

11-1543000  
-001412-01

발간등록번호

11-1543000-001412-01

초음파처리 인삼열매 조성물을 이용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발 최종보고서

2016

농림축산식품부

# 고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

## 초음파처리 인삼열매 조성물을 이 용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발

최종보고서

2016. 10. 25.

주관연구기관/고연(高研)  
1협동연구기관/중앙대학교  
2협동연구기관/세명대학교

농림축산식품부

## 2. 제출문

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “초음파 처리 인삼열매 조성물을 이용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발”(개발기간 : 2013. 7. ~ 2016. 7.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 8. 15.

주관연구기관명 : 고연(高研) (대표자) (인)  
1협동연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (대표자) (인)  
2협동연구기관명 : 세명대학교 산학협력단 (대표자) (인)

주관연구책임자 : 고성권  
1협동연구책임자 : 손의동  
2협동연구책임자 : 김형준

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	113021-3	해당 단계 연구 기간	2013. 7. ~ 2016. 7.	단계 구분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	중사업명	고부가가치식품기술개발사업			
	세부사업명				
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	초음파 처리 인삼열매 조성물을 이용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발			
연구책임자	고성권	해당단계 참여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 74 명 내부: 6 명 외부: 68 명	총 연구개발비	정부: 510,000천원 민간: 171,000천원 계: 681,000천원
연구기관명 및 소속부서명	고연(高研)			참여기업명 고연(高研)	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호		D-01																											
연구의 목적 및 내용	(연구목적) 초음파 처리 인삼열매 조성물을 이용한 간기능 개선 건강기능식품 개발 (연구내용) ○ 초음파 처리 인삼열매 조성물의 성분 분리 분석 ○ prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼열매 조성물 개발 ○ 초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 생리활성 시험 ○ 초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 인체적용 시험 ○ 초음파 처리 인삼열매 조성물의 안전성(독성) 시험 ○ 초음파 처리 인삼열매 조성물 시제품 제작																														
연구개발성과	(연구성과 목표대비 실적) <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="2">특허</th> <th colspan="2">논문</th> <th rowspan="2">학술발표</th> <th rowspan="2">인력양성</th> </tr> <tr> <th>출원</th> <th>등록</th> <th>SCI</th> <th>비SCI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>목표</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>4</td> <td>3</td> <td>2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>성과</td> <td>1</td> <td>-</td> <td>4</td> <td>4</td> <td>6</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table> (연구개발성과) ○ Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> 등의 홍삼 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 초음파 처리 인삼열매 조성물 개발 및 대량 추출조건 최적화 ○ Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> 분리 화학구조 동정 ○ 지표성분 (Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> ) 표준화 (밸리데이션) ○ 간독성 동물모델에서 초음파 처리 인삼 열매 조성물의 간 보호효과 ○ 초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 인체적용 시험 IRB 승인 ○ 초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 인체적용 시험 ○ 초음파 처리 인삼열매 조성물의 안전성(독성)시험[단회독성, 4주 DRF, 유전독성(염색체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험), 13주 반복독성시험 및 4주 회복시험] ○ 초음파 처리 인삼열매 조성물 시제품 제작(상품명 : 인프로)							특허		논문		학술발표	인력양성	출원	등록	SCI	비SCI	목표	1	1	4	3	2	3	성과	1	-	4	4	6	3
	특허		논문		학술발표	인력양성																									
	출원	등록	SCI	비SCI																											
목표	1	1	4	3	2	3																									
성과	1	-	4	4	6	3																									
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	○ 간기능 개선 기능성 강화 인삼열매 조성물 제품 개발 ○ 국민 건강 향상으로 국가 의료비 절감 ○ 인삼가공식품 시장규모 약 1조원에서 20-30% 확대 예상																														
중심어 (5개 이내)	초음파	인삼열매	간	기능성	식품																										



5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호		D-02			
Purpose& Contents	(Purposes of research) Development of functional food for improvement of hepatic protective effect using ultrasonication processed ginseng berry extract (Research contents) ○ Separation and analysis of components from ultrasonication processed ginseng berry extract ○ Development of ultrasonication processed ginseng berry extract containing a high concentration prosapogenin component ○ Physiological activity test of liver function improvement for ultrasonication processed ginseng berry extract ○ Clinical trials of liver function improvement for ultrasonication processed ginseng berry extract ○ Safety(toxic) test of ultrasonication processed ginseng berry extract ○ Prototyping of ultrasonication processed ginseng berry extract						
Results	(Research performance against goals)						
		Patent		Paper		Conference	Human Resources
		Applicati on	Enrollme nt	SCI	Non-SCI		
	Goal	1	1	4	3	2	3
Result	<b>1</b>	-	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	
	(Results of research) ○ Development of ultrasonication processed ginseng berry extract containing a high concentration ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> component and Optimization of mass extraction conditions ○ Separation and chemical structure identification of ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> ○ Standardization of component indicators (Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> ) (validation) ○ Liver protective effect of ultrasonication processed ginseng berry extract on hepatotoxicity model ○ IRB approval for clinical trials of liver function improvement for ultrasonication processed ginseng berry extract ○ Clinical trials of liver function improvement for ultrasonication processed ginseng berry extract ○ Safety(toxic) test of ultrasonication processed ginseng berry extract[single dose toxicity, 4 weeks DRF, genetic toxicity (chromosomal aberration test, reverse mutation test, micronucleus test), 13 weeks repeated toxicity test and 4 weeks recovery test ○ Prototyping of ultrasonication processed ginseng berry extract(product name : Inpro)						
Expected Contribution	○ Development of functional food for improvement of hepatic protective effect using ultrasonication processed ginseng berry extract ○ Reducing medical costs by improving national public health ○ 20-30% expansion expected in the ginseng food market about 1 trillion won						
Keywords	ultrasonication	ginseng berry	liver	functional	food		

## 6. 영문목차

### < Contents >

1. Overview of R & D projects .....	7
2. Status of domestic and international technology developments	14
3. Details and results of study .....	15
4. Goal achievement and contribution to relevant areas .....	499
5. Use Plan of research results .....	500
6. International scientific and technical information collected in the research process .....	503
7. Security clearance of research and development achievements	504
8. Equipment Status and research facility registered with the National Science and Technology Information System .....	504
9. Implemented performance of laboratory safety measures .....	504
10. Typical study results of research and development projects	·505
11. Etc .....	505
12. References .....	506

<Enclosure> Self Assessment Statement

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	7
2. 국내외 기술개발 현황 .....	14
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	15
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	499
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	500
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	503
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	504
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	504
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	504
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	505
11. 기타사항 .....	505
12. 참고문헌 .....	506

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

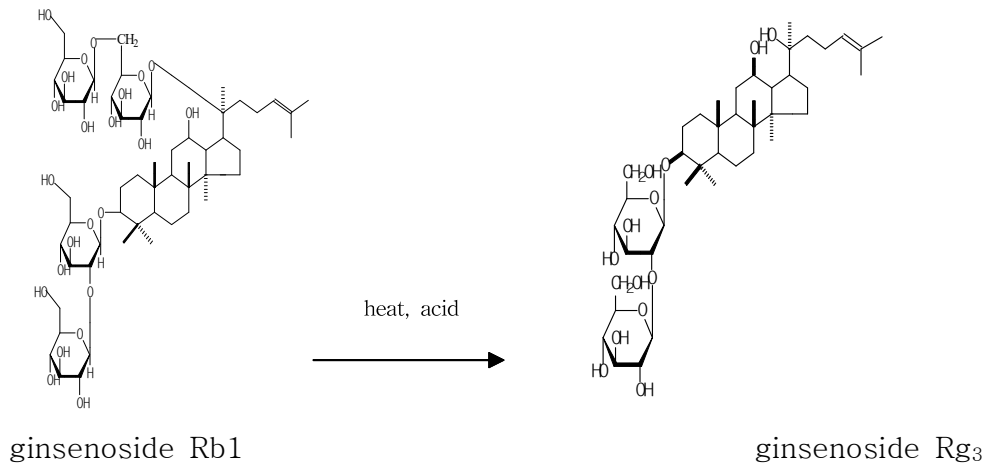
- 초음파 처리 인삼열매 조성물을 이용한 간기능 개선 건강기능식품 개발

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 우리나라 고려인삼은 해외수출 시장의 성장동력 및 전략 품목으로서 차별성 견비
  - 세계 인삼시장 규모는 '09년 기준 200억불 수준이며, '11년도 고려인삼 수출액은 189백만\$로 농산물 단일품목 중 1위를 차지('12.3월, 인삼산업 중장기 발전대책에 의거 '17년 600백만\$ 수출목표 제시)
  - 반면 아직까지 중국, 홍콩을 비롯한 아시아 시장이 85% 이상으로 편중되어 있고, 상대적으로 부가가치가 낮은 뿌리삼(원형삼)이 50% 이상을 차지
  - 제품류의 경우도 분말, 엑기스, 차, 음료 등 단순가공품이 주를 이루어 미국, 유럽 등 건강기능식품 시장의 진입이 어려운 실정임
- 기능성 소재(의약품 등) 및 관련 제품 시장의 빠른 변화 및 성장
  - 세계 기능성 식품시장은 '08년 기준 2,697억\$이며, 미국(37%), 유럽(28%), 일본(14%)의 순으로 현지 소비자의 기대에 부응할 수 있는 차별화된 제품 개발이 필요
  - FTA 대응 미국의 경우에는 생체방어관련 비타민, 미네랄류의 시장 점유율이 가장 높으므로, 이를 대체할 수 있는 인삼 소재를 활용한 제품개발이 필요하며, 비만으로 인한 대사증후군 및 당뇨병, 고령화로 인한 뇌인지장애, 암 치료 보조식품 등 생활습관병 기능성 식품의 필요성이 증대되므로, 이에 대응할 수 있는 맞춤형 인삼 기능성 성분 강화 제품 개발이 필요함
- 해외 인삼소비 패턴의 변화와 수출여건의 변화
  - 중국인삼 시장의 확대('09년 기준 10억\$) 및 뿌리삼(절편)보다 제품류 매출이 증가하고 있는 추세
  - 홍콩의 경우 '13년 7월부터 인삼제품류에 대한 '중성약등록제' 시행을 예고하여 수출여건 악화가 예상, 수출시장의 다변화 및 신시장 진입 필요
  - 특히 인삼제품류(뿌리삼 제외) 시장은 미국이 258백만\$, 중국이 137백만\$로 가장 큰 시장을 형성, 미국을 중심으로 하는 북미시장의 개척도 시급
- 인삼의 효능 강화를 위한 특정사포닌 강화 기술
  - 고부가가치 기능성 강화 인삼제품을 개발하기 위해서는 강력한 생리활성을 나타내는 특정성분을 고농도로 함유하게 하는 가공기술과 이와 관련한 생리활성소재의 유효성을 입증한 기능성제품을 개발해야함.
  - 인삼 함유 성분에 있어서 수삼 및 백삼에는 인삼사포닌 배당체(ginsenoside Ra, Rb<sub>1</sub>,

Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub> 등)가 함유되어 있음.

- 인삼사포닌 배당체는 동맥경화 및 고혈압의 예방, 위 및 간기능 촉진 및 숙취 제거 효과, 항피로 및 항스트레스 작용, 노화방지 작용, 두뇌활동 촉진 작용, 항당뇨작용, 소화기능 개선 효과 등이 보고되어 있음.
- 홍삼은 수삼 즉 밭에서 채굴한 생삼을 수증기로 찌서 건조한 것을 말함. 찌때 열에 의해서 가수분해가 일어나 사환성 triterpenoid 인 Dammarane 기본구조에서 일부분의 당이 유리되어 prosapogenin type의 ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rh<sub>2</sub>, Rh<sub>4</sub>등의 Artifact 즉 홍삼특유성분이 생성됨.
- 인삼 prosapogenin 즉 홍삼특유성분(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>2</sub>)은 암전이 억제활성, 항종양작용, 혈압강하, 항산화, 항당뇨, 뇌인지개선 등의 생리활성이 국제저널에 보고됨으로서 기능성 물질로서 세계적인 주목을 받고 있음.
- 사포닌 배당체 중 하나인 ginsenoside Rf 는 최근 GI motility를 향상시키는 페이스메이커 포텐셜을 조절한다는 연구결과가 발표됨.
- 이와 같은 인삼 prosapogenin을 고농도로 함유한 제제를 개발하기 위한 생명공학적인 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 서울대학교의 박만기 등은 열과 압력을 가하는 물리적인 방법에 의해 인삼사포닌 배당체(ginsenosides)의 당기를 일부분 가수분해하여 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>)을 높은 농도로 함유하는 인삼제품(선삼)을 개발하여 현재 시판 중임.



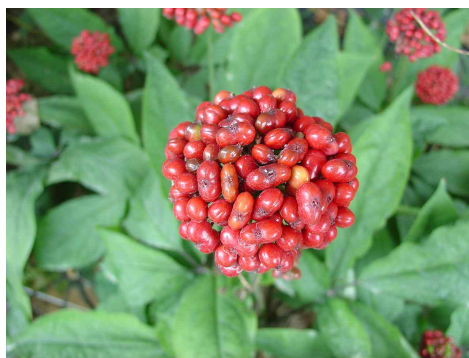
Transformation of protopanaxadiol saponin ginsenoside Rb<sub>1</sub> to ginsenoside Rg<sub>3</sub>

- 한편, (주) 일화와 (주) 원광제약은 장내미생물이 분비하는 효소를 이용하여 효소 가수분해를 유도하여 얻어지는 인삼 prosapogenin(IH-901, Compound K)을 높은 농도로 함유하는 인삼식품(락토진생, 효삼)을 개발하여 현재 시판 중임.
- 그러나, 본 연구팀은 안전성에 커다란 문제가 없는 초단파와 식용 양조식초를 이용하여 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rk<sub>1</sub>)을 고농도로 함유하는 인삼제제와 인삼 prosapogenin(ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, F<sub>4</sub>)를 고농도로 함유하는 인삼 지상부 조성물을 천연물화학적인 접근방법을 통하여 개발하여 국내특허(국내특허 출원번호: 10-2011-0141997, 10-2011-0141998, 10-2011-0141999, 10-2011-0142000, 출원일 : 2011년 12월 26일)를 출원하였음.

- 이와 같은 발명은 현재 개발된 어떤 방법보다 수율이 높고, 빠른 시간에 간단히 인삼 prosapogenin을 대량으로 생산할 수 있는 방법으로 산업계에서 주목을 받고 있음.
- 특히, 공지의 사실인 인삼사포닌 배당체(ginsenoside Rb<sub>2</sub>, Re)의 항당뇨작용, 뇌인지개선 작용, 암 예방작용, 소화기능 개선작용과 관련하여 기능성식품 개발을 위한 보다 체계적인 접근의 연구개발이 필요함.
- 이와 같이 인삼의 주요 약리 성분으로 알려진 인삼사포닌(ginsenosides)을 물리·화학·생물학적 공정을 적용하여 특정 ginsenoside의 함량을 증가시키는 연구는 국내·외적으로 많은 연구가 이미 진행
- 그러나, 인삼에 함유된 다양한 생리활성 물질들을 조절하여 특정 효능을 강화할 수 있는 제어기술 필요.

□ 인삼 재배 및 가공 부산 폐기물을 이용한 기능성 강화 제품 개발 필요

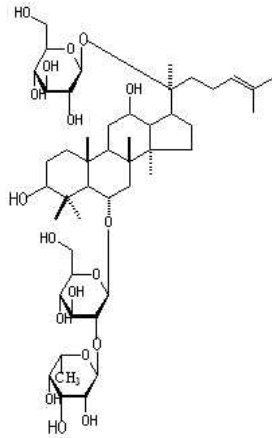
- 인삼 열매는 과중하여 인삼의 번식에 사용하기 위하여 채종할 때, 폐기되는 인삼재배 부산물로서 이를 이용한 기능성 강화 제품 개발은 농민의 소득 증대에 기여할 뿐만 아니라, 인삼산업의 친환경 산업 전환에 기여함.
- 2011년 한국 인삼재배면적이 17,601 ha (53,243,025평)로 채종하는 인삼재배면적은 전 재배면적의 약 20%로서 10,648,605평이며, 건조한 인삼열매는 300평당 약 16 kg 얻을 수 있으므로 전국적으로 1년에 약 567,925 kg을 얻을 수 있다. (농림수산식품부 원예산업 과 2011년 인삼통계자료)



인삼 열매

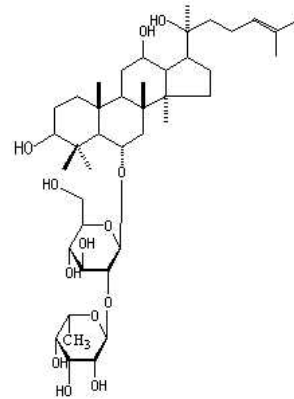
- 인삼 열매에는 항염, 항당뇨 등 생리활성이 확인된 ginsenoside Re 가 약 1.7%의 높은 농도로 존재하는 것을 확인 [Food Sci. Biotechnol. 17(6), 1379-1382, 2008] 됨으로써 고 기능성 신소재로서 가능성 나타냄.
- 인삼 열매의 ginsenoside Re 는 물리화학적 가공에 의해서 ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, F<sub>4</sub> 등 활성 사포닌으로 전환될 수 있음.

### Saponin glycoside



Ginsenoside Re

### prosapogenin



Ginsenoside Rg2

Treatment  
(acid, heat)

○ 본 연구는 초음파와 식초를 동시에 처리함으로써 물리화학적 융합 방법으로 보다 효율적인 화학전환 기술을 개발하는 것으로 대형 추출장치에 초음파 장치를 도입함으로써 공업적 제조 공정에 사용 가능함.

○ 천연의 인삼 열매의 주성분은 ginsenoside Re 인 반면, 본 과제의 소재인 초음파 처리 인삼열매 조성물은 ginsenoside Rh1, Rg2, F4 를 주성분으로 하는 새로운 신소재[초음파 처리를 이용한 인삼 프로사포게인 고농도 함유 인삼 열매 제제 및 이의 제조방법 (출원번호 : 10-2011-0141998), 출원일 : 2011년 12월 26일]로서 천연의 인삼 열매를 주소재로 하는 ‘인삼열매 추출물을 함유하는 간기능 개선용 조성물’ 특허와는 현저한 차별성이 있음.

### 1-3. 연구개발 범위

#### 가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

##### - 연구목표

- 초음파 처리 인삼열매 조성물을 이용한 간기능 개선 건강기능식품 개발

##### - 연구내용

(1세부) 기능성 강화 인삼 열매 조성물 개발 및 안전성시험

- 초음파 처리 인삼열매 조성물의 성분 분리 분석
- prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼열매 조성물 개발
- 초음파 처리 인삼열매 조성물 제조공정 표준화
- 초음파 처리 인삼열매 조성물의 안전성(독성) 시험
- 초음파 처리 인삼열매 조성물 시제품 제작
- 초음파 처리 인삼열매 조성물 간기능개선 개별인정형 건강기능식품 허가서류 제출

(1협동) 초음파 처리 인삼열매 조성물의 생리활성 시험

- 초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 생리활성 시험

(2협동) 초음파 처리 인삼열매 조성물의 인체적용 시험

- 초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 인체적용 시험

##### - 산업화 방안

- 2차년도에 작용기전 연구를 위하여 prep-LC와 HSCCC법을 이용하여 성분을 대량으로 분리하는 목적으로만 실험실적으로 사용하며, 산업화의 경우는 1, 2차년도 개발한 기능물질 (ginsenoside Rg2, Rh1, F4) 고농도 함유 조성물을 3차년도 생산공정 최적화를 통하여 대량 제조함.



나. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

구분	세부과제	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2013)	1세부	prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼열매 조성물 개발 독성시험(단회 및 유전독성시험)	○ 추출 조건 별 성분 분석(GC, HPLC) ○ ultrasonication 처리 조건에 따른 성분 분석(GC, HPLC) ○ 인삼열매의 시기별, 지역별 성분 함량 및 생산량 검토 ○ 독성시험(단회, 유전독성시험, GLP 독성연구기관인 (주)바이오독스텍에 시험의뢰함)
	1협동	간염 및 지방간, 소화기능 향상에 효과가 우수한 인삼열매 조성물을 세포수준 및 정상동물 모델에서 스크리닝	○ 유효 성분군을 처리한 후 손상된 간 세포의 회복 정도 측정(ALT, AST) ○ 유효 성분군을 처리한 동물에서 간 상해의 회복 정도를 확인하기 위해 혈청 AST, ALT, Billirubin 레벨을 측정하고 간 조직의 morphology를 관찰 ○ 식도 LES, 위장관, 소장 평활근 세포 단리 실험을 통한 운동성 평가
2차년도 (2014)	1세부	기능성 성분 대량 분리 동정	○ prosapogenin 성분(ginsenoside Rh1, Rg2, F4) 각 1,000mg 씩 분리 화학구조 동정
		농약 검사	○ 인삼열매 조성물의 농약 검사
		CRO 업무	○ 시험계획서 작성, 증례기록지(CRF)작성 및 IRB서류 작성 및 접수
	1협동	인삼열매 조성물 및 지표성분을 대상으로 간염 및 지방간, 소화기능 지연 동물 모델에서 약효 및 기전 규명	○ 조성물 및 지표성분을 투여받은 동물모델에서의 간 세포상해 관련인자를 DNA, RNA 레벨에서 측정해 기전 탐색 ○ 조성물 및 지표성분을 투여받은 동물모델에서 평활근 장력 시험 및 위장관 운동성 평가 ○ 조성물 및 지표성분을 투여받은 동물모델에서 위 배출 능력, 위장관 이동 능력 평가 및 지연된 위 배출 능력, 위장관 이동 능력의 회복 정도 평가
2협동	인체시험 준비	○ 자료 검토 및 전략 수립 - 간보호 기능의 규명에 의한 인체 시험 전략 수립 ○ Protocol과 CRF의 작성 및 IRB 통과 ○ 피험자 모집 - 60명 기준, 비알코올성 간손상자, 이중맹검법 - AST40~120, ALT45~135, Y-GTP 60~180 IU/L 대상	

3차년도 (2015)	1세부	<p>제조공정 표준화</p> <p>시제품제작</p> <p>개별인정형 제출서류 작성</p> <p>CRO 업무</p> <p>반복독성시험</p>	<p>○ 1차년도에서 확립된 기능 강화 조성물에 대한 초임계추출 등 제조공정 도입으로 지표성분 함량 강화할 수 있는 대량생산공정확립 및 체계구축</p> <p>○ HPLC 분석 : HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system (Waters, 미국)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18 (250*3mm, 독일)을 사용한다. 이동상은 acetonitrile (HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17 %에서 30 % (55분), 40 % (80분) 그리고 60 % (135분)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절한다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출함.</p> <p>○ 지표물질 대상 성분 : ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rf, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>5</sub>, Rg<sub>6</sub>, Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>4</sub>, Rk<sub>1</sub>, Rk<sub>3</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>4</sub></p> <p>○ 성분 표준화(HPLC)</p> <p>○ 성분조사를 통해 표준물질을 선정하여 주성분에 대한 정확성, 정밀성, 직선성이 확보되는 분석법 개발</p> <p>시제품 제작</p> <p>개별인정형 제출서류 작성</p> <p>○ 개시미팅, 모니터링(10회), close out방문, CRF 수거 및 자료 입력(Excel), Query 발생 및 resolution, 통계분석, 결과보고서 작성</p> <p>○ 반복투여 독성 시험 (설치류)</p> <p>시험목적 : 설치류에서의 시험물질을 반복해서 투여할 때 나타나는 독성변화를 용량 및 시간의 경과에 따라 파악하여 시험물질의 안전성을 평가하고 회복성시험을 통해 독성의 가역성을 평가함을 그 목적으로 함.</p>
	2협동	인체적용시험	<p>○인체시험 - 2차년도 24명 3차년도 50명 총 74명을 대상으로 인체적용시험 실시</p> <p>-추출물의 복용과 감마 GT, ALT, AST등의 검사항목 조사</p> <p>○Data입력과 통계분석</p>

## 2. 국내외 기술개발 현황

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### ○ 인삼열매제품 기술현황

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 식의약으로 오래전부터 사용하여온 생약으로 인삼사포닌, 단백질, 다당체, 폴리아세틸렌, 페놀성 물질 등을 함유한다. 특히, 인삼사포닌은 주요한 생리활성물질로서 ginsenoside라고 불리우고, 다양한 약리작용이 보고되었다<sup>1-4)</sup>. 또한, 인삼열매에는 ginsenoside Rb1, Rb2, Rd, Re, Rg1, Rg2 그리고 Rh1<sup>5)</sup>을 함유하고, 항당뇨작용<sup>2)</sup>, 항비만작용<sup>6)</sup>, 항노화작용<sup>7)</sup>, 항스트레스작용<sup>8)</sup>, 항알러지작용<sup>9)</sup>, 항암작용<sup>10)</sup> 등이 보고되었다. 그중에서도, ginsenoside Re는 건조된 인삼열매의 약 6% 정도 함유 되어있는 주성분으로 물리화학적 가수분해에 의하여 ginsenoside Rg2와 Rh1과 같은 생리활성 강화 성분으로 화학전환될 수 있다<sup>5)</sup>. 한편, Wu 등<sup>11)</sup>은 인삼에 초음파처리를 통하여 인삼사포닌을 3배 빠르게 추출할 수 있다고 보고하였고, 곽 등<sup>12)</sup>은 인삼화퇴에 식초를 가하고, 100℃에서 초음파처리 함으로써, prosapogenin 성분 고농도 함유 조성물 제조에 대하여 보고하였다.

#### ○ 인삼제품 생산현황

우리나라 2014년 인삼생산량은 20,978톤이며 소비형태를 보면, 수삼으로 7,487(35.7%)로 소비되었고 뿌리 삼으로 13,491톤이 가공되었으며, 이 중 홍삼 12,651톤, 백삼 742톤 그리고 태극삼 98톤으로 각각 가공되었다. 총 인삼생산량 중 8,362톤이 인삼제품으로 가공되었으며, 홍삼제품 6,287톤, 백삼제품 291톤으로 각각 가공되었다. 이 중 본삼류 검사실적은 총 772톤으로 홍삼이 443톤으로 전체의 약 57.3%를 차지하고 있으며, 백삼 237톤, 태극삼 79톤, 그리고 흑삼 13톤으로 각각 검사되었다.

한국인삼제품공업협회 자료에 따르면 2013년 인삼 제품류 총 생산량은 34,722M/T이고 총 생산액은 200,598백만원이다. 이 중 백삼 제품류 총 생산량은 4,194M/T으로 전체 12.1%를 차지하고 있으며 총 생산액은 15,534백만원으로 전체 7.8%를 차지하고 홍삼 제품류에 비해 상대적으로 적은 점유율을 나타내고 있다. 2013년 홍삼 제품류 생산 총 생산량은 30,528M/T으로 전체 87.9%를 차지하고 있으며 총 생산액은 185,064백만원으로 전체 92.2%를 차지하고 있어 백삼 제품류에 비해 상대적으로 많은 점유율을 나타내고 있다. 이는 2000년대부터 홍삼의 소비가 꾸준히 증가한 결과이다.

우리나라 전체 인삼제품 생산량에 대한 통계 조사가 현실적으로 어렵다. 법으로 금지하고 있지만 본삼류의 미검사품이 유통되고 있고 인삼가공제품에 대해서는 1996년 인삼 전매제 폐지 이후 누구나 홍삼제품을 생산 할 수 있어 현실적으로 전체 생산량을 파악하기가 어렵다. 그러므로 인삼산업 구조와 시장동향 분석에 어려움이 많다.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

[Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, F<sub>4</sub> 등의 홍삼 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 초음파 처리 인삼열매 조성물 개발 및 대량 추출조건 최적화]

#### 가. Prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼열매 조성물 개발

##### 1. 실험재료

본 연구에 사용한 인삼열매(Ginseng berry, *Panax ginseng*)는 충청북도 음성에서 2013년 7월 20일에 4년근 인삼열매 10kg을 채집하였고, 건조는 음성의 충북인삼영농조합법인(대표 : 남성엽)에서 시행하였다.

얻은 시료를 대상으로 조건별로 100℃에서 초음파 처리후, 인삼의 사포닌함량을 비교 검토하였다. 각각의 제품표본은 고연 연구실에 보관하고 있다. (Fig. 1.)



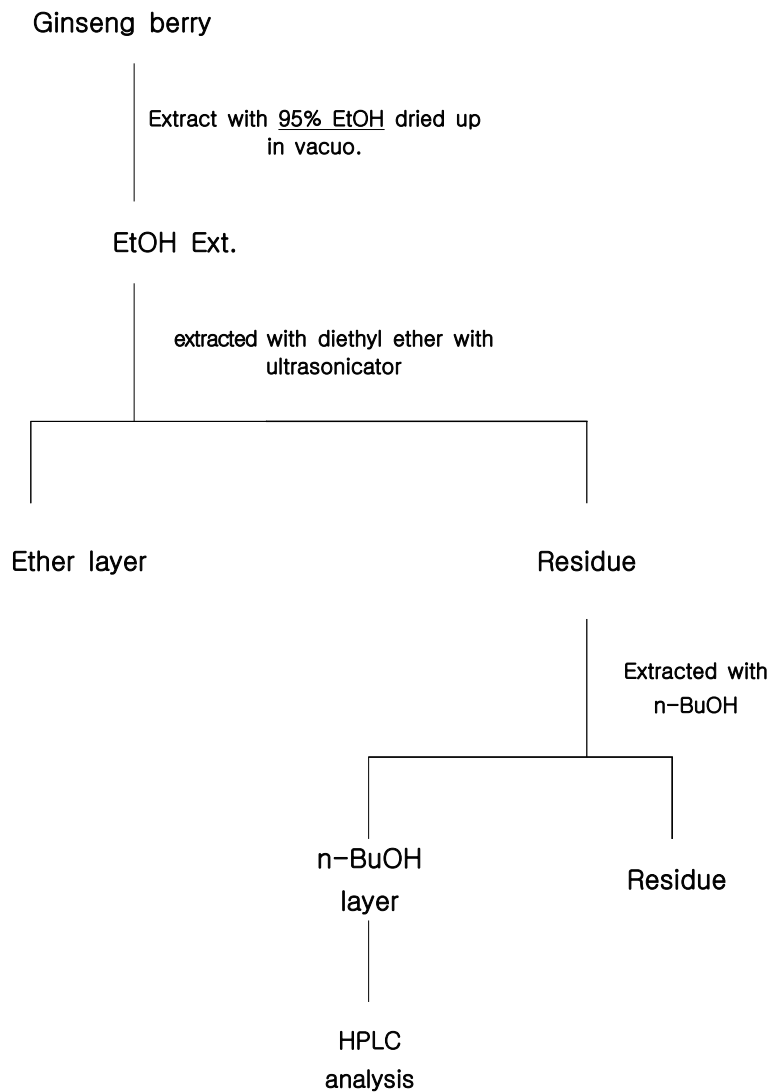
Fig. 1. Photograph of Korean ginseng berry

##### 2. 초음파 처리 인삼열매 조성물 조제

인삼열매 건조물 각각 200g에 Ethyl alcohol 2,000ml를 가하여 2회 환류 추출후 여과하여 감압농축하여 Ethyl alcohol 엑스를 얻었다. 얻은 에탄올 엑스 1g에 증류수 200ml를 가하여 초음파발생기에 넣고, 00℃에서 1, 3, 5, 7, 9 그리고 10분씩 초음파 처리를 각각 1회씩 시행하였다.

### 3. 조사포닌(crude saponin) 조제

Scheme. 1에서 보는바와 같이 초음파 처리 조성물 각 2g에 diethylether 50ml를 가하여 1시간씩 3회 초음파 세정기(고도기업, 4020P, 한국)로 추출한후, 원심분리하여 상등액을 제거한다. 얻은 잔사에 수포화 butanol 50ml를 가하여 2시간씩 3회 추출하고, 원심분리하여 상등액을 취하여 여과하고, 감압농축을 하여 조사포닌을 얻는다.



Scheme. 1. Fractionation of crude saponin

#### 4. HPLC-ginsenoside의 분석

위에서 얻은 엑스를 고 등의 조건을 응용하여 HPLC를 실시하고, 상법에 따라 표품과 직접 비교하여 인삼사포닌의 함량 및 조성을 각 시료당 3회 반복 실험하여 결과의 재현성을 확인하여 분석하였다. 표품은 Chromadex (U.S.A.)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside를 사용하였다.

사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system (Waters, 미국)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18 (250\*3mm)를 사용하였다.

이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17 %(0 min)에서 25 %(25 min), 40 %(50 min), 60%(105 min) 그리고 100 %(110 min)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

**Table 1. HPLC gradient elution on the separation for each of ginsenoside standards**

berry of <i>Panax ginseng</i> <sup>a)</sup>	Time	0	25	50	105	110	120	125	135
	%A	17	25	40	60	100	100	17	17

1) Mobile phase :

Solvent A - ACN

Solvent B - water

2) Flow rate : 0.8 ml/min

3) Column : a - Eurospher 100-5 C18 (Knauer, 3×250mm, Germany), b - Eurospher 100-5 C18 (Knauer, 3×250mm, Germany)

4) Detector : Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.)

## 5. 결과 및 고찰

Table 3에서와 같이 조 사포닌의 양에 있어서 UGB-4가 43.45%이었으며 UGB-3이 42.20%이었으며, UGB-8이 39.90%로서 초음파 4시간 처리 인삼열매 조성물의 조 사포닌 함량이 높게 측정되었다.

각 ginsenoside의 총합인 총 사포닌(total saponin) 함량에 있어서는 Table 4에서 보는 바와 같이 UGB-6이 61.760%이었으며 UGB-10은 53.009%이었으며, UGB-9는 50.652%로서 초음파 6시간 처리 인삼열매 조성물의 총 사포닌이 높은 함량을 보여주었다.

항알러지, 항암작용을 나타내는 Ginsenoside Rh<sub>1</sub>에 있어서는 UGB-10이 15.872%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, UGB-9(15.105%), UGB-5(14.681%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 항암, 항당뇨, 혈압강하, 항산화 등 기능성을 나타내는 Ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 경우, UGB-6가 13.632%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UGB-10(13.055%), UGB-9(11.642%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

주름개선, 항혈전작용을 나타내는 Ginsenoside Rg<sub>2</sub>의 함량에 있어서는 UGB-10이 6.240%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UGB-6(5.973%), UGB-9(5.863%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 또한, ginsenoside F<sub>4</sub>에 있어서는 UGB-10가 2.748%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, UGB-9(2.502%), UGB-6(2.501%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

## 6. 결론

본 연구는 Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>3</sub>, Rg<sub>2</sub> 그리고 F<sub>4</sub> 등의 인삼의 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 조성물을 개발하여 기능성 식품의 핵심 원료 소재 획득을 목표로 하였다. 이의 일환으로 농림 부산 폐기물인 인삼 열매에 물리화학적 가공 방법의 하나로서 초음파를 가하여 초음파 처리를 함으로써 인삼사포닌 배당체를 인삼 prosapogenin으로 전환하여 HPLC법으로 검토했다.

그 결과, 인삼열매 조성물에서는 10시간 초음파 처리시 ginsenoside Rh<sub>1</sub>이 15.872%, 6시간 초음파 처리시 ginsenoside Rg<sub>3</sub>가 13.632%로 고농도 함유를 보여주었다.

이와 같은 결과를 검토해 보면, 인삼 열매를 이용한 초음파 처리 prosapogenin 고농도 함유 조성물은 기능성 식품의 기능성 강화 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료되며, 향후, 본 조성물을 이용한 새로운 기능성 제품의 개발이 기대되고 있다.

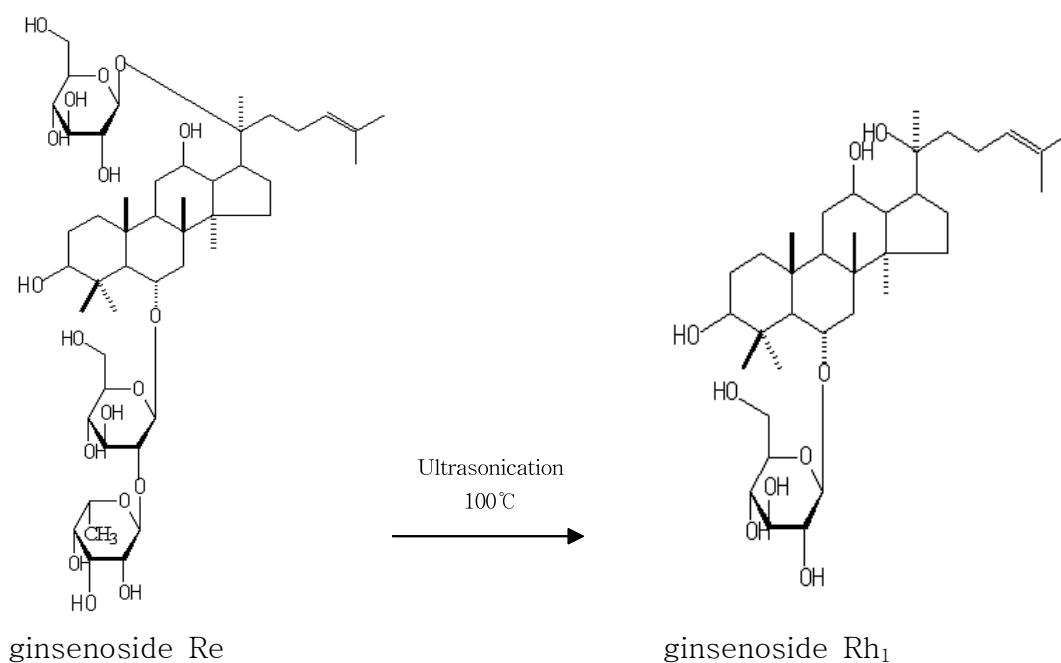
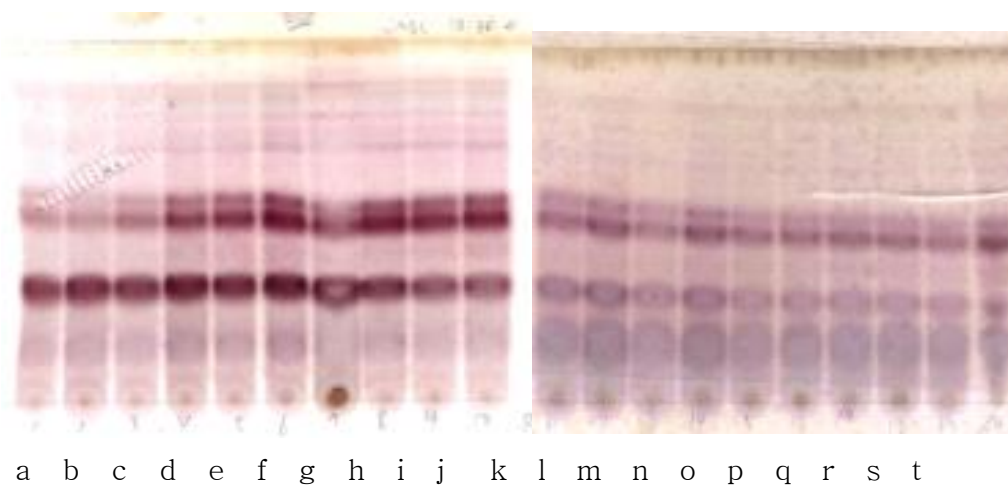


Fig. 2. Transformation of protopanaxatriol saponin ginsenoside Re to ginsenoside Rh<sub>1</sub>



\* a : UGB-1, b : UGB-2, c : UGB-3, d : UGB-4, e : UGB-5, f : UGB-6, g : UGB-7, h : UGB-8, i : UGB-9, j : UGB-10, k : UGB-11, l : UGB-12, m : UGB-13, n : UGB-14, o : UGB-15, p : UGB-16, q : UGB-17, r : UGB-18, s : UGB-19, t : UGB-20

Fig 3. TLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts (UGB)



Table 2. The processing conditions of various ultrasonication on ginseng berrys extracts

(%)	
samples	Times (hours)
UGB-1	1
UGB-2	2
UGB-3	3
UGB-4	4
UGB-5	5
UGB-6	6
UGB-7	7
UGB-8	8
UGB-9	9
UGB-10	10
UGB-11	11
UGB-12	12
UGB-13	13
UGB-14	14
UGB-15	15
UGB-16	16
UGB-17	17
UGB-18	18
UGB-19	19
UGB-20	20

Table 3. Content of Crude Saponins in ginseng berrys extracts

(%)

samples	crude saponins
UGB-1	27.50
UGB-2	38.50
UGB-3	42.20
UGB-4	43.45
UGB-5	40.10
UGB-6	36.60
UGB-7	32.85
UGB-8	39.90
UGB-9	32.60
UGB-10	37.05
UGB-11	7.89
UGB-12	7.18
UGB-13	7.31
UGB-14	8.94
UGB-15	8.485
UGB-16	10.12
UGB-17	10.01
UGB-18	9.30
UGB-19	8.84
UGB-20	10.22

Table 4-1. The ginsenoside composition of the ultrasonication processed ginseng berry extracts over time

Ginsenosides	Ginseng berry									
	UGB-1	UGB-2	UGB-3	UGB-4	UGB-5	UGB-6	UGB-7	UGB-8	UGB-9	UGB-10
Rb <sub>1</sub>	0.761±0.171	0.729±0.098	0.790±0.010	0.897±0.407	0.623±0.226	0.678±0.083	0.134±0.018	0.509±0.073	0.414±0.007	0.454±0.067
Rb <sub>2</sub>	1.629±1.093	3.320±0.171	3.504±0.357	3.945±0.781	3.201±0.157	3.652±0.451	1.016±0.011	2.766±0.359	2.623±0.285	2.372±0.170
Rc	0.607±0.713	0.407±0.188	0.455±0.196	0.667±0.250	0.547±0.104	0.540±0.079	0.228±0.007	0.525±0.044	0.542±0.032	0.622±0.022
Rd	1.398±0.092	3.217±0.095	3.463±0.268	3.847±0.635	3.199±0.122	3.855±0.410	1.140±0.004	2.724±0.079	2.704±0.059	2.659±0.095
Re	13.030±1.767	11.480±0.963	10.915±0.694	11.937±0.818	9.353±0.797	9.759±0.786	3.789±0.060	6.079±0.318	5.635±0.222	4.796±0.199
Rf	0.483±0.160	0.413±0.306	0.484±0.195	0.655±0.446	0.427±0.329	0.517±0.188	0.080±0.003	0.389±0.176	0.361±0.036	0.437±0.177
Rg <sub>1</sub>	0.689±0.339	0.711±0.409	0.794±0.463	0.925±0.634	0.750±0.448	0.932±0.614	0.209±0.013	0.429±0.302	0.375±0.181	0.569±0.386
Rg <sub>2</sub>	1.780±0.078	2.241±0.100	3.162±0.067	4.271±0.658	4.444±0.071	5.973±0.364	2.323±0.033	5.613±0.043	5.863±0.040	6.240±0.109
Rg <sub>3</sub>	4.965±4.014	5.412±4.366	6.900±5.600	9.116±7.503	8.871±7.193	13.632±11.154	1.861±0.031	10.869±8.785	11.642±9.383	13.055±10.577
Rg <sub>5(e)</sub>	0.119±0.016	0.178±0.017	0.488±0.501	0.193±0.142	0.298±0.057	0.418±0.052	0.199±0.003	0.397±0.075	0.444±0.105	0.478±0.093
Rg <sub>5(z)</sub>	0.291±0.042	0.383±0.071	0.568±0.123	0.470±0.351	0.783±0.160	1.095±0.104	0.513±0.035	1.040±0.258	1.071±0.173	1.253
Rg <sub>6</sub>	0.135±0.029	0.206±0.043	0.317±0.078	0.313±0.259	0.525±0.095	0.729±0.165	0.263±0.007	0.683±0.127	0.728±0.121	0.777±0.153
Rh <sub>1</sub>	7.847±1.014	8.257±0.442	10.488±0.895	13.400±2.273	13.151±0.423	16.806±1.754	6.808±0.085	14.681±0.693	15.105±0.280	15.872±0.446
Rh <sub>4</sub>	0.022±0.0017	0.058±0.019	0.092±0.015	0.073±0.060	0.122±0.018	0.171±0.028	0.064±0.002	0.164±0.025	0.183±0.017	0.183±0.020
Rk <sub>1</sub>	0.079±0.011	0.095±0.017	0.078±0.055	0.110±0.084	0.195±0.042	0.276±0.014	0.116±0.009	0.242±0.053	0.266±0.056	0.295±0.070
Rk <sub>3</sub>	0.013±0.006	0.031±0.009	0.048±0.006	0.030±0.035	0.054±0.023	0.090±0.004	0.039±0.001	0.085±0.006	0.093±0.008	0.102±0.007
F <sub>1</sub>	0.176±0.051	0.121±0.027	0.149±0.010	0.164±0.061	0.122±0.027	0.137±0.029	0.048±0.005	0.110±0.013	0.102±0.018	0.096±0.017
F <sub>4</sub>	0.429±0.024	0.664±0.002	1.110±0.037	1.021±0.766	1.775±0.034	2.501±0.223	1.239±0.010	2.312±0.043	2.502±0.024	2.748±0.139
Total ginsenosides <sup>a)</sup>	38.372	37.921	43.805	52.033	48.491	61.760	20.068	49.619	50.652	53.009

