

(옆면)

(앞면)

318038-2

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

가축질병대응기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003181-01

구제역 백신 개발 연구 최종보고서
접종용 간편 무침주사기

**구제역 백신 접종용 간편
무침주사기 개발 연구**

최종보고서

2020.07.17.

2019

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

주관연구기관 / 전북대학교 산학협력단
협동연구기관 / 한국농수산대학 산학협력단
협동연구기관 / (주) 미라클스코프

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "구제역 백신 접종용 간편 무침주사기 개발 연구"(개발기간 : 2018. 04. 26. ~ 2019. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 7. 17.

주관연구기관명 : 전북대학교 산학협력단 (대표자) 조재영 (인)
협동연구기관명 : 한국농수산대학 (대표자) 노한국 (인)
협동연구기관명 : (주) 미라클스코프 (대표자) 이계한 (인)

주관연구책임자 : 엄재
협동연구책임자 : 박용수
협동연구책임자 : 박세훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	318038-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2018. 04. 26 ~ 2019. 12. 31	단 계 구 분	총 단 계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	구제역 백신 접종용 간편 무침주사기 개발 연구			
	세 부 과 제 명				
연구책임자	업 재 구	해당단계 참여연구원 수	총: 12명 내부: 12명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 200,000천원 민간: 66,670천원 계: 266,670천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 12명 내부: 12명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 350,000천원 민간: 116,670천원 계: 466,670천원
연구기관명 및 소속부서명	전북대학교 산학협력단			참여기업명 (주) 미라클스코프	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
협 동 연 구	연구기관명: 한국농수산대학			연구책임자: 박용수	

※ 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											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

- **구제역 백신접종용 간편 무침주사기 개발**
 - 구제역 백신 전용 무침 주사기 개발 및 상용화 달성
 - 새로운 기술을 융합하여 원천기술 확보 및 실제 데이터를 토해 국내 외 기술 및 시장 선점하여 국가 기술 경쟁력 확보할 수 있음
 - 신시장 개척 및 원천 기술 상용화를 통해 새로운 약물주입기 시장 창출할 수 있고 경제적 파급효과 도출 가능함
- **개발된 무침 주사기를 이용한 돼지에 대한 효능평가**
 - 돼지에 적합한 무침주사기 구조 설계
 - 기존 근육접종 백신 중 피내 접종에 적합한 백신 선정(항체 역가 확인 91.8%)
 - 선정된 근육접종 백신을 이용한 SPF돼지에서 개발된 무침주사기 활용 접종시험(항체 역가 확인 87.4%)
 - 피내접종 방식은 근육접종에 비해 현저히 적은 부작용을 보이며, 항체 역가가 충분히 증가함을 확인
- **개발된 무침주사기를 이용한 소에 대한 효능평가**
 - 소 특성에 적합한 무침주사기 구조 설계
 - 기존 무침주사기(돼지용) 형태의 주입기 활용 접종시험(항체 역가 확인 20%)
 - 소 전용 설계 무침주사기 이용 접종시험(항체 역가 확인 86%)
 - 소 특성에 맞게 설계된 무침주사기의 경우 소에서 활용 가능함을 확인

보고서 면수
67

<요약문>

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ● 구제역백신 전용 무침주사기 설계 및 제품 산업화 ● 구제역 백신 접종용 무침주사기에 대한 실험동물 및 현장적용실험을 통한 효능평가 ● 구제역 백신 부작용을 최소화한 간편 사용이 가능한 구제역 백신 접종용 무침주사기 상용화
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ● 구제역백신 전용 무침주사기 설계 및 제품 산업화 <ul style="list-style-type: none"> - 무침 주사기 구동회로 설계 - 피내, 피하 및 근육 접종이 가능한 direct injector 방식의 압축 실린더 설계

- 다양한 용량의 바이알 대응 설계
- 접종액의 경우 0.2-2ml 정도의 접종 가능하도록 설계
- 충전식 배터리 타입 적용 설계
- 한번 장작으로 여러 번 많은 수의 동물에 접종이 가능한 설계
- 실린더 토출압력 구현 설계
- 고출력 사용 모터 적용 및 금속노즐, High Power Starter 구동회로 개발
- 사업화를 위한 대량 생산 시스템 구축
- 무침 주사기에 개발 제품의 제조 및 판매를 위한 특허 및 디자인 확보
- 시제품 성능 검증을 위한 전임상(소, 돼지) 시험 진행

● **구제역 백신 접종용 무침주사기에 대한 실험동물 및 현장적용실험을 통한 효능평가**

- 동물 실험(돼지) 성과
 - 돼지 백신 접종용 무침주사기의 기준 설정: 기존 상용화된 피내백신과 무침주사기를 활용하여 확인한 피내백신의 효과와 성능을 토대로 향후 무침주사기 개발 방향을 설정함.
 - 돼지 전용 무침주사기 어댑터 설계 : 돼지에 일정한 깊이로 백신을 주입하는 어댑터의 형태와 조건 설정
- 돼지에 적합한 무침주사기 어댑터 선정 후 일반 돼지와 SPF 돼지에 무침주사기로 백신 주입 : 항체 역가 90% 확인 (추후 농장 현장 시험 필요)
- 백신 접종 후 항체 확인에는 3주 소요
- 동물 실험(소) 성과
 - 소 전용 무침주사기 설계 : 소의 경우 돼지와 피부 및 털의 특성에 차이가 있어 개발 단계에서부터 차별화된 설계와 주입 압력등 검토 필요
- 소에 적합한 구조 설계 후 제작된 무침주사기로 주입 : 항체 양성을 80% 확인(추후 대량 접종 시험 필요)
- 백신 접종 후 항체 확인에는 2주 소요(Day 0 12.71 → Day 7 20.85 → Day 14 64.01)

● **구제역 백신 부작용을 최소화한 간편 사용이 가능한 구제역 백신 접종용 무침주사기 상용화**

- 국내 유통 다양한 구제역 백신에 대해 이상육 발생 평가 등을 위해 무침주사기로 접종 평가 실시
- 근육접종과 비교하여 잔여물이 남지 않고 육아종형성이 진피에만 제

	한됨				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ● 구제역 백신 전용 간편 무침주사기를 통해 기존 오일 백신의 근육접종에 따른 접종반응(화농발생 및 이상육 발생)을 크게 개선 ● 구제역 백신 전용 간편 무침주사기 국산화로 돼지 사육농가 이상육 발생으로 인한 경제적 피해 감소 및 소비자 신뢰도 제고 ● 돼지사육농가에서 근육접종을 통한 인건비 감소 및 생산성 증가 				
국문핵심어 (5개 이내)	구제역	무침주사기	돼지	소	백신
영문핵심어 (5개 이내)	FMD	Needle-free injector	Pig	Cattle	Vaccine

<본문목차>

< 목 차 >

제 1장. 연구개발과제의 개요	1
제 2장. 연구수행 내용 및 결과	6
제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	55
제 4장. 연구결과의 활용 계획 등	58
붙임. 참고 문헌	62

<별첨> 각종 실적 자료 등

제 1장. 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발 목적

1. 연구개발 목적

- 가. 구제역백신 전용 무침주사기 설계 및 제품 산업화
- 나. 구제역 백신 접종용 무침주사기에 대한 실험동물 및 현장적용실험을 통한 효능 평가
- 다. 구제역 백신 부작용을 최소화한 간편 사용이 가능한 구제역 백신접종용 무침주사기 상용화

2. 연구개발의 필요성

- 가. 구제역의 정의 및 국내 현황 및 문제점

(1) 구제역(foot-and-mouth disease)

소, 돼지, 양, 염소 및 사슴 등 발굽이 둘로 갈라진 동물(우제류)에 감염되는 질병으로 전염성이 매우 강하며 입술, 혀, 잇몸 또는 지간부 등에 물집(수포)이 생기며 체온이 급격히 상승되고 식욕이 저하되어 심하게 앓거나 어린 개체의 경우 폐사가 나타나는 질병이다. 세계동물보건기구(OIE)에서 지정한 중요 가축 전염병으로 가축전염병예방법 제 1종 가축전염병에 속한다.

Picornaviridae Aphthovirus, 작은 RNA 바이러스로서 이는 7개의 혈청형 즉 A, O, C, Asia 1, SAT1, SAT2, SAT3형으로 분류되며 이 주요 혈청형은 다시 80여 가지의 아형으로 나누어진다. 바이러스의 생존 기간은 온도, 습도, pH 및 자외선 등에 영향을 받으며, 통상 물에서는 최대 50일, 흙, 마대, 건초 등에서는 환경조건에 따라서 26~200일, 혈액 등으로 오염된 나무나 금속 등에서는 최대 35일까지 생존한 기록이 있다.

감염은 일반적으로 감염된 동물의 이동에 의해 이루어지고 감염동물의 수포액이나 콧물, 침, 유즙, 정액, 호흡 및 분변 등의 접촉이 감염 경로가 되며 감염 동물 유래의 축산물에 의한 전파도 가능하다. 또한 감염된 동물과 접촉하거나 오염된 지역을 출입한 사람과 차량 그리고 이와 관련된 의복, 사료, 물, 기구 등을 통해서도 전파가 일어난다. 공기를 통한 전파의 경우 육지에서는 50km, 바다를 통해서는 250km 이상까지 전파된 보고가 있다. 특히, 감염축은 구제역 증상을 나타내기 전에도 이미 바이러스를 배출하기 시작하면서 질병을 전파할 수 있으므로 특별한 주의가 필요하다.

잠복기간은 일반적으로 2~14일 정도이고 소에서 구제역 바이러스에 감염되면 체온상승, 식욕부진, 침울, 우유생산량의 급격한 감소 등이 나타난다. 발병 후 24시간 이내에 침을 심하게 흘리고, 혀와 잇몸 등에 물집이 생긴 것을 관찰할 수 있으며, 입맛 다시는 소리를 내기도한다. 물집은 발굽의 사이와 제관부, 젖꼭지 등에서도 관찰되며, 물집은 곧 터져서 피부가 드러나고 짓무르고 헐게된다. 구제역 바이러스에 감염된 6개월 미만의 송아지에서는

심근염에 의해 죽는 경우가 있으며, 이 경우 심근에 나타나는 특징적인 병변을 호반심(tiger heart)이라고 한다. 일반적으로 이환율은 낮은 편이나 어린 송아지의 경우 성우에 비해 폐사율이 높으며 임신우에서는 유산을 초래하기도 한다. 감염된 소들은 1주 이상 거의 먹지 못하며, 절뚝거리며 유방염, 산유량 격감 등의 경제적 피해가 발생하고 특히 젖소에서 는 착유량이 50% 정도 감소한다. 돼지가 감염될 경우 절거나 기립하지 못하고 잘 움직이지 않으며 사료섭취가 부진한 것이 관찰된다. 콧등, 혀, 유두, 발굽과 피부가 접하는 부위 등에 물집이 생기기도 하며, 물집이 터져서 피부가 벗겨진 자리에 세균에 의한 2차 감염이 일어나고 이로 인해 발굽이 탈락되기도 한다. 입 주변의 물집 형성은 소의 경우처럼 전형적이지는 않으나, 콧잔등에는 큰 물집이 형성되며 쉽게 터지는 경우가 있다. 모돈의 감염될 경우 포유증이 자돈의 집단 폐사가 종종 관찰된다.

수포액, 수포 상피조직, 비즙 또는 타액 등을 검사시료로 하며 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 유전자 검출법, 염기서열분석법, 항원 ELISA법 또는 동물세포를 이용한 구제역바이러스의 분리법 등으로 구제역 여부 및 혈청형을 판정한다. 혈액을 채취하여 분리한 혈청내 구제역바이러스에 대한 항체 형성 여부를 항체검사용 ELISA로 판정한다. 백신접종을 실시할 경우 백신축과 감염축을 감별하기 위한 NSP ELISA를 실시한다.

구제역 발생 시 질병 확산을 억제하거나 예방을 위해 구제역 감수성 개체에 백신을 접종할 수 있다. 구제역은 혈청형간에 교차 방어가 되지 않기 때문에 필요한 경우 혈청형별로 백신을 접종해야 하는 어려움이 있으며, 백신을 하더라도 감염축에서 배출되는 바이러스가 많은 경우 동거축이 감염되고 증상을 나타낼 수 있다. 구제역 백신은 일반적으로 구제역 바이러스를 동물세포에서 대량으로 증식시킨 후 이를 화학적으로 불활화 한 후 정제 및 농축 과정을 거쳐 생산된 항원에 면역원성을 증강시켜 주는 부형제를 섞어 놓은 것이다. 백신의 안전성과 방어효능은 일반적으로 동물실험을 통해서 평가한다. 현재 우리나라는 구제역 백신을 상시 접종하고 있으며, 상시 백신접종을 하지 않는 유형의 항원은 항원뱅크에 일정량 보관하고 있어 유사시 신속히 백신으로 제조하여 도입할 수 있도록 되어 있다.

(2) 국내 현황 및 문제점

우리나라는 2000년대 들어 8차례 구제역이 발생하고 있다. 구제역 바이러스는 주로 해외에서 유입된 것으로 추정되고 있지만 2016년 구제역은 2014~2015년 발생한 구제역 바이러스가 잔존하여 발생한 것으로 추정된다.

표 1. 과거 구제역 발생 현황

구 분	2000년	2002년	2010년 1월	2010년 4월
시기	(‘00.3.21~4.15.) (22일)	(‘02.5.2~6.23.) (52일)	(‘10.1.2~1.29.) (28일)	(‘10.4.8~5.6.) (29일)
지역 및 건수	6개 시·군 15건 (소 15)	4개 시·군 16건 (소1, 돼지 15)	2개 시·군 6건 (소 6)	4개 시·군 11건 (소7, 돼지 4)
매몰처분	• 182호 • 2,216마리	• 162호 • 160,155마리	• 55호 • 5,956마리	• 395호 • 49,874마리

혈청형	O형	O형	A형	O형
발생원인(추정)	수입건초, 해외여행객(신발, 휴대축산물)	외국인 근로자 관리 소홀	외국인 근로자 관리 소홀	농장주 구제역 발생지역 여행
재정 소요액	2,725억 원	1,058억 원	272억 원	1,040억 원
구분	2010~11년	2014년 7월	2014~15년	2016년
시기	(‘10.12.3~‘11.4.21.) (145일)	(‘02.5.2~6.23.) (52일)	(‘10.1.2~1.29.) (28일)	(‘10.4.8~5.6.) (29일)
지역 및 건수	75개 시·군 153건 (소 97, 돼지 55, 염소 1)	3개 시·군 3건 (돼지 3)	33개 시·군 185건 (소 5, 돼지 180)	6개 시·군 21건 (돼지 21)
매몰처분	• 6,241호 • 3,479,962마리	• 3호 • 2,009마리	• 196호 • 172,798마리	• 25호 • 33,073마리
혈청형	O형	O형	O형	O형
발생원인(추정)	농장주 구제역 발생지역 여행	해외유입(유입 경로 미상)	해외유입(유입 경로 미상)	‘14~’15년 잔존 바이러스(추정)
재정 소요액	27,383억 원	17억 원	638억 원(추정)	59억 원(추정)

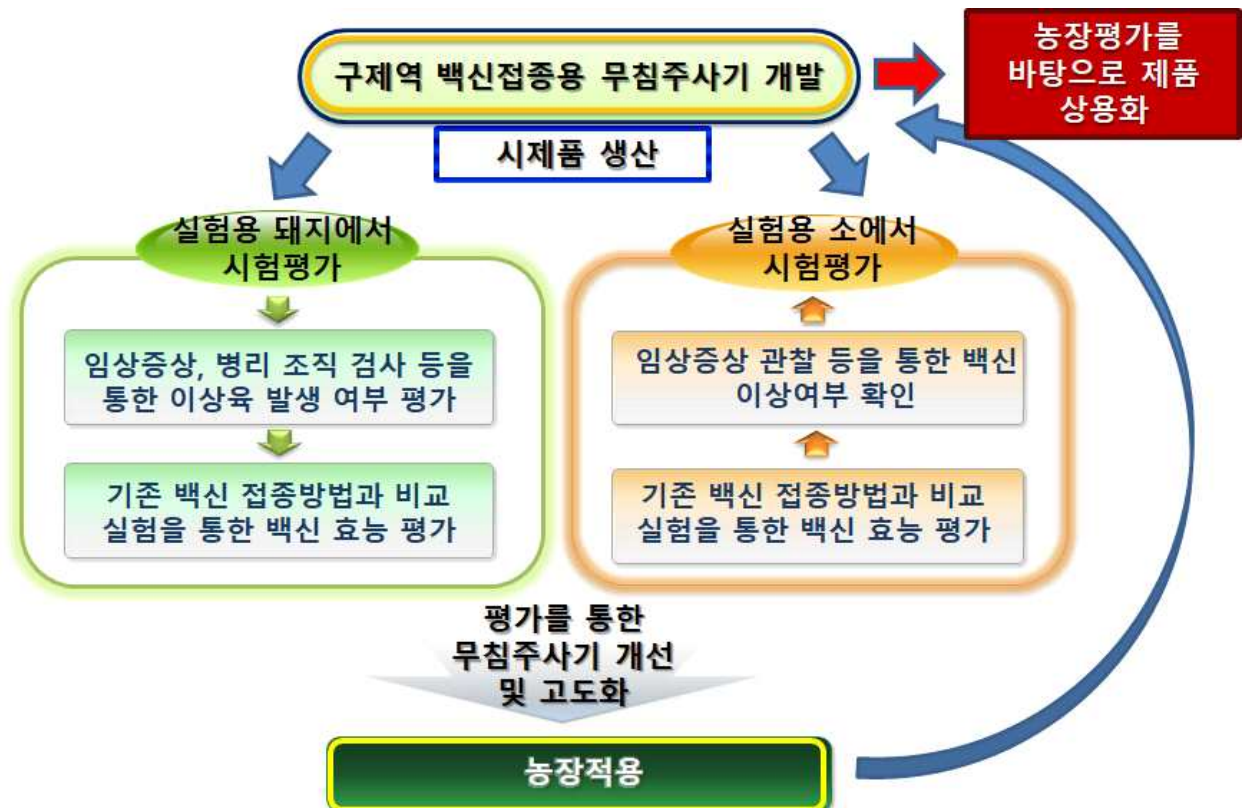
자료: 한국농촌경제연구원, 2010~2011 구제역 백서, 2014~2016 구제역 백서, 농림축산식품부 보도자료 (2016.11.7)

2010~2011년 구제역이 전국적으로 확산되고, 소·돼지 약 350만 마리를 살처분하게 되자 살처분을 통한 구제역 청정국 유지 정책에서 구제역 백신 정책으로 전환하였다. 전국 모든 소·돼지(1,200만 두) 접종으로 백신 부족 문제가 발생하였고 부족분에 대해 메리얼사와 인터벳사를 통해 조달하였으나 인터벳사 제품의 효능문제로 메리얼사에서만 수입하였다. 구제역 백신 수급의 문제가 발생하자 구제역 백신은 메리얼사에서 도입한 벌크 백신을 국내 5개 동물용 백신 생산업체들이 소분해 공급하는 방식으로 수급문제를 해결하였다. 그러나 이 백신은 짧은 항체 지속기간과 부형제로 인한 화농발생 등 농가로부터 지속적인 문제점이 제기 되었다.

