위하여 투과전자 현미경(TEM)으로 관찰하였음. 발현된 PCV2 캡시드 단백질은 기존 문헌에 알려진 바와 유사하게 약 15~20nm 크기로 다각형에 가까운 모양의 particle을 형성하는 것으로 확인되었음(그림 5)

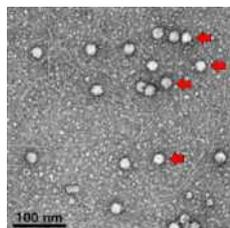


그림 5. PCV2 캡시드 단백질 TEM

○ PCV2 항원 대량 생산화

- PCV2의 백신 항원을 대량 생산하기 위하여 기존에 판매되는 세포배양용 culture bag를 사용하여 wave bioreactor에서 대량 생산조건을 확립하였음. 재조합 Baculovirus 접종량에 따라 발현 차이를 확인하

기 위하여, 바이러스 접종농도를 0.1, 0.5, 1, 5, 10 MOI 조정하여 미리 준비된 곤충세포에 접종한 후 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였음. 단백질의 발현량은 바이러스 접종농도에 따라 큰 차이는 없었지만, 낮은 MOI일수록 높아지는 경향을 보였음. 향후 산업화 과정에 경제성 확보차원에서 바이러스 접종농도를 0.1 MOI로 결정하였음(그림 6).

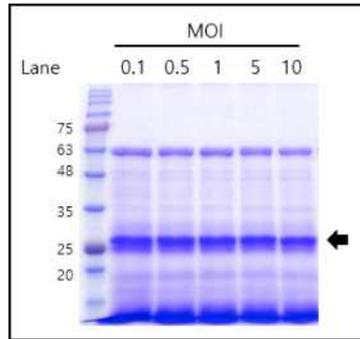


그림 6. 접종량에 따른 PCV2 캡시드 단백질 발현량 비교

- Wave bioreactor의 사용 조건을 확인하기 위하여 기울기와 rocking rpm을 조절하여 최적의 조건을 확인하고자 하였음. 기본적으로 사용되는 15rpm을 사용하였으며, 기울기를 8.5도, 10도, 13도로 설정하여 비교 시험을 진행하였음(그림 7). PCV2 캡시드 단백질은 바이러스 접종 후 시간이 지남에 발현량이 증가하다가, 7일차 이후로는 발현량의 변화는 없는 것으로 확인됨. Wave bioreactor의 rocking 각도가 증가함에 따라 단백질 발현량이 증대되었고, 최대 기울기 설정 각도인 13도에서 가장 높은 발현량을 보였음.

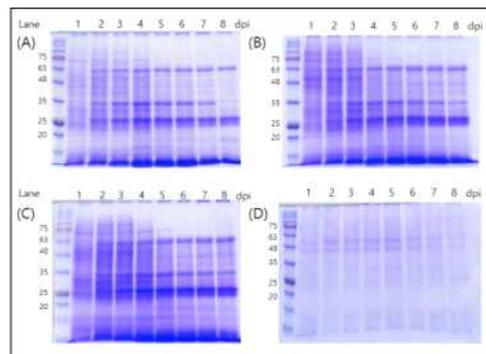


그림 7. Wave bioreactor의 조건에 따른 PCV2 캡시드 단백질 발현 비교. (A) 15 rpm, 8.5도 설정, (B) 15 rpm, 10도 설정, (C) 15 rpm, 13도 설정, (D) 20 rpm, 13도 설정

3) PCV2 항원 생산 공정 수립 및 생산 경제성 검토

○ PCV2 캡시드 단백질 발현 후, 원심분리 공정 검토

- 발현된 단백질의 생산 공정 간소화를 위하여, 수거한 세포배양액을 1차로 원심분리한 후 침전물 발생 여부를 확인한 결과, 침전물이 거의 발생하지 않았음(그림 8)

Lane 1: Baculovirus 접종 세포배양액
 2: 원심분리 후 침전물
 3: 원심분리 후 상층액

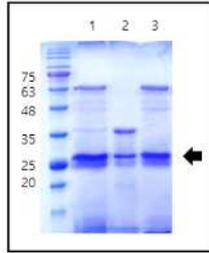


그림 8. 세포배양액 원심분리에 의한 PCV2 캡시드 단백질 침전 확인

○ 세포배양액 후처리 조건 설정

- 재조합 단백질이 포함된 세포배양액은 homogenizer를 사용하여 파쇄한 후, 세포배양 불순물은 단계적 filtering과정을 통하여 제거하였음(그림 9).

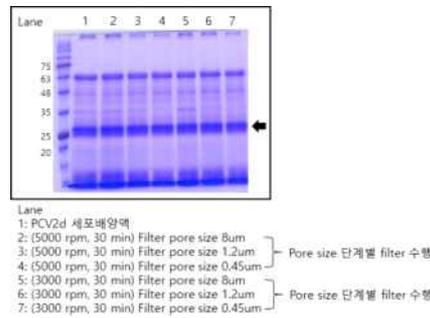


그림 9. 세포배양액 후처리 공정 과정

4) PCV2 항원 정량법

○ Band intensity를 이용한 정량

- PCV2 캡시드 단백질 항원의 정확한 정량법을 세팅하기 위하여, 재조합 단백질을 전기영동 후, 목적단백질 밴드의 intensity를 IQTL software로 측정하여 정량하는 방법을 구축하였음. 정량이 가능한 표준물질로 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여, 표준물질량 1, 2, 3, 4 ug를 비교하였을 시, band density 차이를 참고하여 PCV2 단백질 정량법을 구축하였음 (그림 10).

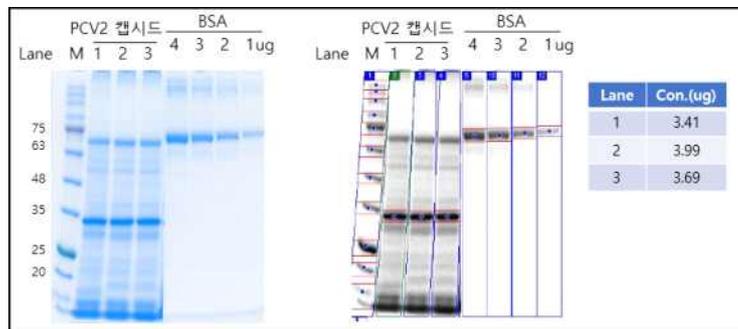


그림 10. PCV2 캡시드 단백질 정량

2. 재조합 PCV2 항원의 면역원성 평가

○ 마우스를 이용한 면역원성 평가

- 곤충세포에서 발현된 단백질을 정량한 후, 각기 다른 농도의 항원이 포함된 시험백신을 제조한 후, 자돈용 백신 권장량의 1/10 dose를 2주 간격으로 2회 복강 접종하여 면역을 유도한 뒤 항체가 측정을 위해 접종 후 2, 4, 6주차 채혈하여 혈청을 확보하였음. PCV2에 대한 혈중 항체가를 확인하기 위하여

In-house ELISA kit를 제작하여 항체가 검사를 진행하였음. 혈중 항체가 분석 결과 PCV2 백신 접종군이 무접종군에 비하여 높은 항체가가 형성됨에 따라 PCV2 VLP 항원을 백신으로 사용 가능성을 확인할 수 있었음(그림 11).

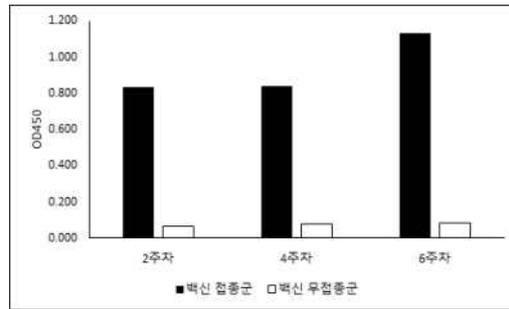


그림 11. 마우스에서의 PCV2 백신 면역원성 평가

○ 기니픽을 이용한 면역원성 평가

- 마우스를 이용한 혈중 항체가 측정과 동일한 방법으로 시험백신을 제조한 후 자돈용 백신 권장량의 1/2 dose를 2주 간격으로 2회 근육 접종하여 면역반응을 유도한 뒤 항체가 측정을 위해 접종 후 2, 4, 6주차 채혈하여 혈청을 확보하였음. 혈중 항체가는 In-house ELISA kit를 사용하여 분석하였고, 무접종군에 비하여 백신접종군에서 매우 높은 형성되었음. 항체가 패턴은 마우스의 경우와 다르게, 백신 접종 후 2주차부터 점진적으로 항체가가 증가 되었음(그림 12). 이는 마우스 시험에 접종된 항원량과 비교하여, 과량의 항원이 접종되어 백신 접종 2주 후부터 높은 항체가를 형성하는 것으로 판단됨.

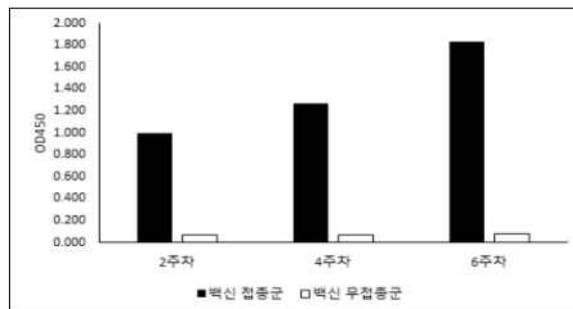


그림 12. 기니픽에서의 PCV2 백신 면역원성 평가

○ PCV2 항원의 안정성 평가

- 동물용 의약품 국가검정기준에 의거하여 설정된 기간동안 시험백신의 특성, 안정성, 그리고 면역원성을 평가를 진행하고 있음.

3. 피내 접종용 PCV2 백신 Adjuvant 선발

○ Adjuvant 후보물질 선발

- 동물용백신은 통상적으로 목적동물의 근육으로 접종하여 면역반응을 유도하지만, 피내 접종할 경우에는 근육으로 접종된 항원을 처리하는 동물의 면역기전과 차이가 있을 수 있음. 이러한 이유로, 피내로 접종된 항원에 대한 적합한 면역반응을 유도할 수 있는 새로운 adjuvant를 선발할 필요가 있음. 따라서, 동량의 PCV2 VLP 항원과 다양한 adjuvant 후보물질이 포함된 시험을 제조하였음(표. 1).

표 1. Adjuvant 조성에 따른 실험군 설정.

시험군	어쥬번트	PCV2 항원
G1	A+B	25 ug/dose
G2	A+C+D	
G3	E	
G4	F	
G5	F+C+D	
G6	G	
G7	G+C	
G8	H+B	
G9	H+C+D	
G10	H+I	
G11	없음	
G12	없음	없음

참고: 물질명은 지적재산권 보호차원에서 비공개함.

○ In-house ELISA 제작

- 시험백신의 역 유도능을 평가하기 위하여, 시험백신에 사용된 항원에 대한 항체를 특정할 수 있는 in-house ELISA를 제작하였음.

○ 각 adjuvant별 면역원성 비교평가

- 자돈용 백신 권장량의 1/10 dose용량의 시험백신을 실험동물에 피내경로로 접종하여 면역을 유도하였고, 백신 접종 후 1, 2, 4주차에 채혈하여 혈청을 확보하였음. 상기에서 제작된 in-house ELISA로 혈중 항체가를 측정 한 결과는 그림과 같음(그림 13).
- 각 시험백신 접종군은 무접종 대조군(G12) 보다 백신 접종 후 2, 4주차에 높은 항체가를 형성하였으며, 2주보다는 4주차에 더 높은 항체가를 형성하였음. 그 중, 전체 혈중 항체가 결과로 미루어 보아 micron-size oil로 구성된 O/W(oil in water) 계열의 어쥬번트인 물질 G와 세포성 면역 유도에 널리 사용되는 물질 C를 혼합하여 사용한 그룹인 G7이 다른 그룹에 비하여 비교적 높은 항체가가 확인되었음.

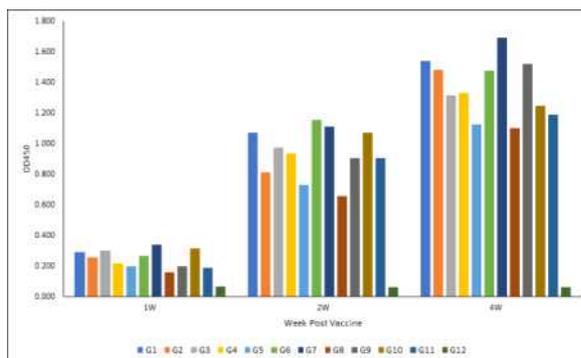


그림 13. Adjuvant 조성에 따른 항체가 비교

4. PCV2 피내 접종용 백신 시제품 제작 및 유효성 평가

○ 목적동물(자돈)에서 PCV2 단백질 항원의 면역원성 평가(근육접종)

- 상기에서 생산된 PCV2항원의 면역원성을 평가하기 위하여, PCV2 VLP항원과 상용 어쥬번트가 혼합된 시험백신을 제조하였고, 이 백신을 3주령 자돈의 이근부에 2mL 근육접종하였고, 대조군에는 동량의 PBS를 접종하였음. 혈중 항체가는 상용 PCV2 ELISA(Median)과 PCV2d항원에 대한 항체를 특이적으로 측정할 수 있는 in-house ELISA로 측정하였음.
- 상용 ELISA로 측정한 항체가 측정 결과는, 3주령 자돈에 상당한 수준의 모체이행항체가 존재하였고, 비 백신 대조군에서는 시간이 경과함에 따라 모체이행항체 수준이 지속적으로 감소하였음. 백신접종군의 항체가는 백신 접종 4주 후부터 유의미한 수준까지 증가하였음(그림 14). In-house ELISA로 측정한 항체가 측정 결과는, 백신접종군의 항체가는 백신 접종 2주 후부터 지속적으로 증가하였음(그림 15).

- 이 시험결과는 상기에서 생산된 PCV2 VLP 단백질은 목적동물(자돈)에서 백신 항원으로서는 충분히 효과가 있음이 확인되었음.

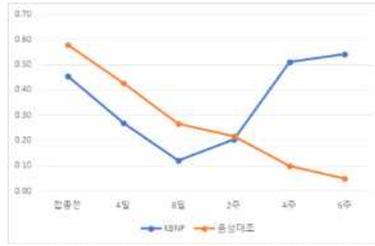


그림 14. 시판되는 ELISA를 사용하여 혈중 PCV2 항체가 측정 결과

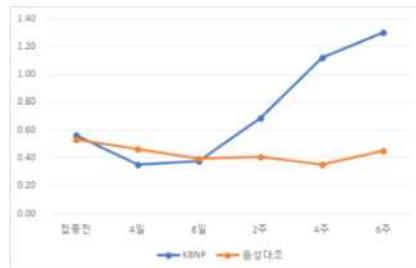


그림 15. In-house ELISA를 사용하여 혈중 PCV2 항체가 측정 결과

○ 자돈에 백신시제품의 피내 접종

- 기 개발된 2종의 무침주사기를 이용하여, 4주령 자돈에 시험백신을 0.5mL/dose 피내접종법으로 이근부에 접종한 후, 14일간 임상증상을 관찰하였음. 대조군은 동량의 PBS를 동일한 방법으로 투여하였음. 임상증상으로는 백신접종 즉시 접종부위가 약간 종창되었고, 접종 후 1일차에 무침주사 접종 부위가 검붉은 색으로 변하는 양상을 확인할 수 있었으며, 접종 후 3일차에 딱딱한 가피가 형성되기 시작하였고, 시간이 경과할수록 점점 가피가 사라지는 양상을 확인하였음 (그림 16).



그림 16. 무침주사기를 이용한 PCV2 백신 접종 후 가피 형성 유무 관찰

○ 목적동물에서 피내접종용 백신의 면역원성 평가

- 선행연구를 통하여 선발된 다수의 피내접종용 시험백신을 대상으로, 백신접종군 자돈에는 시험백신을 0.5mL씩 이근부 피내접종하였고, 무접종 대조군에서는 PBS 0.5mL을 동일한 방법으로 피내접종용 주사기 [Mirajet-100]을 사용하여 접종하였음 (표 2).

표 2. 목적동물을 대상으로 피내접종용 백신 시제품 시험군

시험군	어주버트	PCV2 항원
G1	A+B	100 ug/dose
G2	A+C+D	
G6	G	
G7	G+C	
G9	H+C+D	
G11	없음	
G12	없음	없음

- 자돈에 시험백신을 피내 접종법으로 접종한 후 2, 4, 8주 차에 채혈하였고, PCV2 항원에 대한 혈중 항체가를 상용 ELISA와 in-house ELISA를 사용하여 분석하였음.
- 혈중 항체가는 상용 ELISA로 측정된 항체가(그림 17, A)와 in-house ELISA 항체가(그림 17. B)에 모두 백신접종 4주 이후에 유의미한 증가 경향을 보였음. 그중, 모든 항체가 중에서 micron-size oil로 구성된 O/W 계열의 어주버트인 물질 G와 세포성 면역 유도물질 C가 혼합된 시험군(G7)이 다른 시험군에 비하여 비교적 높은 항체가 수준을 보였음(그림 17).

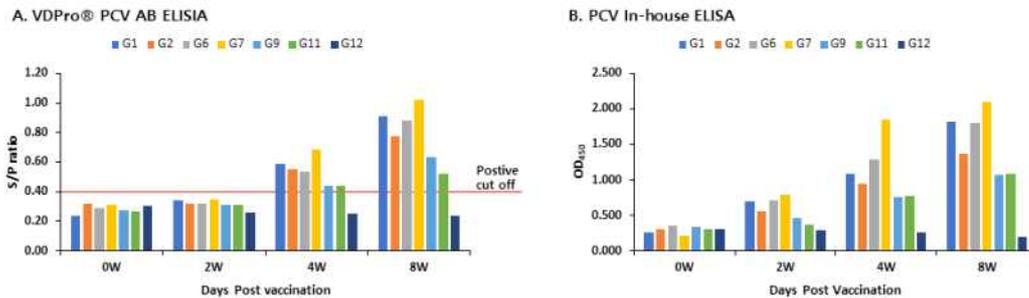


그림17. Adjuvant 조성에 따른 항체가 비교. A: 상용 ELISA, B: in-house ELISA

○ 시험백신의 안전성

- 동물약의약품 국가검정기준에 따라 각 시험백신을 과용량(2배 접종량)을 실험동물(기니픽)과 목적동물(자돈)에 접종한 후 2주간 접종부위 이상반응을 포함하여 임상증상을 관찰하였음. 대조군은 동일한 방법으로 PBS를 접종하였음.
- 2주간 실험동물과 목적동물 모두에서 접종부위의 이상반응 또는 특이한 임상증상이 관찰되지 않았기에, 상기에서 사용된 모든 시험백신의 안전성은 확인되었음.

□ 2차년도 연구개발 과제 수행 : 공동연구기관1 (주)고려비엔피

기관명	2차 연도 개발 목표 (2022.01.01 ~ 2022.12.31)
공동연구기관1: (주)고려비엔피	<ul style="list-style-type: none"> • Mycoplasma 항원의 대량 생산법 확립 및 경제성 확보 • Mycoplasma 항원의 면역원성 평가 • 피내접종용 신규 어주버트의 선발 및 평가 • 피내접종용 Mycoplasma 백신 시제품 제작 및 유효성 평가

1. Mycoplasma 항원 선발 및 대량 생산법

1) Mycoplasma 항원 선발

○ 야외분리주 확보

- 양돈장의 이환돈 또는 도축장의 폐가검물 중에서 암적색 경화소를 보이는 병변부위 조각을 채취하여 생리식염수를 첨가하여 조직마쇄기로 파쇄하여 병원체 분리용 유제액을 준비하였음 (그림 18)



그림 18. 마이코플라즈마성 폐렴 병변 부위

- 유제액에 오염된 세균을 제거하기 위하여 0.22 μm 필터로 통과시킨 다음 100 μl 시료를 4ml 마이코플라즈마 증식배지에 접종한 후 37°C에서 배지의 색상이 노란색으로 변색될 때까지 배양하였음 (그림 19). 마이코플라즈마 군체를 순수분리하기 위하여 균배양액 100 μl 를 마이코플라즈마 증식용 한천배지에 도말한 후 37°C에서 7일간 배양하였고, 한천배지에서 한 개의 콜로니를 채취한 후, 다시 1mL의 증식배지에 접종하여 증식배지 색이 노란색으로 변할 때까지 37°C에서 배양하였음. 이 과정을 3회 반복한 후 최종적으로 확보한 콜로니를 원종균주로 결정하였음(그림 20).



그림 19. Friis 증식배지에 마이코플라즈마를 접종한 후 7일간 정치배양한 증식배지 색상

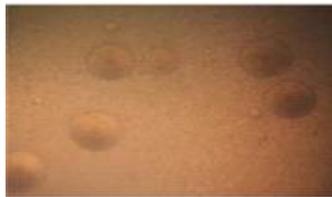


그림 20. 한천배지에서 마이코플라즈마의 집락 모양.

- 마이코플라즈 확인시험
 - 마이코플라즈마 분리주를 증식배지에서 3일간 배양한 후, 원심분리(15,000 xg, 10 min)하여 병원체를 수거하여 상용 DNA extraction kit를 사용하여 genomic DNA를 추출하였음. 병원체의 확인 및 기타 병원체와 감별하기 위하여, 추출한 genomic DNA를 주형으로 다음의 프라이머를 이용하여 PCR를 수행하였음. 마이코플라즈마 감별진단용 프라이머는 *M.hypopneumoniae* Fwd (TTCAAAGGAGCCTTCAAGCTTC), *Mycoplasma* Rev (AGAGGCATGATGATTTGACGTC)의 조합임. PCR 수행조건은 1 cycle (94°C/3 min), 35 cycles(94°C/30sec, 52°C/15sec, 72°C/80sec), 1 cycle (72°C/5 min)을 사용하였음. 마이코플라즈마 균종간 감별은 PCR 증폭물을 1% agarose gel에서 전기영동한 후 확인된 밴드의 크기에 따라 *M.hypopneumoniae* (1,000 bp)로 구별하였음.
- 마이코플라즈 증식성 실험
 - 야외분리주는 일반적으로 인공배지에 증식성 낮은 경향성을 보이기 때문에, 상기에서 선발한 각 분리주의 증식성을 확인하기 위하여 마이코플라즈마 증식배지에 접종하여 37°C에서 7일간 배양하고 색깔이 변한 최대 희석 배수의 역지수를 색깔변화단위(Color Change Unit; CCU)로 나타내어 증식성이 우수한 균주를(sample 13) 선별하였음(그림 21).

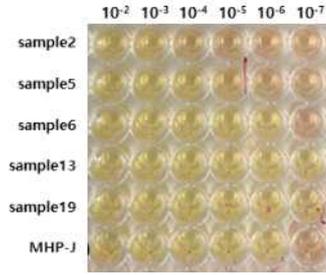


그림 21. 마이코플라즈마 CCU 측정을 통한 최적 균주 선발 결과

2) 항원 대량 생산용 배지 최적화

- Mycoplasma는 배양 배지의 성분 원료 품질과 각 조성비에 따라 증식성에 많은 차이를 보이기 때문에, 마이코플라즈마 항원을 산업적으로 대량생산하기 위해서는 개선된 배지 조성을 확립할 필요가 있음.
- Mycoplasma 최적화 배지 조성은 기본적으로 사용하는 필수 조성에 추가하여, 증식에 영향을 줄 수 있는 serum, yeast, amino acid, saccharide 등의 조건들을 다양하게 조합하여 증식 배지 최적화 시험을 진행하였고, 증식성이 우수한 배지를(조건2) 선발하였음(그림 22)

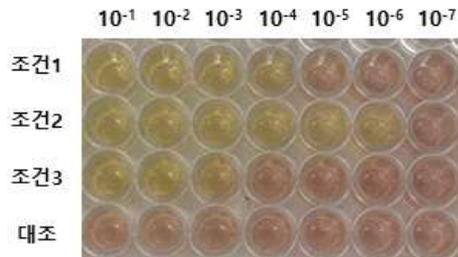


그림 22. 마이코플라즈마 CCU측정을 통한 최적 배지 조건

3) 항원 대량생산 조건 구축

- Mycoplasma는 고농도 배양을 위해서는 상대적으로 까다로운 배양조건이 필요할 뿐만 아니라, 다양한 성분의 배지 조성 최적화가 필요함. 특히, 마이코플라즈마 백신 제품화를 위해서는 항원 대량생산 조건 확립을 통하여 항원 생산의 경제성을 확보할 필요가 있음. 따라서, 5L jar-fermenter를 이용하여 상기에서 확립한 최적의 배양 배지 조성을 기반으로, rpm, 용존산소량, media feeding 등의 조건 등 변경을 통하여 대량 배양법을 구축하였음(그림 23).



그림 23. 마이코플라즈마 scale up 실험

4) 재조합 마이코플라즈마 Ap97 항원 확보

○ 마이코플라즈마 Ap97 단백질 발현

- *M. hypopneumoniae* P97(adhesion protein)에 대한 다양한 연구결과를 분석한 결과, P97 단백질은 *M. hypopneumoniae* 감염에 따른 유행성 폐렴의 발병기전에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었음. 특히 P97 단백질의 C-terminal 위치한 R1 repeat region과 R2 repeat region이 돼지의 섬모 상피조직에 부착하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 이러한 이유로, P97 단백질은 유행성 폐렴 예방백신 개발에서 중요한 표적항원으로 인식되었고, 본 연구에서도 P97 단백질을 백신 항원으로 개발하고자 하였음.
- 분리한 마이코플라즈마 균주의 P97 염기서열을 분석한 후, P97 유전자 서열 중에 존재하는 마이코플라즈마가 사용하는 tryptophan codon(TGA) (대장균에서는 stop codon으로 사용)를 TGG로 변경하였음. 더하여, 이 유전자 서열은 대장균에서 단백질 발현 효율을 높이기 위하여 codon optimization시킨 후, 외부기관에 의뢰하여 유전자를 합성하였고, P97(Ap97 명명)이라 명명하였음(그림 24).