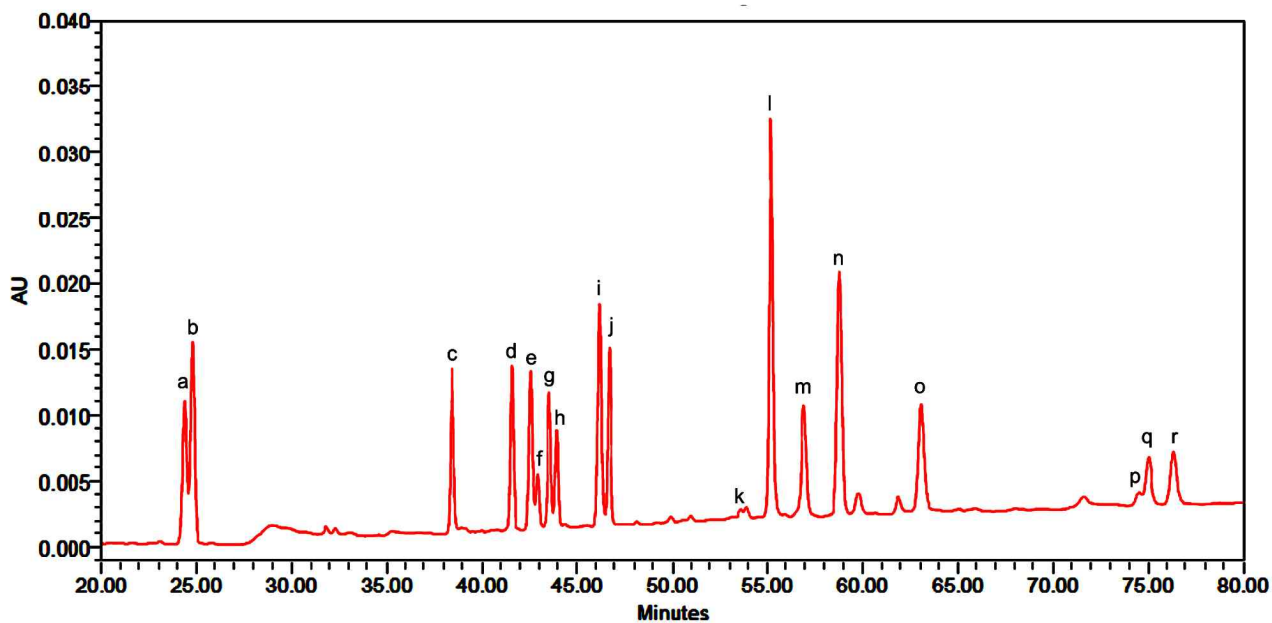
a) Sum of individual ginsenoside contents  
 Values represent the mean±S.E. (n=3)

Table 4-2. The ginsenoside composition of the ultrasonication processed ginseng berry extracts over time

Ginsenosides	Ginseng berry									
	UGB-11	UGB-12	UGB-13	UGB-14	UGB-15	UGB-16	UGB-17	UGB-18	UGB-19	UGB-20
Rb <sub>1</sub>	0.349± 0.049	0.300± 0.055	0.315± 0.059	0.294± 0.011	0.215± 0.048	0.206± 0.050	0.188± 0.034	0.153± 0.016	0.172± 0.009	0.182± 0.028
Rb <sub>2</sub>	1.629± 1.093	1.505± 0.990	1.599± 1.045	1.533± 0.974	1.121± 0.697	1.070± 0.658	1.048± 0.630	0.891± 0.528	0.915± 0.541	±0.922 ±0.504
Rc	0.607± 0.713	0.578± 0.700	0.608± 0.750	0.622± 0.733	0.448± 0.507	0.437± 0.454	0.423± 0.502	0.363± 0.416	0.368± 0.413	0.410± 0.401
Rd	1.398± 0.092	1.321± 0.031	1.398± 0.023	1.428± 0.004	1.074± 0.012	1.094± 0.040	1.040± 0.033	0.915± 0.025	0.944± 0.004	1.053± 0.030
Re	1.751± 0.050	1.481± 0.010	1.404± 0.021	1.302± 0.049	0.888± 0.088	0.999± 0.262	1.185± 0.054	0.722± 0.319	0.665± 0.283	0.554± 0.050
Rf	0.087± 0.004	0.076± 0.008	0.092± 0.024	0.081± 0.008	0.056± 0.002	0.059± 0.007	0.024± 0.007	0.037± 0.016	0.036± 0.008	0.042± 0.022
Rg <sub>1</sub>	0.206± 0.012	0.192± 0.010	0.194± 0.015	0.199± 0.033	0.146± 0.019	0.147± 0.065	0.110± 0.002	0.439± 0.275	0.436± 0.335	0.588± 0.334
Rg <sub>2</sub>	1.801± 0.064	1.801± 0.008	1.936± 0.034	2.113± 0.079	1.630± 0.028	1.820± 0.028	1.747± 0.073	1.640± 0.050	1.669± 0.019	2.026± 0.048
Rg <sub>3</sub>	4.8683. 939	4.872± 3.918	5.370± 4.314	5.900± 4.729	4.733± 3.800	5.290± 4.246	5.209± 4.185	4.887± 3.929	5.031± 4.058	6.688± 2.973
Rg5(e)	0.187± 0.050	0.189± 0.058	0.211± 0.071	0.237± 0.081	0.217± 0.090	0.223± 0.084	0.222± 0.105	0.200± 0.091	0.216± 0.105	0.180± 0.005
Rg5(z)	0.510± 0.156	0.529± 0.178	0.588± 0.200	0.657± 0.237	0.515± 0.181	0.573± 0.190	0.552± 0.213	0.510± 0.203	0.521± 0.203	0.448± 0.004
Rg6	0.234± 0.039	0.232± 0.029	0.249± 0.024	0.273± 0.024	0.209± 0.018	0.235± 0.023	0.220± 0.013	0.210± 0.015	0.209± 0.019	0.238± 0.021
Rh1	6.008± 0.094	5.863± 0.244	6.218± 0.274	6.621± 0.439	5.089± 0.338	5.502± 0.358	5.374± 0.477	4.753± 0.385	4.833± 0.417	5.712± 0.529
Rh4	0.061± 0.002	0.058± 0.005	0.056± 0.012	0.067± 0.005	0.048± 0.012	0.055± 0.009	0.041± 0.001	0.041± 0.001	0.040± 0.004	0.052± 0.005
Rk1	0.115± 0.034	0.117± 0. 038	0.128± 0.040	0.146± 0.049	0.117± 0.047	0.141± 0.064	0.135± 0.062	0.135± 0.082	0.122± 0.049	0.103± 0.002
Rk3	0.017± 0.003	0.018± 0.001	0.020± 0.001	0.028± 0.005	0.017± 0.003	0.020± 0.008	0.017± 0.004	0.015± 0.006	0.014± 0.001	0.018± 0.000
F1	0.017± 0.011	0.018± 0.005	0.016± 0.004	0.017± 0.003	0.010± 0.002	0.011± 0.008	0.003± 0.001	0.004± 0.002	0.017± 0.001	0.019± 0.007
F4	0.830± 0.021	0.819± 0.072	0.889± 0.066	0.966± 0.111	0.812± 0.025	0.903± 0.018	0.793± 0.110	0.745± 0.040	0.760± 0.055	0.870± 0.027
Total ginsenosides <sup>a)</sup>	20.675	19.969	21.291	22.483	17.345	18.790	18.330	16.661	16.967	20.104

<sup>a)</sup> Sum of individual ginsenosides contents

Values represent the mean±S.E. (n=3)



a : Ginsenoside Rg1, b : Ginsenoside Re, c : Ginsenoside Rf, d : Ginsenoside Rb1, e : Ginsenoside Rg2  
 f : Ginsenoside Rh1, g : Ginsenoside Rc, h : Ginsenoside Rb2, i : Ginsenoside F1, j : Ginsenoside Rd  
 k : Ginsenoside Rg6, l : Ginsenoside F4, m : Ginsenoside : Rk3, n : Ginsenoside : Rh4,  
 o : Ginsenoside Rg3, p : Ginsenoside Rk1, q : Ginsenoside Rg5(e), r : Ginsenoside Rg5(z)

Fig. 4. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the standard authentics

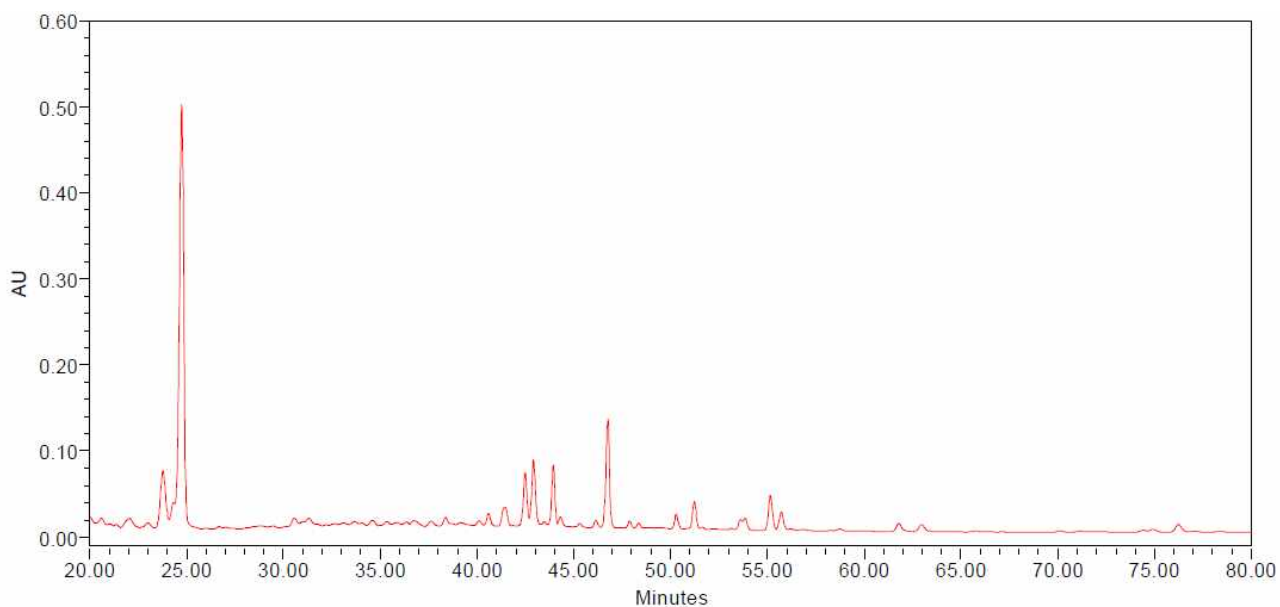


Fig. 5. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 1 hour (UGB-1)

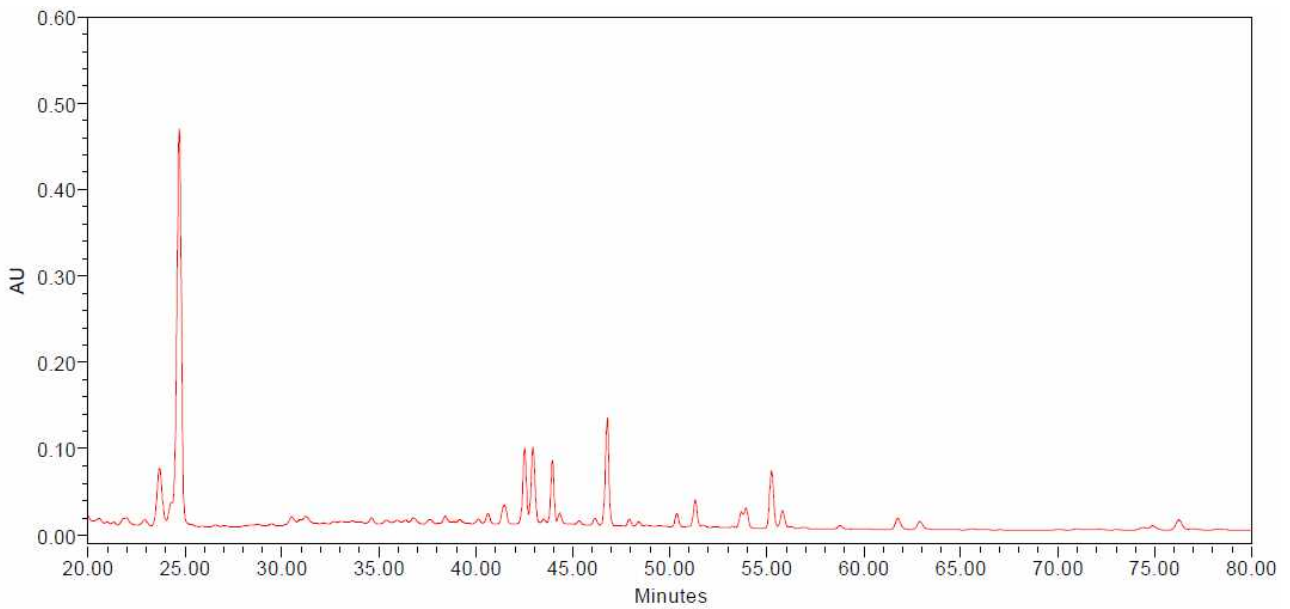


Fig. 6. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 2 hours (UGB-2)

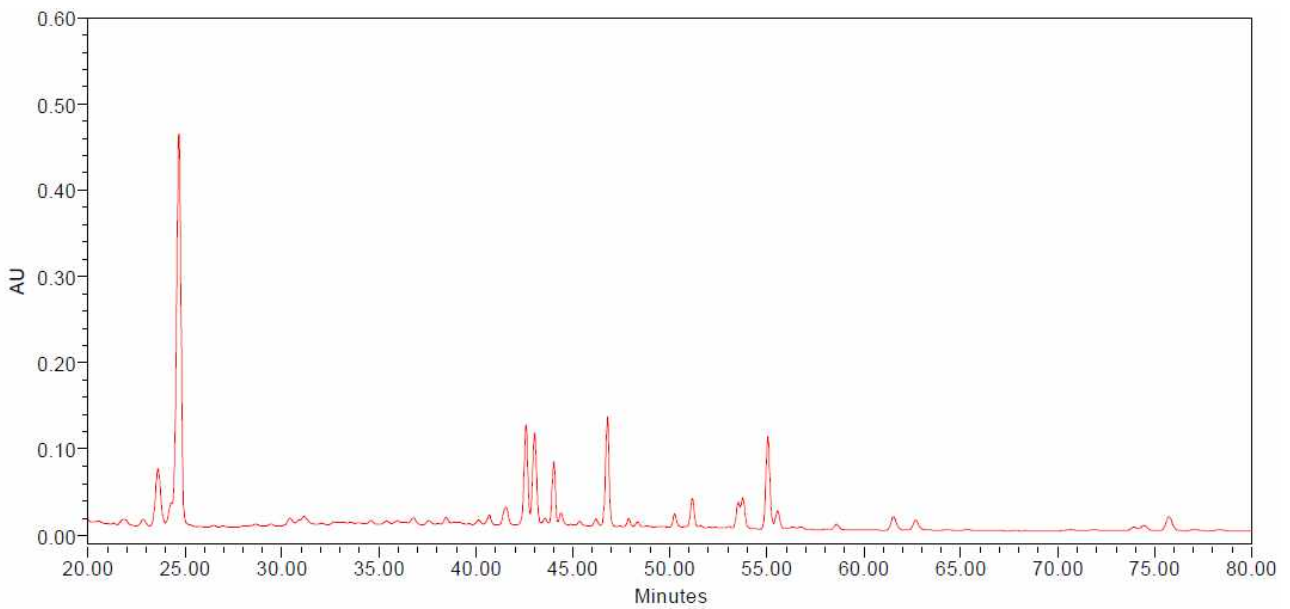


Fig. 7. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 3 hours (UGB-3)

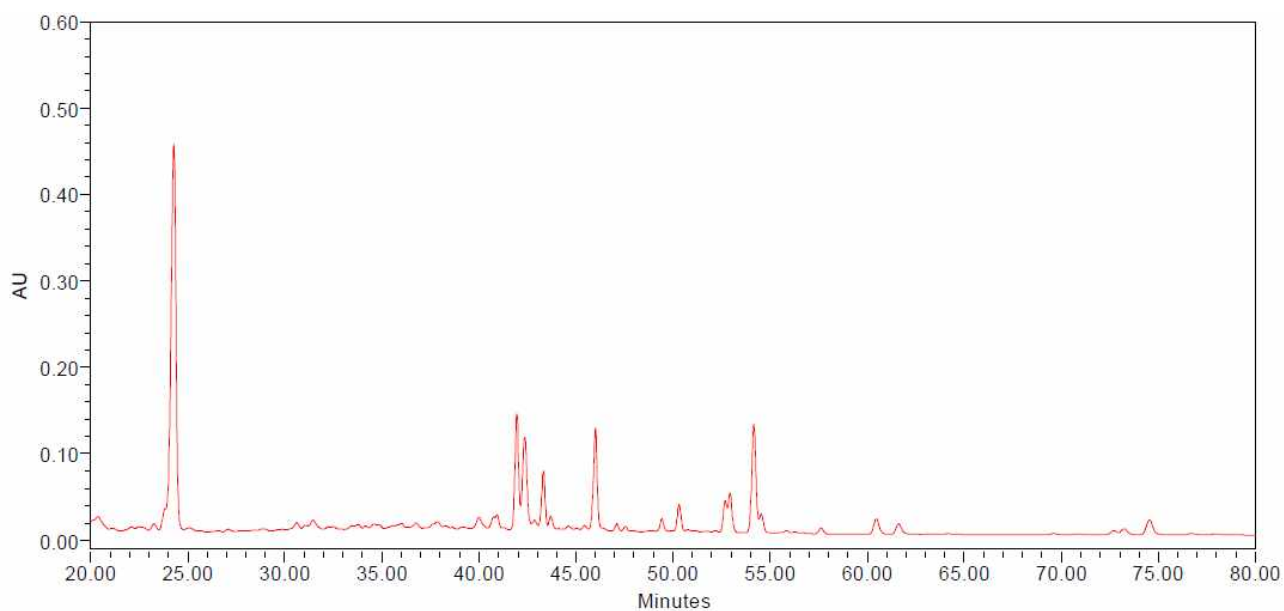


Fig. 8. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 4 hours (UGB-4)

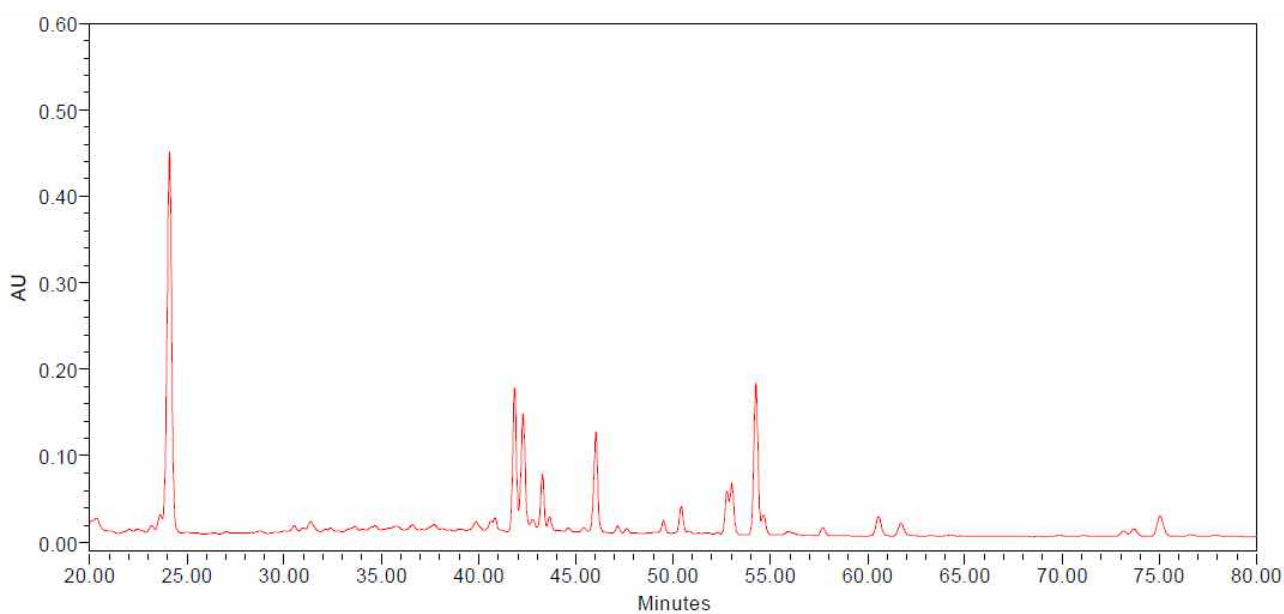


Fig. 9. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 5 hours (UGB-5)

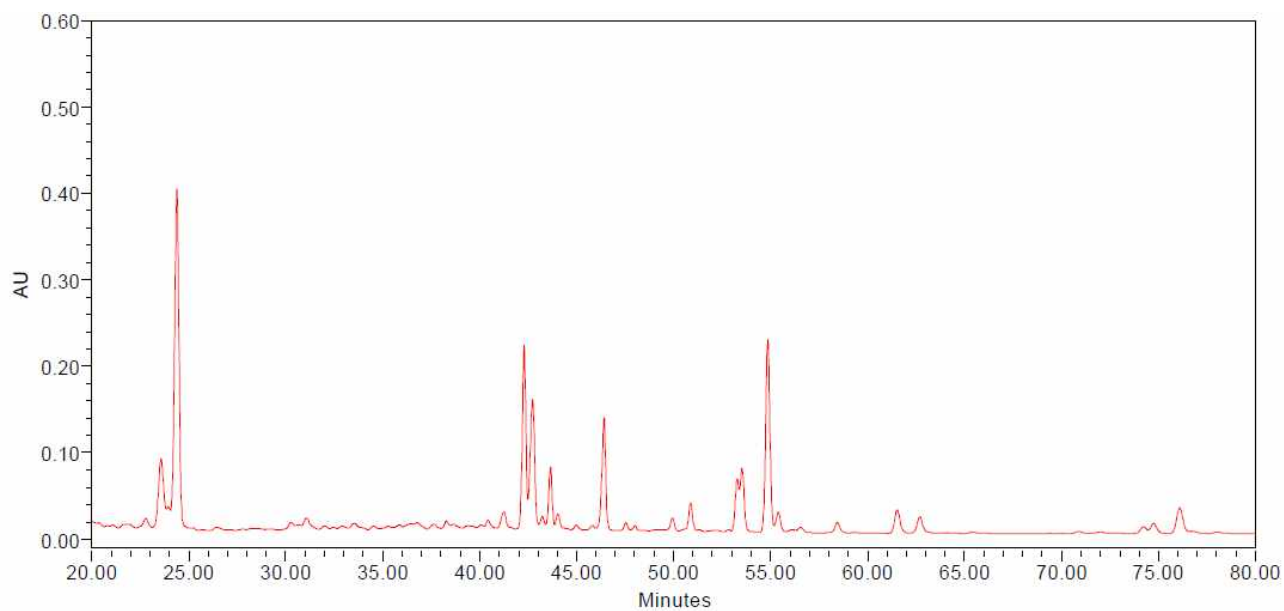


Fig. 9. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 6 hours (UGB-6)

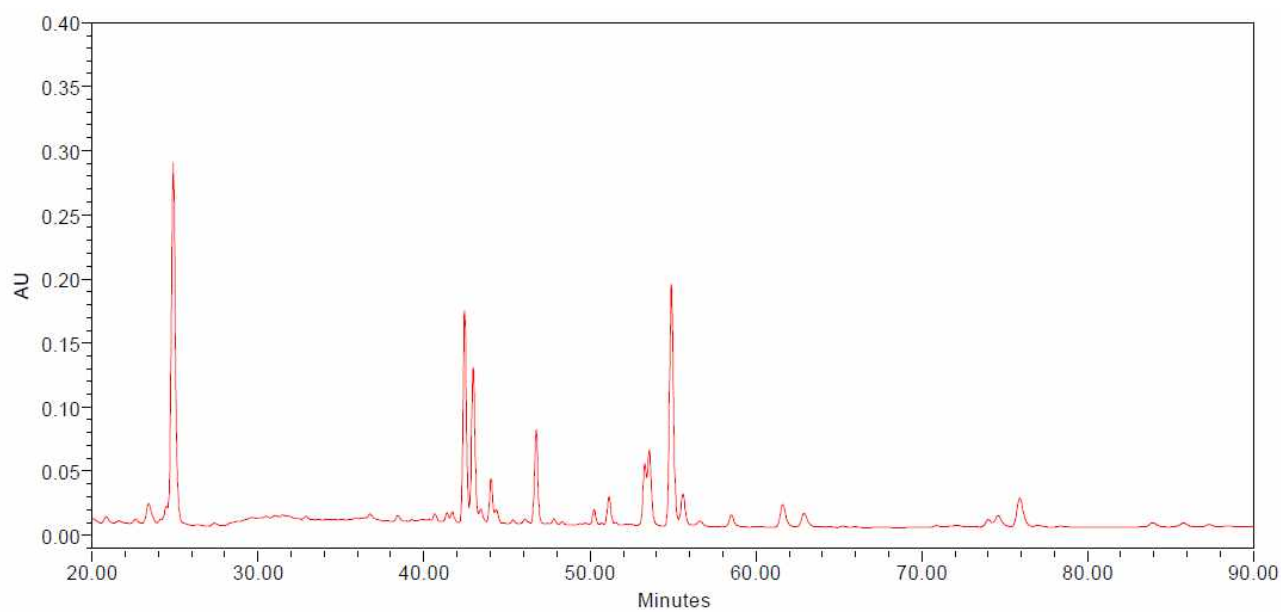


Fig. 10. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 7 hours (UGB-7)



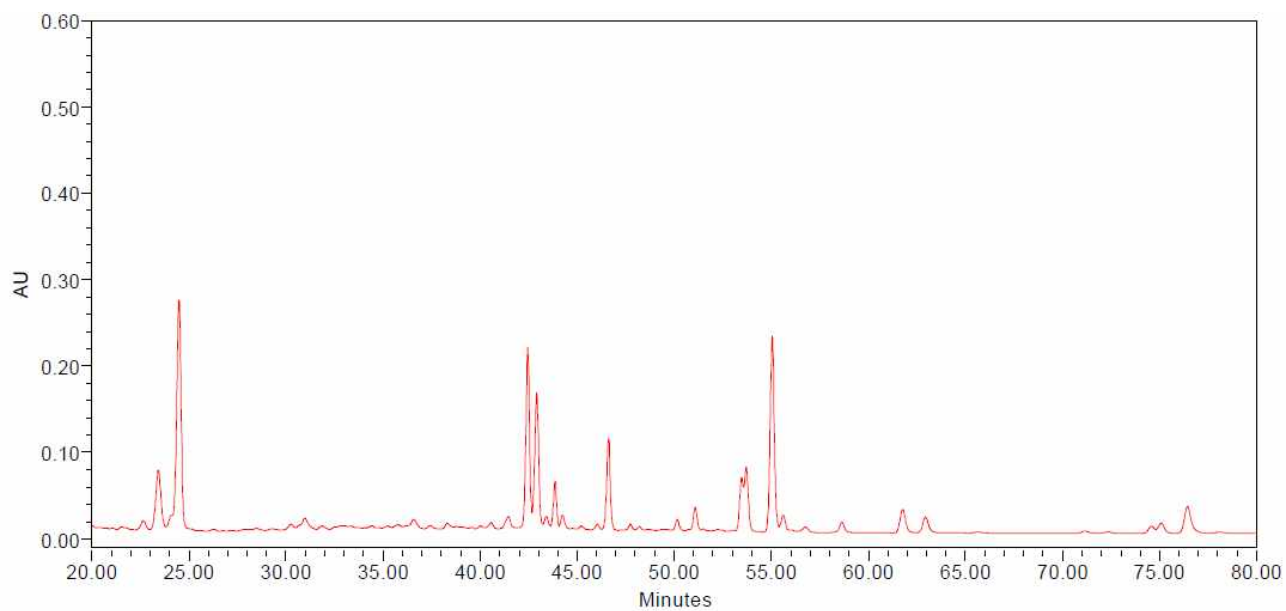


Fig. 11. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 8 hours (UGB-8)

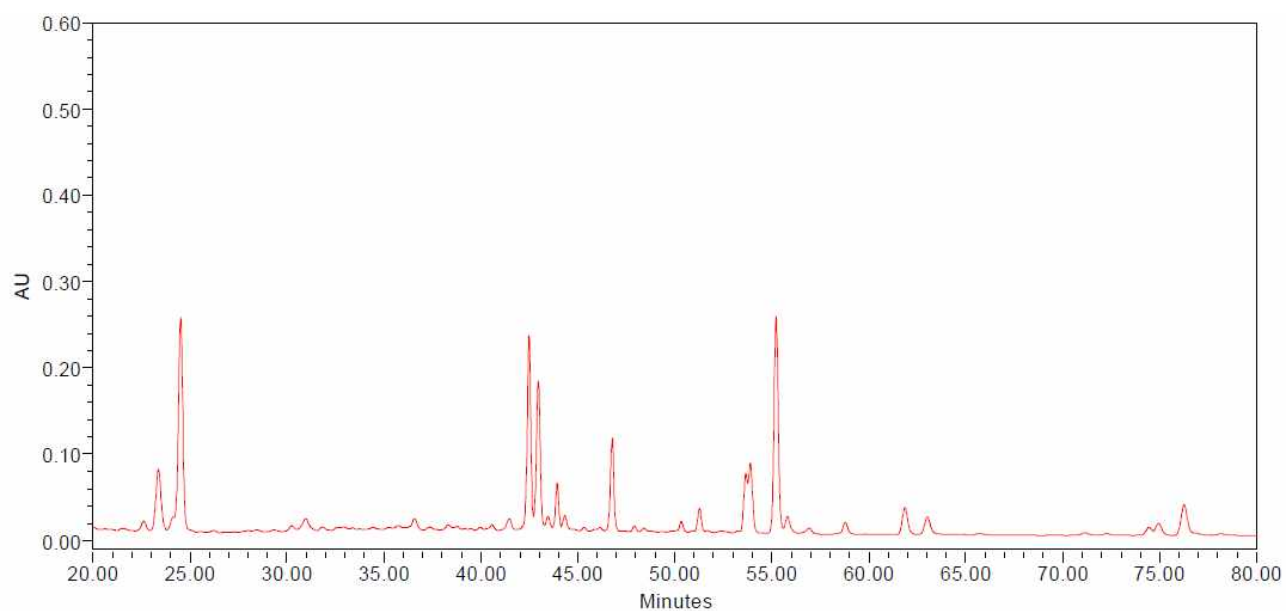


Fig. 12. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 9 hours (UGB-9)

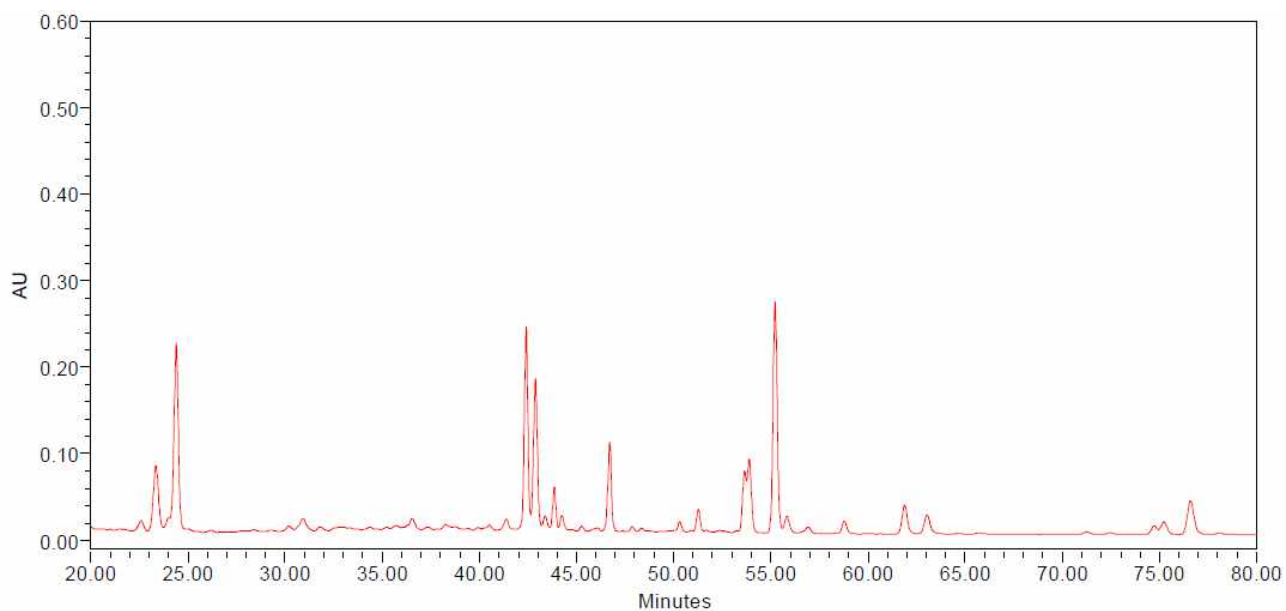


Fig. 13. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 10 hours (UGB-10)

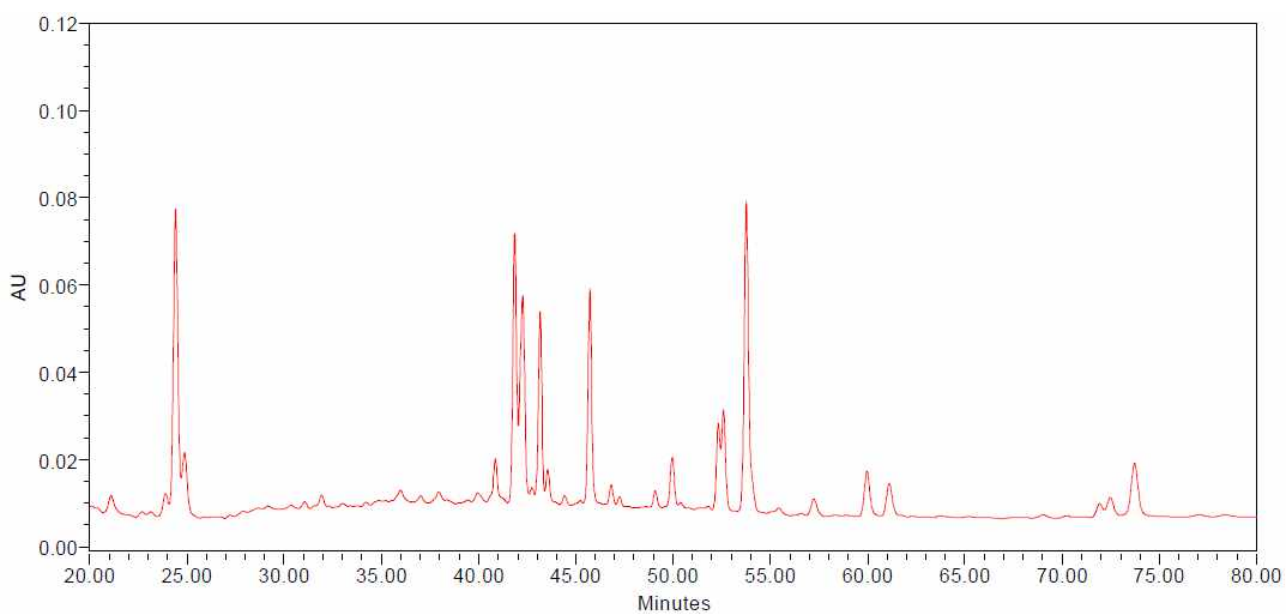


Fig. 14. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 11 hours (UGB-11)

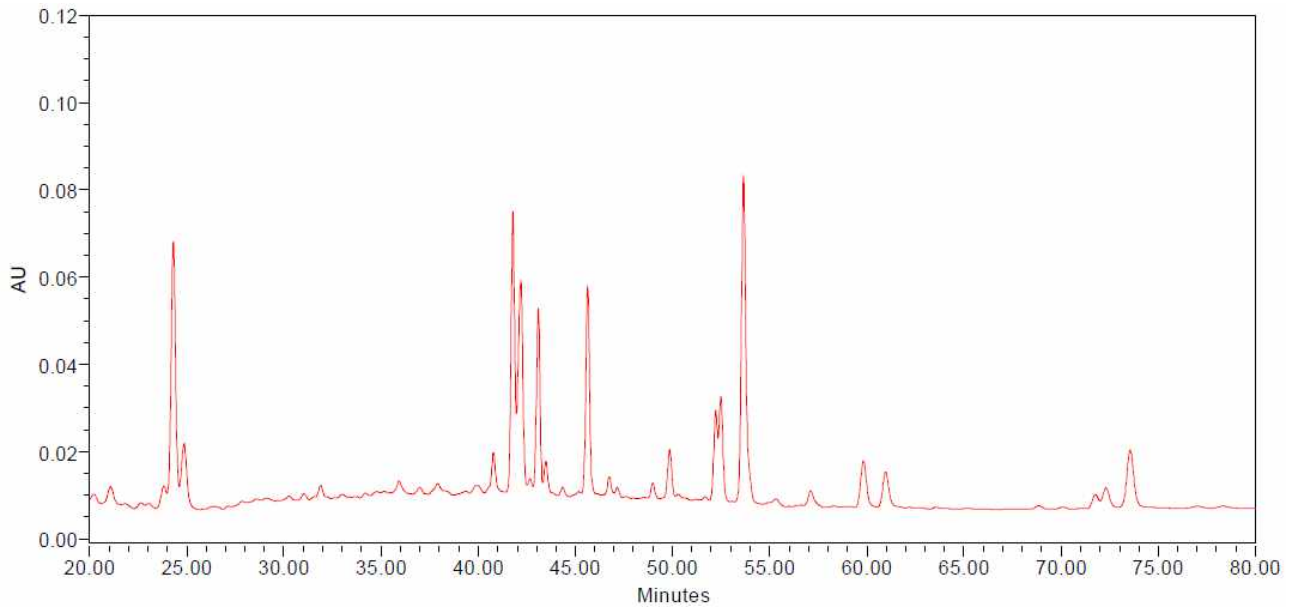


Fig. 15. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 12 hours (UGB-12)

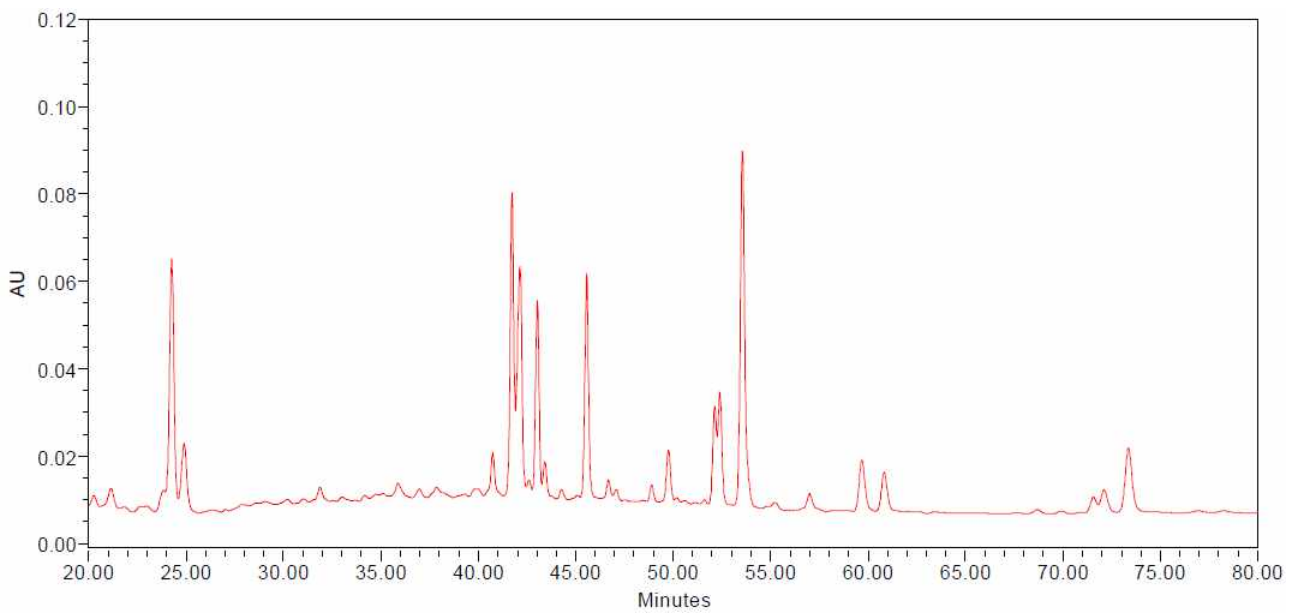


Fig. 16. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 13 hours (UGB-13)

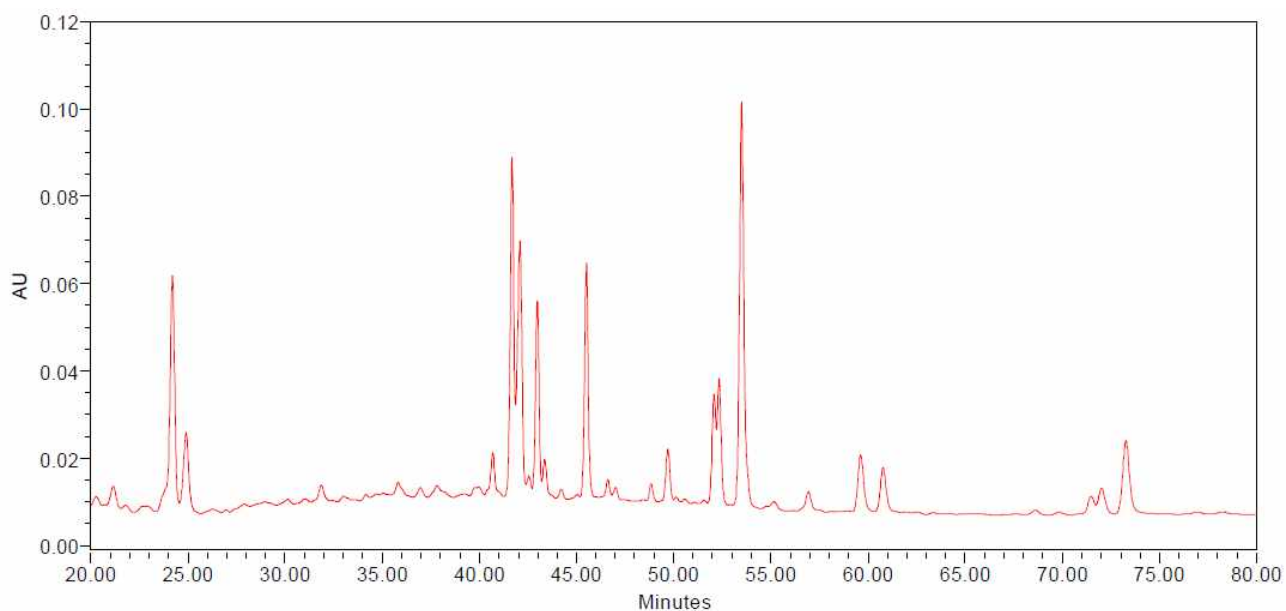


Fig. 17. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 14 hours (UGB-14)

