

316094-2

구제역 백신 접종률 확인을 위한 표식인자 개발 최종보고서

2018
농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

보안 과제(), 일반 과제(■) / 공개(■), 비공개()발간등록번호()
가축질병대응기술개발사업 제2차 연도 최종보고서

발간등록번호 11-1543000-002370-01

구제역 백신 접종률 확인을 위한 표식인자 개발 최종보고서

2018. 10. .

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

주관연구기관 / 계명대학교 산학협력단
협동연구기관 / 강원대학교 산학협력단

(견고덱 15.5p)

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가축질병대응기술개발사업”(개발기간 : 2016. 09. 05 ~ 2018. 09. 04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 . 10 . .

주관연구기관명 : 계명대학교 산학협력단

(남제열)



협동연구기관명 : 강원대학교 산학협력단

(윤경구)



참여기관명 : 주식회사 코미팜

(문성철)



주관연구책임자 : 이 상 길

협동연구책임자 : 오 연 수

참여기관책임자 : 김 주 현

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라
보고서 열람에 동의 합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	316094-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2016. 09. 05- 2018. 09. 04	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	구제역 백신 집중축 확인을 위한 표식인자 개발			
연구책임자	이상길	해당단계 참여연구원 수	총: 18명 내부: 18명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 200,000 천원 민간: 0 천원 계: 200,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 35명 내부: 35명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 350,000 천원 민간: 0 천원 계: 350,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	계명대학교 산학협력단			제약학과	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 주식회사 코미팜			연구책임자: 김주현 이사	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	2	3									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

- 표식능이 가능한 식용색소, 합성색소, tatto ink 등 다양한 색소를 적용하여 표식 가능 여부를 평가하였음
- 피내 접종기(무침주사기)를 이용하여 표식이 가능한 표식인자를 담지한 백신제제에 대하여 검토한 결과 지금까지 알려진 색소종을 이용하여서는 표식을 출하시점까지 유지되기는 어려움
- 피내 접종법을 기반으로 한 구제역 백신의 표식인자 개발은 피내 접종법이 근육 접종법을 대체가능하다는 전제에서 이루어졌으나, 실제 피내 접종법을 통해 백신 면역을 시도해본 결과, 개체 간 편차가 매우 심하고, 면역자극 또한 충분치 않아 접종 방법에 대한 표준화 작업이 선행될 필요가 있음
- 신규로 고안한 다양한 주입기 등을 평가한다면 표식이 장기간 유지될 수 있을 것으로 기대함
- 이상의 연구결과를 통하여 SCIE급 논문 1편(IF : 2.330)과 KCI급논문(SCOPUS 등재) 1편을 게재하였으며, 5편의 학술발표를 수행하였음
- 실용신안 1건, 디자인 1건, 특허 1건 총 3건의 관련특허를 출원하였음

보고서 면수
총 39 페이지

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구제역 백신 접종 후 백신 접종축을 확인할 수 있는 표식인자 개발 ○ 항체형성 유무와 상관없이 백신접종 유무를 확인이 가능한 표식인자 개발 ○ 백신 접종 당시 및 장기간 확인할 수 있는 상용가능 표식인자 개발 				
<p>연구 개발 성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정성적 성과 <ul style="list-style-type: none"> - 표식능 : 출하시점까지의 표식가능 확인을 위한 후보물질을 도출하여 백신과의 혼합 안정성에 큰 영향을 미치지 않는 표식인자 후보물질이 확보되었음. 현재 돼지피부조직 적용시험은 완료되었고, 돼지에 적용한 시험이 진행중에 있으며, 출하시점까지의 결과는 2차년도 연구초기에 확보 예상됨 - 무침주사기 적용시 동물이 접종 압력에 의해 임상적으로 약간의 거부반응을 나타내기는 했으나 백신표식인자 혼합물의 물질에 대한 불필요한 임상적 반응은 나타내지 않는 것으로 확인함 - 무침주사기로 백신-표식인자 혼합물을 접종하였을 때 피하층까지만 침투하고 근육내로는 퍼지지 않는 것을 육안적으로 확인하였고 포르말린 고정시에도 1주~2주간 표식이 유지됨을 확인함 - 백신-표식인자 혼합물과 순수 백신 접종 그룹 간의 항체 형성능을 비교하였을 때, 유의미한 차이는 나타나지 않아 표식인자가 백신에 영향을 주지는 않음을 알 수 있었음 ○ 정량적 성과 <ul style="list-style-type: none"> - 논문 : SCI(E)급 논문 1건, KCI급(SCOPUS) 1건 - 특허출원 : 실용신안 1건, 디자인 1건, 특허 1건 - 학회발표 : 5건 				
<p>연구개발 성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 백신접종 유무의 확인이 가능 하도록 하여 농가지도를 통하여 성공적으로 구제역 방역을 유도 ○ 대국민 구제역에 대한 국민보건안전도 향상 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	구제역	백신	표식인자	접종	방역
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	foot-mouth disease	vaccine	indicator	vaccination	prevention

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

제1장. 연구개발과제의 개요	1
제2장. 연구수행 내용 및 결과	11
제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	30
제4장. 연구결과의 활용 계획 등	31

<별첨1> 연구개발보고서 초록

<별첨2> 주관연구기관의 자체평가의견서

<별첨3> 연구성과 활용계획서

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목적

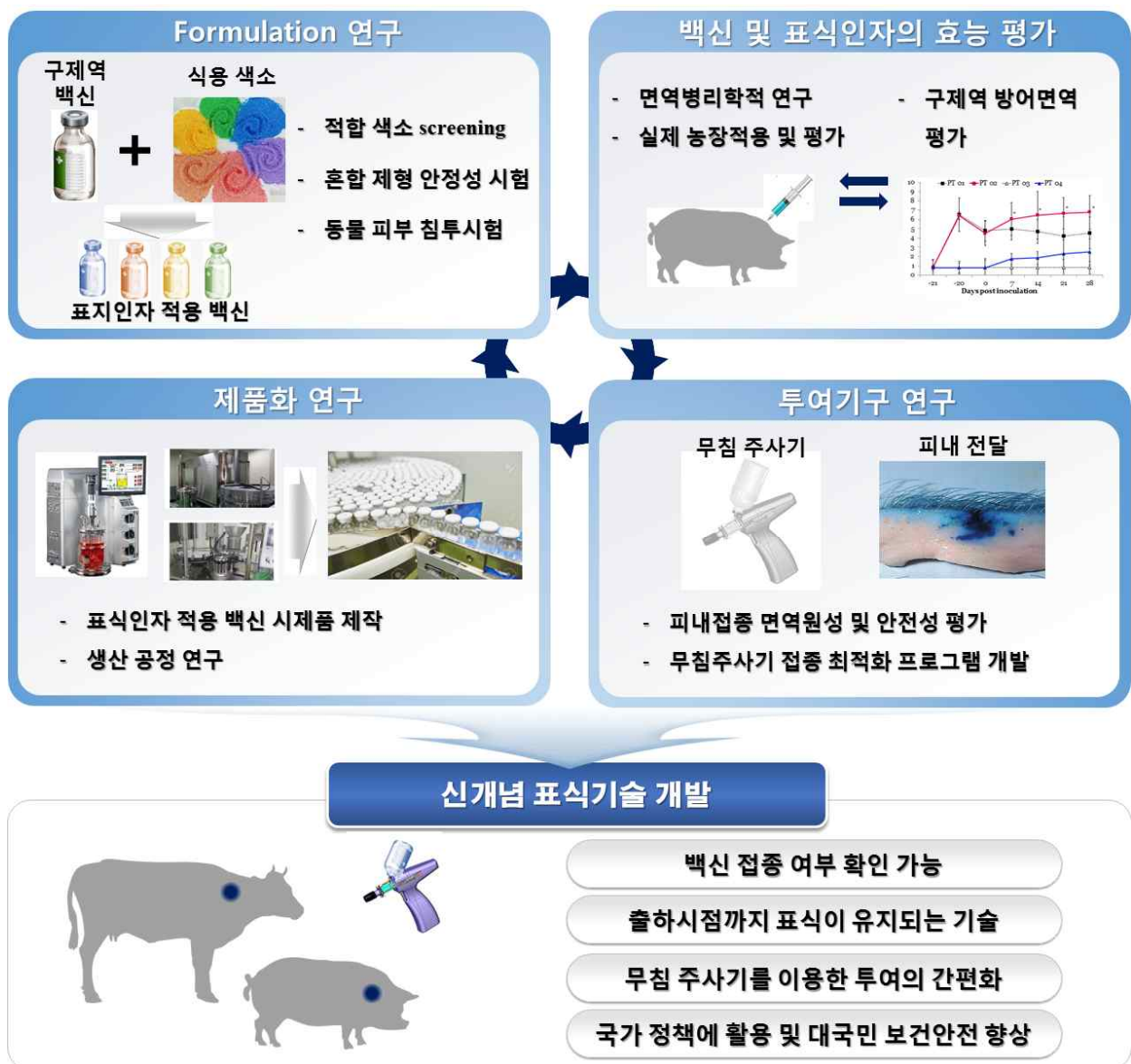
- 본 연구의 목적은 구제역 백신 접종 후 백신 접종축을 구별, 확인할 수 있는 구제역 표식인자를 개발하는 것임
- 궁극적으로는 항체형성 유무와 상관없이 백신접종 유무의 확인이 가능한 표식인자 및 이를 전달하는 방법을 개발하는 것임

제2절 연구개발의 필요성

- 구제역 발생으로 인한 문제점은 전염경로가 콧물, 침, 유즙, 정액, 호흡 및 분변 등의 접촉이 감염경로로 구제역 발생농가의 경제적 피해뿐만 아니라 주변에 구제역이 발생하지 않은 다른 농가에도 피해를 일으키는 문제점이 있음
- 구제역 발생으로 인한 피해 때문에 국가는 농가에 구제역 백신 접종을 권고 받고 있지만 주사침을 재 사용할 시 발생하는 부러진 주사침으로 인한 품질과 생산성 저하 그리고 주사침을 사용한다는 사용자의 불편 돼지의 스트레스와 고통을 덜어준다는 점 때문에 구제역 백신 접종을 기피하고 있음
- 농가에서 구제역 백신을 접종할 시 많은 수의 가축에 접종하며 접종한 후 접종했음을 표시하지만 이는 쉽게 지워지게 되고 구제역 백신을 접종한 농가의 가축 중 백신이 접종되지 않은 가축이 발생할 수 있음
- 가축 판매 시 구제역 백신 접종여부를 단순한 서류 확인을 통하여 확인하기 때문에 백신접종이 안된 가축이 거래되는 위험성을 가짐
- 구제역 백신의 투약이 일관되게 이루어지지 않는다는 점은 보건차원에서 국가와 국민에게 큰 부담과 위험요소이며 궁극적으로 국가 재난형 질병인 구제역 발생 위험이 높아지는 상황으로 무침주사기를 이용한 백신접종 유무를 확인할 수 있는 표식인자의 개발이 필요함
- 무침주사기를 이용하여 백신 투여하는 방법은 외국에서 사람에게 Inﬂuenza virus 백신을 투여하거나 돼지의 썬코 바이러스 백신에 투여하는 등 이미 사용되고 있음
- 기존의 무침주사기들은 가스통을 연결하여 사용한다는 단점을 가지고 있었으나 현재는 가스통 없이 사용이 가능하며, 백신 전달을 피내, 피하, 근육으로 원하는 곳으로 투여할 수 있음
- 무침주사기는 백신을 근육이 아닌 피부에 접종하므로 부작용이 거의 없으며 백신 사용량이 주사침을 이용한 주사와 비교하여 절반에 그쳐 경제성이 우수함. 또한 주사 바늘 부러짐이 없고 가축 간 주사침으로 인한 감염 전파의 위험성이 없음
- 무침주사기를 사용할 경우 주사침으로 인해 발생할 수 있는 가축의 스트레스와 고통을 덜어줄 수 있으며 기기를 이용하여 접종하기 때문에 정확한 양 투여가 가능함
- 구제역 백신 접종 후 표식인자에 대한 개발은 필요한 분야이지만 현재까지 개발된 현황이

없는 부분임. 원인으로서는 표식인자를 가축에 남길시 표식인자로 인한 주사부위의 이상육, 염증 발현으로 상품성의 저하가 나타나며, 국가 기관에서는 연구의 필요성을 가지고 있으나 농가에서는 표식인자에 대한 필요성을 느끼지 못하고 있음

- 표식인자로 사용하는 물질로 식용 가능한 색소를 이용하고 무침주사기를 이용하여 피내 전달을 하면 가축에서 염증, 이상육이 생기는 등 상품성에 영향을 미치지 않음
- 현재 사용 중인 구제역 백신은 농림출산 검역 검사 본부의 허가승인의 사용 설명서의 경우 사육해서 출하시키는 비육돈의 경우 8-12주령에 2 ml을 1차 접종하고 다시 4주 후 2차 백신을 접종하게 되어 있음. 1차 접종 후 2차 접종까지 표식인자가 존재하면 혼동하지 않고 2차 접종을 할 수 있으며 출하까지 구제역에 대한 면역을 가지게 됨