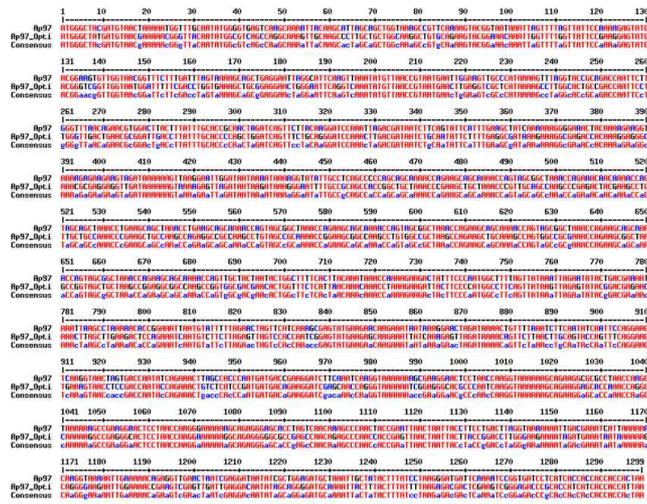


그림 24. 마이코플라즈마 AP97 유전자 codon optimization. native strain과 codon optimized strain 유전자 염기서열 상동성 비교

○ 재조합 단백질 발현 벡터 제작 및 단백질 발현

- 단백질의 발현 효율을 높이기 위하여 목적단백질의 N-terminal에 발현 유도 단백질을 추가하고 C-terminal에 his-tag을 추가하여, pET-28a vector에 삽입하였음. 목적단백질 발현 유전자 서열이 In-frame fusion의 형태로 삽입된 재조합 벡터를 선발하였고, 이 벡터를 단백질 발현용 대장균 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환 시켰음. 재조합 단백질 발현벡터를 함유하는 형질전환된 대장균에서 단백질 발현 유도는 18~24시간 전배양한 후, 배양된 세균액을 1/100 volume으로 신선한 배지에 접종 후 37°C에서 OD600 0.4~0.8이 될 때까지 교반하면서 배양하였음.
- 세균 배양액의 흡광도(OD값)가 일정한 수치에 도달하면 IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도하고, 약 4시간 동안 추가 배양한 후, 배양액의 일부를 채취하여 5XSDS sample buffer와 섞은 후에 95°C에서 10분간 열처리하여 SDS-PAGE로 단백질 발현을 확인하였음. 그 결과 IPTG유도에 의해 77 kDa의 단백질이 발현된 것을 확인하였음(그림 25).

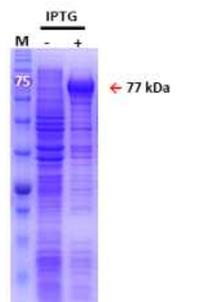


그림 25. E.coli에 도입된 Ap97 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과.

lane1: Protein marker, lane2 : uninduced culture, lane3 : induced cells

○ 재조합 단백질 발현 형태

- 발현된 단백질의 수용성(solubility) 여부를 확인하기 위하여, 세균 배양액을 원심분리하여 pellet만을 채취하여 PBS에 재부유한 후 다시 원심분리하여 상층액을 제거하였음. 세균 펠릿을 PBS에 재부유시킨 후, 다음의 조건에서 20s on / 30s off, 20 cycles 조건에서 세균을 초음파로 파쇄하였음. 파쇄된 세균액은 원심분리하여 상층액(SN, soluble part)과 pellet(IB, insoluble part)로 구분 되어짐. 그 결과 AP97 단백질이(77 kDa) insoluble형태로 발현된 것을 확인하였음 (그림 26).

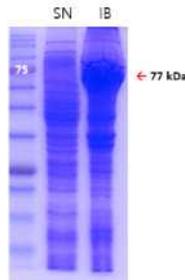


그림 26. Ap97 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과.

lane1: Protein marker, lane2 : SN, soluble part, lane3 : IB, insoluble part

○ 재조합 단백질 정제

- 대량 배양된 균체를 파쇄한 후 Ni-Affinity Chromatography column을 이용하여 재조합 단백질 Ap97을 정제하였음. Ap97 단백질은 insoluble 형태의 단백질로 발현되기 때문에, denaturing condition으로 정제하였음 (그림 27)

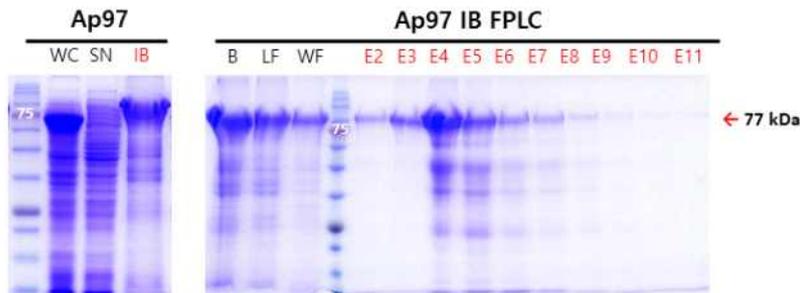


그림 27. Ap97 단백질 정제의 SDS-PAGE 분석.

WC: Whole cell, SN: Supernatant (Soluble protein), IB: Inclusion Body (Insoluble protein), B: Before (Soluble protein in PBS), LF: Loading fraction, WF: Wash fraction, E: Elution fraction

- 정제된 Ap97 단백질은 ultra-filtration system을 이용하여, 정제버퍼에서 PBS버퍼로 교체한 후, 최종적으로 0.2µm filter로 제균한 후, SDS-PAGE 및 BCA assay로 목적 단백질의 상태를 확인하였고, 정량하여 추후 실험에 사용하였음(그림 28).

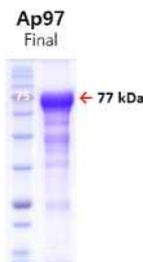


그림 28. Ap97 단백질 최종 정제 확인

5) 마이코플라즈마 OMP(Out Membrane Protein)항원 확보

- 마이코플라즈마 균체막은 한 겹의 세포막으로 구성되었고, 이 세포막에는 다양한 기능을 하는 많은

세포막 단백질(cell membrane protein)이 다수 존재하고 있음. 이 세포막 단백질들은 마이코플라즈마의 생화학적, 생리적인 기능에 필수적이기 때문에, 이 세포막 단백질을 백신항원으로 고려되고 있음. 세포막 단백질(OMP)은 매우 mild한 detergent인 nonionic detergent인 Triton X-100과 Triton X-114를 이용하여 추출하였고, 추출된 OMP는 SDS-PAGE로 확인하였음 (그림 29).

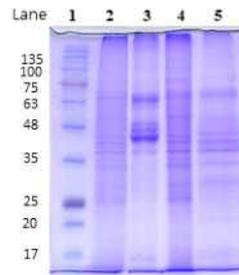


그림 29. Mycoplasma OMP 추출 SDS-PAGE 분석 결과.

lane1: Protein marker, lane2 : M.hyp J+Triton X-114, lane3 : Triton X-114추출 OMP, lane4 : M.hyp J+Triton X-100, lane5 : Triton X-100추출 OMP

2. Mycoplasma 항원의 면역원성 평가

1) 마이코플라즈마 분리주의 면역원성

○ 시험백신의 제조

- 마이코플라즈마 분리주 2종(MHP13, MHP19), 그리고 표준균주 (MHP-J)를 선택한 후, 증식배지에서 배양한 후 항원농도를 CCU방법으로 측정하였고, 포르말린을 이용하여 불활화시켰음. 준비된 불활화 항원을 1×10^7 CCU/dose로 조정 한 후, 2% Aluminum gel이 첨가된 시험백신을 제조한 후, 항원 효능평가에 사용하였음 (표 3).

표 3. 마이코플라즈마 백신 실험군 설정

백신 그룹	그룹	항원명	항원 농도 (ccu/dose)	접종두수 (마리)
백신 접종군	G1	MHP13	1×10^7	5
	G2	MHP19	1×10^7	5
	G3	MHP-J	1×10^7	5
대조군	G4	-	-	5

○ 마우스 면역원성 평가

- 4주령 마우스(ICR, female)를 그룹당 5마리로 할당하고, 시험백신을 2주 간격으로 2회 복강 경로로 접종하였음. 2차 백신 접종 2주차에 채혈하여 혈청을 준비한 후, 본 과제에서 제작한 In-house ELISA kit를 혈중 항체를 측정하였음. 대조군에서는 낮은 수준의 항체가 측정되었지만, 3개 마이코플라즈마 항원에 대한 항체는 높은 수준으로 그리고 거의 유사하게 측정되었음(그림 30).
- 이 결과를 바탕으로, 야외에서 분리한 2개 마이코플라즈마 균주를 백신 후보 균주로 선정하고, 분리주 MHP13번 균주를 최종 후보로 선정하여 향후 연구에 대표 균주로 사용하여 진행하였음.

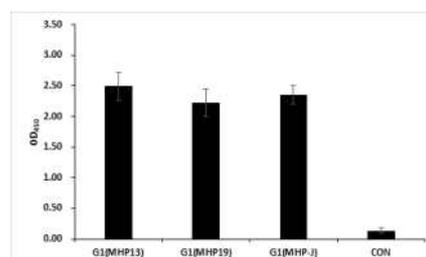


그림 30. 마우스에서 마이코플라즈마 백신의 면역원성 검증

2) Ap97 단백질 항원의 면역원성 평가

○ 시험백신의 제조

- 상기에서 확보한 재조합 Ap97 단백질의 면역원성 평가를 위하여, 재조합 단백질은 dose당 10 µg을 사용하였으며, 2% Aluminum gel을 Adjuvant로 첨가하여 시험백신을 제조하였음. 마우스는 ICR 4주령, female을 사용하였고, 그룹당 5마리의 마우스로 할당하였고, 면역물질을 2주 간격 2회 복강 접종한 후, 2차 접종 2주 뒤 채혈하여 혈청을 확보하였음(표 4).

표 4. Ap97 단백질 백신 실험군 설정

백신 그룹	그룹	항원명	항원 농도 (ug/dose)	접종두수 (마리)
백신 접종군	G1	Ap97	10	5
대조군	G2	-	-	5

○ 마우스 면역원성 평가

- 재조합 단백질 Ap97의 면역원성은 in-house ELISA kit를 사용하여 측정하였고, 무접종 대조군은 항체 유도가 없지만, 백신 접종군에서는 Ap97항원에 대한 높은 수주의 항체를 형성함에 따라, Ap97항원을 방어항원으로 사용 가능성을 확인하였음(그림 31).

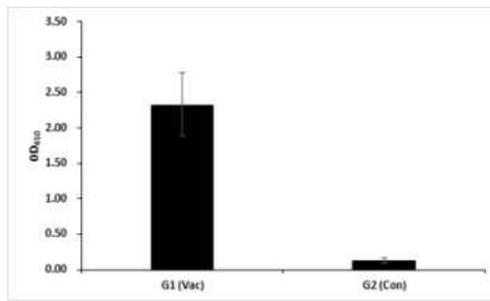


그림 31. 마우스에서 Ap97 단백질 백신의 면역원성 검증

3) 마이코플라즈마 백신의 항원 농도 결정 시험

○ 항원 농도 결정

- 상기에서 확보한 분리주(MHP13) 항원을 이용하여, 마우스에서 항원량 결정시험을 진행하였음. 항원의 준비는 마이코플라즈마 균주는 최적화 배지에서 배양한 후, CCU방법으로 항원량의 측정하고, 포르말린으로 불활화시켰음. 준비된 항원의 농도를 다르게 결정하고, 2% Aluminum gel을 Adjuvant로 사용하여 시험백신 4종을 제조하였음(표 5).

표 5. 마이코플라즈마 항원 농도 결정 시험군 설정

백신 그룹	그룹	항원명	항원 농도 (ccu/dose)	접종두수 (마리)
백신 접종군	G1	MHP13	1*10 ⁷	5
	G2	MHP13	5*10 ⁶	5
	G3	MHP13	2.5*10 ⁶	5
	G4	MHP13	1*10 ⁶	5
대조군	G5	-	-	5

○ 마우스 면역원성 평가

- 분리주 (MHP 13) 항원의 면역원성 평가시험을 위하여, 마우스(ICR 4주령, female)를 그룹당 5로 할당 한 후, 시험백신을 복강 경로로 접종한 후, 접종 2주, 4주차에 채혈하여 혈청을 확보하였고, 항체가 는 In-house ELISA kit을 사용하여 측정하였음. 무접종 대조군의 경우에는 낮은 항체가 수준을 보였지만, 백신접종군 중에서는 5×10^6 CCU/dose 시험군에서 유의미한 항체가 수준을 보였음(그림 32).
- 위 결과로 마이코플라즈마 균주의 항원 농도는 5×10^6 CCU/dose이상 함유하여야 된다고 판단됨. 향후 목적동물에서 효과적인 면역반응을 유도할 수 있는 항원량 결정 지표로 사용될 예정임.

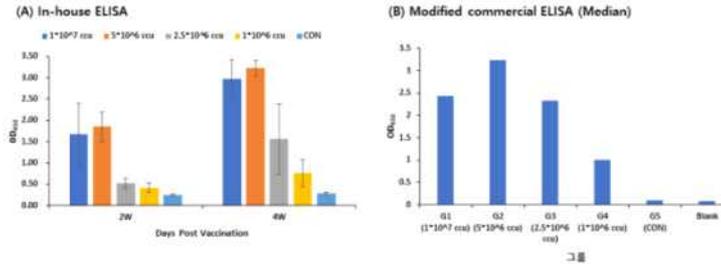


그림 32. 마우스에서 마이코플라즈마 항원 농도별 면역원성 검증

4) 마이코플라즈마 OMP 항원의 면역원성 평가

○ 백신 시험군

- 상기에서 추출한 마이코플라즈마 OMP 항원 4종과 균체(MHP-J) 항원을 대상으로, 마우스에서 면역원성 시험을 진행하였음. 항원의 준비는 마이코플라즈마 균주를 배양한 후, CCU방법으로 항원량을 측정하고, 포르말린 불활화시켰음. 준비된 항원을 25 μg/dose 농도, 그리고 adjuvant로 2% Aluminum gel 첨가하여 백신 시험군을 설정하였음(표 6).

표 6. 마이코플라즈마 백신 실험군 설정

백신 그룹	그룹	항원명	항원 농도 (ug/dose)	접종두수 (마리)
백신 접종군	G1	M.hyp J+Triton X-114	25 (1/100 dose)	3
	G2	Triton X-114추출 OMP		3
	G3	M.hyp J+Triton X-100		3
	G4	Triton X-100추출 OMP		3
	G5	MHP-J		3
대조군	G6	-	-	3
A사 백신	G7		1/10 dose (0.2 ml)	3

○ 마우스에서 면역원성 평가

- 마우스(ICR 4주령, female)를 그룹당 3마리로 할당하였고, 시험물질을 2주 간격 2회 복강 접종하였고, 2차 접종 2주 뒤 채혈하여 혈청을 확보하였음, 혈중 항체가 Modified commercial ELISA 3종을 사용하여 측정하였고, 그 결과는 아래와 같음(그림 33).
- MHP OMP 항원을 포함하지 않은 G6 대조군과 다르게, 백신접종군에서는 접종 후 2, 4주차 모두 높은 항체가 수준을 형성하였음. 백신접종군 G3, G4의 항체가 는 양성 대조군인 G5(MHP-J) 보다는 더 높은 수치를 보였고, 이는 상용백신 A제품 (G7) 접종군과 유사한 수준이었음. 하지만, 상용백신 A제품에서 상대적으로 많은 항원량이 포함되었고, 이를 고려한다면 마이코플라즈마 OMP항원도 충분한 수준의 면역유도능 을 갖은 것으로 판단됨.

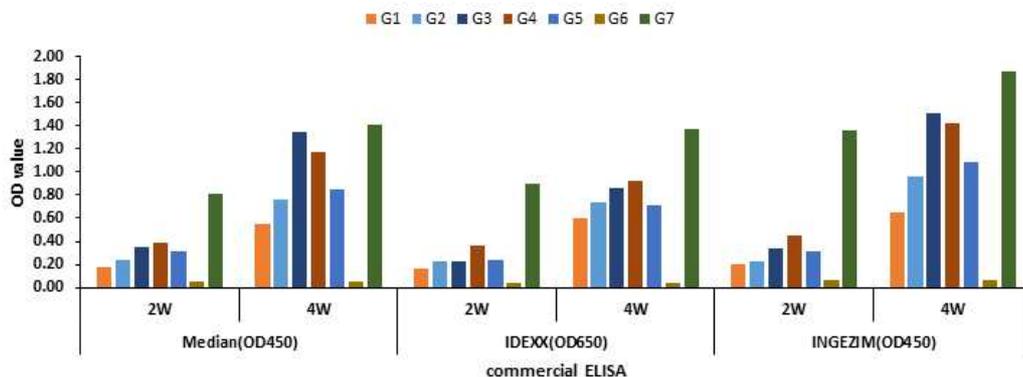


그림 33. 마우스에서 마이코플라즈마 백신의 면역원성 검증

3. 피내접종용 신규 어쥬번트의 선발

1) 신규 어쥬번트의 선발 및 평가(1차)

○ 시험군의 설정

- 동물용백신은 통상적으로 목적동물에 근육접종 경로로 접종하여 면역반응을 유도하지만, 피내 접종 경로로 백신을 접종할 경우에는 근육으로 접종된 항원을 처리하는 체내의 면역기전과 차이로 인하여 상이한 면역반응을 유도할 수 있음. 이러한 이유로, 피내 경로로 접종하는 항원에 대하여 적합한 면역반응을 유도할 수 있는 새로운 adjuvant를 선별할 필요가 있음. 따라서, 면역반응을 유도할 수 있는 최소 항원량이 포함되지만, 다양한 adjuvant 후보물질을 함유된 시험물질을 제작한 후, 각 시험물질 조성에 따른 항체 형성능을 평가하였음(표 7).

표 7. Adjuvant 조성에 따른 시험군 설정.

시험군	어쥬번트	마이코플라즈마 항원
G1	A	5*10 ⁵ ccu/dose
G2	A+D+E	
G3	A+G	
G4	B	
G5	B+D+E	
G6	B+D+F	
G7	C	
G8	C+D+E	
G9	C+D+F	
G10	없음	없음

참고: 상기에서 사용한 각각의 물질명은 지적재산권 보호차원에서 비공개 함.

○ 마우스에서 면역원성 평가

- 각기 다른 어쥬번트 조성이 포함되었지만, 동일한 항원량 50 μl/dose이 포함된 시험백신을 제조한 후, 실험동물에 피내 접종한 후, 1, 2, 3, 4, 6주 차에 채혈하여 혈청을 확보하였음. 시험백신에 포함된 것과 동일한 항원으로 ELISA 플레이트에 코팅하여 제작된 In-house ELISA 를 사용하여 각 시험백신 접종으로 유도된 항체가를 평가하였음.
- 모든 백신 접종군에서 시간이 지날수록 항체가가 높아지는 경향성을 보였고, 그 중에서도 W/O/W(Water-in-Oil-in-Water)계열의 어쥬번트에 물질 B와 세포성면역 및 체액성면역 증강에 사용되는 물질 F를 혼합하여 사용한 그룹인 G6 시험군이 다른 그룹에 비하여 비교적 높은 항체가가 유도하였음. 항체가 수준은 G4, G5, G6 순으로 높아졌지만, 표준편차가 작을 뿐만 아니라, 세포성면역과 체액성면역을 동시에 유도하는 물질이 함유된 G5에 포함된 물질을 본 어쥬번트 조성으로 선정하였음(그림 34).

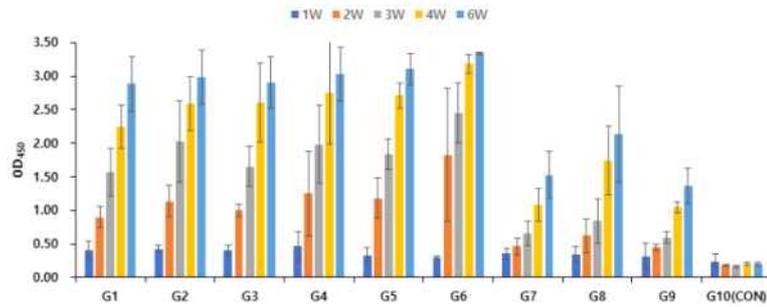


그림 34. Adjuvant 조성에 따른 항체가 비교

2) 피내접종용 신규 어쥬번트의 선발 및 평가(2차)

○ 시험군의 설정

- 어쥬번트 후보물질을 추가로 확보하였고, 양성대조군으로 마이코플라즈마 항원으로 포함하는 상용 ID 용 제품을 선정하여, 2차 어쥬번트 비교평가시험을 진행하였음. 동일한 항원량에 추가로 선발된 후보물질이 첨가된 시험백신을 제조한 후, 상기에서 기술한 것과 동일한 방법으로 마우스에서 시험물질의 면역원성을 비교 평가함(표 8).

표 8. Adjuvant 조성에 따른 시험군 설정.

시험군	어쥬번트	마이코플라즈마 항원
G1	H	5×10 ⁵ ccu/dose
G2	H+D+F	
G3	B	
G4	B+D+F	
G5	I	
G6	I+D+F	
G7	A사 ID 제품	-
G	없음	없음

참고: 상기에서 사용한 각각의 물질명은 지적재산권 보호차원에서 비공개 함.

○ 마우스에서 면역원성 평가

- 다른 어쥬번트 조성이 포함된 시험백신을 50 μl/dose 용량으로, 마이코플라즈마 항원을 포함한 상용백신 제품의 경우에는 돼지 접종량의 1/10dose (20 μl) 용량으로 실험동물에 피내 접종하였음. 백신 접종 후 1, 2, 3, 4, 6주차에 채혈하여 혈청을 확보하였고, 상기와 동일한 방법으로 ELISA항체가를 측정하였음 (그림 35).
- 모든 백신접종군의 항체가는 시간이 지날수록 항체가가 증가가 확인되었고, 1차 실험에서 선정되었던, G4 시험군에서 가장 높은 항체가를 나타내었음. 또한 ID 상용제품보다도 높은 항체가가 확인되었고, 향후 G4의 백신 조성비는 PCV/Mycoplasma 복합백신에 적용할 수 있을 것으로 판단됨.

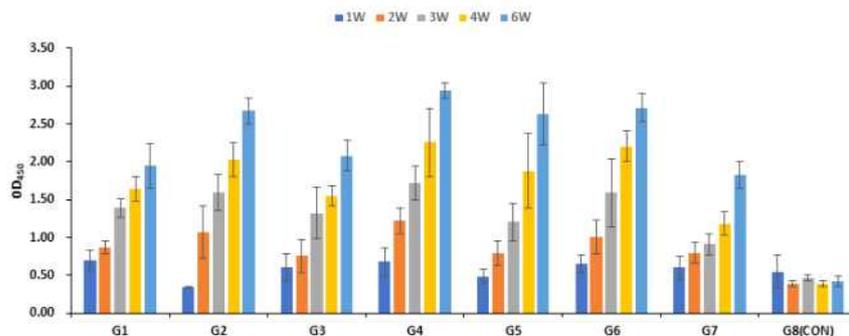


그림 35. Adjuvant 조성에 따른 항체가 비교

□ 3차년도 연구개발 과제 수행 : 공동연구기관1 (주)고려비엔피

기관명	3차 연도 개발 목표 (2023.01.01 ~ 2023.12.31)
공동연구기관1: (주)고려비엔피	<ul style="list-style-type: none"> • 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 시제품 제작 • 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 시제품의 유효성 평가 • 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 시제품의 임상시험계획서 작성 및 제출 • (농림축산검역본부로부터 임상시험 허가를 받을 경우) 농장적용시험 준비

1. Mycoplasmas 항원을 포함하는 피내 접종용 백신 시제품 제작 및 유효성 평가

1) 시제품 제작 및 유효성 평가

○ 목적동물에서 마이코플라즈마 OMP 항원의 면역원성 평가(근육접종)

- 마이코플라즈마 OMP 항원과 2% Aluminum gel을 Adjuvant로 사용하여 시험백신을 제조한 후, 자돈에서 면역원성 평가시험을 다음과 같이 진행하였음. 시험백신을 3주령 자돈의 이근부에 2mL을 근육 접종하였고, 대조군에는 동량의 PBS를 접종하였음. 마이코플라즈마 OMP 항원에 대한 항체가는 상용제품 VPro MH AB ELISIA kit(MEDIAN DIAGNOSTICS)과 in-house ELISA kit를 사용하였음.
- 상용 ELISA를 사용하여 항체가를 측정 한 결과, 자돈의 모체이행항체가는 약한 양성 또는 의양성 수준이었고, 무접종 대조군의 항체가는 일령이 증가함에 따라 모체이행항체가가 소실되는 경향을 보였음. 하지만, 백신접종군의 경우에는 백신 접종 후 2주 후부터는 유의미한 항체가 증가가 관찰되었음 (그림 36, A). 이 항체가의 경향성은 In-house ELISA로 측정 한 결과에서도 유사하게 관찰되었음 (그림 36, B). 이 결과는, 마이코플라즈마 OMP 항원은 목적동물(자돈)에서 백신 항원으로서 가치가 있음이 확인되었고, 마이코플라즈마 백신제조 항원으로 사용할 예정임.

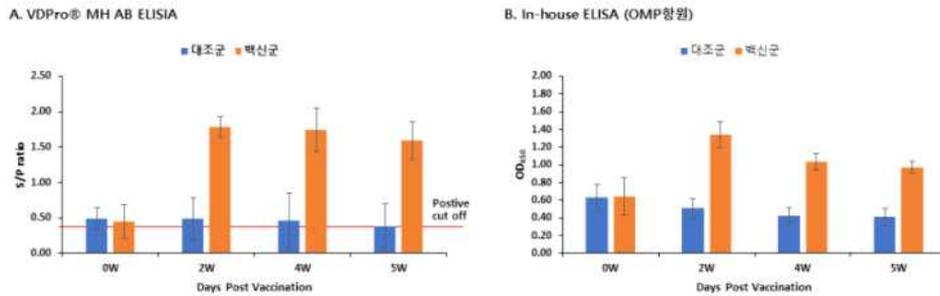


그림 36. 시판되는 ELISA 및 In-house ELISA를 사용하여 항체가 측정 결과

2. PCV2/Mycoplasma 피내 접종용 시제품 제작 및 면역원성 평가

1) 목적동물을 이용한 면역원성평가 및 조성비 결정

○ 백신 시제품의 조성

- 1차, 2차년도의 연구결과를 바탕으로 각각 적량의 PCV2 항원, Mycoplasma항원, 그리고 피내 접종용 신규 adjuvant를 혼합하여 3가지 농도의 백신 시제품을 제작하였음. 백신 시제품은 제품의 안전성,안정성,그리고 면역원성 평가에 사용하였음 (표 9).