구제역 백신 접종으로 인한 부작용으로는 국소 이상반응부터 전신성 과민반응까지 다양하게 나타날 수 있으며, 구제역 백신 접종 이후 돈육에서 이상육 발생이 크게 증가하였다. 이상육 발생의 원인 중 한지로는 근육내 주입된 백신 부형제의 체내 반응을 의심하고 있으며, 실제로 현재 사용하고 있는 구제역 백신의 부형제인 w/o형태는 접종부위의 국소 반응이 단점인 것으로 알려져 있다. 부형제 이외의 원인으로는 백신 접종과정에서의 물리적 손상, 주사과정에서의 미생물 감염 등도 의심하고 있다. 돼지고기에서 목살은 삼겹살과 더불어 한국인이 가장 좋아하는 부위이며, 주사 부위의 이상육 발생은 목살을 잡육으로 처리하여 목살의 생산량을 감소시키며 이것은 농가에 경제적으로 큰 피해를 주고 있다. 실제로 2012년 도드람 양돈조합의 이상육 발생에 따른 경제적 손실에 대한 조사 결과 구제역 백신 접종 전 2010년 약 3억 6백만원에서 접종 후 2011년 20억 6백만원, 2012년 28억 4천 5백만원으로 증가하였다.

따라서 본 연구과제에서는 구제역 백신 간편 접종 무침주사기 개발을 통해 축산농가 피해를 최소화하기 위해 크게 아래의 최종 목표를 가지고 진행될 예정이다.

- 1) 구제역백신 전용 무침주사기 설계 및 제품화를 통해
- 2) 구제역 백신 접종용 무침주사기에 대한 실험동물 및 현장적용실험을 통한 효능 평가를 실시하고,
- 3) 구제역 백신 부작용을 최소화한 간편 사용이 가능한 구제역 백신접종용 무침주사기 상용화를 실시할 계획이다



<구제역 백신 접종용 무침주사기 개발을 위한 본 연구과제의 개발 목표>

3. 연구개발 범위

가. 구제역백신 전용 무침주사기 설계 및 제품 산업화

- (1) 압축실린더 설계 : 모터 구동방식
- (2) 충전식 배터리 타입 적용 설계
- (3) 무침주사기 구동 회로 설계
- (4) 다양한 형태의 바이알 적용 : 다양한 바이알 탈부착 가능한 기구부 개발완료
- (5) 실린더 토출압력 구현 : 고출력 사용 모터 적용 및 약 내경 300um 금속 노즐, High Power starter 구동회로 개발
- (6) 성능시험 : ICR 공인시험기관에서 토출압력 TEST
- (7) 제품 생산을 위한 동물용 허가 : 동물용 업허가 및 품목허가 (2등급) 진행
- (8) 최종 제품 의 성능 및 임상 평가 진행

나. 구제역 백신 접종용 무침주사기를 이용한 실험동물 및 현장적용실험을 통한 효능평가

- (1) 구제역 백신 접종용 무침주사기를 이용한 실험동물용 돼지에 대한 효능평가
 - (가) 피내 접종기 향후 개발 방향 설정
 - (나) 돼지에 적합한 피내 접종기 설계
 - (다) 피내 접종에 적합한 구제역 백신 선택
 - (라) 일반돼지와 SPF돼지에서 구제역 백신의 피내접종을 통한 부작용과 항체 형성 평가
- (2) 구제역 백신 접종용 무침주사기를 이용한 실험동물용 소에 대한 효능평가
 - (가) 피내 접종기 향후 개발 방향 설정
 - (나) 소에 적합한 피내 접종기 설계
 - (다) 피내 접종에 적합한 구제역 백신 선택
 - (라) 실험소에서 구제역 백신의 피내접종을 통한 항체 형성 평가
- (3) 구제역 백신 접종용 무침주사기를 이용한 현장적용실험에 대한 효능평가
 - (가) 양돈장 적용 평가를 통한 문제점 파악

다. 구제역 백신 부작용을 최소화한 간편 사용이 가능한 구제역 백신접종용 무침주사기 상용화

- (1) 농장적용 임상평가를 통한 실질적인 문제점 파악
- (2) 현장(농장 및 수의사)의 의견 파악하여 최종 제품의 디자인 반영
- (3) 국내 유통 다양한 구제역 백신에 대해 이상육 발생 평가 등을 위해 무침주사기로 접종 평가 실시

제 2장. 연구수행 내용 및 결과

제 1절. 구제역 백신 간편 무침주사기를 이용한 실험동물(돼지)에 대한 효능평가 (제1세부)

[1차년도]

1) 백신접종

피내 백신 접종 의 효능과 안전성을 평가하기 위하여 4주령 자돈 9두를 구입하여 사용하였다. 즉, 기개발 경쟁사 피내접종기(IDAL, MSD)를 사용하여 구제역 백신과 동일한 사독백신인 PCV2를 2개 그룹(무침백신군과 무침백신대조군)의 자돈 6두에 접종하고 다른 1 그룹은 백신비접종군으로 나누어 실험을 진행하였고 백신 접종 3주 후에 PCV2 바이러스를 무침백신군과 백신비접종군에 비강을 통해 공격접종을 실시하였다(표1). 이 후 23~24℃, 습도 60%가 유지되는 사육실에서 4주간 임상 및 항원항체 평가를 실시하였다. 사육 기간 동안 음수 및 사료는 무제한으로 공급한다.

표 1. 실험디자인 및 처치 일정

그룹	개체수	백신접종	공격접종	Necropsy
무침 백신군	3	PCV2 백신 무침 접종 1회 (0.2 ml)	PCV2 비강 공격접종	공격접종 4주 후 부검
무침 백신 대조군 (양성대조군)	3	PCV2 백신 무침 접종 1회 (0.2 ml)	PBS	공격접종 4주 후 부검
백신 비접종군 (대조군)	3	백신 비접종	PCV2 비강 공격접종	공격접종 4주 후 부검

2) 임상증상 평가와 가검물 채취

백신접종군의 임상 증상은 접종 후 매일 관찰하고 4주령(백신 접종 전) 및 공격접종 후 4주 동안 매주 채혈 및 혈청 분리를 실시하여 실험시점까지 -80℃에 보관하고 매주 체중을 측정하여 증체율을 측정한다.

3) 항원 항체 평가방법

백신접종에 의한 PCV2 항체 형성을 평가하기 위하여 PCV2 ELISA(바이오노트)를 이용하여 항체가 변화 추이를 평가하였고 PCV2 항원은 PCR(제넷바이오)를 이용하여 평가하였다.

4) 병리조직 검사

공격접종 후 4주가 경과된 시점에 모든 돼지를 안락사하여 부검을 실시하고 각 장기의 육안적 소견을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐, 편도, 폐문림프절, 장간막림프

절 및 악하림프절 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정한다. 또한 백신접종부의 조직병리학적 평가를 진행한다.

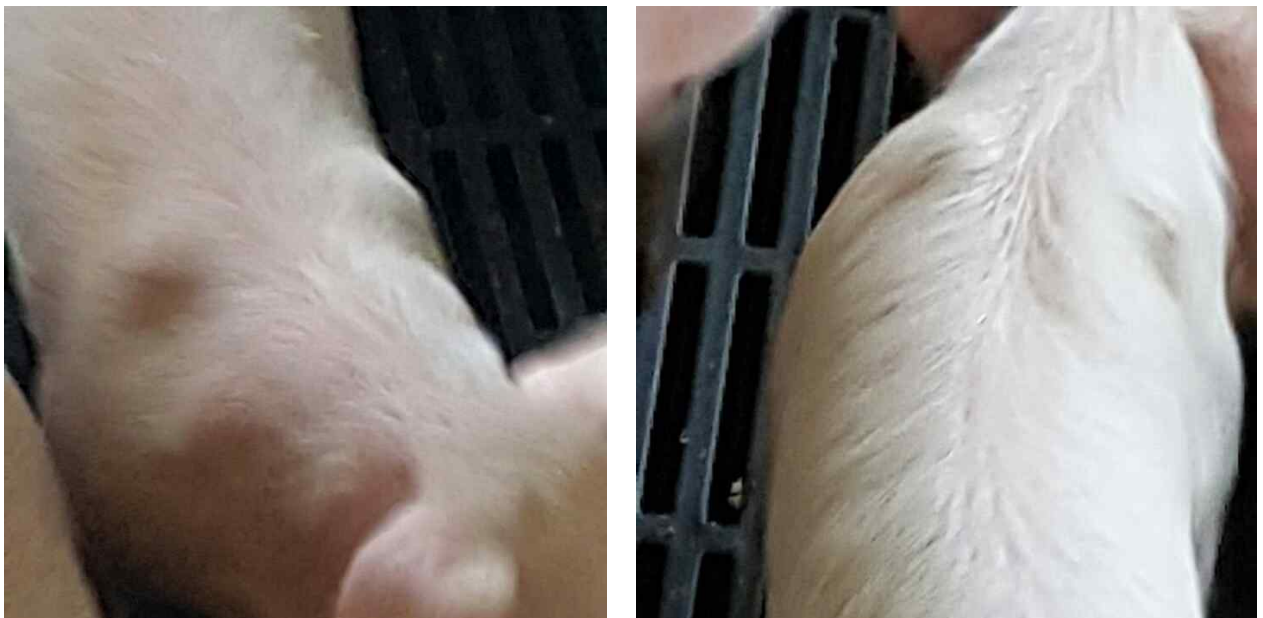
5) 평가결과

- 경쟁사의 기개발 피내 접종기를 이용하여 4주령 자돈의 이근부에 0.2 ml씩 접종하였으며 접종 시에는 특별한 문제점이나 즉각적인 접종반응은 관찰되지 않았다(그림 1).



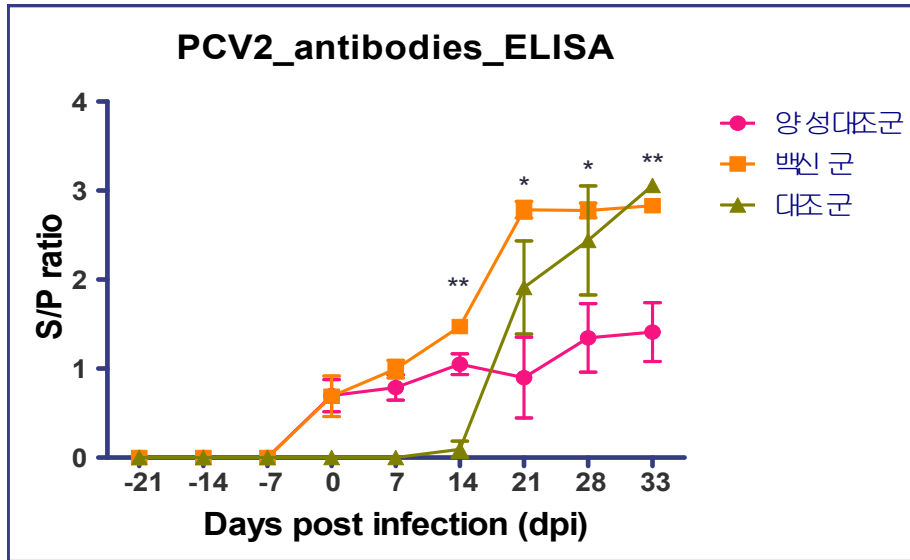
<그림1. 피내 접종기를 이용한 백신의 접종>

- 피내백신을 접종하고 1주 후에 접종 부위의 피부가 부풀어 오르는 피부반응의 관찰되었으나(그림 2) 이 후 점차 소실되었고 공격접종을 실시한 백신 접종 3주에는 피부병변이 관찰되지 않았다.



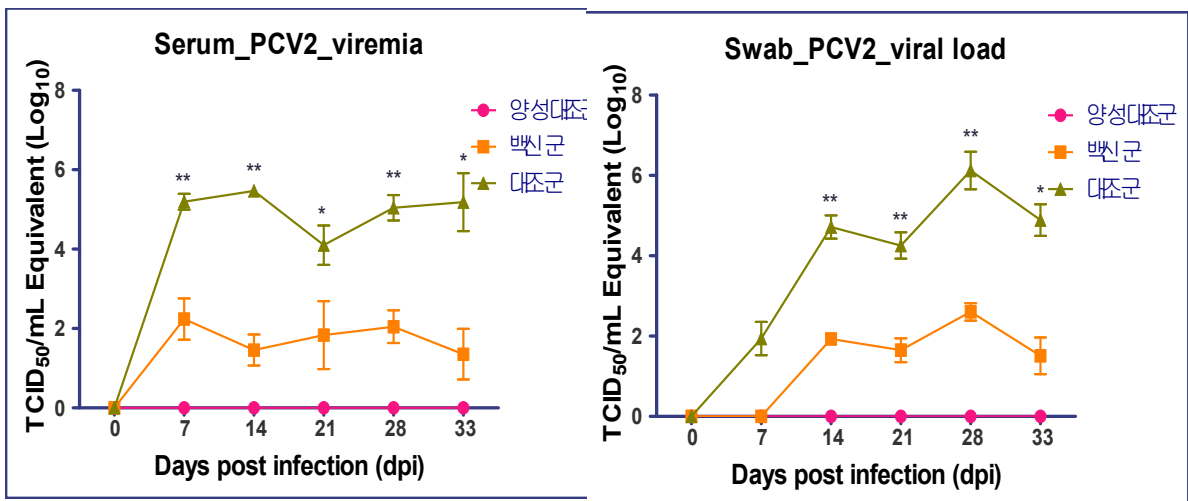
<그림2. 피내 백신 접종 1주 후 피부반응 >

- 백신접종 이후의 항체 ELISA를 검사한 결과, 백신군과 양성대조군의 항체 생성은 백신접종 3주(0dpi)에 관찰되었으며, 백신비접종군(대조군)대조군은 공격감염 14일 이후부터 항체의 증가가 관찰되었다(그림 3)



<그림 3. 백신접종 이후 부검 직전까지 혈청 내 항체가 변화>

- 공격접종 이후 백신군과 대조군 모두 7dpi에 혈장 내 PCV2 항원량이 증가하기 시작하였고, 백신군이 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 낮은 수준의 항원량이 관찰되었다. 비강스왑에서는 혈청보다 늦은 14dpi에 PCV2 항원이 관찰되었고 대조군이 백신군보다 유의성 있게 높은 수준의 항원 검출이 관찰되었다.



<그림 4. 공격접종 후 혈장과 스왑 내 항원량의 변화>

- 기개발된 피내접종기와 피내백신을 평가한 결과 우수한 안전성과 효능이 관찰되어 기존 근육접종과 비교되는 구제역 피내접종의 장점이 분석되며 개발 진행 중인 피내접종기의 목표 성능지표가 설정되어 향후 피내접종기 개발 방향에 많은 도움이 될 것으로 판단된다.

[2차년도]

1. 구제역 백신 간편 무침주사기 조건 설정을 위한 돼지에 대한 접종 실험

가. 무침주사기의 adaptor 길이에 따른 돼지에서 백신침투 정도의 차이 비교

(1) 실험 목적

백신의 ID 접종은 진피로 접종하여 진피에 풍부히 있는 수지상세포를 활성화함으로써 면역반응을 유도하는 접종방법이다. 이를 위해 적절한 위치까지 백신이 침투해야하는데, 어느 정도 길이의 adaptor를 사용해야 돼지 진피의 평균 두께인 약 3.36 mm에 적절히 침투되는지 확인하기 위해 본 연구를 수행하였다 (ref. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice, 돼지피부의 공기노출 시간에 따른 응착, 마찰 및 변형거동).

(2) 실험 디자인

(가) 공시돈 선정 및 백신 접종

무침주사기의 adaptor 길이에 따른 돼지에서 백신침투 정도의 차이 비교를 위해 8마리 자돈을 선정하여 무침주사기의 adaptor 길이가 짧은 것부터 긴 순서대로 1번부터 8번으로 번호를 나눠 실험을 진행하였다. 1번부터 7번 돼지는 이근부 양쪽에 crystal blue가 섞인 백신을 0.2ml씩 ID로 접종하였다. 8번 돼지는 둔부 양쪽에 crystal blue가 섞인 백신을 0.2ml씩 ID로 접종하였다. 백신 접종 1주 후에 부검을 통해 접종부위에서 백신의 침투 정도와 피부의 side effect 정도를 평가하였다 (표 1).

표 1. 실험디자인 및 처치 일정

번호	Adaptor 길이	접종부위	5주령 (0 dpv)	6주령 (7 dpv)
1	짧은	이근부 양쪽	백신 접종	안락사/부검
2		이근부 양쪽	백신 접종	안락사/부검
3		이근부 양쪽	백신 접종	안락사/부검
4		이근부 양쪽	백신 접종	안락사/부검
5		이근부 양쪽	백신 접종	안락사/부검
6		이근부 양쪽	백신 접종	안락사/부검
7		이근부 양쪽	백신 접종	안락사/부검
8	긴	둔부 양쪽	백신 접종	안락사/부검

(나) 사육환경

실험 기간동안 돼지는 23~24℃, 습도 60%가 유지되며, 음수과 사료가 무제한으로 공급되는 실험 사육실에서 사육되었다.

(3) 접종 부위 육안 관찰

백신 접종 1주 후 부검을 실시하여 접종 부위의 side effect를 확인하여 접종이 적절히 되었는지 평가하였으며, 접종 부위의 피부를 절개하여 백신이 어느 정도로 침투되었는지

관찰하였다.

(4) 평가결과

1번 돼지는 우측에 발적과 붓기 등의 명확한 주입자국이 관찰된 반면 좌측에서는 주입자국이 명확하게 관찰되지 않았으며, 절개된 상태에서도 우측은 충분히 깊게 백신이 들어갔지만 좌측은 백신이 제대로 들어가지 않은 것으로 판단되었다. 2번, 3번, 4번 돼지 순으로 무침주사기의 adaptor의 길이가 길어질수록 선명한 주입자국을 남겼으며, 절개를 통해 충분한 깊이로 들어갔음을 관찰하였다. 이후 5번, 6번, 7번 돼지 순으로 무침주사기의 adaptor 길이가 더 길어짐에 따라 주입자국이 작아졌으며, 주입자국이 관찰되지 않기도 하였다. 또한 백신이 투여된 깊이도 3번, 4번 돼지에 비해 얇았기 때문에 적절히 투여되지 않은 것으로 판단되었다. 둔부에 접종한 8번 돼지는 주입자국이 관찰되지 않았다 (그림 1).