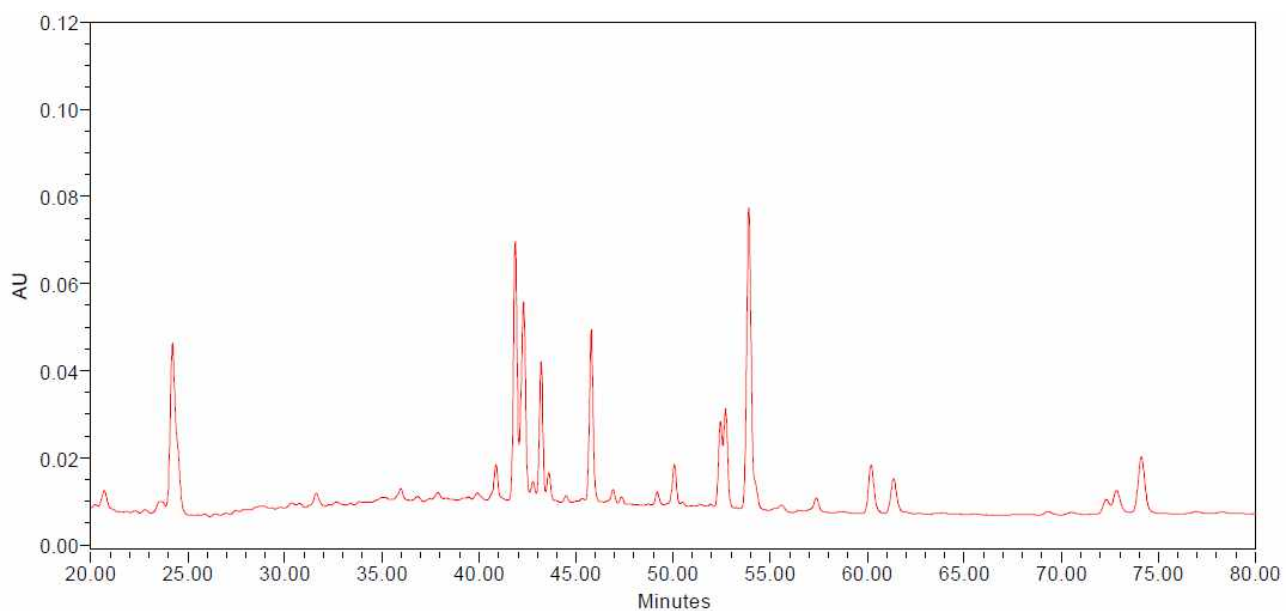


Fig. 18. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 15 hours (UGB-15)

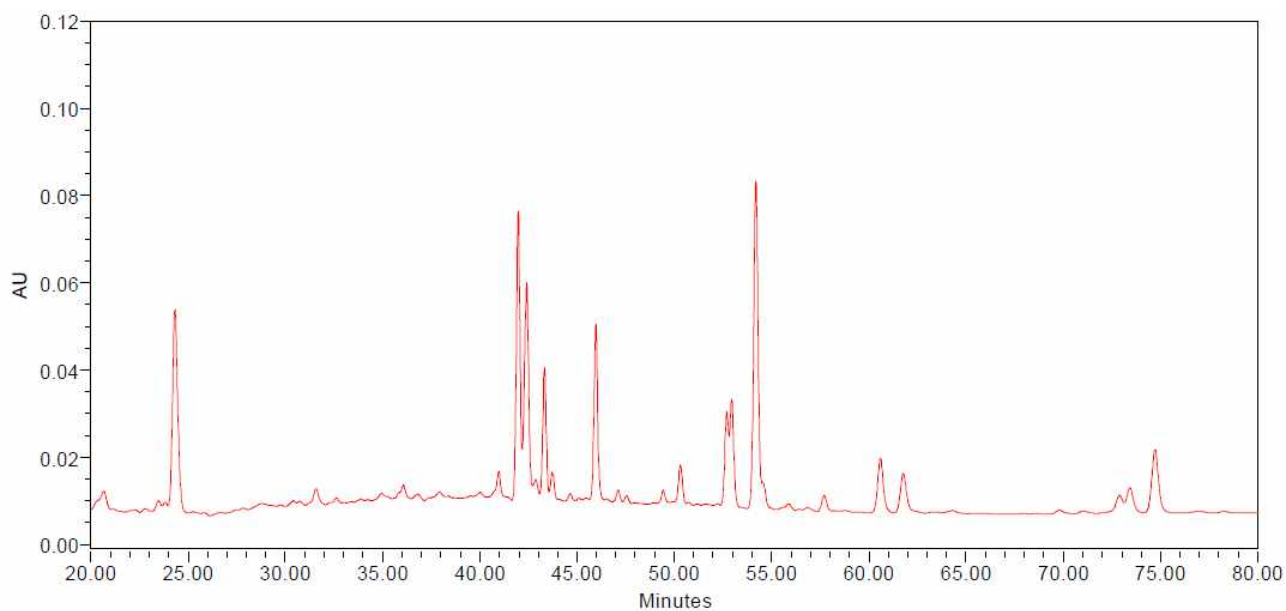


Fig. 19. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 16 hours (UGB-16)

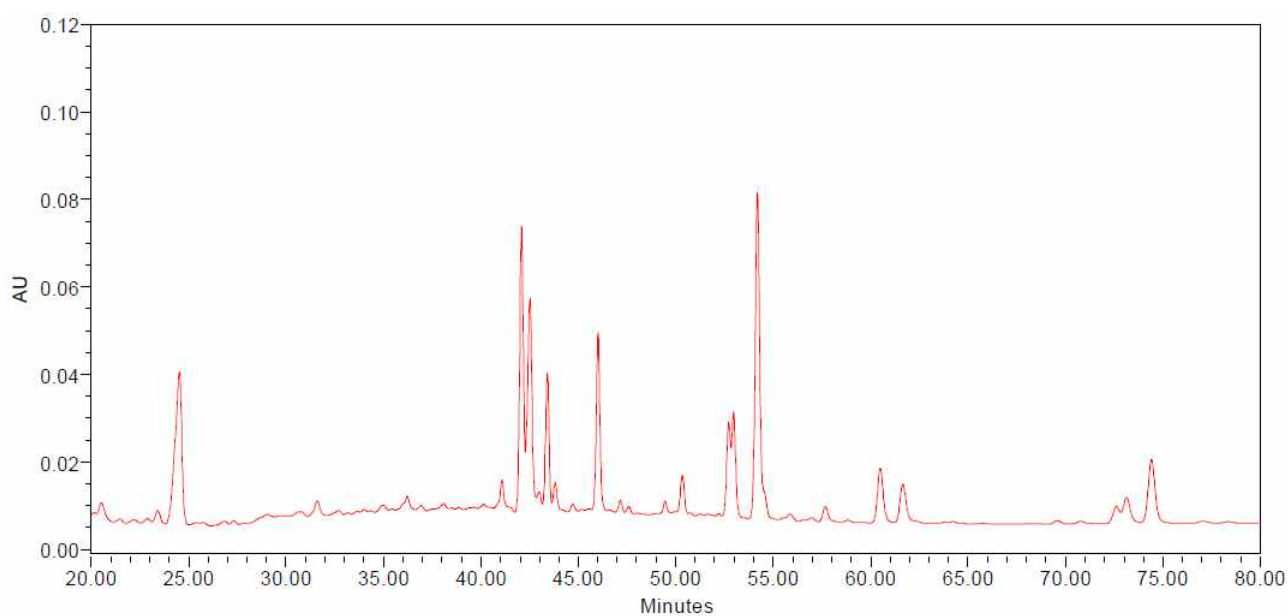


Fig. 20. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 17 hours (UGB-17)

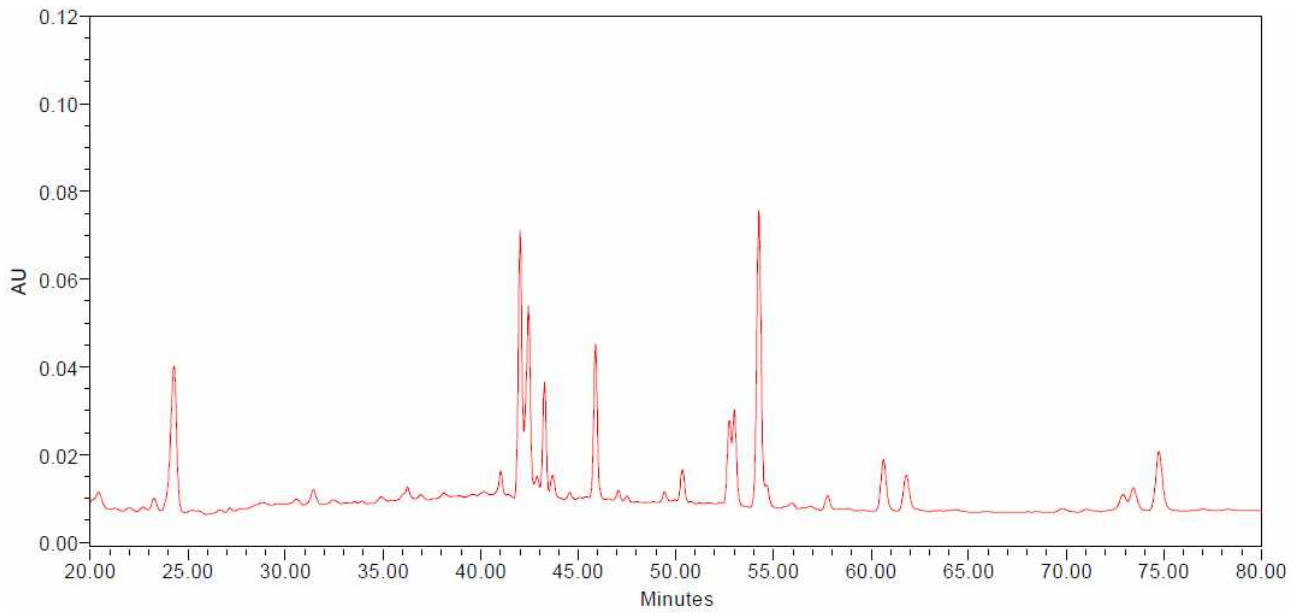


Fig. 21. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 18 hours (UGB-18)

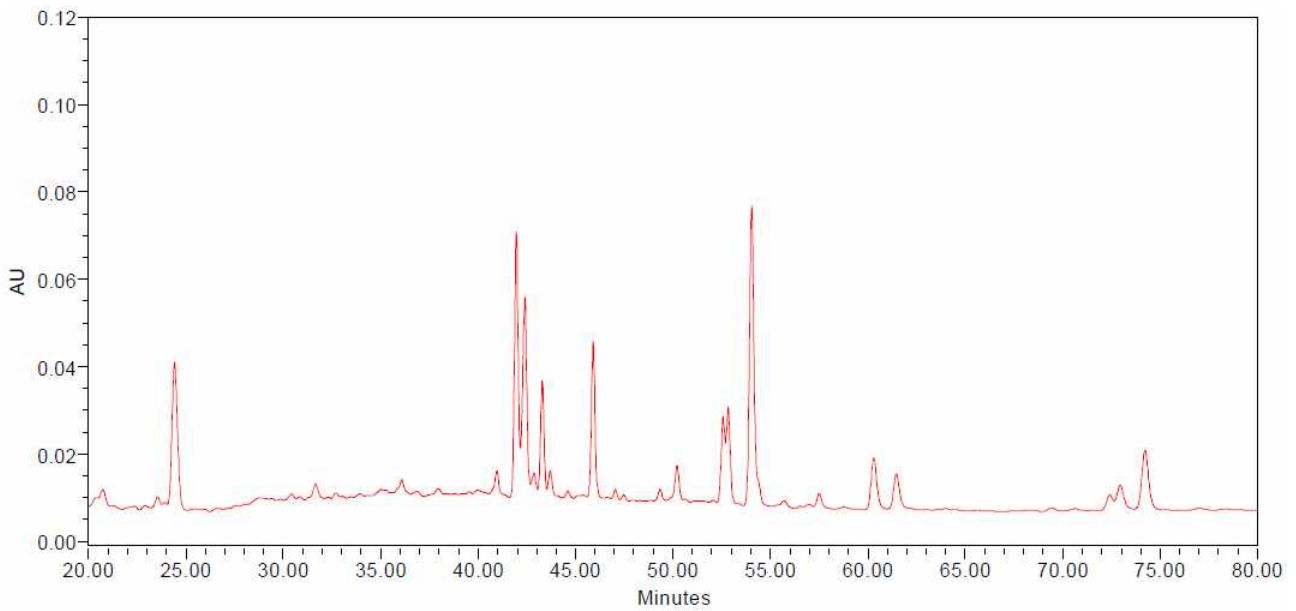


Fig. 22. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 19 hours (UGB-19)

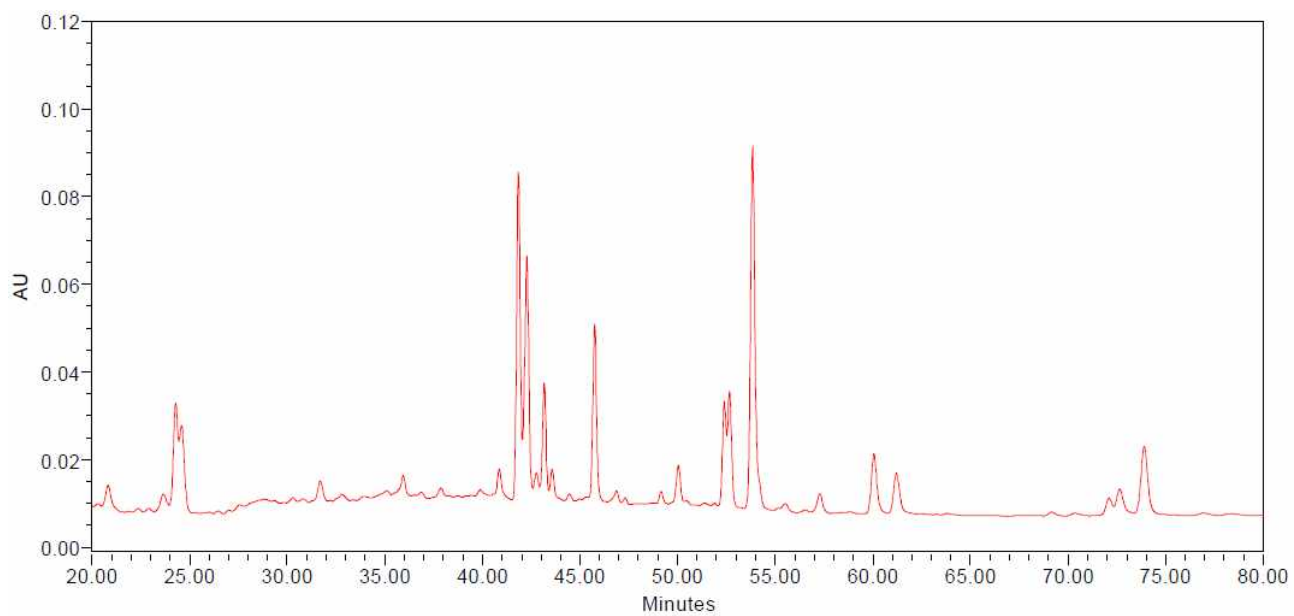


Fig. 23. HPLC chromatogram of ginsenosides detected from the ginseng berry extracts processed with ultrasonication for 20 hours (UGB-20)

## 나. 인삼열매의 대량 추출 조건 최적화

### 1) 실험재료 및 방법

#### (1) 실험재료

4년생 인삼(재배지 : 충청북도 음성군, 재배자 : 남성엽)으로부터 완숙한 열매를 2014년 7월 25일 채취하였으며, 시료 표본은 고연 인삼연구소에 보관(표본번호 : GBE-140725)하고 있다.(Fig. 1. 참조)

#### (2) 초음파 처리 인삼열매 엑스 조제

위에서 얻은 인삼열매분쇄물원액 15kg 및 20kg을 초음파 처리기(KODO, Hwaseong, Korea, 출력 1,200 W, 주파수 28 KHz)에 넣고, 100℃에서 10시간 처리하여 초음파 처리 감압농축하여 초음파 처리 인삼열매 엑스(UGBE-15, UGBE-20)을 얻었다.

#### (3) 조사포닌 조제

초음파 처리 인삼열매 엑스 각 2g에 디에틸에테르(diethylether) 50 ml를 가하여 1시간씩 3회 초음파 세정기(고도기업, 4020P, 한국)로 추출한 후, 원심분리 하여 상등액을 제거한다. 얻은 잔사에 수포화 부탄올(butanol) 50 ml를 가하여 2시간씩 3회 추출하고, 원심분리 하여 상등액을 취하여 여과하고, 감압 농축을 하여 조사포닌을 얻었다.

### 인삼사포닌 분석 (HPLC법)

위에서 얻은 엑스를 이 등의 조건을 응용하여 HPLC를 실시하고, 상법에 따라 표준과 직접 비교하여 인삼사포닌의 함량 및 조성을 각 시료당 3회 반복 실험하여 결과의 재현성을 확인하여 분석하였다. 표준은 Chromadex(USA)와 엠보연구소(Korea)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside를 사용하였다.

사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system(Waters, Milford, MA, USA)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18(3x250 mm; Knauer, Germany)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC grade; Sigma-Aldrich Chem Co., USA)과 증류수(HPLC급, B&J, USA)이며, acetonitrile의 비율을 17%(0 min)에서 25%(25 min), 40%(50 min), 60%(105 min) 그리고 100%(110 min)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector(Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203 nm에서 검출하였다.

### 2) 결과 및 고찰

인삼열매분쇄물원액을 100℃에서 초음파 처리를 실시하여 ginsenoside Rg2, Rh1, F4와 같은 활성형<sup>14)</sup> 프로사포게닌을 고농도로 함유하는 조성물을 개발하고자 하였다. 인삼사포닌 성분분석은 ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rg3, Rg5, Rg6, Rh1, Rh4, Rk1, Rk3, F1 그리고 F4를 대상으로 HPLC법으로 검토하였다.

Table I 에서와 같이 각 진세노사이드의 총합인 총사포닌(total saponin) 함량에 있어서는



UGBE-20이 18.373%이었으며 UGBE-15은 15.438%로서 인삼열매분쇄물원액 20kg 투입한 것이 높은 총사포닌 함량을 보여주었다. 인삼사포닌 배당체는 열이나, 산(acid)에 의해서 프로사포게닌 성분으로 화학전환되어 생리활성이 높아진다고 알려져 있다. Ginsenoside Re 및 Rg2가 가수분해되어 생성되는 성분으로 항알러지 작용이 보고된 ginsenoside Rh1의 경우, UGBE-15가 4.913%로서 높은 함량을 나타내었으며, UGBE-20은 3.03%의 함량을 나타내었다.

또한, 항암작용, 혈압강하작용, 뇌신경세포 보호작용, 항혈전작용, 항산화작용을 나타내는 ginsenoside Rg3는 UGBE-20이 1.969%로서 높은 함량을 나타내었으며, UGBE-15가 1.173%의 함량을 나타내었다. 한편, 주름개선작용을 나타내는 진세노사이드 Rg<sub>2</sub>의 함량에 있어서는 UGBE-20이 2.264%로서 높은 함량을 나타내었으며, UGBE-15가 1.710%의 함량을 나타내었다. 항암작용, 관절연골조직 보호작용이 보고된 Ginsenoside F4의 경우, UGBE-20이 2.436%로서 높은 함량을 나타내었으며, UGBE-15가 1.080%의 함량을 나타내었다.

본 연구를 통하여 인삼열매분쇄물원액 20kg에 100℃에서 초음파 10시간 처리시 홍삼특유 기능성분인 ginsenoside Rh1(4.913%), Rg2(2.264%), F4(2.436%)가 고농도로 함유하는 조성물을 제조할 수 있음을 확인하였다.

Table 1. Ginsenoside composition of the ginseng berry processed with ultrasonication

Ginsenosides	(%w/w)	
	UGBE-15	UGBE-20
Rb1	0.158	0.226 ± 0.016
Rb2	0.777	0.919 ± 0.003
Rc	0.291	0.183 ± 0.002
Rd	1.089	1.240 ± 0.017
Re	0.193	1.771 ± 0.096
Rf	0.049	0.090 ± 0.001
Rg1	0.883	0.161 ± 0.023
Rg2	1.710	2.264 ± 0.016
20S-Rg3	0.698	1.241 ± 0.006
20R-Rg3	0.475	0.728 ± 0.004
Rg5	1.600	2.115 ± 0.012
Rg6	0.245	0.586 ± 0.019
Rh1	4.913	3.030 ± 0.021
Rh2	0.375	0.175 ± 0.004
Rh4	0.136	0.154 ± 0.001
Rk1	0.257	0.859 ± 0.008
Rk3	0.079	0.097 ± 0.001
F1	0.020	0.038 ± 0.007
F4	1.080	2.436 ± 0.008
Total ginsenosides	14.948	18.373

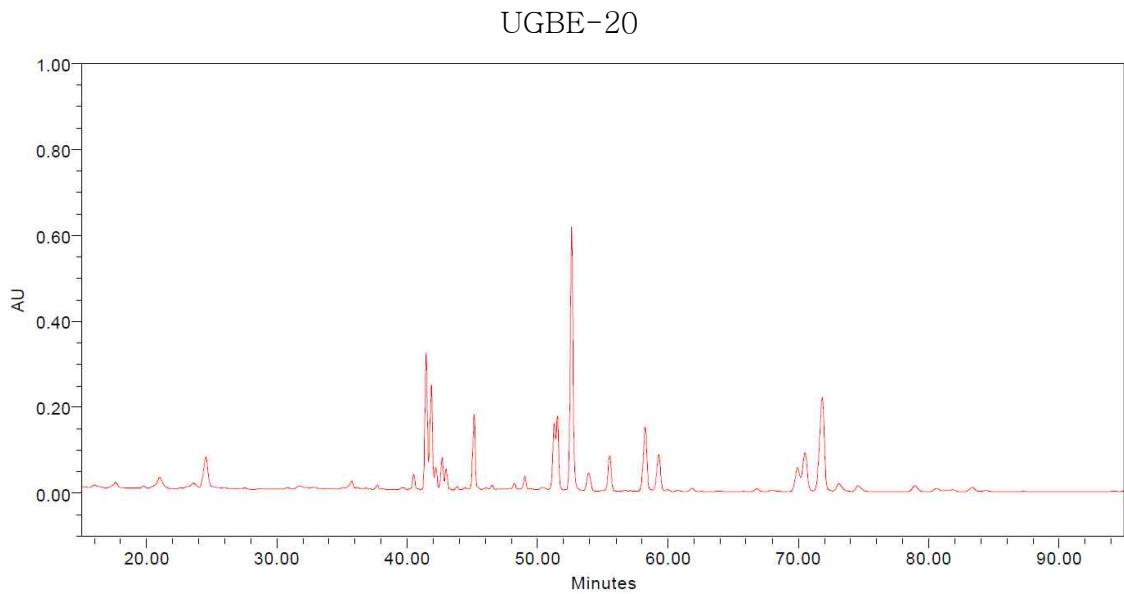
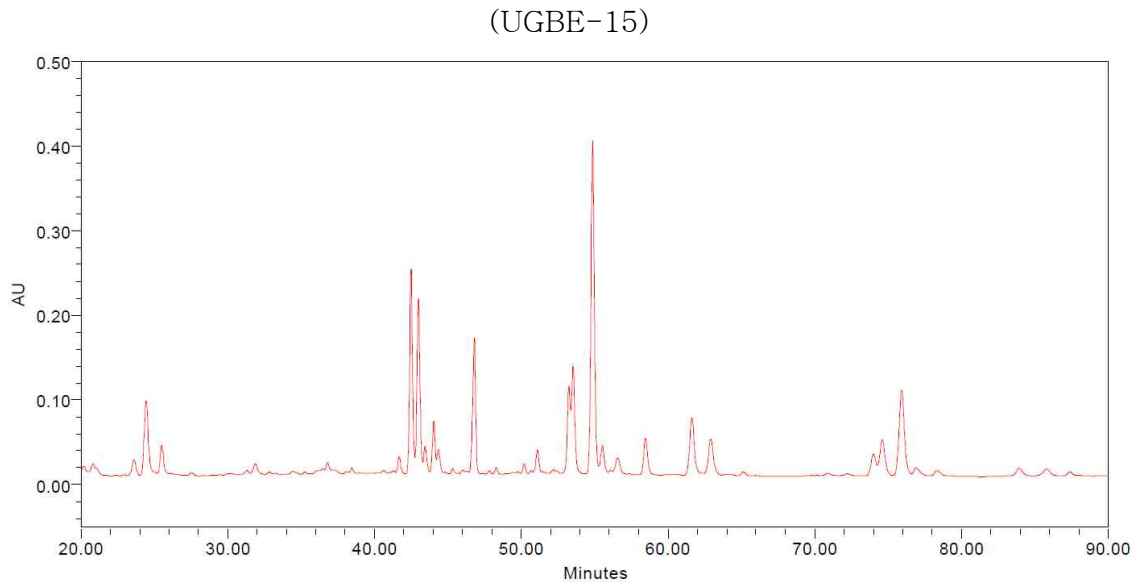


Fig. 1. HPLC chromatogram of ginsenosides in the ginseng berry processed with ultrasonication

## 다. 인삼열매의 시기별, 지역별 성분 함량

### 1. 실험재료

본 연구에 사용한 고려 인삼 열매 열매(*Panax ginseng*)는 4년생 인삼의 열매를 전북 김제에서 6월 20일, 전북 고창에서 7월 9일에 채집(재배자, 김길)하였고, 또한, 충북 음성에서 7월 20일에 채집(재배자, 남성엽)하였다. 얻은 시료를 대상으로 ginsenosides 성분의 함량을 비교 검토하였다. 각각의 제품표본은 고연 연구실에 보관하고 있다. (Fig. 1.)



### 2. 엑스의 조제

각 인삼 과육 및 씨를 세말하였다. 시료 각각 100g 씩에 95% ethyl alcohol과 증류수에 넣어 수욕상에서 2시간씩 1회씩 추출하여 여과 후 여액을 합하여 감압 농축하여 엑스를 얻었다.

### 3. 조 사포닌(crude saponin) 조제 (Shibata 법)

검체(sample) 각 10g을 취하여 ethylether로 3회 처리하여 지용성 물질을 제거한 후 다시 수포화 n-butanol로 3회 처리하여 얻은 n-BuOH 층을 합하여 감압농축 하였다. 이때 모든 조작은 정량적으로 하였다. 감압농축물의 함량을 조 사포닌(crude saponin) 양으로 하였다.

#### 4. HPLC-ginsenoside의 분석

위에서 얻은 엑스를 고 등<sup>23)</sup>의 조건을 응용하여 HPLC를 실시하고, 상법에 따라 표준과 직접 비교하여 인삼사포닌의 함량 및 조성을 각 시료당 3회 반복 실험하여 결과의 재현성을 확인하여 분석하였다. 표준은 Chromadex (U.S.A.)로부터 구입한 순도 99% 이상의 ginsenoside를 사용하였다. 사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system (Waters, 미국)이며, 컬럼은 Gemini 5 $\mu$  C<sub>18</sub> 110A(Phenomenex, 4.6 $\times$ 250mm, 미국)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile(HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, acetonitrile의 비율을 17 %에서 40 %, 60 % 그리고 80 %로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다. 전개 온도는 실온, 유속은 분당 1.0 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

#### 5. 결과 및 고찰

각 ginsenoside의 총합인 총 사포닌(total saponin) 함량에 있어서는 Table 1에서 보는 바와 같이 김제에서 6월 20일 채집한 GB620이 9.09%이었으며 음성에서 7월 20일 채집한 GB720이 8.448%이었으며, 고창에서 7월 9일 채집한 GB709는 8.405%로서 김제에서 6월 20일 채집한 인삼열매가 총 사포닌이 높은 함량을 보여주었다.

항알러지, 항알츠하이머, 항지방간 가능성을 나타내는 Ginsenoside Re에 있어서는 GB720이 6.276%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, GB709(5.889%), GB620(4.789%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 다른 인삼사포닌은 지역별 시기별 큰 차이를 발견할 수 없었다.

#### 6. 결론

채집시기가 이른 인삼열매가 총사포닌 함량은 높은 경향을 나타내었고, 인삼열매의 주성분인 Ginsenoside Re의 경우는 늦은 채집이 높은 함량을 나타내었다.

Table 1. The ginsenoside content of the ginseng berry in Different Areas and at Various Ages.

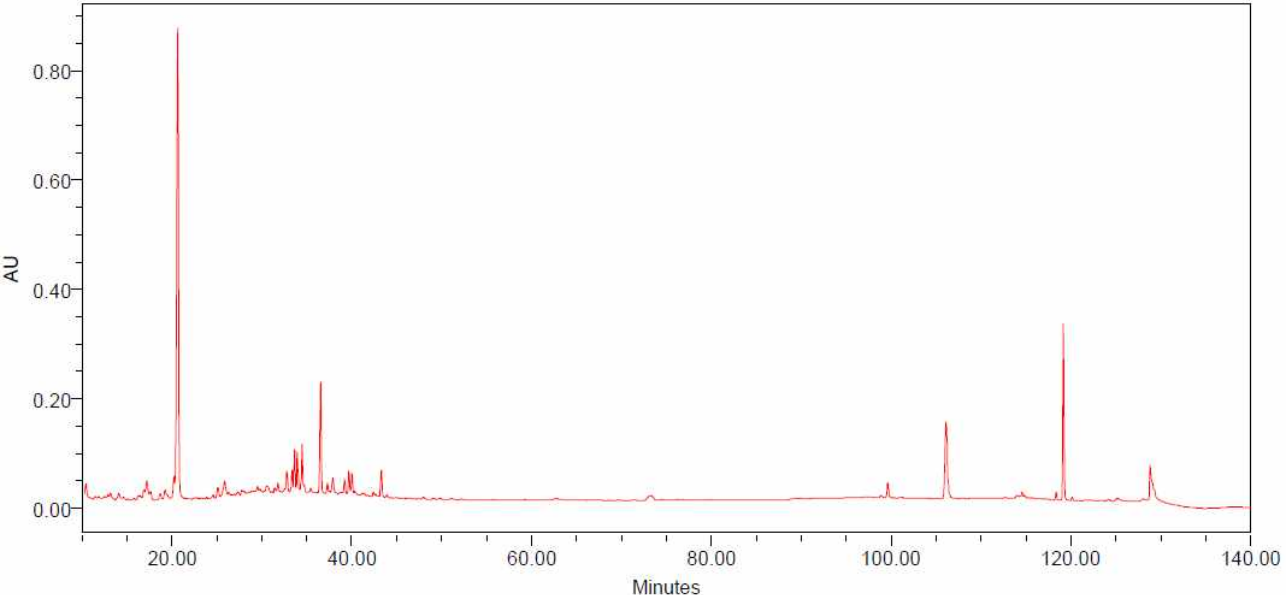
(% ,w/w)

Ginsenosides	Ginseng berry		
	GB620	GB709	GB720
Rb <sub>1</sub>	0.823±0.162	0.541±0.162	0.501±0.162
Rb <sub>2</sub>	0.728±0.037	0.621±0.017	0.421±0.025
Rd	0.422±0.062	0.372±0.042	0.422±0.032
Re	4.789±0.088	5.889±0.088	6.276±0.088
Rg <sub>1</sub>	0.423±0.006	0.478±0.002	0.373±0.008
Rg <sub>2</sub>	0.604±0.091	0.504±0.031	0.304±0.049
Rh <sub>1</sub>	0.091±0.010	0.121±0.008	0.151±0.002
Total ginsenosides <sup>a)</sup>	9.09	8.405	8.448

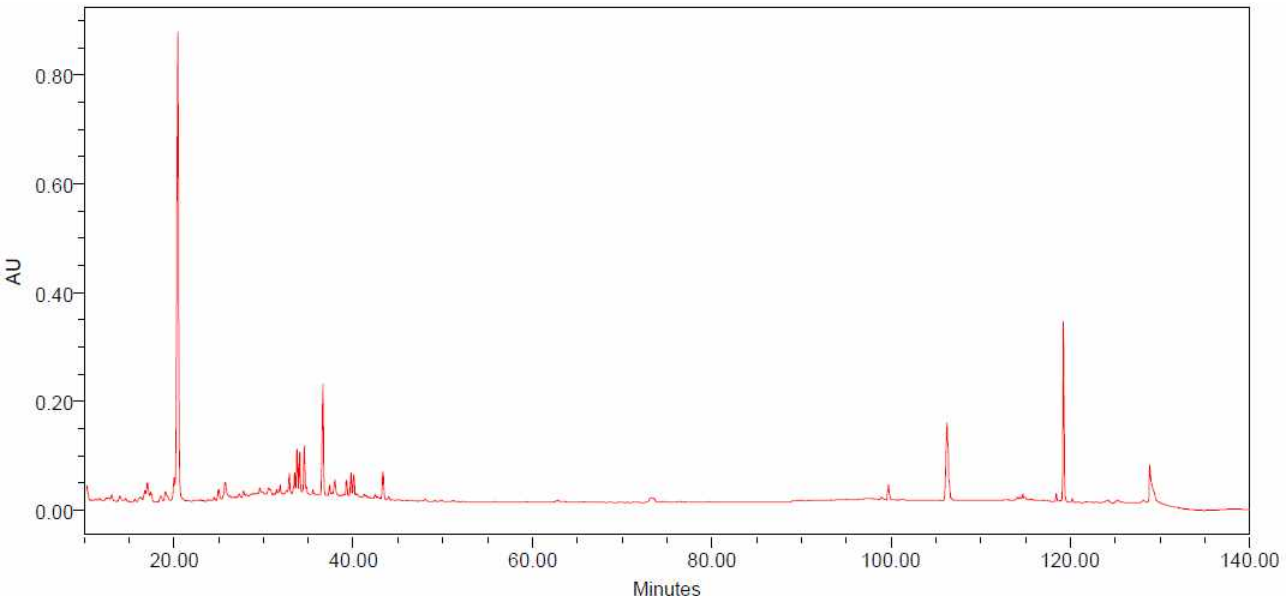
\* GB620 : 4 years old cultivated ginseng berry(Kimje) at June 20, GB709 : 4 years old cultivated ginseng berry(Kochang) at July 9, GB720 : 4 years old cultivated ginseng berry(Umsong) at July 20.

Values represent the mean±S.E. (n=3)

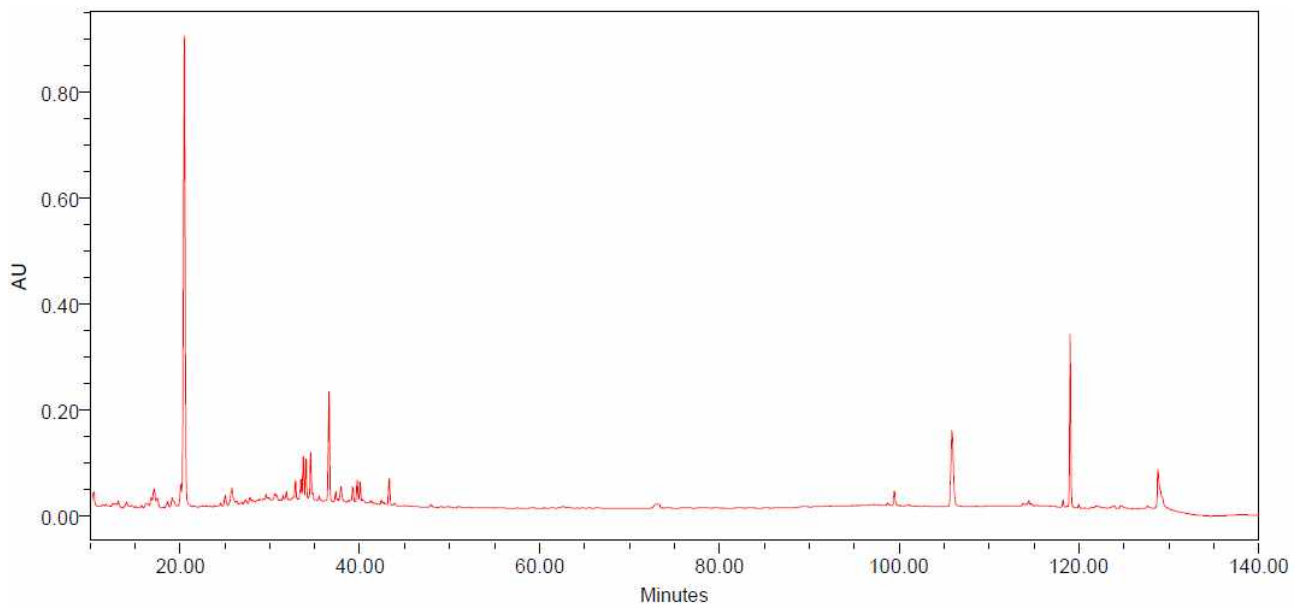
Fig. 1. HPLC chromatogram of ginsenosides in the ginseng berry in Different Areas and at Various Ages.



GB620



GB709



GB720

\* GB620 : 4 years old cultivated ginseng berry(Kimje) at June 20, GB709 : 4 years old cultivated ginseng berry(Kochang) at July 9, GB720 : 4 years old cultivated ginseng berry(Umsong) at July 20.



## 라. 인삼과 초음파 인삼열매 조성물의 인삼 프로사포게닌 성분 비교분석

초음파 10시간 처리(100℃) 인삼열매 엑스와 본 연구팀이 발표한 인삼류 생약 엑스의 인삼 사포닌 데이터[인삼열매엑스(J. Ginseng Res. 37(3), 269-272, 2013), 인삼잎줄기엑스(Kor. J. Pharmacogn. 44(2): 149-153, 2013), 홍삼엑스(2012년도 대한약학회 춘계 학술대회 2012년)]를 비교분석해보면, 각 ginsenoside의 총합인 총 사포닌(total saponin) 함량에 있어서는 초음파 10시간처리 인삼열매 엑스가 53.009%로 가장 높은 함량을 나타내었고, 인삼열매엑스(16.793%), 인삼잎줄기엑스(9.86%), 홍삼(1.2808%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

홍삼의 특유성분이며, 항암, 혈압강하, 항산화, 뇌신경 보호작용이 보고된 ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 경우, 초음파 10시간처리 인삼열매 엑스가 13.055%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, 인삼잎줄기엑스(0.435%), 홍삼엑스(0.025%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 따라서, 초음파 10시간처리 인삼열매 엑스는 인삼잎줄기엑스보다 약 30배, 홍삼엑스보다 약 522배 높은 함량을 나타내었다. 또다른 열 가수분해물인 Ginsenoside Rg<sub>5</sub>의 경우, 초음파 10시간처리 인삼열매 엑스가 1.731%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, 인삼잎줄기엑스(0.192%), 홍삼엑스(0.013%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다.

한편, 주름개선작용이 보고된 ginsenoside Rg<sub>2</sub>의 함량에 있어서는 초음파 10시간처리 인삼열매 엑스가 6.240%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, 인삼잎줄기엑스(0.200%), 인삼열매엑스(0.802%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 항알러지 작용이 보고된 ginsenoside Rh<sub>1</sub>에 있어서는 초음파 10시간처리 인삼열매 엑스가 15.872%로서 가장 높은 함량을 나타내었으며, 인삼잎줄기엑스(0.798%), 인삼열매엑스(0.629%), 홍삼엑스(0.213%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. 이와 같은 초음파 처리 인삼열매엑스의 함량은 인삼잎줄기엑스보다 약 20배, 인삼열매엑스의 약25배, 홍삼엑스보다 약 75배 높은 함량을 나타내었다.

초음파 처리 인삼열매 엑스와 인삼류 생약 엑스의 인삼사포닌 비교분석

(%w/w)

Ginsenosides	(%w/w)			
	인삼열매엑스(GB)	인삼잎줄기엑스 (GLS)	홍삼엑스(RG)	초음파10시간처리 인삼열매엑스 (UGB-10)
Rb <sub>1</sub>	0.738±0.179	0.998±0.029	0.425±0.108	0.454±0.067
Rb <sub>2</sub>	0.598±0.114	0.834±0.027	0.131±0.023	2.372±0.170
Rc	-	0	±	0.622±0.022
Rd	1.534±0.183	2.547±0.077	0.041±0.008	2.659±0.095
Re	11.169±0.159	3.046±0.125	0.131±0.024	4.796±0.199
Rf	0.330±0.116	0.055±0.004	0.065±0.012	0.437±0.177
Rg <sub>1</sub>	0.567±0.014	0.378±0.022	0.045±0.207	0.569±0.386
Rg <sub>2</sub>	0.802±0.216	0.200±0.007	±	6.240±0.109
Rg <sub>3</sub>	-	0.435±0.013	0.025±0.001	13.055±10.577
Rg <sub>5</sub>	-	0.192±0.008	0.013±0.005	1.731±0.093
Rg <sub>6</sub>	0.044±0.026	0.026±0.002	-	0.777±0.153
Rh <sub>1</sub>	0.629±0.095	0.798±0.025	0.213±0.081	15.872±0.446
Rh <sub>4</sub>	-	0.020±0.001	0.004±0.001	0.183±0.020
Rk <sub>1</sub>	-	0.035±0.016	0.003±0.000	0.295±0.070
Rk <sub>3</sub>	-	0.011±0.000	0.003±0.000	0.102±0.007
F <sub>1</sub>	0.193±0.150	0.165±0.006	0.016±0.003	0.096±0.017
F <sub>4</sub>	0.191±0.026	0.123±0.050	0.003±0.001	2.748±0.139
Total ginsenosides <sup>a)</sup>	16.793	9.860	1.281	53.009

마. 인삼열매 조성물의 잔류농약검사

1. 초음파 처리 인삼열매 조성물의 잔류농약 검사 결과 (한국임업진흥원 검사)

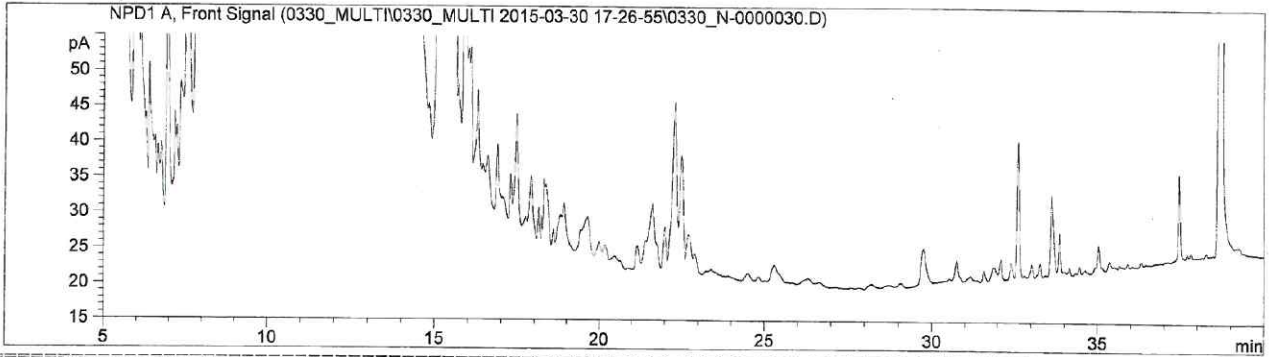
식품의약품안전처 수삼 잔류농약 기준에 해당하는 75종 농약을 대상으로 초음파 처리 인삼 열매 조성물의 잔류농약을 검토한 결과, 메타락실 등 11종의 잔류농약이 검출되었으나, 식품의약품안전처 수삼기준 내의 농도로 검출되었고, 나머지 64종의 농약을 검출되지 않았다.