표 9. 백신 시제품의 항원함량 및 실험 설계

구 분	시험백신 항원	항원 함량/dose	공시 두수	백신 접종
G1	PCV2d-ORF2 + <i>M. hyopneumoniae</i>	100 μ g	5	0.5mL/두, 피내 주사
		2 \times 10 ⁷ CCU		
G2	PCV2d-ORF2 + <i>M. hyopneumoniae</i>	200 μ g	5	
		2 \times 10 ⁸ CCU		
G3	PCV2d-ORF2 + <i>M. hyopneumoniae</i>	300 μ g	5	
		1 \times 10 ⁹ CCU		
G4	음성대조군	-	5	-

○ 목적동물(자돈)에서 면역원성 평가

- 상기 제조된 백신 시제품을 3주령 자돈의 이근부에 무침주사기를 이용하여 0.5mL 피내 접종하였고, 대조군에는 동량의 PBS를 동일한 방법으로 접종하였음. PCV2와 Mycoplasma에 대한 혈중 항체가는 상용 ELISA kit과 In-house ELISA kit을 사용하여 측정하였음.
- PCV에 대한 항체가는 대조군의 경우는 모체이행항체가 소실되는 경향을 보였지만, 백신접종군은 항원 접종 농도별로 유의미한 증가가 관찰되었음 (표 10).

표 10. PCV2 ELISA 항체가 분석 결과

구분	백신 항원농도	ELISA 항체가 ¹⁾	
		0 dpv	21 dpv
G1	100µg	0.29±0.13	0.71±0.15**
G2	200µg	0.34±0.08	1.16±0.21**
G3	300µg	0.33±0.09	1.35±0.25***
G4	-	0.43±0.07	0.23±0.07

1) in-house ELISA OD 측정값 (0.4 이상 양성)

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

- Mycoplasma항원에 대한 항체가 측정 결과, 대조군의 경우에 모체이행항체가 소실 경향을 보이지만, 백신접종군의 경우에는 백신 접종후 3주에 항원 농도별로 유의미한 항체 증가가 관찰되었음 (표 11).

표 11. Mycoplasma ELISA 항체가 분석 결과

구분	백신 항원농도	ELISA 항체가 ¹⁾	
		0 dpv	21 dpv
G1	2×10 ⁷ CCU	0.21±0.15	0.39±0.08**
G2	2×10 ⁸ CCU	0.14±0.03	0.63±0.12***
G3	1×10 ⁹ CCU	0.16±0.09	0.67±0.10***
G4	-	0.22±0.15	0.21±0.12

1) Mycoplasma 상용화 ELISA OD 측정값 (0.4 이상 양성)

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

2) 목적동물에서 방어능 평가

○ 시험군 설정

- 상기에서 제조된 시험백신을 3주령 자돈의 이근부에 무침주사기를 이용하여 0.5mL을 피내 접종하였고, 대조군에는 동량의 PBS를 동일한 방법으로 접종하였음 (표12). 충분한 면역에 형성된 시점에 PCV2 또는 Mycoplasma 균주를 공격접종한 후, 항체가 변화, 증체량, 공격접종 병원체의 분리율, 부검소견 그리고 조직병변 등을 각 시험군별로 비교 평가하였음. 항체가 평가는 상용 ELISA kit 또는 In-house ELISA kit를 사용하였음. 혈액, 조직 등의 시료에서 항원량(PCV2, Mycoplasma)은 Real-time PCR 방법으로 정량적으로 평가하였음. 병리조직학적 평가는 외부기관에 의뢰하여 진행하였음.

표 12. 백신 시제품의 유효성 시험군 설정

구분	시험백신 항원	항원 함량/dose	공시 두수	백신 접종	공격 접종		
					항원	공시두수	
G1	PCV2d-ORF2 + <i>M. hyopneumoniae</i>	100µg	10	0.5mL/두, 피내 주사	PCV2d+PRRSV	5	
		2×10 ⁷ CCU			<i>M. hyopneumoniae</i>	5	
G2	PCV2d-ORF2 + <i>M. hyopneumoniae</i>	200µg	10		PCV2d+PRRSV	5	
		2×10 ⁸ CCU			<i>M. hyopneumoniae</i>	5	
G3	PCV2d-ORF2 + <i>M. hyopneumoniae</i>	300µg	10		PCV2d+PRRSV	5	
		1×10 ⁹ CCU			<i>M. hyopneumoniae</i>	5	
G4	양성대조군	-	10		-	PCV2d+PRRSV	5
		-			-	<i>M. hyopneumoniae</i>	5
G5	음성대조군	-	5		-	-	-

○ 임상증상 (clinical signs)

- PCV 경우에는, 3주령 자돈에 백신 시제품을 접종 3주 후에 PCV2d와 PRRSV를 동시에 공격접종한 후 3주간 임상증상을 관찰하면서, 백신 접종군과 비백신 접종군 간의 일당 증체량을 비교하였음. 백신 접종군(G1~G3)은 백신에 포함된 항원량에 따라 증체량 수준이 약간 차이를 보였고, 특히 G2와 G3시험군은 비백신 접종군(G4)와 비교하여 유의적인 일당증체량의 차이를 보였음 (P<0.01)(그림 37).

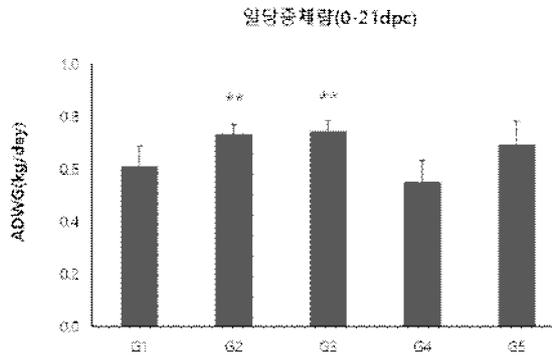


그림 37. PCV2 공격접종 자돈의 일당증체량(ADWG) 확인

- Mycoplasma의 경우에는, 백신 접종 3주 후에 병원성 Mycoplasma 분리주로 공격접종한 후 4주간 임상증상을 관찰하였음. 공격접종 후 4주간 일당증체량을 비교한 결과, 백신 접종군(G1~G3)은 비백신 접종군(G4)와 유의적인 증체량 차이를 보였음(P<0.001)(그림 38).

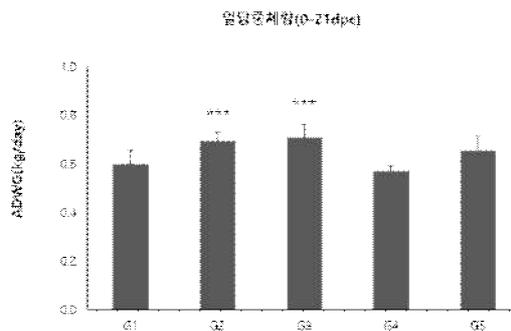


그림 38. 마이코플라즈마 공격접종 자돈의 일당증체량(ADWG) 확인

○ 혈청학적 분석(serological analysis)

- 혈중 PCV2 항체가 분석 결과에 따르면, 음성대조군(G5)은 모체이행항체는 시간이 경과되면서 소실되지만, 양성대조군(G4, 비백신 시험군에 공격접종 실시)은 공격접종 2주부터 항체가 증가 경향을 보였음. 하지만, 백신접종군(G1~G3)에서는 혈중 항체는 백신 항원 농도 의존적이고, 시간이 경과함에 따라 항체가 수준이 증가하는 경향을 보였음 (표 13).

표 13. PCV2 ELISA 항체가 결과

구분	백신	공격접종	ELISA 항체가 ¹⁾

	항원농도	항원	0dpc	7dpc	14dpc	21dpc
G1	100 μ g	PCV2d +PRRSV	0.71 \pm 0.15**	1.09 \pm 0.14***	1.49 \pm 0.15**	1.93 \pm 0.21
G2	200 μ g		1.16 \pm 0.21**	1.51 \pm 0.22***	1.89 \pm 0.18**	2.21 \pm 0.16
G3	300 μ g		1.35 \pm 0.25***	1.67 \pm 0.28***	1.96 \pm 0.19***	2.26 \pm 0.21
G4	-		0.23 \pm 0.06	0.22 \pm 0.12	0.64 \pm 0.29	1.91 \pm 0.31
G5	-	무접종	0.23 \pm 0.07	0.13 \pm 0.03	0.22 \pm 0.12	0.20 \pm 0.14

1) in-house ELISA OD 측정값 (0.4 이상 양성)

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

- 혈중 Mycoplasma 항체가 분석 결과에 따르면, 음성대조군(G5)의 경우에 항체가 소실 경향을 보이지만, 양성대조군(G4)의 경우에 공격 접종 1주부터 항체 증가가 관찰되며, 백신접종군(G1~G3)의 경우에 공격 접종 전(0dpc) 항원 농도 의존적으로 항체 수준을 나타내었으며, 공격 접종 후 지속적인 항체 증가가 관찰되었음 (표 14).

표 14. Mycoplasma ELISA 항체가 결과

구분	백신 항원농도	공격접종 항원	ELISA 항체가 ¹⁾			
			0dpc	7dpc	14dpc	28dpc
G1	2 \times 10 ⁷ CCU	<i>M. hyo</i>	0.39 \pm 0.08**	0.67 \pm 0.16**	0.88 \pm 0.24**	1.48 \pm 0.22***
G2	2 \times 10 ⁸ CCU		0.63 \pm 0.12***	0.86 \pm 0.17***	1.11 \pm 0.16***	1.68 \pm 0.19***
G3	1 \times 10 ⁹ CCU		0.67 \pm 0.10***	0.93 \pm 0.11***	1.21 \pm 0.16***	1.75 \pm 0.20***
G4	-		0.16 \pm 0.05	0.23 \pm 0.09	0.36 \pm 0.08	0.79 \pm 0.16
G5	-	무접종	0.21 \pm 0.12	0.19 \pm 0.13	0.16 \pm 0.09	0.11 \pm 0.03

○ 항원검사 (viremia/viral load/bacterial load)

- PCV2d를 공격접종 3주 후 부검을 통하여 viremia 수준을 평가한 결과, 양성대조군(G4)에서는 많은 양의 바이러스 항원이 검출되었지만, 백신 접종군(G2~G3)에서는 항원이 거의 검출되지 않았음(p<0.05)(표 15). 폐, 편도, 서혜림프절의 조직에서 항원 검출은 양성대조군에 비하여 백신접종군에서 현저히 감소하는 경향을 보였음. 특히, 조직 내 바이러스 항원 검출은 시험백신에 포함된 항원량과 비례적으로 감소하는 경향을 보였음 (p<0.001)(표 15).

표 15. PCV2의 viremia 및 viral load 결과

구분	항원 농도	공격접종	PCV2			
			Viremia (copy #/mL, log ₁₀)	Viral load(Copy #/200ng total DNA, log ₁₀)		
				폐	편도	서혜림프절
G1	100 μ g	PCV2d +PRRSV	1.69 \pm 0.27	1.51 \pm 0.33*	1.47 \pm 0.44***	1.38 \pm 0.45***
G2	200 μ g		0.94 \pm 0.24*	0.95 \pm 0.24*	1.10 \pm 0.25***	1.03 \pm 0.28***
G3	300 μ g		0.66 \pm 0.11*	0.78 \pm 0.34*	0.98 \pm 0.27***	0.76 \pm 0.32***
G4	-		3.28 \pm 0.29	3.27 \pm 0.29	3.75 \pm 0.48	3.60 \pm 0.49
G5	-		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

- 마이코플라즈마를 공격접종 4주 후 부검을 통하여 개체별로 비강 샘플에서 마이코플라즈마 항원 검사를 실시한 결과, 백신접종군 (G1~G3)의 경우에는 양성대조군(G4) 대비 약 27~42% 수준으로 감소하는 경향을 보였는데, 이는 통계학적 유의적인 차이로 확인되었음(p<0.05)(표 16). 폐문림프절 조직, BALF(bronchoalveolar lavage fluid) 샘플에서 마이코플라즈마 항원 검사를 실시한 결과, 백신접종군(G1~G3)에서 양성대조군(G4)에 대비하여 폐문림프절 조직의 경우 약 27%~43%, BALF 샘플의 경우 30%~41% 수준으로 감소하였음. 조직내에서 검출되는 항원량은 백신제품에 포함된 항원량과 비례적으로 감소하였고, 통계학적으로 유의적인 차

이가 확인되었음($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)(표 16).

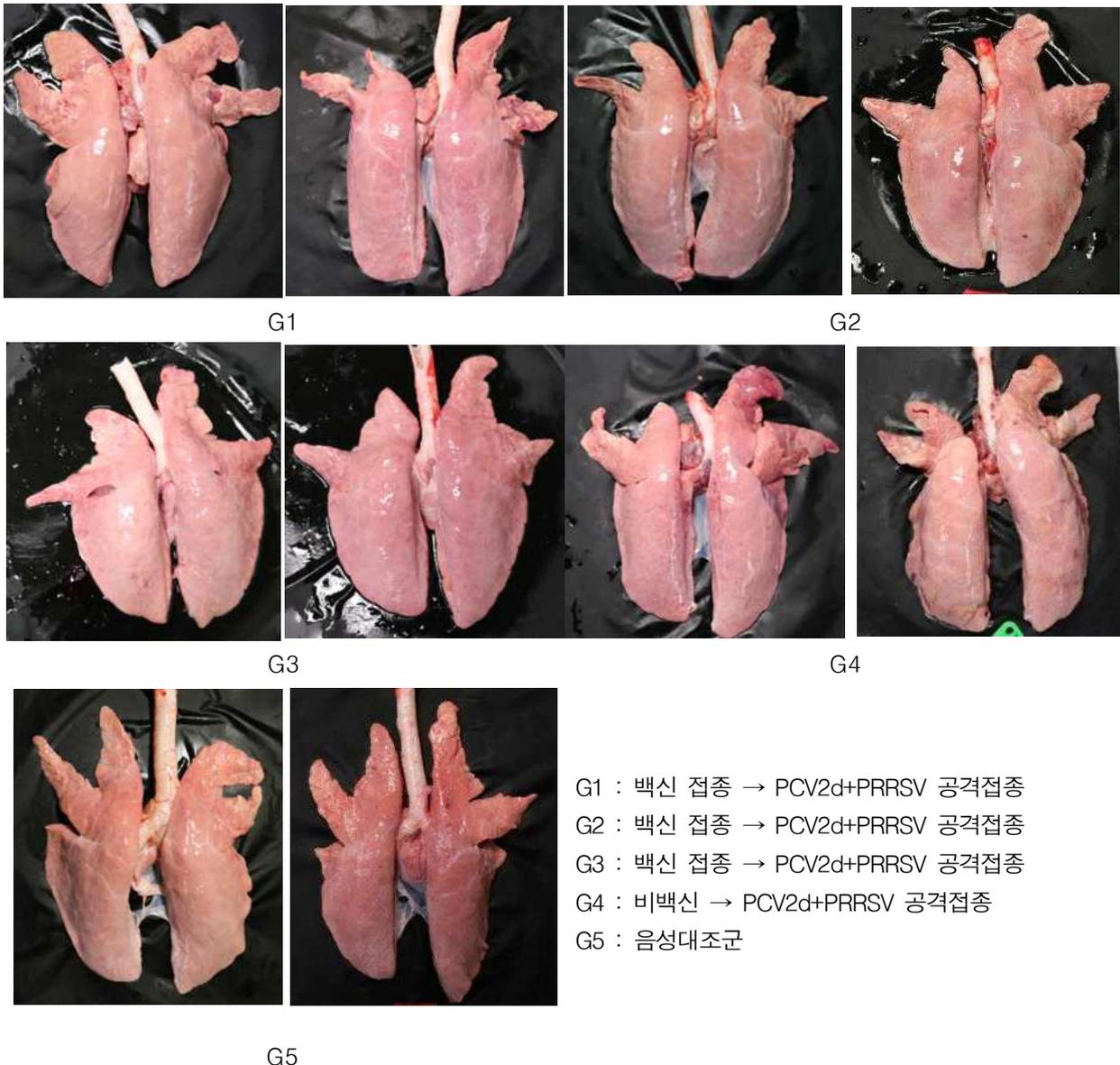
표 16. *M. hyopneumoniae*의 조직 내 항원 정량 결과

구분	항원농도	공격접종	<i>M. hyopneumoniae</i>		
			nasal swab (copy #/mL, log ₁₀)	bacterial load(Copy #/200ng total DNA, log ₁₀)	
				폐문림프절	BALF
G1	2×10 ⁷ CCU	<i>M. hyo</i>	2.25±0.24*	2.46±0.27*	2.52±0.38**
G2	2×10 ⁸ CCU		2.07±0.30*	1.96±0.13*	2.13±0.33***
G3	1×10 ⁸ CCU		2.01±0.26*	1.92±0.22*	2.11±0.31***
G4	-		3.47±0.42	3.37±0.31	3.58±0.31
G5	-	무접종	0±0	0±0	0±0

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

○ 육안소견(Macroscopic lesions)

- PCV2를 공격접종한 자돈의 부검 소견 결과, 음성대조군(G5)은 특이 폐병변이 없었지만, 양성대조군(G5, 비백신 공격접종군)에서는 침엽, 심엽, 그리고 횡격막엽에서 PCV2 감염 병변이 관찰되었음. 시험군 G1의 경우에 침엽과 심엽에서 낮은 수준의 병변이 관찰되었으나, 시험군 G2와 G3에서는 폐병변이 거의 관찰되지 않았음(그림 39). 이 결과에 따르면, 시제품 G2(PCV2항원 200 μg 함유) 백신은 목적동물에서 PCV2 감염을 충분히 예방할 수 있음이 확인되었음.



G1 : 백신 접종 → PCV2d+PRRSV 공격접종
 G2 : 백신 접종 → PCV2d+PRRSV 공격접종
 G3 : 백신 접종 → PCV2d+PRRSV 공격접종
 G4 : 비백신 → PCV2d+PRRSV 공격접종
 G5 : 음성대조군

그림 39. PCV2 공격접종 자돈의 폐병변 사진

- 마이코플라즈마를 공격 접종한 자돈 부검결과에 따르면, 음성대조군(G5)은 병변이 없었지만, 양성대조군(G4,

비백신 공격접종군)에서는 폐의 침엽, 심엽에 마이코플라즈마 감염 시 보이는 특이적인 병변이 관찰되었음. 백신군 G1에서 주로 심엽에서 병변이 관찰되나, 백신군 G2와 G3에서는 병변이 미약하거나 거의 관찰되지 않음(그림 40).

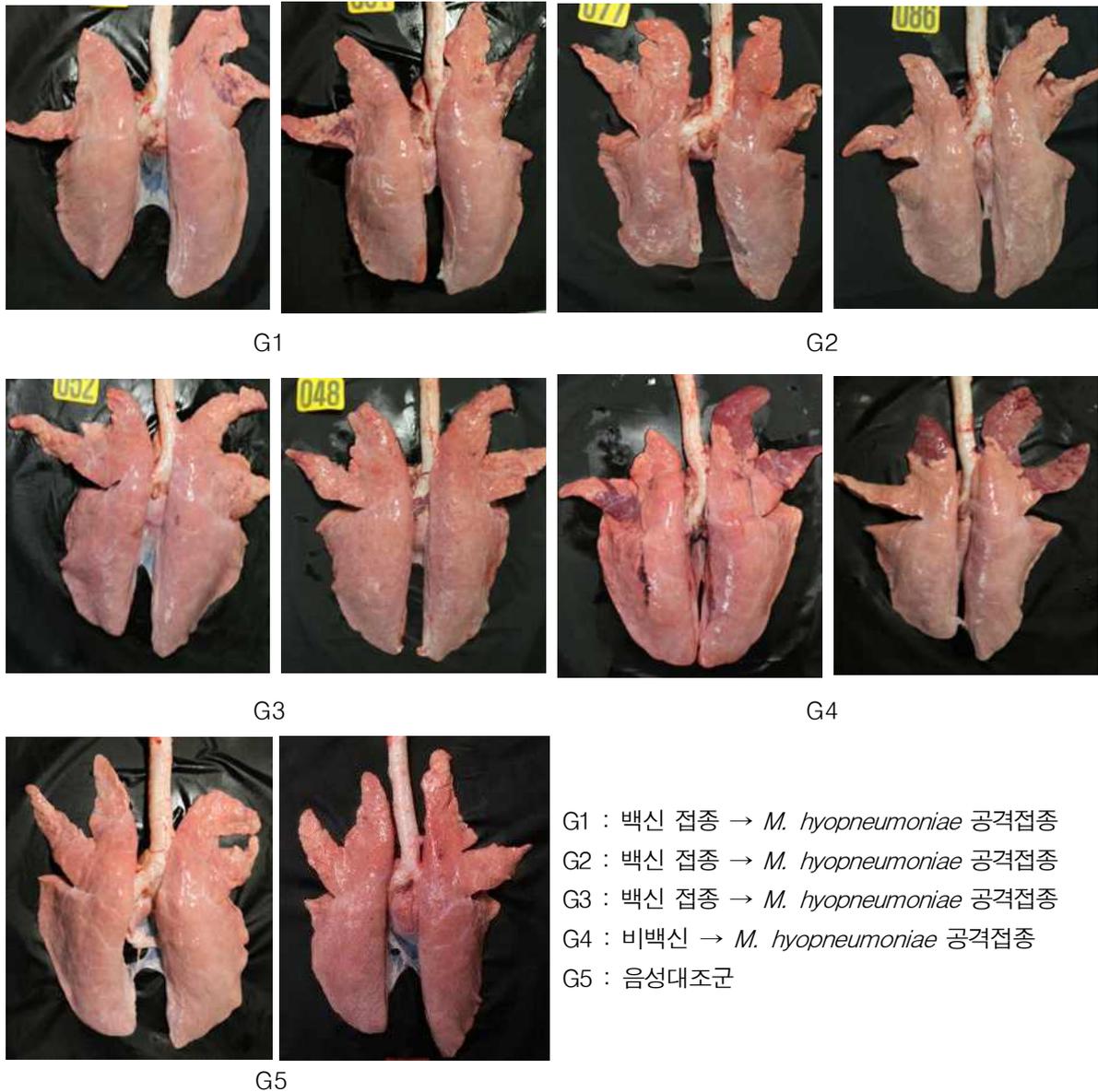


그림 40. Mycoplasma 공격접종 자돈의 폐병변 사진

- PCV/Mycoplasma 복합백신을 접종한 후 PCV2d 또는 마이코플라즈마주로 공격접종한 다음 3주 또는 4주차에 부검하였음. 부검 시 폐병변 지수를 평가한 결과, 양성대조군(G4)에 비하여 백신접종군(G2, G3)에서 폐병변 지수가 통계학적으로 유의성 있는 수준까지 감소하였음 ($p < 0.01$)(그림 41). 이 결과는 목적동물에서 피내접종용 백신으로서 충분한 효과가 있음이 확인되었음.

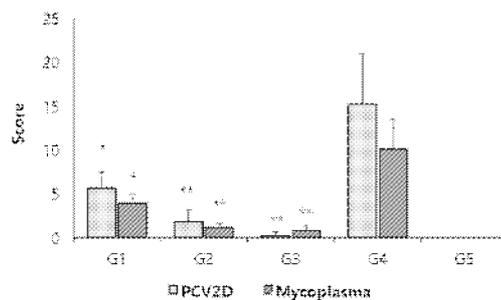


그림 41. 공격접종 자돈의 폐 부검소견

○ 조직병변(Histopathological analysis)

- 자돈에 시험백신을 접종한 후 3주차에 PCV2d주로 공격접종하였고, 공격접종 3주 후에 부검을 실시하였음. 부검 시 폐조직 병변을 평가하기 위하여, 수집된 각 시험군의 가검물은 외부기관에 의뢰하여 H&E 염색 및 병리조직학적 평가를 수행하였음. 음성대조군(G5)의 경우에 병변이 나타나지 않았지만, 양성대조군(G4)에서는 간질성 폐렴 병변이 관찰되었음. 백신접종군(G1~G3)의 경우에 미약한 간질성 폐렴 또는 림파구 침윤이 관찰되었음 (그림 42).

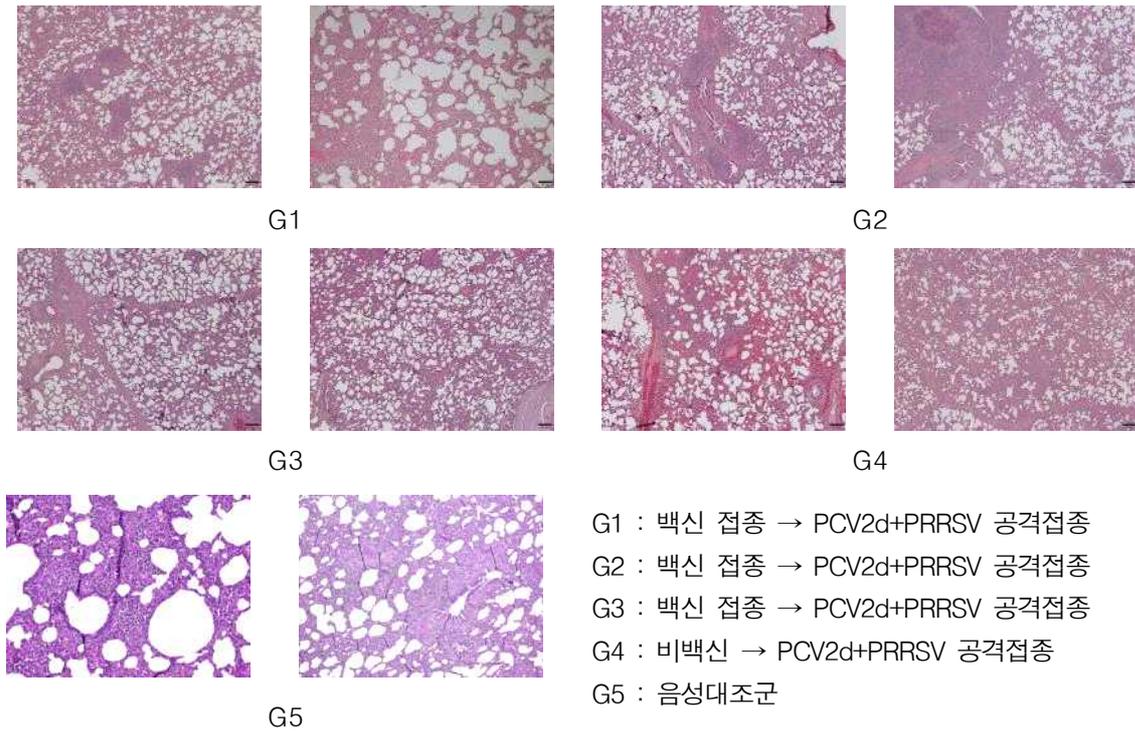


그림 42. PCV2 공격접종 자돈의 폐조직 사진

- 자돈에 시험백신을 접종한 후 3 주차에 마이코플라스마를 공격접종하였고, 공격접종 후 4주 후에 부검을 실시하였음. 부검 시 채취한 폐조직 병변 결과에 따르면, 음성대조군(G5)은 특이 소견이 보이지 않았지만, 양성대조군(G4)은 세기관지 폐렴, 림파구 침윤 등의 병변이 관찰되었음. 백신접종군의 경우에는 마이코플라스마성 폐렴 증상이 경미하게 관찰되었음(그림 43).