<그림 1> 본 연구의 총괄 개요도

- 현재 농가에서는 출하되는 비육돈의 경우 1주령에 마이코플라즈마 백신, 2주령에 돼지 생식기 호흡기 증후군 백신 (PRRS), 3주령에 썬코백신, 6주령과 8주령에 돼지 돈열 백신 등을 접종하게 되어서 실제적으로 구제역 백신을 2회 접종 할 여유가 없기에 가급적 1회 투약하고 있으나 1회 접종으로는 효과적인 항체 형성을 유도하는 데 어려움이 있어 피내접종 등 다양한 접종법 개발에 대한 연구가 진행되고 있음
- 구제역 백신의 2차 접종 후 출하까지 표식인자가 일부 남아있으면 백신을 접종한 가축만 선별할 수 있으며 이를 통해 농가에서 백신접종의 동기유발과 함께 구제역 발병이 감소하여 농가의 피해와 국가에서 구제역에 대해 가지는 문제점을 해결할 수 있음
- 본 연구가 갖는 차별성 및 중요성은 무한 국제 경쟁체제 하에서 식량, 의료, 에너지 및 환경문제 등 여러 방면에 대하여 세계 여러 나라의 집중 투자와 연구개발이 이루어지고 있는 현실에서 개발된 신기술에 대하여 지식 재산권을 확보하고 보호하려는 움직임이 강해지고 있어 세계적으로 경쟁력 있는 제품을 개발하는 것은 중요한 의의가 있음
- 본 연구개발의 목표는 구제역 백신 접종측 확인을 위한 표식인자를 개발하는 것으로써, 이미 피내접종에 관한 선행연구가 되어 있을 뿐만 아니라 제제개발과 평가에 관한 전문성있는 팀으로 구성되어 있으므로 성공적으로 기술을 개발할 가능성이 높음
- 본 연구는 아직까지 외국에서도 실시된 바 없는 새로운 시도이기에 개발에 성공할 경우 정책적, 산업적 파급효과가 매우 클 것으로 기대됨
- 본 연구의 개요는 <그림 1>과 같음

제3절 연구개발 대상의 국내·외 현황

1. 국내 기술 수준 및 시장 현황

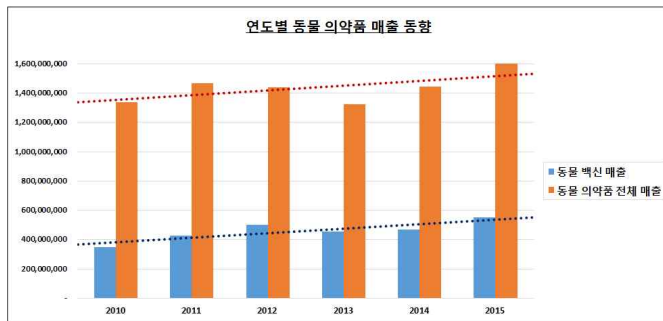
가. 기술 및 시장현황

- 한국동물약품협회의 자료를 근거로 하여 년도 별로 3, 6, 9, 12월에 발표된 판매동향을 재구성한 자료를 바탕으로 볼 때<그림 2>, 동물의약품의 국내 전체 시장 규모는 2010년부터 2015년까지 매년 증가하고 있으며, 동물 백신 시장도 동반 성장하고 있음
- 2010년 동물 백신 시장은 동물의약품 전체 시장의 25%, 현재는 34%를 점유하고 있어 매년 동물의약품 전체 시장에서 동물 백신 시장의 규모가 증가하고 있음

나. 시장현황

- 국내에 시판되고 있는 구제역 백신들로는 힘백-FMD(고려비엔피), FMD-100(중앙백신연구소), 대성 에프엠디백신(대성미생물연구소), 녹수에프엠디백신(녹십자 수의약품), 프로백 에프엠디(코미팜)와 같은 제품이 있음<표 1>
- 그러나 이 백신들은 모두 바이러스를 불활화시킨 뒤 오일성분의 백신보좌제를 혼합시킨 불

활화오일 백신들이며, 단지 구제역 백신을 접종하기 위한 목적으로만 사용되는 제품들이 주류임



<표 1> 국내 주요 동물 의약품 생산업체

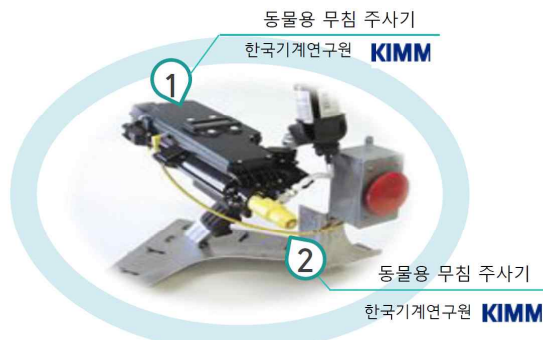
계약회사	제품
고려비엔피	힘백-FMD
대성미생물연구소	대성 에프엠디백신
중앙백신연구소	FMD-100
녹십자수의약품	녹수에프엠디백신
코미팜	프로백 에프엠디

<그림 2> 연도별 국내 동물 의약품 시장 현황

다. 경쟁기관 현황

- <표 1>에 제시한 바와 같이 현재 우리나라에서 구제역 백신을 생산할 수 있는 경쟁기업은 총 5개사 정도임.
- 그러나 현재까지 그 어느 기업도 백신 투여 이후 투약 여부 확인이 가능한 표식인자 관련 기술을 보유한 업체는 없음
- 백신을 피부로 전달하기 위한 장치에 관한 연구 또는 제품에 대한 일부 보고는 있음
- 아울러 국내에는 동물백신을 전달하는 방법들에 대해서도 많은 연구가 이루어지지 않은 상황임
- 한국기계연구원에서 최근 개발한 무침주사 장치를 개발한 바 있고 이것이 유일한 상황임

<그림 3>



<그림 3> 국내에서 개발 중인 무침 주사기 (출처 : nts 국가과학기술연구회 자료집)

- 국내에서 무침주사 관련한 최초 기술은 ACUSHOT((주)송강GLC, 대표 원성오)임
- 이 기술은 바늘주사기를 사용시 발생하는 질병전파, 경제성, 스트레스 등 문제점을 일시에 제거 할 수 있으며, 향후 안전한 먹거리에 대한 소비자의 욕구를 충족시킬 수 있는 혁신적인 제품으로 소개된 바 있음
- ACUSHOT은 초기에 선보였던 무침주사기와 차별화된 무침주사기로 배터리를 사용으로 이

- 동이 간편하며, 기존의 가스(CO₂, 산소)를 사용하는 장비와는 달리 파워실린더를 사용함으로써 가스 조달에 어려움을 없애고 편리하게 장비를 사용할 수 있다는 특징을 지니고 있음
- 또한 가스 사용시 일정한 압력을 지속적으로 유지할 수 없는 기존방식과 다른 파워실린더 장착으로 안정적인 압력을 유지해 원하는 주사방식(근육, 피하, 피내) 을 선택하여 작업 할 수 있음
- 본체에는 LCD를 통해 실시간으로 장비의 상태를 점검할 수 있고, 버튼으로 간단하게 주사 용량을 조절하는 등 기존의 장비에서는 구현할 수없는 시스템이 적용되어 있음

라. 지식재산권 현황

- 국내의 지식재산권 현황은 주로 백신, 백신 보좌제에 관한 특허는 많은 편이나, 백신 표식 기술과 직접적으로 관련된 특허는 거의 없는 수준임
- 국내의 무침주사기에 대한 등록 특허중 대표적인 것은 10-2013-0005841, 10-2013-0005842 임. 위 특허는 작년 6월부터 한국기계연구원에서 개발 중이며 아직 시제품이나 제품화가 이루어지지 않은 상황임. 등록특허 중 10-2013-0005841은 약물 공급시린지의 약물을 펌프를 통해 이송하여 노즐로 분사하여 약물 분사에 효과적이며, 10-2013-0005842은 탄성변형 가능한 재질로 형성되는 타격부재와, 타격부재를 탄성 변형시키는 구동부, 타격부재에 의해 이동되어 약물을 분사시키는 피스톤 부를 포함하여 계속적으로 약물을 분사할 수 있음
- 결론적으로 국내에는 백신과 백신의 투약을 확인할 수 있는 표식인자를 함께 고려한 관련 특허는 전무한 상황임

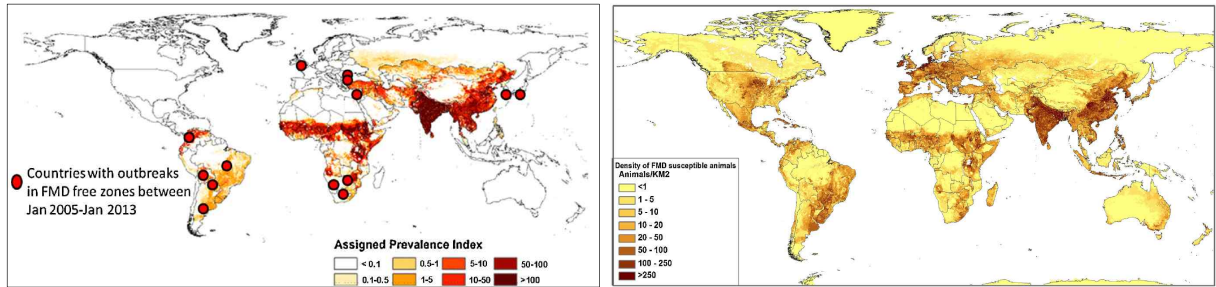
마. 표준화현황

- 현재까지 백신 표식인자에 대한 **표준화된 가이드라인은 없음**

2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

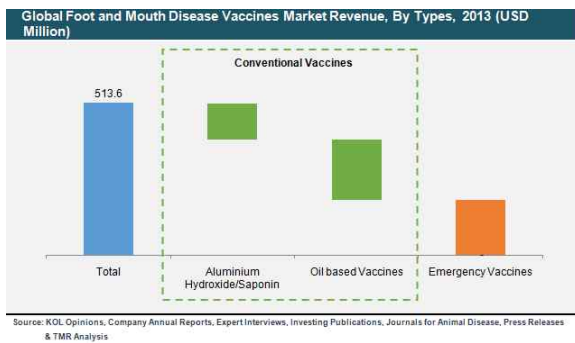
가. 기술 및 시장현황

- 동물백신이 필요한 구제역은 이미 global 규모로 볼 때 매우 심각한 수준이며, 많은 국가의 지역들에서 일명 FMD freeze zone으로 구분되어 있음 <그림 4>
- Transparency market analysis에서 보고한 “Foot and Mouth Disease Vaccines Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2014-2020”에 의하면 구제역 백신 시장은 2014년부터 2020년까지 연평균 8.8% 성장할 것으로 전망되었음 <그림 5>
- 이렇게 급속도로 성장할 동물백신 시장에서 주로 관심사는 이어지는 백신개발과 함께 새로운 백신 보좌제에 관한 것들이 주류임
- 그러나 국외의 상황 역시 그 어느 기업도 백신 투여이후 투약여부 확인이 가능한 표식인자 기술을 보유한 업체는 없음

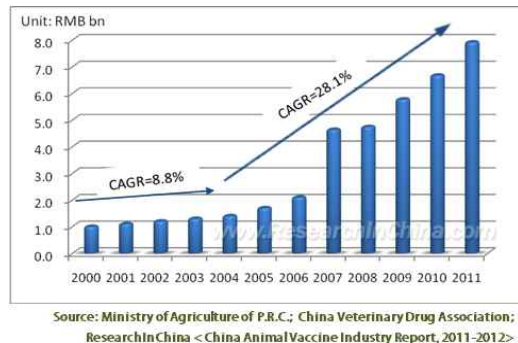


<그림 4> Global burden of FMD in cattle; burden of FMD in sheep and goats had a similar distribution. Measured as a prevalence score based on estimates of incidence, population distribution and other risk factors (a) and density map of FMD susceptible livestock species, i.e. combined cattle, pigs, sheep and goats (b) [출처 : Preventive Veterinary Medicine 112 (2013) 161 - 173].

- 더욱이 중국의 동물백신 시장은 2004년을 기점으로 고속성장하고 있어<그림 6> 차별화된 제품이 개발된다면 아시아의 가장 큰 시장인 중국시장도 선점이 가능할 것으로 예측됨. (출처: <http://www.researchinchina.com/htmls/report/2012/6447.html>).