잔류농약	시 료 검출농도(mg/kg)	식약처 수삼기준(mg/kg)
디디티(DDT)	ND	0.01
메타락실(Metalaxyl)	0.252	0.5
비에치시(BHC)	ND	0.01
알드린(Aldrin)및디엘드린(Dieldrin)	ND	0.01
엔드린(Endrin)	ND	0.01
카벤다짐(Carbendazim)	ND	0.2
퀸토젠(Quintozene)	ND	0.1
디에토펜카브(Diethofencarb)	ND	0.3
디페노코나졸(Difenoconazole)	ND	0.5
사이퍼메스린(Cypermethrin)	ND	0.1
아зок시스트로빈(Azoxystrobin)	0.094	0.1
토릴플루아니드(Tolylfluanid)	ND	0.2
톨크로포스-메틸(Tolclofos-methyl)	ND	1
이민옥타딘(Iminoctadine)	ND	0.1
피리메타닐(Pyrimethanil)	0.094	1
펜헥사미드(Fenhexamid)	0.25	0.3
시아조파미드(Cyazofamid)	ND	0.3
싸이프로디닐(Cyprodinil)	ND	2
크레속심-메틸(Kresoxim-methyl)	0.102	0.2
디치오카바메이트(dithiocarbamates)	ND	0.3
카두사포스(Cadusafos)	ND	0.05
펜시쿠론(Pencycuron)	ND	0.7
후루디옥소닐(Fludioxonil)	0.354	0.5
카보설판(Carbosulfan)*	ND	0.1
티플루자마이드(Thifluzamide)	0.890	1
플루토라닐(Flutolanil)	ND	1
테부피림포스(Tebupirimfos)	ND	0.01
트리프록시스트로빈(Trifloxystrobin)	0.096	0.1
보스칼리드(Boscalid)	ND	0.3
디메토모르프(Dimethomorph)	0.600	3
클로로타로닐(Chlorothalonil)	ND	0.1
테플루스린(Tefluthrin)	ND	0.1
플루퀸코나졸(Fluquinconazole)	0.140	0.2
피라크로스트로빈(Pyraclostrobin)	0.07	2
아미트라즈(Amitraz)	ND	0.05

부프로페진(Buprofezin)	ND	0.07
사이할로스린(Cyhalothrin)	ND	0.05
푸루실라졸(Flusilazole)	ND	0.07
프로클로라즈(Prochloraz)	ND	0.3
디치아논(Dithianon)*	ND	0.2
싸이목사닐(Cymoxanil)	ND	0.2
클로치아니딘(Clothianidin)	ND	0.2
티아메톡삼(Thiametoxam)	ND	0.1
에타복삼(Ethaboxam)	ND	0.2
사이플루스린(Cyfluthrin)	ND	0.1
후루아지남(Fluazinam)	ND	0.7
데부코나졸(Tebuconazole)	ND	0.5
만디프로파미드(Mandipropamid)	ND	0.1
메톡시페노자이드(Methoxyfenozide)	ND	0.2
메트코나졸(Metconazole)	ND	1
비펜스린(Bifenthrin)	ND	0.5
세록시딴(Sethoxydim)	ND	0.05
에마멕티벤조에이트 (Emamectinbenzoate)	ND	0.05
에트리디아졸(Etridiazole)	ND	3
티아크로프리트(Thiacloprid)	ND	0.1
프로파모카브(Propamocarb)	ND	0.5
헥사코나졸(Hexaconazole)	ND	0.5
플루오피콜라이드(Fluopicolide)	ND	0.1
트리플루미졸(Triflumizole)	ND	0.1
포세틸-알루미늄(Fosetyl-aluminium)	ND	2
시메코나졸(Simeconazole)	ND	0.7
아미설브롬(Amisulbrom)	ND	0.3
아세타미프리트(Acetamiprid)	ND	0.1
클로르헨나피르(Chlorfenapyr)	ND	0.1
디노테푸란(Dinotefuran)	ND	0.05
카보후란( Carbofuran)	ND	0.1
크레소딴(Clethodim)	ND	0.05
이프로발리카브(Iprovalicarb)	ND	0.1
린단(Lindane, $\gamma$ -BHC)	ND	0.01
베나락실(Benalaxyl)	ND	0.05
캡탄(Captan)	ND	0.05
터브포스(Terbufos)	ND	0.05
스피네토람(Spinetoram)	ND	0.05
설펡사플로르(Sulfoxafloer)	ND	0.05
플록사피록사드(Fluxapyroxad)	ND	0.05

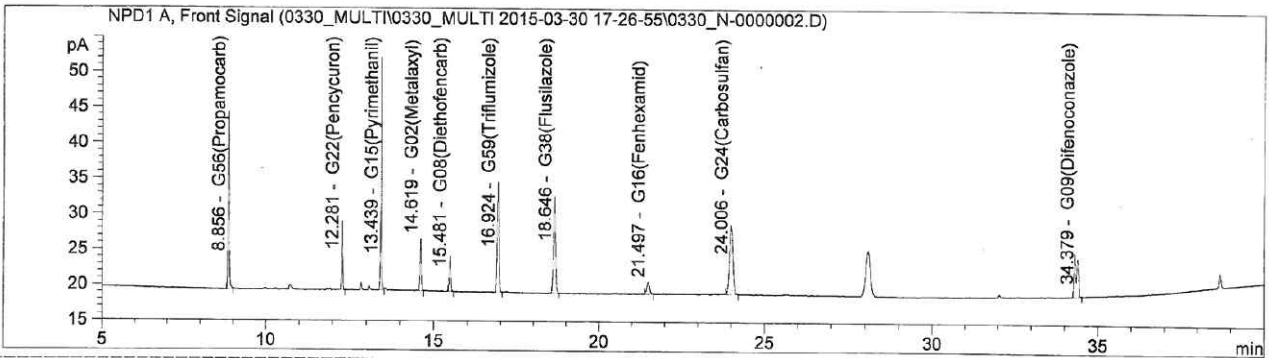
## 2. 잔류농약 검사 로데이터

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_NPD1.M



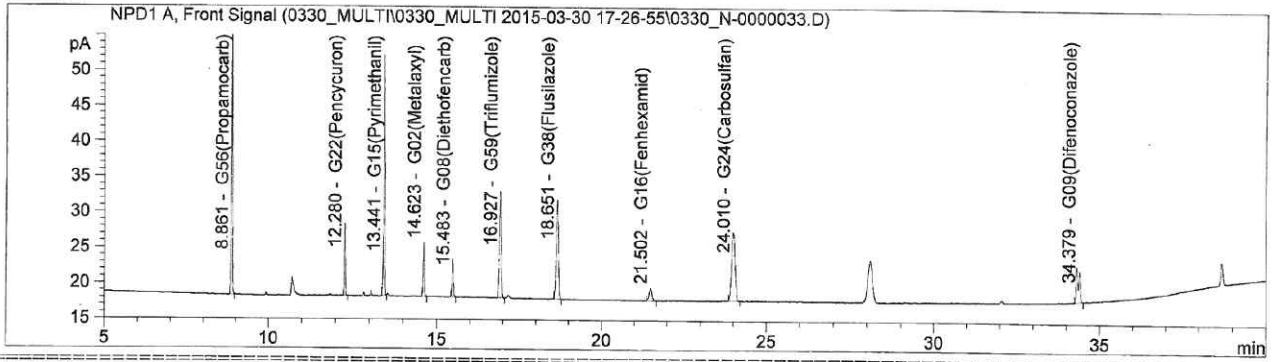
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	0.000	G56 (Propamocarb)	0.000	0.000
2	0.000	G22 (Pencycuron)	0.000	0.000
3	0.000	G15 (Pyrimethanil)	0.000	0.000
4	0.000	G02 (Metalaxyl)	0.000	0.000
5	0.000	G08 (Diethofencarb)	0.000	0.000
6	0.000	G59 (Triflumizole)	0.000	0.000
7	0.000	G38 (Flusilazole)	0.000	0.000
8	0.000	G16 (Fenhexamid)	0.000	0.000
9	0.000	G24 (Carbosulfan)	0.000	0.000
10	0.000	G09 (Difenoconazole)	0.000	0.000

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_NPD1.M



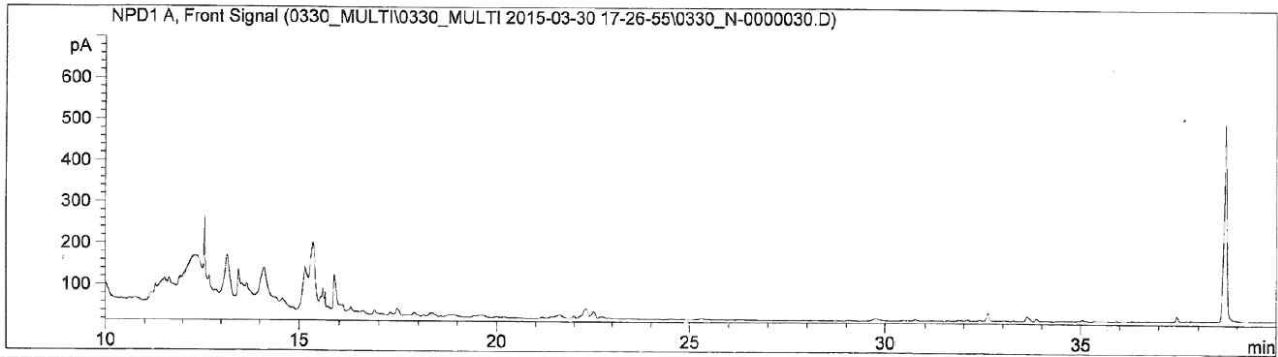
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	8.856	G56 (Propamocarb)	62.347	1.000
2	12.281	G22 (Pencycuron)	21.378	1.000
3	13.439	G15 (Pyrimethanil)	74.267	1.000
4	14.619	G02 (Metalaxyl)	19.758	1.000
5	15.481	G08 (Diethofencarb)	15.711	1.000
6	16.924	G59 (Triflumizole)	60.219	1.000
7	18.646	G38 (Flusilazole)	63.979	1.000
8	21.497	G16 (Fenhexamid)	10.386	1.000
9	24.006	G24 (Carbosulfan)	70.567	1.000
10	34.379	G09 (Difenoconazole)	40.159	1.000

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_NPD1.M



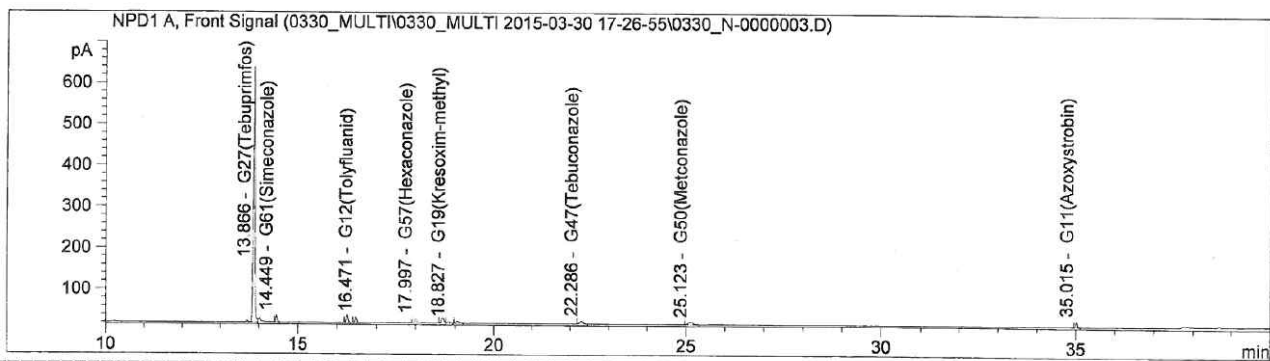
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	8.861	G56 (Propamocarb)	87.953	1.411
2	12.280	G22 (Pencycuron)	22.970	1.074
3	13.441	G15 (Pyrimethanil)	77.996	1.050
4	14.623	G02 (Metalaxyl)	19.760	1.000
5	15.483	G08 (Diethofencarb)	16.232	1.033
6	16.927	G59 (Triflumizole)	58.974	0.979
7	18.651	G38 (Flusilazole)	65.125	1.018
8	21.502	G16 (Fenhexamid)	10.992	1.058
9	24.010	G24 (Carbosulfan)	71.760	1.017
10	34.379	G09 (Difenoconazole)	33.633	0.838

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_NPD2.M



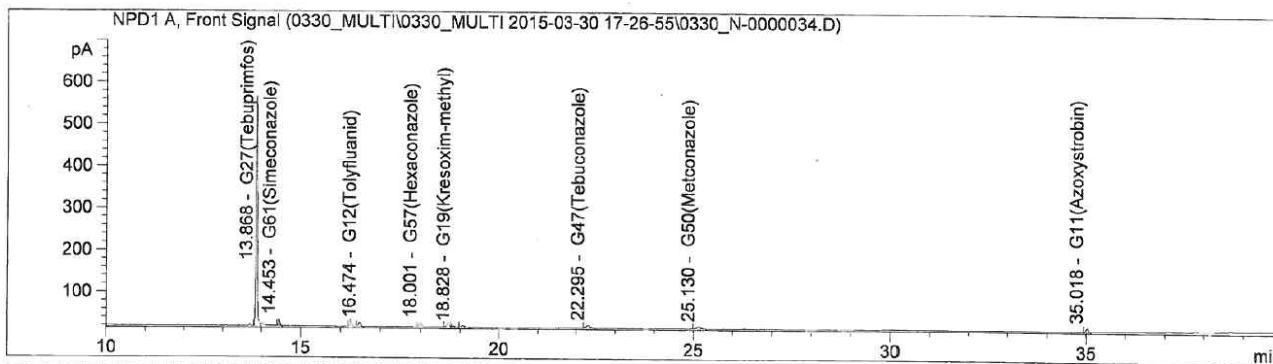
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	0.000	G27 (Tebuprimfos)	0.000	0.000
2	0.000	G61 (Simeconazole)	0.000	0.000
3	0.000	G18 (Cyprodinil)	0.000	0.000
4	0.000	G12 (Tolyfluanid)	0.000	0.000
5	0.000	G57 (Hexaconazole)	0.000	0.000
6	0.000	G36 (Buprofezin)	0.000	0.000
7	0.000	G19 (Kresoxim-methyl)	0.000	0.000
8	0.000	G64 (Chlorofenapyr)	0.000	0.000
9	0.000	G47 (Tebuconazole)	0.000	0.000
10	0.000	G50 (Metconazole)	0.000	0.000
11	0.000	G11 (Azoxystrobin)	0.000	0.000

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_NPD2.M



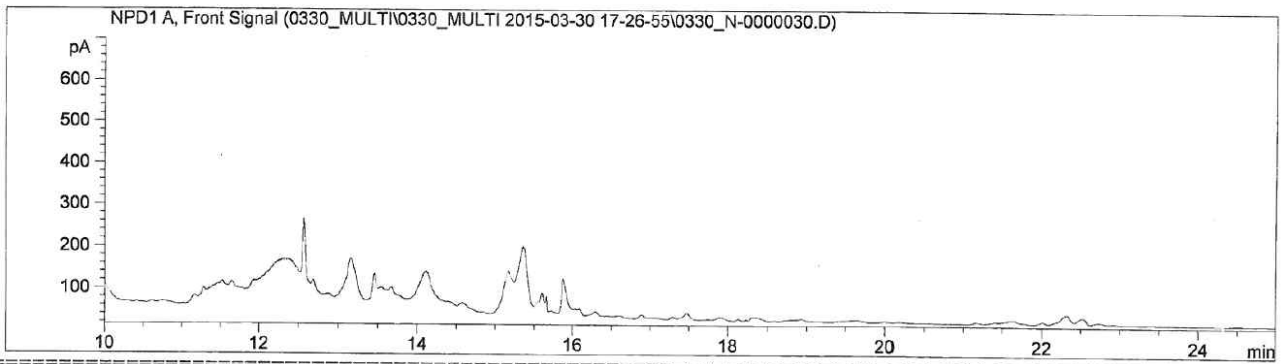
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	13.866	G27 (Tebuprimfos)	1661.391	1.000
2	14.449	G61 (Simeconazole)	42.817	1.000
3	16.249	G18 (Cyprodinil)	62.143	1.000
4	16.471	G12 (Tolyfluamid)	49.119	1.000
5	17.997	G57 (Hexaconazole)	51.237	1.000
6	18.688	G36 (Buprofezin)	60.043	1.000
7	18.827	G19 (Kresoxim-methyl)	15.855	1.000
8	19.074	G64 (Chlorofenapyr)	25.201	1.000
9	22.286	G47 (Tebuconazole)	44.648	1.000
10	25.123	G50 (Metconazole)	45.903	1.000
11	35.015	G11 (Azoxystrobin)	43.669	1.000

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_NPD2.M



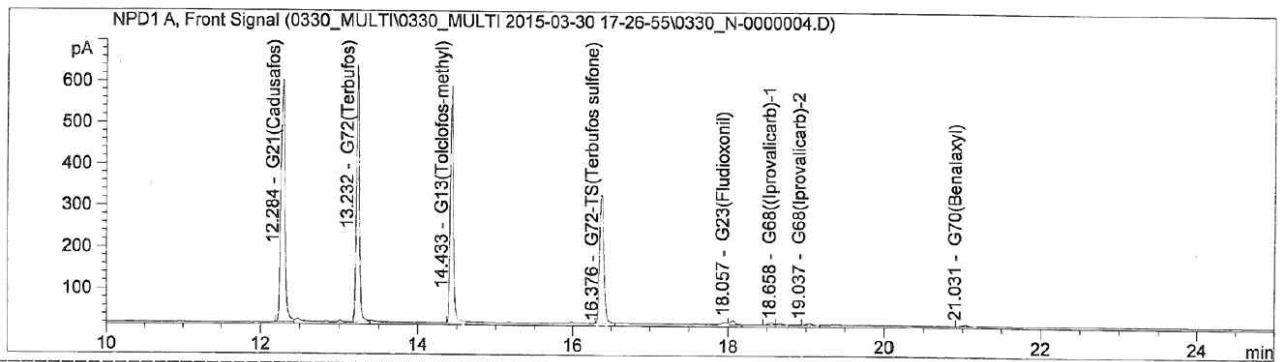
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	13.868	G27 (Tebuprimfos)	1455.849	0.876
2	14.453	G61 (Simeconazole)	40.833	0.954
3	16.250	G18 (Cyprodinil)	60.311	0.971
4	16.474	G12 (Tolyfluamid)	36.321	0.739
5	18.001	G57 (Hexaconazole)	48.175	0.940
6	18.694	G36 (Buprofezin)	56.096	0.934
7	18.828	G19 (Kresoxim-methyl)	14.322	0.903
8	19.078	G64 (Chlorofenapyr)	22.234	0.882
9	22.295	G47 (Tebuconazole)	42.367	0.949
10	25.130	G50 (Metconazole)	42.101	0.917
11	35.018	G11 (Azoxystrobin)	28.633	0.656

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_NPD3.M



#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	0.000	G21 (Cadusafos)	0.000	0.000
2	0.000	G72 (Terbufos)	0.000	0.000
3	0.000	G13 (Tolclofos-methyl)	0.000	0.000
4	0.000	G72-TS (Terbufos sulfone)	0.000	0.000
5	0.000	G23 (Fludioxonil)	0.000	0.000
6	0.000	G25 (Thifluzamid)	0.000	0.000
7	0.000	G68 (Iprovalicarb)-1	0.000	0.000
8	0.000	G68 (Iprovalicarb)-2	0.000	0.000
9	0.000	G70 (Benalaxyl)	0.000	0.000

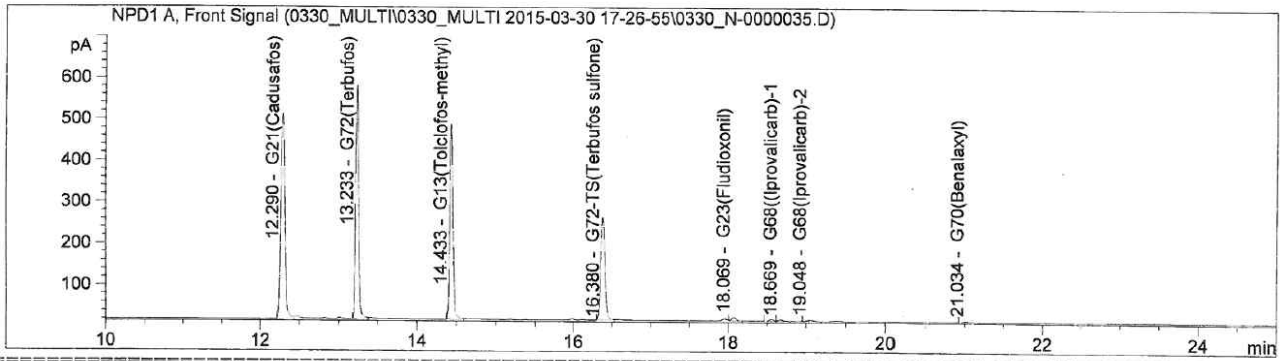
Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_NPD3.M



#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	12.284	G21 (Cadusafos)	2076.061	1.000
2	13.232	G72 (Terbufos)	1633.551	1.000
3	14.433	G13 (Tolclofos-methyl)	1583.958	1.000
4	16.376	G72-TS (Terbufos sulfone)	1208.657	1.000
5	18.057	G23 (Fludioxonil)	40.469	1.000
6	18.546	G25 (Thifluzamid)	18.672	1.000
7	18.658	G68 (Iprovalicarb)-1	16.576	1.000
8	19.037	G68 (Iprovalicarb)-2	16.858	1.000
9	21.031	G70 (Benalaxyl)	15.936	1.000

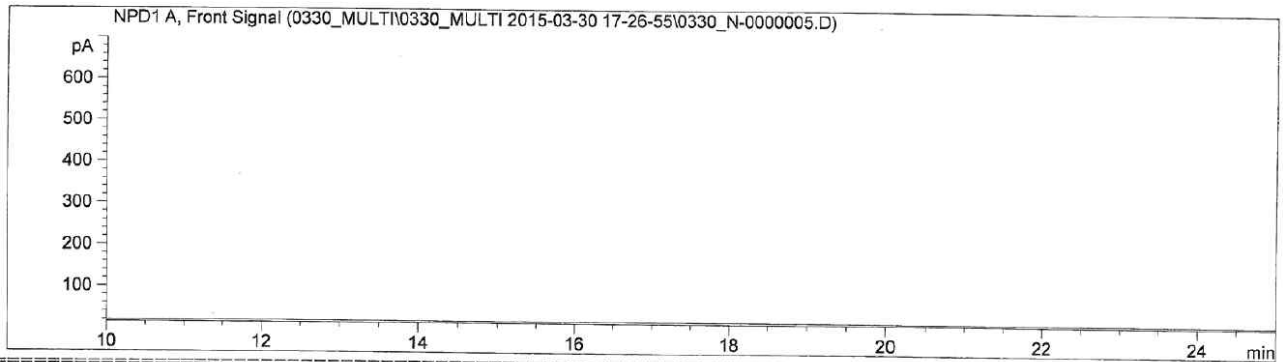


Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_NPD3.M



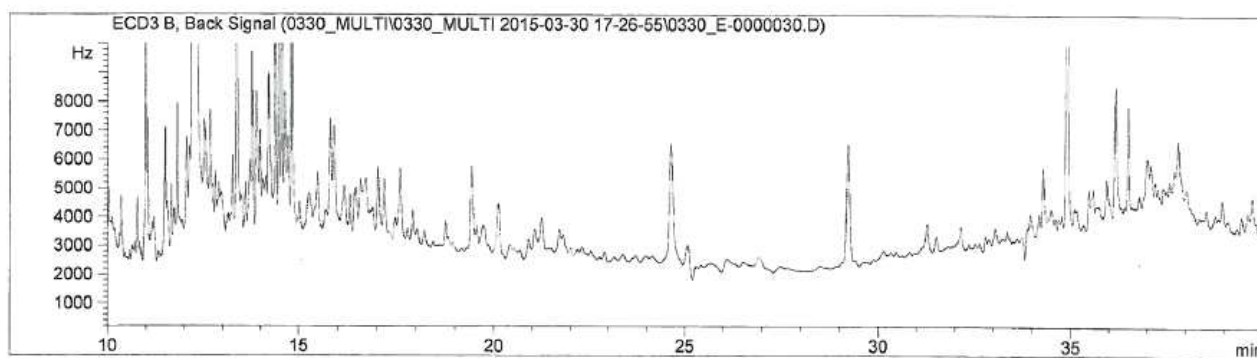
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	12.290	G21 (Cadusafos)	1734.720	0.836
2	13.233	G72 (Terbufos)	1441.341	0.882
3	14.433	G13 (Tolclofos-methyl)	1302.405	0.822
4	16.380	G72-TS (Terbufos sulfone)	943.240	0.780
5	18.069	G23 (Fludioxonil)	35.335	0.873
6	18.552	G25 (Thifluzamid)	17.200	0.921
7	18.669	G68 ((Iprovalicarb)-1)	15.586	0.940
8	19.048	G68 ((Iprovalicarb)-2)	15.980	0.948
9	21.034	G70 (Benalaxyl)	13.349	0.838

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_NPD3.M

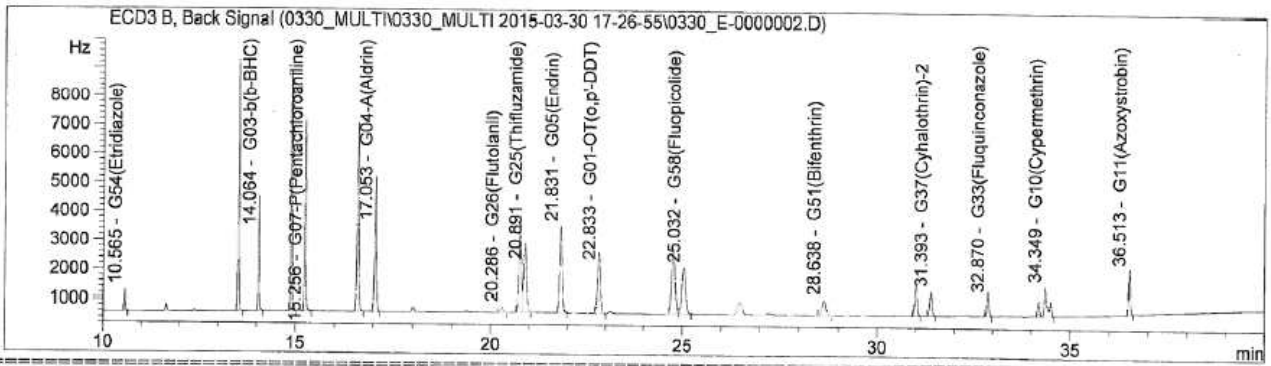


#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	0.000	G21 (Cadusafos)	0.000	0.000
2	0.000	G72 (Terbufos)	0.000	0.000
3	0.000	G13 (Tolclofos-methyl)	0.000	0.000
4	0.000	G72-TS (Terbufos sulfone)	0.000	0.000
5	0.000	G23 (Fludioxonil)	0.000	0.000
6	0.000	G25 (Thifluzamid)	0.000	0.000
7	0.000	G68 ((Iprovalicarb)-1)	0.000	0.000
8	0.000	G68 ((Iprovalicarb)-2)	0.000	0.000
9	0.000	G70 (Benalaxyl)	0.000	0.000

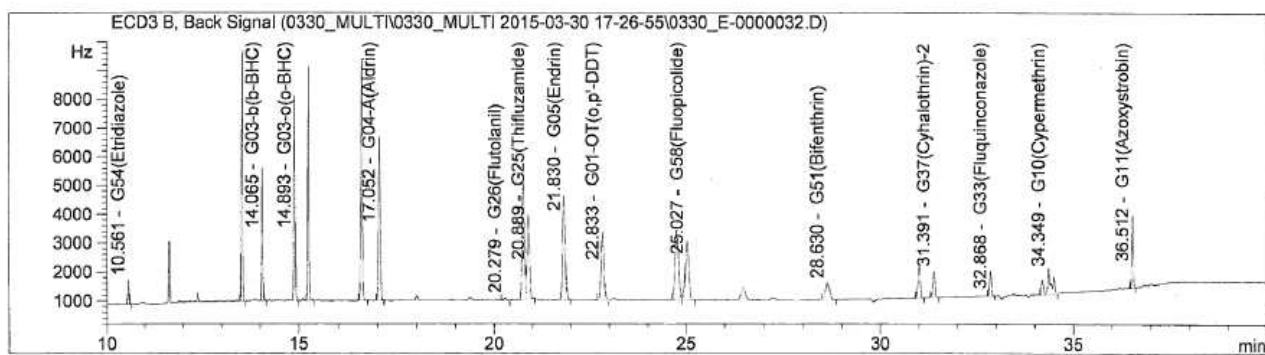
Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_ECD1.M



#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	0.000	G54 (Etridiazole)	0.000	0.000
2	0.000	G03-a (a-BHC)	0.000	0.000
3	0.000	G03-b (b-BHC)	0.000	0.000
4	0.000	G03-o (o-BHC)	0.000	0.000
5	0.000	G07-P (Pentachloroaniline)	0.000	0.000
6	0.000	G07-M (Methylpentachlorophenyl sulfide)	0.000	0.000
7	0.000	G04-A (Aldrin)	0.000	0.000
8	0.000	G26 (Flutolanil)	0.000	0.000
9	0.000	G01-PE (p,p'-DDE)	0.000	0.000
10	0.000	G25 (Thifluzamide)	0.000	0.000
11	0.000	G05 (Endrin)	0.000	0.000
12	0.000	G01-OT (o,p'-DDT)	0.000	0.000
13	0.000	G01-PT (p,p'-DDT)	0.000	0.000
14	0.000	G58 (Fluopicolide)	0.000	0.000
15	0.000	G51 (Bifenthrin)	0.000	0.000
16	0.000	G37 (Cyhalothrin)-1	0.000	0.000
17	0.000	G37 (Cyhalothrin)-2	0.000	0.000
18	0.000	G33 (Fluquinconazole)	0.000	0.000
19	0.000	G10 (Cypermethrin)	0.000	0.000
20	0.000	G11 (Azoxystrobin)	0.000	0.000

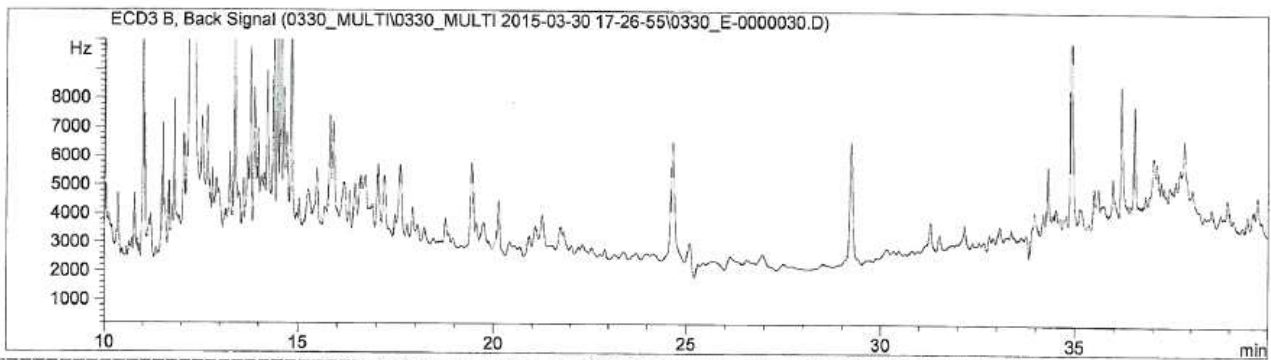


#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	10.565	G54 (Etridiazole)	1489.987	1.000
2	13.535	G03-a (a-BHC)	16715.600	1.000
3	14.064	G03-b (b-BHC)	8065.645	1.000
4	14.894	G03-o (o-BHC)	18371.275	1.000
5	15.256	G07-P (Pentachloroaniline)	16376.963	1.000
6	16.596	G07-M (Methylpentachlorophenyl sulfide)	20420.674	1.000
7	17.053	G04-A (Aldrin)	15419.469	1.000
8	20.286	G26 (Flutolanil)	967.750	1.000
9	20.763	G01-PE (p,p'-DDE)	15205.449	1.000
10	20.891	G25 (Thiﬂuzamide)	11429.585	1.000
11	21.831	G05 (Endrin)	14802.758	1.000
12	22.833	G01-OT (o,p'-DDT)	11494.572	1.000
13	24.763	G01-PT (p,p'-DDT)	13899.759	1.000
14	25.032	G58 (Fluopicolide)	10274.563	1.000
15	28.638	G51 (Bifenthrin)	3762.982	1.000
16	31.008	G37 (Cyhalothrin)-1	4982.143	1.000
17	31.393	G37 (Cyhalothrin)-2	3386.102	1.000
18	32.870	G33 (Fluquinconazole)	3029.309	1.000
19	34.349	G10 (Cypermethrin)	7228.552	1.000
20	36.513	G11 (Azoxystrobin)	4302.979	1.000



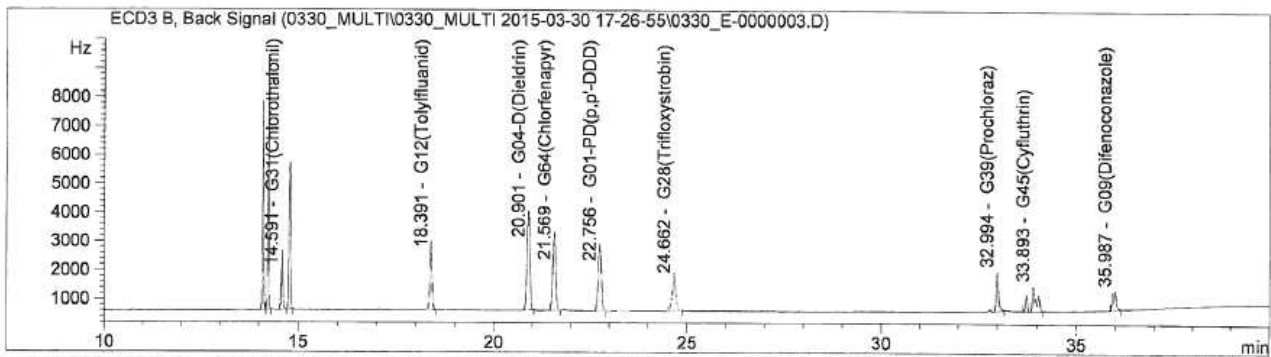
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	10.561	G54 (Etridiazole)	1620.926	1.088
2	13.533	G03-a (a-BHC)	17209.525	1.030
3	14.065	G03-b (b-BHC)	9259.701	1.148
4	14.893	G03-o (o-BHC)	15268.181	0.831
5	15.253	G07-P (Pentachloroaniline)	19803.287	1.209
6	16.594	G07-M (Methylpentachlorophenyl sulfide)	25044.609	1.226
7	17.052	G04-A (Aldrin)	18845.348	1.222
8	20.279	G26 (Flutolanil)	373.042	0.385
9	20.759	G01-PE (p,p'-DDE)	19451.225	1.279
10	20.889	G25 (Thifluzamide)	13851.601	1.212
11	21.830	G05 (Endrin)	17844.596	1.205
12	22.833	G01-OT (o,p'-DDT)	12811.426	1.115
13	24.760	G01-PT (p,p'-DDT)	14605.324	1.051
14	25.027	G58 (Fluopicolide)	13202.689	1.285
15	28.630	G51 (Bifenthrin)	4262.599	1.133
16	31.007	G37 (Cyhalothrin)-1	5224.507	1.049
17	31.391	G37 (Cyhalothrin)-2	3782.260	1.117
18	32.868	G33 (Fluquinconazole)	3078.797	1.016
19	34.349	G10 (Cypermethrin)	7626.105	1.055
20	36.512	G11 (Azoxystrobin)	7012.896	1.630

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_ECD2.M



#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	0.000	G07-Q(Quintozene)	0.000	0.000
2	0.000	G69(r-BHC,Lindane)	0.000	0.000
3	0.000	G31(Chlorothalonil)	0.000	0.000
4	0.000	G32(Tefluthrin)	0.000	0.000
5	0.000	G12(Tolyfluanid)	0.000	0.000
6	0.000	G04-D(Dieldrin)	0.000	0.000
7	0.000	G64(Chlorfenapyr)	0.000	0.000
8	0.000	G01-PD(p,p'-DDD)	0.000	0.000
9	0.000	G28(Trifloxystrobin)	0.000	0.000
10	0.000	G16(Fenhexamid)	0.000	0.000
11	0.000	G39(Prochloraz)	0.000	0.000
12	0.000	G45(Cyfluthrin)	0.000	0.000
13	0.000	G09(Difenoconazole)	0.000	0.000

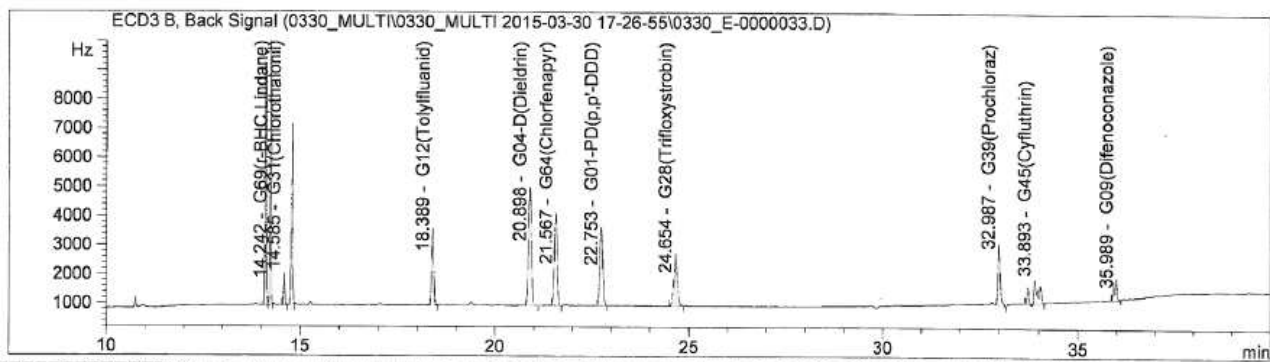
Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_ECD2.M



#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	14.114	G07-Q(Quintozene)	14945.882	1.000
2	14.243	G69(r-BHC,Lindane)	18625.457	1.000
3	14.591	G31(Chlorothalonil)	4928.801	1.000
4	14.785	G32(Tefluthrin)	11873.430	1.000
5	18.391	G12(Tolyfluanid)	9203.260	1.000
6	20.901	G04-D(Dieldrin)	15986.352	1.000
7	21.569	G64(Chlorfenapyr)	13809.473	1.000
8	22.756	G01-PD(p,p'-DDD)	12218.174	1.000
9	24.662	G28(Trifloxystrobin)	3728.088	1.000
10	24.663	G16(Fenhexamid)	3974.667	1.000
11	32.994	G39(Prochloraz)	5272.200	1.000
12	33.893	G45(Cyfluthrin)	7788.994	1.000
13	35.987	G09(Difenoconazole)	4227.714	1.000

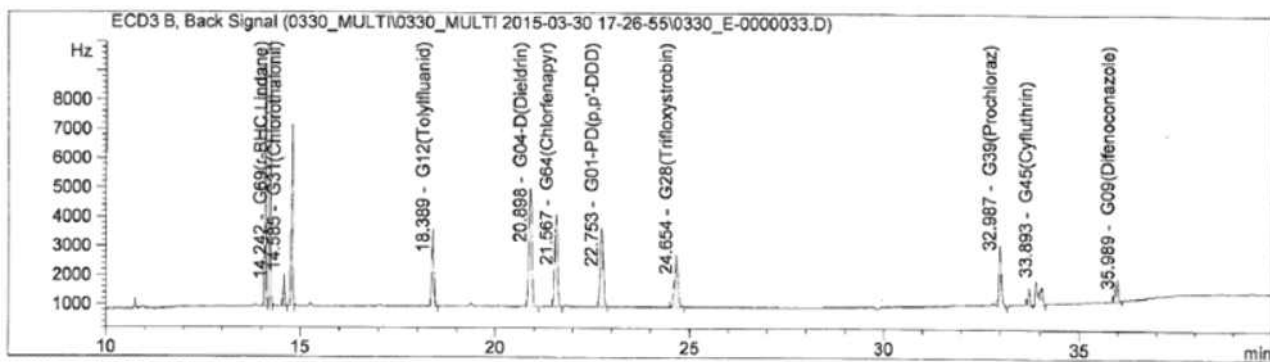


Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_ECD2.M



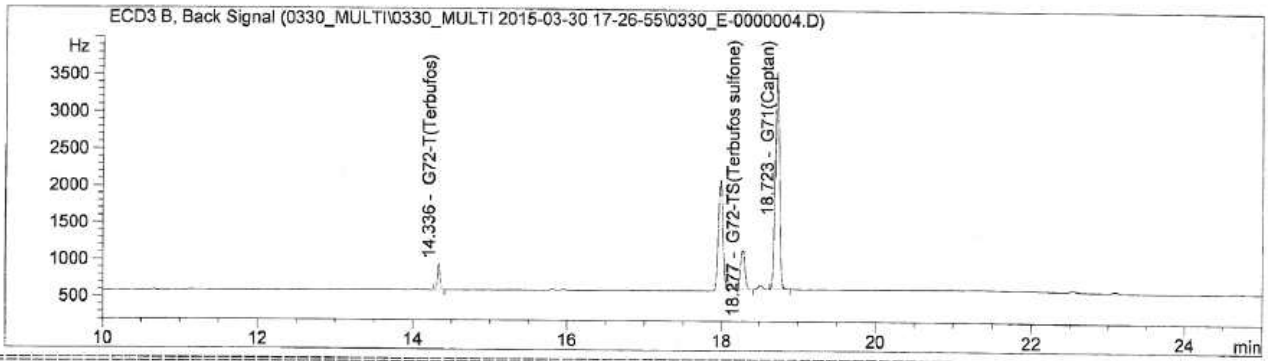
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	14.112	G07-Q(Quintozene)	17245.455	1.154
2	14.242	G69(r-BHC,Lindane)	19691.561	1.057
3	14.585	G31(Chlorothalonil)	2380.695	0.483
4	14.783	G32(Tefluthrin)	14347.658	1.208
5	18.389	G12(Tolyfluand)	9990.939	1.086
6	20.898	G04-D(Dieldrin)	19224.330	1.203
7	21.567	G64(Chlorfenapyr)	15894.123	1.151
8	22.753	G01-PD(p,p'-DDD)	13916.533	1.139
9	24.654	G16(Fenhexamid)	5451.808	1.372
10	24.654	G28(Trifloxystrobin)	5501.202	1.476
11	32.987	G39(Prochloraz)	7647.697	1.451
12	33.893	G45(Cyfluthrin)	7703.876	0.989
13	35.989	G09(Difenoconazole)	4203.139	0.994

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_ECD2.M



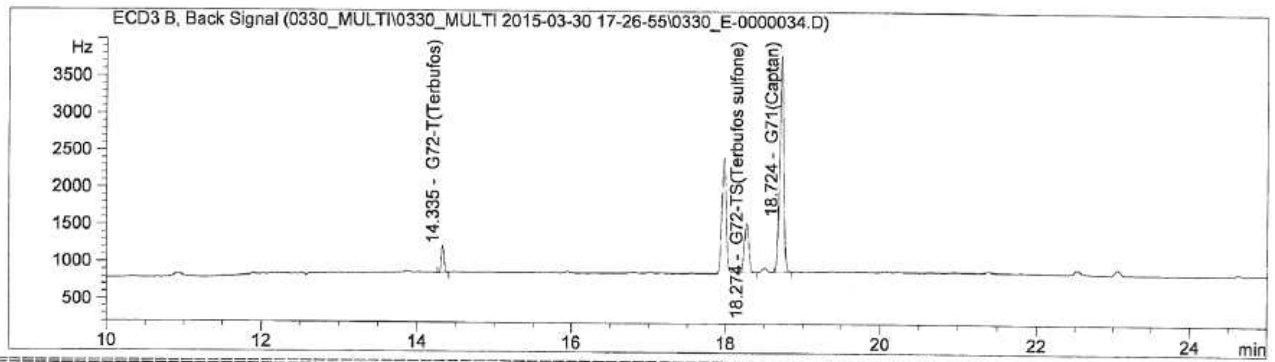
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	14.112	G07-Q(Quintozene)	17245.455	1.154
2	14.242	G69(r-BHC,Lindane)	19691.561	1.057
3	14.585	G31(Chlorothalonil)	2380.695	0.483
4	14.783	G32(Tefluthrin)	14347.658	1.208
5	18.389	G12(Tolyfluand)	9990.939	1.086
6	20.898	G04-D(Dieldrin)	19224.330	1.203
7	21.567	G64(Chlorfenapyr)	15894.123	1.151
8	22.753	G01-PD(p,p'-DDD)	13916.533	1.139
9	24.654	G16(Fenhexamid)	5451.808	1.372
10	24.654	G28(Trifloxystrobin)	5501.202	1.476
11	32.987	G39(Prochloraz)	7647.697	1.451
12	33.893	G45(Cyfluthrin)	7703.876	0.989
13	35.989	G09(Difenoconazole)	4203.139	0.994

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_ECD3.M



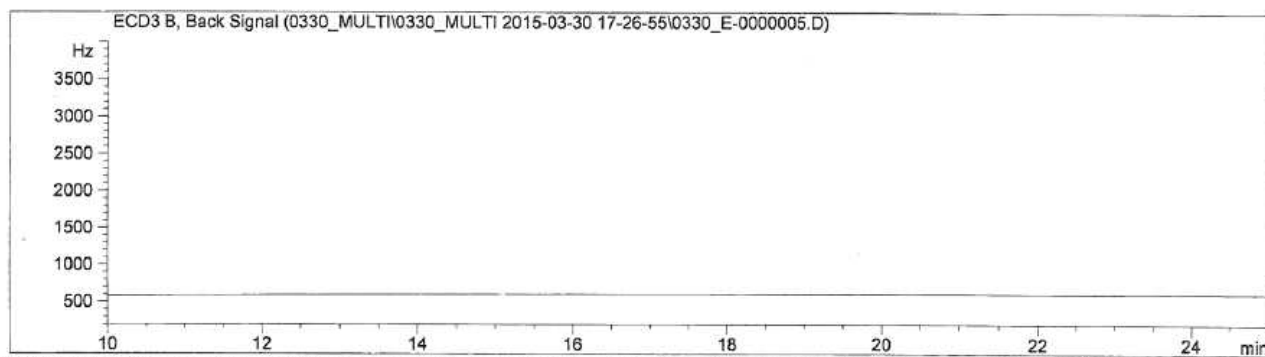
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	14.336	G72-T (Terbufos)	829.476	1.000
2	18.277	G72-TS (Terbufos sulfone)	2053.330	1.000
3	18.723	G71 (Captan)	11104.876	1.000