#1	 <p>좌측 접종부위</p>	 <p>우측 접종부위</p>	 <p>절개된 좌측 접종부위</p>	 <p>절개된 우측 접종부위</p>
#2	 <p>좌측 접종부위</p>	 <p>우측 접종부위</p>	 <p>절개된 좌측 접종부위</p>	 <p>절개된 우측 접종부위</p>

#3	 좌측 접종부위	 우측 접종부위	 절개된 좌측 접종부위	 절개된 우측 접종부위
#4	 좌측 접종부위	 우측 접종부위	 절개된 좌측 접종부위	 절개된 우측 접종부위
#5	 좌측 접종부위	 우측 접종부위	 절개된 좌측 접종부위	 절개된 우측 접종부위
#6	 좌측 접종부위	 우측 접종부위	NA 절개된 좌측 접종부위	NA 절개된 우측 접종부위
#7	 좌측 접종부위	 우측 접종부위	 절개된 좌측 접종부위	 절개된 우측 접종부위

#8			NA	NA
	좌측 접종부위	우측 접종부위	절개된 좌측 접종 부위	절개된 우측 접종 부위

그림 1. 부검 당시 접종 부위 국소 반응 평가

(5) 평가결과 요약

무침주사기의 adaptor 길이가 길어질수록 선명한 접종부위를 보였으며, 과도하게 길어지는 경우에는 오히려 역으로 접종이 잘 되지 않는 것으로 파악된다. 특히 3번, 4번 돼지에 사용한 무침주사기의 adaptor 길이가 백신 접종에 가장 적절한 것으로 생각되며, 둔부보다 이근부에 접종하는 것이 정확하게 백신을 접종할 수 있는 것으로 보인다.

2. 구제역 백신 간편 무침주사기를 이용한 실험동물(돼지)에 대한 효능평가

가. 간편 무침주사기를 이용한 러시아산 고농축 구제역 백신 접종에서 돼지에 대한 효능 평가

(1) 실험 디자인

무침주사기와 근육접종의 효능을 비교하기 위해 무침주사기로 백신 접종한 군 (ID), 근육 백신 접종한 군 (IM), 2개 그룹으로 나누었다. 백신 접종 직후 접종부위의 부작용을 비교하였고, 5주간 체중 및 항체가 모니터링을 실시하였다 (표 2).

표 2. 실험디자인 및 처치 일정

그룹	개체수	백신접종	부검
진피 접종 (ID)	3	러시아산 고농축항원 구제역 백신	백신접종 35일 후 부검
근육 접종 (IM)	3	아리아백 플러스주	백신접종 35일 후 부검

그룹	21일령 (0 dpv)	24일령 (3 dpv)	28일령 (7 dpv)	35일령 (14 dpv)	42일령 (21 dpv)	49일령 (28 dpv)	56일령 (35 dpv)
진피 접종 (ID)	러시아산 고농축항원 구제역 백신	-	-	-	-	-	안락사 / 부검
근육 접종 (IM)	아리아백 플러스주	-	-	-	-	-	안락사 / 부검
체중 측정, 혈액 채취	○	○	○	○	○	○	○

(2) 공시돈 선정 및 백신 접종

구제역 음성 농장에서 3주령의 6마리 자돈을 선정하여 3마리씩 ID그룹과 IM그룹으로 구분하였다. ID그룹은 무침주사기를 이용하여 양쪽 이근부에 러시아산 고농축 FMD 백신을 접종하였고, IM그룹은 아리아백 플러스주 백신을 용법 용량대로 양쪽 이근부에 근육접종을 하였다.

(3) 사육환경

실험 기간동안 돼지는 23~24℃, 습도 60%가 유지되며, 음수와 사료가 무제한으로 공급되는 실험 사육실에서 사육되었다.

(4) 체중 측정 및 시료 채취

(가) 혈액 채취

21일령(백신 접종 전), 24일령(백신 접종 3일 후), 28일령(백신 접종 7일 후), 35일령(백신 접종 14일 후), 42일령(백신 접종 21일 후), 49일령(백신 접종 28일 후), 56일령 (백신 접종 35일 후)에 채혈 및 혈청분리를 실시하였고 실험시점까지 4 °C에 보관하였다.

(나) 생산성관련 일당증체량 분석

21일령(백신 접종 전), 24일령(백신 접종 3일 후), 28일령(백신 접종 7일 후), 35일령(백신 접종 14일 후), 42일령(백신 접종 21일 후), 49일령(백신 접종 28일 후), 56일령 (백신 접종 35일 후)에 공시돈 체중을 측정하여, 일당증체량을 계산하였다. Mann-whitney 방법을 이용하여 그룹별 일당증체량의 유의성 여부를 확인하였다.

(5) 돼지 FMD 바이러스 O형 항체 혈청검사

FMD ELISA 항체검사는 바이오노트사 키트(PrioCHECK™ FMDV Type O Antibody ELISA kit)를 이용하여 공급처의 설명서에 따라 실시하였다.

(6) 병리조직학적 검사

(가) 병리조직 샘플

백신 접종 5주가 경과된 시점인 56일령에 부검을 하여 피부의 육안 병변을 관찰하고 조직 슬라이드 제작을 위해 피부조직을 10% 포르말린에 고정하였다.

(나) 병리조직학적 관찰 및 분석 방법

포르말린에 고정한 피부 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 한다. H&E 염색이 된 조직은 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다.

(7) 통계분석

그룹별 평균 차이를 통한 귀무가설의 기각 혹은 채택을 위해서 연속변수인 경우 repeated measure of ANOVA를 이용하였으며, 모집단의 정규분포를 규정할 수 없다고 판단될 경우 Mann-Whitney U test나 Wilcoxon signed-rank test를 실시했다.

(8) 평가결과

(가) 접종부위 평가 결과

접종 1일 후 개체 별 반응의 정도 차이가 있지만 ID 그룹의 대부분 돼지에서 진피에 들어간 백신과 유도되는 면역반응에 의해 엄지손톱 크기의 붓기와 발적을 보였다. 그에 반해 근육접종 돼지는 붓기나 발적이 관찰되지 않았으며 일부 돼지에서 점상의 발적만을 보였다 (그림 2).













#1 ID	 <p data-bbox="392 454 756 488">접종 1일 차 좌측 접종부위</p>	 <p data-bbox="960 454 1324 488">접종 1일 차 우측 접종부위</p>
#2 ID	 <p data-bbox="392 752 756 786">접종 1일 차 좌측 접종부위</p>	 <p data-bbox="960 752 1324 786">접종 1일 차 우측 접종부위</p>
#3 ID	 <p data-bbox="392 1050 756 1084">접종 1일 차 좌측 접종부위</p>	 <p data-bbox="960 1050 1324 1084">접종 1일 차 우측 접종부위</p>
#4 IM	 <p data-bbox="392 1341 756 1375">접종 1일 차 좌측 접종부위</p>	 <p data-bbox="960 1341 1324 1375">접종 1일 차 우측 접종부위</p>
#5 IM	 <p data-bbox="392 1639 756 1673">접종 1일 차 좌측 접종부위</p>	 <p data-bbox="960 1639 1324 1673">접종 1일 차 우측 접종부위</p>
#6 IM	 <p data-bbox="392 1937 756 1971">접종 1일 차 좌측 접종부위</p>	 <p data-bbox="960 1937 1324 1971">접종 1일 차 우측 접종부위</p>

그림 2. 백신 이후 접종 부위의 국소 반응

(나) 체중 및 일당증체량 분석결과

체중은 두 그룹 모두 실험종료 시점까지 꾸준히 증가하였으며 그룹 간 체중 차이는 크지 않았다. 그러나 백신 접종 28일 차 일당증체율은 ID 그룹 (0.68kg)이 IM 그룹 (0.61kg) 보다 높았으며 이를 토대로 진피 접종 방식은 생산성이 근육접종보다 낮거나 비슷하다고 평가되었다 (그림 3).

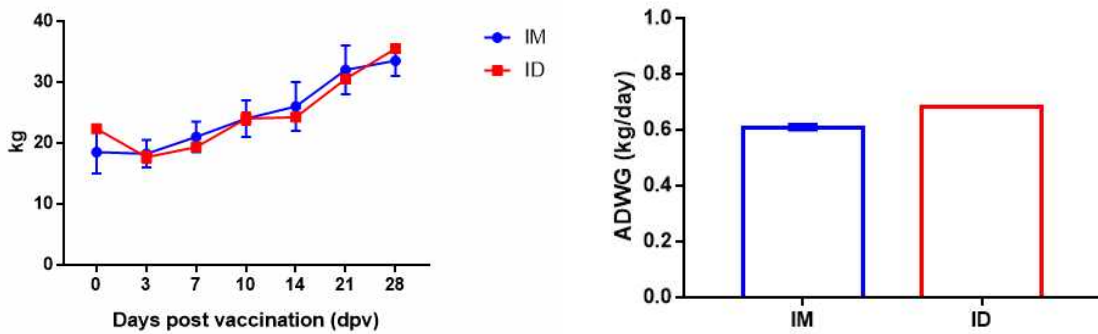


그림 3. 체중의 변화 및 28 dpv에서 일당증체량

(다) 돼지 FMD바이러스 O형 항체 혈청검사 결과

IM 그룹과 ID 그룹의 구제역 항체는 백신 접종 2주까지 모체이행 항체소실의 결과로 지속적으로 감소하는 경향을 보인다 IM 그룹은 백신 접종 이후 3주부터 항체가가 증가하여 실험 종료시점에 가장 높은 항체가를 보였다 (PI value 90.18%). 반면 ID 그룹의 구제역 항체는 지속적으로 감소하여 실험 종료시점에서 구제역 항체가의 cut-off value에 미치지 못하였다 (PI value 40.07%) (그림 4).

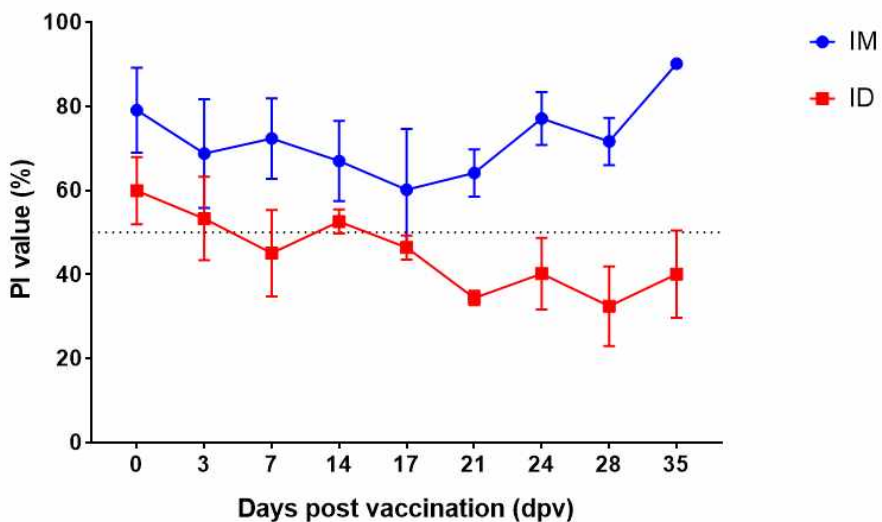


그림 4. 백신 접종 이후 항체가의 변화

(라) 부검 당시 접종 부위 육안 검사 결과

백신접종 1일 차와 달리 진피접종한 돼지의 피부에서 국소반응은 뚜렷하지 않았으며 진피층과 근육층에 어떠한 부작용을 나타내지 않았다. 반면 근육접종한 돼지의 피부에서 국소반응은 빨갛게 granuloma가 형성된 것이 보였으며, 근육층에도 granuloma와 pus가 관찰되었다 (그림 5).

<p>#1 ID</p>				
	<p>좌측 접종부위</p>	<p>우측 접종부위</p>	<p>절개된 좌측 접종부위</p>	<p>절개된 우측 접종부위</p>
<p>#2 ID</p>				
	<p>좌측 접종부위</p>	<p>우측 접종부위</p>	<p>절개된 좌측 접종부위</p>	<p>절개된 우측 접종부위</p>
<p>#4 IM</p>				
	<p>좌측 접종부위</p>	<p>우측 접종부위</p>	<p>절개된 좌측 접종부위</p>	<p>절개된 우측 접종부위</p>



그림 5. 부검 당시 접종 부위의 국소 반응

(마) 병리조직학적 검사 결과

ID 접종 그룹 접종부위의 피부조직에서 특이 사항이 발견되지 않았지만, IM 접종 그룹 중 1마리의 진피층에서 많은 수의 granuloma가 관찰되었다 (그림 6).

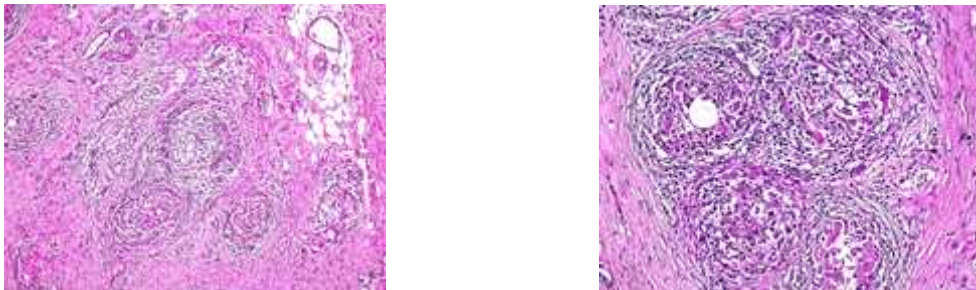


그림 6. 근육 접종 돼지(#5)의 병리조직검사 결과

(9) 평가결과 요약

진피 접종 이후 피부에 국소적으로 발적 및 부종이 관찰된 것으로 보아 백신 접종이 제대로 된 것으로 평가된다. 또한 부검 당시 (백신 5주 후) ID 그룹의 일당증체량이 IM 그룹보다 높았고, ID 그룹의 피부에서 IM 그룹과 달리 국소반응 및 granuloma 같은 부작용을 보이지 않았기 때문에 생산성과 안전성이 입증된 것으로 평가된다. 그러나 IM 그룹은 FMD 항체가 유도가 적절히 된 것에 비해 ID 그룹은 FMD 항체가 지속적으로 감소한 것으로 미루어보아 실험에 사용한 백신의 ID 접종으로는 효과적인 항체가 유도가 되지 않는 것으로 파악된다.

나. 간편 무침주사기를 이용한 케어사이드 바이오아토젠 구제역 백신 접종에서 돼지에 대한 효능 평가

(1) 실험 디자인

무침주사기와 근육접종의 효능을 비교하기 위해 무침주사기로 백신 접종한 군 (ID), 근육 백신 접종한 군 (IM), 2개 그룹으로 나누었다. 백신 접종 직후 접종부위의 부작용을 비교하였고, 5주간 체중 및 항체가 모니터링을 실시하였다 (표 3).

표 3. 실험디자인 및 처치 일정

그룹	개체수	백신접종	부검
진피 접종 (ID)	3	케어사이드 바이오아토젠 FMD 백신	백신접종 35일 후 부검
근육 접종 (IM)	3	케어사이드 바이오아토젠 FMD 백신	백신접종 35일 후 부검

그룹	21일령 (0 dpv)	24일령 (3 dpv)	28일령 (7 dpv)	35일령 (14 dpv)	42일령 (21 dpv)	49일령 (28 dpv)	56일령 (35 dpv)
진피 접종 (ID)	바이오아토젠 FMD 백신	-	-	바이오아토젠 FMD 백신	-	-	안락사 / 부검
근육 접종 (IM)	바이오아토젠 FMD 백신	-	-	바이오아토젠 FMD 백신	-	-	안락사 / 부검
체중 측정, 혈액 채취	O	O	O	O	O	O	O

(2) 공시돈 선정 및 백신 접종

구제역 음성 농장에서 3주령의 6마리 자돈을 선정하여 3마리씩 ID그룹과 IM그룹으로 구분하였다. ID그룹은 무침주사기를 이용하여 양쪽 이근부에 케어사이드 바이오아토젠 FMD 백신을 접종하였고, IM그룹은 동일 백신을 용법 용량대로 양쪽 이근부에 근육접종을 하였다. 백신 접종 14일 후 같은 부위에 그룹에 맞는 접종 방식으로 백신을 재접종하였다.

(3) 사육환경

실험 기간동안 돼지는 23~24℃, 습도 60%가 유지되며, 음수와 사료가 무제한으로 공급되는 실험 사육실에서 사육되었다.

(4) 체중 측정 및 시료 채취

(가) 혈액 채취

21일령(백신 접종 전), 24일령(백신 접종 3일 후), 28일령(백신 접종 7일 후), 35일령(백신

접종 14일 후), 42일령(백신 접종 21일 후), 49일령(백신 접종 28일 후), 56일령 (백신 접종 35일 후)에 채혈 및 혈청분리를 실시하였고 실험시점까지 4 °C에 보관하였다.

(나) 생산성관련 일당증체량 분석

21일령(백신 접종 전), 24일령(백신 접종 3일 후), 28일령(백신 접종 7일 후), 35일령(백신 접종 14일 후), 42일령(백신 접종 21일 후), 49일령(백신 접종 28일 후), 56일령 (백신 접종 35일 후)에 공시돈 체중을 측정하여, 일당증체량을 계산하였다. Mann-whitney 방법을 이용하여 그룹별 일당증체량의 유의성 여부를 확인하였다.

(5) 돼지 FMD 바이러스 O형 항체 혈청검사

FMD ELISA 항체검사는 바이오노트사 키트(PrioCHECK™ FMDV Type O Antibody ELISA kit)를 이용하여 공급처의 설명서에 따라 실시하였다.

(6) 병리조직학적 검사

(가) 병리조직 샘플

백신 접종 5주가 경과된 시점인 56일령에 부검을 하여 피부의 육안 병변을 관찰하고 조직 슬라이드 제작을 위해 피부조직을 10% 포르말린에 고정하였다.

(나) 병리조직학적 관찰 및 분석 방법

포르말린에 고정한 피부 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 한다. H&E 염색이 된 조직은 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다.

(7) 통계분석

그룹별 평균 차이를 통한 귀무가설의 기각 혹은 채택을 위해서 연속변수인 경우 repeated measure of ANOVA를 이용하였으며, 모집단의 정규분포를 규정할 수 없다고 판단될 경우 Mann-Whitney U test나 Wilcoxon signed-rank test를 실시했다.