<그림 5> 세계 구제역 백신 시장 규모



<그림 6> 중국의 구제역 백신시장 성장현황

나. 경쟁기관 현황

- <표 2>에서 제시한 바와 같이 현재 전세계에서 구제역 백신을 생산할 수 있는 대표적 기업은 Various, Novartis, GSK, Crucell 정도이고, 이들 기업들도 주된 관심사는 새로운 백신을 생산하거나 백신 보좌제를 개발하는 것임
- 현재까지 그 어느 기업도 구제역 백신 투여 이후 투약여부 확인이 가능한 표식인자 기술을 보유한 업체는 없음

<표 2> 국외 주요 백신 및 백신관련 제품생산 업체의 사례

	Company	Class	Indications
Alum	Various	Mineral salts	Various
MF59	Novartis	O/W emulsion	Influenza(Fluad)/pandemic flu
AS03	GSK	O/W emulsion + a tocopherol	pandemic flu
AS04	GSK	MPL+alum	HBV, HPV
Liposome	Crucell	O/W emulsion	HAV, Flu(EU)

- 한편 국외에서 개발된 무침주사기 현황은 하기와 같음
- 미국 Pacific Vet사에서 개발한 Twin vaccinator gun은 매뉴얼 방식으로 작동할 수 있으며, 두 가지 약제를 동시에 투약할 수 있는 특징이 있음
- 그러나 이 장치는 오직 근육내로만 투약이 가능하다는 특징을 지니고 있음 <그림 7>



<그림 7> Twin vaccinator gun (미국 Pacific Vet 사)

- 또한 영국의 Hyperdrug사와 farmacy 사와 farmacy 사에서도 무침주사기를 개발하여 출시한 바 있음 <그림 8, 9>
- 그런데 이 제품들 역시 동물의 귀 뒤의 근육 즉, 근육으로 접종이 가능한 제품들임
- 그러나 근육으로 주사하는 개량형태의 주사기는 출시되어 있지만 표식인자를 함께 개발한 사례는 보고된 바 없음



<그림 8> Porcilis Pig Vaccinator
(영국 Hyperdrug 사)



<그림 9> Sterimatic 2ml Tube Fed Vaccination Gun
(영국 farmacy 사)

다. 지식재산권 현황

- 국내의 지식재산권 현황은 주로 백신, 백신 보좌제에 관한 특허가 가장 많으며, 관련 특허는 거의 없는 수준임
- 해외의 무침주사기에 대한 등록 특허중 대표적인 것은 US 8,221,347 B2로 현재 제품화되어 상품명 AcuShotTM으로 우리나라에서는 수입·판매하고 있음. 기존의 가스를 연결하여 사용하는 장비와 다르게 파워 시린더를 사용하여 가스 조달의 어려움 없이 주사가 가능함. 또한 파워 시린더의 압력조절 기능을 통하여 근육 피하 피내주사를 선택하여 주사할 수 있음
- 궁극적으로 국내에는 백신과 백신의 투약을 확인할 수 있는 표식인자를 함께 고려한 제품 관련 특허는 전무한 상황임

라. 표준화 현황

- 현재까지 구제역백신의 표식인자에 대한 정해진 가이드라인이나 사용량은 표준화되어 있지 않음

제4절 연구개발 내용 및 범위

1. 1차년도

가. 개발목표

- 주관/제1세부연구기관(계명대학교 약학대학) : 구제역백신의 표식소재 도출 및 제제화 연구
- 제1협동 연구기관(강원대학교 수의과대학)
 - 구제역백신 표식인자의 임상학적 안전성 연구
 - 구제역 체액성 면역 평가

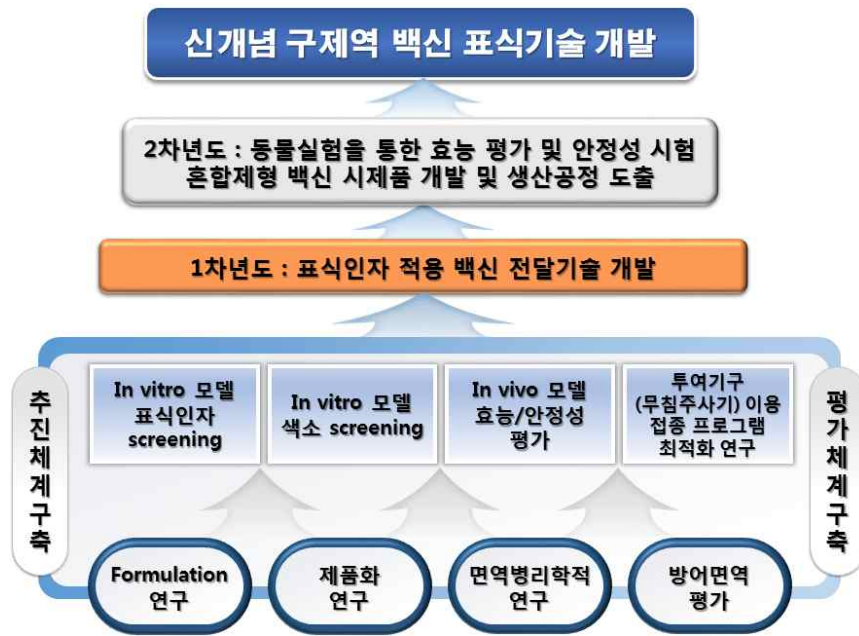
나. 개발 내용 및 범위

- 주관/제1세부연구기관(계명대학교 약학대학) : 백신/색소 혼합제형 중 단기 안정성 시험
동물피부 침투시험
- 제1협동 연구기관(강원대학교 수의과대학)
 - 선발 백신/색소 혼합제형의 임상학적 안전성 평가 (즉각형/지연형 임상반응 평가)
 - 선발 백신/색소 혼합제형의 표식 안정성 시험
 - 선발 백신/색소 혼합제형 접종 동물의 체액성 면역 평가

2. 2차년도

가. 개발목표

- 주관/제1세부연구기관(계명대학교 약학대학) : 구제역백신 표식인자 혼합 제제 개발
- 제1협동 연구기관(강원대학교 수의과대학/전북대학교 수의과대학)
 - 선발 백신/색소 혼합제형의 농장적용
 - 선발 백신/색소 혼합제형의 출하까지의 안정성 평가
 - 구제역백신 표식인자의 육안 및 조직병리학적 안전성 연구
- 참여기관 1 ([주] 코미팜) : 시제품 개발, 공정개발
- 상기의 내용을 <그림 10>에 제시하였음



<그림 10> 2차년에 걸친 연구 추진도

제5절 연구개발의 추진전략 및 방법

1. 제1단계 추진방법 : 백신 표식인자 후보물질 screening

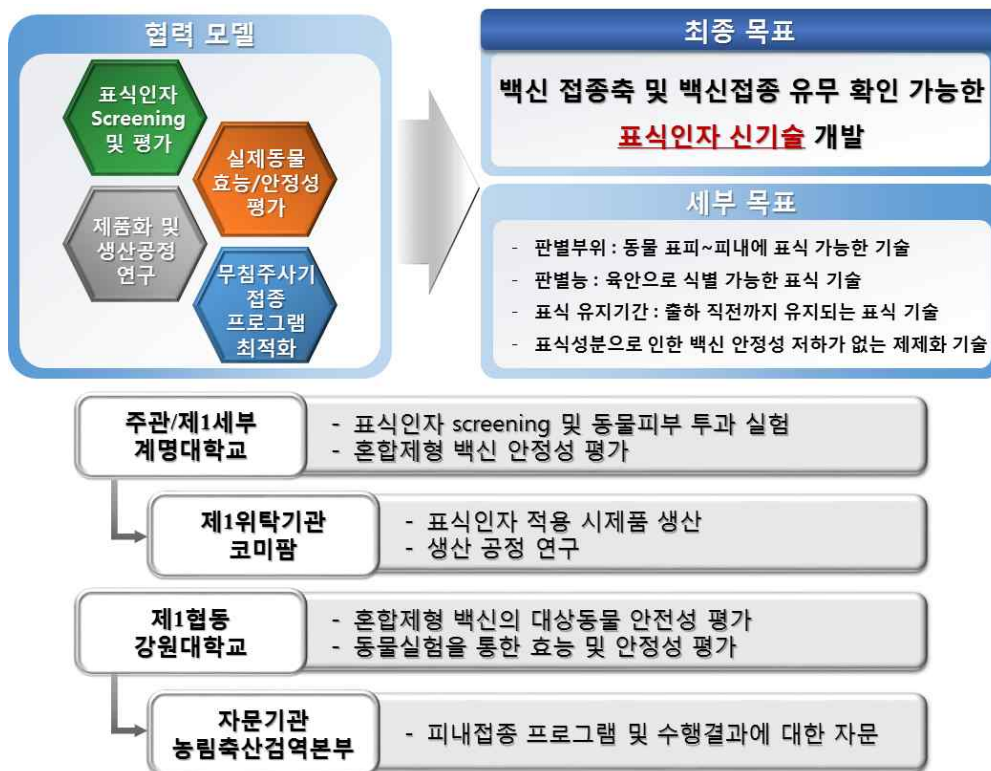
- 본 과제를 수행하기 위해 먼저 투여 시 육안으로 확인이 가능한 수준으로 동물의 표피~피 내에 침착 가능한 표식인자를 screening하여야 하므로, 계명대(주관/제1세부기관)에서는 먼저 표식인자로 이용될 수 있는 다양한 천연물 유래색소 및 식용 가능한 색소 등 표식인자로 이용될 수 있는 물질들을 확보한 뒤 동물피부 침투 실험을 통해 침착정도를 육안으로 확인하여 기준을 충족하는 후보물질들을 선별할 것임

2. 제2단계 추진방법 : 표식인자 적용 구제역백신의 제제화

- 주관연구기관은 제1단계 실험에서 선정된 표식인자 후보물질을 이용하여 백신/색소 혼합제형을 설계하여 후보제형을 선정하여 제조한 후, 무침주사기를 이용한 동물피부 침투 실험을 통해 표식능을 확인하여 후보제형을 선별할 것임. 선별된 후보제형에 대해 단기 안정성 시험이 이루어짐과 동시에 강원대 (제1협동연구기관)에서는 야외 농장에서 직접 동물실험을 통한 면역병리학적 연구와 구제역 방어면역 평가를 통하여 역가 저하, 항체 형성 감소 등 표식인자가 백신의 효능에 끼칠 수 있는 영향을 평가할 것임. 또한 표식인자의 표식능을 평가하기 위해 판별부위, 판별능, 판별 유지기간에 대해 실험할 것임.
- 본 연구에서는 개발중인 무침주사기를 이용하여 수행할 것이며 무침주사기를 이용한 접종 프로그램의 최적화를 위해 후보제형 접종 동물의 중화항체 형성 평가와 함께 표식능 확인 실험을 수행할 것임

3. 제3단계 추진방법 : 혼합제형 백신의 효능 및 안정성 실험

- 주관연구기관은 제2단계의 실험 결과를 모두 종합하여 최적의 백신-표식인자 최종 혼합제형을 도출하고, 코미팜(위탁기관)에서는 구제역백신 시제품개발 및 제조공정을 개발할 것임. 최종 혼합제형의 효능을 평가하기 위해 2세부기관에서는 야외 농장에서의 동물실험을 진행함과 동시에 농림축산검역본부의 자문을 수행할 것임
- 주관연구기관은 ELISA 항체가 확인을 포함한 장기 안정성 시험을 실시함과 동시에 제1협동연구기관에서는 출하시점까지의 안정성 평가를 통해 표식인자 함유 구제역백신제형의 안정성을 확보하고자 함
- 이상의 연구를 수행하기 위한 협력모식도는 <그림 11>과 같음



<그림 11> 2개년간의 연구개발 추진도

제2장 연구수행 내용 및 결과

제1절 표식인자 screening 실험모델 선정

1. 천연 색소 및 실제 동물 적용 시제품의 용해 성상 확인

가. 색소의 물에 대한 용해도 실험

- 각 색소들을 피펫을 이용해 칭량하여 10%(v/v)의 농도로 물에 섞어 vortex mixer로 용해시킨 직후 성상을 관찰한 후, 6시간 후 다시 관찰하여 침전이 발생하였는지 확인함
- 본 연구의 개념은 무침주사기를 이용하고 식용색소 및 tattoo ink를 적용하여 구제역 백신 접종 후 백신 접종축을 구별, 확인할 수 있는 표식인자 기술을 개발하는 것임 <그림 12>



<그림 12> 본 연구에 사용한 장비와 재료

- 각 색소들을 30%(v/v)의 농도로 물에 혼합하여 용해도를 확인함 <그림 13, 14, 표3>



<그림 13> 10% v/v의 성상



<그림 14> 30% v/v의 성상

<표 3> 색소의 용해도 평가 결과 요약

		식용 색소					Stone社 색소	
10%(v/v)		Violet	Black	Blue	Red	Green	Black	Green
용 해 여 부	직후	○	○	○	○	○	○	○
	6시간후	○	○	○	○	○	○	○
	30%(v/v)							
	직후	○	○	○	○	○	○	○
	6시간후	○	○	○	○	○	○	△

나. 천연 색소의 실제동물 조직 적용시 정상확인을 위한 예비시험

- 5종의 식용색소 및 Stone사의 색소를 물을 이용해 각각 5%로 희석하여 20mL을 만들어 vial에 담고 무침주사기를 이용해 돼지 목 뒤의 피하주사 부위에 각각 30, 50psi로 색소를 적용하였음.
- overnight 동안 4℃ 조건에서 둔 후, 조직을 잘라 침투 및 표식능을 확인하였음 <표 4, 5>