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_ECD3.M



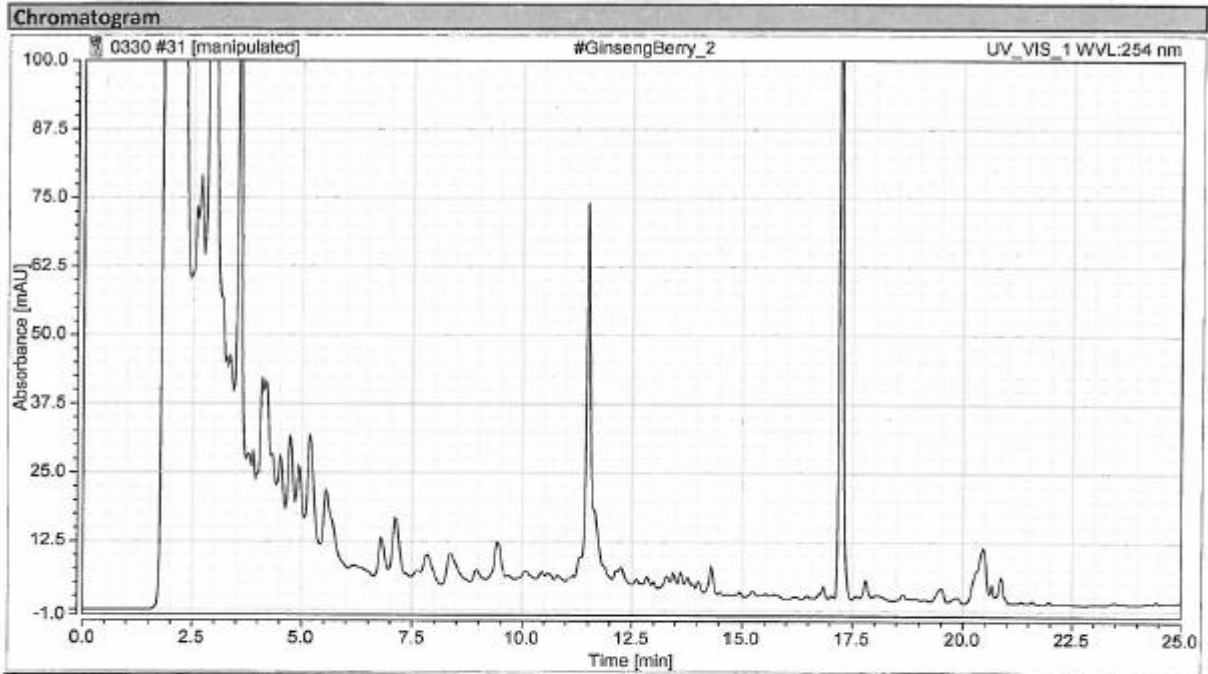
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	14.335	G72-T (Terbufos)	932.953	1.125
2	18.274	G72-TS (Terbufos sulfone)	2587.326	1.260
3	18.724	G71 (Captan)	10762.315	0.969

Analysis Method : D:\GC\_2015\0330\_MULTI\0330\_MULTI 2015-03-30 17-26-55\0330\_ECD3.M



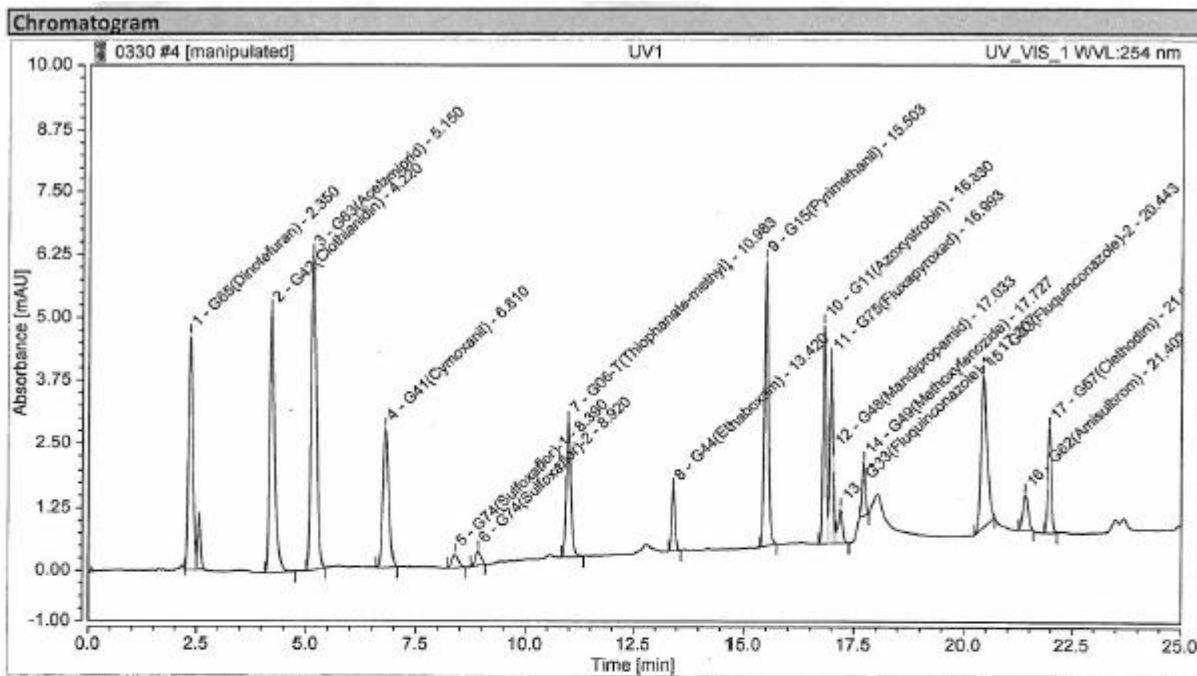
#	Meas. Ret	Compound Name	Area	Amount
1	0.000	G72-T (Terbufos)	0.000	0.000
2	0.000	G72-TS (Terbufos sulfone)	0.000	0.000
3	0.000	G71 (Captan)	0.000	0.000





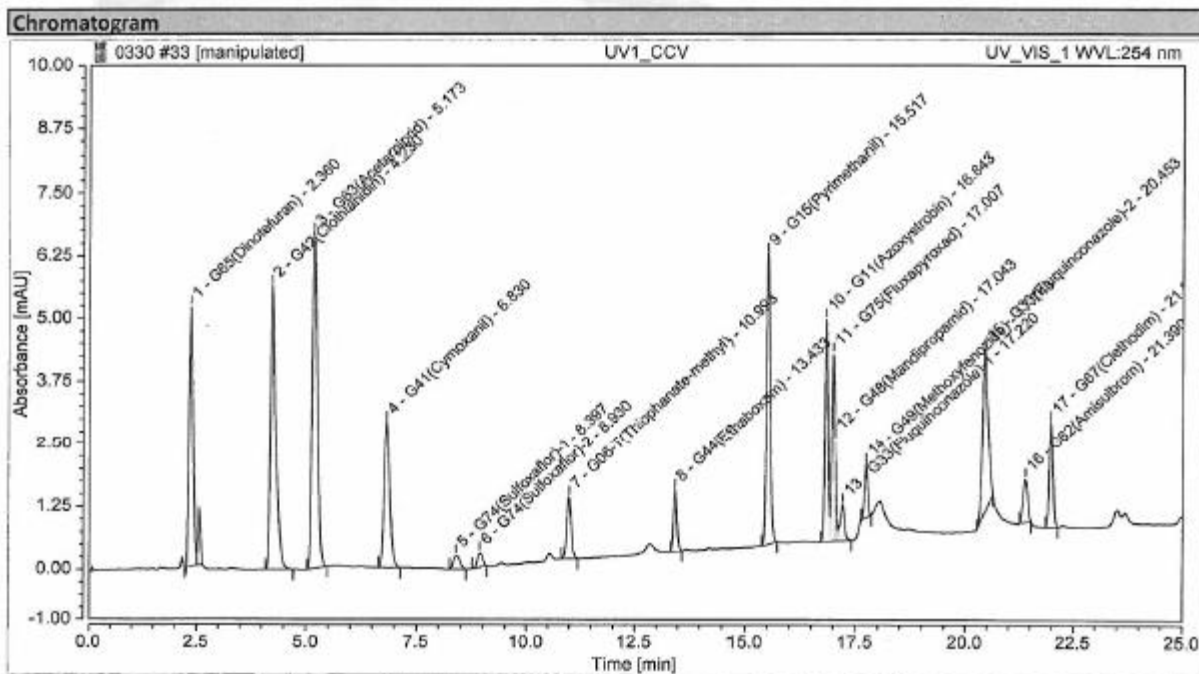
**Integration Results**

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
n.a.	G65(Dinotefuran)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G42(Clothianidin)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G63(Acetamiprid)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G41(Cymoxanil)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G74(Sulfoxaflor)-1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G74(Sulfoxaflor)-2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G06-T(Thiophanate-meth)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G44(Ethaboxam)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G15(Pyrimethanil)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G11(Azoxystrobin)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G75(Fluxapyroxad)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G48(Mandipropamid)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G33(Fluquinconazole)-1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G49(Methoxyfenozide)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G33(Fluquinconazole)-2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G62(Amisulbrom)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	G67(Clethodim)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Total:</b>			<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	



**Integration Results**

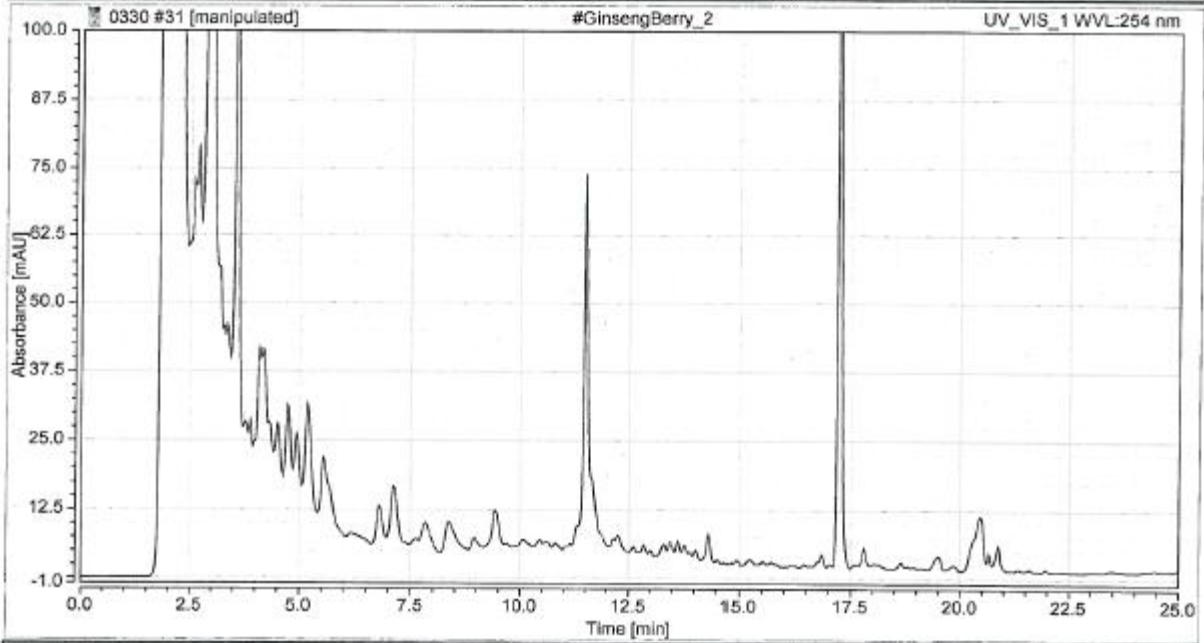
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	G65(Dinotefuran)	2.350	0.531	4.626	10.19	10.10	1.0000
2	G42(Clothianidin)	4.220	0.702	5.169	13.49	11.28	1.0000
3	G63(Acetamiprid)	5.150	0.898	6.223	17.25	13.58	1.0000
4	G41(Cymoxanil)	6.810	0.433	2.719	8.31	5.94	1.0000
5	G74(Sulfoxaflor)-1	8.390	0.044	0.261	0.84	0.57	1.0000
6	G74(Sulfoxaflor)-2	8.920	0.041	0.278	0.79	0.61	1.0000
7	G08-T(Thiophanate-meth)	10.983	0.320	2.644	6.15	5.77	1.0000
8	G44(Ethaboxam)	13.420	0.109	1.231	2.09	2.69	1.0000
9	G15(Pyrimethanil)	15.503	0.573	5.623	11.00	12.27	1.0000
10	G11(Azoxystrobin)	16.830	0.360	4.293	6.91	9.37	1.0000
11	G75(Fluxapyroxad)	16.993	0.261	3.619	5.00	7.90	1.0000
12	G48(Mandipropamid)	17.033	0.043	1.730	0.82	3.78	1.0000
13	G33(Fluquinconazole)-1	17.207	0.077	0.687	1.49	1.50	1.0000
14	G49(Methoxyfenozide)	17.727	0.082	1.005	1.57	2.19	1.0000
15	G33(Fluquinconazole)-2	20.443	0.448	2.956	8.56	6.45	1.0000
16	G62(Amisulbrom)	21.403	0.096	0.698	1.84	1.52	1.0000
17	G67(Clethodim)	21.967	0.194	2.046	3.72	4.47	1.0000
<b>Total:</b>			<b>5.209</b>	<b>45.808</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	



**Integration Results**

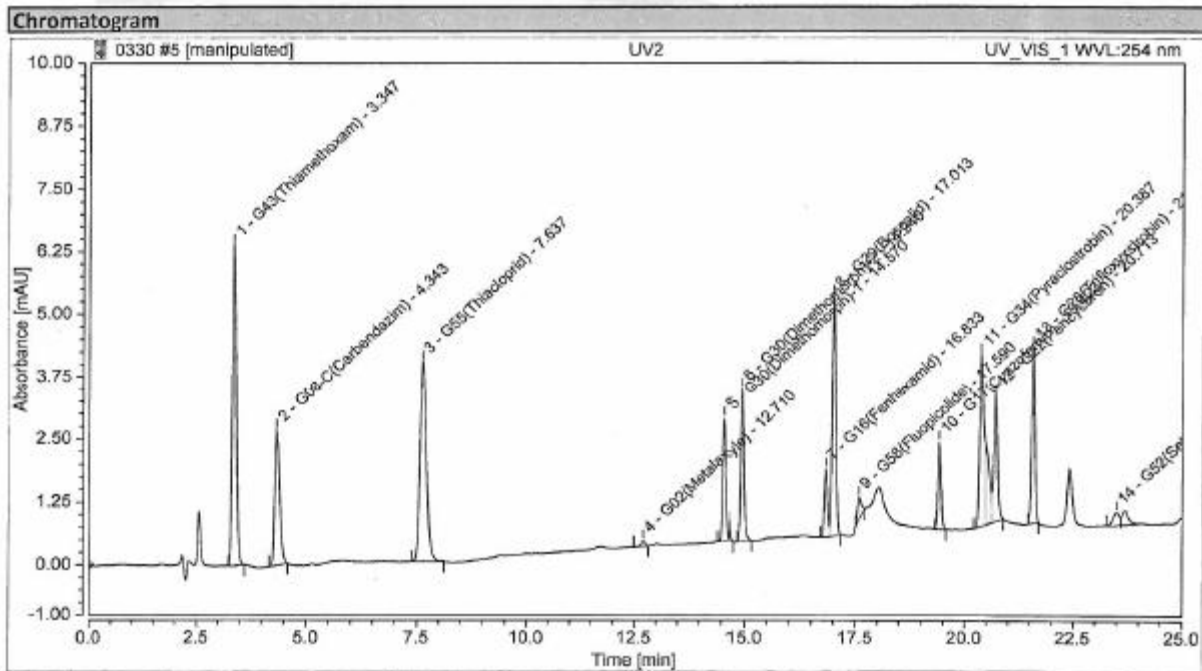
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	G65(Dinotefuran)	2.360	0.542	5.169	10.36	10.92	1.0199
2	G42(Clothianidin)	4.230	0.801	5.645	15.31	11.93	1.1396
3	G63(Acetamiprid)	5.173	0.923	6.666	17.66	14.09	1.0278
4	G41(Cymoxanil)	6.830	0.440	2.903	8.42	6.13	1.0176
5	G74(Sulfoxaflor)-1	8.397	0.045	0.273	0.85	0.58	1.0148
6	G74(Sulfoxaflor)-2	8.930	0.038	0.283	0.73	0.60	0.9364
7	G06-T(Thiophanate-meth)	10.993	0.140	1.212	2.68	2.56	0.4380
8	G44(Ethaboxam)	13.433	0.105	1.211	2.02	2.56	0.9677
9	G15(Pyrimethanil)	15.517	0.584	5.786	11.17	12.23	1.0197
10	G11(Azoxystrobin)	16.843	0.368	4.422	7.04	9.34	1.0225
11	G75(Fluxapyroxad)	17.007	0.259	3.732	4.95	7.89	0.9941
12	G48(Mandipropamid)	17.043	0.051	2.059	0.97	4.35	1.1928
13	G33(Fluquinconazole)-1	17.220	0.081	0.712	1.54	1.50	1.0397
14	G49(Methoxyfenozide)	17.743	0.088	1.050	1.68	2.22	1.0773
15	G33(Fluquinconazole)-2	20.453	0.462	3.237	8.84	6.84	1.0372
16	G62(Amisulbrom)	21.390	0.103	0.857	1.97	1.81	1.0771
17	G67(Clethodim)	21.977	0.196	2.106	3.79	4.45	1.0215
<b>Total:</b>			<b>5.229</b>	<b>47.322</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	

**Chromatogram**



**Integration Results**

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount mg/ml
n.a	G43(Thiamethoxam)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G06-C(Carbendazim)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G55(Thiacloprid)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G02(Metalaxyle)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G30(Dimethomorph)-1	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G30(Dimethomorph)-2	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G16(Fenhexamid)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G29(Boscalid)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G58(Fluopicolide)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G17(Cyazofamid)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G34(Pyraclostrobin)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G22(Pencycuron)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G28(Trifloxystrobin)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G52(Sethoxydim)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
<b>Total:</b>			<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	



**Integration Results**

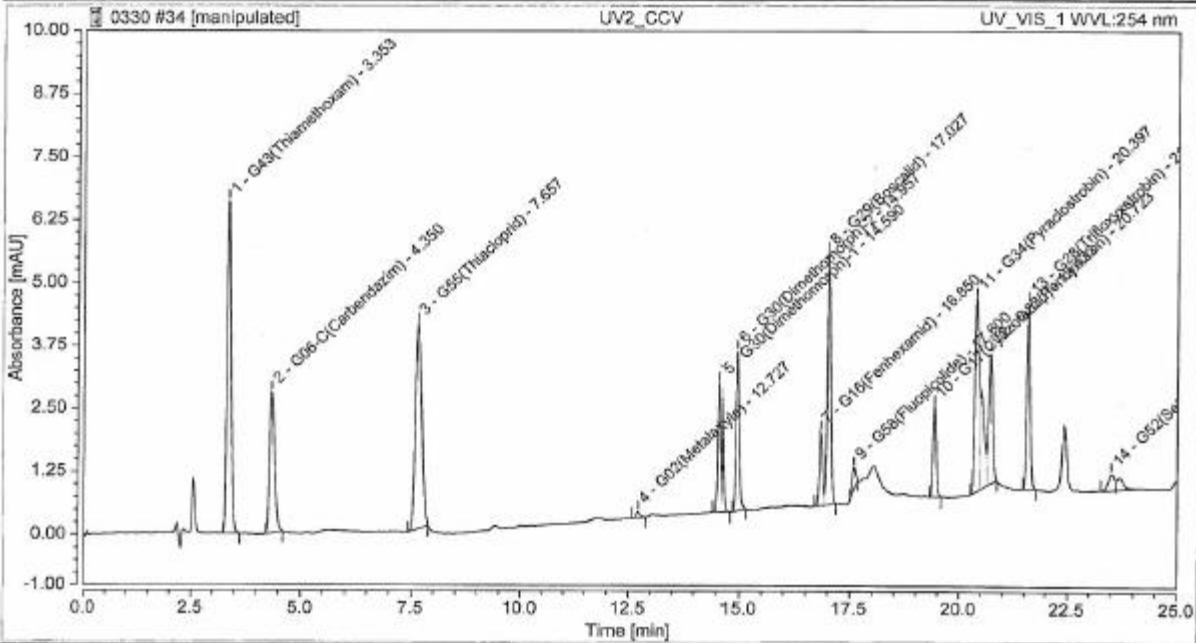
No	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount mg/ml
1	G43(Thiamethoxam)	3.347	0.647	6.403	16.81	17.46	1.0000
2	G06-C(Carbendazim)	4.343	0.342	2.680	8.89	7.31	1.0000
3	G55(Thiacloprid)	7.637	0.683	3.986	17.75	10.87	1.0000
4	G02(Metalaxyle)	12.710	0.011	0.111	0.30	0.30	1.0000
5	G30(Dimethomorph)-1	14.570	0.208	2.452	5.41	6.89	1.0000
6	G30(Dimethomorph)-2	14.940	0.262	3.038	6.82	8.29	1.0000
7	G16(Fenhexamid)	16.833	0.116	1.350	3.00	3.68	1.0000
8	G29(Boscalid)	17.013	0.416	4.776	10.81	13.03	1.0000
9	G58(Fluopicolide)	17.590	0.043	0.434	1.11	1.18	1.0000
10	G17(Cyazofamid)	19.423	0.138	1.726	3.59	4.71	1.0000
11	G34(Pyraclostrobin)	20.387	0.375	3.425	9.74	9.34	1.0000
12	G22(Pencycuron)	20.713	0.251	2.525	6.52	6.89	1.0000
13	G28(Trifloxystrobin)	21.577	0.313	3.505	8.14	9.56	1.0000
14	G52(Sethoxydim)	23.500	0.043	0.256	1.11	0.70	1.0000
<b>Total:</b>			<b>3.847</b>	<b>36.667</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	

## Chromatogram and Results

### Injection Details

Injection Name:	UV2_CCV	Run Time (min):	37.00
Vial Number:	RE8	Injection Volume:	30.00
Injection Type:	Check Standard	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	254.0
Instrument Method:	2013_KOFPI_Multi	Bandwidth:	4
Processing Method:	0330_UV2	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	31-3-15 16:47	Sample Weight:	1.0000

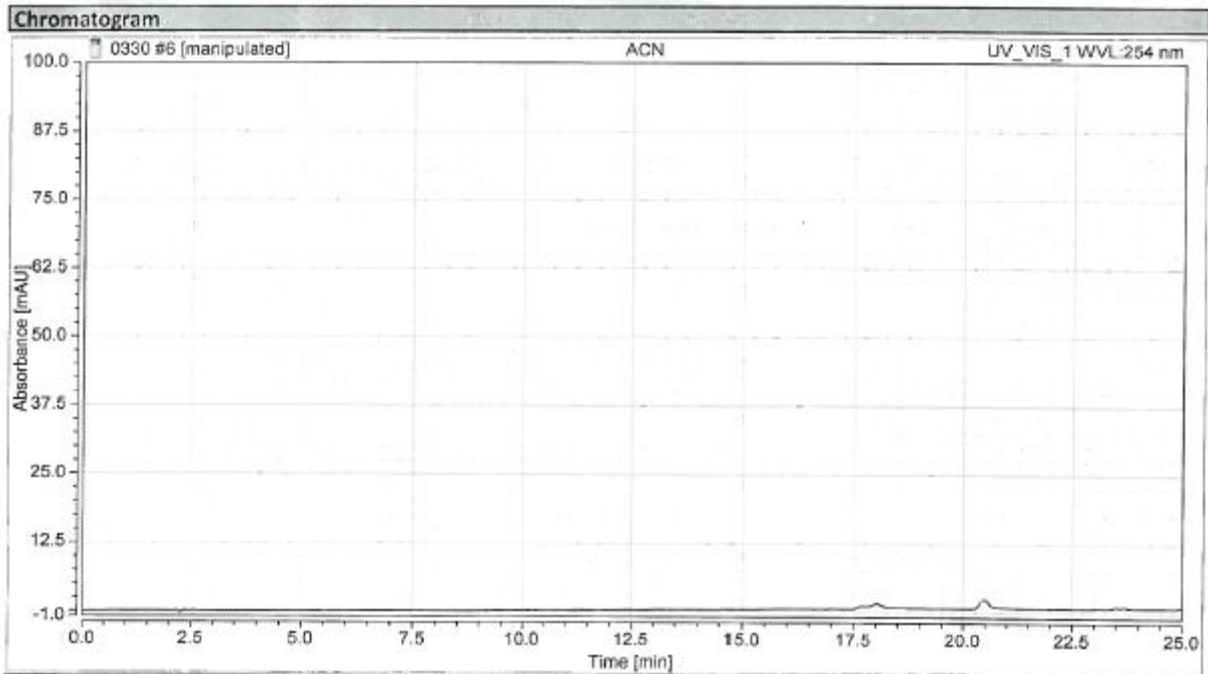
### Chromatogram



### Integration Results

No	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount mg/ml
1	G43(Thiamethoxam)	3.353	0.675	6.598	16.96	17.18	1.0450
2	G06-C(Carbendazim)	4.350	0.353	2.797	8.85	7.28	1.0321
3	G55(Thiacloprid)	7.657	0.672	4.079	16.87	10.62	0.9847
4	G02(Metalaxyle)	12.727	0.012	0.117	0.29	0.30	1.0239
5	G30(Dimethomorph)-1	14.590	0.217	2.553	5.45	6.65	1.0441
6	G30(Dimethomorph)-2	14.957	0.271	3.162	6.79	8.23	1.0319
7	G16(Fenhexamid)	16.850	0.123	1.452	3.09	3.78	1.0864
8	G29(Boscalid)	17.027	0.434	4.987	10.89	12.98	1.0434
9	G58(Fluopicolide)	17.600	0.038	0.427	0.96	1.11	0.8949
10	G17(Cyazofamid)	19.433	0.143	1.796	3.60	4.68	1.0375
11	G34(Pyraclostrobin)	20.397	0.414	3.824	10.38	9.95	1.1044
12	G22(Pericycureon)	20.723	0.247	2.599	6.19	6.77	0.9845
13	G28(Trifloxystrobin)	21.590	0.332	3.694	8.34	9.62	1.0614
14	G52(Sethoxydim)	23.507	0.054	0.326	1.35	0.85	1.2549
<b>Total:</b>			<b>3.987</b>	<b>38.411</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	





**Integration Results**

No	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount mg/ml
n.a	G43(Thiamethoxam)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G06-C(Carbendazim)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G55(Thiacloprid)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G02(Metaxyle)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G30(Dimethomorph)-1	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G30(Dimethomorph)-2	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G16(Fenhexamid)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G29(Boscalid)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G59(Fluopicolide)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G17(Cyazofamid)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G34(Pyraclostrobin)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G22(Penbycuron)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G28(Trifloxystrobin)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
n.a	G52(Sethoxydim)	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
<b>Total:</b>			<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	

## [Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, F<sub>4</sub> 분리 화학구조 동정]

### 가. Prosapogenin 성분(ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, F<sub>4</sub>) 분리 화학구조 동정

#### 1. 실험 재료 및 엑스의 조제

##### 1) 실험 재료

본 연구에 사용한 인삼열매(Ginseng berry, *Panax ginseng*)는 충청북도 음성에서 2013년 7월 20일에 4년근 인삼열매 10kg을 채집하였고, 건조는 음성의 충북인삼영농조합법인(대표 : 남성엽)에서 시행하였다. 각각의 제품표본은 고연 연구실에 보관하고 있다. (Fig. 1.)



Fig. 1. Photograph of Korean ginseng berry

##### 2) 엑스의 조제

위의 시료를 세말하였고 시료 100 kg의 인삼열매를 약 70℃에서 95% ethyl alcohol (600L)로 2시간씩 2회 추출하여 여액을 모아 감압 농축하여 동결건조하여 95% EtOH 엑스 26 kg을 얻었다. (scheme. 1.)

##### 3) 초음파 처리 인삼열매 조성물 조제

인삼열매 ethyl alcohol 엑스 각각 25 kg에 증류수 200 ℓ를 가하여 초음파발생기에 넣고, 100℃에서 10시간 초음파 처리를 시행하였다.

##### 4) 초음파 처리 인삼열매 조성물로부터 주 사포닌의 분리

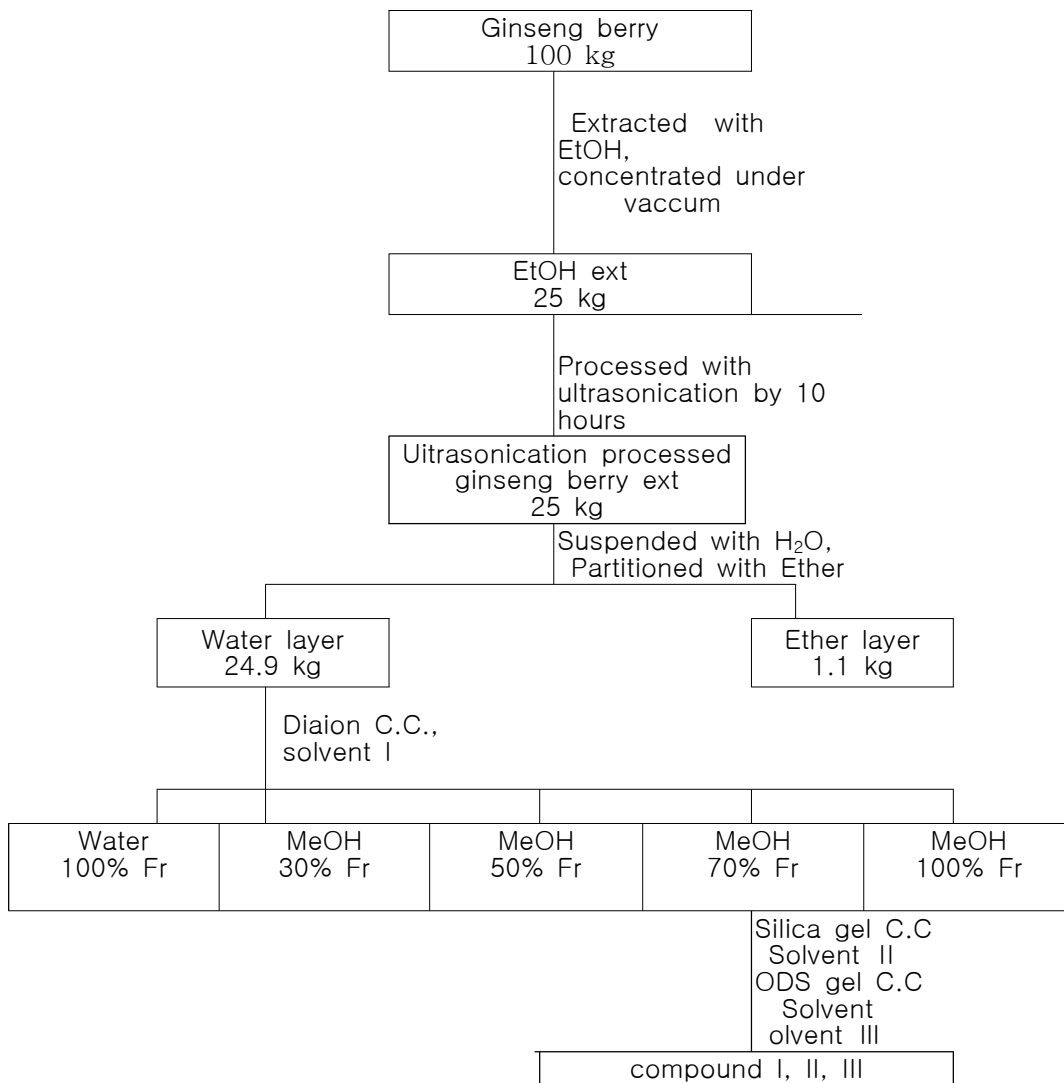
###### (1) 초음파 처리 인삼열매 조성물로부터 사포닌 분획의 추출

초음파 처리 인삼열매 조성물 25 kg을 증류수에 현탁하여 분획 깔때기에 넣고 Diethyl Ether 넣어 shaking 하여 진탕하고 방치한 후 Ether를 제거한다. 이 방법을 10회 처리하여 Diethyl Ether 분획(1.1 kg), 물 분획(24.9 kg)을 얻었다.



(2) 초음파 처리 인삼열매 조성물로부터 사포닌 분획과 인삼사포닌의 분리

위의 수가용성 분획을 증류수에 현탁하여 Diaion column에 흡착시킨 후 30% methanol 분획, 50% methanol 분획, 70% methanol 분획, 100% methanol 분획을 하였고, 50% methanol 분획 10g을 silica gel column에 [CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 70:30:4 v/v]로 로딩하여 F1 - F4를 얻었다. 위에서 얻은 F3로 ODS gel column에 전개 용매 50% methanol로 전개하여 Compound I - IV를 얻었다. (scheme. 1.)



Scheme 1. Extraction and Isolation ginsenosides from ginseng berry

\*Solvent I : 30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH, 100% MeOH 순차적으로 치환

\*Solvent II : CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 7:3:1 v/v

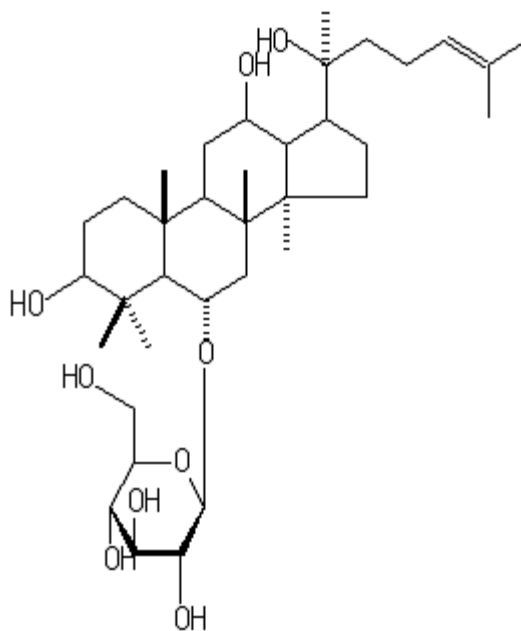
\*Solvent III : 70% MeOH, 100% MeOH 순차적으로 치환

### (3) 인삼열매로부터 주 사포닌의 화학구조 동정

#### ① Compound I의 화학구조 동정

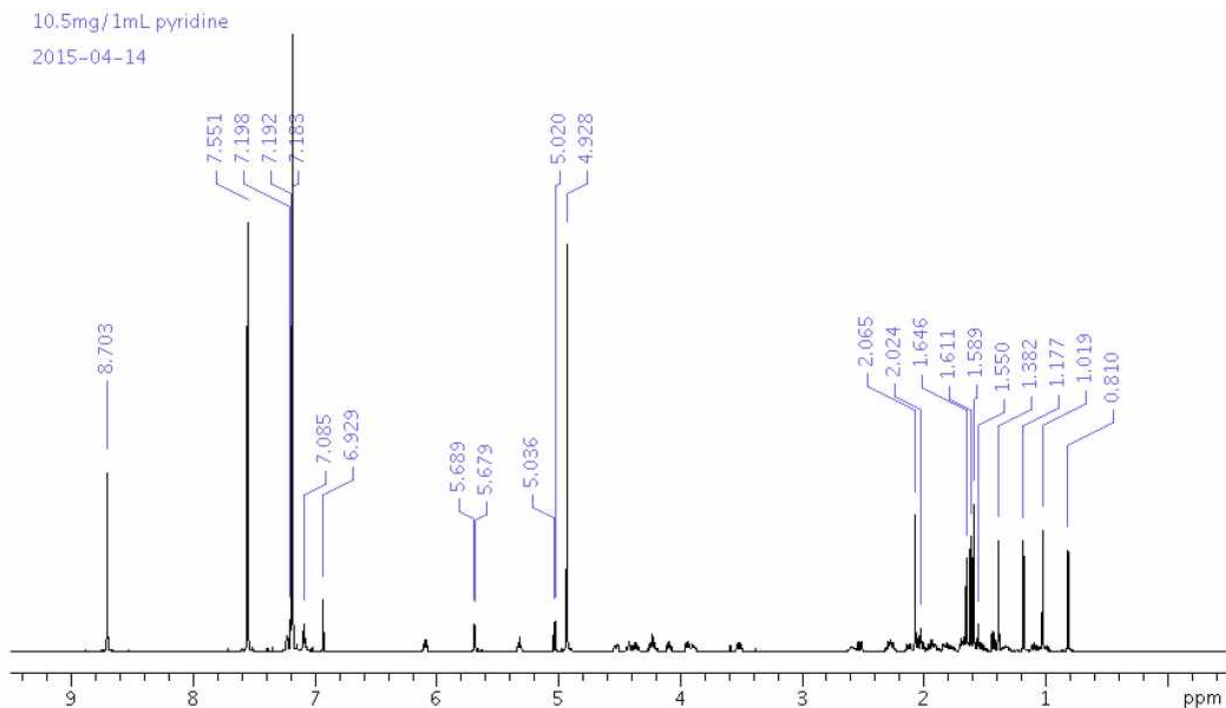
Compound I의 TLC Rf값은 0.6 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 70 : 30 : 4/\text{kieselgel 60 F254 Merk}$ )이고, UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 묶은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서는  $\delta$  0.81ppm으로부터  $\delta$  2.07ppm까지 8개의 methyl signal이 나타나고 있으며,  $\delta$  3.52ppm에서의 doublet은 H-3의 proton임을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서는 C-24와 C-25가 126.12ppm과 130.56ppm의 저자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는 C-1'가 105.85ppm에서 확인되었고, C-22는 35.62ppm에서 확인되었다. 이러한 결과들은 인삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 (20S)-ginsenoside Rh1의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, Compound I을 (20S)-ginsenoside Rh1으로 동정하였다.

Fig. . Chemical structures of compound I



compound I : ginsenoside-Rh1

### $^1\text{H-NMR}$ spectra of compound I ( $\text{d}_5\text{-Py}$ )



### $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of compound I ( $\text{d}_5\text{-Py}$ )

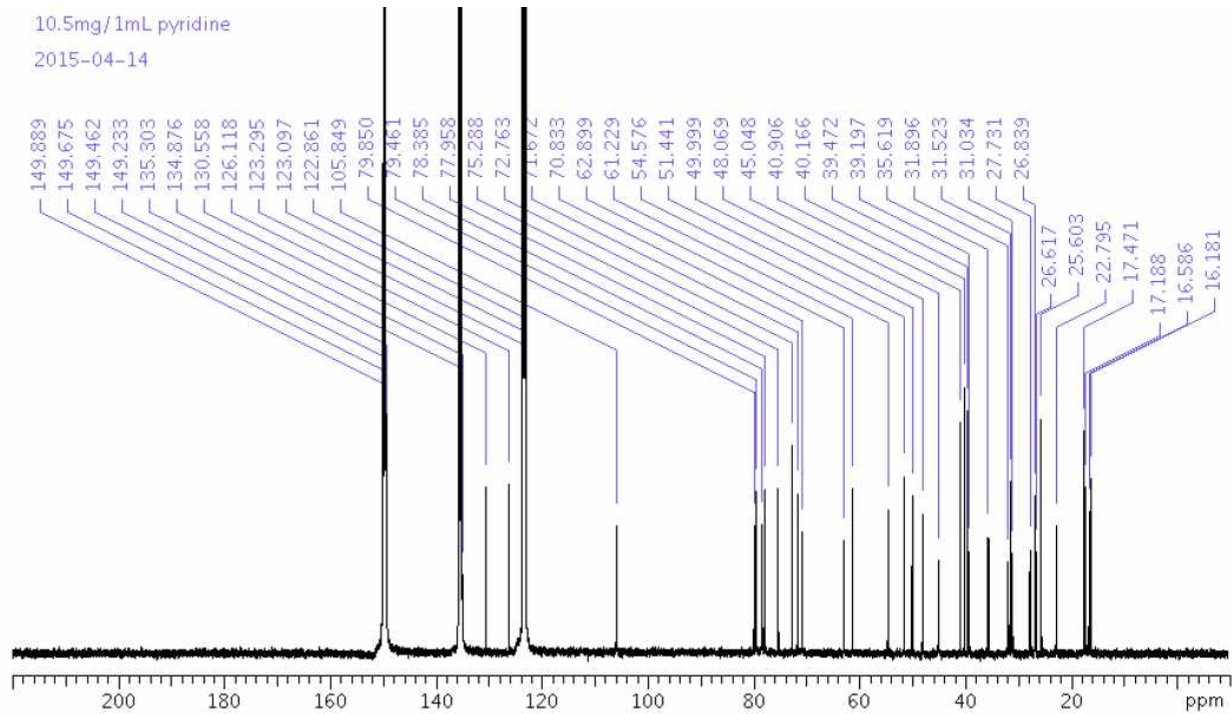


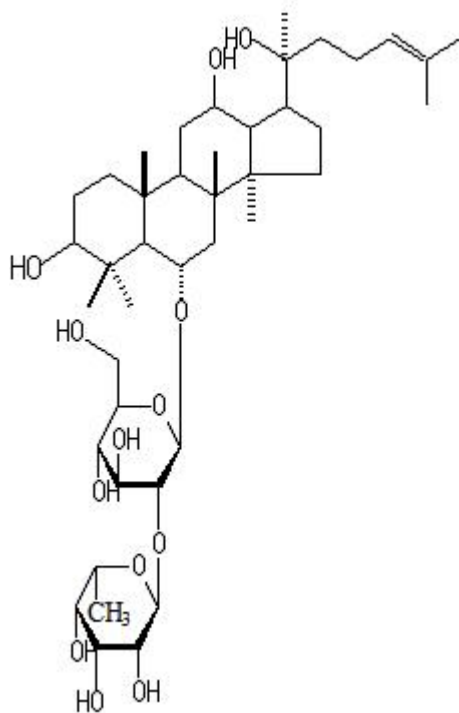
Table. 1. Chemical shifts of compound I in  $^{13}\text{C}$ -NMR

Carbon No.	G-Rh1	Compound I
C-1	39.40	39.197
C-2	27.70	27.731
C-3	78.60	78.385
C-4	40.30	40.166
C-5	61.40	61.229
C-6	78.10	77.958
C-7	45.10	45.048
C-8	41.00	40.906
C-9	50.10	49.999
C-10	39.60	39.472
C-11	32.10	31.896
C-12	70.90	70.833
C-13	48.70	48.069
C-14	51.70	51.441
C-15	31.30	31.034
C-16	26.60	26.617
C-17	50.50	50.50
C-18	17.30	17.188
C-19	17.60	17.471
C-20	73.00	72.763
C-21	22.70	22.795
C-22	43.20	43.20
C-23	22.50	22.795
C-24	126.00	126.118
C-25	130.70	130.558
C-26	25.80	25.603
C-27	17.70	17.471
C-28	31.50	31.523
C-29	16.40	16.181
C-30	16.80	16.586
6-Glc 1	106.00	105.849
6-Glc 2	75.40	75.288
6-Glc 3	80.00	79.850
6-Glc 4	71.90	71.672
6-Glc 5	79.60	79.461
6-Glc 6	63.10	62.899

## ② Compound II의 화학구조 동정

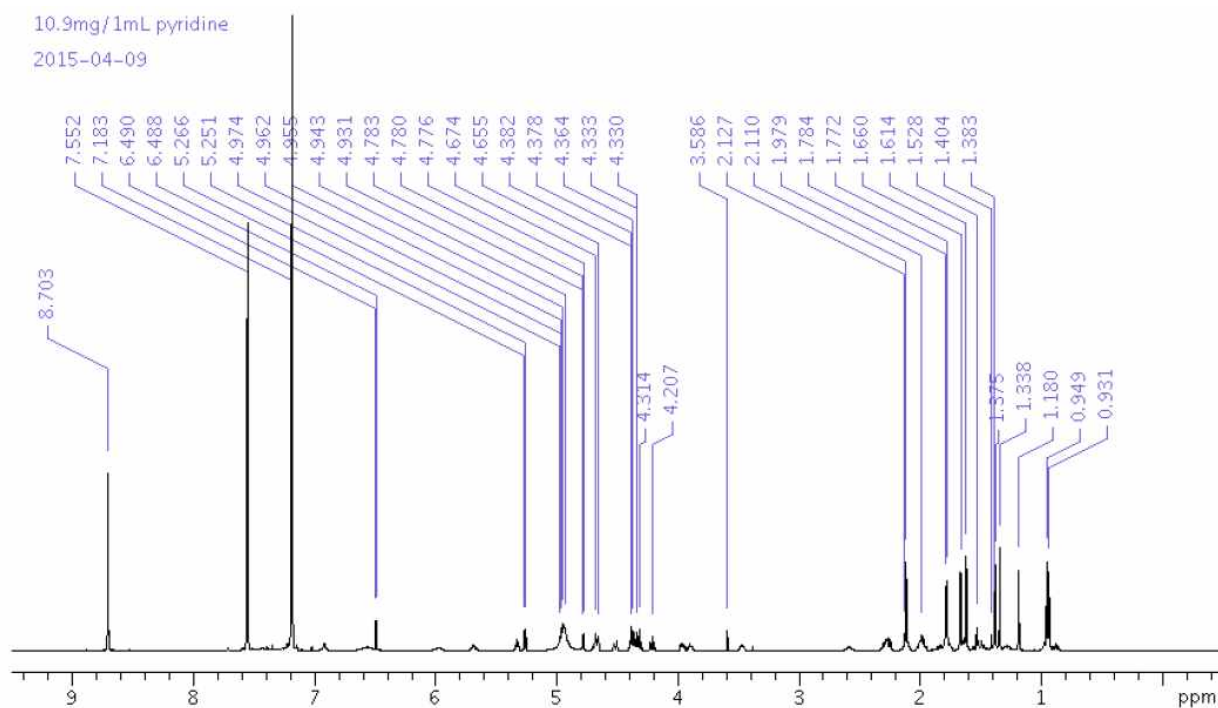
Compound II의 TLC Rf값은 0.39 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} = 70 : 30 : 4/\text{kieselgel 60 F254 Merk}$ )이고, UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 묶은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서는  $\delta$  0.93ppm으로부터  $\delta$  2.13ppm까지 8개의 methyl signal이 나타나고 있으며,  $\delta$  3.59ppm에서의 doublet은 H-3의 proton임을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서는 C-24와 C-25가 126.15ppm과 130.55ppm의 저자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는 C-1', C-1''가 101.77ppm에서 확인되었고, C-22는 35.58ppm에서 확인되었다. 이러한 결과들은 인삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 (20S)-ginsenoside Rg2의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, Compound I을 (20S)-ginsenoside Rg2으로 동정하였다.