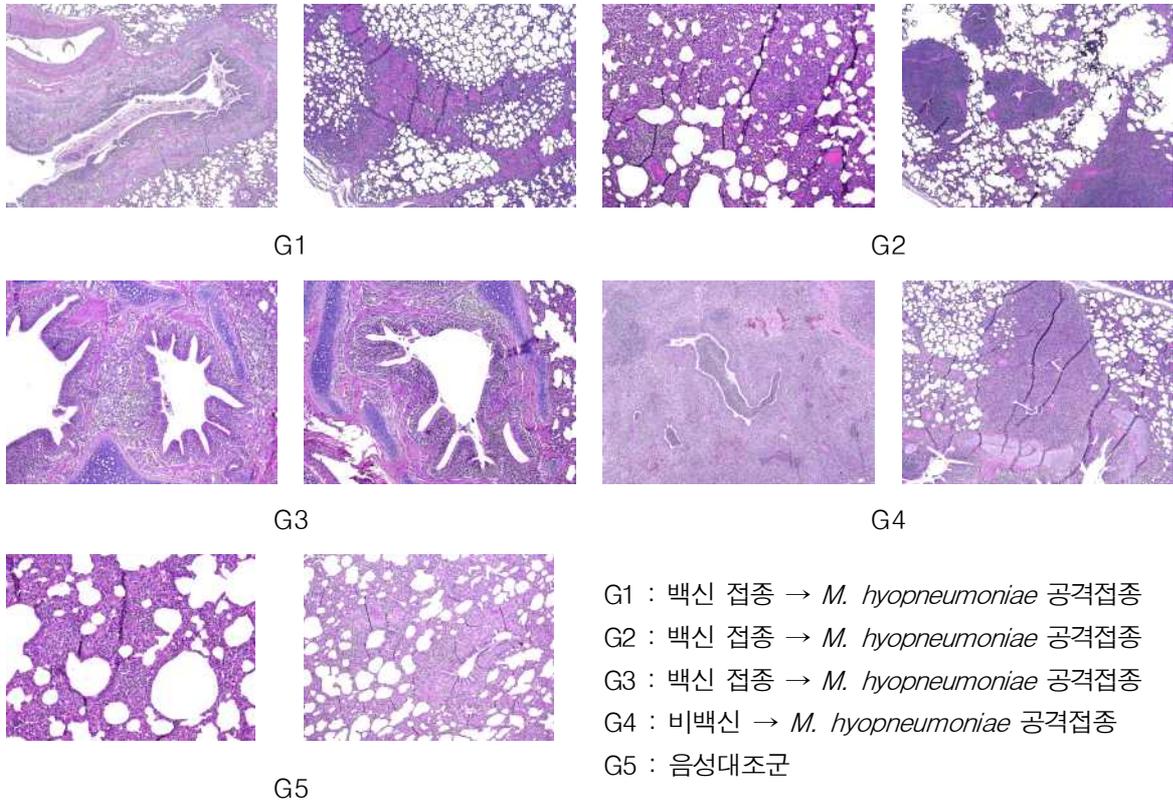


그림 43. Mycoplasma 공격접종 자돈의 폐조직 사진

- 백신을 접종한 자돈에 공격접종을 실시하고, 공격접종 3주 또는 4주에 부검 시 육안적 병변평가결과에 따르면, 양성대조군(G4)에 비하여 백신접종군(G2, G3)에서는 폐병변지수가 통계학적으로 유의성 있게 감소하였음($p < 0.1$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)(그림 44).

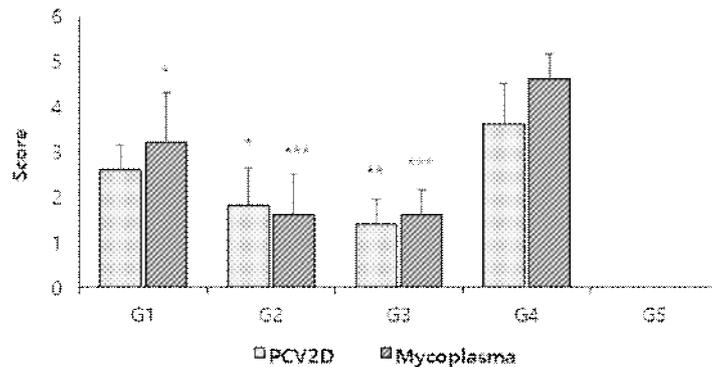


그림 44. 공격접종 자돈의 폐 조직병변지수

○ 결론

- 백신 시제품의 유효성 평가결과를 종합하면, 피내 접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신의 항원 조성은 PCV2 200ug/dose와 Mycoplasma 2×10^8 CCU/dose으로 결정하였음.

3) 항원의 안정성 평가

- 상기에서 제조된 시험 항원인 마이코플라즈마 균체, PCV 단백질 항원을 냉장, 상온에 보관 후 12개월 동안 항원의 안정성을 평가하였음. 그 결과 냉장에 보관된 2가지 항원 모두 이상이 없는 것으로 나타났지만, 상온 보관에서는 3개월 후부터 항원 변성이 확인되었음(표 17).

표 17. 마이코플라즈마 및 PCV 백신 제조용 항원의 안정성 평가

보관 기간	보관 상태	PCV	마이코플라즈마
0개월	냉장	이상없음	이상없음
	상온	이상없음	이상없음
3개월	냉장	이상없음	이상없음
	상온	변성	변성
6개월	냉장	이상없음	이상없음
	상온	변성	변성
9개월	냉장	이상없음	이상없음
	상온	변성	변성
12개월	냉장	이상없음	이상없음
	상온	변성	변성

4) 시제품의 안정성, 안전성, 유효성 평가

- 상기의 백신조성비 결정시험을 통하여 확립된 결과에 따라, 임상시험용 시제품 3 batch를 제조하고 이 시제품은 백신의 안정성, 안전성, 유효성 평가에 사용함.
- 백신시제품 “힘백 돈호방 써코2D+M ID 주” 3 Lot (C2DM 01, C2DM 02, C2DM 03)를 공시하였음(표 18).

표 18. 힘백 돈호방 써코2D+M ID 주 시제품 조성

Lot No.	성분	벌크 함량 (%) ¹⁾	사용량(mL)	제조당시 titer (/dose)	생산수량
C2DM 01	PCV2d ORF2 단백질	36	540	220 μ g	122병
	<i>M. hyopneumoniae</i>	14	210 ²⁾	2 \times 10 ⁸ CCU	
	adjuvant	50	750	-	
C2DM 02	PCV2d ORF2 단백질	39	590	220 μ g	123병
	<i>M. hyopneumoniae</i>	11	165	2 \times 10 ⁸ CCU	
	adjuvant	50	750	-	
C2DM 03	PCV2d ORF2 단백질	39	580	220 μ g	123병
	<i>M. hyopneumoniae</i>	11	165	2 \times 10 ⁸ CCU	
	adjuvant	50	750	-	

- 동물용의약품의 안정성 평가는 시제품을 제조한 후, 적절한 환경에 보관하면서 제조 당시, 제조 후 3, 6, 9, 12, 16, 18, 24개월 동안 제품의 성상 변화, 동물시험을 통한 제품 안전성, 그리고 유효성 평가를 실시해야 함. 현재까지 제조 후 6개월까지 안정성, 안전성, 유효성이 확인되었고, 정해진 일정에 따라 평가시험을 진행 중임 (표 19).

표 19. 백신 시험품 3 Lot의 안전성 평가 결과

보관 기간	검사 항목	결과
제조당시	특성시험	통과
	수소이온농도시험	통과
	무균시험	통과
	혈청역가시험	PCV
마이코플라즈마		-
3개월	특성시험	통과
	수소이온농도시험	통과
	무균시험	통과
	혈청역가시험	PCV
마이코플라즈마		-
6개월	특성시험	통과
	수소이온농도시험	통과
	무균시험	통과
	혈청역가시험	PCV
마이코플라즈마		-
9개월	특성시험	진행중
	수소이온농도시험	진행중
	무균시험	진행중
	혈청역가시험	PCV
마이코플라즈마		진행중

- 안전성 평가는 시제품 3 Lot를 제조한 후, 동물용의약품 국가검정기준에 따라 동물시험(실험동물, 목적 동물)에 접종한 후, 접종부위 이상반응이나 임상증상 발현여부 확인을 통하여 안전성을 평가하였음.
- 마우스 안전성 평가는 체중 15~20g의 마우스 8마리를 준비하여, 8마리의 마우스 복강에 0.5mL를 접종하고 7일간 관찰한 결과, 백신 접종 후 7일간 시험백신 3 Lot 모두에서 아무 이상 없이 생존하였음(표20).

표 20. 마우스에 대한 안전시험 결과

시험백신	공시수	접종량	생존수/접종수	결과(생존율)
C2DM 01	8	0.5mL/복강	8/8	100%
C2DM 02	8	0.5mL/복강	8/8	100%
C2DM 03	8	0.5mL/복강	8/8	100%

- 기니픽 안전성 평가는 체중 300~350g의 기니픽 4마리를 준비하여, 2마리의 기니픽 근육 또는 피하에 2mL를, 다른 2마리의 기니픽 복강에 2mL를 접종하고 7일간 관찰한 결과, 시험백신 3 Lot 모두에서 아무 이상 없이 생존하였음(표 21).

표 21. 기니픽에 대한 안전시험 결과

시험백신	공시수	접종량	접종경로	관찰기간	결과
C2DM 01	2마리	2mL	근육	7일	이상 없음
	2마리	2mL	복강		
C2DM 02	2마리	2mL	근육	7일	이상 없음
	2마리	2mL	복강		
C2DM 03	2마리	2mL	근육	7일	이상 없음
	2마리	2mL	복강		

- 자돈 안전성 평가는 체중 8~10kg(4~6주령)의 건강한 돼지 2마리에 백신의 2두분을 피내 접종하고 접종 후 1~2시간 내에 과민반응이 없어야 하며, 21일간 관찰하는 동안 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 피부 병변 등의 부작용이 없어야 함.

- 시험백신 3 Lot 모두에서 백신 접종 후 1~2시간 내에 과민반응이 없었으며, 21일간 동안 폐사 및 임상증상을 보이지 않았고, 주사 부위의 화농, 괴사 및 피부병변 등의 부작용이 관찰되지 않아 안전성이 확인되었음(표 22).

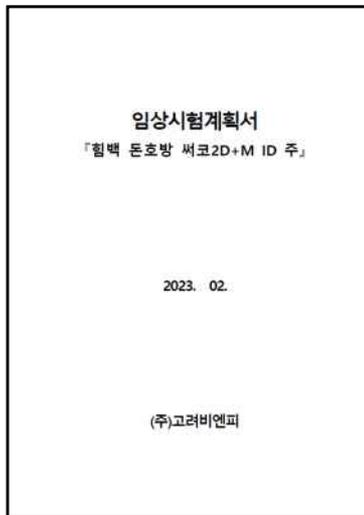
표 22. 목적동물에 대한 안전시험 결과

시험백신	공시수	접종량	접종경로	관찰기간	결과
C2DM 01	2마리	2두분*	피내	21일	이상 없음
C2DM 02	2마리	2두분	피내	21일	이상 없음
C2DM 03	2마리	2두분	피내	21일	이상 없음

*피내용 무침주사기의 특성상 마리당 다른 부위에 2번 접종을 통해 2두분 적용

3. 임상시험계획서 제출

- 동물용의약품 제품허사 취득을 위해서는 전임상시험결과를 바탕으로, 농장에서 수행하는 야외 임상시험이 필수적임. 임상시험은 농림축산검사본부에 임상시험계획서 제출/승인 받은 후 야외 농장에서 진행이 가능하기 때문에,
- 본 사업의 정량목표로서 “힘백 돈호방 써코2D+M ID 주” 제품으로 임상시험계획서 제출을 완료하였음 (접수번호: 20240004189).



4. 수출용품목허가

- 동물용의약품을 수출하기 위해서는 “수출용품목허가” 뿐만 아니라 수출대상국에 제품등록 절차가 필요함.
- 수출대상국에 제품등록 절차를 진행하기 위하여, “힘백 돈호방 써코2D+M ID 주” 제품으로 “수출용품목허가” 를 취득하였음 (허가번호:제 006-369호).



[공동연구기관2: 한국농수산대학교]

□ 1차년도 연구개발 과제 수행 : 공동연구기관2 한국농수산대학교

1. 개발 목표

기관명	1차 연도 개발 목표 (2021.04.01 ~ 2021.12.31)
공동연구기관2: 한국농수산대학교 /전북대학교	<ul style="list-style-type: none"> ○ 압력 개선된 피내 접종용 무침주사기의 효능, 및 농장적용 평가 ○ 피내 접종용 무침주사기의 개선 방향 제안 ○ 구제역 및 돈열 백신 피내접종 효능 및 안전성 평가 ○ 구제역 및 돈열 백신 접종 개선 방향 제안

2. 개발 내용 및 범위

- 개선된 피내 접종용 무침주사기의 효능 및 안전성 평가
- 원래의 1구형 피내 접종용 무침주사기에서 압력 차로 인한 항체가 확보에 어려움이 제기되어 압력 향상된 피내 접종기의 효능 및 안전성 평가
- 시험계획 : 무침주사기의 효능 평가를 위하여 구제역백신(오일제제)와 돈열(수용성) 백신에 대한 압력 효과를 평가하여 효과적인 압력과 접종 기준을 설정하여 2차년도 시험에 활용

3. 연구결과

- 시험농장 선정 (3개소)
- 전북 정읍, 전북 완주, 경북 영천 등 3개 지역의 양돈농장을 지정하였고, 추가로 농장시험을 위한 다양한 농장을 섭외하여 농장 단위 접종 결과를 비교 분석

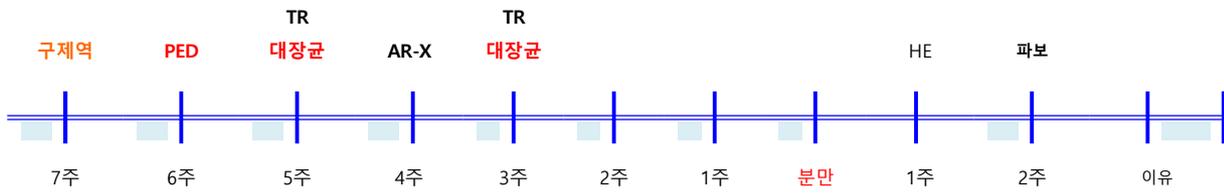
표 79. 농장시험 계획

농장명	지역	규모	비고
둘이농장	전북 정읍	모돈 300두	
야베스농장	전남 영광	모돈 300두	
영천농장	경북 영천	모돈 500두	

- 시험 농장 백신 프로그램(예)

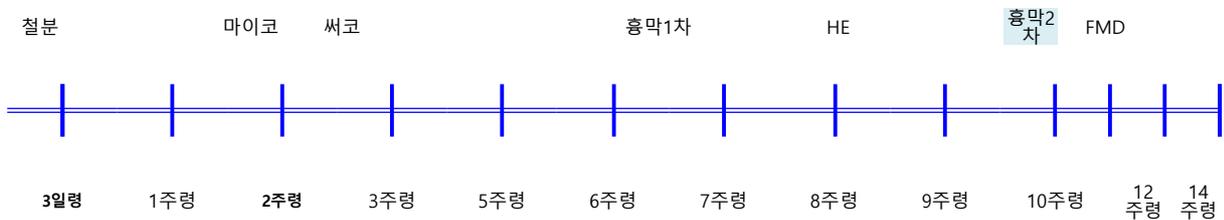
- 본 연구에 참여한 시험농장의 기본 백신 프로그램은 아래와 같다. 각각 모돈과 자돈으로 구분하여 시행하며, 모돈은 구제역 등8종, 자돈은 마이코 등 5종을 시행하고 있다.

(1) 모돈 프로그램



- 구제역 - 케어사이드(2ml)
- PED - PED-X(중양)(2ml)
- TR + 대장균 - 섞어서 2ml TR(중양), 대장균(네오콜리퍼-베링거)
- AR-X - AR+씨코 원샷 2ml(중양)
- HE - 단콜1ml(코미팜)
- 파보 - 파보진1ml(녹십자)

(2) 자돈 프로그램



- 마이코 - 마이코가드원타임(동방)(1ml)
- 씨코 - 씨코플렉스(베링거)(1ml)
- 홍막 - APP(MSD)(2ml)
- 단콜 - HE(코미팜)(1ml)
- 구제역 - 케어사이드(2ml)

[구제역 백신 접종 시험]

- 시험구 배치

그룹	개체수	백신접종부위	공격접종	비고
대조군	8	일반 주사기(둔부)		
무침주사기	8	이근부	-	yellow tag
무침주사기	8	등	-	green tag
무침주사기	8	둔부	-	orange tag

- 실험축 주령 : `21.6.13 출생(10주령 선발) 50두 중에서 선발
- 백신 : 아토젠올리고2(케어사이드)
- 1차 : `21.8.20, 2차 : `21.9.20
- 무침주사기 : 0.6파스칼 압력
- 샘플 채취
경정맥 3ml 채혈

○ 항체가 분석(실험방법)

- 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 ABI사 키트(PrioCHECK™ FMDV Type 0 Antibody ELISA)를 이용하여 FMDV Type 0 항체가를 측정하였다. 검사순서는 항원코팅 플레이트의 각 well에 ELISA buffer 90µl 씩 분주하였다. 1열에 Reference serum 1~4를 2well 씩 10µl 분주하고 나머지 well에 검사시료를 10µl 씩 분주한 후 밀봉하여 살짝 흔들어 상온(22±3℃)에서 1시간(±5분) 배양하였다. 플레이트를 덜어 1배 세

척액 300 μ l을 모든 well에 분주한 후 바로 털어버리는 방법으로 6회 세척하였다. 마지막으로 세척액을 제거한 뒤 plate를 거꾸로 놓고 paper towel로 수차례 쳐서 남아있는 용액을 제거하였다. Conjugate를 100 μ l씩 분주하고 밀봉하여 살짝 흔들어준 다음 상온(22 \pm 3 $^{\circ}$ C)에서 1시간(\pm 5분) 배양하였다. 반응이 끝난 plate는 동일한 방법으로 세척하고 발색제(TMB)를 100 μ l씩 분주하였다. 15분 후 정지액을 100 μ l 첨가하여 반응을 중지시켰다. ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

○ 접종 부위별 항체가 검사 결과

- 접종 2주차 항체가 검사 결과

VDC순번	검체번호	PI값	판정	비고
1	연속-1	43.11244	음성	
2	연속-2	46.64468	음성	
3	연속-3	40.86957	음성	
4	연속-4	47.53223	음성	
5	이근부-1	28.70165	음성	
6	이근부-2	27.31034	음성	
7	이근부-3	16.52774	음성	
8	이근부-4	23.74213	음성	
9	등-1	25.27136	음성	
10	등-2	2.13493	음성	
11	등-3	15.07646	음성	
12	등-4	24.25187	음성	
13	둔부-1	38.22489	음성	
14	둔부-2	30.59070	음성	
15	둔부-3	9.58321	음성	
16	둔부-4	24.84558	음성	

- 접종 4주차 항체 결과

VDC순번	검체번호	PI값	판정	비고
1	연속-1	95.29192	양성	
2	연속-2	97.61476	양성	
3	연속-3	96.83816	양성	
4	연속-4	97.33740	양성	
5	이근부-1	15.71211	음성	
6	이근부-2	50.33282	양성	
7	이근부-3	14.25600	음성	
8	이근부-4	60.40078	양성	
9	둔부-1	21.71682	음성	
10	둔부-2	18.58965	음성	
11	둔부-3	30.23852	음성	
12	둔부-4	5.48468	음성	
13	등-1	5.76203	음성	
14	등-2	30.62682	음성	
15	등-3	-0.51310	음성	
16	등-4	3.64027	음성	

○ 접종 후 경과 기간에 따른 항체가 변화

- 접종 후 2개월 항체가 변화

VDC순번	검체번호	PI값	판정	비고
1	무표기-1	98.57739	양성	일반1회 접종
2	무표기-2	91.71017	양성	
3	무표기-3	97.43930	양성	
4	무표기-4	96.10784	양성	
5	무표기-5	100.72650	양성	
6	무표기-6	94.77639	양성	
7	무표기-7	99.68785	양성	
8	무표기-8	98.24038	양성	

9	무표기-9	97.71001	양성	무침 1회 접종
10	무표기-10	101.04141	양성	
11	표기-1	92.03613	양성	
12	표기-2	77.20781	양성	
13	표기-3	83.14687	양성	
14	표기-4	86.20756	양성	
15	표기-5	91.94221	양성	
16	표기-6	54.82721	양성	
17	표기-7	57.60614	양성	
18	표기-8	20.01602	음성	
19	표기-9	55.42941	양성	
20	표기-10	64.26894	양성	

- 출하 1주일전 항체가 변화

VDC순번	검체번호	PI값	판정	비고
1	빨강-1	80.88073	양성	일반 1회 접종
2	빨강-2	89.14774	양성	
3	빨강-3	85.30181	양성	
4	빨강-4	90.59432	양성	
5	빨강-5	95.12578	양성	
6	빨강-6	63.44623	양성	
7	빨강-7	86.82972	양성	
8	빨강-8	99.61657	양성	
9	빨강-9	97.24046	양성	
10	빨강-10	100.13943	양성	
11	검정-1	81.60692	양성	무침1회접종
12	검정-2	76.08784	양성	
13	검정-3	99.90124	양성	
14	검정-4	90.56527	양성	
15	검정-5	88.71202	양성	
16	검정-6	86.67867	양성	
17	검정-7	81.49654	양성	
18	검정-8	84.13408	양성	
19	검정-9	76.87213	양성	
20	검정-10	98.48370	양성	

○ 백신 종류에 따른 접종 후 일령별 항체가 변화

- 농장 현황 : 야베스농장(김성갑), 모돈 300두
전남 장흥군 관산읍 신동리 620
- 백신 접종 : 백신종류(동방), 생후 6주차(1차) 8주차(2차), 이근부 접종
- 무침주사기 : 0.6 파스칼
- 접종 후 150일령 항체가 결과

VDC순번	검체번호	PI값	판정	비고
1	150일령-1	24.05957	음성	
2	150일령-2	22.48171	음성	
3	150일령-3	22.93334	음성	
4	150일령-4	17.14784	음성	
5	150일령-5	32.13183	음성	
6	150일령-6	43.43986	음성	
7	150일령-7	14.75818	음성	
8	150일령-8	54.05614	양성	
9	150일령-9	33.56106	음성	
10	150일령-10	29.02756	음성	
11	150일령-11	19.04585	음성	
12	150일령-12	18.94295	음성	
13	150일령-13	15.35273	음성	

14	150일령-14	31.43437	음성	
15	150일령-15	21.61274	음성	
16	150일령-16	36.81969	음성	
17	150일령-17	22.44740	음성	
18	150일령-18	20.08633	음성	

- 접종 후 160일령 항체가 결과

VDC순번	검체번호	PI값	판정	비고
1	1	32.03022	음성	
2	2	40.73289	음성	
3	3	27.53255	음성	
4	4	70.06630	양성	
5	5	64.68463	양성	
6	6	32.47223	음성	
7	7	37.35814	음성	
8	8	45.63672	음성	
9	9	50.80934	양성	
10	10	41.90957	음성	
11	11	36.06200	음성	
12	12	52.94170	양성	
13	13	69.23008	양성	
14	14	62.68964	양성	
15	15	93.14598	양성	
16	16	34.38359	음성	

○ 고찰

- 백신 접종 후 피내 주입에 따른 피부 이상반응이 있어야 하지만, 접종 후 특이점이 없었음.
- 이근부의 항체가는 50%에서 양성율을 나타냈으나, 둔부 및 등은 양성인 실험축이 없었다. 따라서 0.6 파스칼 무침주사기의 활용도는 둔부 및 등은 사용이 어려운 것으로 판단됨
- 시험 농장에 따른 항체 양성율의 차이가 심함. -> 이러한 현상은 농장별로 접종 방법에 따른 차이 인 것으로 판단되며, 무침주사기의 상용화를 위해서는 무엇보다 정확한 접종 방법에 대한 교육이 필요할 것으로 판단됨

[압력 향상 무침주사기 접종 시험]

- 무침주사기 압력 조절 : 0.6파스칼 -> 0.7 파스칼
- 시험농장 : 경북 영천
- 접종 2주차 검사 결과

VDC순번	검체번호	PI값	판정	비고
1	혈청-1	31.43028	음성	
2	혈청-2	39.02249	음성	
3	혈청-3	34.32684	음성	
4	혈청-4	33.93103	음성	
5	혈청-5	35.71214	음성	
6	혈청-6	37.11544	음성	
7	혈청-7	8.19790	음성	
8	혈청-8	36.35382	음성	
9	혈청-9	15.67616	음성	
10	혈청-10	42.27286	음성	
37	예천-11	36.23388	음성	

- 접종 4주차 검사 결과

VDC순번	검체번호	PI값	판정	비고
1	혈청-1	78.37257	양성	
2	혈청-2	62.84518	양성	
3	혈청-3	46.71420	음성	

4	혈청-4	72.67617	양성
5	혈청-5	85.54021	양성
6	혈청-6	28.45556	음성
7	혈청-7	66.41391	양성
8	혈청-8	17.74181	음성
9	혈청-9	46.19360	음성
10	혈청-10	5.08148	음성

- 고찰 :

- ✓ 접종 4주차 50%에서 양성율을 나타냈고, 음성이지만 역가가 높은 2두는 지속적으로 상승할 것으로 예상되어 70%에서 양성율일 것으로 판단됨
- ✓ 무침주사기의 구제역 백신 피내 주입 특성으로 인하여 일반 접종과 같이 1개월째에 양성율을 나타내지는 못하였고, 1개월 이후에도 지속적으로 항체가 증가하여 출하직전까지 증가하는 경향이 있었다.
- ✓ 이전 연구 결과에서 피내 주입 구제역 항체가가 초기에는 IM에 비하여 낮으나 1개월 이후에는 항체가가 역전되는 경향을 나타냈는데, 이와 유사한 결과를 확인 할 수 있었다.