<표 4> 무침주사기의 수성백신 및 수성베이스 항생제의 증폭기 최소압력

개체 크기/종류	투여경로 / 증폭기 압력	개체 크기/종류	투여경로 / 증폭기 압력
신생자돈	근육 주사 - 25 psi	27.2 ~ 36.3 kg	근육 주사 - 60 psi
이유자돈	근육 주사 - 35 psi	36.3 ~ 68 kg	근육 주사 - 70 psi
4.5 ~ 13.5 kg	근육 주사 - 35 psi	68kg 이상	근육 주사 - 80 psi
13.6 ~ 18.1 kg	근육 주사 - 35 psi	모든	근육 주사 - 90 psi
18.1 ~ 27.2 kg	근육 주사 - 50 psi		

<표 5> 색소 최적 농도 screening 결과

		식용 색소				Stone社 색소		
10%(v/v)		Violet	Black	Blue	Red	Green	Black	Green
겉보기 성상	진함	진함	진함	진함	진함	진함	진함	진함
	불투명	불투명	불투명	불투명	불투명	불투명	불투명	입자관찰
overnight	구분 가능	구분 가능	구분 가능	구분 가능	구분 가능	구분 가능	구분 힘들 조직에 잘 분포되지 않음	구분 힘들 주사 어려움
		1%(v/v)						
겉보기 성상	진함	진함	진함	진함	진함	진함	진함	진함
	조금 투과	불투명	조금 투과	투과됨	조금 투과	불투명	불투명	입자관찰
overnight	표식인자로 사용되기에는 낮은 농도로 생각됨							
		0.1%(v/v)						
겉보기 성상	맑음	맑음	맑음	맑음	맑음	맑음	진함	입자관찰
	투명	투명	투명	투명	투명	투명	불투명	불투명

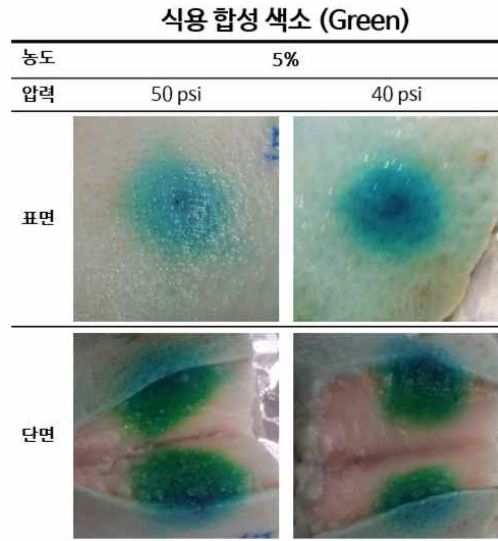
- 실제 동물 적용에 앞선 표식인자 후보군들의 표식능을 평가하기 위한 최적의 실험 모델로 그림 1과 귀 정중앙을 따라 귀 뒤로 약 2~3cm 떨어진 실제 구제역 백신이 접종되는 부위의 조직을 이용하여 표식인자 screening을 수행하기로 결정함
- 구제역 백신 접종 최적 시기인 8주령 돼지로부터 조직을 얻기에는 실질적인 어려움이 있어 출하된 성돈으로부터 조직을 확보함. 그러나 도축 후 가공 과정에서 구제역 백신 접종 부위의 조직을 제거한 후 돼지고기가 공급되기 때문에 실제 구제역 백신 접종 부위보다 지방층이 비교적 두꺼운 특성을 가지고 있지만 접종 부위로부터 최대한 가까운 부근의 조직을 확보하여 표식인자 screening 실험을 수행함
- 실험에 이용된 조직은 인근 축산물 도매시장에서 당일 도축 후 얻은 조직임. 조직은 연구실로 이송하는 과정 및 보관하는 과정에서 4℃ 조건을 유지하였으며, 전달받은 후 24시간 내에 실험에 사용하였음 <그림 15>



<그림 15> 구제역 백신 접종 부위 및 조직 단면도

제2절 동물 적용 시 표피, 피내에 침착되어 충분한 표식능을 가지는 표식인자 screening

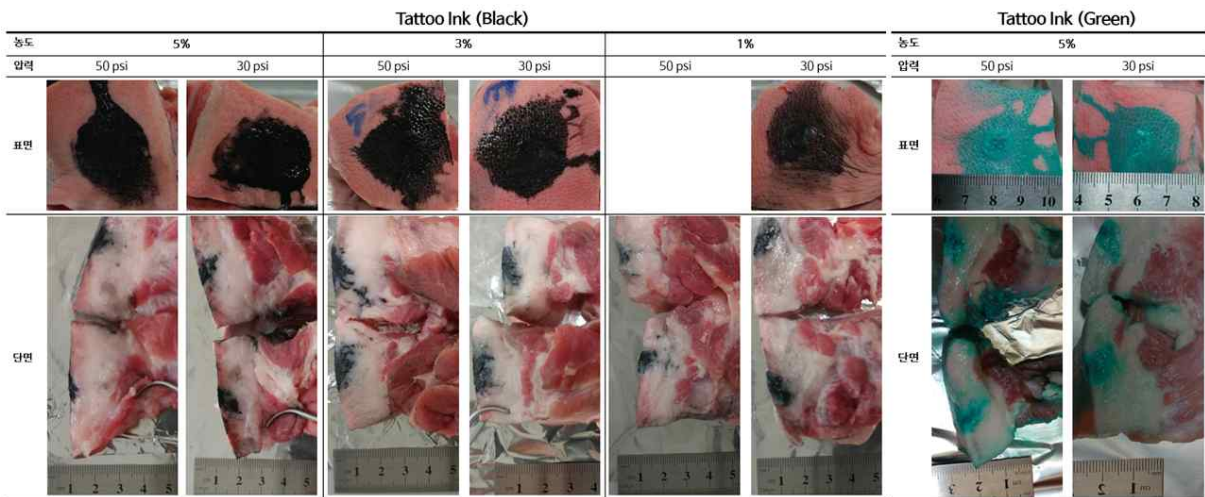
- 실제 동물에 적용되는 시판 tattoo ink 2종과 함께 식용 합성 색소 5종과 식용 천연 색소 10종을 확보하였으며, 다양한 농도(0.1~20%)로 백신-색소 혼합제형을 제조하여 백신에 충분히 용해됨과 동시에 최적의 표식능을 가지는 색소의 최적 농도를 5%로 선정함
- 실제 동물 적용을 가정한 상태에서의 표식인자의 표식능을 확인하기 위하여 피내주사기(무침주사기)를 이용하여 돼지 조직에 색소를 적용한 후, 48시간 동안 조직을 PBS에 담그어 50 rpm의 속도로 교반한 후, 조직의 표면과 단면을 관찰하였음
- <그림 16>과 같이 색소가 다량 방출되었음에도 불구하고 조직 표면에 육안으로 쉽게 확인 가능한 수준의 표식능이 확보되고 조직 내부에도 충분한 색소 침착을 관찰함. 따라서 실제 동물 적용시 백신-표식인자 혼합제형이 충분한 표식능을 얻을 수 있을 것으로 기대됨



<그림 16> 혼합제형 방출 시험 후 돼지 조직 표면 및 단면 사진

제3절 무침주사기를 이용한 백신-색소 혼합제형의 표식능 평가

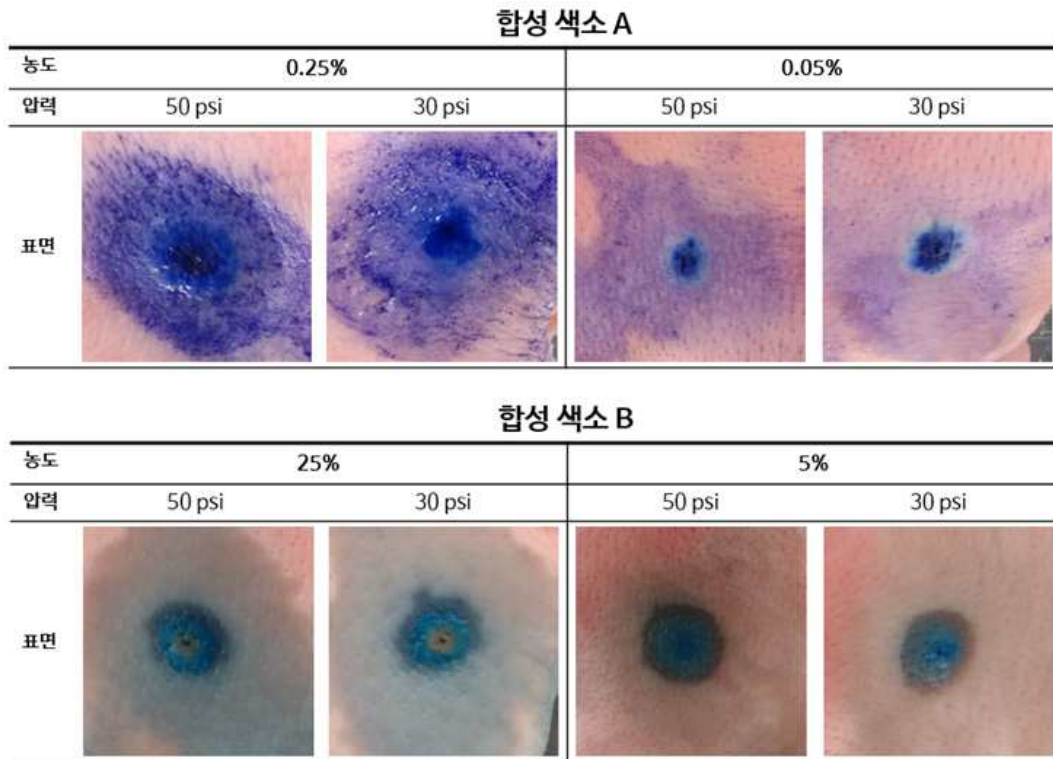
- 표식인자 후보군들의 표식능은 시판 tattoo ink > 합성색소, 식용 합성 색소 > 식용 천연 색소 순으로 우수하였음
- <그림 17>에 따르면 tattoo ink 혼합제형은 색소 농도 1% 적용군에서 비교적 충분한 표식능을 나타냄



<그림 17> 백신-tattoo ink 혼합제형 적용 조직 표면 및 단면 사진

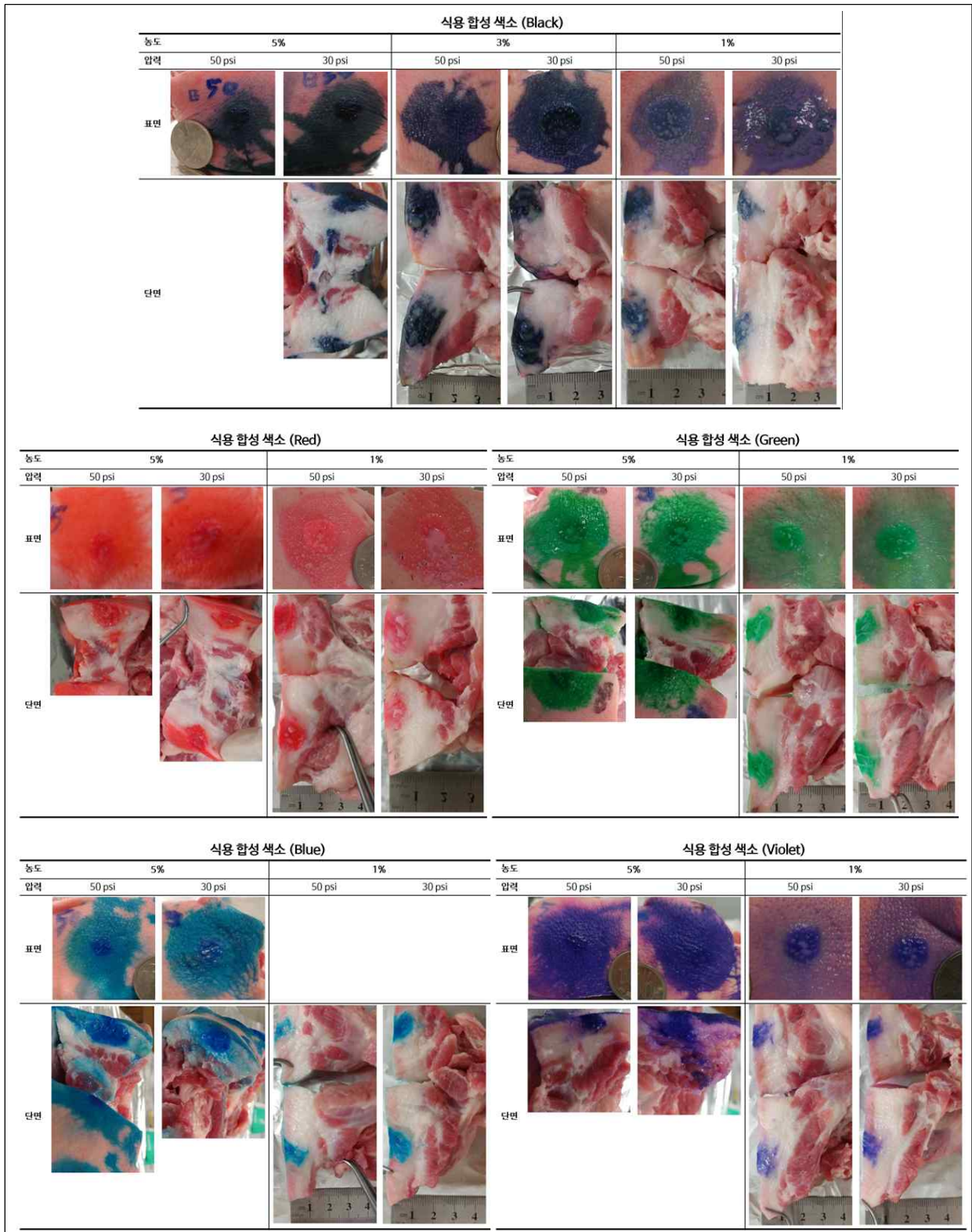
- <그림 18>의 합성 색소 A는 타 색소들과 비교하여 매우 낮은 농도(0.25%)에서도 육안으로 구분이 가능한 수준의 표식능을 나타내었음.
- <그림 19>의 식용 합성 색소는 색소 농도 1% 적용군에서 표식능이 크게 감소하나 육안으로 표식이 구분이 가능한 수준이었음.