Fig. . Chemical structures of compound II



compound II: ginsenoside-Rg2

### $^1\text{H-NMR}$ spectra of compound II ( $\text{d}_5\text{-Py}$ )



### $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of compound II ( $\text{d}_5\text{-Py}$ )

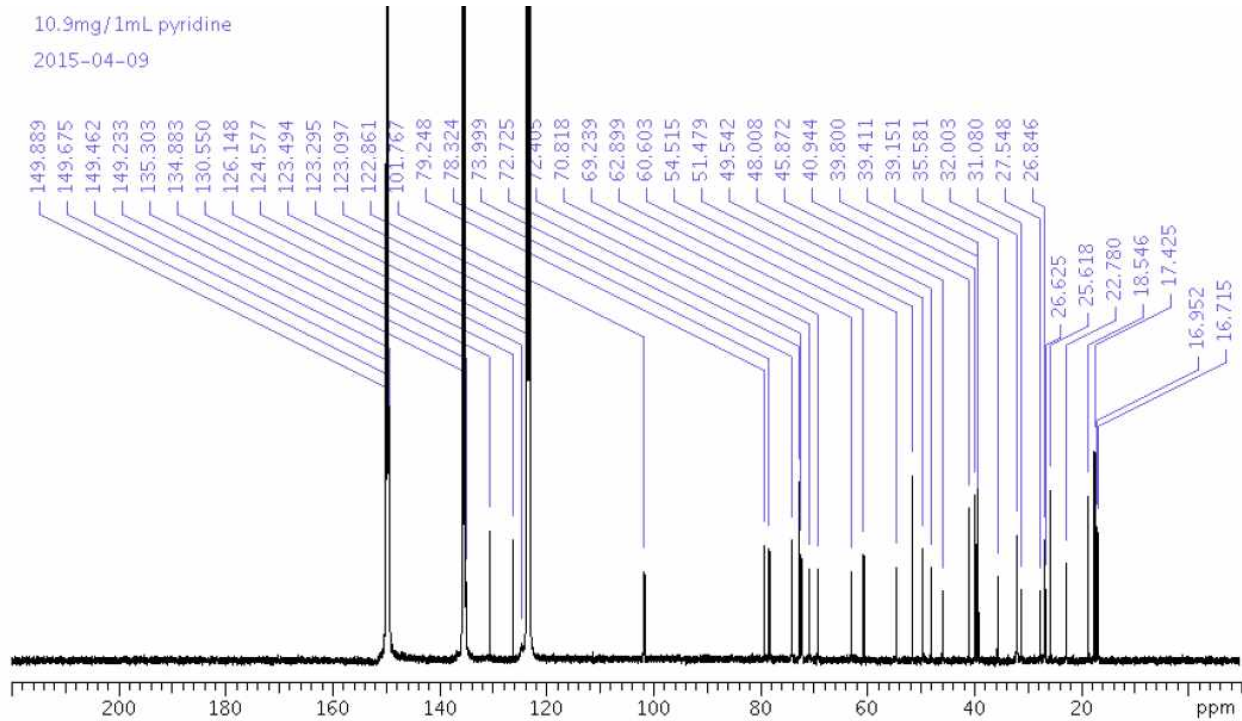


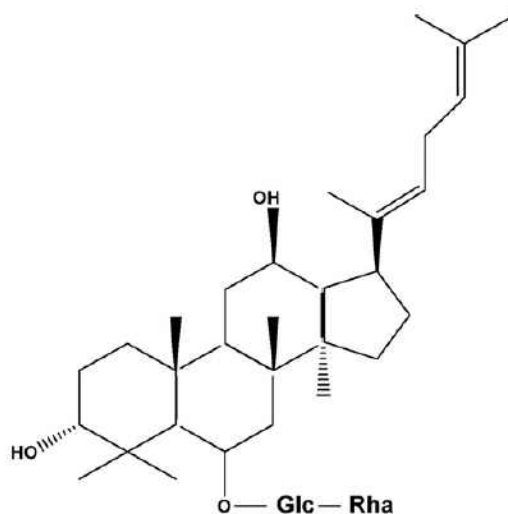
Table. 1. Chemical shifts of compound II in  $^{13}\text{C}$ -NMR

Carbon No.	G-Rg2	Compound II
C-1	39.46	39.411
C-2	26.88	26.846
C-3	78.36	78.324
C-4	39.87	39.800
C-5	60.65	60.603
C-6	74.14	74.083
C-7	45.95	45.872
C-8	40.99	40.944
C-9	49.59	49.542
C-10	39.20	39.151
C-11	31.14	31.080
C-12	70.89	70.818
C-13	48.02	48.008
C-14	51.54	51.479
C-15	31.92	32.003
C-16	26.69	26.625
C-17	54.55	54.515
C-18	17.49	17.425
C-19	17.53	17.471
C-20	72.83	72.725
C-21	22.85	22.780
C-22	35.64	35.583
C-23	22.85	22.780
C-24	126.2	126.148
C-25	130.67	130.55
C-26	25.73	25.618
C-27	17.57	17.57
C-28	32.07	32.053
C-29	17.01	16.952
C-30	16.77	16.715
6-Glc 1	101.66	101.599
6-Glc 2	79.31	79.248
6-Glc 3	78.19	78.118
6-Glc 4	72.42	72.405
6-Glc 5	78.29	78.195
6-Glc 6	62.91	62.899
6-Rha 1	101.87	101.767
6-Rha 2	72.31	72.237
6-Rha 3	72.14	72.084
6-Rha 4	74.03	73.999
6-Rha 5	69.33	69.239
6-Rha 6	18.64	18.546

### ③ Compound III의 화학구조 동정

Compound III의 TLC Rf값은 0.44 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 70 : 30 : 4/kieselgel 60 F254 Merk)이고, UV 램프(254, 365 nm)하에서 아무 반점을 확인할 수 없었으나, 물은 황산으로 가열하여 적자색으로 발색됨으로서 인삼사포닌으로 추정할 수 있었으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 δ 0.95ppm으로부터 δ 2.11ppm까지 8개의 methyl singnal이 나타나고 있으며, δ 2.75ppm에서의 doublet은 H-3의 proton임을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 C-20와 C-25가 139.93ppm과 131.05ppm의 저자장에서 확인되었으며, 당으로부터 기인하는 C-1', C-1"가 101.62ppm와 101.74ppm에서 확인되었다. 이러한 결과들은 인삼(*Panax ginseng*)으로부터 추출 분리되었던 ginsenoside F4의 문헌 data와 일치하였다. 따라서, Compound III을 ginsenoside F4로 동정하였다.

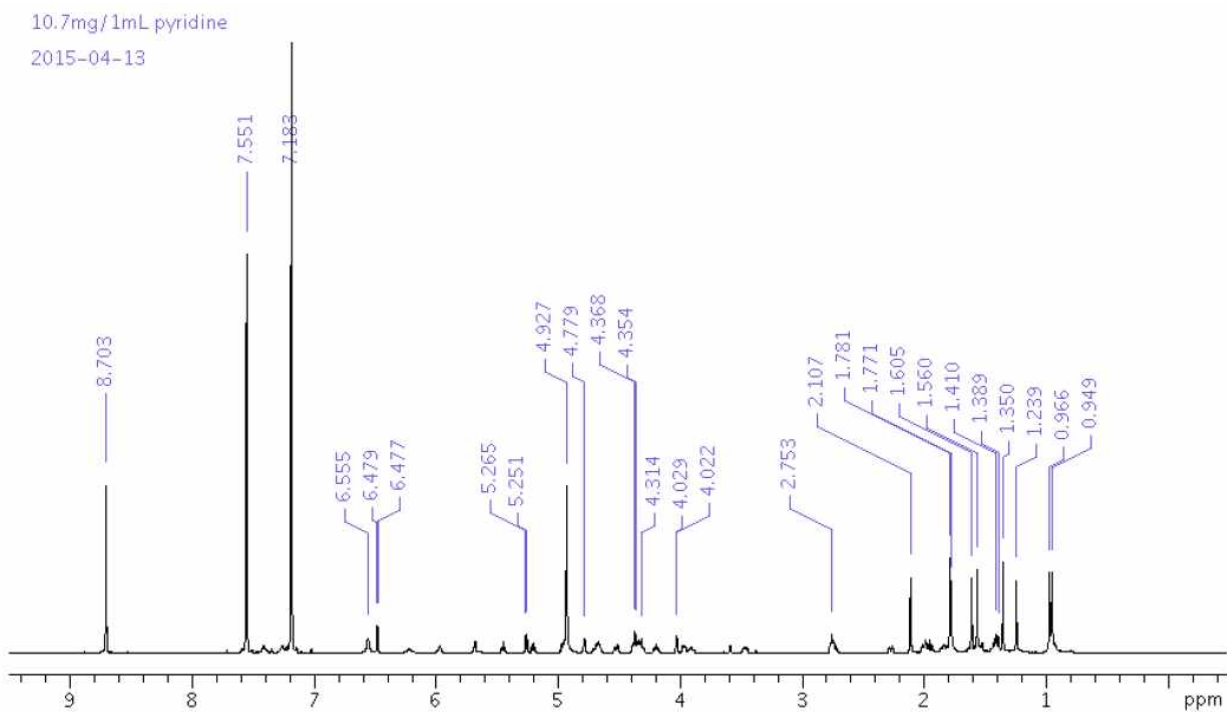
Fig. . Chemical structures of compound III



compound III: ginsenoside F4



$^1\text{H-NMR}$  spectra of compound III ( $\text{d}_5\text{-Py}$ )



$^{13}\text{C-NMR}$  spectra of compound III ( $\text{d}_5\text{-Py}$ )

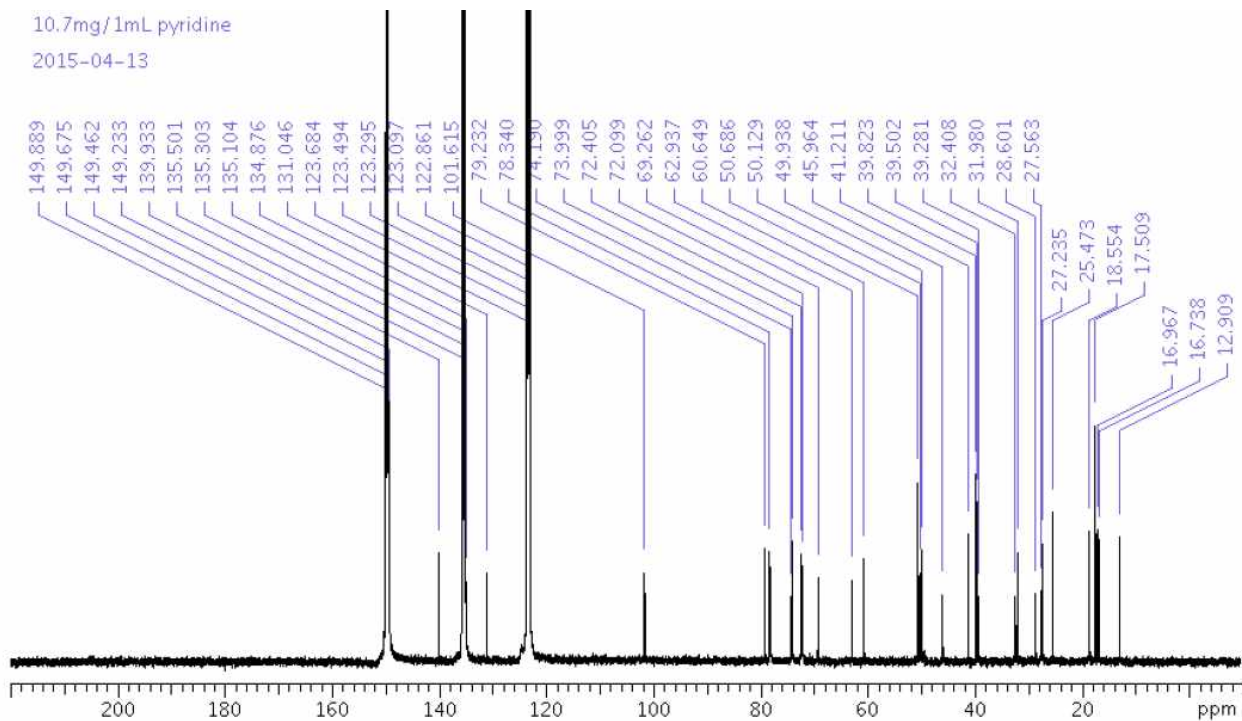


Table. 1. Chemical shifts of compound III in  $^{13}\text{C}$ -NMR

Carbon No.	G-F4	Compound III
C-1	39.40	39.281
C-2	27.70	27.563
C-3	78.50	78.340
C-4	40.00	39.823
C-5	60.80	60.649
C-6	74.30	74.190
C-7	46.10	45.964
C-8	41.40	41.211
C-9	50.10	49.938
C-10	39.60	39.501
C-11	32.10	31.980
C-12	70.40	72.237
C-13	50.30	50.129
C-14	50.60	50.495
C-15	32.60	32.408
C-16	25.70	25.70
C-17	50.80	50.686
C-18	17.70	17.70
C-19	18.70	18.554
C-20	140.10	139.933
C-21	27.40	27.235
C-22	124.30	124.30
C-23	30.10	31.980
C-24	124.80	124.80
C-25	131.20	131.046
C-26	25.60	25.473
C-27	17.60	17.509
C-28	32.60	32.408
C-29	16.90	16.738
C-30	17.10	16.967
6-Glc 1	101.80	101.615
6-Glc 2	79.30	79.30
6-Glc 3	78.30	78.118
6-Glc 4	72.50	72.374
6-Glc 5	78.30	78.118
6-Glc 6	63.10	62.937
6-Rha 1	101.90	101.737
6-Rha 2	72.20	72.099
6-Rha 3	72.40	72.237
6-Rha 4	74.10	73.999
6-Rha 5	69.40	69.262
6-Rha 6	19.10	19.10

## [지표성분 (Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, F<sub>4</sub>) 표준화 (밸리데이션)]

### 가. Prosapogenin 성분(ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, F<sub>4</sub>) 분석법 개발

#### 1. 분석대상 성분

UGBE의 시제품 제작을 위하여 성분표준화가 필요하여 Prosapogenin성분인 ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, F<sub>4</sub>로 표준물질을 선정하였다.

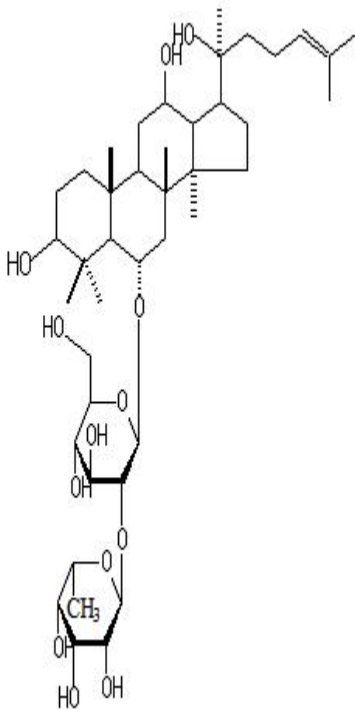


Fig 1. ginsenoside Rg<sub>2</sub>

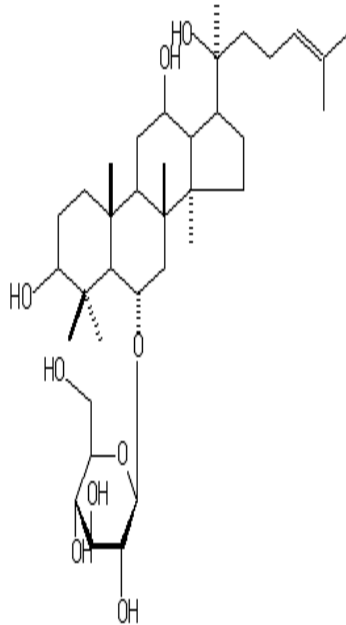


Fig 2. ginsenoside Rh<sub>1</sub>

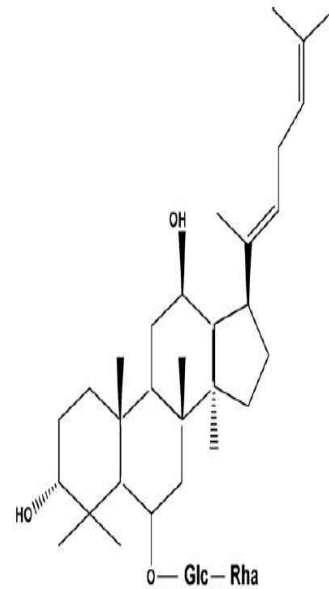


Fig 3. ginsenoside F<sub>4</sub>

#### 2. 재료 및 시약

본 연구에 사용한 표준품 ginsenoside Rg<sub>2</sub>와 ginsenoside Rh<sub>1</sub>은 chromadex(U.S.A)사, ginsenoside F<sub>4</sub>+Rg<sub>6</sub>는 엠보연구소를 통하여 구입하였으며 순도 99%이상의 ginsenoside를 사용하였다.

HPLC분석 시 이동상은 acetonitrile(HPLC급, Burdick&jackson, 미국)과 Water(HPLC급, Burdick&jackson, 미국)을 사용하였다.

#### 3. ginsenoside 표준용액의 조제

각 표준품을 정밀하게 취하여 methanol에 용해시켜 1mg/ml 용액을 만들고, 동일 용매로 희석하여 10, 20, 50, 100, 200ppm의 ginsenoside 표준용액을 만들었다.

#### 4. ginsenoside의 HPLC 분석조건

사용한 HPLC장치는 Waters 1525 binary HPLC system(Waters, 미국)과 shimadzu LC-20AD(Shimadzu, 일본)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18(250\*3mm)를 사용하였다.

이동상 조건은 Prosapogenin(ginsenoside Rg<sub>2</sub>, Rh<sub>1</sub>, F<sub>4</sub>)을 대상으로 유효성분들을 동시에 분석할 수 있는 최적의 조건을 설정하여, Acetonitrile의 비율을 17%(0 min)에서 25%(25 min), 40%(50 min), 60%(105 min) 그리고 100%(110 min)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17%로 조절하였다.

전개온도는 25℃, 유속은 분당 0.8ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector(Waters, U.S.A)검출기와 Shimadzu SPD-20A검출기를 이용하여 203nm에서 검출하였다.

Time	Flow	A%(ACN)	B%(Water)
0	0.8	17.0	83.0
25	0.8	25.0	75.0
50	0.8	40.0	60.0
105	0.8	60.0	40.0
110	0.8	100.0	0.0
120	0.8	100.0	0.0
125	0.8	17.0	83.0
135	0.8	17.0	83.0

Table 1. Analytical condition of HPLC

## 5. 분석 결과 (HPLC 분석법에 대한 검증(validation))

분석법 검증은 선택성, 직선성, 정확성과 정밀성등 4가지 항목에 대하여 수행하였다.

### 5.1 선택성(Selectivity)

UGBE의 주성분인 Prosapogenin의 각 머무름 시간은 ginsenoside Rg2가 약 45.556분, ginsenoside Rh1이 약 46.149분, ginsenoside F4가 약 59.230분이었고 UGBE의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다.

### 5.2 직선성(Linearity)

UGBE의 주성분 Prosapogenin ginsenoside Rg2, Rh1, F4은 10~200ppm(10, 20, 50, 100, 200ppm, 총 5개 농도)의 농도 범위에서 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수( $R^2$ )가 0.98 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. (Fig.10~Fig.12)

#### (1) ginsenoside Rg2

○ Group 1의 직선성 시험 결과(1회 분석)

Group 1	ginsenoside Rg2	
	ppm(mg/L)	Peak area
Cal 1-1	10	55336
Cal 1-2	20	102716
Cal 1-3	50	261164
Cal 1-4	100	512682
Cal 1-5	200	1069398
$R^2$	0.9995	

※ Cal :calibration

Table 2. Calibration curves dator of group 1

검량선식

Group 1  $y=5336.5x-5311(R^2=0.9995)$

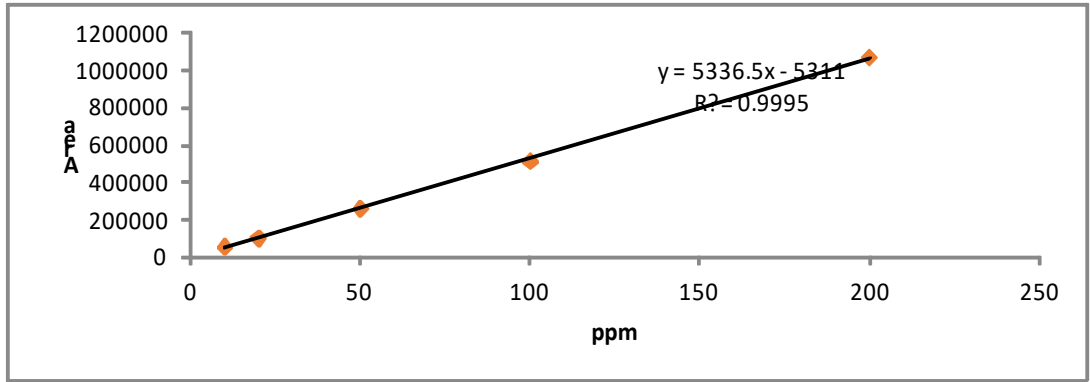


Fig 4. Calibration curves of group 1

○ ginsenoside Rg2를 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R<sup>2</sup>)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

○ Group 2의 직선성 시험 결과(2회 분석)

Group 2	ginsenoside Rg2	
	ppm(mg/L)	Peak area
Cal 2-1	10	54482
Cal 2-2	20	97395
Cal 2-3	50	259884
Cal 2-4	100	533389
Cal 2-5	200	1064803
R <sup>2</sup>	0.9999	

※ Cal :calibration

Table 3. Calibration curves dator of group 2

검량선식

Group 2  $y=5349.5x-4571.6(R^2=0.9999)$

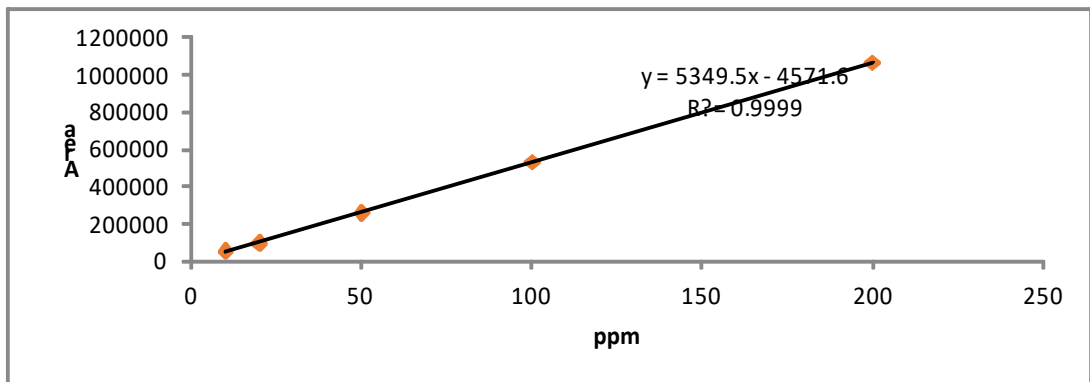


Fig 5. Calibration curves of group 2

○ ginsenoside Rg2를 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R<sup>2</sup>)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.      때 그

○ Group 3의 직선성 시험 결과(3회 분석)

Group 3	ginsenoside Rg2	
	ppm(mg/L)	Peak area
Cal 3-1	10	56421
Cal 3-2	20	90656
Cal 3-3	50	237039
Cal 3-4	100	451069
Cal 3-5	200	965339
R <sup>2</sup>	0.9984	

※ Cal :calibration

Table 4. Calibration curves dator of group 3

검량선식

Group 3  $y=4791.2x-4027.7(R^2=0.9984)$

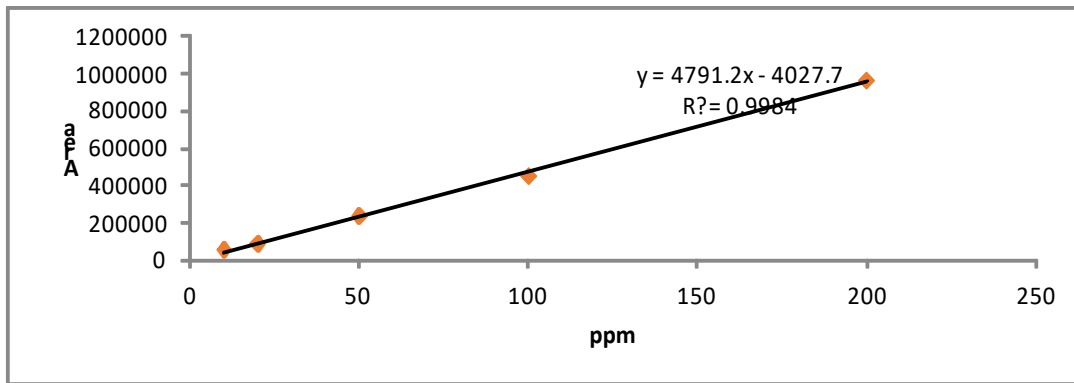


Fig 6. Calibration curves of group 3

○ ginsenoside Rg2를 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그 상관계수의 제곱(R<sup>2</sup>)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

때 그

직선성시험 종합결과	곰취추출물		
	기울기	y절편	R <sup>2</sup>
직선성 시험 1	5336.5	-5311	0.9995
직선성 시험 2	5349.5	-4571.6	0.9999
직선성 시험 3	4791.2	-4027.7	0.9984
평균	5159.0	-4636.7	0.9992
표준편차	318.6	-644.1	0.0007
종합 검량선	$y=5159.1x-4636.8$		

Table 5. Calibration curves dator of ginsenoside Rg2

(1) ginsenoside Rh1

○ Group 1의 직선성 시험 결과(1회 분석)

Group 1	ginsenoside Rh1	
	ppm(mg/L)	Peak area
Cal 1-1	10	76773
Cal 1-2	20	152464
Cal 1-3	50	381311
Cal 1-4	100	858832
Cal 1-5	200	1741837
R <sup>2</sup>	0.9993	

※ Cal :calibration

Table 6. Calibration curves dator of group 1

검량선식

Group 1  $y=8834.2x-29155(R^2=0.9993)$

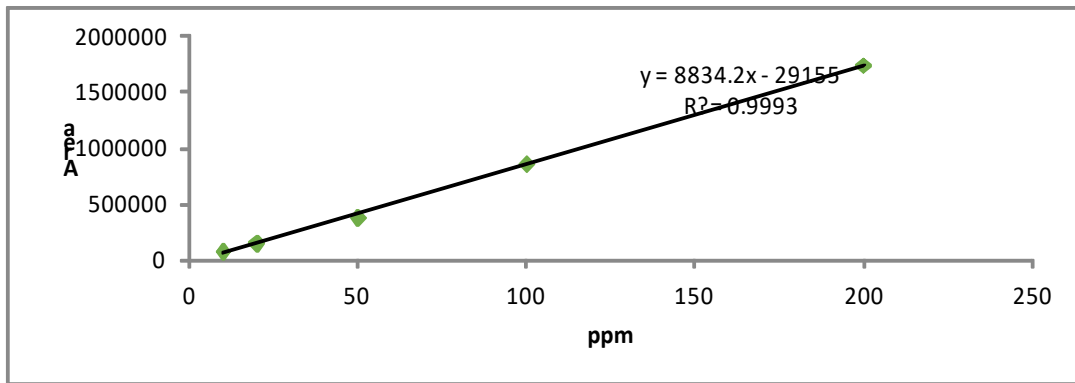


Fig 7. Calibration curves of group 1

○ ginsenoside Rh1을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R<sup>2</sup>)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

○ Group 2의 직선성 시험 결과(2회 분석)

Group 2	ginsenoside Rh1	
	ppm(mg/L)	Peak area
Cal 2-1	10	78560
Cal 2-2	20	206175
Cal 2-3	50	372437
Cal 2-4	100	858311
Cal 2-5	200	1734956
R <sup>2</sup>	0.9975	

※ Cal :calibration

Table 7. Calibration curves dator of group 2

검량선식

Group 2  $y=8678.3x-9460.8(R^2=0.9975)$

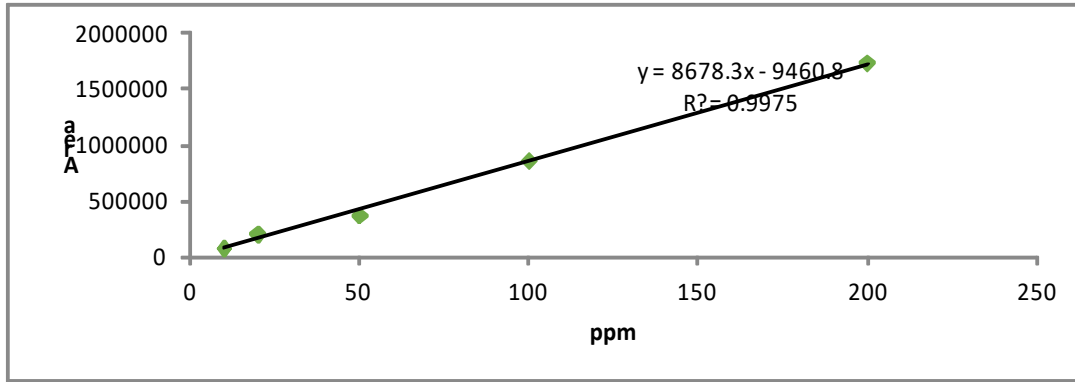


Fig 8. Calibration curves of group 2

○ ginsenoside Rh1을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱( $R^2$ )은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

○ Group 3의 직선성 시험 결과(3회 분석)

Group 3	ginsenoside Rh1	
	ppm(mg/L)	Peak area
Cal 3-1	10	84527
Cal 3-2	20	161613
Cal 3-3	50	441776
Cal 3-4	100	866310
Cal 3-5	200	1872747
$R^2$	0.9987	

※ Cal :calibration

Table 8. Calibration curves dator of group 3

검량선식

Group 3  $y = 9407x - 29537$  ( $R^2 = 0.9987$ )

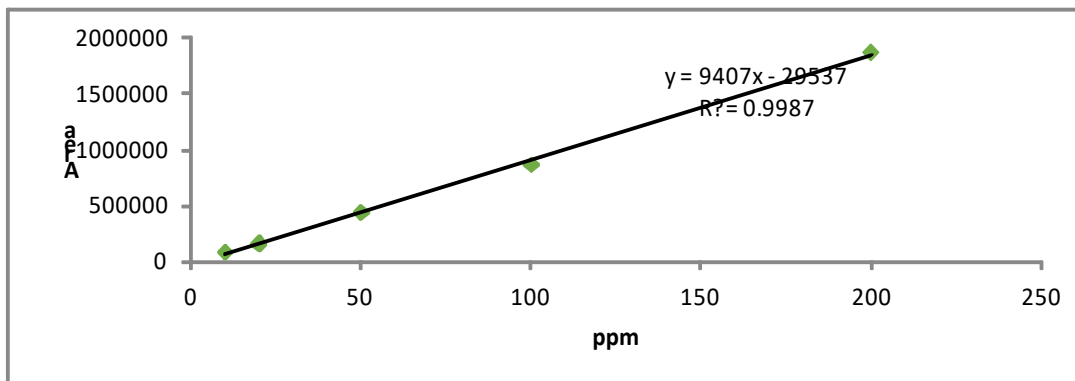


Fig 9. Calibration curves of group 3

○ ginsenoside Rh1을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱( $R^2$ )은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.



직선성시험 종합결과	ginsenoside Rh1		
	기울기	y절편	R <sup>2</sup>
직선성 시험 1	8834.2	-29155	0.9993
직선성 시험 2	8678.3	-9490.8	0.9975
직선성 시험 3	9407.0	-29537.0	0.9987
평균	8973.1	-22727.6	0.9985
표준편차	383.7	11464.9	0.0009
종합 검량선	y=8973.2x-22718		

Table 9. Calibration curves dator of ginsenoside Rh1

(1) ginsenoside F4

○ Group 1의 직선성 시험 결과(1회 분석)

Group 1	ginsenoside F4	
	ppm(mg/L)	Peak area
Cal 1-1	7.85	32440
Cal 1-2	14.45	85540
Cal 1-3	36.51	221119
Cal 1-4	72.28	432905
Cal 1-5	145.54	697955
R <sup>2</sup>	0.9816	

※ Cal :calibration

Table 6. Calibration curves dator of group 1

검량선식

Group 1 y=4806x+ 27843(R<sup>2</sup>=0.9816)

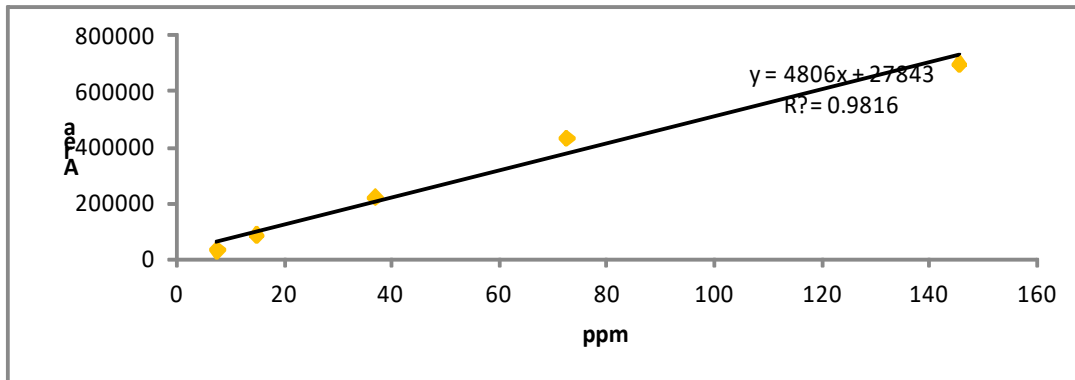


Fig 7. Calibration curves of group 1

○ ginsenoside F4를 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R<sup>2</sup>)은 0.98이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

○ Group 2의 직선성 시험 결과(2회 분석)

Group 2	ginsenoside F4	
	ppm(mg/L)	Peak area
Cal 2-1	7.85	37897
Cal 2-2	14.45	74848
Cal 2-3	36.51	184095
Cal 2-4	72.28	373833
Cal 2-5	145.54	665570
R <sup>2</sup>	0.9953	

※ Cal :calibration

Table 7. Calibration curves dator of group 2

검량선식

Group 2  $y=4582.1x+12637(R^2=0.9953)$

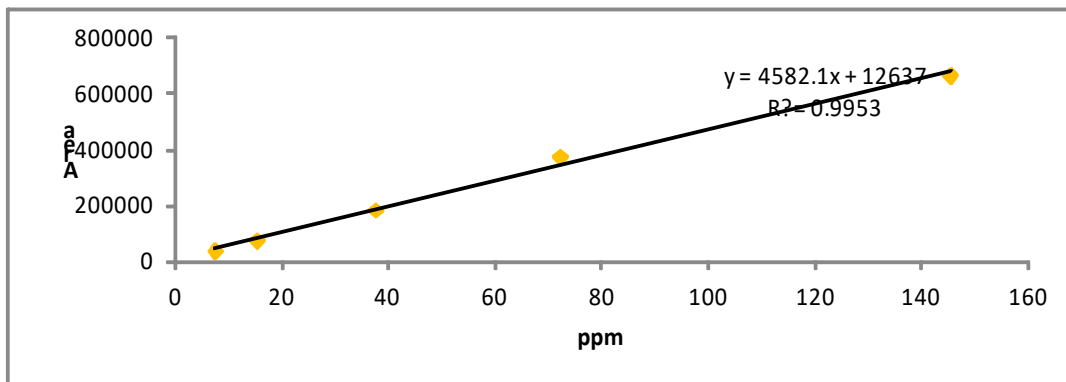


Fig 8. Calibration curves of group 2

○ ginsenoside F4를 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R<sup>2</sup>)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

때 그의

○ Group 3의 직선성 시험 결과(3회 분석)

Group 3	ginsenoside F4	
	ppm(mg/L)	Peak area
Cal 3-1	7.85	38356
Cal 3-2	14.45	83506
Cal 3-3	36.51	204755
Cal 3-4	72.28	395726
Cal 3-5	145.54	-
R <sup>2</sup>	0.9959	

※ Cal :calibration

Table 8. Calibration curves dator of group 3

검량선식

Group 3  $y=5510x+1922.7(R^2=0.9959)$

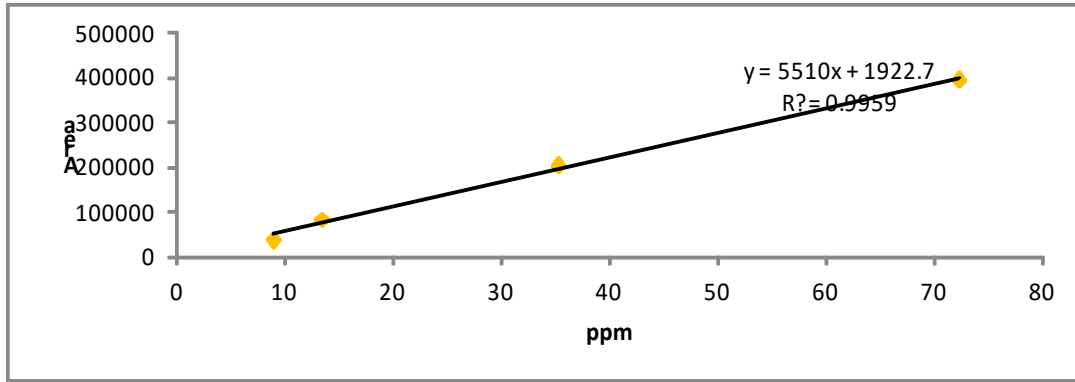


Fig 9. Calibration curves of group 3

○ ginsenoside F4를 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R<sup>2</sup>)은 0.99이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었다.

직선성시험 종합결과	ginsenoside F4		
	기울기	y절편	R <sup>2</sup>
직선성 시험 1	4806	27843	0.9816
직선성 시험 2	4582.1	12637	0.9953
직선성 시험 3	5510	1922.7	0.9959
평균	4966.0	14134.2	0.9909
표준편차	484.2	13024.8	0.0080
종합 검량선	y=4745.4x+ 20048		

Table 9. Calibration curves dator of ginsenoside F4

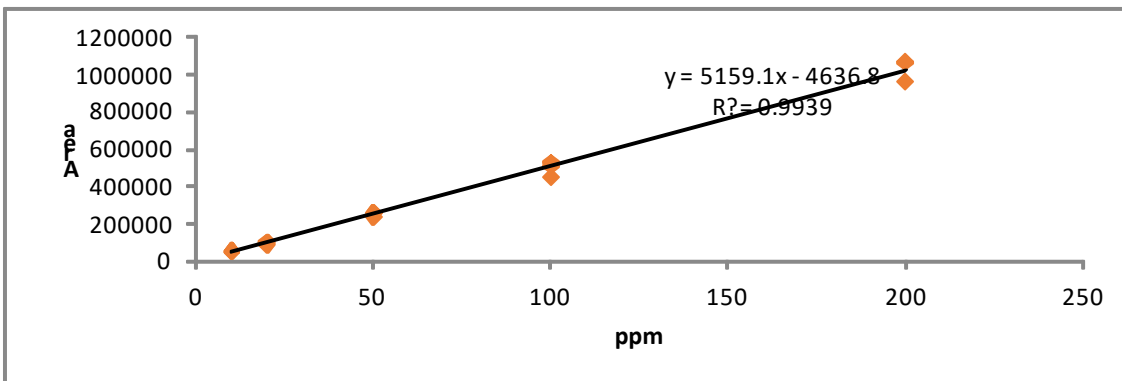


Fig 10. Calibration curves of ginsenoside Rg2

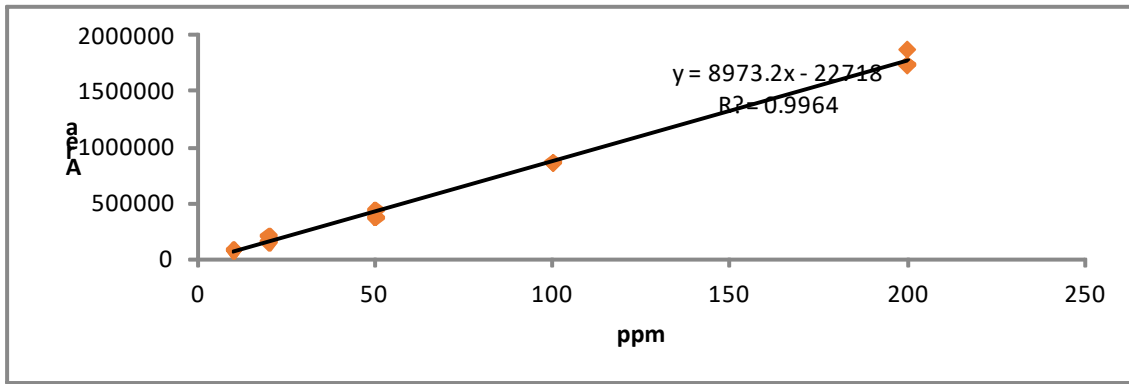


Fig 11. Calibration curves of ginsenoside Rh1

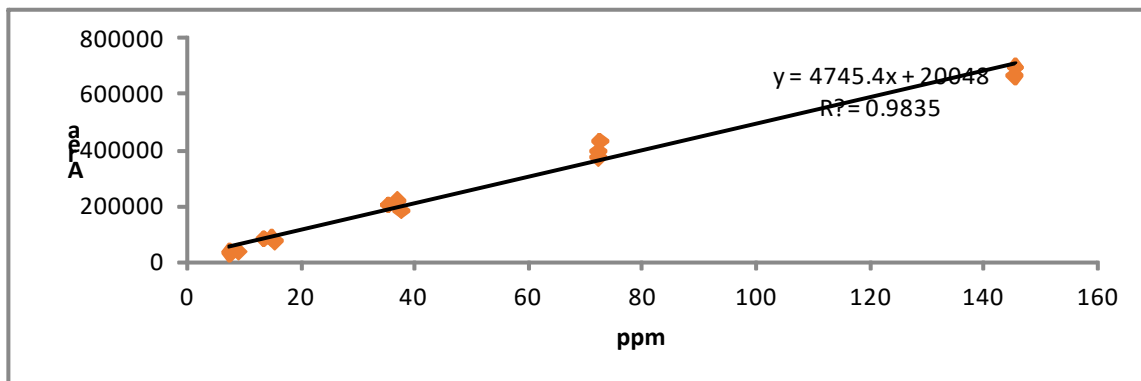


Fig 12. Calibration curves of ginsenoside F4

### 5.3 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)

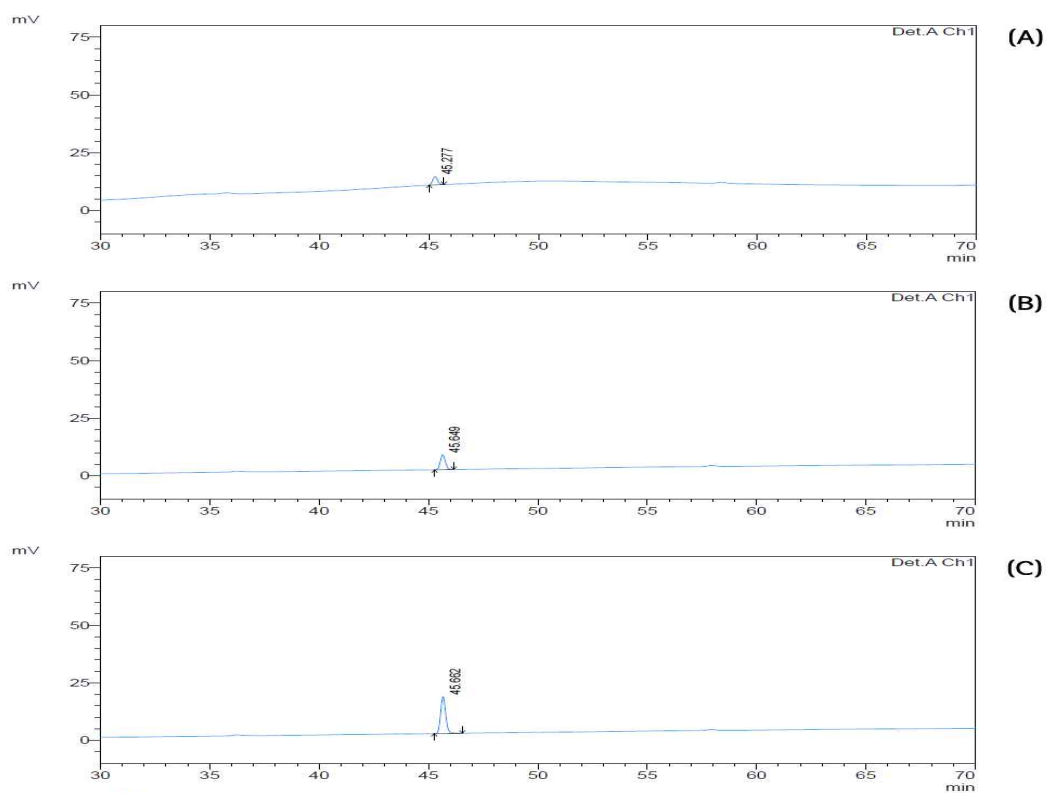
UGBE 분석법의 일내 정확성과 정밀성을 확인하기 위하여 각 표준품을 10, 20, 50, 100, 200ppm 5 가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복실험 하였으며, 일간 정확성과 정밀성을 확인하기 위하여 3일간(or 3회) 반복 실험하였다.