[돈열/돈단독 혼합 백신 접종 시험]

- 시험구 배치

그룹	개체수	백신 희석 배율	공격접종	비고
대조군	10	일반 2ml		
무침주사기	10	50%	-	yellow tag
무침주사기	10	25%	-	green tag
무침주사기	10	12.5%	-	orange tag

- 실험축 주령 : `21.6.13 출생(10주령 선발) 50두 중에서 선발



- 백신 : 단콜

1차 : `21.9.1, 2차 : `21.10.1

- 샘플 채취

경정맥 3ml 채혈, 2주차(10.16), 4주차(10.30), 8주차(11.30)



- 항체가 분석(실험방법)

- ✓ 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 MEDIAN사 키트(VDPro® CSFV AB ELISA)를 이용하여 CSFV 항체를 측정하였다. 검사순서는 항원코팅 플레이트를 실온에서 10-20분간 정치시킨 후 미리 희석용 플레이트에 20배 희석으로 준비한 양/음성대조 및 시료를 항원코팅 플레이트 well에 각각 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 1시간 배양하였다. 플레이트를 덜어 1배 세척액 300 μ l을 모든 well에 분주한 후 바로 털어버리는 방법으로 3회 세척하였다. 마지막으로 세척액을 제거한 뒤 plate를 거꾸로 놓고 paper towel로 수 차례 쳐서 남아있는 용액을 제거하였다. HRP0 Anti-swine IgG Conjugate를 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 1시간 배양하였다. 반응이 끝난 plate는 동일한 방법으로 세척하고 발색제(ABTS Substrate)를 100 μ l씩 분주하였다. 10분 후 정지액을 100 μ l 첨가하여 반응을 중지시켰다. ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

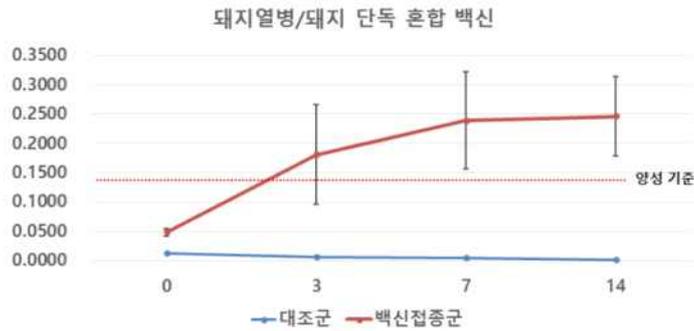
- 결과

- ✓ 돈단독/돼지열병 혼합백신 접종 후 일령별 항체가 변화

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
1	18	0.0016	음성	21.07.13
2	19	0.0272	음성	
3	20	0.0099	음성	
4	21	0.0558	음성	
5	22	0.0436	음성	
6	23	0.0458	음성	
7	18	-0.0042	음성	21.07.16
8	19	0.0213	음성	
9	20	-0.0002	음성	
10	21	0.2376	양성	
11	22	0.0829	음성	
12	23	0.2213	양성	
13	18	-0.0039	음성	21.07.20
14	19	0.0164	음성	
15	20	-0.0005	음성	
16	21	0.2709	양성	
17	22	0.1441	양성	
18	23	0.3004	양성	
19	18	-0.0031	음성	21.07.27
20	19	0.0132	음성	
21	20	-0.0061	음성	
22	21	0.3044	양성	
23	22	0.1713	양성	
24	23	0.2615	양성	

- 돈단독/돼지열병 혼합백신 접종 용량에 따른 항체가 변화

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
1	E2.5-1	0.1174	음성	
2	E2.5-2	0.2009	양성	
3	E2.5-3	0.0888	음성	
4	E2.5-4	0.0023	음성	
5	E2.5-5	0.0534	음성	
6	E2.5-6	0.2040	양성	
7	E2.5-7	0.0663	음성	
8	E5-1	0.1618	양성	
9	E5-2	0.2156	양성	
10	E5-3	-0.0040	음성	
11	E5-4	-0.0007	음성	
12	E5-5	0.0036	음성	
13	E5-6	-0.0033	음성	
14	E5-7	-0.0014	음성	
15	E10-1	0.0527	음성	
16	E10-2	0.1907	양성	
17	E10-3	0.2286	양성	
18	E10-4	0.0526	음성	
19	E10-5	0.1194	음성	
20	E10-6	-0.0042	음성	
21	E10-7	0.1484	양성	



✓ 돼지열병 접종(0.6 파스칼) 160일령 항체가

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
1	1	0.0232	음성	
2	2	0.2878	양성	
3	3	0.3202	양성	
4	4	0.1237	음성	
5	5	0.2206	양성	
6	6	0.2075	양성	
7	7	0.1600	양성	
8	8	0.1424	양성	
9	9	0.1580	양성	
10	10	0.1074	음성	
11	11	0.1305	음성	
12	12	0.1075	음성	
13	13	0.2133	양성	
14	14	0.2481	양성	
15	15	0.3316	양성	
16	16	0.0130	음성	

- 고찰

✓ 백신 접종 후 피내 주입에 따른 피부 이상반응이 있어야 하지만, 접종 후 특이점이 없었음. 돈단독 /돈열 혼합 백신의 경우 0.6파스칼 압력의 무침주사기는 피내 주입보다는 피부외부로 흘러내리는 경향이 많았음. 특히, 기존 무침주사기(히프라, 스페인)에 비하여 접종압력이 약하다고 판단됨. 돼지열병은 접종 3일부터 양성으로 전환되었음. 이후는 양성 기준인 0.14 이상을 지속적으로 유지

하였음

○ 피내 접종용 무침주사기의 개선 방향 제안

- 무침주사기의 동물실험을 통한 평가를 바탕으로 개선 방향을 제시하고 개선된 무침주사기의 평가 수행
- 개선된 무침주사기 개선 방향 제안 : 생후 10주령을 기준으로 미만은 자돈용으로 0.6파스칼 압력, 이상은 육성돈용으로 0.7파스칼 이상의 압력을 가진 무침주사기를 이용하는 것이 필요함

□ 2차년도 연구개발 과제 수행 : 공동연구기관2 한국농수산대학교

기관명	2차 연도 개발 목표 (2022.01.01 ~ 2022.12.31)
공동연구기관2: 한국농수산대학교 /전북대학교	<ul style="list-style-type: none"> • 피내 접종용 무침주사기의 효능, 안전성 및 농장적용 평가 • 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 및 무침주사기 농장적용 평가 • PCV2 백신 효능평가를 위한 PCV2 공격접종 모델 확립

1. 개선된 피내 접종용 무침주사기의 효능 및 안전성 평가

- 1차년도의 평가를 바탕으로 개선된 다구형 접종기 등의 효능 및 안전성 평가
- 개선된 무침주사기를 사용하여 crystal violet 등의 색소가 포함된 신규 구제역 백신을 3마리의 8주, 9주, 12주 및 14주령 자돈에 접종하여 국소 부위 관찰
- 2주 간격으로 각각 2회 접종하고 2주간 추가로 관찰하여 전신 부작용 및 접종부위의 국소 부작용을 관찰하고 피부 절개 후 접종액의 접종 위치를 확인
- PCV2 항체 유도능을 비교 평가하여 개선된 무침주사기의 항체 유도능 평가

< 실험디자인 및 처치 일정 >

주령	개체수	백신	공격접종	Necropsy
8	6	FMD ()	-	접종 직후 안락사/부검
9	6	FMD ()	-	접종 직후 안락사/부검
12	6	FMD ()	-	접종 직후 안락사/부검
14	6	FMD ()	-	접종 직후 안락사/부검

<결과>

- 주입 주령 및 부위별 접종 성공률
- 성공률: 주입 후 피내에서 색소 확인이 되는 비율

주령	귀뒤	등상부	등하부	엉덩이	평균
8	6/6(100)	5/6(83)	5/6(83)	5/6(83)	88%
9	6/6(100)	6/6(100)	6/6(100)	4/6(67)	92%
12	6/6(100)	4/6(67)	5/6(83)	3/6(50)	75%
14	6/6(100)	3/6(50)	1/6(17)	4/6(67)	58%
평균	100%	75%	71%	67%	

- 접종 시험



부위별 접종



접종 부위 확인



부위별 샘플 채취



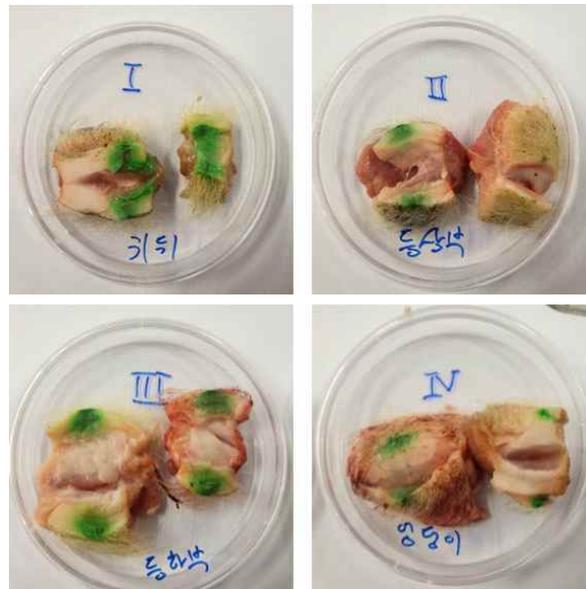
부위별 주입 깊이 측정

- 각주령 별접종 부위에 따른 주입 깊이 조사 결과

주령	귀뒤		등상부		등하부		엉덩이	
	깊이	너비	깊이	너비	깊이	너비	깊이	너비
8	1.52±0. 27	0.72±0. 12	0.36±0. 36	0.20±0. 17	0.73±0. 6	0.37±0. 31	0.47±0. 47	0.22±0. 22
9	1.60±0. 28	0.65±0. 12	0.23±0. 23	0.15±0. 08	0.33±0. 27	0.15±0. 08	0.12±0. 12	0.08±0. 08
12	1.55±0. 36	0.78±0. 15	0.22±0. 19	0.08±0. 08	0.18±0. 12	0.08±0. 04	0.18±0. 15	0.08±0. 07
14	1.57±0. 73	0.73±0. 08	0.20±0. 15	0.18±0. 08	0.29±0. 12	0.12±0. 05	0.19±0. 17	0.10±0. 09

* mean ± SD

- 부위별 주입 깊이 측정



○ 개선된 피내 접종용 무침주사기의 효능평가

- 1차년도의 평가를 바탕으로 개선된 다구형 접종기 등의 효능 및 안전성 평가
- PCV2 항체 유도능을 비교 평가하여 개선된 무침주사기의 항체 유도능 평가

< 실험디자인 및 처치 일정 >

주령	개체수	백신	접종	채혈
1	20	Mycoplasma	일반주사기, 무침주사기	○
2	20	PCV2	일반주사기, 무침주사기	-
3	20	채혈		○
5	20	채혈		○
6	20	채혈		○

2. 항체가 분석

< PCV2 >

○ 항체검사를 위해 PCV2 항체 indirect ELISA 시약(BioNote PCV2 Antibody ELISA)을 사용하여 실시한다.

(1) 검사시료

- 1차년 : 신선한 돼지 혈청을 사용하며, 채취된 시료는 냉장고에 보관하면서 1주일 이내에 검사에 사용하고, 시료를 1주일 이상 보관하는 경우 -20℃ 이하로 냉동하여 보관하고 용혈이 심하게 관찰되는 시료는 비특이반응이 있을 수 있으니 가능하면 사용하지 않는다. 시료가 혼탁한 경우 원심분리 후 상층액을 채취하여 사용한다.

(2) 시료 및 시약 희석

- 1차년- 희석용 튜브에 검체희석액390ul와 양성대조와 음성대조 그리고 시료를 10ul씩 분주하여 40배 희석한다.
- - 20X Washing Buffer를 D.W와 희석하여 1X로 만든다.

(3) 검사순서

- 1차년- 항원 흡착 플레이트를 실온에 두고 10~20분 가량 방치 후 희석된 양성/음성대조 및 시료를 각 100ul씩 동일하게 분주한 후 실온(18~25℃)에서 30분 반응시킨다.
- 1X Washing Buffer 200~300ul를 사용하여 5회 세척하고 마지막 세척 후에는 플레이트를 잘 두드린다.
- 접합체액(Conjugate)을 각 well에 100ul씩 분주하고 실온(18~25℃)에서 30분 반응시킨다.
- 1X Washing Buffer 200~300ul를 사용하여 5회 세척하고 마지막 세척 후에는 플레이트를 잘 두드린다.
- 기질액을 각 well에 100ul씩 분주하고 실온에서 15분간 반응시킨다.
- 15분 후 정지액(Stop solution)을 각 well에 100ul씩 첨가하여 반응을 중지 시킨 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정한다.

(4)결과

- 유효성 평가

- ① 양성평균 흡광도 (PC OD mean) : 0.4 이상
- ② 음성평균 흡광도 (NC OD mean) : 0.2 미만

- 결과판정

- ① S/P = (가검시료 평균 OD - 음성대조 평균 OD)/(양성대조 평균 흡광도 - 음성대조 평균 흡광도)
- ② S/P 값 0.4 이상 이면 양성
- ③ S/P 값 0.4 미만 이면 음성

< Mycoplasma H >

○ 항체검사를 위해 MH 항체 indirect ELISA 시약(IDEXX M. hyo. ELISA)을 사용하여 실시한다.

(1) 검사시료

- 신선한 돼지 혈청을 사용하며, 채취된 시료는 냉장고에 보관하면서 1주일 이내에 검사에 사용하고, 시료를 1주이상 보관하는 경우 -20℃ 이하로 냉동하여 보관하고 용혈이 심하게 관찰되는 시료는 비특이반응이 있을 수 있으니 가능하면 사용하지 않는다. 시료가 혼탁한 경우 원심분리 후 상층액을 채취하여 사용한다.

(2) 시료 및 시약 희석

- 희석용 튜브에 검체희석액 390ul와 시료를 10ul씩 분주하여 40배 희석한다.
- 10X Washing Buffer를 D.W와 희석하여 1X로 만든다.

(3)검사순서

- 항원 흡착 플레이트를 실온에 두고 10~20분 가량 방치 후 양성, 음성 대조액(희석하지 않는다.)과 희석된 시료를 각 100ul씩 동일하게 분주한 후 실온(18~25℃)에서 30분 반응시킨다.
- 1X Washing Buffer 200~300ul를 사용하여 5회 세척하고 마지막 세척 후에는 플레이트를 잘 두드린다.
- 접합체액(Conjugate)을 각 well에 100ul씩 분주하고 실온(18~25℃)에서 30분 반응시킨다.
- 1X Washing Buffer 200~300ul를 사용하여 5회 세척하고 마지막 세척 후에는 플레이트를 잘 두드린다.
- TMB를 각 well에 100ul씩 분주하고 실온에서 15분간 반응시킨다.
- 15분 후 정지액(Stop solution)을 각 well에 100ul씩 첨가하여 반응을 중지 시킨 후 ELISA reader로 650nm에서 흡광도를 측정한다.

(4)결과

- 유효성 평가

- ① 양성평균 흡광도 (PC OD mean) : 0.150 이상
- ② 음성평균 흡광도 (NC OD mean) : 0.150 미만

- 결과판정

- ① S/P = (가검시료 평균 OD - 음성대조 평균 OD)/(양성대조 평균 흡광도 - 음성대조 평균 흡광도)
- ② S/P 값 0.4 이상 이면 양성
- ③ S/P 값 0.3 미만 이면 음성
- ④ S/P 값 0.3 과 0.4 사이 이면 의양성

<결과>

- 주입 주령 및 부위별 접종 성공률
- 성공률: 주입 후 피내에서
- 1주령 PCV2

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
1	1주령-1	3.02578	양성	
2	1주령-2	2.93089	양성	
3	1주령-3	2.98635	양성	
4	1주령-4	2.78975	양성	
5	1주령-5	2.62866	양성	
6	1주령-6	2.83347	양성	
Negative		0.06305	less than 0.2	
Positive		0.8545	greater than or equal to 0.4	
Pcx-NCx		0.79145		

- 3주령 PCV2

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
7	3주령-1	2.70194	양성	
8	3주령-2	2.72746	양성	
9	3주령-3	2.66934	양성	
10	3주령-4	1.79171	양성	
11	3주령-5	2.88957	양성	
Negative		0.06305	less than 0.2	
Positive		0.8545	greater than or equal to 0.4	
Pcx-NCx		0.79145		

- 5주령 PCV2(일반 주사기)

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
1	5주령-1	0.84360	양성	
2	5주령-2	1.00799	양성	
3	5주령-3	1.18313	양성	
4	5주령-4	1.29868	양성	
5	5주령-5	1.76633	양성	
6	5주령-6	1.11691	양성	
7	5주령-7	0.95564	양성	
8	5주령-8	1.07622	양성	
9	5주령-9	1.39274	양성	
10	5주령-10	1.24060	양성	
Negative		0.07025	less than 0.2	
Positive		1.06545	greater than or equal to 0.4	
Pcx-NCx		0.9952		

- 5주령 PCV2(무침 주사기)

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
1	5주령-1	0.84360	양성	
2	5주령-2	1.00799	양성	
3	5주령-3	1.18313	양성	
4	5주령-4	1.29868	양성	
5	5주령-5	1.76633	양성	
6	5주령-6	1.11691	양성	
7	5주령-7	0.95564	양성	
8	5주령-8	1.07622	양성	
9	5주령-9	1.39274	양성	
10	5주령-10	1.24060	양성	
Negative		0.07025	less than 0.2	
Positive		1.06545	greater than or equal to 0.4	
Pcx-NCx		0.9952		

- 6주령 PCV2(무침 주사기)

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
17	6주령-1	0.30381	음성	
18	6주령-2	0.17228	음성	
19	6주령-3	0.70800	양성	
20	6주령-4	1.25788	양성	
21	6주령-5	0.16028	음성	
Negative		0.06305	less than 0.2	
Positive		0.8545	greater than or equal to 0.4	
Pcx-NCx		0.79145		

- 1주령 MH(무침주사기-접종 전)

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
1	1주령-1	0.3130	음성	
2	1주령-2	0.2207	음성	
3	1주령-3	0.1123	음성	
4	1주령-4	0.1170	음성	
5	1주령-5	0.1613	음성	
6	1주령-6	0.0525	음성	
Negative		0.05255	less than or equal to 0.150	
Positive (MH)		0.3486		
Pcx-NCx		0.29605	greater than or equal to 0.150	

- 3주령 MH(무침주사기-접종 전)

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
7	3주령-1	0.1096	음성	
8	3주령-2	0.1002	음성	
9	3주령-3	0.1407	음성	
10	3주령-4	1.2736	양성	
11	3주령-5	0.1610	음성	
Negative		0.05255	less than or equal to 0.150	
Positive (MH)		0.3486		
Pcx-NCx		0.29605	greater than or equal to 0.150	

- 5주령 Mycoplasma

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
1	5주령-1	0.0569	음성	
2	5주령-2	0.1234	음성	
3	5주령-3	0.0966	음성	
4	5주령-4	0.1081	음성	
5	5주령-5	0.1904	음성	
6	5주령-6	0.0464	음성	
7	5주령-7	-0.0172	음성	
8	5주령-8	0.0154	음성	
9	5주령-9	0.0782	음성	
10	5주령-10	0.1216	음성	
Negative		0.05735	less than or equal to 0.150	
Positive (MH)		0.43785		
Pcx-NCx		0.3805	greater than or equal to 0.150	

- 5주령 Mycoplasma

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
12	5주령-1	-0.0046	음성	
13	5주령-2	0.2467	음성	
14	5주령-3	0.2346	음성	
15	5주령-4	0.0235	음성	
16	5주령-5	0.1258	음성	
Negative		0.05255	less than or equal to 0.150	
Positive (MH)		0.3486		
Pcx-NCx		0.29605	greater than or equal to 0.150	

- 6주령 Mycoplasma (무침주사기)

VDC순번	검체번호	S/P값	판정	비고
17	6주령-1	0.4920	양성	
18	6주령-2	0.8470	양성	
19	6주령-3	0.6663	양성	
20	6주령-4	0.2883	음성	
21	6주령-5	0.4623	양성	
Negative		0.05255	less than or equal to 0.150	
Positive (MH)		0.3486		
Pcx-NCx		0.29605	greater than or equal to 0.150	

○ PCV2 백신 효능평가를 위한 PCV2 공격접종 모델 확립

- 6마리의 SPF 돼지를 두 그룹(그룹당 3마리)으로 나누어 각각 접종군과 대조군으로 따로 사육하였다.
- 2일 동안 순응시킨 후, 접종군의 자돈에 $10^{6.82}$ TCID₅₀/ml 역가의 PCV2d(CBNU0324) 1ml를 근육 그리고 2 ml를 비강에(각 비강에 1ml) 접종하였다.
- 대조군은 동일한 경로를 통해 PBS를 접종하였다.
- 0, 7, 10, 14 및 21일에 채혈을 실시하고 비강 및 대변 스왑은 PCV2d 바이러스 접종 후 0, 3, 5, 7, 10, 14 및 21일에 채취하였다.
- 공격접종 3주에 모든 자돈은 Xylm® 2%(Intervet)와 Zoletil 100®(Virbac)의 혼합물 0.3 ml/kg을 사용한 깊은 마취 후 제조업체의 권장 용량으로 T61(MSD)을 정맥 주사하여 안락사 하였다.
- 모든 새끼 돼지를 부검하여 주로 외부, 림프절 비대, 폐허탈 및 간질성 폐렴을 관찰하였고 총 폐 병변 점수를 추정하고 각 엽의 폐렴 양을 반영하여 점수를 부여하였다. 모든 엽의 총점은 육안으로 보이는 폐렴이 있는 전체 폐의 백분을 추정하였고 조직병리학적 검사를 통해 폐, 비장, 림프절의 병변을 측정

하였다(그림 101).

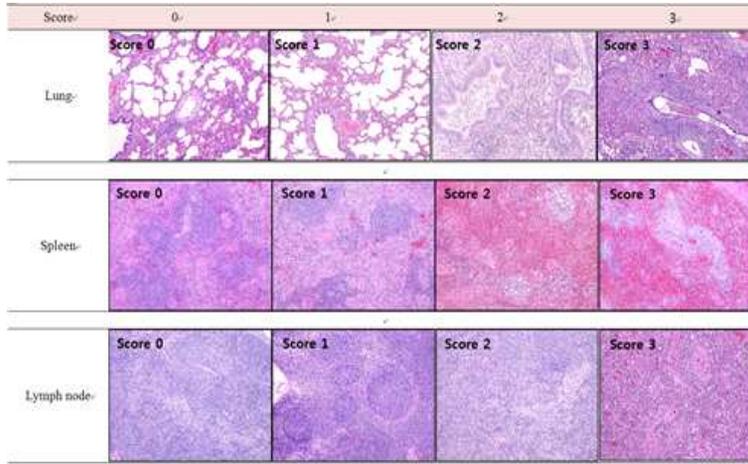


그림 169. 폐 병변 스코어링 체계(100점)(Paladino et al., 2017)과 조직병변 스코어

<결과>

- 백신 개발을 위해 사용한 PCV2d는 기존 2010년 초반까지 유행하던 PCV2b와 10% 정도의 유전적 변이를 보이는 새로운 유전형으로 기존 PCV2b 백신의 방어 효능을 감소 시킬것으로 유추되고 있어 PCV2d를 활용한 백신 개발이 필요하다.

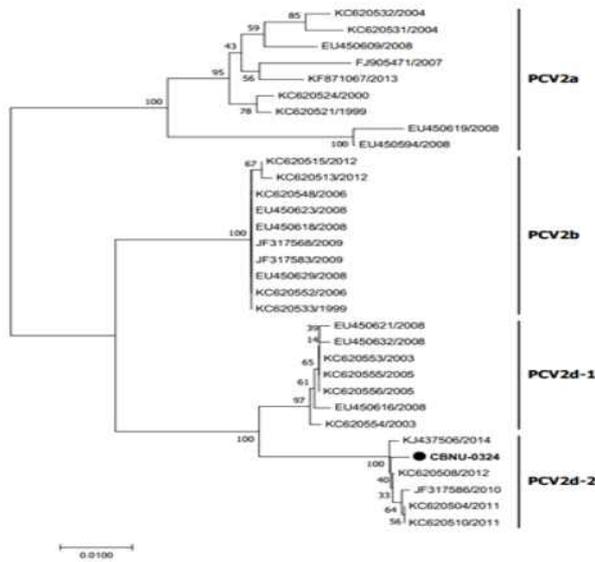


그림 170.. PCV2 바이러스의 유전적 분류 (● PCV2d, CBNU0324)

- PCV2d 접종군의 증체율이 공격접종 1-2주 구간에 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고 2-3주 구간에는 체중감소가 관찰되었다.

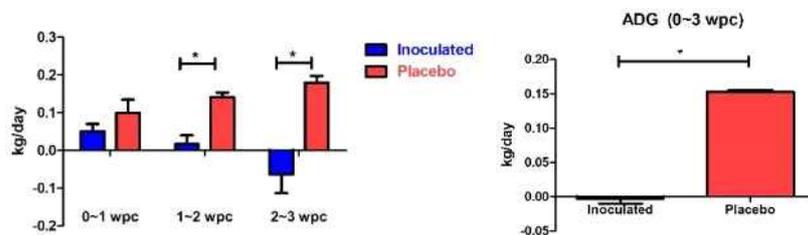


그림 103. 일당평균체중 (ADWG). (A): each time period, (B): 0~3 weeks post challenge (wpc)

- PCV2d 접종군의 혈중, 비강, 분변에 바이러스가 검출되었고 공격접종 21일까지 지속적으로 증가하였고 대조군에서는 바이러스가 검출되지 않았다.