(8) 평가결과

(가) 접종부위 평가 결과

접종 1일 후 개체 별 반응의 정도 차이가 있지만 ID 그룹의 모든 돼지에서 진피에 들어간 백신과 유도되는 면역반응에 의해 엄지손톱 크기의 붓기와 발적을 보였다. 재접종 1일 후 (15 dpv)에는 기존 접종 부위는 딱지만 관찰되었으며 재접종 부위에서는 엄지손톱 크기의 붓기와 발적, 그리고 딱지가 관찰되었다. 진피 접종 2주가 지난 시점에서는 접종 부작용이 크게 감소되는 것으로 판단된다. 그에 반해 근육접종 돼지는 붓기나 발적이 관찰되지 않았으며 재접종 이후에도 접종 부작용이 보이지 않았다 (그림 7).





#1 ID				
	접종 1일 차 좌측 접종부위	접종 1일 차 우측 접종부위	재접종 1일 차 (15dpv) 좌측 접종부위	재접종 1일 차 (15dpv) 우측 접종부위
#2 ID				
	접종 1일 차 좌측 접종부위	접종 1일 차 우측 접종부위	재접종 1일 차 (15dpv) 좌측 접종부위	재접종 1일 차 (15dpv) 우측 접종부위
#3 ID				
	접종 1일 차 좌측 접종부위	접종 1일 차 우측 접종부위	접종 1일 차 우측 접종부위	재접종 1일 차 (15dpv) 우측 접종부위

그림 7. 백신 이후 접종 부위의 국소 반응

(나) 체중 및 일당증체량 분석결과

체중은 두 그룹 모두 실험종료 시점까지 꾸준히 증가하였으며 실험종료시점에서 ID 그룹의 평균 체중 (35.3kg)은 IM 그룹 평균 체중 (28.3kg)보다 많았으며, 백신 접종 35일 차 일당증체율은 ID 그룹 (0.66kg)이 IM 그룹 (0.53kg) 보다 높았다. 이를 토대로 진피 접종 방식은 근육 접종보다 생산성이 낮다고 평가되었다. (그림 8).

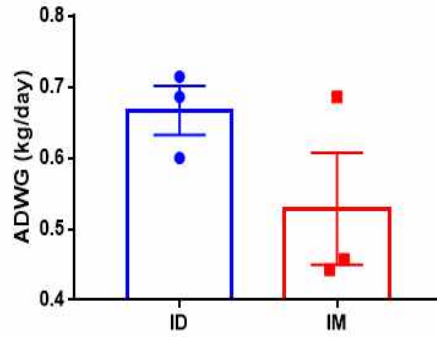
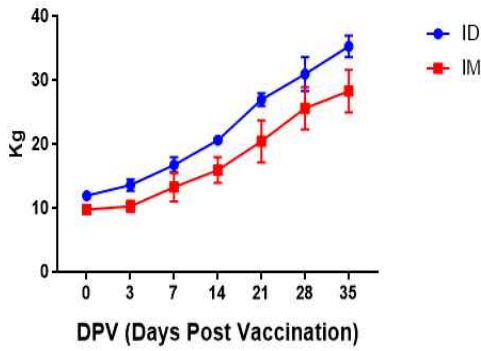


그림 8. 체중의 변화 및 35 dpv에서 일당증체량

(다) 돼지 FMD바이러스 O형 항체 혈청검사 결과

IM 그룹과 ID 그룹의 구제역 항체가는 모체이행 항체소실의 결과로 지속적으로 감소하는 경향을 보이다 IM 그룹은 백신 접종 이후 1주부터 항체가가 증가하여 실험 종료시점에 가장 높은 항체가를 보였다 (PI value 92.55%). 반면 ID 그룹의 구제역 항체가는 백신 접종 이후 3주부터 (재접종 이후 1주) IM 그룹 항체가 수준까지 급격히 증가하여 실험 종료시점까지 유지되었다 (PI value 91.79%) (그림 9).

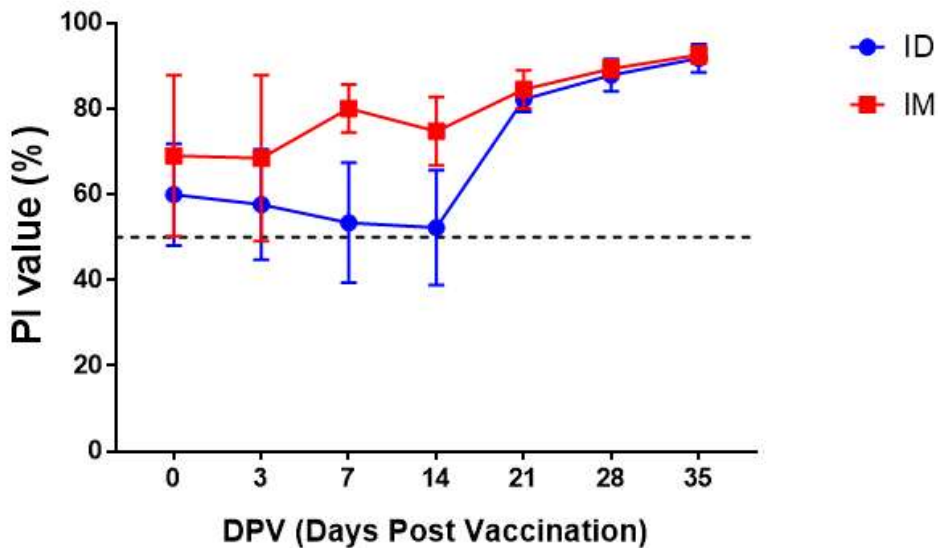


그림 9. 백신 접종 이후 항체가의 변화

(라) 부검 당시 접종 부위 육안 검사 결과

ID 접종 그룹 중 일부 돼지는 진피층까지 발적 및 부종이 관찰되었고, 일부 돼지는 국소 반응이 관찰되지 않았다. 반면 IM 접종 그룹의 모든 돼지에서 근육 층에 노란 농이 관찰되었다 (그림 10).



그림 10. 부검 당시 접종 부위의 국소 반응

(마) 병리조직학적 검사 결과

IM 접종 그룹 접종부위의 근육층과 피하지방 층에서 많은 수의 granuloma가 관찰되었다. 또한 ID 접종 그룹 접종부위의 진피층에서 많은 수의 granuloma가 관찰되었으나 근육층과 피하지방층은 정상 소견을 보였다 (그림 11).

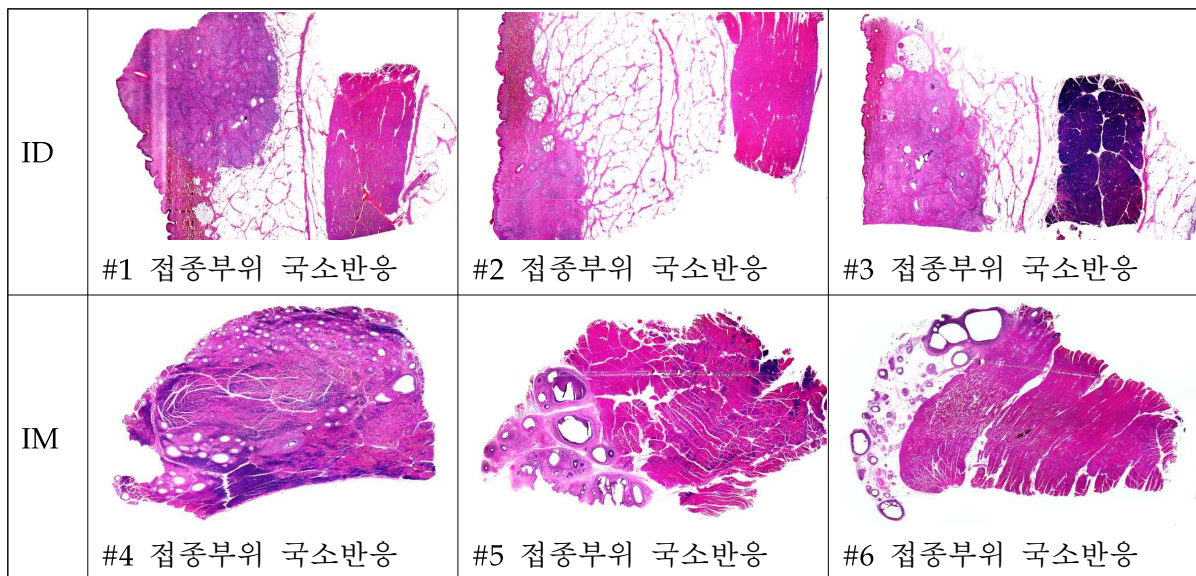


그림 11. 병리조직학적 검사 결과

(9) 평가결과 요약

진피 접종 이후 피부에 국소적으로 발적 및 부종이 관찰된 것으로 보아 백신 접종이 제대로 된 것으로 평가된다. 또한 부검 당시 (백신 5주 후) ID 그룹의 체중과 일당증체량이 IM 그룹보다 높았고, ID 그룹의 근육층에서 IM 그룹과 달리 granuloma 같은 부작용을 보이지 않았기 때문에 생산성과 안전성이 입증된 것으로 평가된다. 더 나아가 ID 그룹의 FMD 항체가는 근육 접종 방식보다 늦지만 비슷하거나 더 나은 수준으로 효과적으로 증가하여 FMD 방어능을 형성하는 것으로 평가되었다.

다. 간편 무침주사기를 이용한 케어사이드 바이오아토젠 구제역 백신 접종에서 SPF 미 돼지에 대한 효능 평가

(1) 실험 디자인

SPF돼지에서 무침주사기와 근육접종의 효능을 비교하기 위해 무침주사기로 백신 접종한 군 (ID), 근육 백신 접종한 군 (IM), 2개 그룹으로 나누었다. 백신 접종 직후 접종부위의 부작용을 비교하였고, 5주간 체중 및 항체가 모니터링을 실시하였다 (표 4).

표 4. 실험디자인 및 처치 일정

그룹	개체수	백신접종	부검
진피 접종 (ID)	3	케어사이드 바이오아토젠 FMD 백신	백신접종 35일 후 부검
근육 접종 (IM)	3	케어사이드 바이오아토젠 FMD 백신	백신접종 35일 후 부검

그룹	19주령 (0 dpv)	19주령 (3 dpv)	20주령 (7 dpv)	35일령 (14 dpv)	42일령 (21 dpv)	49일령 (28 dpv)	56일령 (35 dpv)
진피 접종 (ID)	바이오아토젠 FMD 백신	-	-	바이오아토젠 FMD 백신	-	-	안락사 / 부검
근육 접종 (IM)	바이오아토젠 FMD 백신	-	-	바이오아토젠 FMD 백신	-	-	안락사 / 부검
체중 측정, 혈액 채취	O	O	O	O	O	O	O

(2) 공시돈 선정 및 백신 접종

19주령의 6마리 SPF 돼지를 구입하여 3마리씩 ID그룹과 IM그룹으로 구분하였다. ID그룹은 무침주사기를 이용하여 양쪽 이근부에 바이오아토젠 FMD 백신을 접종하였고, IM 그룹은 동일 백신을 용법 용량대로 양쪽 이근부에 근육접종을 하였다. 백신 접종 14일 후 같은 부위에 그룹에 맞는 접종 방식으로 백신을 재접종하였다.

(3) 사육환경

실험 기간동안 돼지는 23~24℃, 습도 60%가 유지되며, 음수와 사료가 무제한으로 공급되는 실험 사육실에서 사육되었다.

(4) 체중 측정 및 시료 채취

(가) 혈액 채취

19주령(백신 접종 전), 19주령(백신 접종 3일 후), 20주령(백신 접종 7일 후), 21주령(백신

접종 14일 후), 22주령(백신 접종 21일 후), 23주령(백신 접종 28일 후), 24주령(백신 접종 35일 후)에 채혈 및 혈청분리를 실시하였고 실험시점까지 4 °C에 보관하였다.

(나) 생산성관련 일당증체량 분석

19주령(백신 접종 전), 19주령(백신 접종 3일 후), 20주령(백신 접종 7일 후), 21주령(백신 접종 14일 후), 22주령(백신 접종 21일 후), 23주령(백신 접종 28일 후), 24주령(백신 접종 35일 후)에 공시돈 체중을 측정하여, 일당증체량을 계산하였다. Mann-whitney 방법을 이용하여 그룹별 일당증체량의 유의성 여부를 확인하였다.

(5) 돼지 FMD 바이러스 O형 항체 혈청검사

FMD ELISA 항체검사는 바이오노트사 키트(PrioCHECK™ FMDV Type O Antibody ELISA kit)를 이용하여 공급처의 설명서에 따라 실시하였다.

(6) 병리조직학적 검사

(가) 병리조직 샘플

백신 접종 5주가 경과된 시점인 24주령에 부검을 하여 피부의 육안 병변을 관찰하고 조직 슬라이드 제작을 위해 피부조직을 10% 포르말린에 고정하였다.

(나) 병리조직학적 관찰 및 분석 방법

포르말린에 고정한 피부 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 한다. H&E 염색이 된 조직은 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다.



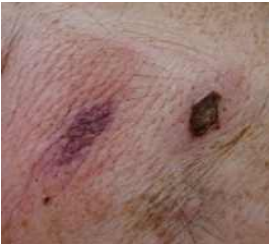











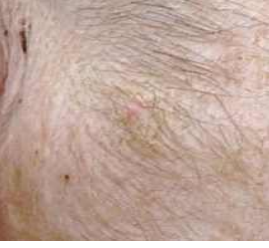

(7) 통계분석

그룹별 평균 차이를 통한 귀무가설의 기각 혹은 채택을 위해서 연속변수인 경우 repeated measure of ANOVA를 이용하였으며, 모집단의 정규분포를 규정할 수 없다고 판단될 경우 Mann-Whitney U test나 Wilcoxon signed-rank test를 실시했다.

(8) 평가결과

(가) 접종부위 평가 결과

접종 1일 후 개체 별 반응의 정도 차이가 있지만 ID 그룹의 모든 돼지에서 진피에 들어간 백신과 유도되는 면역반응에 의해 엄지손톱 크기의 붓기와 발적을 보였다. 재접종 1일 후 (15 dpv)에는 기존 접종 부위는 딱지만 관찰되었으며 재접종 부위에서는 엄지손톱 크기의 붓기와 발적, 그리고 딱지가 관찰되었다. 진피 접종 2주가 지난 시점에서는 접종 부작용이 크게 감소되는 것으로 판단된다. 그에 반해 근육접종 돼지는 접종 이후 발적만 관찰되었으며, 그마저도 ID 그룹보다 약하게 관찰되었다 (그림 12).

#1 ID	 <p>접종 1일 차 좌측 접종부위</p>	 <p>접종 1일 차 우측 접종부위</p>	 <p>재접종 1일 차 (15dpv) 좌측 접종부위</p>	 <p>재접종 1일 차 (15dpv) 우측 접종부위</p>
#2 ID	 <p>접종 1일 차 좌측 접종부위</p>	 <p>접종 1일 차 우측 접종부위</p>	 <p>재접종 1일 차 (15dpv) 좌측 접종부위</p>	 <p>재접종 1일 차 (15dpv) 우측 접종부위</p>
#3 ID	 <p>접종 1일 차 좌측 접종부위</p>	 <p>접종 1일 차 우측 접종부위</p>	 <p>재접종 1일 차 (15dpv) 좌측 접종부위</p>	 <p>재접종 1일 차 (15dpv) 우측 접종부위</p>
#4 IM	 <p>접종 1일 차 좌측 접종부위</p>	 <p>접종 1일 차 우측 접종부위</p>	 <p>재접종 1일 차 (15dpv) 좌측 접종부위</p>	 <p>재접종 1일 차 (15dpv) 우측 접종부위</p>

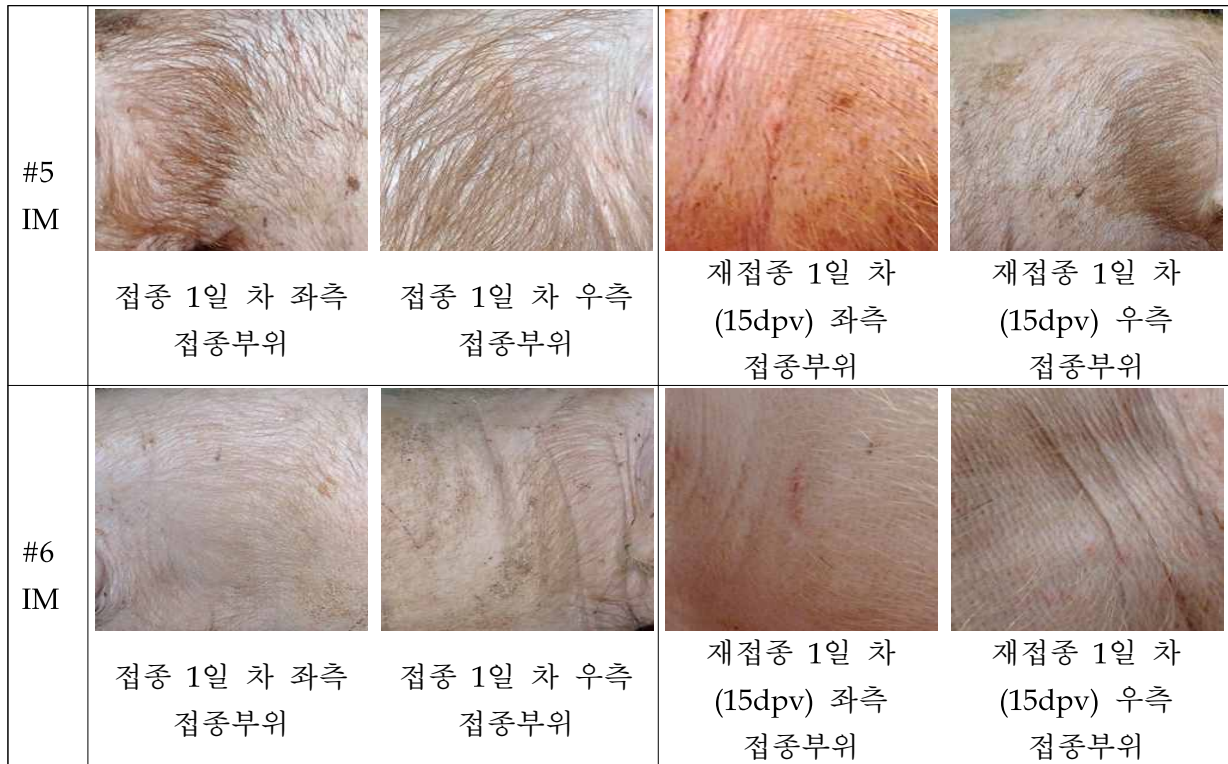


그림 12. 백신 이후 접종 부위의 국소 반응

(나) 체중 및 일당증체량 분석결과

체중은 두 그룹 모두 실험종료 시점까지 꾸준히 증가하였으며 실험종료시점에서 ID 그룹의 평균 체중(27kg)과 일당증체율(0.28kg)은 IM 그룹의 평균 체중(29.2kg)과 일당증체율(0.30kg)과 비슷한 수준이었다. 이를 토대로 진피접종 방식의 생산성은 근육접종의 그것과 비슷하다고 평가되었다 (그림 13).