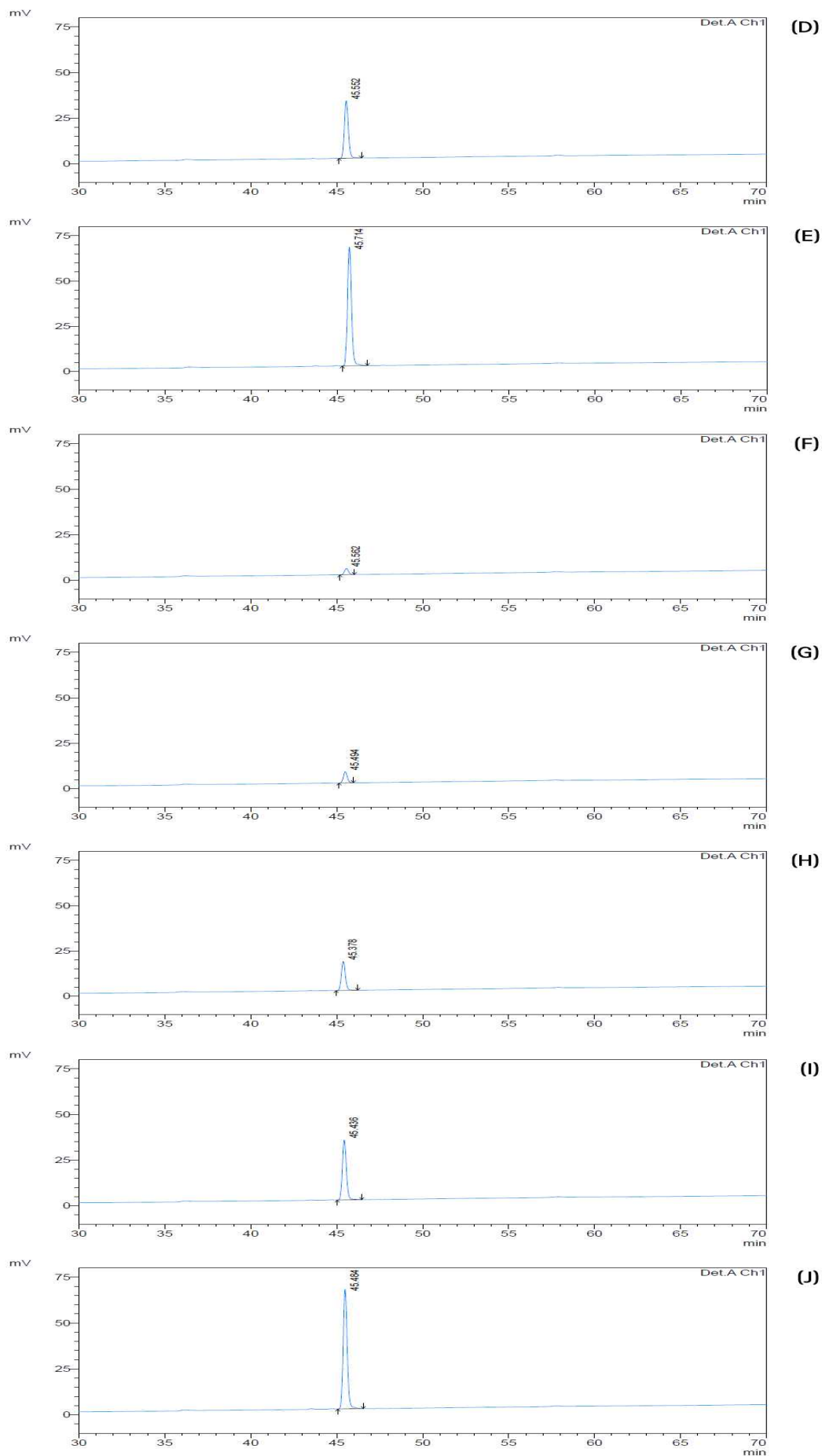
일내 및 일간 정밀성은 피크면적을 이용하여 얻어진 검량선에 의하여 정량한 농도의 표준편차를 정량한 농도의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며, 그 값은 0.519~6.57%이었다.(Table.2)

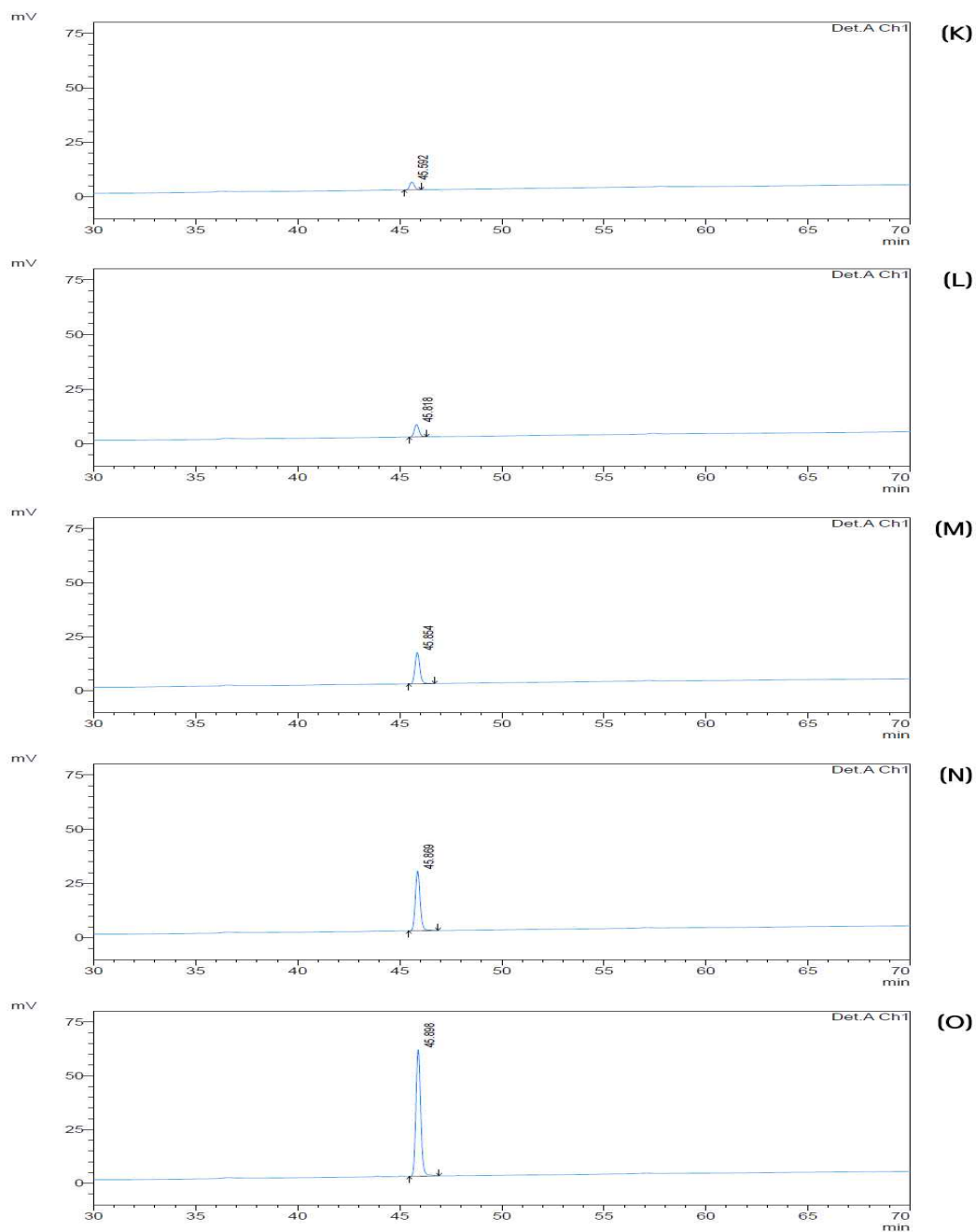
일내 및 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며, 그 값은 63.1~118%이었다.(Table.2)

compounds	Conc. (ppm)	Intra-day(n=3)		Inter-day(n=3)	
		Precision(%)	Accuracy(%)	Precision(%)	Accuracy(%)
ginsenoside Rg2	10	1.753	118.0	-	-
	20	6.235	98.3	-	-
	50	5.371	99.7	-	-
	100	8.580	97.6	-	-
	200	5.690	100.5	-	-
ginsenoside Rh1	10	5.078	91.4	30.328	157.7
	20	16.570	97.8	21.191	122.0
	50	9.468	89.2	39.408	82.9
	100	0.519	96.2	17.325	99.3
	200	4.354	99.4	25.067	109.6
ginsenoside F4	10	9.083	63.1	-	-
	20	6.983	91.7	-	-
	50	9.125	105.1	-	-
	100	7.450	110.3	-	-
	200	3.358	95.9	-	-

Table 10. Intra, inter-day precision and accuracy of ginsenoside Rg2, Rh1, F4

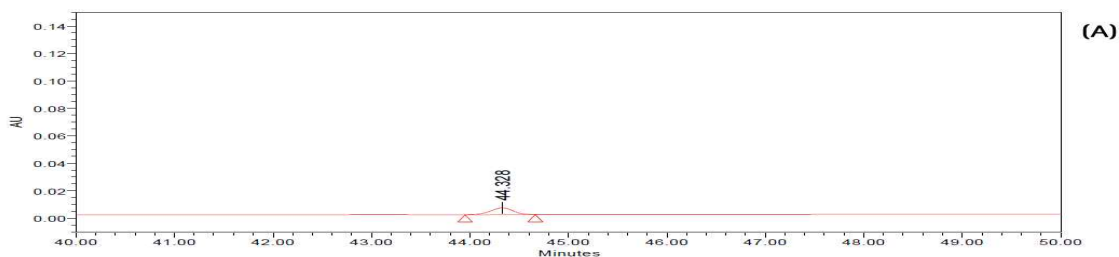


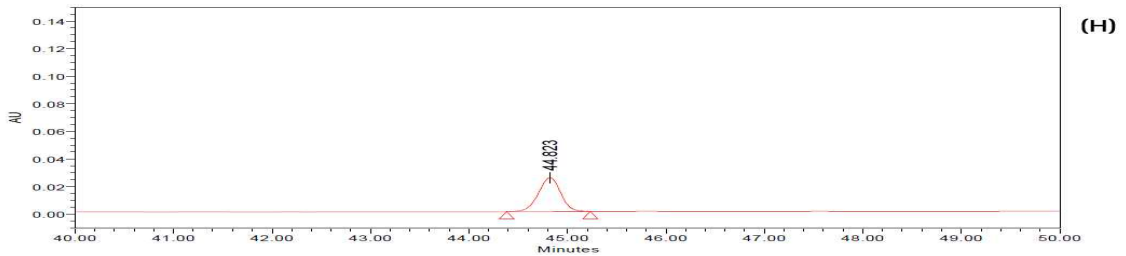
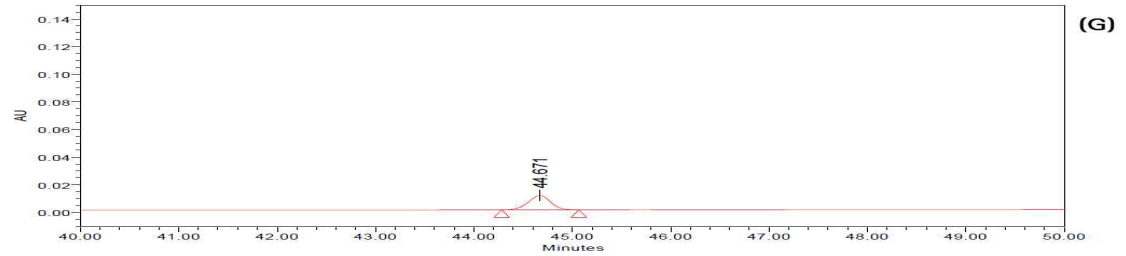
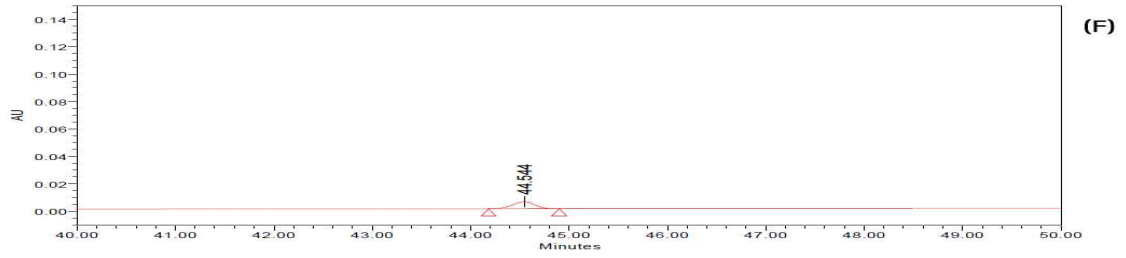
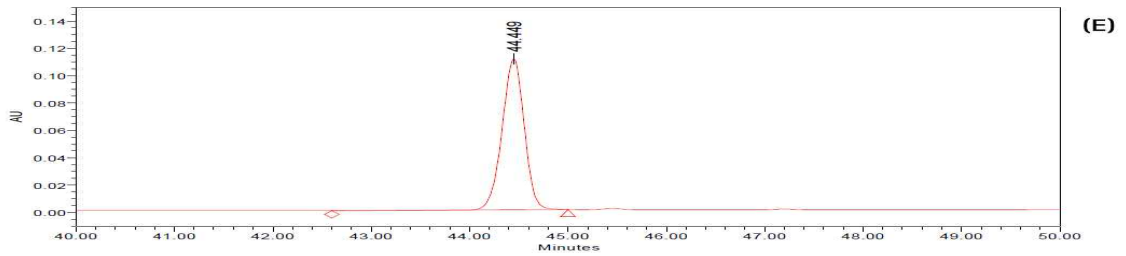
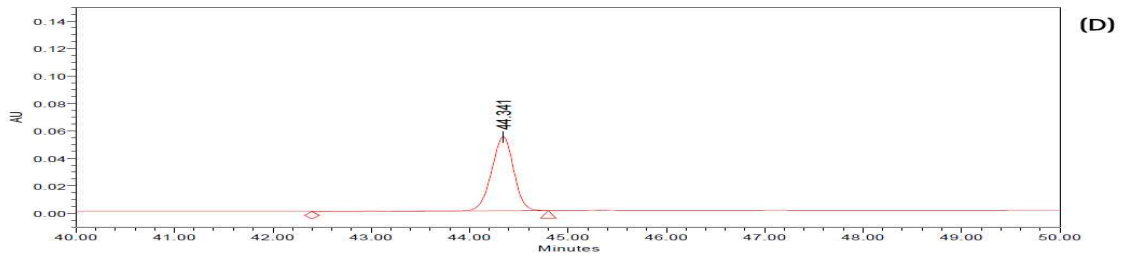
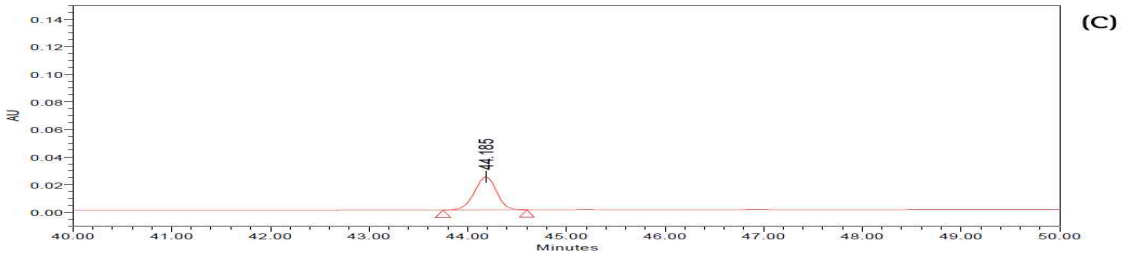
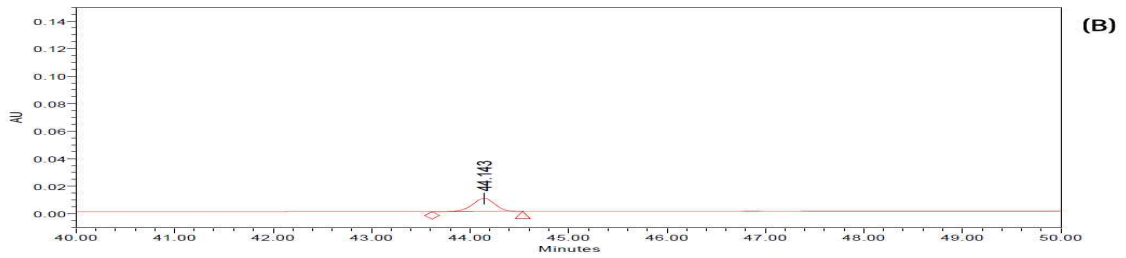




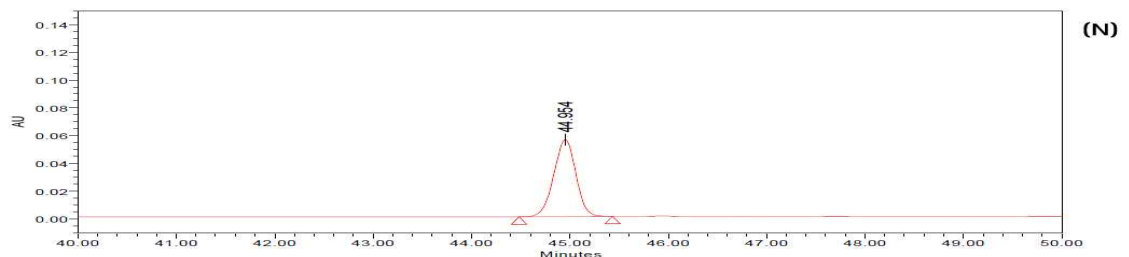
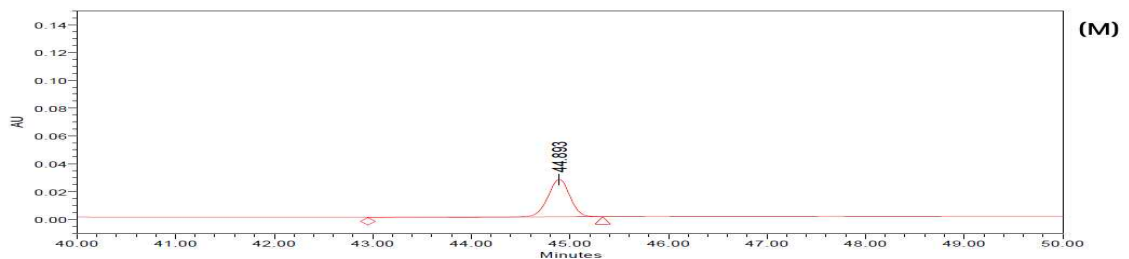
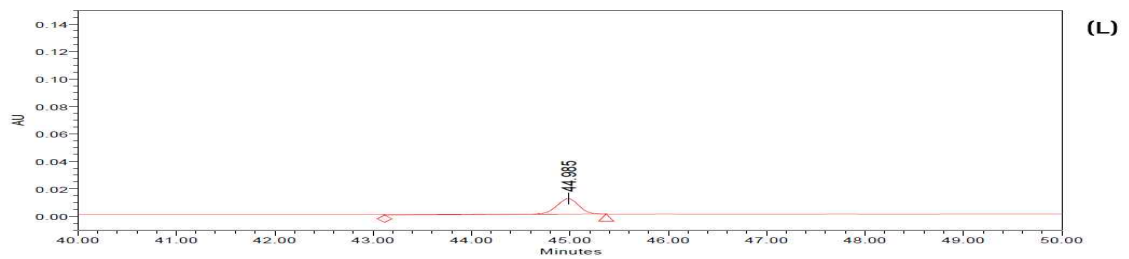
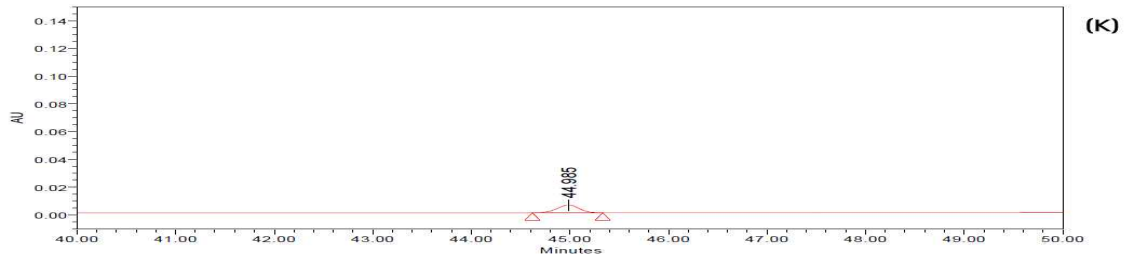
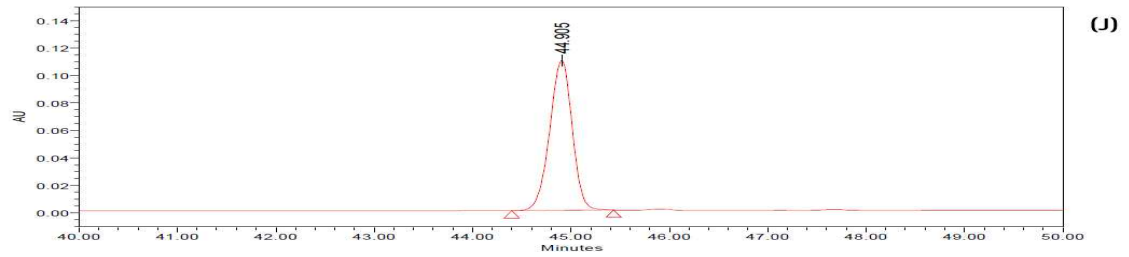
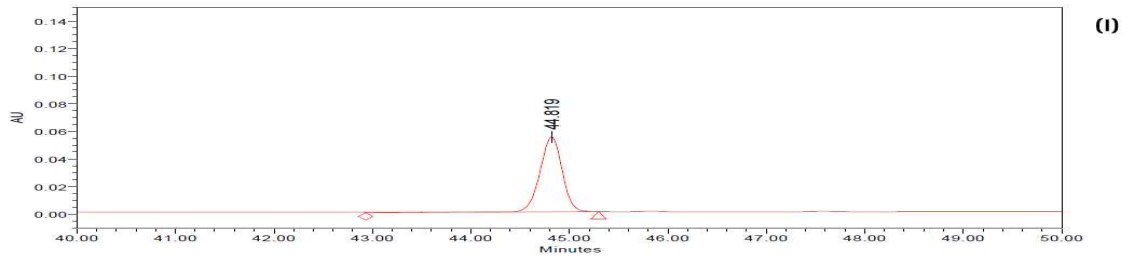
**Fig 13. HPLC Chromatogram of ginsenoside Rg2**

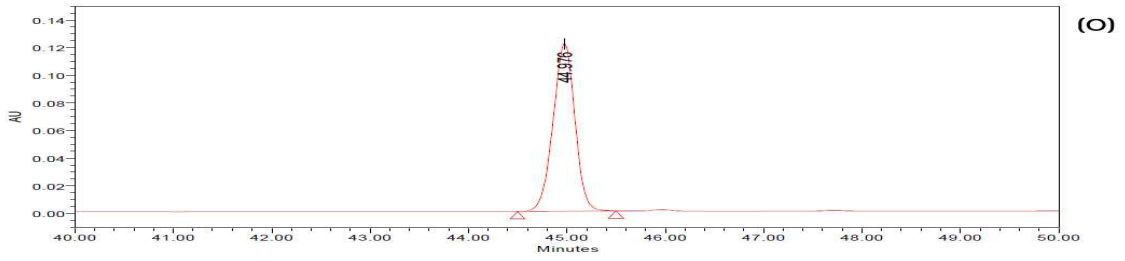
10ppm\_inject1(A), 20ppm\_inject1(B), 50ppm\_inject1(C), 100ppm\_inject1(D),  
 200ppm\_inject1(E), 10ppm\_inject2(F), 20ppm\_inject2(G), 50ppm\_inject2(H),  
 100ppm\_inject2(I), 200ppm\_inject2(J), 10ppm\_inject3(K), 20ppm\_inject3(L),  
 50ppm\_inject3(M), 100ppm\_inject3(N), 200ppm\_inject3(O)





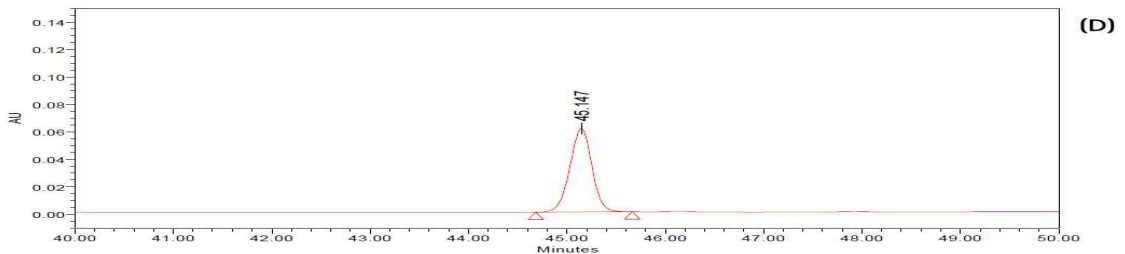
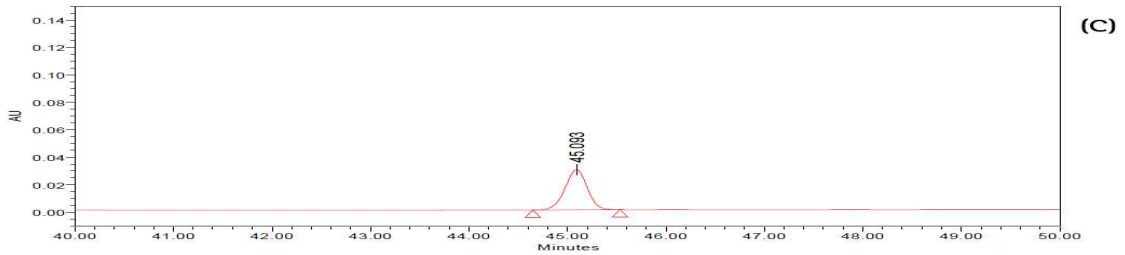
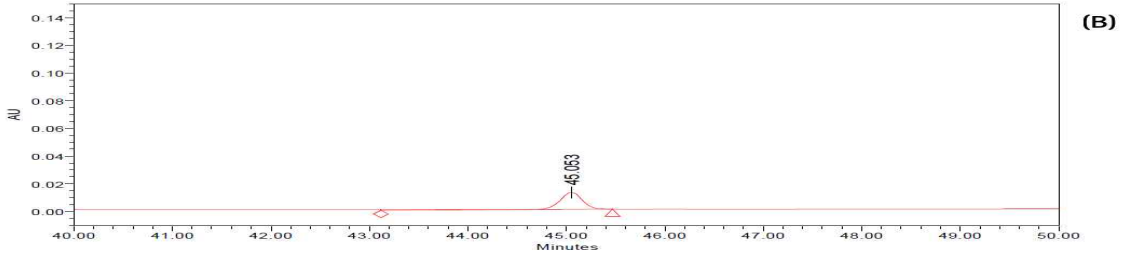
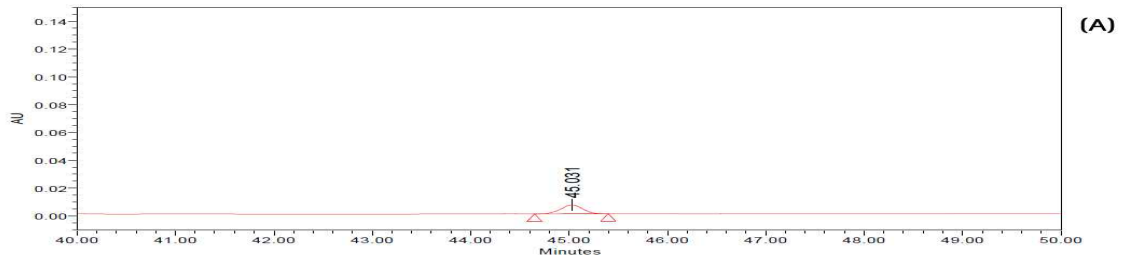


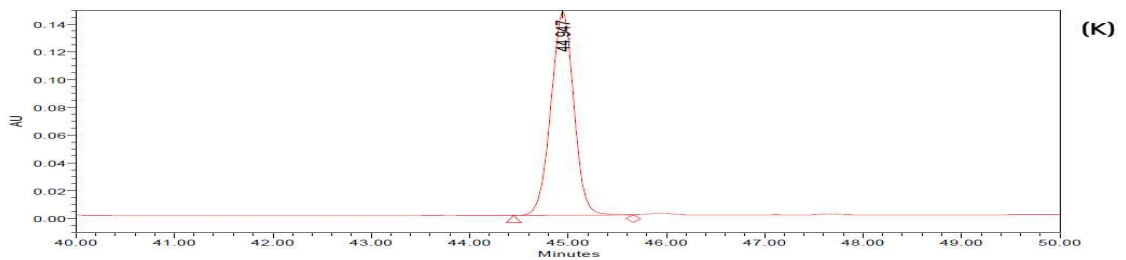
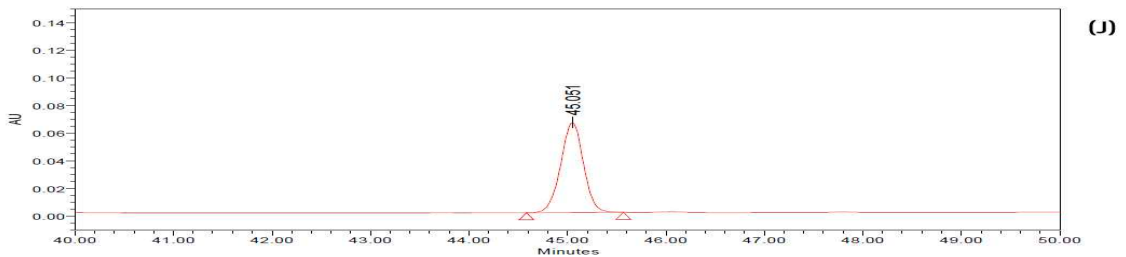
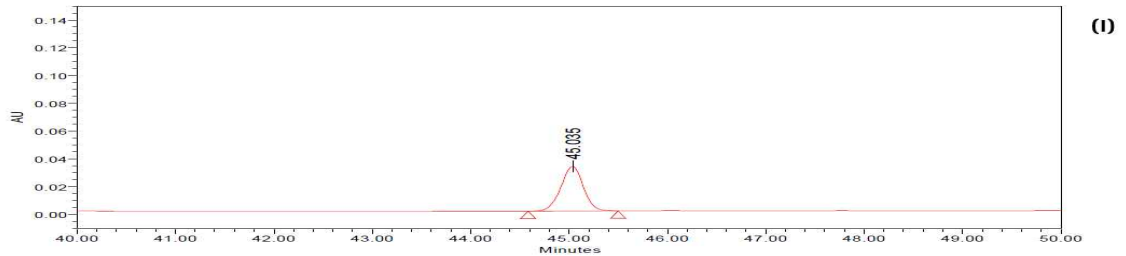
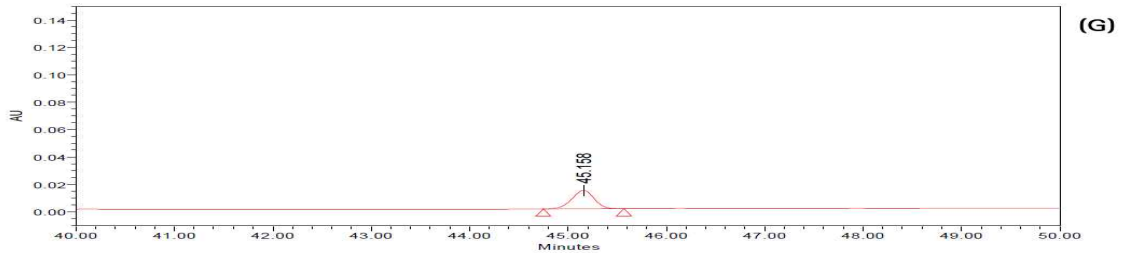
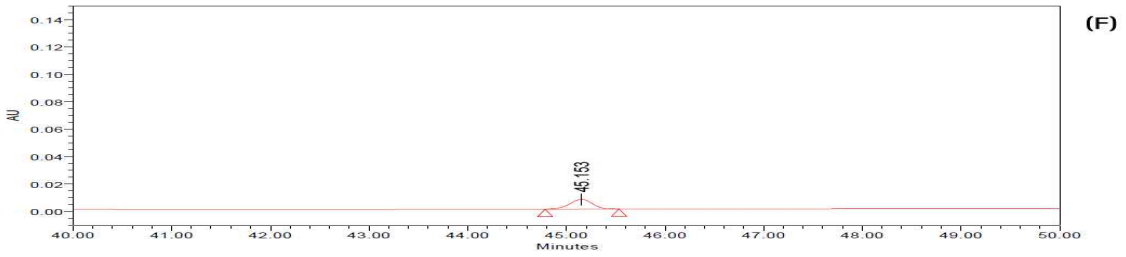
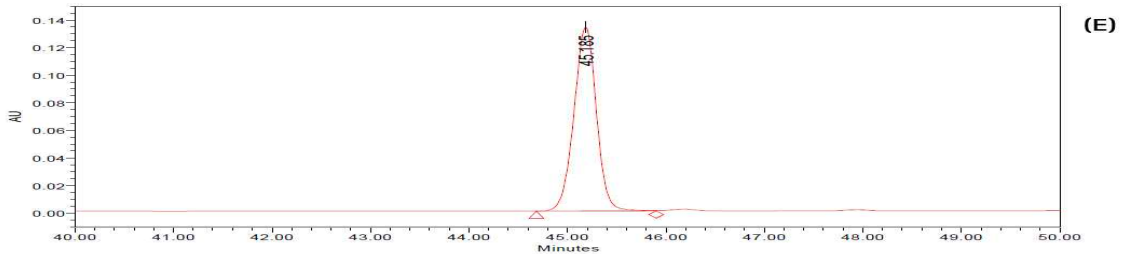


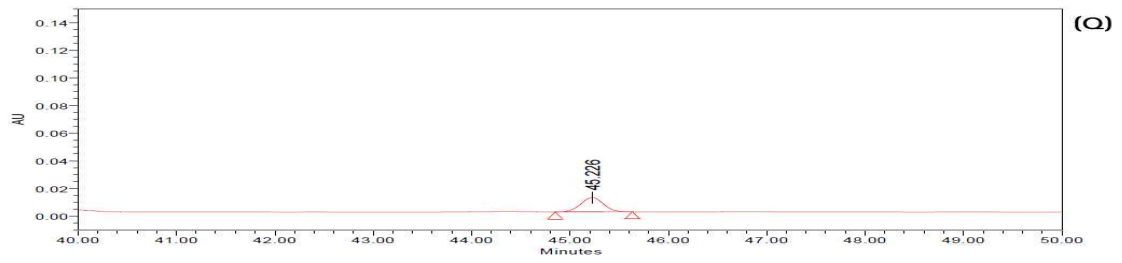
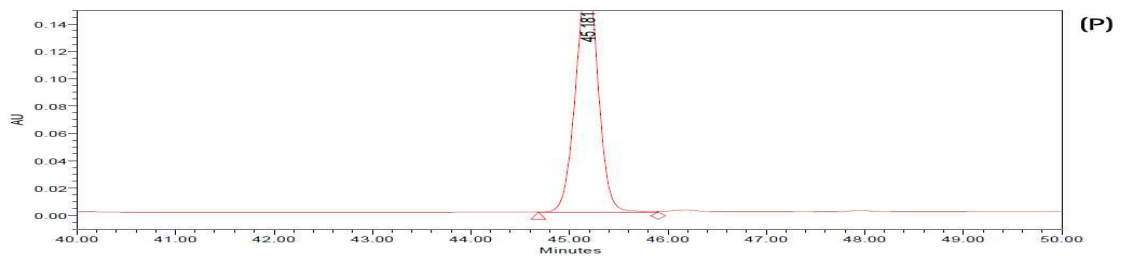
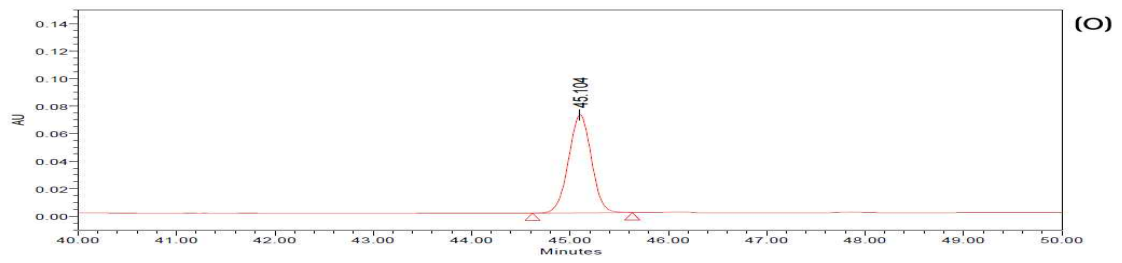
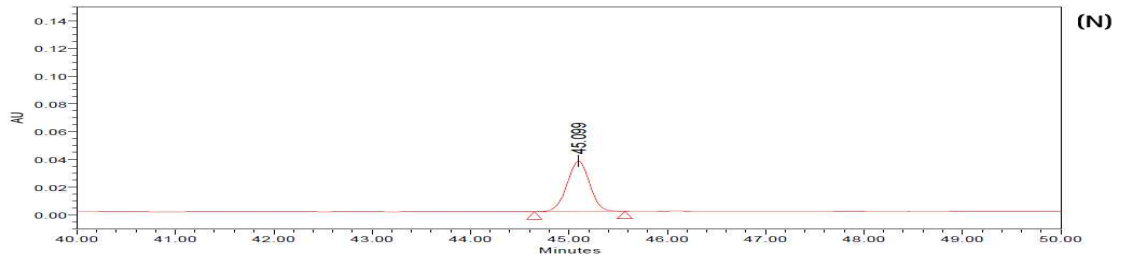
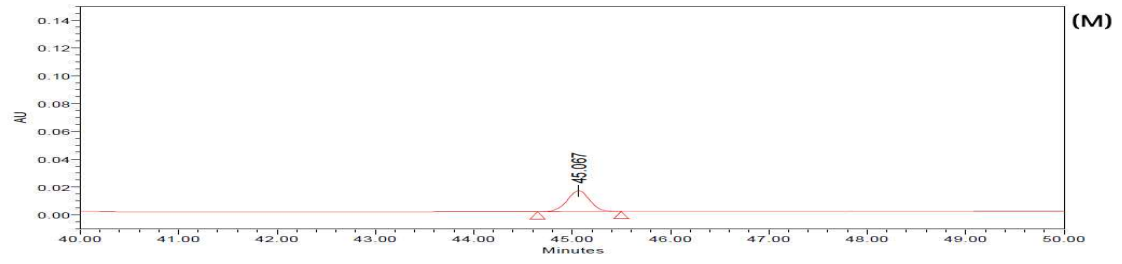
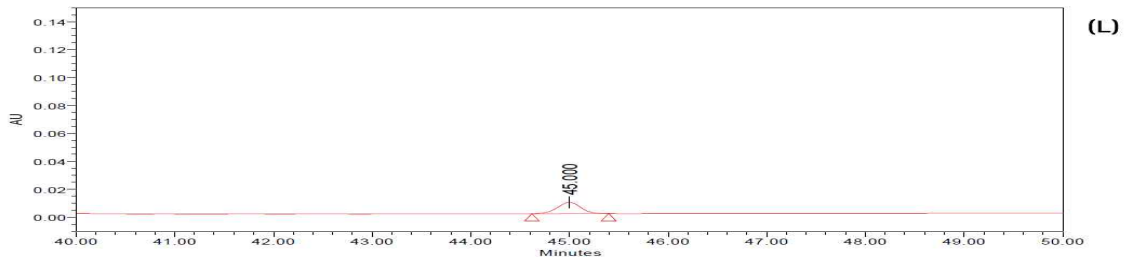