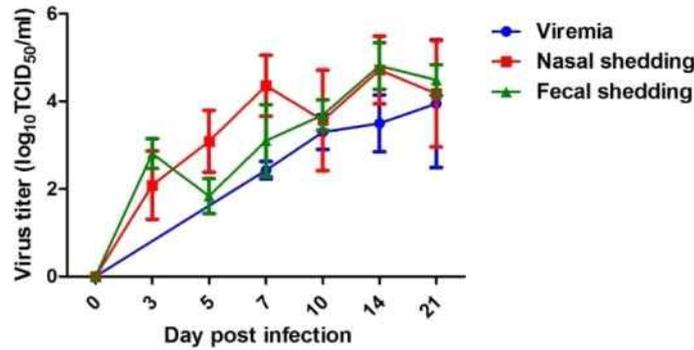


그림 104. 혈액, 비강, 분변 내 PCV2d virus titer

- PCV2d 접종군의 폐와 편도, 비장, 간, 주요 림프절과 다양한 위치의 장 등에서 높은 수준의 PCV2d 바이러스가 검출되었고 대조군에서는 바이러스가 검출되지 않았다.

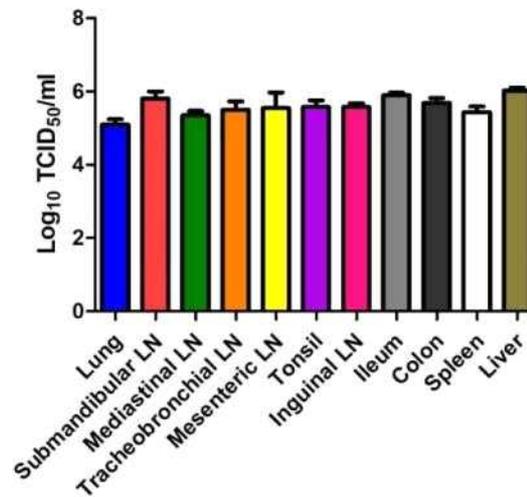


그림 105. 공격접종 21일에 수거한 각 장기의 PCV2d virus titer

- PCV2d 접종군의 폐와 편도, 비장, 간, 주요 림프절과 다양한 위치의 장 등에서 높은 수준의 병변이 검출된 반면 대조군에서는 특이한 병변이 관찰되지 않았다.

표 120. 접종군의 각 주요장기에서 관찰된 조직병리학적 병변

Pig No.	Organ	Histopathological findings	Presence of PCV2 antigens*
1	Lung	Mild bronchopneumonia with atelectasis Mild peribronchiolar and perivascular inflammatory cell infiltration	1
	Tonsil	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	2
	Spleen	Moderate lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	1
	Liver	Moderate portal hepatitis Mild hepatocellular degeneration/necrosis	3
	Lymph node	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	2
	Ileum	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of Peyer's patch	2
	Colon	No remarkable lesions	1

2	Lung	Mild bronchopneumonia with atelectasis Mild peribronchiolar and perivascular inflammatory cell infiltration	2
	Tonsil	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	3
	Spleen	Moderate lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	1
	Liver	Moderate portal hepatitis Mild hepatocellular degeneration/necrosis	2
	Lymph node	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	2
	Ileum	No remarkable lesions	1
	Colon	No remarkable lesions	1
3	Lung	Mild suppurative bronchiolitis with atelectasis Minimal peribronchiolar and perivascular inflammatory cell infiltration	2
	Tonsil	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles Numerous intranuclear/intracytoplasmic inclusion bodies in the histiocytes	3
	Spleen	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles	3
	Liver	Moderate portal hepatitis Severe hepatocellular degeneration/necrosis	3
	Lymph node	Severe lymphoid depletion and histiocytic replacement of lymphoid follicles Numerous intranuclear/intracytoplasmic inclusion bodies in the histiocytes	3
	Ileum	Moderate lymphoid depletion and histiocytic replacement of Peyer's patch	3
	Colon	Mild inflammatory cell infiltration in the submucosa Mild crypt abscess	3

*Percentage of lymphoid follicles that have cells with staining for PCV2 antigen demonstrated by IHC (0, negative; 1, less than 10% of the lymphoid follicles ; 2, 10-50% of the lymphoid follicles; 3, more than 50% of the lymphoid follicles).

- 성과

(논문 1편- SCI 1편 출판)

Lee S-I et al, Protective immunity induced by concurrent intradermal injection of porcine circovirus type 2 and Mycoplasma hyopneumoniae inactivated vaccines in pigs. Vaccine 39 (2021) 6691-6699

(학술발표)

Kim H-R et al, Prevalence, co-infection status, and phylogenetic analysis of porcine circoviruses (PCV2, PCV3, and PCV4) and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV-1 and PRRSV-2) in Korean pig herds (2022) 대한바이러스학회 P-7

□ 3차년도 연구개발 과제 수행 : 공동연구기관2 한국농수산대학교

1. 임상 시험 농장 선정

- 관리가 잘 되어있고 백신접종 실험을 객관적인 지표로 관찰하고 실험을 진행할 수 있다고 판단되는 농장을 선정.
- 공시동물 : 선정된 시험농장 1곳에서 백신 종류 별로 각각 20두를 선정하여 백신군에 20두, 대조군에 20두를 선정한다. 선정된 돼지에게는 귀에 번호가 표기된 이표를 장착하고 사육.
- 백신접종 : 시험 목적에 맞게 모돈 또는 자돈에게 접종

2. 피내접종용 무침주사기 활용도 향상 방안 및 평가

- 피내접종용 무침주사기의 효능 평가를 위하여 FMD 1회 접종효과 검증, PED(Porcine Endemic Diarrhea)

1) FMD 1회 접종 효능 시험

(1) 실험 디자인 및 검사 시료 - 실험디자인

- 시험축 : 23년 5월 15일 생(20두)
- 접종(1회) : 23년 7월 3일(11주령)
- 채혈 : 23년 8월 21일(접종 후 7주)
- 백신 : 올리고(아르헨티나)

(2) 시료 및 시약 희석

- 시료 : 혈청(경정맥 3ml)

(3) 검사 순서

- 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 ABI사 키트(PrioCHECK™ FMDV Type 0 Antibody ELISA)를 이용하여 FMDV Type 0 항체를 측정하였다.
- 검사순서는 항원코팅 플레이트의 각 well에 ELISA buffer 90µl 씩 분주하였다.
- 1열에 Reference serum 1~4를 2well 씩 10µl 분주하고 나머지 well에 검사시료를 10µl 씩 분주한 후 밀봉하여 살짝 흔들어 상온(22±3℃)에서 1시간(±5분) 배양하였다.
- 플레이트를 덮어 1배 세척액 300µl을 모든 well에 분주한 후 바로 털어버리는 방법으로 6회 세척하였다.
- 마지막으로 세척액을 제거한 뒤 plate를 거꾸로 놓고 paper towel로 수차례 쳐서 남아있는 용액을 제거하였다.
- Conjugate를 100µl씩 분주하고 밀봉하여 살짝 흔들어준 다음 상온(22±3℃)에서 1시간(±5분) 배양하였다.
- 반응이 끝난 plate 는 동일한 방법으로 세척하고 발색제(TMB)를 100µl씩 분주하였다.
- 15분 후 정지액을 100µl 첨가하여 반응을 중지시켰다.
- ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 결과

- 실험군 20두에 대한 항체가 분석결과

VDC순번	검체번호	S/N값	판정	비고
1	1-1	0.97407	음성	
2	1-2	0.81210	음성	
3	1-3	0.48465	양성	
4	1-4	0.55241	양성	
5	1-5	0.50326	양성	
6	2-1	0.62800	음성	
7	2-2	0.44878	양성	
8	2-3	0.75512	음성	
9	2-4	0.82697	음성	
10	2-5	0.83355	음성	
11	3-1	0.81732	음성	
12	3-2	0.73458	음성	
13	3-3	0.65558	음성	
14	3-4	0.40032	양성	
15	3-5	0.49146	양성	
16	4-1	0.58828	양성	
17	4-2	0.42529	양성	
18	4-3	0.33710	양성	
19	4-4	0.75399	음성	
20	4-5	0.27513	양성	

Negative	0.95095	greater than or equal to 0.6
Positive	0.0699	less than 0.3
Pcx-NCx	0.88105	
Reference1	0.3154	less than 0.4
Reference2	0.8838	greater than or equal to 0.6

(5) 고찰

- 백신접종 접종 후 7주차에 20두 중에서 10두에서 양성이 확인되어 향후 1회 0.5ml 또는 1회 1ml 접종에 대한 효과 검토 필요

2) PED (Porcine Endemic Diarrhea)

(1) 실험 디자인 및 검사 시료

주령	개체수	백신	접종	검사
모돈 (분만2주전)	10	PED	무침 (실험군)	
모돈 (분만2주전)	10	PED	일반주사기	
자돈 2주령	10	채혈		○
자돈 2주령	10	채혈		○

(2) 시료 및 시약 희석

- 시료 : 혈청

(3) 검사 순서

- 1.5ml tube에 가검 혈청을 300ul씩 덜어서 water bath를 56°C에 맞춘 후 1시간 반응시킨다. (비동화 과정)
- (이 후 4°C에 보관하였다가 사용한다.)
- 세포배양용 96 well plate에 DMEM을 각 well에 100ul씩 분주한 후 비동화시킨 가검혈청을 각각 2well에 100ul씩 넣고 2계단 희석한다.
- PED virus 10² (10³ TCID/ml)을 플레이트 well에 100ul씩 분주한 후 37°C incubator에 1시간 반응시킨다. (back titor칸과 negative칸은 비워둔다.)
- back titer는 10² (10³ TCID/ml)부터 10진 희석하여 5개의 titer를 준비
- 1시간 반응 후 vero cell 플레이트를 post-inoculation media를 사용하여 2번(1회 150ul이상/well) 세척한다.
- 가검혈청과 virus를 분주한 플레이트의 내용물을 vero cell 플레이트로 모두 옮긴다. 준비한 back titer를 well에 순서대로 넣고 37°C incubator 에 1시간 반응시킨다.
- 반응 후 post-inoculation media를 사용하여 1번(1회 150ul이상/well) 세척한다.
- post-inoculation media를 200ul씩 넣고 37°C incubator에 3~5일 동안 배양한 후 결과를 판독한다.
- 결과 판정 : negative 세포에 어떠한 세포변성반응이나 오염이 되어서는 안된다. 항체 역가는 세포변성 효과를 일으키지 않은 최대 희석 배수의 역수

(4) 결과

- 실험군과 대조군 각각 10두에 대한 항체가 분석결과

VDC 순번	검체번호	판정	비고	VDC 순번	검체번호	결과	비고
1	실험군-1	2배		1	대조군-1	음성	
2	실험군-2	2배		2	대조군-2	음성	
3	실험군-3	2배		3	대조군-3	음성	
4	실험군-4	4배		4	대조군-4	2배	
5	실험군-5	4배		5	대조군-5	2배	
6	실험군-6	음성		6	대조군-6	음성	
7	실험군-7	음성		7	대조군-7	음성	
8	실험군-8	음성		8	대조군-8	음성	
9	실험군-9	2배		9	대조군-9	음성	
10	실험군-10	8배		10	대조군-10	음성	

(5) 고찰

- 백신접종 모돈에서 태어난 자돈에 대한 2주령 항체가 검사 결과 대조군은 양성 비율이 20% 였으나, 실험군은 70%로 높게 나타났다.

3) Japanese Encephalitis(일본 뇌염)

(1) 실험 디자인 및 검사 시료

주령	개체수	백신	접종	검사
모돈 (임신)	10	일본뇌염	무침	
모돈 (임신)	10	일본뇌염	일반	
분만 후 1주	6	채혈	무침, 일반	○
분만 후 3주	4	채혈	무침, 일반	○

(2) 시료 및 시약 희석

- 희석용 튜브에 검체희석액390ul와 양성대조와 음성대조 그리고 시료를 10ul씩 분주하여 40배 희석한다.
- 20X Washing Buffer를 D.W와 희석하여 1X로 만든다.

(3) 검사순서(Median VPro JEV AB ELISA)

- 모든 구성품을 실온에 적응시키고, 플레이트를 지퍼백에서 꺼냅니다.
- 플레이트의 각 well에 희석된 가검혈청과 희석하지 않은 양/음성대조를 각각 100 μ l씩 분주합니다.
- 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킵니다.
- 반응액을 털어버리고 1X 세척액(1X Washing Buffer)300 μ l씩을 모든 well에 분주한 후 바로 털어는 과정을3회 반복합니다.
- 마지막 세척액을 제거하고 well 내에 물기가 남지 않도록 플레이트를 거꾸로 들고 paper towel 위에 여러 번 쳐서 물기를 제거합니다. 이때 물기를 털어 버린 후 well이마르지 않도록 특히 주의해야 합니다.
- HRPO Anti-Swine IgG Conjugate를 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킵니다.
- 위의 4)~5)번과 동일한 방법으로 세척합니다.
- 발색제 (TMB Substrate)를 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온 (25 \pm 3 $^{\circ}$ C)에서 10분간 반응시킵니다.
- 10분 후 반응 정지액 (Stop Solution)을 50 μ l 씩 첨가하여 반응을 중지시킵니다.
- 판독기 (ELISA Reader)의 450nm에서 흡광도(A450)를 측정합니다

(4) 결과

- 실험군과 대조군 각각 10두에 대한 항체가 분석결과

< 무침주사기 >

VDC 순번	검체번호	S/P값	판정
1	1주령-1	0.8286	양성
2	1주령-2	0.5879	양성
3	1주령-3	0.9225	양성
4	1주령-4	0.4881	양성
5	1주령-5	0.8967	양성
6	1주령-6	0.6262	양성
7	3주령-1	0.4680	양성
8	3주령-2	0.6359	양성
9	3주령-3	1.1603	양성
10	3주령-4	0.5001	양성

< 일반주사기 >

VDC 순번	검체번호	S/P값	판정
1	1주령-1	0.9208	양성
2	1주령-2	0.8680	양성
3	1주령-3	0.9456	양성
4	1주령-4	0.2345	음성
5	1주령-5	0.5710	양성
6	1주령-6	0.5122	양성
7	3주령-1	0.9734	양성
8	3주령-2	0.0422	음성
9	3주령-3	0.5281	양성
10	3주령-4	0.1248	음성

항목	제조사	결과판정(S/P Value)	
		양성	음성
JEV	MEDIAN	0.25이상	0.25미만

(5) 고찰

- 무침주사기 접종 시험군에서는 1주령 6두, 3주령 4두 모두에서 양성을 확인하였다.
- 일반주사기 접종 대조군에서는 1주령 5두(83.3%), 3주령 2두(50%)에서 각각 양성을 확인하였다.

3. 피내접종용 무침주사기의 개선 방향 및 농장적용 방안 제안

(1) 실험 디자인 및 검사 시료

- 신선한 돼지 혈청을 사용하며, 채취된 시료는 냉장고에 보관하면서 1주일 이내에 검사에 사용하고, 시료를 1주이상 보관하는 경우 -20℃ 이하로 냉동하여 보관하고 용혈이 심하게 관찰되는 시료는 비특이반응이 있을 수 있으니 가능하면 사용하지 않는다. 시료가 혼탁한 경우 원심분리 후 상층액을 채취하여 사용한다.

표 130 실험디자인 및 처치 일정

주령	개체수	백신	채혈	비고
1	20		채혈	
3	20		채혈	
5	20	Suishot(Circo-One)*	백신(무침)	
7	20		채혈	
9	20		채혈	
11	20		채혈	

★ Porcine circovirus type2 inactivated vaccine(Cavac.co.kr)

(2) 시료 및 시약 희석

- 희석용 튜브에 검체 희석액390ul와 양성대조와 음성대조 그리고 시료를 10ul씩 분주하여 40배 희석한다.
- 20X Washing Buffer를 D.W와 희석하여 1X로 만든다.

(3) 검사순서

- 항원 흡착 플레이트를 실온에 두고 10~20분 가량 방치 후 희석된 양성/음성대조 및 시료를 각 100ul씩 동일하게 분주한 후 실온(18~25℃)에서 30분 반응시킨다.
- 1X Washing Buffer 200~300ul를 사용하여 5회 세척하고 마지막 세척 후에는 플레이트를 잘 두드린다.
- 접합체액(Conjugate)을 각 well에 100ul씩 분주하고 실온(18~25℃)에서 30분 반응시킨다.
- 1X Washing Buffer 200~300ul를 사용하여 5회 세척하고 마지막 세척 후에는 플레이트를 잘 두드린다.
- 기질액을 각 well에 100ul씩 분주하고 실온에서 15분간 반응시킨다.
- 15분 후 정지액(Stop solution)을 각 well에 100ul씩 첨가하여 반응을 중지 시킨 후 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정한다.

(4) 결과

- 유효성 평가
 - ① 양성평균 흡광도 (PC OD mean) : 0.4 이상
 - ② 음성평균 흡광도 (NC OD mean) : 0.2 미만
- 결과판정
 - ① S/P = (가검시료 평균 OD - 음성대조 평균 OD)/(양성대조 평균 흡광도 - 음성대조 평균 흡광도)
 - ② S/P 값 0.4 이상 이면 양성
 - ③ S/P 값 0.4 미만 이면 음성
- 결과

주령	S/P값(mean ± SD)		양성율	
	무침	일반	무침	일반
1	2.87 ± 0.15			
3	2.56 ± 0.44			
5	1.19 ± 0.26	1.19 ± 0.26	90(접종전)	
7	1.49 ± 0.84	1.62 ± 0.81	88.9	85.7
9	0.65 ± 0.55		69.2	
11	0.81 ± 0.25	0.88 ± 0.35	66.7	50.0

Negative	0.0618	less than 0.2
Positive	0.85235	greater than or equal to 0.4
Pcx-NCx	0.79055	

비고) 실험 사진



(5) 고찰

- 일반적으로 PCV 백신의 모체 이행항체의 영향으로 10주령까지는 항체수준이 유지되는 것으로 알려져 있음
- 본 연구에서도 접종전 1, 3 및 5주(접종전 채혈)에서는 항체가가 유지되고 있었다.
- 7주령 및 8주령에서도 항체가가 유지되면서 양성율이 무침군 88.9% 및 69.2% 였고, 일반주사기 군에서도 85.7%였다.
- 11주령에서는 항체 수준은 무침군 평균 0.81, 일반주사기 평균 0.88로 비슷하였고, 양성율은 7주령에 비하여 낮아졌으나 무침군 66.7% 및 일반주사기 50% 였다.
- 썬코 바이러스의 감염 특성은 50일령(7주령 이후)에 감염률이 증가하기 시작해 75일령(10-11주령)에 가장 높은 감염률을 보인다.
- 모체이행항체의 간섭이 있어 장기간 실험을 하여야 하지만, 감염기간이 11주령 정도로 인하여 실험 기간이 12주 이상으로 증가되어야 하지만, 농장 관리상 기간 연장에 어려움 있음
- 11주 이후 실험은 귀표 탈락으로 재시험 중

4) Mycoplasma H

(1) 실험 디자인 및 검사 시료

- 신선한 돼지 혈청을 사용하며, 채취된 시료는 냉장고에 보관하면서 1주일 이내에 검사에 사용하고, 시료를 1주이상 보관하는 경우 -20℃ 이하로 냉동하여 보관하고 용혈이 심하게 관찰되는 시료는 비특이반응이 있을 수 있으니 가능하면 사용하지 않는다. 시료가 혼탁한 경우 원심분리 후 상층액을 채취하여 사용한다.

표 134. 실험디자인 및 처치 일정

주령	개체수	백신	백신/채혈	비고
2	20	Mycogard 1 time*	채혈	
3	20		채혈	
5	20		채혈	
7	20		채혈	

★ Mycoplasma hyopneumoniae antigen(ATCC strain #25095)

(2) 시료 및 시약 희석

- 희석용 튜브에 검체희석액 390ul와 시료를 10ul씩 분주하여 40배 희석한다.
- 10X Washing Buffer를 D.W와 희석하여 1X로 만든다.

(3) 검사순서

- 항원 흡착 플레이트를 실온에 두고 10~20분 가량 방치 후 양성, 음성 대조액(희석하지 않는다.)과 희석된 시료를 각 100ul씩 동일하게 분주한 후 실온(18~25℃)에서 30분 반응시킨다.
- 1X Washing Buffer 200~300ul를 사용하여 5회 세척하고 마지막 세척 후에는 플레이트를 잘 두드린다.
- 접합체액(Conjugate)을 각 well에 100ul씩 분주하고 실온(18~25℃)에서 30분 반응시킨다.
- 1X Washing Buffer 200~300ul를 사용하여 5회 세척하고 마지막 세척 후에는 플레이트를 잘 두드린다.
- TMB를 각 well에 100ul씩 분주하고 실온에서 15분간 반응시킨다.
- 15분 후 정지액(Stop solution)을 각 well에 100ul씩 첨가하여 반응을 중지 시킨 후 ELISA reader로 650nm에서 흡광도를 측정한다.

(4) 결과

- 유효성 평가

- ① 양성평균 흡광도 (PC OD mean) : 0.150 이상
- ② 음성평균 흡광도 (NC OD mean) : 0.150 미만

- 결과판정

- ① S/P = (가검시료 평균 OD - 음성대조 평균 OD)/(양성대조 평균 흡광도 - 음성대조 평균 흡광도)
- ② S/P 값 0.4 이상 이면 양성
- ③ S/P 값 0.3 미만 이면 음성
- ④ S/P 값 0.3 과 0.4 사이 이면 의양성

- 결과

주령	S/P값(mean±SD)	양성율(%)
2	0.16±0.09	0
3	0.13±0.03	0
5	0.16±0.10(접종)	0
7	0.55±0.21	80

Negative	0.0618	less than 0.2
Positive	0.85235	greater than or equal to 0.4
Pcx-NCx	0.79055	

(4) 고찰

- 접종 전 1-5주차에는 S/P값이 평균 0.13 - 0.16이었으나 접종 2주차에는 평균 0.55로 상승하였고, 양성율도 80%였다.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

[주관연구기관: 미라클스코프(주)]

□ 1차년도 연구개발성과 : 주관기관 미라클스코프(주)

- 사용자 요구사항 분석 및 개발사양 확정: 100%
 - 사용자(농장, 수의사 등)의 요구사항을 파악하여 개발제품의 사양을 확정함.
- 사용자 요구사항을 반영한 제품 디자인 개발: 100%
 - 유사 제품 디자인을 참고로 사용자의 요구사항을 반영한 10종의 제품 디자인 시안을 작성함.
 - 차기년도에 제품 디자인을 확정하고, 이를 바탕으로 기구 설계 및 시제품 제작을 진행할 예정임.
- 피내접종용 무침주사기 핵심모듈 개발 및 원천기술 확보: 100%
 - 토출압력 및 토출량 시뮬레이션을 통해 압축실린더 내부의 직경/길이 및 노즐 직경을 확정함.
 - 내구성, 경량화, 생산성을 고려한 압축실린더 모듈의 구조설계 및 제작을 수행함.
 - 동시 2종의 백신 접종을 가능하게 하고, 동일 백신 접종 시 백신 흡수율을 높일 수 있는 듀얼 노즐 헤드에 대한 설계를 완료함,
- IT 기술을 활용한 무침주사기 성능 개선: 100%
 - 약물 센싱 기술: 임피던스의 측정으로 약물의 유무를 감지할 수 있는 회로 및 PCB 설계를 완료함.

- 모션 제어 기술: MEMS gyroscope인 TDK사의 MPU-9250 IC를 사용하여 무침주사기의 자세를 센싱할
있는 회로 설계를 완료함.
- 백신 온도 제어 기술: 동절기 원할만 백신 접종을 위해 온도 센서부와 히터부로 구성된 회로 및
PCB 설계를 완료함.
- 개발된 핵심 모듈의 평가기준 확립 및 특성 평가: 100%
- 토출압력 및 토출량에 대한 평가방법 및 평가기준을 확립함.
- 실제 평가를 통해 평가방법 및 평가기준의 유효성을 검증함.
- 약물 전달 시 페인팅 기능 추가: 100%
- 기기 본체에 탈부착이 가능한 페인팅 모듈에 대한 설계를 완료함.

□ 2차년도 연구개발 성과 : 주관기관 미라클스코프(주)

- 무침주사기 및 사용자 관리를 위한 ICT 기술 개발 : 100%
- 사용자 관리용 데이터 저장을 위한 서버를 구축함.
- 사용자 관리용 데이터 서비스를 위한 백엔드 서버프로그램의 사양을 설계하고 개발함
- 사용자 관리를 위한 프론트엔드 프로그램의 사양을 설계하고 개발함

- 무침주사기 제품 디자인 확정 및 모델링 : 100%
- 듀얼 무침주사기 핵심 모듈의 부품을 확정하고, 모델링하고 사양을 확정함.
- 듀얼 모듈형태의 무침주사기를 디자인을 확정하고 모델링함

- 평가용 무침주사기 시제품 개발 : 100%
- 평가용 무침주사기 시제품은 농장현장에서의 요구조건 및 불편사항들을 반영하여 개발되고 제작되
었음.
- 농장현장의 요구조건들은 (1) 토출압력 높일 것 (1) 사용횟수 문제 해결, (2) 노즐 막힘 최소화
(4) 사용자 UI인터페이스 간편화 등이 었음
- 토출압력은 내부 부품 사양 변경 및 구조를 변경으로 해결 하였음. 압력측정 시험결과에 의하면 변
경전에 비해 변경후 압력이 약 60%향상되었음
- 노즐 막힘은 노즐 구조 개선(약물 분사부 탈착 가능 구조 변경)으로 해결 하였음.
- 사용횟수 문제는 농장현장에서 사용시 공타 및 이물에 의한 밸브의 잦은 파손 문제를 해결하기 위
해 역류방지 밸브 구조 및 내부 파손 부품 구조 등 내부구조를 개선하였음.

- 시제품 평가 : 100%
- 개발된 시제품은 자체 또는 실험농장시험을 실시하였음
- 실험 농장 시험은 미라켓-100 기기 사용 농장 뿐만아니라 한돈혁신센터에서 검역본부와 공동으로
돼지 연령별 및 부위별 주입 시험을 실시하였음
- 성능시험은 배터리 전압별 토출압력 시험/배터리 전압별 토출용량 시험/배터리 전압별 토출시간
시험/배터리 전압별 충전시간 시험 등을 실시하였음.