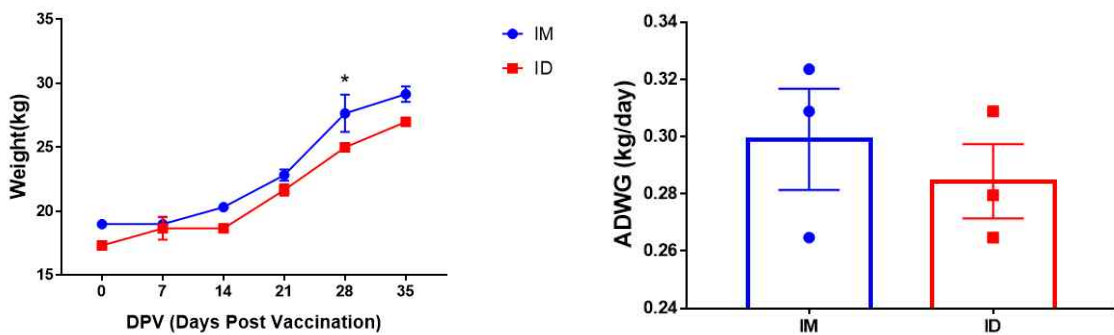


그림 13. 체중의 변화 및 35 dpv에서 일당증체량

(다) 돼지 FMD바이러스 O형 항체 혈청검사 결과

IIM 그룹은 백신 접종 이후 1주부터 항체가가 증가하여 실험 종료시점에 가장 높은 항체가를 보였다 (PI value 88.4%). 반면 ID 그룹의 구제역 항체가는 백신 접종 이후 2주부터 급격히 증가하여 실험종료 시점에는 IM 그룹 항체가 수준까지 증가하였다 (PI value

87.4%) (그림 14).

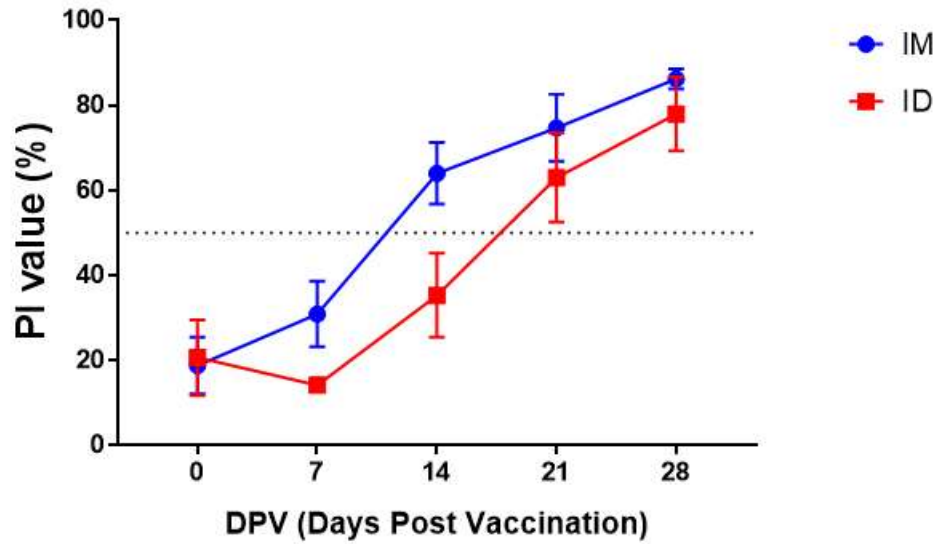
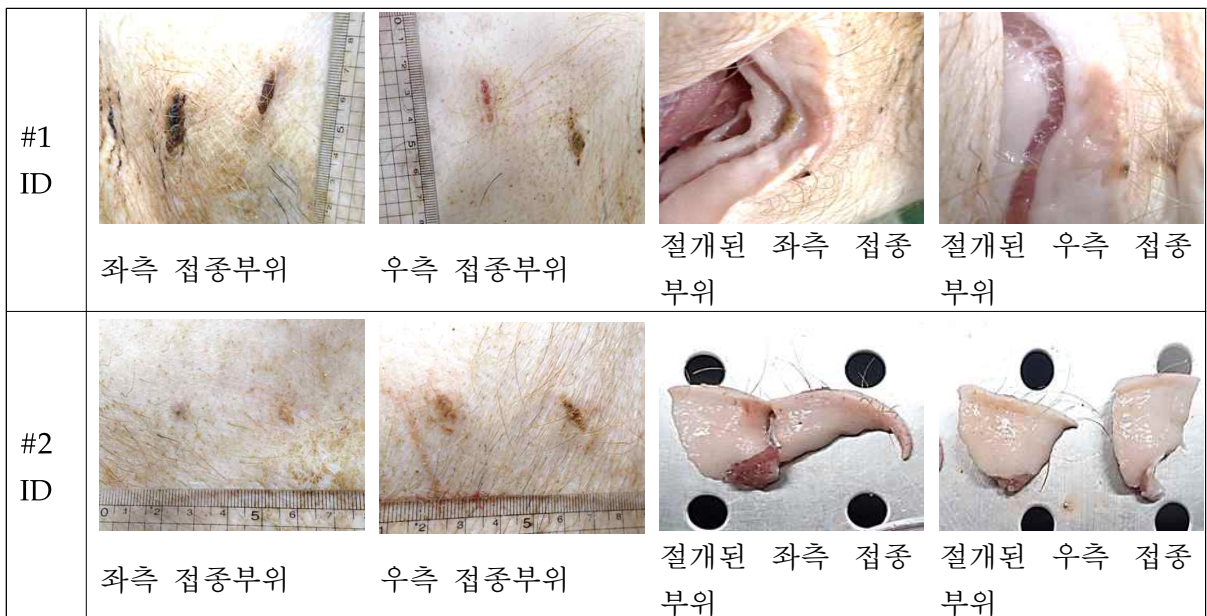


그림 14. 백신 접종 이후 항체가의 변화

(라) 부검 당시 접종 부위 육안 검사 결과

ID 접종 그룹 중 일부 돼지의 피부에서 발적이나 딱지같은 국소 반응이 관찰되었으며 진 피층에서 발적 이외에 특별한 소견이 관찰되지 않았다. 반면 IM 접종 그룹의 돼지의 근육층에서 granuloma와 농이 관찰되었으며 일부 돼지에서는 부형제가 근육층에 잔류하고 있었다 (그림 15).



#3 ID				
	좌측 접종부위	우측 접종부위	절개된 좌측 접종부위	절개된 우측 접종부위
#4 IM				
	좌측 접종부위	우측 접종부위	절개된 좌측 접종부위	절개된 우측 접종부위
#5 IM				
	좌측 접종부위	우측 접종부위	절개된 좌측 접종부위	절개된 우측 접종부위
#6 IM				
	좌측 접종부위	우측 접종부위	절개된 좌측 접종부위	절개된 우측 접종부위

그림 15. 부검 당시 접종 부위의 국소 반응

(9) 평가결과 요약

진피 접종 이후 피부에 국소적으로 발적 및 부종이 관찰된 것으로 보아 백신 접종이 제대로 된 것으로 평가된다. 또한 부검 당시 (백신 5주 후) ID 그룹의 체중과 일당증체량이 IM 그룹보다 비슷하였고, ID 그룹의 근육층에서 IM 그룹과 달리 granuloma 같은 부작용을 보이지 않았기 때문에 생산성과 안전성이 입증된 것으로 평가된다. 더 나아가 ID 그룹의 FMD 항체가는 근육 접종 방식보다 늦지만 비슷하거나 더 나은 수준으로 효과적으로 증가하여 FMD 방어능을 형성하는 것으로 평가되었다.

제 2절. 구제역 백신 간편 무침주사기를 이용한 실험동물(소)에 대한 효능평가 (제2세부)

[1차년도]

1. 구제역 백신 간편 무침주사기 조건 설정을 위한 소에 대한 접종 실험

가. 실험 농장 선정 및 실험구 배치

(1) 실험농장 일반 현황

일반적인 질병관리 수준의 농장을 선정하여 무침주사와 근육주사를 이용한 구제역 백신접종의 항체가 형성을 평가하고 안전성을 평가한다. 선정된 시험농장에서 2개월 이상의 송아지 20두를 선정하여 무침접종 백신군에 10두, 근육접종 백신군 10두를 선정한다.

(가) 실험농장 현황 : 전북 익산 용안면(농업회사법인 보비텍, 대표 공준호)

(나) 실험구 배치 : 홀스타인 송아지 20두(10두 접종군, 10두 미접종군)

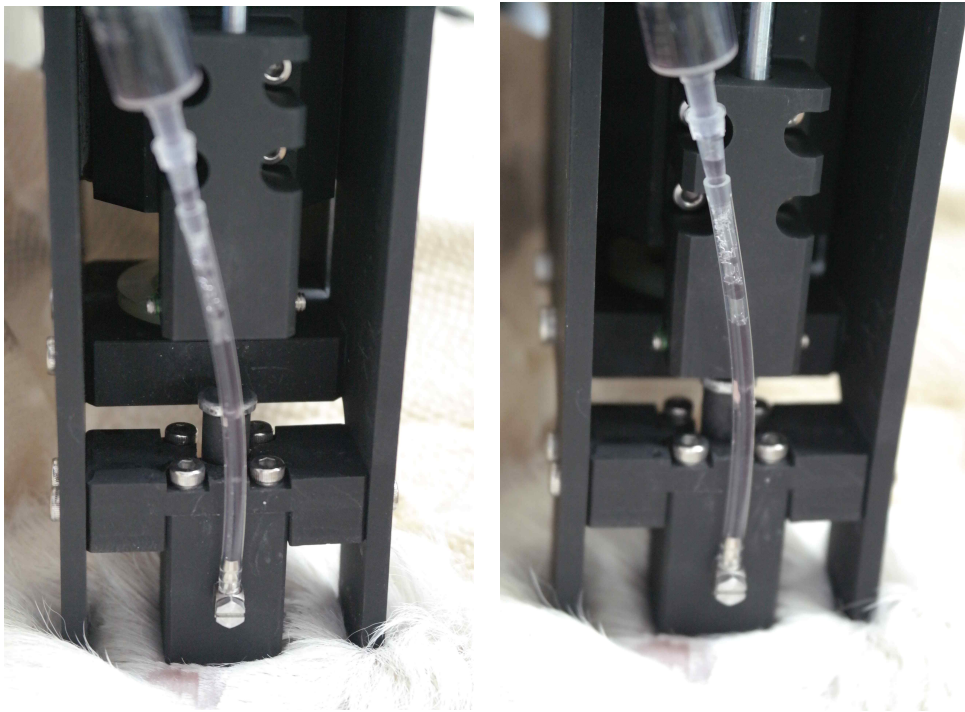
(다) 실험구 배치(좌), 개체사진(우)



(2) 무침주사기 시제품 접종 시험



접종을 위한 접촉(좌), 접종후 피부(우)



주입을 위한 피스톤 후퇴(좌), 주입 후 피스톤(우)

(3) 무침주사기 개발을 시제품 테스트 결과

- (가) 압력이 너무 강해 피부 및 근육까지 주입 예상
- (나) 연속 주사시 약물의 압력 형성이 부족함
- (다) 작동시 과도한 소음 등 개선해야 할 문제점이 있음

[2차년도]

1. 구제역백신 간편 무침주사기를 이용한 소농장에 대한 효능평가

(1) 실험 디자인

소에서 무침주사기와 근육접종의 효능을 비교하기 위해 무침주사기로 백신 접종한 군 (ID), 근육 백신 접종한 군 (IM), 2개 그룹으로 나누었다. 백신 접종 직후 접종부위의 부작용을 관찰하였고, 4주간 항체가 모니터링을 실시하였다.

(가) 실험디자인 및 처치 일정

그룹	개체수	백신접종	접종부위 확인
진피 접종 (ID)	5	동방 FMD 백신	2일 후
근육 접종 (IM)	3	동방 FMD 백신	

(나) 1차 접종 대상축 내역

품종	축번	생년월일	성별	비고
한우	002141766422	2019.6.16	수	
한우	002141766439	2019.6.16	수	
한우	002142381462	2019.6.13	수	
홀스타인	1404 94449	2019.6.17	암	
홀스타인	1414 26599	2019.6.15	암	

(2) 공시 동물 및 백신 접종

4개월령 한우 및 젖소 8두를 활용 대조군(IM) 3두 및 실험군(ID) 5두로 구분하였다. ID 그룹은 무침주사기를 이용하여 양쪽 둔부에 동방 FMD 백신을 접종하였고, IM그룹은 동일 백신을 용법 용량대로 양쪽 견갑부에 근육접종을 하였다. 백신 접종 14일 후 같은 부위에 그룹에 맞는 접종 방식으로 백신을 재접종하였다.

(3) 사육환경

실험 기간동안 시험축은 개체별 우방에서 농장 관리 방법에 준하여 사육되었다. 음수는 무제한 공급, 체중 5% 우유, 송아지사료 0.5kg을 기준으로 성장에 따라 추가적으로 증가하였다.

(4) 혈액 채취

백신 접종(생후 4개월령), 2주차(백신 접종 후) 및 4주차(백신 접종 후)에 경정맥에서 5ml의 혈액을 채혈 하였고, 혈청 분리를 실시하였고 -20℃에서 분석 시점까지 보관하였다.

(5) 소 FMD 바이러스 O형 항체 혈청검사

FMD ELISA 항체검사는 바이오노트사 키트(PrioCHECK™ FMDV Type O Antibody ELISA kit)를 이용하여 공급처의 설명서에 따라 실시하였다.

(7) 통계분석

그룹별 평균 차이를 통한 귀무가설의 기각 혹은 채택을 위해서 연속변수인 경우 repeated measure of ANOVA를 이용하였으며, 모집단의 정규분포를 규정할 수 없다고 판단될 경우 Mann-Whitney U test나 Wilcoxon signed-rank test를 실시했다.

(8) 평가결과

(가) 접종부위 육안 결과

접종 부위는 외관상 피부에 푸른색을 나타냈다(백신에 푸른색 색소 첨가). 2일 후 접종 부위를 절개하여 관찰한 결과 피부층에 발적을 확인 할 수 있었다.



(접종 부위(좌), 절개면 접종 부위 확인(우))

(나) 소 FMD바이러스 O형 항체 혈청검사 결과

ID 그룹의 항체가는 접종시점 21.19±17.21, 접종 2주차 34.11±31.61, 4주차 17.19±5.23으로 항체가 평가 결과 음성으로 확인되었다. 하지만 개체번호 94449(홀스타인)은 접종 2주차 항체가 90.61 로 양성으로 확인되었다. 5주 접종에서 1두만이 양성을 나타냈다.(그림 14).

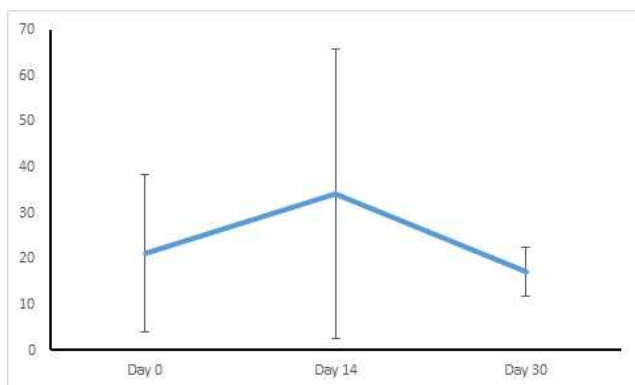


그림. 무침주사기를 이용한 백신 접종 후 항체가 변화

2. 소 구제역백신 접종용 무침주사기 설계

(1) 무침주사기 백신 접종 문제점

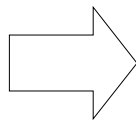
- 돼지 맞게 설계된 무침주사기를 소에 적용에 따른 접종 어려움 (송아지(4개월 미만)는 가능하지만 6개월 이후에는 접종 어려움)
- 소의 경우 피부가 두껍고 털로 덮혀 있어 가이드에 유도되면서 주입구와 피부의 밀착이 불가
- 추가 3회 접종 시험을 하였으나, 접종 부위를 확인하기 어려워 재 설계하기로 함

(2) 구조 변경

- 기존 돼지용은 외부 가이드 보다 0.2-0.3mm 함몰된 형태로 제작(본 과제 제작 및 타 제품에서도 비슷하게 설계)되어 있음
- 상기 단점을 보완하기 위하여 가이드 보다 0.3mm 이상 돌출된 형태의 구조 설계 및 제작



(기존 무침주사기)



(구조 변경 무침주사기)

3. 구제역백신 간편 무침주사기를 이용한 소농장에 대한 효능평가

(1) 실험 디자인

소에서 무침주사기와 근육접종의 효능을 비교하기 위해 무침주사기로 백신 접종한 군 (ID), 근육 백신 접종한 군 (IM), 2개 그룹으로 나누었다. 백신 접종 직후 접종부위의 부작용을 관찰하였고, 4주간 항체가 모니터링을 실시하였다.

(가) 실험디자인 및 처치 일정

그룹	개체수	백신접종	접종부위 확인
진피 접종 (ID)	7	케어사이드 바이오아토젠 FMD 백신	7일 후
근육 접종 (IM)	3	케어사이드 바이오아토젠 FMD 백신	7일 후(미확인)

(나) 2차 접종 대상축 내역

품종	축번	생년월일	성별	비고
한우	002141766439	2019.6.16	수	대조군
한우	002141766578	2019.6.16	수	대조군
한우	002142381462	2019.6.13	수	대조군
젃소	002143352675	2019.10.16	암	실험군
한우	002141766422	2019.6.16	수	실험군
젃소	002144369864	2019.10. 3	암	실험군
젃소	002144371639	2019.10.14	암	실험군
젃소	002144371622	2019.10.14	암	실험군
한우	002141787298	2019.8.13	수	실험군
젃소	002141426599	2019.6. 1	암	실험군

(2) 공시 동물 및 백신 접종

3-6개월령 한우 및 젃소 총10두를 활용 대조군(IM) 3두 및 실험군(ID) 7두(젃소5두, 한우2두)로 구분하였다. ID그룹은 무침주사기를 이용하여 양쪽 둔부에 FMD 백신을 접종하였고, IM그룹은 동일 백신을 용법 용량대로 양쪽 견갑부에 근육접종을 하였다. 백신 접종 14일 후 같은 부위에 그룹에 맞는 접종 방식으로 백신을 재접종하였다. 백신 접종용 무침주사기는 소 전용으로 제작된 것을 이용하였다.