- <그림 20>의 식용 천연 색소에서 색소 농도 1% 적용군에서 매우 낮은 수준의 표식능이 확인됨.

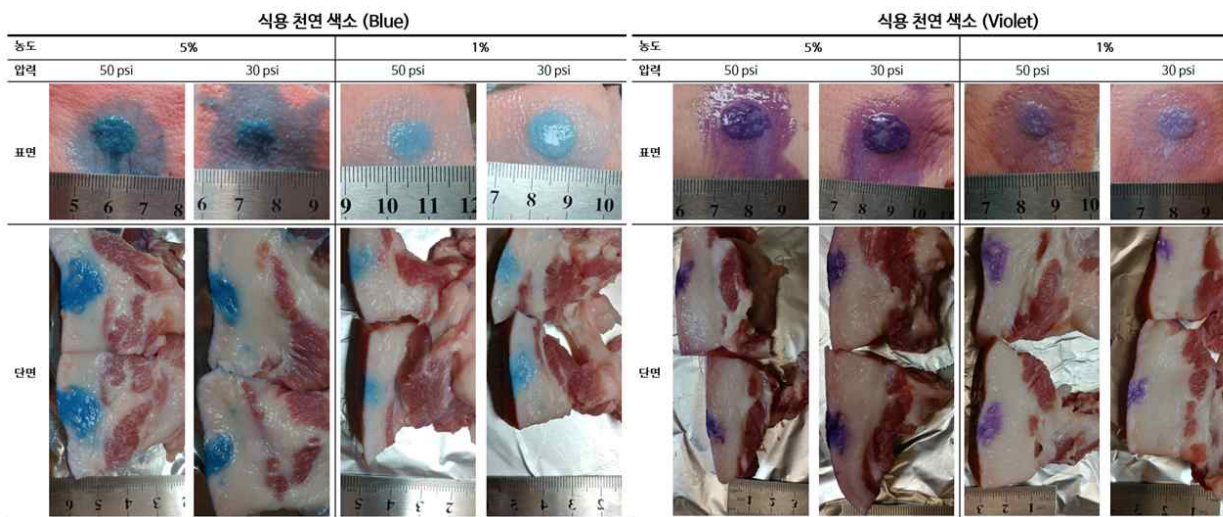
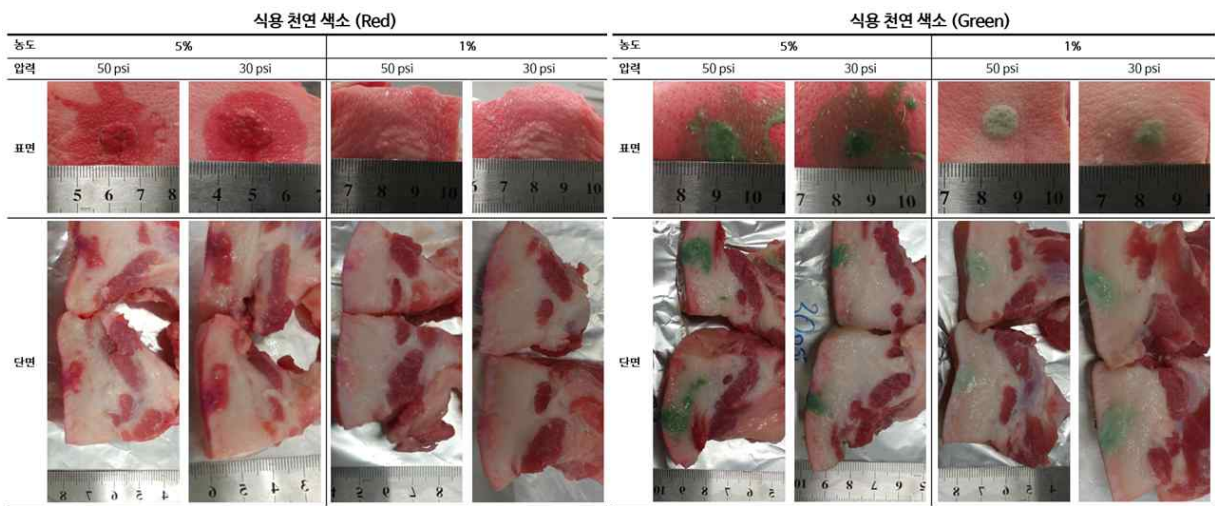


<그림 18> 합성 색소 적용 조직 표면 사진

- 투여기구(무침주사기) 적용 압력을 변화시켜가며 백신-표식인자 혼합제형을 적용하여 피부 침투도를 평가하였을 때, 30, 50psi 적용군에서 각각 약 0.7cm, 1cm의 침투 깊이를 나타내었으며, 50psi 적용군에서 더 많은 양의 혼합제형이 조직 내에 침투되었음
- 반면 투여기구(무침주사기) 적용 후 돼지 조직 표면에 결절이 발생하게 되며, 그 크기는 50psi 적용군에 비하여 30psi 적용군에서 유사하거나 다소 큰 경향을 나타냄. 이는 투여기구(무침주사기)의 낮은 적용 압력으로 인해 혼합제형이 충분한 깊이로 침투되지 못하여 피부 표면에 더 큰 크기의 결절을 발생시키는 것으로 생각됨



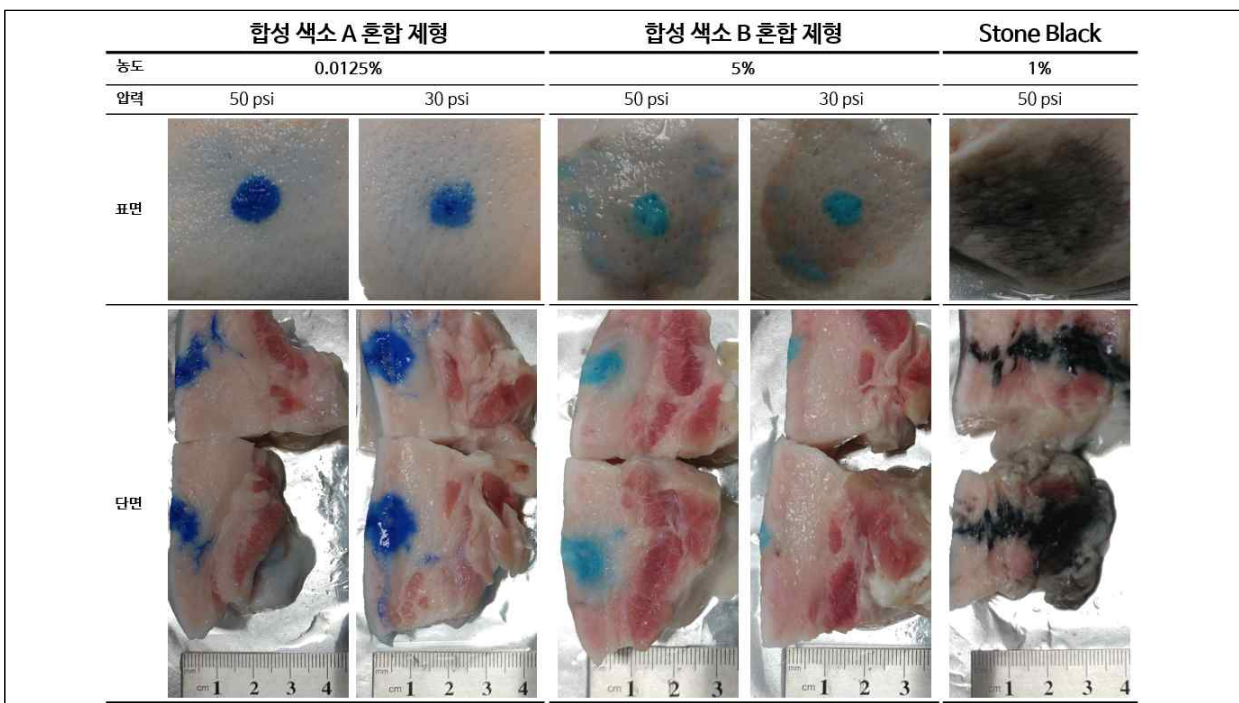
<그림 19> 백신-식용 합성 색소 혼합제형 적용 조직 표면 및 단면 사진



<그림 20> 백신-식용 천연 색소 혼합제형 적용 조직 표면 및 단면 사진

제4절 무침주사기를 이용한 백신-색소 혼합제형의 표식능 평가

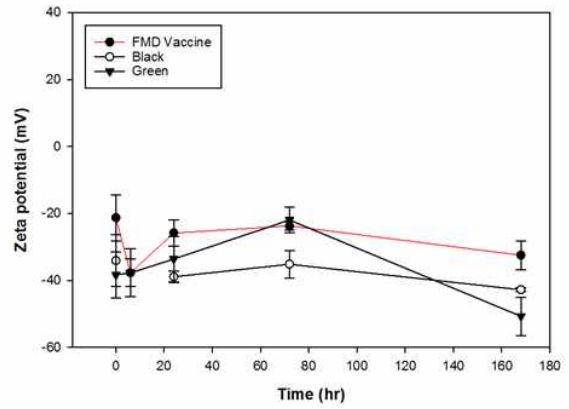
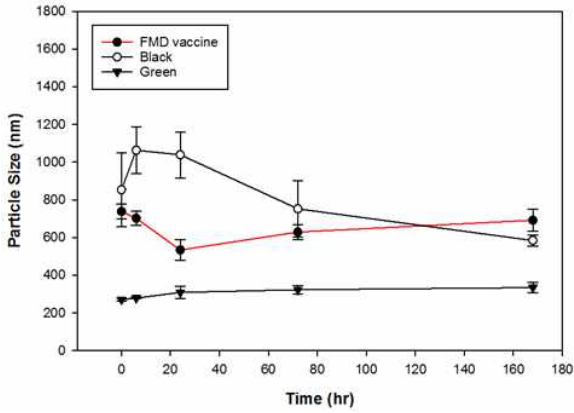
- 위 실험 결과를 토대로 우수한 표식능을 나타낼 것으로 기대되는 후보로 tattoo ink와 합성 색소를 선정하여 실제 동물 적용을 가정한 환경(방출 실험 환경)에서 적용하여 표식능을 관찰하였음
- <그림 21>과 같이 Tattoo ink의 경우 주사부위의 표식은 사라지고 피부에 묻어 있는 색소 일부가 유지된 반면 합성 색소는 접종 부위 피하 및 피내에서 뚜렷한 표식을 유지하였고 육안으로도 명확한 표식을 유지하였음
- 결론적으로 Tattoo ink, 천연색소, 합성색소들을 평가하였을 때 합성색소 2 종류가 오랫동안 표식을 유지할 수 있을 것으로 기대되었음.



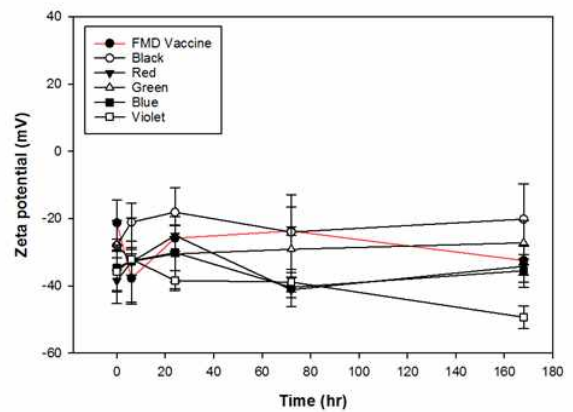
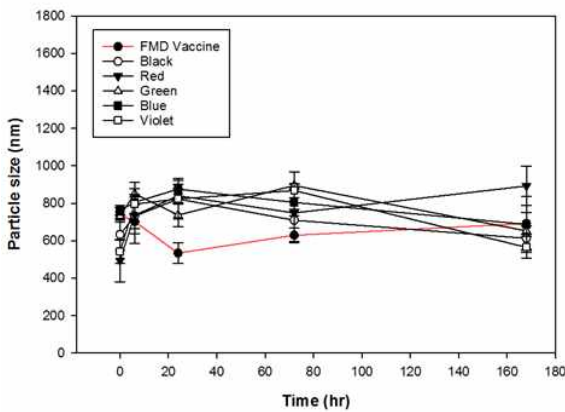
<그림 21> 백신-합성 색소, tattoo ink 혼합제형 방출실험 후 조직 표면 및 단면 사진

제5절 백신-색소 혼합제형의 물리적 단기 안정성 평가

- <그림 22>, <그림 23>과 같이 tattoo ink, 식용 합성 색소와 백신을 섞은 혼합제형에서 1주일 동안 유의한 particle size나 zeta potential의 변화가 관찰되지 않음. 이는 색소의 혼합으로 인해 백신의 안정성에 영향을 줄 수 있는 aggregation 등의 현상이 발생하지 않았으며, 적절한 표면 전하의 유지를 나타냄.
- 따라서 백신과 식용 합성 색소 또는 tattoo ink의 혼합제형에서 최소 1주일간 물리적 안정성이 유지됨을 확인함.