□ 3차년도 연구개발 성과 : 주관기관 미라클스코프(주)

- 피내접종용 무침주사기 상용 시제품 제작 : 100%
- 고객의 요구조건인 사용의 편리성, 고장시 현장조치 가능 등을 반영한 제품디자인 완료함
- 핵심부인 구동/제어부 보드 및 프로그램 개발, 구동부 모듈화 및 시제품 설계 및 제작을 완료함

- 피내접종용 무침주사기 상용 시제품 성능, 내구성 등 평가 : 100%
- 상용화를 위한 평가항목 (토출압력, 토출량, 배터리 수명, 내구성)을 선정하고 평가 방법을 확립
함.
- 확립된 평가항목에 대한 평가를 실시함

- 인증용 공인시험기관에서 시험 실시 및 성적서 발급 : 90%
 - 한국기계전자시험연구원과 동물의료기기 인허가 시험방법에 협의 완료
 - 사업기간내 한국기계전자시험연구원에 인허가용 공인시험 의뢰 완료
 - 인허가용 공인시험 진행중 (3월내로 완료 예정)

- 피내접종용 무침주사기 제조업허가 및 품목허가 획득 : 70%
 - 품목허가용 기술문서 작성완료
 - 동물의료기기(무침주사기) 제조업 허가 완료
 - 품목허가는 공인시험완료후 기작성된 기술문서를 검역본부에 제출하여 품목허가를 획득할 예정임
 -

- 마케팅 및 상용화 준비 : 100%
 - 외국계 지사장 10년 이상의 경력이 있는 전문가 채용
 - 국내 : 특허등록, 전시회참가, 경연대회참가, 월간지 광고 게재
 - 국외 : 중국 임상시험 완료, 태국 임상계획수립 및 2024년 해외전시회 3개 참가 예정(베트남, 중국, 유럽)
 - 상용화를 위한 BOM, 원가분석, 협력업체, 제조시설 등 완료

[공동연구기관1: (주)고려비엔피]

□ 1차년도 연구개발 과제 수행 : 공동연구기관1 (주)고려비엔피]

- 국내 분리주 PCV2를 이용한 PCV2 VLP 항원 개발: 100%
 - 선행 연구과제를 통하여 확보한 PCV2 바이러스주 중에서 국내 유행 바이러스주와 교차면역원성이 높은 분리주를 선발하였음. 선발된 바이러스의 유전자를 기반으로 곤충세포에서 baculovirus expression system을 이용하여 PCV2 VLP항원을 개발하였음.

- PCV2 VLP 항원의 대량 생산 공정 확립: 100%
 - PCV2 VLP를 대량생산하기 위하여 다양한 조건 시험을 통하여, 동물용 백신 상업화에 적용할 수 있을 정도의 항원 생산 경제성을 확보하였음.

- 실험동물을 이용한 PCV2 VLP 항원의 면역원성 확인: 100%
 - 상기에서 생산된 PCV2 VLP항원의 면역원성을 시험동물, 목적동물에서 확인하였고, 이는 본 과제에서 생산된 VLP항원을 백신 상용화에 적용할 수 있음을 증명하였음.

- 피내접종용 adjuvant 선발: 100%
 - 다양한 물질의 조합을 포함하는 시험백신을 제조하였고, 시험동물, 목적동물을 대상으로 제조된 각각의 시험백신을 피내 접종한 후 면역원성을 확인하였고, 이 adjuvant를 피내 접종용으로 결정하였음.

- 목적동물에서 시험백신의 무침주사기 적용 시험: 100%
 - 목적동물을 대상으로 기 개발된 무침주사기를 사용하여 피내접종 적용시험을 통하여, 피내 접종용 백신제품의 특성 및 조성에 대한 기초자료를 확보하였음.

□ 2차년도 연구개발 성과 : 공동연구기관1 (주)고려비엔피]

- Mycoplasma 항원의 대량 생산법 확립 및 경제성 확보: 100%
 - 야외분리주 중에서 증식성이 우수한 균주를 선발하였고, 마이코플라즈 최적화 배지에서 대량생산 조건을 확립하였고, 항원 생산 경제성을 확보하였음.
 - 대장균에서 재조합 단백질 P97을 발현, 정제, 그리고 동물실험을 통하여 P97의 면역원성을 확인하였음.

- Mycoplasma 항원의 면역원성 평가: 100%
 - 마이코플라즈마 최소 항원량 결정시험(실험동물, 목적동물)을 통하여, 백신에 포함될 항원량을 결정하였음.
 - OPM 추출공정, 재조합 단백질 P97 생산법을 세팅하였고, 그 면역원성 평가에 필요한 in-house

ELISA 조건을 확립하였음.

- 피내접종용 신규 어쥬번트의 선발 및 평가: 100%
- 피내접종용 백신 조성에 필요한 신규 adjuvant를 선발하였고, 그 면역유도능 평가를 완료함.
- 피내접종용 mycoplasma 백신 시제품 제작:100%
- 상지에서 선발된 피내접종용 adjuvant와 마이코플라스마 항원을 포함하는 시제품을 제조한 후, 그 안전성, 안정성, 그리고 동물실험(실험동물, 목적동물)을 통하여 그 유효성을 평가하였음.

□ 3차년도 연구개발 성과 : 공동연구기관1 (주)고려비엔피]

- 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 시제품 제작 :100%
- 1차, 2차년도 연구를 통하여 시험백신의 조성을 결정하였고, 이 조성비를 기반으로 백신 시제품 3 lot를 제조한 후, 냉장온도에 보관하면서 다음의 시험에 사용하고 있음.
- 시제품의 안정성 평가는 동물의약품 국가검정기준에 따라, 일정한 조건에 보관하면서 정해진 일정 에 따라 시제품의 특성 분석을 진행하고 있음.
- 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 시제품의 유효성 평가 : 100%
- 백신 시제품을 사용하여 실험동물과 목적동물 실험을 통하여, 시제품의 면역원성, 면역지속성, 그 리고 방어능 평가 시험을 완료하였음.
- 백신 시제품의 안전성, 안정성, 유효성은 동물의약품 국가검정기준에 따라 지속적으로 진행하고 있음.
- 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 시제품 임상시험계획서 작성 및 제출 :100%
- 농림축산검역본부에 “힘백 돈호방 써코2D+M ID 주” 복합 백신 임상시험계획서를 제출하였음.
- 수출용품목허가
- 농림축산검역본부로부터 “힘백 돈호방 써코2D+M ID 주” 수출용품목허가를 취득하였음.

[공동연구기관2: 한국농수산대학교]

□ 1차년도 연구개발 성과 : 공동연구기관2 한국농수산대학교

- 압력 개선된 피내 접종용 무침주사기의 효능, 및 농장적용 평가 :100%
- 3개 이상 시험농장에서 무침주사기 적용 평가
- 오일백신 및 수용성백신에 대한 효능 평가
- 피내 접종용 무침주사기의 개선 방향 제안 :100%
- 개선방향으로 기존 압력 0.6파스칼로는 10주령 미만은 가능하지만 범용성확대를 위해서는 0.7파스 칼 이상으로 압력 조절 필요
- 압력 조절 주사기는 10주령 이상에서도 사용 가능함
- 구제역 및 돈열 백신 피내접종 효능 및 안전성 평가 : 100%
- 구제역 효능 평가에서 접종 후 1개월까지는 기존 주사기에 비하여 항체가 양성율이 낮으나 2개월 이후에는 동일하게 나타남
- 돈열 백신의 경우는 접종 후 1개월에서 접종량 12.5%에서도 항체 역가가 발현되어 향후 백신 사용 양 감소 등에 효과적으로 이용이 가능함
- 구제역 및 돈열 백신 접종 개선 방향 제안 : 100%

□ 2차년도 연구개발 성과 : 공동연구기관2 한국농수산대학교

- 최근 구제역 백신 변경에 따른 피내접종 효과 및 무침주사기 효능, 안전성 및 농장적용 평가
- 주입 부위, 넓이 및 깊이 확인
- PCV2 및 Mycoplasma 백신의 피내접종 효능 평가
- 백신 접종에 따른 주령별 양성율이 안정적으로 나타남
- Mycoplasma는 6주령(접종 후 4주이후)부터 양성이 발현됨
- PCV2 백신 효능평가를 위한 공격접종 모델 확립으로 향후 안정적인 백신 평가 체계 마련

□ 3차년도 연구개발 성과 : 공동연구기관2 한국농수산대학교

- 구제역 백신 용량 및 주입 회수에 따른 무침주사기 효능 및 농장 적용 평가 : 1회 0.5ml 효과 확인
- PED 및 일본 뇌염 백신에 대한 무침주사기 사용 효능 및 농장 적용 평가
 - PED 무침주사기 80% > 일반주사기 20%, 일본 뇌염 무침주사기 83.3% > 일반주사기 50%
- PCV 및 Mycoplasma 백신의 피내접종 효능 및 농장 평가
 - PCV 백신 양성율이 11주령에서 무침군 66.7% 및 일반주사기 50%
 - 백Mycoplasma 접종 2주차에는 S/P값 평균 0.55로 상승하였고, 양성율도 80%
- 농장 단위에서 이용하고 있는 다양한 백신(FMD, PED, 일본뇌염, PCV, Mycoplasma)에 대한 무침주사기 효능 및 농장 적용 시험으로 향후 이용 여건을 개선함

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성, 연구개발과제의 특성에 따라 수정 가능합니다)

<연구개발성과 목표 대비 실적>

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문 SCI	비 SCI	논문 평균 IF			학술발표	정책 활용	
단위	건	건	건	평균등급	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	5					35	20	0	10				10		5		5		
최종목표	2	2			1		2	7,200	1,900	5				2	3		7		5	
사업기간 내	목표	2	1				1	100		2				1	2		5		1	2
	실적	2	2				1	400	20	2				2	0		2		1	3
사업종료 후 5년	목표		1		1		1	7,100	1,900	3				1	1		2			3
	실적																			
합계	2	2			1		2	7,200	1,900	5				2	3		7		1	5

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재 : SCI 논문 : 목표(1건), 실적(2건)

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Protective immunity induced by concurrent intradermal injection of porcine circovirus type 2 and Mycoplasma hyopneumoniae inactivated vaccines in pigs	Vaccine	Sim-In Lee	39		Vaccine	SCIE			100
2	Intradermal inoculation of inactivated Foot-and-Mouth disease vaccine induced effective immune responses comparable to conventional intramuscular injection in pigs	vaccines	Sim-In Lee	12(120)		vaccines	SCI	2024.2.13		100

국내 및 국제 학술회의 발표 : 목표(5건), 실적(2건)

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2022 대한바이러스학회	Hye-Ryung Kim	2022.08.26	강원도 양양 을지인력개발원	
2	2023 아시아양돈수의사 심포지엄	Saejin Kim	2023.08.01	대만 국제컨벤션센터	대만

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권 - 별첨참조

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	약물주입단자를 구비한 무침주사기		미라클 스코프 (주)	2020.10.26	10-2020-0138929		미라클 스코프 (주)	2022.11.01	10-2463473	100	유
2	캠팔로워 부하 감소형 무침주사기		미라클 스코프 (주)	2021.09.06	10-2022-0147516		미라클 스코프 (주)	2023.11.30	10-2610301	100	유

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√	√	√							
2	√	√	√							

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증 - 별첨참조

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		
1	혁신제품인증	농림축산식품부	피내접종용 분사식주사기	2022-006	2022.03.25	대한민국

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일

[경제적 성과]

시제품 제작 - 별첨 참조

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	힘백 돈호방 써코2D+M ID 주	2023.09	(주)고려비엔피		임상시험용			
2	분사식 무침주사기	2023.01	미라클스코프 (주)		제품화	2년		

기술 실시(이전) - 별첨참조

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	지적재산권	돼지 피내접종용 분사식 무침주사기	농림식품부	2024.06.30		

사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

□ 사업화 현황 - 별첨참조

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품개발	국내	구제역 백신용 무침주사기 사업화	무침주사기 제품 개발 및 인허가 인증	미라클스코프(주)	411,000천원		2021	10

□ 매출 실적(누적) - 별첨참조

- (1) 국내 매출액 : 목표 (100백만원), 실적(311백만원)
- (2) 국외 매출액 : 목표 (0), 실적(14백만원)

사업화명	발생 연도	매출액		합계(천원)	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
무침주사기 사업화	2022	6,363		6,363	조은솔농장 세금계산서
무침주사기 사업화	2022	12,500		12,500	(주)고려비엔피 세금계산서
무침주사기 사업화	2022	4,545		4,545	대한에코팜 세금계산서
무침주사기 사업화	2022	26,250		26,250	(주)동진비엘에스 세금계산서
무침주사기 사업화	2022	52,500		52,500	툴라스 세금계산서
무침주사기 사업화	2022	9,090		9,090	학성농장 세금계산서
무침주사기 사업화	2022		\$4,000	5,200	수출면장
무침주사기 사업화	2023		\$7,000	9,100	수출면장
무침주사기 사업화	2023	300,000		300,000	제주특별자치도 지방보조사업
합계		411,248		425,548	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

- (1) 돼지 피내접종용 무침주사기

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	○ 피내접종용 무침주사기 -> 과제 종료 후 1년 이내			
	소요예산(천원)	○ 피내접종용 무침주사기 금형비 및 양산 원자재 -> 200,000억원			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		500,000천원	2,000,000천원	5,000,000천원	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			국내	30	50
국외			0	1	3
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
		500,000천원	2,000,000천원	5,000,000천원	
수출		15,000천원	1,000,000천원	2,000,000천원	

- (2) 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신

성과				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	○ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신개발 --> 과제 종료 후 3년 (제품허가 취득 기간이 필요함)		
	소요예산(천원)	○ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신개발 --> 3억원		
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
			500,000천원	1,000,000천원
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내				
국외				
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수) 수 출	현재	3년 후	5년 후

□ 고용 창출 - 별첨참조

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)			합계
			2021년	2022년	2023년	
1	기술사업화지원 사업	미라클스코프(주)		1	1	2
2	기술사업화지원 사업	(주)고려비엔피		1	0	1
합계				2		3

(1) 고용창출: 목표(2명), 실적(2명)

성명	박철수	안성수
참여기관	미라클스코프	미라클스코프
고용일	2022.03.01	2023.12.12
참여기간	2022.03.01. ~ 2023.12.31	-
참여율	10%	-
주요경력	ICT 개발 28년 경력	외국계 회사 한국지사장 15년 포함, 25년 경력
담당 역할	연구개발	해외 마케팅

(2) 고용창출: 1명 (청년의무고용) - 목표(1명), 실적(1명)

성명	이승철
기관	(주)고려비엔피24
고용일	2022.01.24
당해연도 참여기간	22.02.01~23.12.31
당해연도 참여율	10.8%
담당 역할	동물실험

□ 고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	1
		생산인력	1
	개발 후	연구인력	3
		생산인력	3

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도	무침주사기	10,000,000	5,000,000	50,000,000		10	
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
		2022		1				1					1	

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적 : 목표(2건), 실적(6건) - 별첨참조

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	월간지 제품홍보	피크엔포크	국내기술로 개발된 사용자 중심의 'Mirajet-100'	2022.01.24
2	전시회 참가		2022 학국국제축산 박람회 전시회 참가	2022.09
3	전시회 참가		2022 학국국제축산 박람회 전시회 참가	2023.09
4	전시회 참가		농림축산식품 과학기술대전	2022.11
5	월간지 제품홍보	피크엔포크	매월 광고	
6	월간지 제품홍보	월간 한돈	매월 광고	

포상 및 수상 실적 - 별첨참조

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	상용화 컨테스트	2023 농식품 R&D 기술상용화 컨테스트에서 우수상 수상	농식품부 과제중 기술상용화 컨테스트		2023.12	농식품부

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 피내접종용 무침주사기 상용 시제품 제작	- 고객의 요구조건인 사용의 편리성, 고장시 현장조치 가능 등을 반영한 제품디자인 완료함 - 핵심부인 구동/제어부 보드 및 프로그램 개발, 구동부 모듈화 및 시제품 설계 및 제작을 완료함	100
○ 피내접종용 무침주사기 상용 시제품 성능, 내구성 등 평가	- 상용화를 위한 평가항목 (토출압력, 토출량, 배터리 수명, 내구성)을 선정하고 평가 방법을 확립함. - 확립된 평가항목에 대한 평가를 실시함	100
○ 인증용 공인시험기관에서 시험 실시 및 성적서 발급	- 한국기계전자시험연구원과 동물의료기기 인허가 시험방법에 협의 완료 - 사업기간내 한국기계전자시험연구원에 인허가용 공인시험 의뢰 완료 - 인허가용 공인시험 진행중 (3월내로 완료 예정)	90
○ 피내접종용 무침주사기 제조업허가 및 품목허가 획득	- 품목허가용 기술문서 작성완료 - 동물의료기기(무침주사기) 제조업 허가 완료 - 품목허가는 공인시험완료후 기작성된 기술문서를 이용하여 검역본부에서 획득할 예정임	70
○ 마케팅 및 상용화 준비	- 외국계 지사장 10년 이상의 경력의 전문가 채용 - 국내 : 특허등록, 전시회참가, 경연대회참가, 월간지 광고 게재 - 국외 : 중국 임상시험 완료, 태국 임상계획수립 및 2024년 해외전시회 3개 참가 예정(베트남, 중국, 유럽) - 상용화를 위한 BOM, 원가분석, 협력업체, 제조시설 등 완료	100
○ PCV2, Mycoplasma 항원 대량생산법 확립 및 경제성 확보	- PCV2 항원을 곤충세포에서 VLP형태로 대량생산하는 기술을 안정화 시켰음 - Mycoplasma항원 대량생산에 필요한 증식배지의 최적화 조건 확립 및 항원생산 경제성을 확보하였음	100
○ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합 백신 시제품 제작	- 백신 시제품을 완료하였고, 시제품의 국가검정기준에 부합함을 확인하였음	100
○ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합 백신의 유효성 평가	- 백신 시제품의 유효성 평가(안전성, 안정성, 면역원성, 방어능)을 완료하였음.	100
○ 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 복합 백신 임상시험계획서	- 백신 시제품의 유효성을 평가를 완료한 후, 임상시험계획서를 검역본부에 제출하였음.	100
○ 피내접종 주사기 및 백신 효능/안전성 평가	- 피내접종용 무침주사기 활용도 향상 방안 및 평가 - 피내접종용 무침주사기의 개선 및 농장적용 방향 제안	100 100

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 과제 기간내 제품 개발, 자체 평가, 기술문서작성, 임상시험, 인증을 위한 시험규격 협의 및 공인 시험기관(한국기계전자시험연구원) 의뢰를 완료하였으나, 해외바이어(베트남, 태국, 중국 등)의 사양 변경 요청으로 제품 구조 변경에 따른 지연
- 해외바이어의 요청은 다음과 같다.
 - ① 무침주사기의 압력 매우 높기 때문에 사용중에 고장 확률이 매우 높다.
 - ② 고장시, 현지 대리점에서 A/S가 가능하도록 제품 구조 변경을 요청함.
- 미라클스코프는 주요 고장원인 및 고장부위를 분석하고 고장부위를 탈부착가능한 구조로 변경함. 이에 따라 일정이 지연됨

2) 자체 보완활동

-
- 일정 앞당기기 위해서 제품을 6대 제작하여 동시에 여러 인증시험을 실시하고 있음.
 - 또한, 공인시험을 신속히 진행하기 위해 일부 평가항목 (압력시험, 토출량시험, 배터리 수명)들은 자체평가 완료하였음
 - 시험 완료 후, 신속한 품목 인허가 획득을 위해서 원가분석, 기술문서작성, 제조 허가 등을 완료하였음.
-

3) 연구개발 과정의 성실성

1. 마케팅 계획수립 및 실적

(1) 국내 마케팅

- 제주도 한돈협회 지부 전문가 초청 세미나 실시
- 국내 전시회 3회 참가
- 월간한돈 및 피그엔포크에 매월 광고 게재
- 혁신제품 지정
- 농식품부 R&D 상용화 컨테스트에서 우수상 수상

(2) 해외 마케팅

- 2024년도 베트남(일텍스, 호치민축산업전시회 5/29~5/31), 중국(남경 국제 축산박람회(VIV China, 9/5 ~ 9/7)), 유럽(유로티어, 하노버축산업전시회, 11/12~11/15) 등 전시회 3회 참가 예정
- 중국 마케팅진행사항
 - ① 대리점 판매계획 : 중국내 농축산기자재업체와 판매계약
 - ② 수량 : 12대 납품(2023년 기준)
 - ③ 진행현황 : 운스집단(모돈30만두의 대형농장)과의 구제역백신 임상시험에서 합격함으로 인한 2024년 대량 판매전망
- 태국 마케팅진행사항
 - ① 대리점 판매계획 : 대형농축산기자재업체(UAP, Union Agriphar Co)와 판매계약 추진중
 - ② 수량 : 2대 납품예정
 - ③ 진행현황 : 국제농장체인 대기업인 CP사와 King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang(KMITL)와 돼지백신 임상시험준비중, 이시험에 합격하면 CP사에서 대량 구매 예상.
- (3) 마케팅 전문가 인력충원
 - 유럽 외국계회사 15년 지사장 경력자 채용하여 국내외 마케팅 강화

2. 자체 기술로 제품 개발 및 특허 등록

- (1) 특허 등록 : 2건 완료
- (2) 자체 기술로 개발
 - 구동 및 제어 보드 및 프로그램 자체 개발
 - 기기 케이스 및 내부 기구부 자체 개발
 - 핵심 구동 메카니즘 자체 개발
- (3) 핵심부 모듈화 개발 및 특허 등록 완료
- (4) 해외바이어 요청의 고장부위 탈부착구조의 제품 제작 완료

3. 관련 단체 및 임상농가에서 지속적 임상시험 실시

- (1) 국내 임상시험 실시 :
 - 검역본부, 한돈협회 및 일반농장 등에서 임상 평가 완료 : 한돈협회 결과에 따르면 무침주사기 사용시 이상육이 30%에서 2%로 감소함.
- (2) 해외 임상시험 실시
 - 중국 바이어 임상평가 완료 : 임상결과가 양호하여 수출협의중
 - 태국 바이어 임상 시험 계획중

4. 공인시험실시 실시중

- 인허가요 공인시험기관인 한국기계전자시험연구원과 허가용 시험기준 협의 완료
- 기기 6대 제작완료 및 시험 중 (3월중 완료 예정)

5. 양산준비 완료

- 양산에 필요한 BOM, 단가표, 협력업체 등 확보
- 제조 시설 및 동물용의료기기 제조업 허가 완료

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 피내접종용 무침주사기 개발
 - 검역본부와 한돈협회 혁신센터의 2년동안 임상시험보고서에 의하면 무침주사기 사용시 이상육이 30%에서 2%내외로 감소함
 - 농가의 이상육 피해는 1년 2,000억이상이며, 이를 최소화할 것으로 판단됨
- 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신개발
 - 본 사업을 통하여 개발될 제품은 국내 최초로 피내접종용 백신 산업화에 도전하는 것으로, 국내 동물용의약품 개발 기술 수준을 향상시키는 데 기여함.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 피내접종용 무침주사기 개발
 - 해외 지적재산권 확보예정
 - 해외 지사 및 바이어와 협력하여 해외 인증을 획득하고 수출 예정
- 피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신개발
 - 임상시험 완료 후 제품허가를 취득하면, 즉시 제품 산업화가 가능할 뿐만 아니라 시장에서 기술적으 앞선 선도적인 제품으로 자리매김을 할 수 있음.