(3) 사육환경

실험 기간동안 시험축은 개체별 우방에서 농장 관리 방법에 준하여 사육되었다. 음수는 무제한 공급, 체중 5% 우유, 송아지사료 0.5kg을 기준으로 성장에 따라 추가적으로 증가하였다. 6개월령 소는 건초와 농후사료를 농장 기준에 준하여 급여하였다.

(4) 혈액 채취

백신 접종(생후 4개월령), 2주차(백신 접종 후) 및 4주차(백신 접종 후)에 경정맥에서 5ml의 혈액을 채혈 하였고, 혈청 분리를 실시하였고 -20℃에서 분석 시점까지 보관하였다.

(5) 소 FMD 바이러스 O형 항체 혈청검사

FMD ELISA 항체검사는 바이오노트사 키트(PrioCHECK™ FMDV Type O Antibody ELISA kit)를 이용하여 공급처의 설명서에 따라 실시하였다.

(7) 통계분석

그룹별 평균 차이를 통한 귀무가설의 기각 혹은 채택을 위해서 연속변수인 경우 repeated measure of ANOVA를 이용하였으며, 모집단의 정규분포를 규정할 수 없다고 판단될 경우 Mann-Whitney U test나 Wilcoxon signed-rank test를 실시했다.

(8) 평가결과

(가) 접종부위 육안 결과

접종 부위는 외관상 피부에 푸른색을 나타냈다(백신에 푸른색 색소 첨가). 2일 후 접종 부위를 절개하여 관찰한 결과 피부층에 발적을 확인 할 수 있었다.



(변경전 무침주사기 활용 접종 시연(좌), 접종 부위 확인(우))

(나) 소 FMD바이러스 O형 항체 혈청검사 결과

대조군인 IM 접종군의 항체는 백신접종 시점 21.60 ± 0.99 , 2주차 74.10 ± 17.13 , 4주차 88.20 ± 3.33 으로 접종 2주차에 양성 기준역가인 60이상으로 모두 항체가 양성을 확인하였다. ID 그룹의 항체는 접종 시점에 항체가 2두에서 양성으로 판정되어 최종 통계에서는 제외한 5두만을 항체가 결과로 분석하였다. ID 그룹의 항체는 접종시점 22.62 ± 8.72 , 접종 2주차 36.46 ± 6.55 , 4주차 94.32 ± 39.01 로 접종 후 2주차까지는 음성이었으나 4주차에는 항체가 양성으로 확인되었다. 무침주사기 접종 5두 중에서 4두가 항체가 양성으로 나타났다.(그림 14).

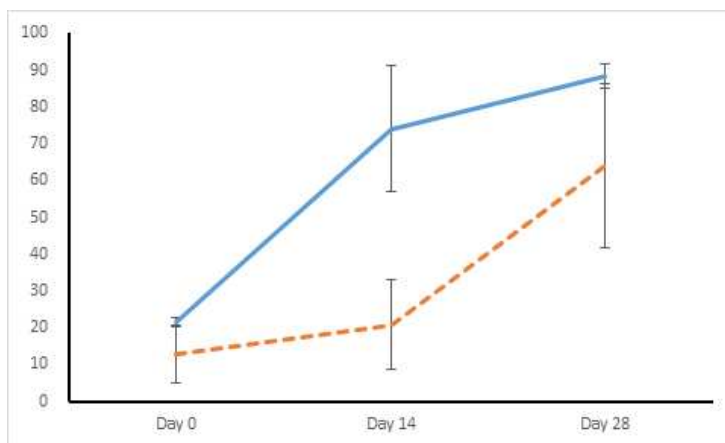


그림. 무침주사기를 이용한 백신 접종 후 항체가 변화(- IM, ... ID)1. 구제역 백신 간편 무침 주사기 조건 설정을 위한 소에 대한 접종 실험

제 3절. 구제역 백신 전용 간편 무침주사기 개발 (제3세부)

[1차년도]

1. 구제역 백신 전용 간편 무침주사기 설계 및 시제품 제작

가. 당해연도 3차에 걸쳐 시작품을 제작 및 평가

- 모터를 적용하여 압축 실린더 설계 (>2Mpa, >100M/sec 기준 이상)함.
- 충전식 배터리 타입 적용 설계
- ✓ 1차 시작품 컨셉, 모델링, 제품 사진 이미지는 다음과 같다.

1) 1차 시작품 컨셉

- 일반 주사기 이용, 스프링 탄성힘으로 주사액 토출 구현 가능성 TEST
- 동작 방법
- ✓ 슬라이드 나사 + 스프링을 이용하여 니들부 후퇴 고정
- ✓ 니들부 고정부 제거

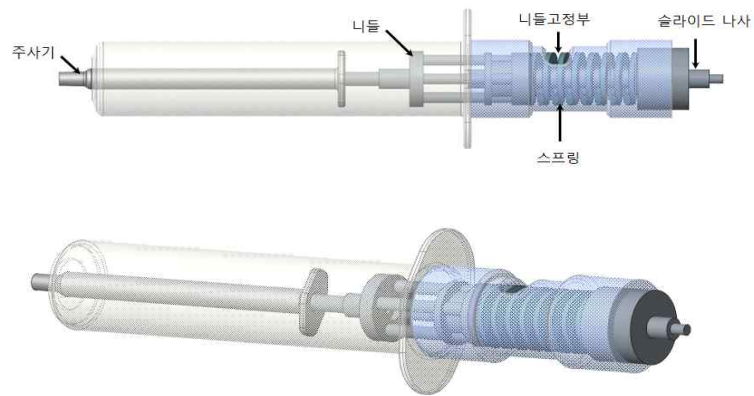


그림 163. 1차 시작품 모델링

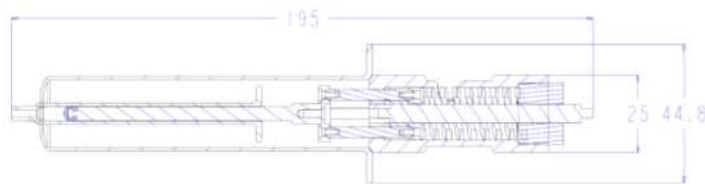


그림 18. 1차 시작품 설계 도면

○ 검토 결과

- ✓ 스프링 탄성 힘으로 액체가 토출됨을 확인 하였음.
- ✓ 1차 시작품은 수동 구동 방식으로 자동 구동 방식 구조로 2차 시제품에 적용

2) 2차 시작품 컨셉

○ 모터 및 슬라이드 나사, 스프링 탄성힘으로 피스톤 구동, 공기 흐름을 이용하여 액체 토출 구현

○ 동작방법

- ✓ 모터+슬라이드 나사를 이용, Piston을 후퇴 이동시켜 Lock Block에 고정
- ✓ Piston Block 전진하면서 Shaft Block을 이동시켜 Lock 해제
- ✓ 스프링 탄성 힘에 의해 Piston 전진하면서 공기를 노즐쪽으로 이동, 노즐안에 차있던 액체밖으로 토출.

○ 약액 흐름

- ✓ Piston 전진 시 Air를 Vial 쪽으로 흐르게 하여 vial 내부 압력을 높여 반대쪽 라인으로 약물을 흐르게 함.
- ✓ Solenoid를 이용 밸브 개,폐 하여 일정량 약품을 노즐로 흐르게 함

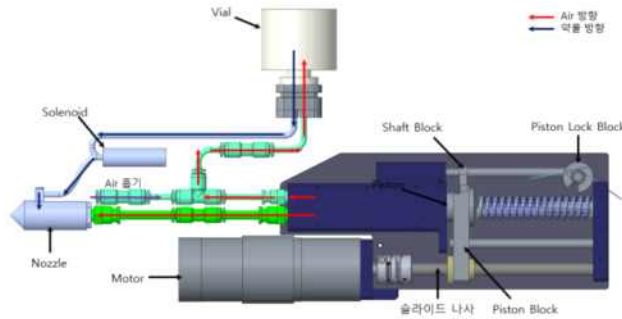


그림 165. 2차 시제품 모델링



그림 166. 2차 시작품 이미지.

○ 검토 결과

- ✓ 공기 분출 압력이 낮아 액체 분출이 원활히 이루어지지 않음.
- ✓ 액체 노즐로 이동 후 내부 공기 배기가 안되어, 약물과 공기 같이 토출됨.
- ✓ 피스톤 구조 및 액체 토출 방식 변경 필요.

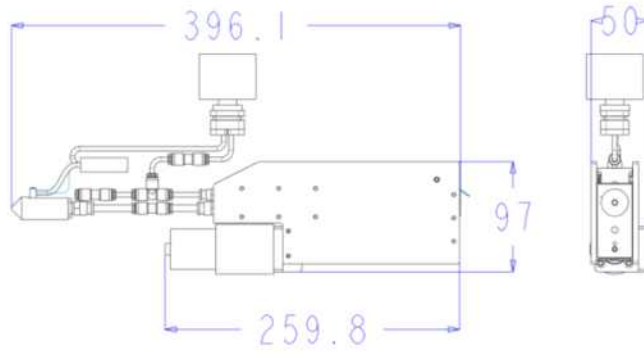


그림 167. 2차 시작품 설계도

3) 3차 시작품 컨셉

○ 동작방법

- ✓ 모터회전 -> 피니언 기어 회전하면서 Piston 후퇴 이동, 피니언 기어 톱니 없는 부위가 랙기어 부와 만나 Piston 전진 이동 하게 됨.
- ✓ Piston 후퇴 시 플런저도 같이 일정 위치까지 후퇴 시키며, 일정위치를 지나 Piston에서 떨어지게 됨.(후퇴 시 노즐부 액체 투입)
- ✓ 약품 투입 후 Push Pin이 플런저를 다시 일정 위치까지 전진시킴(액체 용량 조절)
- ✓ Piston 후퇴 -> 전진 하면서 노즐부 플런저부를 타격힘에 의해 액체 토출.

○ 약품 흐름

- ✓ Piston 후퇴 시 air piston을 구동 시켜 공기를 Vial쪽으로 흐리게 하여 Vial내부 압력을 높여 반대쪽 라인으로 약물을 흐르게 함.
- ✓ Solenoid를 이용하여 밸브 개,폐 하여 일정량 약품을 노즐로 흐르게 함
- ✓ Air-> Vial 이동부 중간 체크밸브 사용하여, 역류 방지 적용

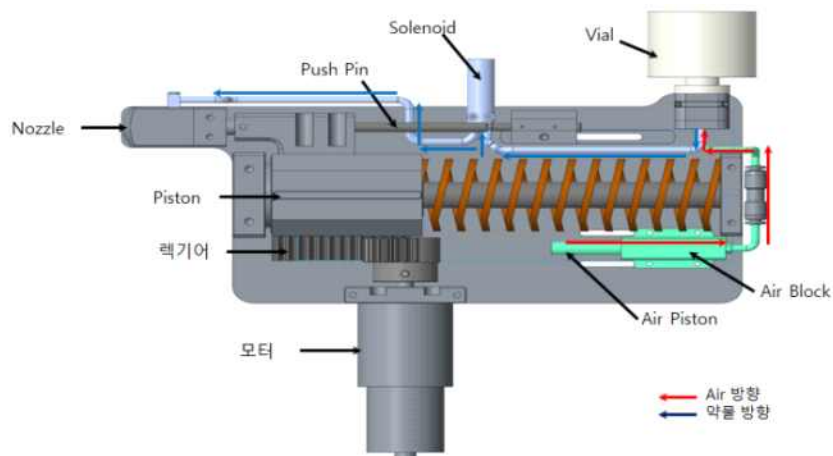


그림 168. 3차 모델링 이미지 (내부)

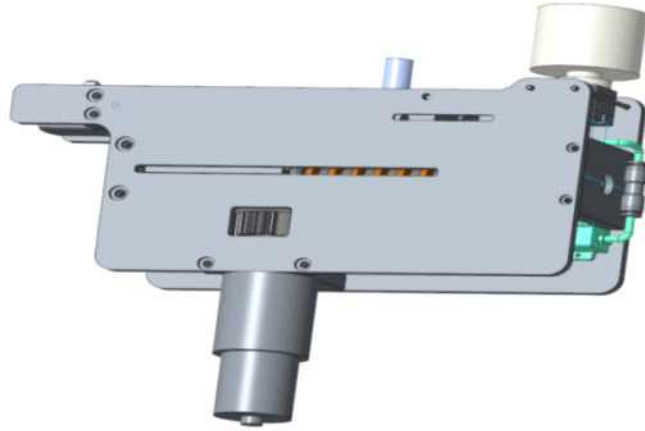


그림 169. 3차 모델링 이미지(전체)

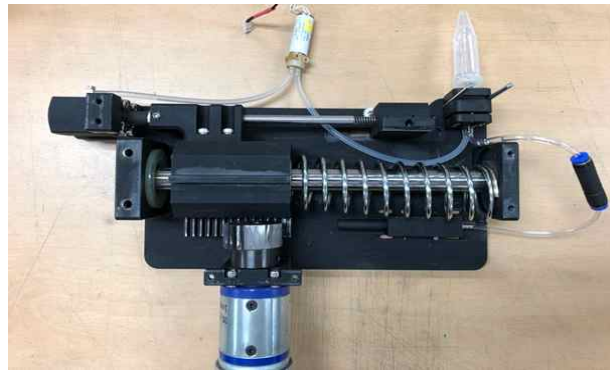


그림 170. 3차 시작품

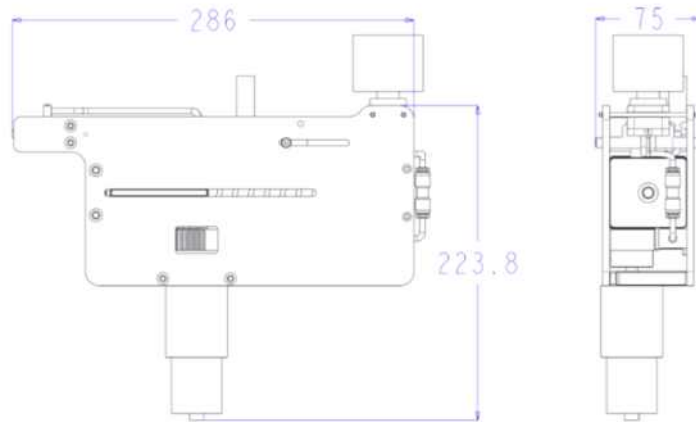


그림 171. 3차 시작품 설계도

[2차년도]

가. 4차 시작품 제작

4) 동작방법

- 구동 Start Button 동작하여, 약물 주입 대기 모드 실행.
 - ✓ 모터+Cam 일정 각도 회전하면서 Piston+Plunger 후퇴 이동 및 스프링 압축 (회전 위치(각도)는 포토센서 이용하여 제어)
 - ✓ Piston+Plunger 이동되면서 Nozzle부에 약물이 투입 됨.(약물 용량은 Cam높이에 의해 결정)
- 약물 주입 대기 모드후 전면 Triger 동작하여 약물 토출
 - ✓ Trigger 위치 이동 되어 센서 동작시켜 모터+Cam 일정 각도 회전됨.
 - ✓ Cam 특정부에 도달하게 되면 스프링 탄성으로 Piston+Plunger 전진시켜 Nozzle부 약물을 토출시킴
- 약물 토출 후 재장전 필요시 1번항목부터 재실행.

5) 약품흐름

- Piston+Plunger 후퇴시 Nozzle 내부 압력으로 인하여 약물 바이알에서 자동으로 Nozzle 방향으로 흐르게 됨
- Piston+Plunger 전진시 스프링 탄성의 힘으로 Nozzle 내부 약물이 토출됨.
 - ✓ 약물, Air 흐름부 역류되지 않도록 체크밸브 구조 적용됨.