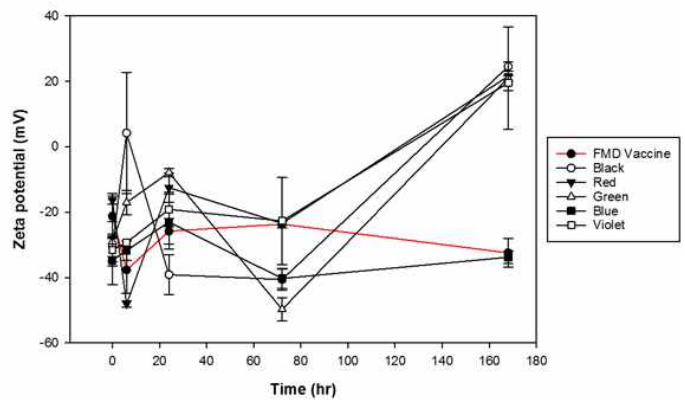
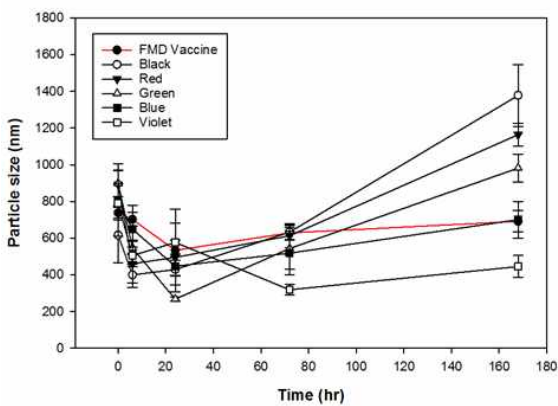


<그림 22> 백신-tattoo ink 혼합제형의 물리적 성상 변화



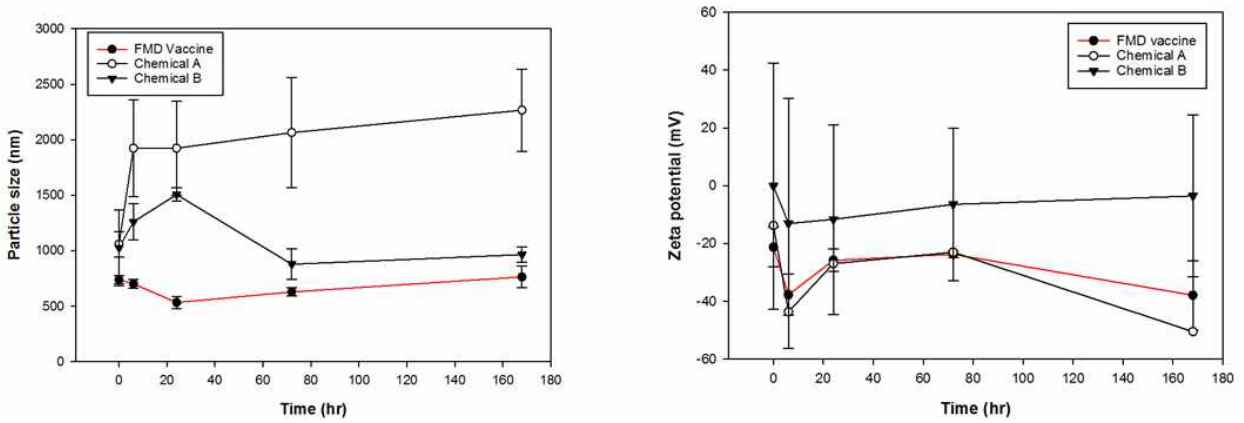
<그림 23> 백신-식용 합성 색소 혼합제형의 물리적 성상 변화

○ 백신-식용 천연 색소의 혼합제형의 물리적 특성은 <그림 24>과 같이 72시간 시점까지는 큰 변화를 나타내지 않으나 1주일 시점에서 particle size와 함께 zeta potential이 급격하게 증가하는 경향을 나타냄. 이는 혼합 후 3일이 지난 시점에서 식용 천연 색소와 백신제제간에 aggregation과 표면 전하의 변화로 인해 안정성이 저하되었음을 알 수 있음. 그러나 백신과 식용 천연 색소의 혼합제형은 최소 3일간 물리적 안정성이 유지되어 농가에서 사용자 (수의사, 농부)들이 조제 직후 사용하는 데에는 큰 안정성의 문제는 없을 것으로 사료됨



<그림 24> 백신-식용 천연 색소 혼합제형의 물리적 성상 변화

- 백신-합성 색소 A,B 혼합제형은 <그림 25>와 같이 혼합 이후 입자도가 증가하였으나 피내 주사를 하는 데에는 문제가 없는 크기로 사료됨. 아울러 제타전위 역시 양호한 수준으로 유지됨을 알 수 있음.



<그림 25> 백신-합성 색소 A, B 혼합제형의 물리적 성상 변화



제6절 축종에 피내 접종 이후 표식여부의 확인

- 돼지에서 표식인자 함유 백신의 피내 접종



- <그림 26>에서 보는 바와 같이 백신-식용 합성색소 혼합제제를 피내접종 한 뒤 1주일간 관찰한 결과 Black 색소를 제외하고는 1~2주간 표식능이 유지됨을 알 수 있었음 <그림 27>.
- 돼지는 통상 무침주사기를 사용할 때의 무난한 반응을 보였으며, 표식인자 농도에 따라 초기 표식되는 정도에 차이가 있음을 알 수 있음

<그림 26> 피내 접종기를 이용한 표식인자 함유 백신의 접종 후 모습

	1일차	2일차	5일차	6일차	7일차
Blue					
Green					
Violet					
Black					
Red					

<그림 27> 백신-식용 합성색소 혼합제제를 피내접종 한 이후 표식 유지도를 측정한 결과

제7절 백신-색소 혼합제형의 면역원성 평가

- Tattoo ink, 합성 색소, 식용합성 색소, 식용천연 색소를 포함하는 백신-색소 혼합제형을 조제하여 10~14주령의 돼지를 대상으로 0.2 ml씩을 목 부위 피내로 1회 접종 (50psi 압력)하고, 색소를 포함하지 않은 순수 백신 접종 그룹과 항체 형성을 비교하였음
- 시험에 사용된 구제역 백신은 코미팜에서 생산된 O+A형 2가 백신으로 O 혈청형에 대한 ELISA 항체를 상용화 ELISA kit를 사용하여 측정하였음
- 구제역 백신을 접종하지 않은 14주령의 일반돼지 22마리를 준비하여 20마리는 시험백신 접종군, 나머지 2마리는 비접종 대조군으로 하였음. 시험백신 접종군은 다시 4마리씩 5그룹으로 세분화하여 4개 그룹은 각각의 백신-색소 혼합제형 접종그룹, 나머지 1개 그룹은 순수 백신만을 피내로 접종하는 그룹으로 하였음

<표 6> Tattoo ink 및 합성 색소를 포함하는 구제역 백신 혼합제형의 항체양성을

구분	조성	항체 양성율 (%)	
		접종 전 (14주령)	접종 4주 후 (18주령)
T1	Tattoo (black) + 백신	0	0
T2	Tattoo (green) + 백신	0	0
T3	합성 A + 백신	0	50
T4	합성 B + 백신	0	0
백신 대조군		0	25
비접종 대조군		0	0

- <표 6>과 같이 백신 접종 전 모든 개체는 항체 음성이었고, 1회 피내 접종 이후 순수 백신 접종 그룹의 경우 4마리 중 1마리만 항체 양성으로 양전이 되었고, 나머지 3마리의 경우 여전히 항체 음성 상태를 유지하였음
- 합성 색소와의 혼합제형 그룹 중 1개 그룹에서 항체 양성율이 50%를 기록하였으나, tattoo ink 2그룹과 나머지 합성 색소 그룹의 경우, 여전히 항체 음성 상태를 유지하고 있었음. 이 결과만으로는 tattoo ink 및 합성 색소의 혼합이 백신의 면역원성 변화에 미치는 영향을 정확히 확인할 수 없었음
- 구제역 백신을 접종하지 않은 10주령의 일반돼지 26마리를 준비하여 24마리는 시험백신 접종군, 나머지 2마리는 비접종 대조군으로 하였음. 시험백신 접종군은 다시 4마리씩 6그룹으로 세분화하여 5그룹은 각각의 백신-색소 혼합제형 접종그룹, 나머지 1그룹은 순수 백신만을 피내로 접종하는 그룹으로 하였음

<표 4> 식용합성 색소를 포함하는 구제역 백신 혼합제형의 항체양성율

구분	조성	항체 양성율 (%)	
		접종 전 (10주령)	접종 4주 후 (14주령)
T1	식용합성 (black) + 백신	50	0
T2	식용합성 (green) + 백신	25	25
T3	식용합성 (red) + 백신	50	0
T4	식용합성 (blue) + 백신	0	25
T5	식용합성 (violet) + 백신	25	25
백신 대조군		50	50
비접종 대조군		0	0

- <표 4>와 같이 백신 접종 전 항체 양성율은 0~50% 수준이었고, 1회 피내 접종 이후 순수 백신 접종 그룹의 경우, 50% 항체 양성율이 그대로 유지되었음
- 식용합성 색소와 백신 혼합제형을 접종한 그룹의 경우에는 특별한 경향성 없이 접종 전 항체 양성율과 비교하여 줄어들거나 증가하였으며, 최대 25%를 넘지 못하였음. 이전 결과와 동일하게 이 결과만으로는 식용합성 색소의 혼합이 백신의 면역원성 변화에 미치는 영향은 없는 것으로 평가되었음
- 구제역 백신을 접종하지 않은 12주령의 일반돼지 26마리를 준비하여 24마리는 시험백신 접종군, 나머지 2마리는 비접종 대조군으로 하였음. 시험백신 접종군은 다시 4마리씩 6그룹으로 세분화하여 5그룹은 각각의 백신-색소 혼합제형 접종그룹, 나머지 1그룹은 순수 백신만을 피내로 접종하는 그룹으로 하였음

<표 5> 식용천연 색소를 포함하는 구제역 백신 혼합제형의 항체양성율

구분	조성	항체 양성율 (%)	
		접종 전 (12주령)	접종 4주 후 (16주령)
T1	식용천연 (black) + 백신	25	0
T2	식용천연 (green) + 백신	0	75
T3	식용천연 (red) + 백신	0	0
T4	식용천연 (blue) + 백신	25	0
T5	식용천연 (violet) + 백신	50	25
백신 대조군		25	0
비접종 대조군		0	0

- <표 5>와 같이 백신 접종 전 항체 양성율은 0~50% 수준이었고, 1회 피내 접종 이후 순수 백신 접종 그룹의 경우, 모든 개체가 항체 음성으로 확인되었다. 식용천연 색소와 백신 혼

합 제형을 접종한 그룹의 경우에는 특별한 경향성 없이 접종 전 항체 양성율과 비교하여 줄어 들거나 증가하였으며, 특정 그룹에서는 항체 양성율이 75% 까지 증가한 반면, 대부분의 그룹은 순수 백신 접종 그룹과 동일하게 백신 접종 후 항체 양성율이 감소하는 양상을 보였고, 이 결과만으로는 식용천연 색소의 혼합이 백신의 면역원성 변화에 미치는 영향을 정확히 확인할 수 없었음

- 상기 실험들을 통해 피내 접종 시 표식 기능을 가지는 여러 가지 다양한 색소들을 (tattoo ink, 합성 색소, 식용합성, 식용천연) 실제 구제역 백신과 혼합하여 사용하였을 때, 구제역 백신의 효과에 미치는 영향을 확인하고자 하였으나, 결론론적으로 상용화 구제역 백신을 (메리알 사) 0.2 ml 1회 피내로 접종하였을 때 면역자극이 충분치 못하였고, 이로 인해 순수 백신 접종 그룹에서도 항체 양성율이 매우 저조한 결과를 보여, 각 그룹 간에 의미 있는 결과 도출이 힘들었다. 또한, 피내 접종법의 경우, 근육 접종법과 비교하여 소량의 항원으로 동등한 면역자극이 가능하고, 특히 이상육 발생이 크게 경감하는 것으로 알려져 있지만, 실제로 피내 접종법을 적용하는데 있어서 접종 개체 간의 편차를 줄이고, 효과적으로 면역을 유도하기 위한 구체적인 사용법 확립이 (접종량, 접종 시기, 접종압력 등) 우선시 되어야 할 필요가 있다고 판단됨
- 결론적으로, 피내 접종을 통해 백신 접종에 대한 표식을 남기는 것도 중요하지만, 가장 우선시 되어야 할 것은 백신 접종에 대한 효과를 보증하는 것으로 피내 접종법을 통한 표식인자를 개발하기 위해서는 피내 접종법에 대한 추가적인 연구가 선행되어야 할 것이며, 피내 접종법을 통해 백신의 효과를 온전히 발휘할 수 있을 때 비로소 표식인자에 대한 추가 연구가 가능할 것이다. 이러한 측면에서 표식인자 기능을 가지면서 백신의 면역을 확실히 부여할 수 있는 새로운 방법에 대한 연구가 추가로 필요할 것으로 사료됨