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내 매년 목표치	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 공통 요구자료	1) 자체평가의견서 2) 연구성과 활용계획서 3) 연구부정행위 예방 확인서
2. 정량적 실적 증빙자료	1) 고용창출 실적 2) 청년고용창출 실적 3) 논문(국내외 전문 학술지) 게재 4) 국내 및 국제 학술회의 발표 5) 특허 출원 6) 혁신제품인증서 7) 시제품 8) 기술실시 보고서 9) 매출 실적 10) 전시회 참가 11) 수상실적

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 민간중심 R&D사업화지원 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 기술사업화지원사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	821070031SB010		
사업구분	기술사업화지원사업				
연구분야	백신 및 접종기기			과제구분	단위
사업명	기술사업화지원사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 개발 및 무침주사기 상용화		과제유형	개발	
연구개발기관	미라클스코프(주)		연구책임자	이계한	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2021. 04. 01 - 2021. 12. 31	219,000	75,000	294,000
	2차년도	2022. 01. 01 - 2022. 12. 31	292,000	100,000	392,000
	3차년도	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31	292,000	100,000	392,000
	4차년도				
	5차년도				
	계	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31	803,000	275,000	1,078,000
참여기업	(주)고려비엔피, 한국농수산대학교				
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
미라클스코프(주)	대표이사	이계한

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

[별첨 1]

연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

- 돼지 백신의 접종부위는 피내/피하이다.
- 무침주사기로 백신을 피내/피하에 접종하기 위해서는 12Mpa정도로 매우 높은 압력을 요구하며 높은 압력은 기기 고장의 원인된다.
- 본 과제에서 높은 압력에서 고장율이 낮고, 고장시에도 현지(해외)조치가 가능한 기술을 확보했다.
- 확보된 기술은 Cam, Dual Followr 등 기술로서, 특허 등록을 완료했으며, 현지(해외)고장부 탈부착 제품은 개발완료했다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

- 전세계가 생활권이 되면서 질병이 확산되어 접종백신이 늘어나고, 백신 판매 경쟁이 매우 심해졌다.
- 본 과제를 통해 무침주사기와 무침용 백신이 개발되면서, 무침주사기는 세계적 경쟁력을 갖고 중국, 대만, 태국 등에 수출 또는 수출예정이며, 무침용 백신 개발이 많이 이루어 지고 있다.
- 또한, 무침주사기를 사용하여 이상육을 30%에서 2.2%로 낮아져 농가 이득을 증대하고 있다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

- 다양한 축종의 무침주사기 개발가능함
- 피내접종용 백신개발 기술을 타 질병의 백신개발에 적용/활용이 가능함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

- #### 1. 마케팅 계획수립 및 실적
- (1) 국내 마케팅
- 제주도 한돈협회 지부 전문가 초청 세미나 실시
 - 국내 전시회 3회 참가
 - 월간한돈 및 피그엔포크에 매월 광고 게재
 - 혁신제품 지정
 - 농식품부 R&D 상용화 컨테스트에서 우수상 수상
- (2) 해외 마케팅
- 2024년도 베트남(일텍스, 호치민축산업전시회 5/29~5/31), 중국(남경 국제 축산박람회(VIV China, 9/5 ~ 9/7)), 유럽(유로티어, 하노버축산업전시회, 11/12~11/15) 등 전시회 3회 참가 예정
 - 중국 마케팅진행사항
 - ① 대리점 판매계획 : 중국내 농축산기자재업체와 판매계약
 - ② 수량 : 12대 납품(2023년 기준)
 - ③ 진행현황 : 운스집단(모돈30만두의 대형농장)과의 구제역백신 임상시험에서 합격함으로 인한

2024년 대량 판매전망

- 태국 마케팅진행사항
 - ① 대리점 판매계획 : 대형농축산기자재업체(UAP, Union Agriphar Co)와 판매계약 추진중
 - ② 수량 : 2대 납품예정
 - ③ 진행현황 : 국제농장체인 대기업인 CP사와 King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang(KMITL)와 돼지백신 임상시험준비중, 이시험에 합격하면 CP사에서 대량 구매 예상.
- (3) 마케팅 전문가 인력충원
 - 유럽 외국계회사 15년 지사장 경력자 채용하여 국내외 마케팅 강화

2. 자체 기술로 제품 개발 및 특허 등록

- (1) 특허 등록 : 2건 완료
- (2) 자체 기술로 개발
 - 구동 및 제어 보드 및 프로그램 자체 개발
 - 기기 케이스 및 내부 기구부 자체 개발
 - 핵심 구동 메카니즘 자체 개발
- (3) 핵심부 모듈화 개발 및 특허 등록 완료
- (4) 해외바이어 요청의 고장부위 탈부착구조의 제품 제작 완료

3. 관련 단체 및 임상농가에서 지속적 임상시험 실시

- (1) 국내 임상시험 실시 :
 - 검역본부와 한돈협회 혁신센터의 2년동안 임상시험보고서에 의하면 무침주사기 사용시 이상육이 30%에서 2%내외로 감소함
 - 농가의 이상육 피해는 1년 2,000억이상이며, 이를 최소화할 것으로 판단됨
- (2) 해외 임상시험 실시
 - 중국 바이어 임상평가 완료 : 임상결과가 양호하여 수출협의중
 - 태국 바이어 임상 시험 계획중

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히 불량)

- (1) 논문 성과
 - 백신의 임상시험 관련 SCI급 논문 2건 게재
- (2) 지적소유권 성과
 - 무침주사기 구조에 대한 원천 특허 2건 등록
- (3) 발표회 개최 성과
 - 전문가를 초빙하여 제주특별자치도 한돈협회제주지부와 공동으로 농가 100여명을 대상으로 무침주사기 설명회 개최

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
피내접종용 무침주사기 상용 시제품 제작	20	100	- 고객의 요구조건인 사용의 편리성, 고장시 현장조치 가능 등을 반영한 제품디자인 완료함 - 핵심부인 구동/제어부 보드 및 프로그램 개발, 구동부 모듈화 및 시제품 설계 및 제작을 완료함
피내접종용 무침주사기 상용 시제품 성능, 내구성 등 평가	5	100	- 상용화를 위한 평가항목 (토출압력, 토출량, 배터리 수명, 내구성)을 선정하고 평가 방법을 확립함. - 확립된 평가항목에 대한 평가를 실시함
인증용 공인시험기관에서 시험	10	90	- 시험용 무침주사기 6대 제작완료

실시 및 성적서 발급			- 한국기계전자시험연구원과 동물의료기기 인허가 시험방법에 협의 완료 - 사업기간내 한국기계전자시험연구원에 인허가용 공인시험 실시중
피내접종용 무침주사기 제조업 허가 및 품목허가 획득	5	70	- 기술문서 작성을 완료함 - 제조시설 확보 및 제조업허가를 획득함 - 인허가용 시험 항목 및 방법을 확립함. - 한국기계시험연구원에서 시험중
마케팅 및 상용화 준비	10	100	- 외국계 지사장 10년 이상의 경력의 전문가 채용 - 국내 : 특허등록, 전시회참가, 경연대회참가, 월간지 광고 게재 - 국외 : 중국 임상시험 완료, 태국 임상계획수립 및 2024년 해외전시회 3개 참가 예정(베트남, 중국, 유럽) - 상용화를 위한 BOM, 원가분석, 협력업체, 제조시설 등 완료
피내 접종용 PCV2/Mycoplasma 복합백신 시제품 제작	30	100	- 백신 시제품을 제작 후, 제품의 유효성 평가를 완료하였음.
피내 접종용 PCV/Mycoplasma 백신개발(임상시험계획서 제출)	20	100	- 백신 제품화 추진과정에 필수적인 “임상시험계획서”를 검역본부에 제출하였음.
합계	100	97.5	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 무침주사기 개발, 백신 개발 및 임상시험은 100%완료 되었음. 인허가용/상용화 무침주사기는 제작되어 인허가용 공인기관(한국기계시험연구원)시험 진행중임.
- 또한, 기술문서작성과 임상시험은 완료하였고, 제조업허가는 보유하고 있음
- 시험 완료 후 품목허가 신청예정임

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 과제 기간내 제품 개발, 자체 평가, 기술문서작성, 임상시험, 인증을 위한 시험규격 협의 및 공인시험기관(한국기계전자시험연구원) 의뢰를 완료하였으나, 해외바이어(베트남, 태국, 중국 등)의 사양 변경 요청으로 제품 구조 변경에 따른 지연
- 해외바이어의 요청은 다음과 같다.
 - ① 무침주사기의 압력 매우기 때문에 사용중 고장 확률이 매우 높다.
 - ② 고장시, 현지 대리점에서 A/S가 가능하도록 제품 구조 변경을 요청함.
- 미라클스코프는 주요 고장원인 및 고장부위를 분석하고 고장부위를 탈부착가능한 구조로 변경함. 이에 따라 시험 및 인허가 일정이 연기됨

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- (1) 과제 향후 조치
 - 품목 인가는 2024년 상반기에 완료할 예정
- (2) 국내
 - 양산준비는 완료되어 있어 2024년 하반기부터 양산 예정임.
- (3) 해외 : 2024년 주요 계획은 CE 인증, 해당국가 임상 실시, 제품 수출 시작
 - 2024년 하반기 CE 인허가 획득 예정
 - 중국, 태국, 베트남 및 기타 지역 임상시험 실시 예정
 - 해외 전시회(베트남, 중국, 독일 등 전시회참가) 참가 및 바이어를 통해 해외 고객을 확보하고 수출 예정.

IV. 보안성 검토

- 개발 결과물은 보완 서버에서 관리하고 있고 외부 유출시 관리자 승인을 거쳐 보완유지
- 또한 중요한 결과물은 특허 출원으로 지적재산권을 확보하고 있음.

1. 연구책임자의 의견

- 보완에 문제 없음

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

- 보완에 문제 없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	백신 및 무침주사기	
연구과제명	피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 개발 및 무침주사기 상용화			
주관연구개발기관	미라클스코프(주)		주관연구책임자	이계한
연구개발비 (천원)	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	803,000	275,000		1,078,000
연구개발기간	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 피내접종용 무침주사기 제품 개발 및 임상시험	100% 완료 - 무침주사기 시제품 및 상용제품 개발 완료함 - 참여기관, 한돈협회혁신센터, 검역본부, 사육농가 등에서 임상시험을 완료함
② 피내접종용 무침주사기 공인시험성적, 제조업허가 및 품목허가 획득	90% 완료 - 기술문서 작성을 완료함 - 제조시설 확보 및 제조업허가를 획득함 - 인허가용 시험 항목 및 방법을 확립함. - 한국기계시험연구원에서 시험중
③ 피내접종용 자돈용 복합 백신 개발한 후, 개발백신의 유효성을 확인하고, 이를 바탕으로 임상시험계획서를 농림축산검역본부에 제출함.	100%완료 - 임상시험계획서 제출 완료 - 수출용제품허가 취득 완료

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식재산권				기술실시(이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타 (타연구활용액)
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문SCI	비SCI			논문평판IF	학술발표	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건		건	명	건	건	
가중치	10	5					35	20	0	10				10		5		5	

최종 목표	2	2			1		2	7,200	1,900	5			2	3		7		1		5
당해 년도	목표	1	1				1	100		1			1			2				1
	실적	1	1				1	411	15	1			1			1				2
달성률 (%)	100	100					100	400		100			100			50				200

4. 핵심기술

구분	핵심기술명									
①	돼지 백신 접종용 무침주사기 상용화 기술 확보									
②	무침주사기를 이용한 구제역, 돼지열병, PRRS등 백신의 임상데이터 확보									
③	무침주사를 사용하여 자돈용 백신을 피내접종하여 백신의 유효성을 확인함									

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책자료	기타
①의 기술	√	√			√			√	√	
②의 기술								√	√	
③의 기술		√		√						
.										

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	수입대체 효과 및 수출증대 다양한 축종에 적용가능 무침용 백신 개발에 활용
②의 기술	정책자료로 활용 무침용 백신 개발에 활용
③의 기술	피내접종용 백신개발 기술을 타 질병의 백신개발에 적용/활용이 가능함

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문 SCI	비SCI			논문평균 I F	학술발표	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건		건	명	건	건	
가중치	10	5					35	20	0	10				10		5		5	

최종목표	2	2			1		2	7,200	1,900	5			2	3		7		7		5
연구기간내 달성실적	2	2					1	411	20	2			2	0		2		1		3
연구종료후 성과장출 계획							2	50억		5			1	1		3				10

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함) - 계획없음

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	○	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	○	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	○	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	○	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	○	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	○	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	○	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	○	
부당한 중복 게재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	○	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	○	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024. 02. 29

기관명 : 미라클스코프(주)

점검자 : 이계한 (서명)

농림식품기술기획평가원장 귀하

[별첨]

1. 논문(국내외 전문 학술지) 게재 : SCI 논문 : 목표(1건), 실적(2건)

① Vaccine

Vaccine 39 (2021) 4694–4699

Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Protective immunity induced by concurrent intradermal injection of porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccines in pigs

Sim-In Lee^{a,1}, Chang-Gi Jeong^{a,1}, Sameer ul Salam Mattoo^{b,1}, Salik Nazki^{a,c}, Ram Prasad Aganja^b, Seung-Chai Kim^d, Amina Khatun^{a,d}, Yeonsu Oh^e, Sang-Hyun Noh^f, Sang-Myeong Lee^{g,h}, Won-Il Kim^{a,*}

^a College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea
^b Division of Biotechnology, Jeonbuk National University, Iksan, Republic of Korea
^c The Pirbright Institute, Ash Road, Pirbright GU24 0NF, Woking, United Kingdom
^d Department of Pathology, Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Sher-e-Bangla Agricultural University, Sher-e-Bangla Nagar, Dhaka 1207, Bangladesh
^e Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 24304, Republic of Korea
^f MDS Animal Health Korea Ltd., Seoul 04837, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 24 December 2020
 Received in revised form 20 May 2021
 Accepted 10 July 2021
 Available online 13 September 2021

Keywords:
 Porcine circovirus type 2
 Mycoplasma hyopneumoniae
 Intradermal vaccine
 T-cell immune response

ABSTRACT

Vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) are routinely used by intramuscular injection. However, since intramuscular vaccination causes stress and increases the risk of cross-contamination among pigs, research on intradermal vaccination is currently being actively conducted. This study was designed to evaluate the efficacy of intradermally administered inactivated vaccines against PCV2 and Mhp in pigs. Three-week-old specific pathogen-free pigs were divided into three groups (5 pigs per group). Pigs in the two groups were intradermally vaccinated with the PCV2 or Mhp vaccine using a needle-free injector. Pigs in the third group were kept as nonvaccinated controls. At 21 days post-vaccination, pigs in one of these vaccinated groups and the nonvaccinated group were intranasally challenged with PCV2 and Mhp, while the other vaccinated group pigs were maintained as vaccine controls. Vaccine efficacy was evaluated by observing weight gain, pathogen load, pathological changes, and humoral or cellular immune responses. As a result, vaccinated pigs revealed significantly higher body weight gain, with lower clinical scores. Vaccinated pigs also showed higher antibody responses but lower PCV2 or Mhp loads in sera, nasal swabs, or lungs than nonvaccinated pigs. Intriguingly, vaccinated pigs upregulated cytotoxic T cells (CTLs), helper T type 1 cells (Th1 cells), and helper T type 17 cells (Th17 cells) after immunization and showed significantly higher levels of CTLs, Th1 and Th17 cells at 14 days post-challenge than nonvaccinated and challenged pigs. This study demonstrated that protective immune responses against PCV2 and Mhp could be efficiently induced in pigs using a relatively small volume of intradermal vaccines, probably due to effective antigen delivery to antigen-presenting cells in the dermis.

© 2021 Published by Elsevier Ltd.

② Vaccine

vaccines MDPI

Article

Intradermal Inoculation of Inactivated Foot-and-Mouth Disease Vaccine Induced Effective Immune Responses Comparable to Conventional Intramuscular Injection in Pigs

Simin Lee^{1,*}, Sameer ul Salam Mattoo^{2,*}, Chang-Gi Jeong¹, Seung-Chai Kim¹, Salik Nazki^{1,3}, Gyehee Lee⁴, Yong-Soo Park⁵, Sun Young Park⁶, Myeon-Sik Yang⁷, Bumseok Kim⁸, Sang-Myeong Lee^{9,*} and Won-Il Kim^{1,*}

¹ College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, 79 Gobong-ro, Iksan 54596, Republic of Korea; lsmark32@gmail.com (S.-I.); jcg0102@gmail.com (C.-G.); levsor2@jnu.ac.kr (S.-C.K.); saliknazki@gmail.com (S.N.)
² Division of Biotechnology, Jeonbuk National University, 79 Gobong-ro, Iksan 54596, Republic of Korea; desameerulsalam@gmail.com
³ Pandemic Sciences Institute, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford OX3 7DQ, UK
⁴ Miraclescope Inc., 708 Pangyo-ro, Seongnam 13516, Republic of Korea; sky949@miraclescope.com
⁵ Department of Livestock, Korea National University of Agriculture and Fisheries, Jeonju 54874, Republic of Korea; dvmpys@korea.kr
⁶ Animal and Plant Quarantine Agency, 177 Hyeoksan 8-ro, Gimcheon 39660, Republic of Korea; sun0730@kqia.go.kr
⁷ Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yeosu-eup, Yesan 32439, Republic of Korea; h114@kongju.ac.kr
⁸ Biosafety Research Institute and Laboratory of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, 79 Gobong-ro, Iksan 54596, Republic of Korea; bskim@jnu.ac.kr
⁹ College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 1 Chungdae-ro, Cheongju 28644, Republic of Korea
 * Correspondence: smlee@chungbuk.ac.kr (S.-M.L.); kw0621@jnu.ac.kr (W.-I.K.); Tel.: +82-43-249-1693 (S.-M.L.); +82-63-270-3881 (W.-I.K.)
 † These authors contributed equally to this work.

Abstract: All pigs in the Republic of Korea are given the foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccine intramuscularly (IM) as part of the country's vaccination policy. However, the IM administration of the FMDV vaccine to pig results in residual vaccine components in the muscle and undesirable changes in muscle and soft tissues, causing economic losses in swine production. In this study, we evaluated whether intradermal (ID) vaccination could be proposed as an alternative to IM administration. ID vaccination (0.2 mL on each side of the neck muscle) and IM vaccination (2 mL on each side of the neck muscle) were performed twice, separated by 14 days, using a commercial FMD vaccine in specific-pathogen-free pigs. We observed growth performance, gross and microscopic lesions at the inoculation site, FMDV-specific antibodies, and neutralizing antibodies for 35 days after vaccination. Side effects on the skin grossly appeared following ID administration, but most were reduced within two weeks. All ID-vaccinated pigs showed inflammatory lesions limited to the dermis, but IM-vaccinated pigs had abnormal undesirable changes and pus in the muscle. ID-vaccinated pigs performed comparably to IM-vaccinated pigs in terms of growth, FMD virus-specific antibodies, protection capability against FMDV, and T-cell induction. This study demonstrated that the ID inoculation of the inactivated FMD vaccine induced immune responses comparable to an IM injection at 1/10 of the inoculation dose and that the inoculation lesion was limited to the dermis, effectively protecting against the formation of abnormal undesirable changes in muscle and soft tissues.

Keywords: needle-free injector; intradermal vaccination; foot-and-mouth disease; vaccine; immune response

Check for updates

Citation: Lee, S.; Mattoo, S.U.S.; Jeong, C.-G.; Kim, S.-C.; Nazki, S.; Lee, G.; Park, Y.-S.; Park, S.Y.; Yang, M.-S.; Kim, B., et al. Intradermal Inoculation of Inactivated Foot-and-Mouth Disease Vaccine Induced Effective Immune Responses Comparable to Conventional Intramuscular Injection in Pigs. *Vaccines* **2024**, *12*, 190. <https://doi.org/10.3390/vaccines12020190>

Academic Editor: François Meuniers

Received: 22 December 2023
 Revised: 7 February 2024
 Accepted: 8 February 2024
 Published: 13 February 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Vaccines **2024**, *12*, 190. <https://doi.org/10.3390/vaccines12020190> <https://www.mdpi.com/journal/vaccines>

2. 국내 및 국제 학술회의 발표 : 목표(5건), 실적(2건)

① 2022 대한바이러스학회

수익 7

Prevalence, co-infection status, and phylogenetic analysis of porcine circoviruses (PCV2, PCV3, and PCV4) and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV-1 and PRRSV-2) in Korean pig herds

Hye-Ryung Kim¹, Jonghyun Park^{1,2}, Gyu-Tae Jeon¹, Jong-Min Kim¹, Ji-Su Baek¹, Won-Il Kim³, Young S. Lyoo⁴, and Choi-Kyu Park^{1*}

¹College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center, Kyungpook National University, Daegu, 41566, Republic of Korea, ²DVA Bio Incorporation, Daegu, 41519, Republic of Korea, ³College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University, Iksan, 54596, Republic of Korea, ⁴College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, 05029, Republic of Korea

In Korea, different PCV2 and PRRSV genotypes have been circulating in the form of single or mixed infections in domestic pig herds, and this has caused tremendous economic losses to the Korean pig industry. Moreover, since the introduction of novel PCV3 and PCV4, co-infections with three PCVs have been frequently observed in Korean pig herds. In this study, we investigated the prevalence, co-infection status, and genetic diversity of three genotypes of PCVs (PCV2, PCV3, and PCV4) and both genotypes of PRRSVs (PRRSV-1 and PRRSV-2) circulating in 229 Korean pig farms from 2019 to 2021. Among patterns of PCVs infections, detection of PCV3 alone was predominant and that of PRRSVs infections, detection of PRRSV-2 was more prevalent. When we analyzed the prevalence of PCVs at the farm level for PRRSV-infected or non-infected farms, the prevalence of PCVs in farms where PRRSV was infected was higher than that in farms where PRRSV was not infected. For the genetic characterization of the PCVs and PRRSVs, phylogenetic analysis was performed with detected viral sequences in this study. Based on the result of genotyping of PCVs and PRRSVs in this study, the most prevalent genotypes were determined as PCV2d for PCV2, Subtype 1A for PRRSV-1, and Lineage 1 (NADC30-like clade) and Lineage 5 for PRRSV-2, respectively. Furthermore, all PCV3 and PCV4 strains identified in this study were identified as PCV3a and PCV4b clusters, respectively. It is noteworthy that molecular markers on the ORF2 sequence that discriminates the PCV4 genotypes were first identified in this study. Finally, based on the complete genomic sequences of all available Korean PCV2 and PCV3, the most recent common ancestor and evolutionary rate for each virus were analyzed in this study. In conclusion, these results will help to better understand the etiology and epidemiology of PCVs and PRRSVs currently circulating in Korea and serve as a basis for diagnosing, preventing, and controlling these viral infections in Korean pig herds.

② 2023 아시아양돈수의사 심포지엄

P-V-014

ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF PCV2D AND PCV2B INACTIVATED VACCINES IN PIGS CHALLENGED WITH PCV2D

Ms. Saejin Kim¹, Ms. Seung-Chai Kim², Ms. Yun-Hee Noh², Mr. Hwan-Ju Kim², Mr. Chang-Gi Jeong², Mr. Won-Il Kim², Dr. Jeonggyo Lim¹

¹Chong Ang Vaccine Laboratories Co., Ltd., ²College of Veterinary Medicine, Jeonbuk National University

Introduction

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is an important swine pathogen causing porcine circovirus-associated diseases (PCVAD) and finding ways to effectively control it is crucial for the well-being of pigs and the economic viability of the swine industry. Most of the current commercial PCV2 vaccines are based on PCV2a and the experimental and field evaluations of the commercially available PCV2a-based vaccine have shown its effectiveness in reducing viremia caused by both PCV2a and PCV2b, as well as the associated lesions and diseases. However, as the global PCV2 genotype shift from PCV2b into PCV2d, concerns regarding vaccine failure have been raised. The objective of this study was to evaluate the efficacy of inactivated and adjuvanted PCV2b- and PCV2d-based vaccines in the specific pathogen-free (SPF) pig model against PCV2d field isolate challenge.

Materials and Methods

Thirteen three-week-old SPF pigs that are free of PCV2 were randomly divided into three groups, a non-vaccinated group of three pigs, a group of five pigs vaccinated with the commercial PCV2b-based inactivated vaccine (SuiShot® Circo-ONE) and a group of five pigs vaccinated with the inactivated and adjuvanted PCV2d-based vaccine. At 21 days post vaccination, all pigs were simultaneously challenged with a PCV2d field isolate (PCV2d/CBNU0324) via both the intranasal and intramuscular routes of inoculation. The experiment was concluded 21 days post virus challenge.

Results

The study found that PCV2d/CBNU0324 infection alone can trigger PCVAD. Both PCV2b- and PCV2d-based vaccinations demonstrated remarkable efficacy in protecting against PCV2d infection compared to the non-vaccinated challenged group, as indicated by a reduction in viral loads in nasal swabs, serum samples, and lymphoid tissues and improved growth performance. Furthermore, both types of PCV2 vaccines were found to effectively protect PCV2-associated pathological lesions based on histopathology and immunohistochemistry.

Conclusions

In conclusion, the results of this study demonstrate that the inactivated and adjuvanted PCV2b- and PCV2d-based vaccines are effective in protecting against PCV2d infection in specific pathogen-free pigs. The findings also suggest that a PCV2b commercial vaccine induced effective cross-protection against a heterologous PCV2d challenge as equivalent to the homologous PCV2d vaccination.

Discussion

Globally, vaccination has been identified as one of the most crucial and effective strategies to control PCV2-related diseases. As observed with the use of PCV2 vaccines in 2–3-week-old antibody-positive pigs, vaccination has had a major positive impact on decreasing PCVAD in the field. The study was conducted to evaluate the protective efficacy of heterologous



3. 특허 출원 : 목표(2건), 실적(2건) / 특허등록 : 목표(2건), 실적(2건)

① 특허등록번호: 제 10-2610301호



② 특허등록번호: 제 10-2463473호



4. 혁신제품인증서



5. 시제품



그림 181. 무침주사기 시제품

6. 기술실시 보고서

■ 농림축산식품연구개발사업 관리기준 [별지 제27호 서식] <제35조제4항 관련> (2쪽 중 1쪽)

기술실시 보고(확인)서						
					(단위 : 원)	
연구개발과제 현황	사업명	기술사업화지원사업	연구과제번호	821070-03		
	연구과제명	피내접종용 PCV2/Mycoplasma 백신 개발 및 무침주사기 상용화	연구개발기관명	미라클푸드(주)	연구책임자	이계한
	연구개발일	2021.04.01	연구기간	2021.04.01. - 2023.12.31		
	연구개발비	267,700,000	정부지원연구개발비	137,608,000	연구개발비(기타)	405,200,000
기술실시계약 및 성과활동 현황	계약(기술)명	체지 피내접종용 분사식 무침주사기				
	계약(확인)일	2023.12.26	실시(활동)기간	태출발생일로부터 6년간		
	지재권 종류	지적재산권 등록	실시연 유형	직접실시		
	* 지재권이 특허(출원/등록) 인 경우	명칭	약물 미주입 방지 및 공차 방지용 무침주사기			
		번호	제 10-2610301호			
	실시(활동)기관	기관명	미라클푸드(주)	기관유형	중소기업	
	주소	경기도 성남시 분당구 판교로 700, D동 310-2호				
	사업자번호	144-81-10393	전화번호	070-4099-0388		
	부세담당자	연구소(이계한)	e-mail	miracle.lee@miracle-food.com		
기술료	정책기술료		경상기술료			
	정수(예정)일	정수(예정)금액	과수기분포	정수(예정)일	정수(예정)금액	
	계					
기타특기사항						
「농림축산식품연구개발사업 관리기준」 제35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고(확인)합니다.						
붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기권으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증명자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기권으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).						
2023년 12월 26일						
미라클푸드(주) 대표이사 이계한 [직인]						
농림축산식품기술기획평가원장 귀하						

7. 매출 실적

- 제주도특별자치도 지방보조사업 계약서

물품 공급 계약서

제주특별자치도 제주시 월랑로 26, 2층(노형동)에 주소를 둔 대한한농협회 제주특별자치도협의회(이하 "제주도협의회"이라 함)와 경기도 성남시 분당구 판교로 700, D동 310-2호(아람동, 분당테크노파크)에 주소를 둔 미라클스코프주식회사 (이하 "미라클"이라 함)는 아래와 같은 물품공급 계약서(이하 "본 계약")을 맺고 이를 신의에 따라 성실히 이행한다.

제 1 조 【매매물 내역】

① "미라클"은 "제주도협의회"에게 부속기기를 포함한 백신 분사식 무침주사기를 하기와 같이 매도하고 "제주도협의회"은 이를 매수하기로 한다.

품 목	수 량	단 가	금 액	비 고
돼지 백신 분사식 무침주사기	56세트	6,000,000원	336,000,000원	부가세포함

② 제1조 1항의 부속기기는 다음과 같이 구성된다.

- 무침주사기 본체(1대)
- 바이알어댑터(1개)
- 2,100mAh 대용량 배터리(2개)
- 배터리 충전기 (1개)
- 어깨끈 (1개)
- 사용자 매뉴얼 (1개)
- 초음파 세척기 (1대)

- 수출명장

수출실적증명서

수출처	미국(로스앤젤레스)	입국 일자	2023년 09월 01일 ~ 2023년 09월 30일
수출품명	444-44-10000	수량	2023년 09월 01일 ~ 2023년 09월 30일

구분	구분명	수량	단가	합계	비고	수량	단가	합계
1	444-44-10000	10	1,000	10,000		10	1,000	10,000
2	444-44-10000	10	1,000	10,000		10	1,000	10,000
3	444-44-10000	10	1,000	10,000		10	1,000	10,000
4	444-44-10000	10	1,000	10,000		10	1,000	10,000
합계				40	4,000	40	4,000	160,000

한국무역진흥공사 한국무역진흥원장

8. 홍보실적 : 전시회 참가



9. 수상실적