6) 4차 시작품 기구설계

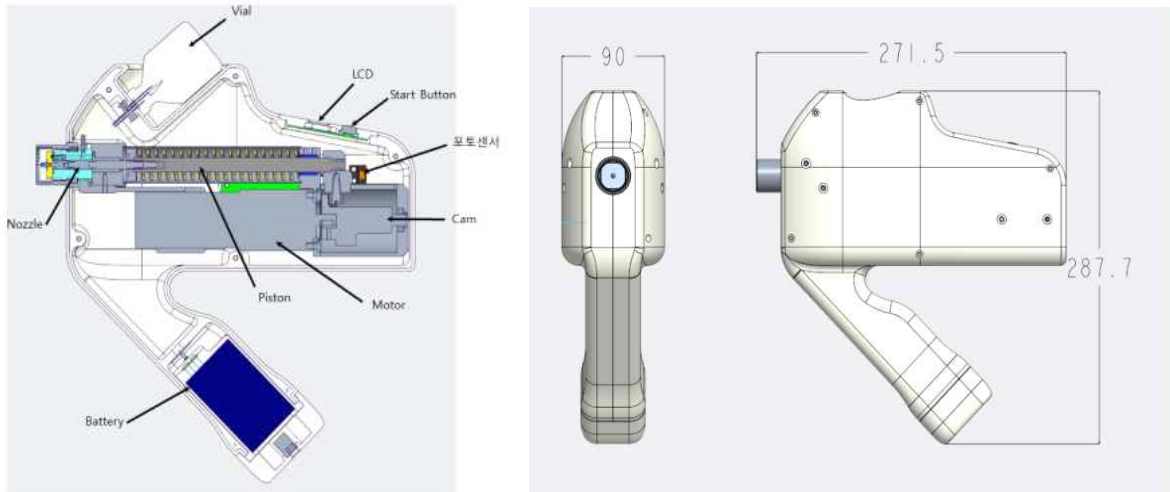


그림 172. 4차 시작품 기구 설계

7) 시작품 구동 보드 제작 및 제어 프로그램 개발

① 구동 보드 회로도

- 구동보드 회로도는 전원부, MCU부, 디스플레이부, 자이로/온도제어부 등으로 구성됨.
세부회로도는 아래 표와 같음

표 46. 무침주입기 최종 회로도_전원회로부

번호	회로부	회로도																																																												
1	전원부																																																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th>REV</th> <th>SYN</th> <th>DATE</th> <th>DESCRIPTION</th> <th>DRAWN</th> <th>CHECKED</th> <th>APPROVED</th> <th>DRAWN</th> <th>CHECKED</th> <th>APPROVED</th> <th>COMPANY</th> <th>MIRACLESCOPE</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>SH LEE</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			REV	SYN	DATE	DESCRIPTION	DRAWN	CHECKED	APPROVED	DRAWN	CHECKED	APPROVED	COMPANY	MIRACLESCOPE					SH LEE																																											
REV	SYN	DATE	DESCRIPTION	DRAWN	CHECKED	APPROVED	DRAWN	CHECKED	APPROVED	COMPANY	MIRACLESCOPE																																																			
				SH LEE																																																										

표 47. 무침주입기 최종 회로도_MCU회로부

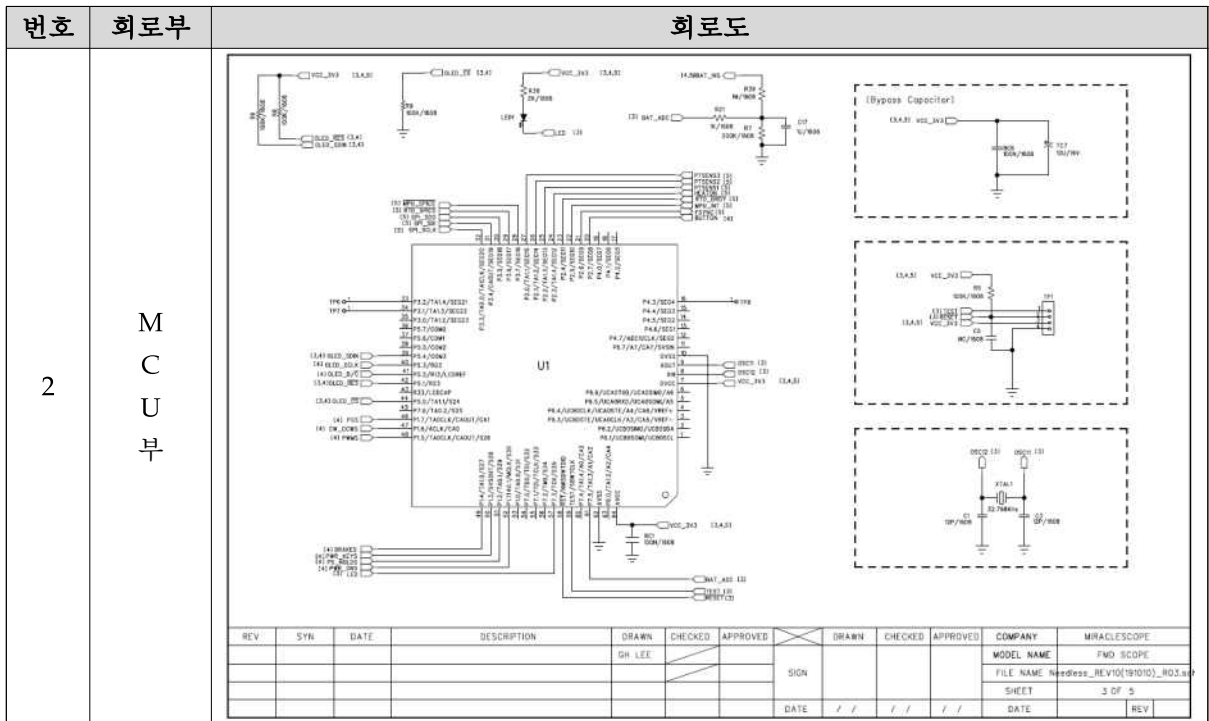


표 48. 무침주입기 최종 회로도_디스플레이구동회로부

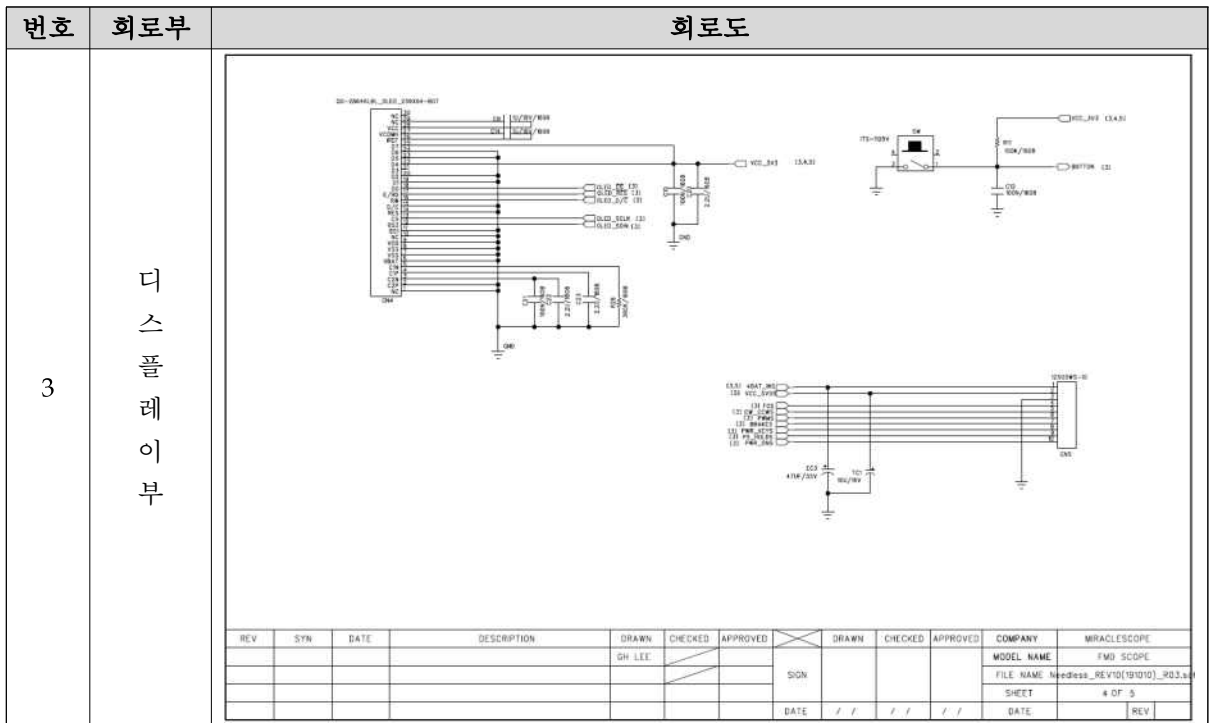
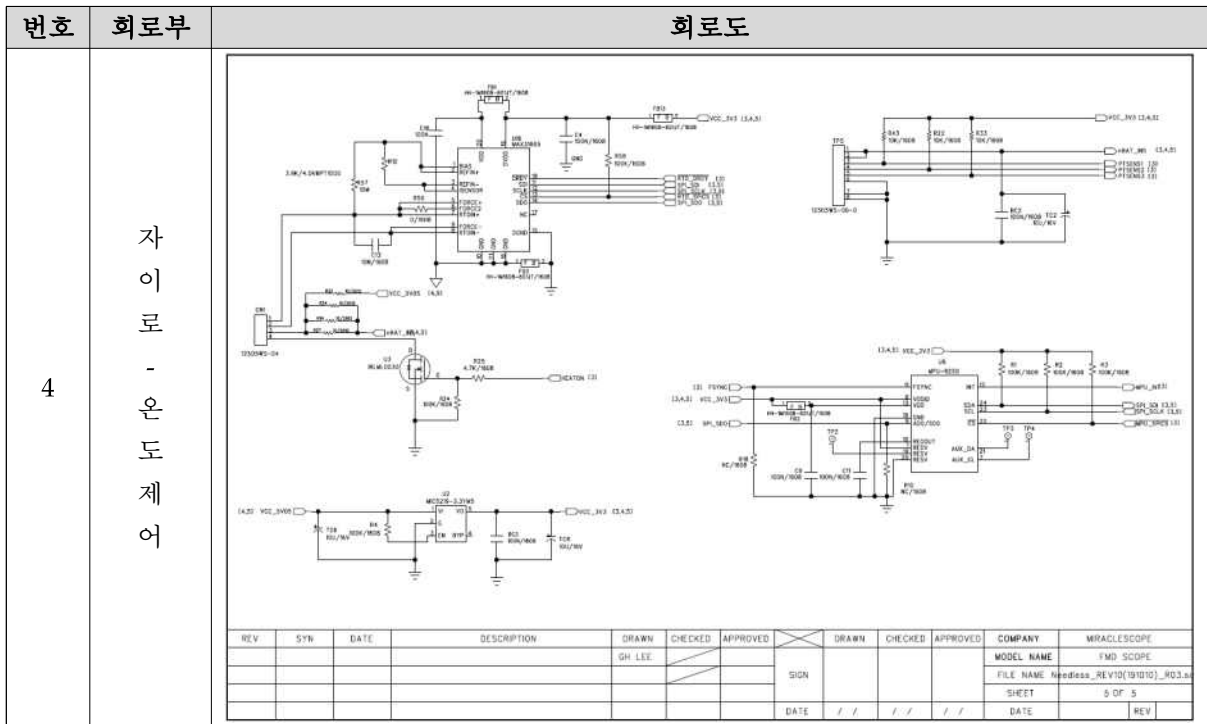


표 49. 무침주입기 최종 회로도_자이로 및 온도제어회로부



② PCB 설계

○ 무침주입기 구동보드는 제어보드와 모터구동보드 등 2개로 구성됨.

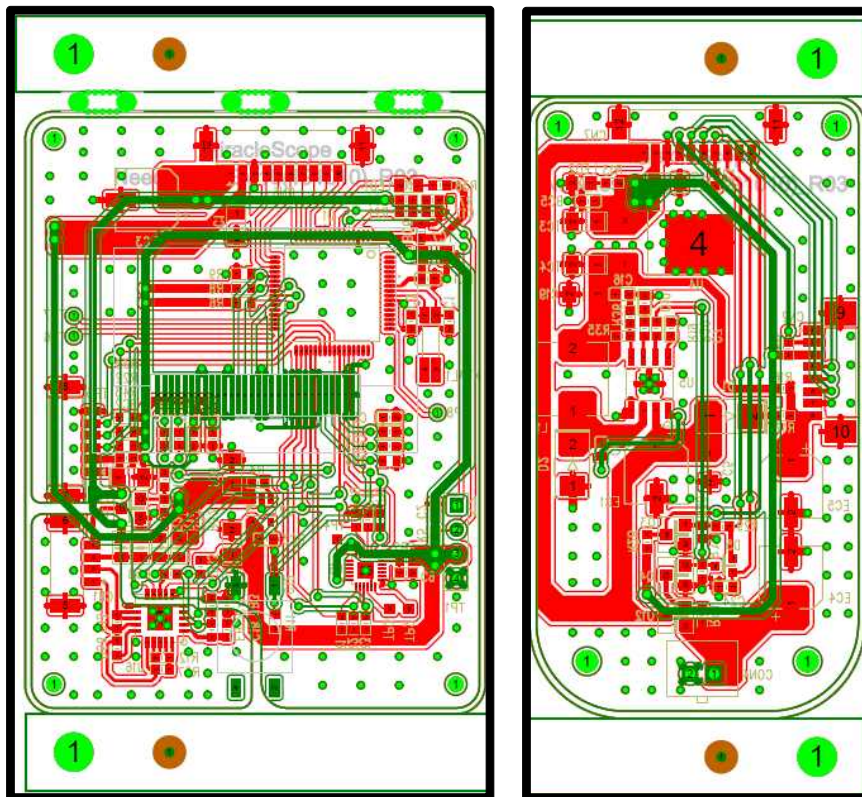


그림 177. 무침주입기 구동보드. (a) 제어보드, (b) 모터구동보드

③ 구동 및 제어 프로그램

- 구동 및 제어보드의 CPU는 TI사의 MSP430F4152이며, 컴파일러 및 Editor는 개발환경은 아래 그림과 같이 TI사에서 제공함 IAR Embedded Workbench IDE를 사용함.

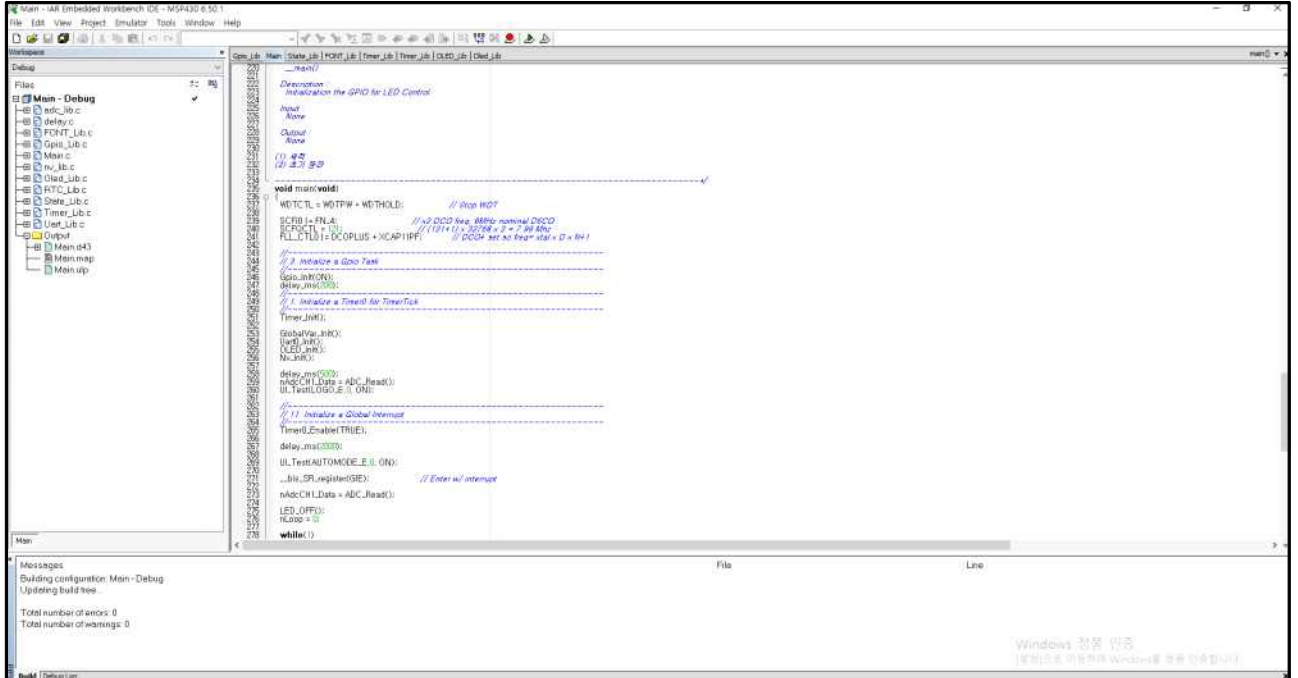


그림 178. IAR Embedded Workbench IDE

- 파일 구성 및 역할은 아래 표와 같음.

표 50. 무침주입기 구동 및 제어 프로그램

번호	파일명	설명
1	main.c	메인 프로그램
2	adc_lib.c	배터리 전압값 읽고, 충전상태 알림
3	font_lib.c oled_lib.c	폰트 저장 및 디스플레이 수행
4	gpio_lib.c	GPIO 포트 설정. Trigger 스위치, Start스위치, 및 엔코더 인터럽트 처리
5	timer_lib.c	타이머 인터럽트 처리
6	rtc_lib.c	RTC(Real Time) 인터럽트 처리
7	state_lib.c	동작 상태 처리

8) 4차 시작품 제작 및 평가



그림 179. 4차 시작품 제작

나. 최종(5차) 시작품 제작

1) 최종 시작품 디자인

○ 기존 제품의 디자인을 조사하고 분석함



그림 180. 무침주입기 자료조사

○ 기존 제품을 바탕으로 7개의 다양한 형태를 아래 그림과 같이 스케치함.

Type_A 스케치	Type_B 스케치
------------	------------



○ 위의 다양한 스케치 중에서 하나를 선정하여 최종 시작품을 디자인함.



그림 189. 최종 디자인.

2) 최종시제품 개선 및 추가 사항

- 주사기 파지방향(위치)제어 관련 자이로센서 적용
- 결빙 및 저온에서 약물 흐름 원활하도록 히터 적용
- 부품 소형화 하여 무게 및 크기 줄임(무게 약 35%, 부피 약 40% 줄임)
- 구동 시나리오 추가(세정, 자동 충전)

3) 동작방법

- 구동 Start Button 동작하여, 약물 주입 대기 모드 실행.
 - ✓ 모터+Cam 일정 각도 회전하면서 Piston+Plunger 후퇴 이동 및 스프링 압축 (회전위치(각도)는 포토센서 이용하여 제어)
 - ✓ Piston+Plunger 이동되면서 Nozzle부에 약물이 투입 됨.(약물 용량은 Cam높이에 의해 결정)
- 약물 주입 대기 모드후 전면 Triger 동작하여 약물 토출
 - ✓ Trigger 위치 이동 되어 센서 동작시켜 모터+Cam 일정 각도 회전됨.
 - ✓ Cam 특정부에 도달하게 되면 스프링 탄성으로 Piston+Plunger 전진시켜 Nozzle부 약물을 토출시킴
- 약물 토출후 자이로 센서 내장되어 있어 특정 위치(각도)파지시 약물 주입대기 모드로 동작됨
 - ✓ 약물 원활히 Nozzle 내부에 투입되기 위한 위치(방향).

4) 약품흐름

- Piston+Plunger 후퇴시 Nozzle 내부 압력으로 인하여 약물 바이알에서 자동으로 Nozzle 방향으로 흐르게 됨
- Piston+Plunger 전진시 스프링 탄성의 힘으로 Nozzle 내부 약물 토출
 - ✓ 약물, Air 흐름부 역류 되지 않도록 체크밸브 구조 적용
 - ✓ Nozzle 및 Vial Needle부 결빙 및 저온에서 약물 흐름 용이 하도록 내부 히터 적용.

5) 최종시작품 기구설계

- 최종시제품은 Battery, 구동모터, Vial, Trigger 스위치, Start 스위치, LCD 등으로 구성됨.
- Battery는 충전이 가능한 2차 리튬폴리머 Battery로 타사에 비해 2배의 용량을 갖고 있음
- 전체 외관 사이즈는 242.3(H) x 273.2(L) x 64.1(W) mm이고, 무게는 대략 1.7Kg임.