제8절 표식능 확인을 위한 디바이스 적용 가능성 검토

가. Ralgro를 응용한 표식능 평가

- 상기와 같은 방법 상황에서 디바이 구축을 통한 표식 가능 여부에 대한 검토를 수행함으로써 자발적인 연구를 수행하였음
- Ralogun needle 정보 <그림 28>
 - O.D. : 3.4 mm, I.D. : 2.65 mm
 - 1, 2mm SUS304 ball이 pellet과 함께 적용이 가능함.
- Pellet 정보
 - 3개로 나뉘어져 있음.
 - 각 pellet : 무게 = 16.6mg (총 49.7mg), 지름=2.3mm, 길이 = 3.2mm (총 9.6mm)
 - 2.3mm 지름을 가진 pellet을 1cm의 길이로 타정하는 것은 부러질 가능성이 매우 높기 때문에 이러한 방식을 취한 것으로 생각됨



<그림 28> Ralgro 외형과 펠렛의 모양

○ Pellet 의 제조

- 하기의 처방을 바탕으로 pellet 처방 F1 및 F2를 제조하였음
- Formulation 1(magnesiumstearate는 따로)과 2를 칭량하여 비닐에 담아 충분히 모두 섞이도록 혼합함
- 오븐에서 overnight 동안 충분히 건조시킨 후 덩어리가 저있을 경우 곱게 갈아줌
- F1과 F2를 Needle mold 혹은 stainless tube를 이용하여 타정함 <표 6>

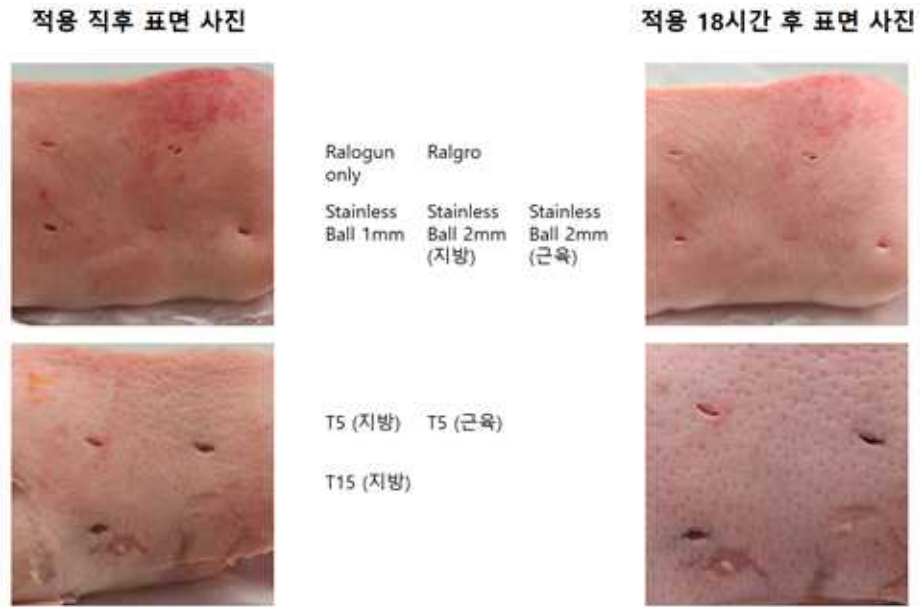
<표 6> 펠렛의 처방

Ingredient	Function	Formulation (g)	
		F1	F2
Lactose monohydrate	Carrier	13.125	13.125
Magnesium stearate	Lubricant	2.5	2.5
Boric acid		1.25	1.25
Tattoo ink	Dye	3.125	3.125

○ Pellet 의 돼지 조직 적용시험





- 냉장된 돼지 조직을 데워지도록 실온에서 한 시간 동안 둠
- Ralogun을 이용하여 제작된 pellet을 지방층 내, 지방층 아래로 깊이를 달리하여 투여
- *조직 1 : Ralogun only / Ralgro / Stainless ball 1mm, 2mm
- *조직 2 : T5 지방층 / T5 근육층 / T15 지방층
- 표식 인자가 육안으로 확인 가능한지, 축진이 가능한지 관찰함
- 조직을 매스로 갈라 내부를 확인함 <그림 29, 표 7>

○ 실험결과



<그림 29> Ralgro 적용 이후 돼지 피부의 상태

<표 7>

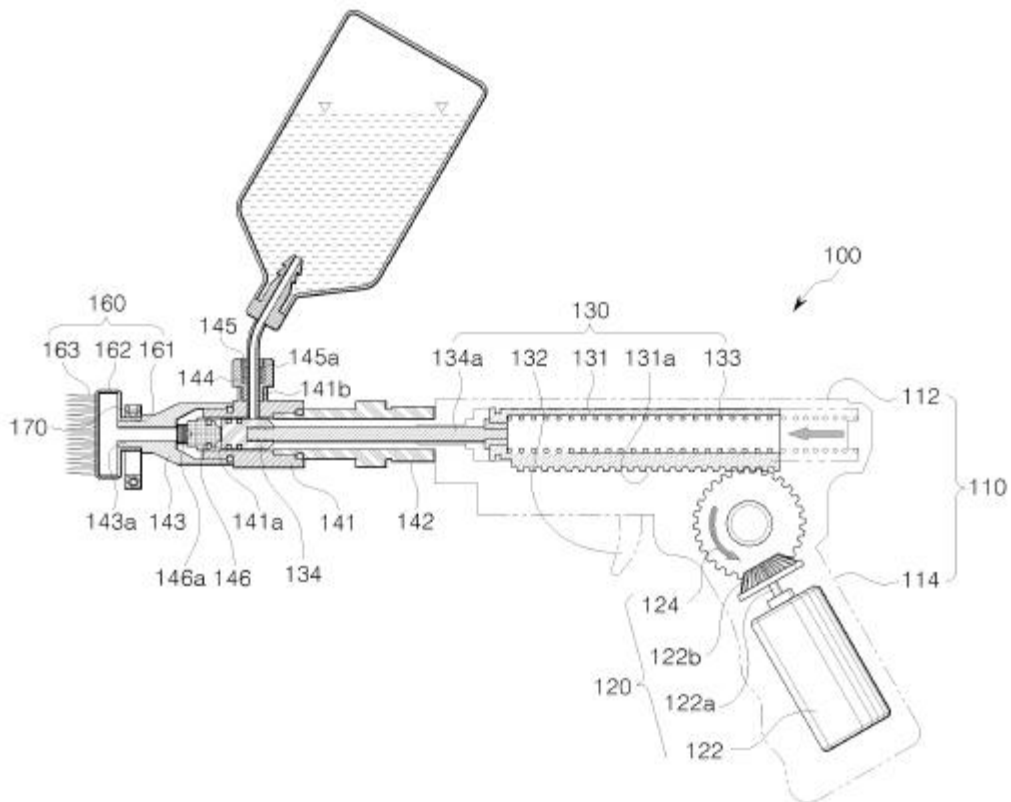
실험군	육안확인	추진확인	조직 내 사진
Ralogun only	X	X	 <p>펠릿이 피하지방층에 존재하는 모습</p>
Ralgro	X	X	
S.ball 1mm	X	X	  <p>T5</p>
S.ball 2mm (지방)	X	X	
S.ball 2mm (근육)	X	X	
T5 (지방)	X	X	 <p>T15</p>
T5 (근육)	X	X	
T15 (지방)	X	X	

Ink의 양이 더 많은 T15에서 표식이 더 진하게 남음을 확인. 그러나 조직 내부만 착색되어 두 경우 모두 육안으로 표식여부의 확인은 불가능하였음

제9절 Device 고안 성과

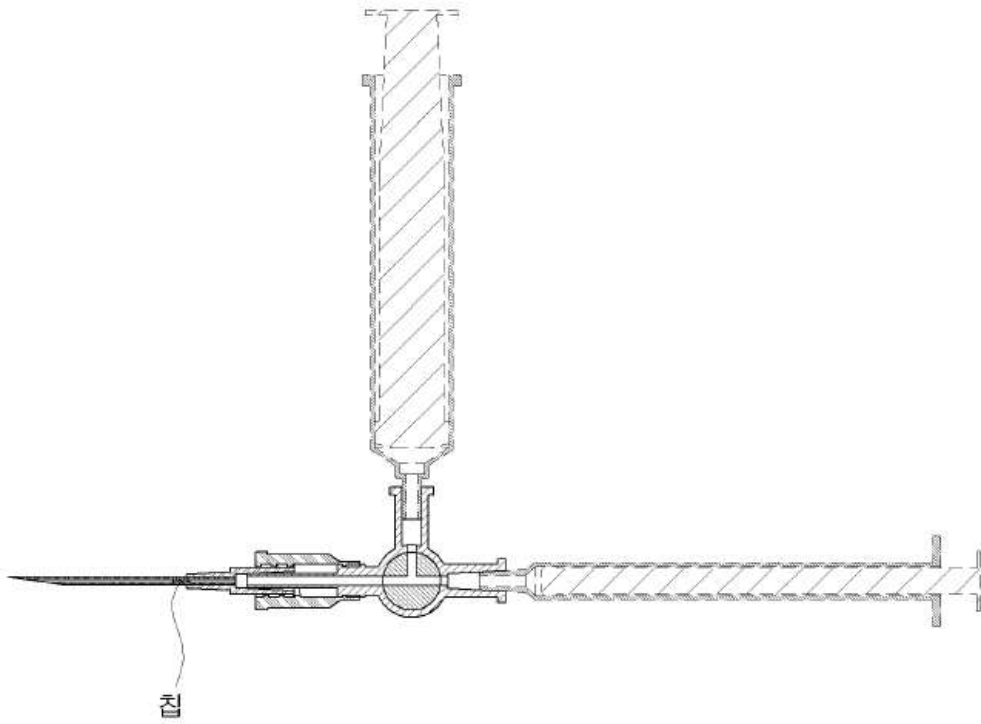
가. 백신 표식기

- 백신 표식기에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 가축에 백신을 접종하면 가축의 피부에 백신의 접종 여부가 표시되도록 하여 백신의 접종여부를 확인 할 수 있도록 하는 백신 표식기를 고안하였음
- 외력에 의해 주사기의 실린더를 몸체안으로 넣어 주사액이 외부로 분출토록 하는 주입수단)과, 상기 주입수단의 몸체를 내부에 실장하는 지지수단과, 상기 지지수단의 전면에 위치하여 백신용기로부터 유입되는 약물을 외기로 분사하는 분사부와, 상기 분사부의 일측에 위치하며 백신을 보관하고 있는 백신용기를 포함하는 것으로 특징으로 함
- 개념도는 다음과 같음



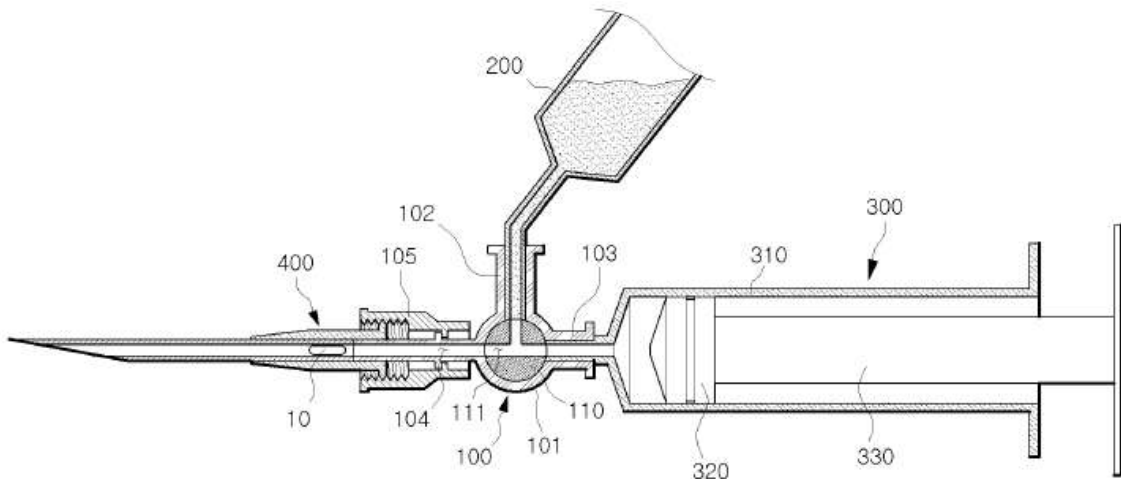
나. 동물용 주사기

- 재질은 합성수지 및 금속재임
- 이 동물용 주사기는 생체(동물)에 백신을 주입시, 주사바늘에 수용된 칩이 약제와 함께 생체에 이식되어 백신을 중복으로 접종하는 등의 사고를 방지할 수 있는 것이 특징임.
- 개념도는 다음과 같음



다. 백신접종장치

- 백신 접종 장치에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 생체에 백신을 주입 시, 주사바늘인 니들 부재에 수용된 RFID칩이 실린지부재에서 유출되는 약제와 함께 생체에 이식되도록 한 백신 접종 장치에 관한 것임
- 본 발명은 백신 접종과 RFID칩의 이식이 한번에 이루어지도록 하여, 종래와 같이 별도로 백신 접종 및 RFID칩 이식을 하는 것보다 접종 과정에 소요되는 시간이 현저히 짧고, 백신을 중복으로 접종하거나, 백신 접종하지 않고 RFID칩을 이식하는 등의 오인 혼동 사고가 방지되는 백신 접종 장치를 제공하는 것을 목적으로 하였음
- 개념도는 다음과 같음



제10절 연구개발성과

가. 논문게재성과

- SCIE(IF : 2.333) 1편 : Arhives of Pharmacal Research / 2017. 12 / Rakesh Bastola, Gyubin Noh, Taekwang Keum, Santosh Bashyal, Jo-Eun Seo, Jaewoong Choi, Yeonsu Oh, YoungSik Cho & Sangkil Lee, Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system, 40:1238-1248 / 국제 / SCI(E)
- SCOPUS 저널 1편 : (online publish) Journal of Pharmaceutical Investigation / Rakesh Bastola and Sangkil Lee, Physicochemical properties of particulate vaccine adjuvants: their pivotal role in modulating immune responses / 국내 / SCOPUS

나. 특허출원 성과

- 대한민국 실용신안등록출원 / 이상길 / 백신 표식기 / 출원일 : 2017. 07. 21
- 대한민국 디자인심사등록출원 / 이상길, 금태광, 노규빈 / 동물용 주사기 / 출원일 : 2018. 10. 16
- 대한민국 특허출원 / 이상길, 바스톨라 라케시, 서조은 / 백신 접종장치 / 출원일 : 2018. 10. 16

다. 학회발표

- 국내외 학회 : 5회

제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제1절 목표

- 본 연구의 목표는 구제역 백신 접종 후 백신 접종축을 구별, 확인할 수 있는 표식인자를 개발하는 것임
- 궁극적으로는 항체형성 유무와 상관없이 백신접종 유무의 확인이 가능한 표식인자 및 이를 전달하는 방법을 개발하는 것임

제2절 목표 달성여부

- 연구성과를 정성적 부분과 정량적 부분으로 다음과 같이 요약함
- 정성적 성과
 - 표식능 : 출하시점까지의 표식가능 확인을 위한 후보물질을 도출하여 백신과의 혼합 안정성에 큰 영향을 미치지 않는 표식인자 후보물질이 확보되었음. 현재 돼지피부조직 적용시험은 완료되었고, 돼지에 적용한 시험이 진행중에 있으며, 출하시점까지의 결과는 2차년도 연구초기에 확보 예상됨
 - 무침주사기 적용시 동물이 접종 압력에 의해 임상적으로 약간의 거부반응을 나타내기는 했으나 백신표식인자 혼합물의 물질에 대한 불필요한 임상적 반응은 나타내지 않는 것으로 확인함
 - 무침주사기로 백신-표식인자 혼합물을 접종하였을 때 피하층까지만 침투하고 근육내로는 퍼지지 않는 것을 육안적으로 확인하였고 포르말린 고정시에도 1주일 이상 색소가 유지되는 것을 확인함
 - 무침주사기를 사용한 피내접종법이 접종축에 대하여 고른 면역을 유도하지 못하였기 때문에 표식인자가 백신의 효능에 미치는 영향을 판단할 수 없었고, 접종 그룹 간에 유의미한 차이는 확인되지 않았음
- 정량적 성과
 - 정량적 목표 : 정책제안을 제외한 나머지 항목들은 성과를 초과달성하였음.

제3절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 정책제안은 미달성됨
- 정책의 제안은 실용적 결과를 득한 이후 진행하는 것이 바람직하다고 판단되며, 과제종료 1차년도에 정책 제안을 위한 협의를 진행할 계획임

제4장 . 연구결과의 활용 계획 등

제1절 예상되는 연구성과의 활용분야 및 활용방안

- 본 연구의 성과는 다양한 축종의 구제역 백신 접종 이후 표식가능성 여부를 알 수 있는 방안 및 연구에 활용될 수 있을 것임
- 본 연구의 다양한 시도의 결과는 향후 바람직한 표식방법의 도출을 위한 귀중한 발판이 될 것으로 사료됨

제2절 추가 연구의 필요성

- 본 연구를 통해 궁극적으로 표식의 방법이 용이하지 않으나 물리적인 방법, 특히 device를 활용하는 것이 표식의 유지에 더 도움이 될 것으로 기대됨
- 후속 연구를 통하여 다양한 축종에 바람직한 표식용 device, 주입장치 등의 개발을 위한 지정공모과제를 제안하는 바임

제3절 기업화 추진방안

- 본 성과는 관심이 있는 축산관련 업체 및 방역관련 업체에게 전용실시가 가능함
- 특히 기업화 또는 사업화를 위해서는 정부가 본 기술을 통해 산출된 표식방법을 전매하여 정부의 예산을 지원하는 방안도 검토해 볼 필요성이 있음

제4절 기술이전

- 희망 기업이 있으면 언제든지 전용실시, 통상권 실시가 가능함

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 구제역 백신 접종측 확인을 위한 표식인자 개발				
	(영문) Development of Foot and Mouth Disease Vaccination Indicator				
주관연구기관	계명대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 제약학과	
참 여 기 업	주식회사 코미팜			(성명) 이상길	
총연구개발비 (350,000 천원)	계	350,000	총 연 구 기 간	2016. 09. 05~2018. 09. 04(2년 월)	
	정부출연 연구개발비	350,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	35
	기업부담금	0		내부인원	35
	연구기관부담금	0		외부인원	0
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>본 연구의 목표는 구제역 백신 접종 후 백신 접종측을 확인할 수 있는 표식인자를 개발하는 것이며, 구체적으로는 항체형성 유무와 상관없이 백신접종 유무의 확인이 가능하고, 백신 접종 당시 및 장기간 확인할 수 있는 상용가능 표식인자를 개발하는 것임. 본 연구를 통하여 다양한 천연색소, 합성색소, tatto ink를 적용하여 표식가능여부를 확인하였음. 색소를 적용하는 것은 오랜 기간 동안 표식을 유지시키는 것은 어려웠으나 디바이스 개발 또는 물리적인 표식방법을 적용한다면 가능할 것으로 기대함</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>표식인자 후보물질 screening을 통하여 동물 문신 색소, 식용 천연물 유래 및 합성 색소들의 표식가능성을 평가하였고, 표식인자 피내 침착도를 평가함으로써 투여기구 (무침주사기)를 이용한 백신/표식인자 투여로 돼지에서 표식가능성을 확인하였음. 표식인자-백신 혼합제형의 단기 안정성 시험을 통하여 표식인자-백신 혼합제형에서 물리적 안정성이 유지됨을 확인하였음. 또한 본 연구의 지원을 통하여 SCIE급 논문 1편(IF : 2.330)과 KCI급 논문(SCOPUS 등재) 1편을 게재하였으며, 5회의 국내외 학술발표를 수행하였음. 또한 특허실용신안 1건, 디자인 1건 및 특허 1건을 출원하였으며, 부가적으로 본 연구의 지원을 통하여 두 편의 연구논문이 리뷰중에 있음</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>향후 본 연구성과는 연계 연구과제를 통하여 기술을 성공시킬 수 있는 방안을 강구할 계획임</p>					

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호			
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	가축질병대응기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	구제역 백신 접종축 확인을 위한 표식인자 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	계명대학교 산학협력단			연구책임자	이상길
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016. 09. 05.-2017. 09. 04	150,000	-	150,000
	2차연도	2017. 09. 04.-2018. 09. 04	200,000	-	200,000
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계		350,000		350,000
참여기업	주식회사 코미팜(위탁연구기관)				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018. 10. 15

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
계명대학교 산학협력단	부교수	이상길

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.

확약	
-----------	--

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

구제역 표식인자에 관한 연구는 국내외 적으로도 아직까지 시도되거나 보고된 바 없는 새로운 연구이며, 상기 연구성과는 구제역의 확산을 방지하여 대국민보건안전의 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

연구성과는 향후 백신 표식인자 연구개발에 대한 환경을 조성함으로써 추후에는 제품 도출, 국가적 정책방향수립에 기여할 수 있는 파급성이 있음

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

본 연구에서는 돼지에서 가능성 연구하였으나 추후 소와 같은 다른 축종에 대한 연구로도 활용이 되어 구제역의 확산을 방지하여 대국민보건에 기여할 수 있을 것으로 기대됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (**아주우수**, 우수, 보통, 미흡, 불량)

가능한 방안을 강구하여 실제로 활용이 가능한 표식인자 기술확보 및 구제역 방어에 대한 대책을 제시하기 위하여 노력하였음. 과제의 전략을 device를 활용한 방법으로 창의적으로 전환하면서까지 과제의 성공을 위해 성실히 노력하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (**아주우수**, 우수, 보통, 미흡, 불량)

2년의 기간 동안 SCIE급 논문 1편(IF : 2.330)과 KCI급논문(SCOPUS 등재)을 게재하였으며, 5편의 국내외 학술발표를 수행하였고, 관련 특허 3건(실용신안 1건, 디자인 1건, 특허 1건)을 출원하는 등 매우 우수한 성과를 도출하였음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
표식인자 후보물질 screening	20	100	동물 문신 색소, 식용이 가능한 합성 및 천연물 유래 색소를 확보하여 돼지 조직 표면에 적용하여 충분한 표식능을 가지는지 평가함
표식인자 피내 침착도 평가	20	100	상기 색소들의 피내 침착도를 평가 완료함
표식인자-백신 혼합제형의 단기 안정성 시험	10	100	표식인자 후보군들을 다양한 농도로 백신과 혼합하여 분산/용해도를 확인함
야외 임상현장에서 혼합제형의 병리, 임상학적 반응 확인	20	100	백신-색소 혼합제형을 무침주사기로 실제 돼지 표피조직에 적용하였을 때 피부조직 중 피하층까지 넓은 범위로 퍼지는 정도를 병리학 전공 수의학 연구진이 육안으로 확인하였으며 그 조직부위를 포르말린에 고정 시에는 1주일 이상 색소 침투정도가 유지되는 것을 육안적으로 확인함
야외 임상현장에서 혼합제형 개체 내 유지정도, 안정도 확인	10	100	야외 임상현장을 모델링한 실험실에서 유지중인 대상 동물에 대해 무침주사기로 체제를 투여하고 모니터링한 결과 식용합성색소의 경우 유지기간이 1주 전후임을 확인함
백신-색소 혼합제형의 면역원성 평가	20	100	코미팜에서 생산된 O+A형 2가 백신으로 O 혈청형에 대한 ELISA 항체를 상용화 ELISA kit를 사용하여 측정함
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구에서는 2년간 설정하였던 정량목표는 충분히 달성하였다고 평가됩니다. 정책제안은 이에 대한 명확한 결과 도출이 지연되었기에 달성하지 못하였지만, 추후 1종의 축종에 대해서라도 정책이 제안될 수 있도록 하겠습니다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 구제역방역을 위하여 축종에 표식을 남길 수 있는 방안에 대한 연구이었으며, 2회의 과제 유찰에도 적합한 연구자가 지원하지 않은 말 그대로 미개척 연구분야이자 해결이 어려운 연구주제이었습니다. 평가위원분들께서 평가를 하실 때에 실제적인 방안마련이 어려운 도전적인 과제이었다는 점과 지원자가 방안 마련을 위해 주어진 상황에서 최선의 성과와 대책을 검토하였음을 고려해 주십사 요청드리는 바입니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구를 지속적으로 이어 갈 수 있는 맞춤형/지정 후속과제가 제안될 필요가 있다고 생각합니다. 특히 device 등을 이용한 방안이 적절하다고 사료됩니다.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

특이사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

특이사항 없음

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	70												10			20			
최종목표	1	1		1							2	1	4			2			
연구기간내 달성실적	3										1	1	7			0			
달성율(%)	100										100	100	100			0			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	표식인자 함유 백신 제조기술
②	표식인자 피내 주입기술
③	백신-색소 혼합제형의 면역원성 평가 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	v	v								
②의 기술						v				
③의 기술	v	v								

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	표식인자 함유 백신의 제조
②의 기술	표식인자의 평가에 활용
③의 기술	표식인자의 평가에 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명					
가중치		40											30			30			
최종목표		1											2			1			
연기간내 달성실적																			
연구종료 후 성과창출 계획																			

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	백신 표식기		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	5,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾	2021년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	-		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)