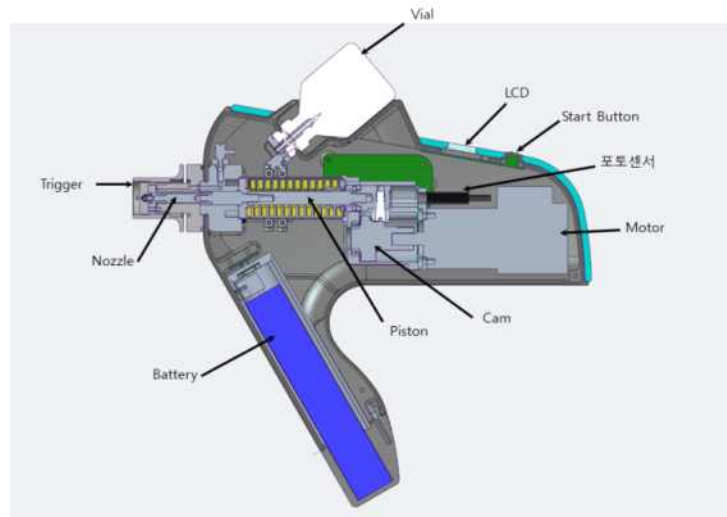


그림 190. 최종시작품 내부도면

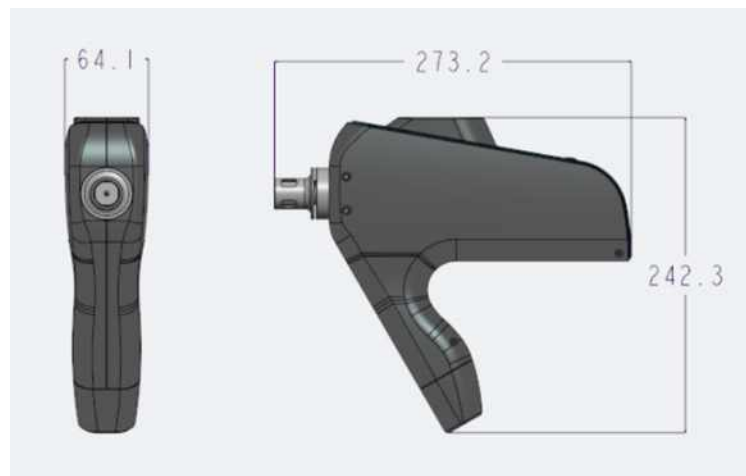


그림 191. 최종시작품 외관도면

6) 최종시작품 제작



그림 194. 최종시작품 제작

다. 성능 평가

○ 참여기관 미라클스코프(주)는 토출압력과 분사속도 등 기기의 성능을 평가하였으며, 성능 평가 결과는 아래 도표와 같음.

번호	시험항목	목표치	결과치	단위
1	토출압력	2MPa이상	4.24 MPa	MPa
2	분사속도	100 m/sec이상	102.32 m/sec	m/sec



□ 시험 결과

번호	시험항목 및 기준	판정	비고
1	토출 압력 2 MPa 이상	적 합 (Pass)	측정된 힘: 2 N 계산된 압력: 4.24 MPa
2	분사 속도 100 m/sec 이상	적 합 (Pass)	102.32 m/sec

□ 시험 방법

1. 토출 압력

- 투출구를 로드셀에 붙여서 토출되는 힘을 측정한다.
- 측정된 힘을 압력으로 단위 변환 한다. (압력=힘/면적)
- 면적: 0.471 mm² (토출 입구 지름: 0.3 mm)

2. 분사 속도

- Speed meter를 이용하여 분사되는 속도를 측정한다.

3. 시험 사진



[1. 토출 압력]



[2. 분사 속도]

□ 사용장비

관리번호	장비명	교정유효일	비고
S022-03	Push pull gauge	2020.11.14	-
S090-01	Speed meter	2020.07.26	-



□ 제품 사진



제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

<정성적 목표>

- 구제역백신 전용 무침주사기 설계 및 제품 산업화
- 구제역 백신 접종용 무침주사기에 대한 실험동물 및 현장적용실험을 통한 효능 평가
- 구제역 백신 부작용을 최소화한 간편 사용이 가능한 구제역 백신접종용 무침주사기 상용화

<정량적 목표>

성과 목표	사업화지표							연구기반지표							
	지식 재산권		기술실시 (이전)		사업화		기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책활용 홍보	
	특허 출원	특허 등록	건 수	기술료	제품화	매출액		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전시
								SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	백만원	건	백만원	건	건	건	5	건		명	건	건
가중치	20	0	10	10	20	0	10				5	5	5	5	5
1차년도	1	0	0	0	0	0	0	0	1	50	1	0	0		1
2차년도	1	0	1	4.9	1	0	0	1	0	50	2	1	2	1	2
합계	2	2	1	4.9	1	3,600	0	1	1	100	3	1	2	1	18

3-2. 목표 달성여부

<정성적 목표> - 달성완료

- 구제역백신 전용 무침주사기 설계 및 제품 산업화(달성완료)
 - 돼지 피내접종에 적합한 무침주사기 도출 압력 실험 반복 실험 실시
 - 실험돼지에 피내 접종에 적합한 디자인 설계 등 시제품 제작 완료
 - 시제품 제작을 통한 구제역 백신 접종 무침주사기 제품 산업화 준비 완료
- 구제역 백신 접종용 무침주사기에 대한 실험동물 및 현장적용실험을 통한 효능 평가(일부 달성완료)
 - 구제역 백신 접종용 무침주사기에 대한 실험동물 돼지에 적용을 통한 구제역 항체 형성 효능실험 실시
 - 구제역 백신 접종용 무침주사기에 대한 실험동물 소에 적용을 통한 구제역 항체 형성 효능실험 실

시

- 근육접종 보다 무침주사기를 이용할 경우 항체형성이 늦게 되고 개체간 편차가 있는 부분에 대해서는 구제역백신 항원양을 늘리는 방식으로 해결을 시도해볼 계획임
- 구제역 백신 접종용 무침주사기에 대한 현장적용실험을 실시할 계획이었으나 아프리카돼지 열병 발생 등으로 인한 현장적용실험을 위한 농장 섭외에 어려움이 존재하여 현장적용 실험 미실시
- 향후 추가 연구사업 혹은 자체 평가 계획을 수립하여 농장적용 평가를 실시하여 연구의 완성도 높여 본 사업으로 개발된 구제역 백신 전용 무침주사기가 현장에서 사용될 수 있도록 노력할 계획임

● 구제역 백신 부작용을 최소화한 간편 사용이 가능한 구제역 백신접종용 무침주사기 상용화(달성완료)

- 구제역 백신 접종용 무침주사기를 실험용 돼지에 적용한 결과 구제역 백신 근육접종으로 인한 이상육 발생 등이 거의 없는 것으로 확인됨
- 구제역 백신접종용 무침주사기를 이용한 백신 접종 결과 구제역 항체가 형성되어 상용화 가능
- 다만, 농장적용평가 및 항체지속기간 조사 등에 대한 추가적인 연구를 추진할 계획임
- 향후 백신 개발업체 등과 제휴하여 돼지에서 개체 간에 항체형성 차이에 대한 분석도 실시할 계획임

<정량적 목표> - 목표 달성 및 일부 미달성

정량적 목표 항목	달성	달성율 (%)	가중치	비고
특허출원 2건	2	100	20	
특허등록 2건	0	0	-	과제 종료 2~3년차에 등록 예정
기술이전 1건	1	100	10	
기술료	0	0	10	과제 종료 2~3년차에 실시 예정
제품화 1건	1	100	20	
매출액 1건	0	0	10	2020년부터 집계 가능
기술인증	0	0	10	
SCI급 논문 1건	0	0	-	1건 심사 중
비SCI급 논문 1건	0	0	-	1건 심사 중
학술발표 3건	3	100	5	
교육지도 1건	1	0	5	
인력양성 2명	2	100	5	
정책활용 1건	1	100	5	
홍보전시 18건	3	100	5	15건은 과제 종료 후 예정
합계	9		100	

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 기술이전: 과제 종료 후 기술이전 실시

- 구제역 백신 회사와 업무협약 등을 통해 구제역 백신 전용 무침주사기 기술이전 실시 진행 중
- 논문출판: SCI급 논문 1건 및 비SCI급 논문 1건 심사 중
 - Needle-free intradermal vaccination of pigs induced a good level of protection against Porcine Circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. BMC Veterinary Research (심사 중)
 - Evaluation of safety and efficacy between intradermal administration and intramuscular administration of inactivated FMD vaccine. Vaccine (심사 중)
- 제품화
 - 향후 추가 평가 및 인허가를 통해 제품화 예정
- 매출액 달성
 - 2년간의 실험결과를 구제역 백신 전용 무침주사기에 대하여 농림축산검역본부로부터 허가승인을 신청할 계획이며 매출 창출을 위하여 시제품을 생산하여 농림축산검역본부 고시 자가검정 및 국가검정을 거쳐서 2022년 출시 예정임
 - 매출은 2022년 발생 예정임
- 기술인증
 - 2차년도 과제 종료 이후 농림부 신기술 인증 및 녹색인증 순차적으로 진행 예정.

제 4장. 연구결과의 활용 계획 등

● 제 1 절. 연구개발 결과의 활용방안

1) 특허 등

- 명칭 : 무침 주사기 특허 (출원번호 :10-2020-007910)
- 명칭 : 무침 주사기 디자인 (출원번호 30-2020-0004864)

2) 세미나 전시회 참가 (별첨1)

- 2019 성남 바이오나노 컨퍼런스
- 일시 : 2019. 11. 22
- 장소 : 가천대학교

3) 고용창출 : 2명 (별첨2)

- 김OO : 2019.03.02. 채용
- 정OO : 2019.08.01. 채용

3) 매출증대 및 비용 절감 효과

- 국내 의료·바이오 산업분야용 디스펜서 시장규모는 2004년도 약 20억원 규모를 나타내고 있으나, 의료·바이오 응용기술 PM보고서에 따르면 2012년 이후 약 10배 이상 성장이 예측됨
- 액추에이팅 기술 향상 및 이에 따른 토출 압력, 물질 및 허용 범위의 대역화에 따라 압전 소자 기술을 적용한 디스펜서 및 인젝터 시장이 급속하게 성장할 것으로 예상됨. 2010년 1억 4,600만 개에서 2015년에는 6억 5,100만 개로 증가할 것으로 예상됨
- 따라서 해당 기술의 상업화 가능성은 80% 이상으로 예상되고, 매출증가에 개발기술만이 기여하는 정도는 60% 이상으로 판단되며 나머지 기여 분은 정책변화 및 수요증가에 따른 것으로 예상됨

3) 수출 증대 및 수입 대체 효과

- 국외 반도체 공정용 디스펜서의 시장 동향은 2010년 1,500억원 규모로 대폭 성장하였음. 전통적인 국내 반도체 산업의 강세에 힘입어 더욱 성장될 것으로 전망되어 수출 증대 효과 기대됨
- SMT 장비는 2012년 35억불의 글로벌 시장규모를 기록했음. SMT 공정은 모든 전자산업계에 널리 사용되고 있는 공정으로서, 휴대폰 케이스, 카메라폰에 사용되는 CMOS 이미지 센서 모듈 및 광부품, LCD, OLED, LED에서 집중적으로 디스펜서가 사용되고 있음. 소형화와 고집적 기술을 필요로 하는 스마트폰 및 태블릿 제품의 강세로 SMT용 디스펜서의 수요는

성장할 것으로 전망되어 수입 대체 효과가 큼

- 압전 소재를 적용한 액추에이터 시장에서 모바일기기용 및 정밀제어용 액추에이터의 핵심 부품·소재는 대부분 일본, 유럽, 미국 등 해외 산업체에 의해 장악되어 있어 수입대체 효과 기대됨

4) 기대성과 및 파급효과

1. 기술적 측면

- 가. 기존 오일백신의 근육접종에 따른 접종반응을 크게 개선
- 나. 소 및 돼지에서의 구제역 방어에 관여하는 면역인자에 대한 현장 연구 축적

2. 정책 및 사회적 측면

- 가. 접종 부작용을 줄여 전체적으로 백신접종율과 항체양성율을 제고할 수 있는 토대 마련
- 나. 백신 국산화를 위한 인프라 구축에 기여

3. 경제 및 산업적 측면

- 가. 다른 백신의 피내 접종을 위한 기술적 토대 마련, 새로운 사업 기회 마련
- 나. 기존 근육접종에 따른 화농발생(접종반응) 및 이상육 발생을 감소시켜서 생산성을 크게 증대시킴
- 다. 기존 근육 접종시 사용되는 백신접종량을 감소시킬 수 있음
- 라. 소 및 돼지에서의 근육접종시 유발되는 스트레스 감소로 생산성 증대에 기여

● 제 2 절. 사업화 계획

① 제품화

- 과제 종료 시 개발되는 시제품 제작을 통해 원자재 확보 및 부품 단가 측정
- 시제품 케이스 디자인 제품 홍보용 카달로그 제작

② 양산

- 시제품 금형 설계 제작 진행
- 기존 사용되는 케이스 및 기구물에 대한 생산라인 구축

③ 판로개척

- 판매점 확보 방안
- B to B : 동물 병원(4,426), 가축 농가, 제약회사(백신), 전국 축산업 협동조합(40)

④ 사업화를 위한 후속 투자계획

구 분	(2020)년 (개발종료 해당년)	(2021)년 (종료 후 1년)	(2022)년 (종료 후 2년)	(2023)년 (종료 후 3년)	(2024)년 (종료 후 4년)	(2025)년 (종료 후 5년)
사업화 제품명	무침주사기	무침주사기	무침주사기	무침주사기	무침주사기	무침주사기
투자계획(백만원)	500	630	1,480	1,300	730	700

⑤ 해외시장 진출계획

세부 추진 사항		
마케팅 전략	제품 네이밍 전략	<ul style="list-style-type: none"> 이미지를 강조한 명명 및 상표 등록
	가격 전략	<ul style="list-style-type: none"> 경쟁사 제품대비 시장니즈가격 사전조사 가격경쟁력을 확보할 수 있는 원가대비 판매단가 결정
	제품 전략	<ul style="list-style-type: none"> 인체 기존 약물주입기와 차별화된 무침주사기 제품 개발 및 제품 광고
	유통 전략	<ul style="list-style-type: none"> 해외 바이어 발굴
	A/S 계획수립	<ul style="list-style-type: none"> A/S 비용 절감 및 A/S기간 단축을 위한 계획수립

- 현지 바이어들을 통한 해외시장의 지속적인 수요조사 진행.
- 해외 전시회 참가를 통해 바이어 발굴 진행.
- 중동, 중남미 국가에 패키지 수출을 통한 시장구축
- 제조 단가에서 가장 많은 부분을 차지하는 구동부 단가를 낮추고 개별 판매보다는 종합 동물병원을 포함한 병원을 주요 고객사로 선정하는 B2B 전략을 통해서 장비 렌탈 및 이에 따른 지속적인 유지관리 및 서비스 제공
- 본 연구과제에서는 기존 데이터 값들을 근거로 하여 추후 빅데이터화 시켜 측정 이후의 예측 및 진단 방법을 제시 할 수 있도록 개발 진행 예정임.
- 수출 인프라 구축
 - ✓ 온라인 마케팅
 - ✓ 홈페이지 : 국내 및 국외 버전 관리로 제작 진행
 - ✓ SNS : SNS를 통한 제품의 홍보 및 동영상, 카달로그 등을 게시함

⑥ 고용유지 및 고용 창출 계획

- ✓ 현재고용 인원 : 6명
- ✓ 신규채용 : 2명
- ✓ 담 당 : DB 구축 및 인허가
- ✓ 기 간 : '19.1.1 - ' 20.12.31 (향후 실적에 따라 정규직 전환)

○ 기술개발을 통한 고용창출 효과 및 신규인력 채용 계획

- ✓ 개발된 제품의 해외 시장 진출 및 국내 시장 점유 등으로 인한 매출 증대에 따른 신규 직원들의 고용 창출 예정.

고용 현황 및 향후 계획

구 분	(2020)년 (기술개발 전년)	(2021)년 (개발종료 해당년)	(2022)년 (개발종료 후 1년)	(2023)년 (개발종료 후 2년)
신규고용(명)	1	1	3	3
상시고용(명)	6	7	10	13

붙임. 참고문헌

1. 구제역 발생 현황과 방역 체계 개선 방안. 제 27호(2017.2.24.) 지인배, 허덕, 김현중, 김원태, 한봉희, 김진년, 정세미. 한국농촌경제연구원
2. Needless intradermal vaccination for foot-and-mouth disease induced granuloma-free effective protection in pigs. Hwang JH, Lee KN, Kim SM, Lee G, Moon Y, Kim B, Lee JS, Park JH. J. Vet. Sci. 2019
3. Intradermal vaccination of pigs against FMD with 1/10 dose results in comparable vaccine efficacy as intradermal vaccination with a full dose. Eble PL, Weerdmeester K, van Hemert-Kuitenberg F, Dekker A. Vaccine 2009, 27(8): 1272-8
4. 구제역 백신의 피내 및 피하접종을 통한 이상육 감소. 박준우, 문영광, 유은희, 류영수, 2019. APVS(Asian Pig Veterinary Society)
5. Enhanced immune responses of foot-and-mouth disease vaccine using new oil/gel adjuvant mixtures in pigs and goats. Park ME, Lee SY, Kim RH, Ko MK, Lee KN, Kim SM, Kim BK, Lee JS, Kim BH, Park JH. Vaccine. 2014, 32, 5221-5227
6. Effect of the route of foot-and-mouth disease virus infection of piglets on the course of the disease. Acta Virol. 2010. 54(3), 311-313
7. Foot-and-mouth disease virus transmission among vaccinated pigs after exposure to virus shedding pigs. Orsel K, de Jong MC, Bouma A, Stegeman JA, Dekker A. Vaccine 2007. 25(34): 6381-6391
8. Comparison of a liquid-phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency tests of foot-and-mouth disease vaccines. J Immunol Methods 1989. 124(1):111-119
9. Challenges of Generating and maintaining protective vaccine-induced immune responses for foot-and-mouth disease virus in pigs. Lyons NA, LyooYS, King DP, Paton DJ. Front Vet Sci 2016 3:102

별첨1. 세미나 전시회 참가







발급번호 :				
건강보험자격득실확인서				
확인청구자	성명	주민등록번호		
	김	-1		
자격득실확인내역				
No	가입자구분	사업장명칭	자격취득일	자격상실일
1	직장가입자	에라앰소프트주식회사	2019.03.02	
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

2019.03.12

국민건강보험공단 이사장


- ※ 이 확인서의 취득일·상실일은 실제의 사업장 입사일·퇴직일과 다를 수 있습니다.
- ※ 이 확인서는 국민건강보험공단 인터넷 홈페이지(www.nhis.or.kr)에서 직접 발급이 가능합니다. (공인인증서 필요)
- ※ 이 확인서는 건강보험 자격확인용어므로 다른 용도(계직증명용, 경력증명용, 대출용 등)로 사용시 공단에 법적인 책임이 없음을 알려드립니다.



주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.