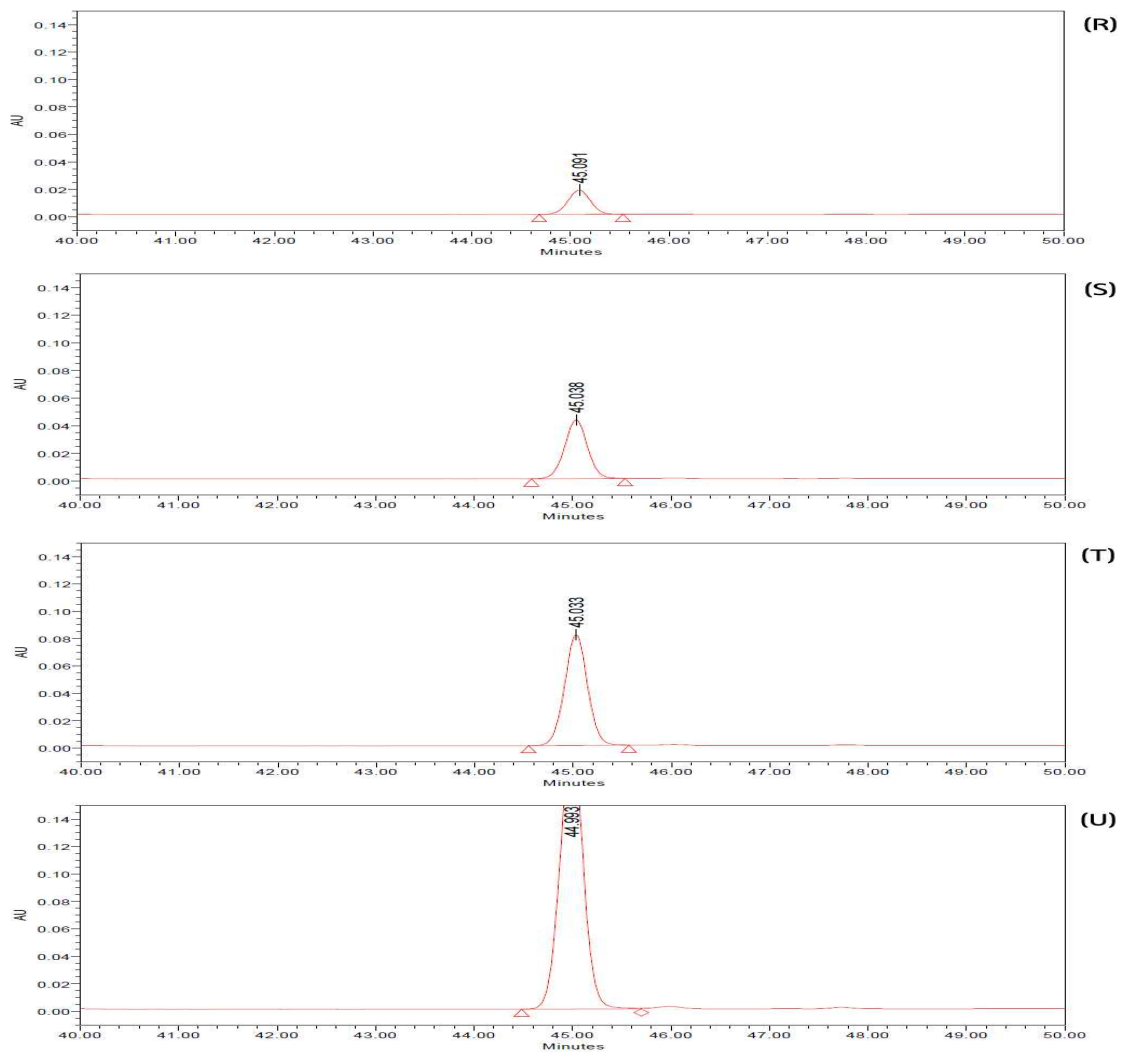
**Fig 14. HPLC Chromatogram of ginsenoside Rh1(Intra day)**

10ppm\_inject1(A), 20ppm\_inject1(B), 50ppm\_inject1(C), 100ppm\_inject1(D),  
 200ppm\_inject1(E), 10ppm\_inject2(F), 20ppm\_inject2(G), 50ppm\_inject2(H),  
 100ppm\_inject2(I), 200ppm\_inject2(J), 10ppm\_inject3(K), 20ppm\_inject3(L),  
 50ppm\_inject3(M), 100ppm\_inject3(N), 200ppm\_inject3(O)



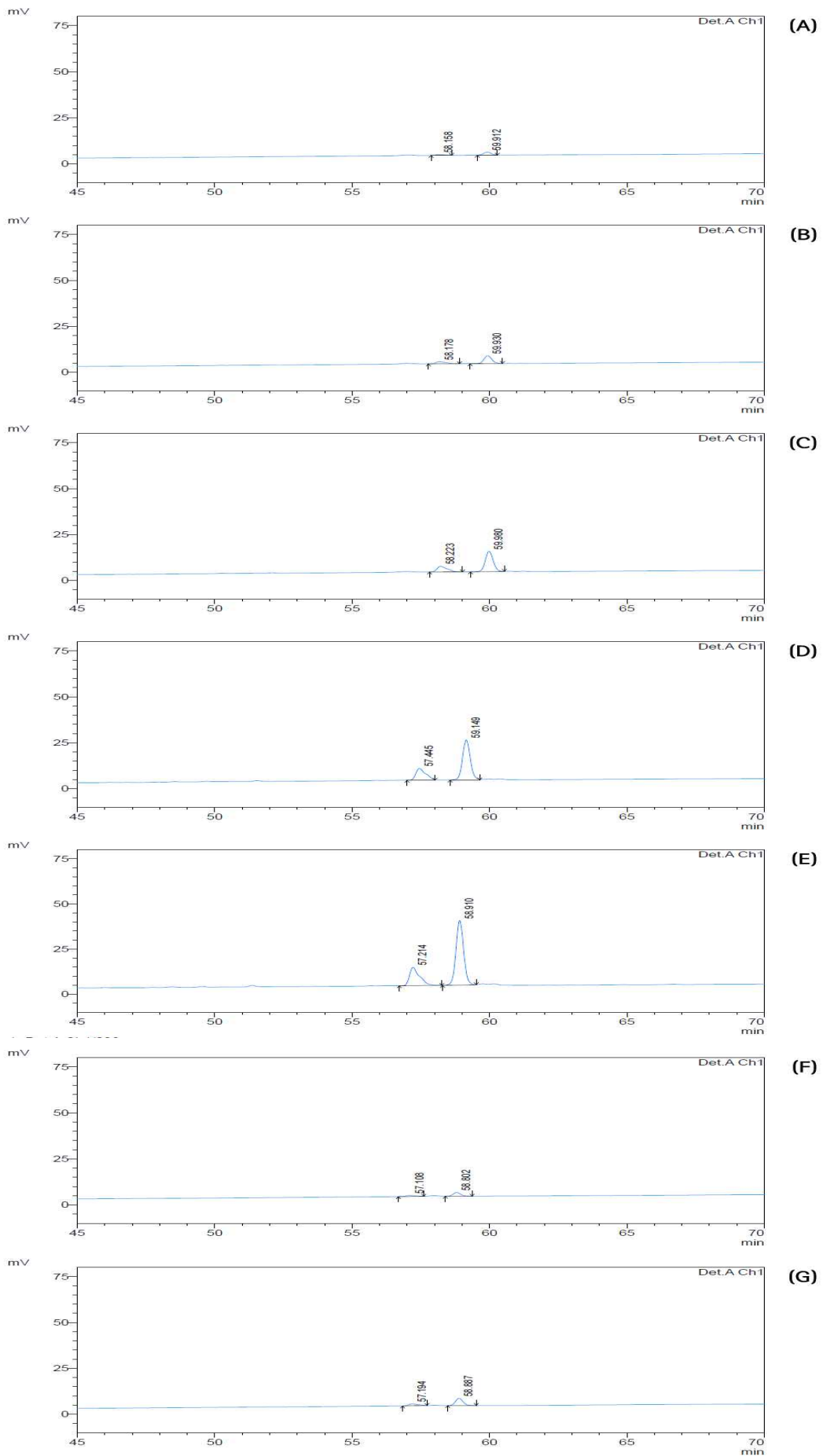


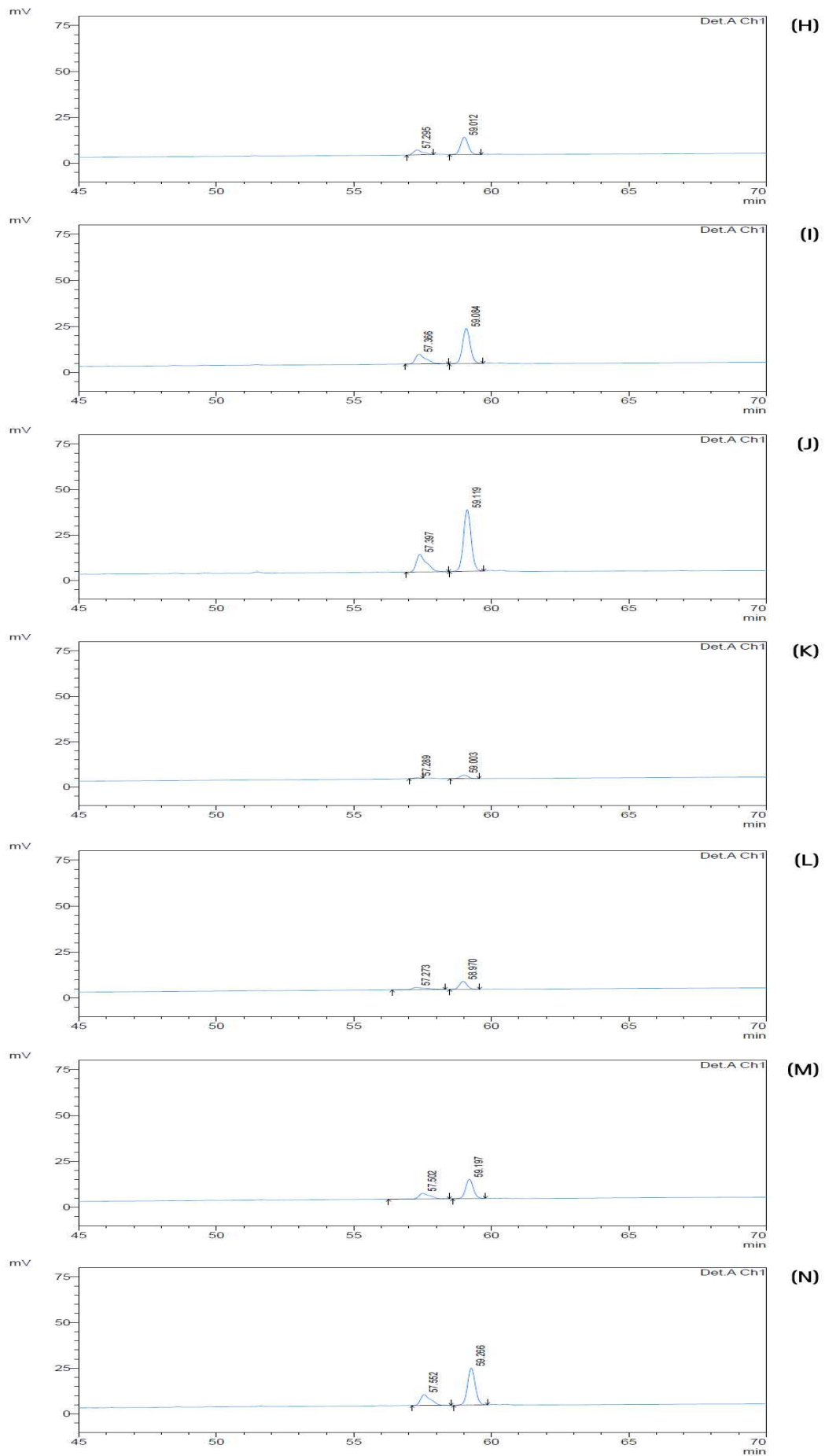




**Fig 15. HPLC Chromatogram of ginsenoside Rh1(Inter day)**

10ppm\_inject4(A), 20ppm\_inject4(B), 50ppm\_inject4(C), 100ppm\_inject4(D),  
 200ppm\_inject4(E), 10ppm\_inject5(F), 20ppm\_inject5(G), 50ppm\_inject5(I),  
 100ppm\_inject5(J), 200ppm\_inject5(K), 10ppm\_inject6(L), 20ppm\_inject6(M),  
 50ppm\_inject6(N), 100ppm\_inject6(O), 200ppm\_inject6(P), 10ppm\_inject7(Q), 20ppm\_inject7(R),  
 50ppm\_inject7(S), 100ppm\_inject7(T), 200ppm\_inject7(U)





**Fig 16. HPLC Chromatogram of ginsenoside F4**

10ppm\_inject1(A), 20ppm\_inject1(B), 50ppm\_inject1(C), 100ppm\_inject1(D),  
200ppm\_inject1(E), 10ppm\_inject2(F), 20ppm\_inject2(G), 50ppm\_inject2(H),  
100ppm\_inject2(I), 200ppm\_inject2(J), 10ppm\_inject3(K), 20ppm\_inject3(L),  
50ppm\_inject3(M), 100ppm\_inject3(N)



## [간독성 동물모델에서 초음파 처리 인삼 열매 조성물의 간 보호효과]

### 가. GalN/LPS 투여로 유발된 간독성모델에서 인삼 열매 추출물의 간 보호 효과

#### 1. 실험 요약

인삼열매 추출물 및 실리마린을 3주 동안 투여 받은 동물모델에 GalN/LPS 를 단회 투여하여 간 손상을 일으키고, 보호효과를 혈액 및 간의 생화학적 수치를 근거로 평가하였다.

- 1.1. 실험물질의 투여와 관련된 실험동물의 이상증상은 관찰되지 않았다.
- 1.2. 실험물질의 투여와 관련된 실험동물의 체중변화는 관찰되지 않았다.
- 1.3. GalN/LPS 단독투여군과 비교하여, 인삼열매 추출물 및 실리마린 투여 군에서 AST 와 ALT가 유의성 있게 감소하였다.
- 1.4. GalN/LPS 단독투여군과 비교하여, 인삼열매 추출물 및 실리마린 투여 군에서 SOD 와 GPx의 수치가 유의성 있게 회복되는 것을 확인하였다.
- 1.5. 인삼열매 추출물 및 실리마린 투여 군에서의 간 보호 효과를 조직병리학적 검사로 확인하였다.

이상의 결과를 종합해볼 때, GalN/LPS 투여로 유발된 간 손상 모델에서, 인삼열매 추출물은 실리마린과 유사하거나 더 강력한 정도의 간 보호효과를 나타낸 것으로 판단되었다.

#### 2. 실험 방법

##### 2.1. 실험물질

- 2.1.1. 인삼 열매 추출물 (100, 250, 500 mg/kg, p.o.)
- 2.1.2. 실리마린 (Sigma Aldrich Korea, 150 mg/kg, p.o.)
- 2.1.3. Galactosamine (Sigma Aldrich Korea, 300 mg/kg, i.p.)
- 2.1.4. LPS (Sigma Aldrich Korea, 30 µg/kg, i.p.)

##### 2.2. 실험동물 및 실험방법

###### 2.2.1. 실험물질 투여 및 샘플 채취

72 마리의 수컷 S.D. 랫드 (200-250 g)을 6개의 군으로 나누고 (n=12), 1군을 Control 군으로, 2군을 GalN/LPS 단독 투여군으로, 3군을 실리마린 투여 (150 mg/kg) 군으로, 4,5,6 군을 각각 인삼열매 추출물 투여 (100, 250, 500 mg/kg) 군으로 나눈뒤, 3주 동안 1,2 군은 각각 생리식염수를, 3,4,5,6 군은 각 군에 해당하는 시험물질을 용량별로 투여하였다. 마지막 시험물질 투여 후 1시간 후에 2,3,4,5,6 군에 GalN/LPS (GalN : 300 mg/kg, LPS : 30 µg/kg)를 복강투여 하였고, GalN/LPS 투여 후 24시간 후에 경추탈골법을 통해 희생시킨 랫드로부터 혈액 및 간을 채취하였다. 시험물질 투여기간 동안 랫드의 이상증상, 체중변화, 사료 및 물 섭취량을 매일 기록하였다.

#### 2.2.2. AST, ALT 측정

각 군 별로 채취한 혈액 샘플을 원심분리하여 (15000g, 4°C, 20분) 혈청을 분리하여 분리된 혈청으로 AST, ALT (UV without P-5-P; IFCC 법, Beckman Coulter 시약, Ireland)를 측정하였다.

#### 2.2.3. SOD, GPx (Glutathione Peroxidase) 측정

각 군별로 채취한 간 샘플을 조직용해 버퍼를 사용해 균질화 하여 각각의 키트 (Biovision, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

#### 2.2.4. 조직학적 검사

각 군별로 채취한 간 샘플을 10% formalin 용액에 넣어 고정시킨 후 paraffin block 을 만들어 H&E 염색법을 통해 간의 상해 정도를 육안으로 확인하였다.

### 3. 실험 결과

#### 3.1. 이상증상, 체중변화 및 사료/물 섭취량

#### Body Weight (GalN/LPS)

	Day 1	Day 21
Control	228.25 ± 1.93	359.25 ± 12.44
GalN/LPS	229.25 ± 6.08	338 ± 11.48
GalN/LPS + Sil	228.75 ± 4.28	337.75 ± 7.16
GalN/LPS + GBE 100	236.86 ± 3.51	340.86 ± 6.57
GalN/LPS + GBE 250	257.63 ± 4.28	349 ± 7.03
GalN/LPS + GBE 500	259.38 ± 4.46	352.5 ± 8.04

단위 : g

표 43. S.D. 랫드 체중 변화

실험 기간 도중 이상증상은 발견되지 않았으나, GalN/LPS 만 투여받은 그룹에서 랫드 한 마리가 사망하였다. 사료 및 물 섭취량 (data not shown)과 체중변화는 각 군 별로 유의성 있는 차이가 존재하지 않았다.

### 3.2. AST, ALT 레벨

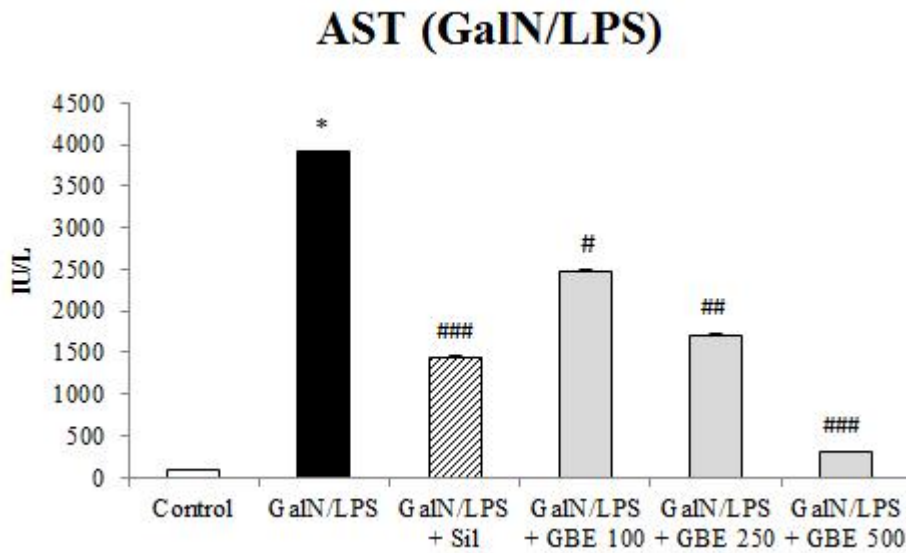


그림 164. AST 레벨. Student's t-test(\*;  $p < 0.01$  vs Control, #;  $p < 0.05$  vs GalN/LPS, ##;  $p < 0.01$  vs GalN/LPS, ###;  $p < 0.001$  vs GalN/LPS)

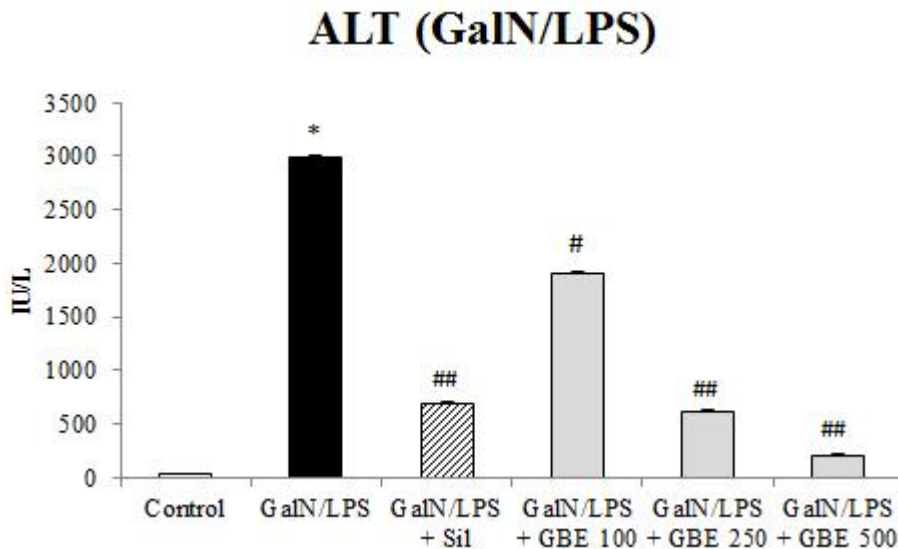


그림 165. ALT 레벨. Student's t-test(\*;  $p < 0.01$  vs Control, #;  $p < 0.05$  vs GalN/LPS, ##;  $p < 0.01$  vs GalN/LPS)

간 손상 정도의 대표적인 지표인 AST, ALT 레벨을 측정한 결과, GalN/LPS 투여군에서, Control 군에 비해 AST, ALT 레벨이 급격하게 상승하였고, 실리마린과 인삼열매 추출물을 투여한 그룹에서 AST, ALT 레벨이 유의성 있게 감소하는 것을 보였다. 인삼열매 추출물은 농도의존적인 효과를 나타냈으며, 특히 인삼열매 추출물 500 mg/kg 투여군에서의 간보호효과는 실리마린보다 유의성 있게 강하게 나타났다.

### 3.3. SOD, Glutathione Peroxidase (GPx)

#### SOD Activity (GalN/LPS)

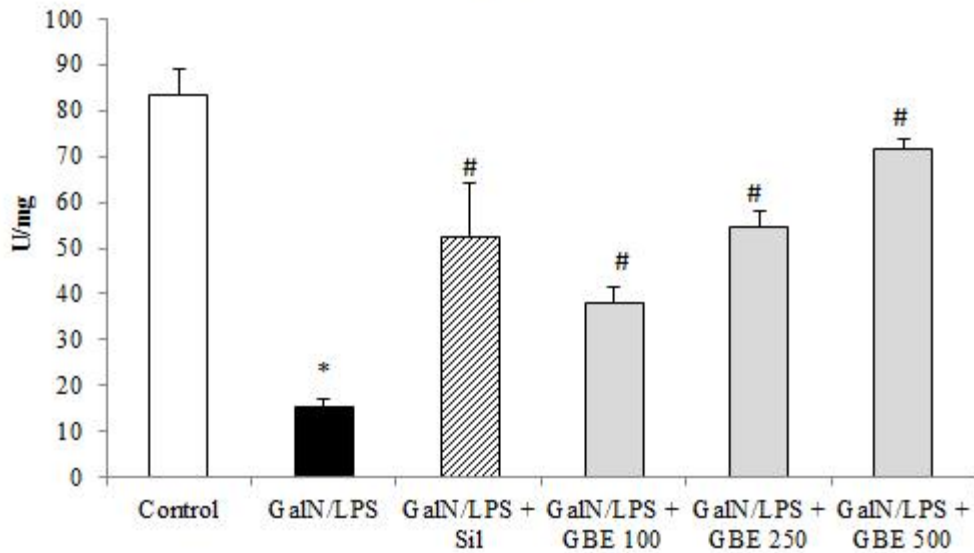


그림 166. SOD 활성도. Student's t-test(\*;  $p < 0.001$  vs Control, #;  $p < 0.001$  vs GalN/LPS)

#### GPx Activity (GalN/LPS)

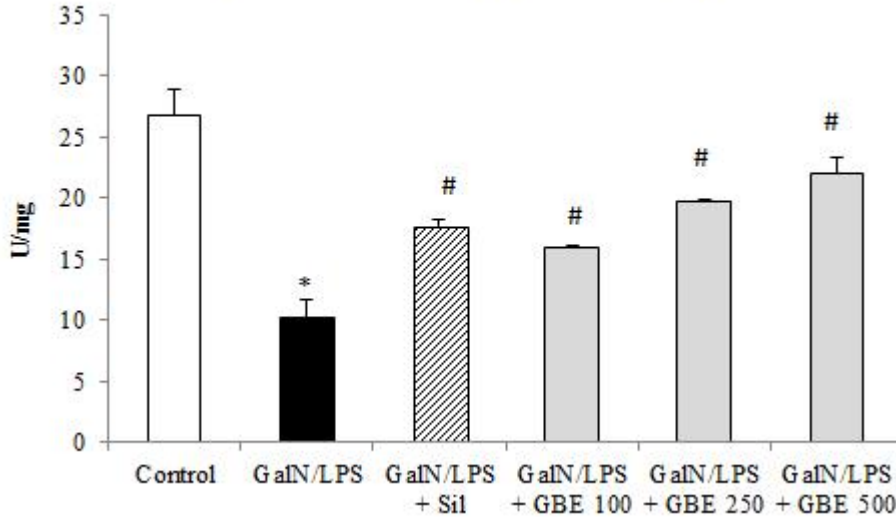
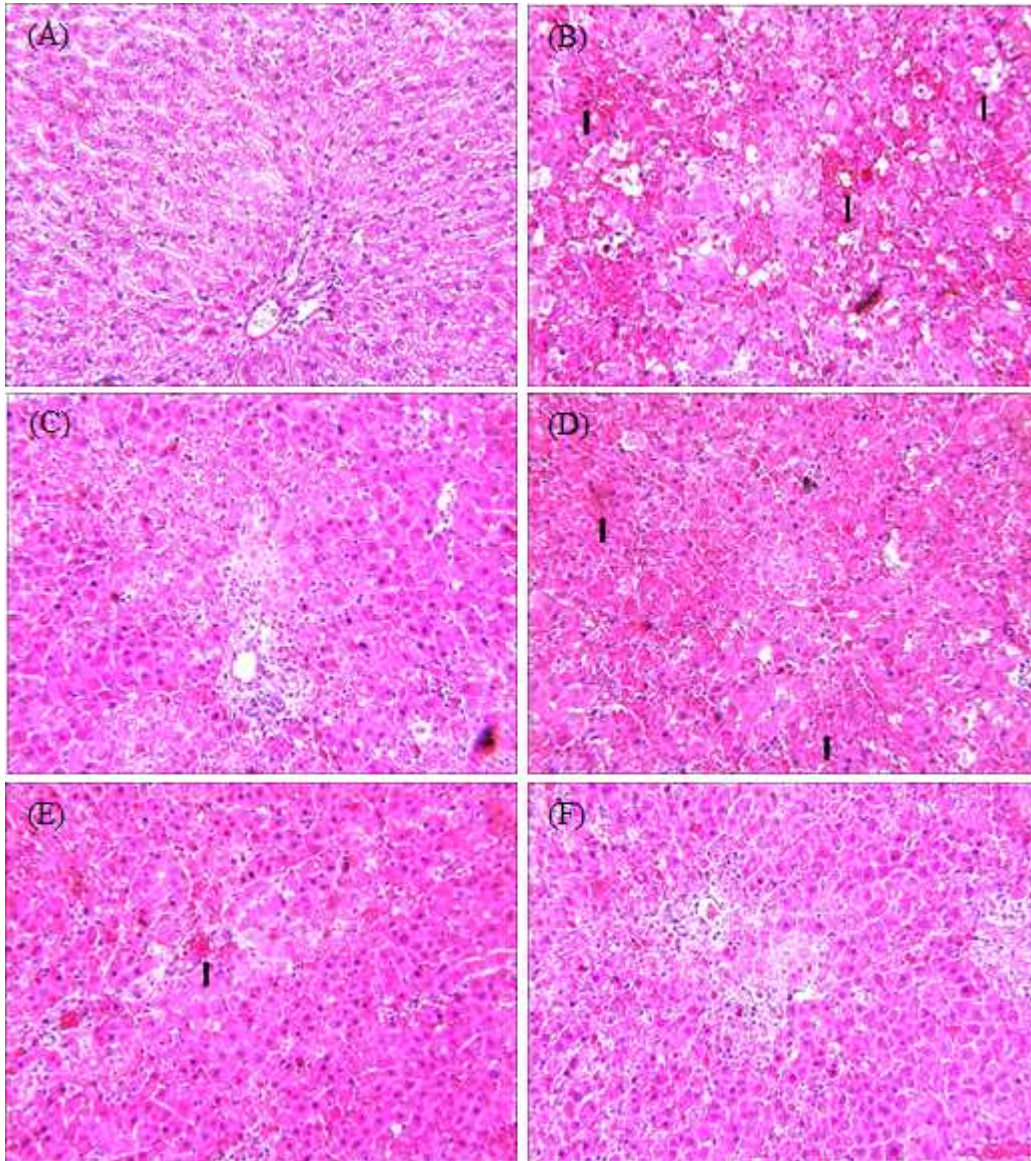


그림 167. GPx 활성도. Student's t-test(\*;  $p < 0.001$  vs Control, #;  $p < 0.001$  vs GalN/LPS)

간에서의 산화적인 손상의 정도를 나타내는 SOD 와 GPx의 활성도를 측정한 결과, GalN/LPS 투여군에서, Control 군에 비해 SOD, GPx의 활성도가 유의성 있게 감소한 것을 확인 할 수 있었고, 실리마린과 인삼열매추출물을 투여한 그룹에서 SOD 와 GPx의 활성도가 유의성 있게 회복되는 것을 확인하였다. 특히, 인삼 열매 추출물을 투여한

그룹에서 SOD와 GPx가 회복되는 정도는 농도의존적인 경향을 나타내었다.

### 3.3. 조직학적 소견



**그림 168.** H&E staining (x 200) (A) : Control, (B) : GalN/LPS, (C) : GalN/LPS + Silymarin (150 mg/kg) (D) : GalN/LPS + GBE (100 mg/kg), (E) : GalN/LPS + GBE (200 mg/kg), (F) : GalN/LPS + GBE (500 mg/kg)

H&E 염색 결과, Control 군은 정상적인 간세포 및 간소엽의 형태를 나타냈다. 하지만, GalN/LPS 투여 군에서는 centritubular necrosis 와 inflammatory cell infiltration 이 관찰 되었고, 정상적인 간세포 및 간소엽의 형태가 관찰되지 않았다. Silymarin (150 mg/kg) 투여군 과 GBE 500 (mg/kg) 투여군에서는 이러한 간상해 지표가 사라진 것을 확인 할 수 있었다.



## 나. EtOH 투여로 유발된 간독성모델에서 인삼 열매 추출물의 간 보호 효과

### 1. 실험 요약

EtOH 로 유도된 간 손상 모델에서, 인삼열매 추출물 및 실리마린의 보호효과를 혈액 및 간의 생화학적 수치를 근거로 평가하였다.

1.1. 실험물질의 투여와 관련된 실험동물의 이상증상은 관찰되지 않았다.

1.2. EtOH 단독 투여군 에서는 Control 군에 비해 체중이 유의성 있게 감소하였다.

1.3. EtOH 단독 투여군과 비교하여, 인삼열매 추출물 및 실리마린 투여 군에서 AST 와 ALT 가 유의성 있게 감소하였다.

1.4. EtOH 단독 투여군과 비교하여, 인삼열매 추출물 및 실리마린 투여 군에서 SOD 와 GPx 의 수치가 유의성 있게 회복되는 것을 확인하였다.

2.1.5. 인삼열매 추출물 및 실리마린 투여 군에서의 간 보호 효과를 조직병리학적 검사로 확인 하였다.

이상의 결과를 종합해볼 때, EtOH 투여로 유발된 간 손상 모델에서, 인삼열매 추출물은 실리마린과 유사하거나 더 강력한 정도의 간 보호효과를 나타낸 것으로 판단되었다.

### 2. 실험 방법

#### 2.1. 실험물질

2.1.1. 인삼 열매 추출물 (100, 250, 500 mg/kg, p.o.)

2.1.2. 실리마린 (Sigma Aldrich Korea, 150 mg/kg, p.o.)

2.1.3. EtOH (Merk, 40 % (v/v), 5 g/kg, p.o.)

#### 2.2. 실험동물 및 실험방법

##### 2.2.1. 실험물질 투여 및 샘플 채취

72 마리의 수컷 S.D. 랫드 (200-250 g)을 6개의 군으로 나누고 (n=12), 1군을 Control 군으로, 2군을 EtOH 단독 투여군으로, 3군을 실리마린 투여 (150 mg/kg) 군으로, 4,5,6 군을 각각 인삼열매 추출물 투여 (100, 250, 500 mg/kg) 군으로 나눈뒤, 3주 동안 3,4,5,6 군은 각 군에 해당하는 시험물질을 용량별로 투여하였고, 실험물질 투여 후 1시간 후에 2,3,4,5,6 군에는 EtOH (5 g/kg)를 투여하였다. 1군에는 동일한 양의 생리식염수를 투여하였다. 마지막 EtOH 투여 후 24시간 후에 경추탈골법을 통해 희생시킨 랫드로부터 혈액 및 간을 채취하였다. 실험물질 투여기간 동안 랫드의 이상증상, 체중변화, 사료 및 물 섭취량을 매일 기록하였다.

### 2.2.2. AST, ALT 측정

각 군 별로 채취한 혈액 샘플을 원심분리하여 (15000g, 4℃, 20분) 혈청을 분리하여 분리된 혈청으로 AST, ALT (UV without P-5-P; IFCC 법, Beckman Coulter 시약, Ireland)를 측정하였다.

### 2.2.3. SOD, GPx (Glutathione Peroxidase) 측정

각 군별로 채취한 간 샘플을 조직용해 버퍼를 사용해 균질화 하여 각각의 키트 (Biovision, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 2.2.4. 조직학적 검사

각 군별로 채취한 간 샘플을 10% formalin 용액에 넣어 고정시킨 후 paraffin block을 만들어 H&E 염색법을 통해 간의 상해 정도를 육안으로 확인하였다.

## 3. 실험 결과

### 3.1. 이상증상, 체중변화 및 사료/물 섭취량

#### Body Weight (EtOH)

	Day 1	Day 21
Control	226.5 ± 3.9	375.67 ± 15.31
EtOH	239.13 ± 3.67	353.3 ± 3.25*
EtOH + Sil	236.38 ± 4.28	357.29 ± 4.33
EtOH + GBE 100	239.25 ± 8.9	355.07 ± 9.31
EtOH + GBE 250	229.88 ± 3.65	363 ± 5.93
EtOH + GBE 500	243.25 ± 6.17	366.14 ± 3.62

단위 : g

표 44. S.D. 랫드 체중 변화. Student t-test(\*; p<0.05 vs Control)

실험 기간 도중 이상증상은 발견되지 않았고, 사료 및 물 섭취량 (data not shown)에도 유의성 있는 차이가 없었다. 다만, 실험 종료시 EtOH 군에서 Control 군과 비교하여 유의성 있는 체중감소가 나타났다.



### 3.2. AST, ALT 레벨

간 손상 정도의 대표적인 지표인 AST, ALT 레벨을 측정한 결과, EtOH 투여군에서, Control 군에 비해 AST, ALT 레벨이 유의성있게 상승하였고, 실리마린과 인삼열매추출물 500 mg/kg 을 투여한 그룹에서 AST, ALT 레벨이 유의성 있게 감소하는 것을 보였다.

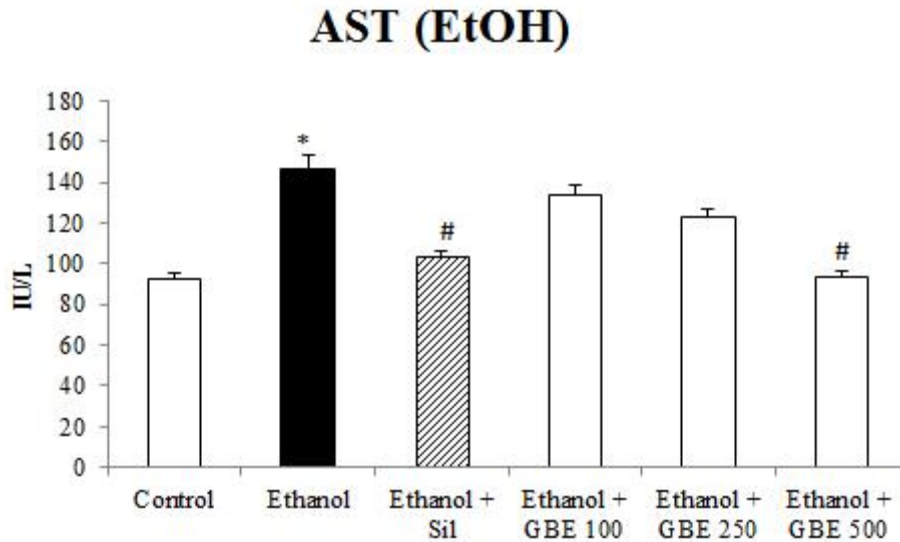


그림 169. AST 레벨. Student's t-test(\*;  $p < 0.05$  vs Control, #;  $p < 0.05$  vs EtOH)

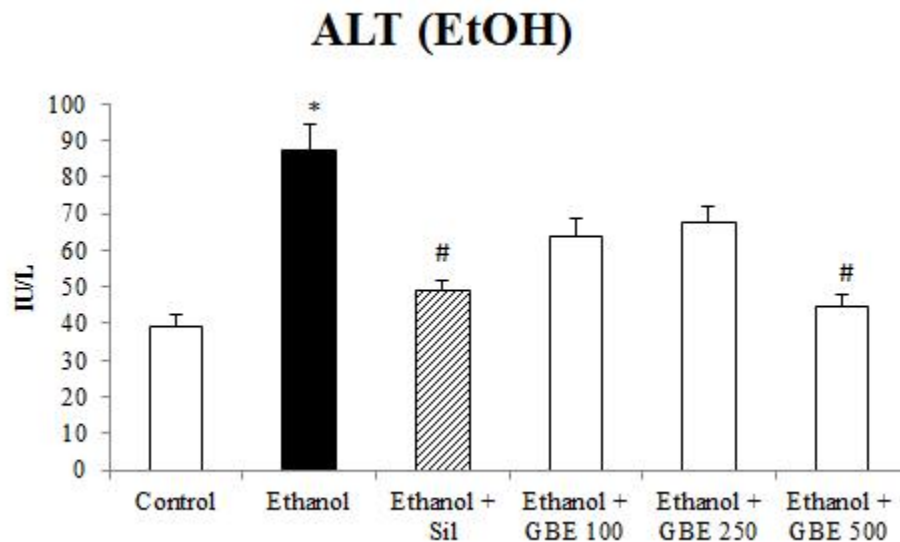


그림 170. ALT 레벨. Student's t-test(\*;  $p < 0.05$  vs Control, #;  $p < 0.05$  vs EtOH)

### 3.3. SOD, Glutathione Peroxidase (GPx)

간에서의 산화적인 손상의 정도를 나타내는 SOD 와 GPx의 활성도를 측정한 결과, EtOH 투여군에서, Control 군에 비해 SOD, GPx의 활성도가 유의성 있게 감소한 것을 확인 할 수 있

있고, 실리마린과 인삼열매추출물을 투여한 그룹에서 AST, ALT 레벨이 유의성 있게 감소하는 것을 보였다. 인삼열매 추출물은 농도 100 mg/kg 에서는 효과를 나타내지 않았으나, 250 mg/kg, 500 mg/kg 에서는 농도 의존적으로 산화적인 손상을 줄여 주는 것으로 확인되었다.

### SOD Activity (EtOH)

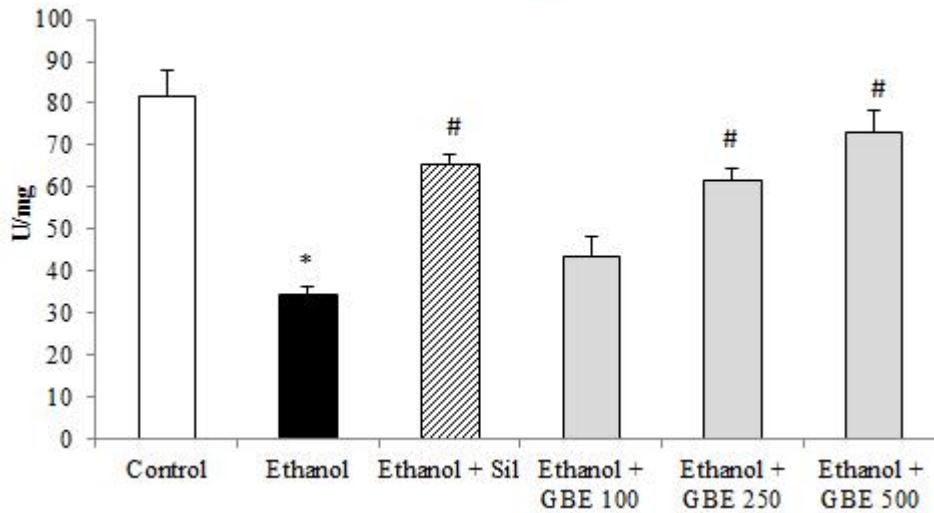


그림 171. SOD 활성도. Student's t-test(\*; p<0.01 vs Control, #; p<0.01 vs EtOH)

### GPx Activity (EtOH)

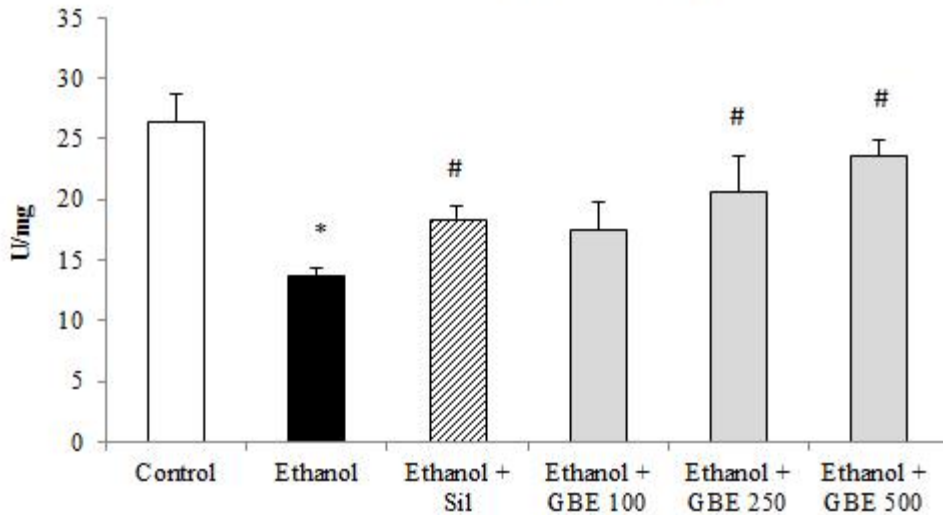


그림 172. GPx 활성도. Student's t-test(\*; p<0.01 vs Control, #; p<0.01 vs EtOH)

간에서의 산화적인 손상의 정도를 나타내는 SOD 와 GPx의 활성도를 측정한 결과, EtOH 투여군에서, Control 군에 비해 SOD, GPx의 활성도가 유의성 있게 감소한 것을 확인 할 수 있었고, 실리마린과 인삼열매추출물을 투여한 그룹에서 SOD, GPx 활성도가 유의성 있게 회복되

는 것을 보았다. 인삼열매 추출물은 농도 100 mg/kg 에서는 효과를 나타내지 않았으나, 250 mg/kg, 500 mg/kg 에서는 농도 의존적으로 산화적인 손상을 줄여 주는 것으로 확인되었다.

## 다. EtOH 투여로 유발된 산화적 손상에 대한 인삼 열매 추출물의 간 보호 효과

### 1. 실험 요약

EtOH 로 유도된 산화적 손상에 대한 초음파처리 인삼열매 추출물 및 실리마린의 보호효과를 혈액 및 간의 생화학적 수치를 근거로 평가하였다.

- 1) 초음파 처리 인삼열매의 투여와 관련된 실험동물의 이상증상은 관찰되지 않았고, 실험 종료 시 유의성 있는 체중의 변화 또한 나타나지 않았다.
- 2) EtOH 단독 투여군과 비교하여, 초음파 처리 인삼열매 추출물은 부고환지방조직/체중 비율이 유의성있게 감소시켰다.
- 3) EtOH 단독 투여군과 비교하여, 초음파 처리 인삼열매 추출물은 혈청 AST, ALT,  $\gamma$ -GT의 농도를 유의성 있게 감소시켰다.
- 4) EtOH 단독 투여군과 비교하여, 초음파 처리 인삼열매 추출물은 간 iNOS 단백질 발현 및 NO 생성을 감소시켰고, 지질과산화를 억제하였다.
- 5) EtOH 단독 투여군과 비교하여, 초음파 처리 인삼열매 추출물은 SOD, GPx, CAT의 수치가 유의성 있게 회복시켰다.
- 6) EtOH 단독 투여군과 비교하여, 초음파 처리 인삼열매 추출물은 지질과산화를 억제시켰다.
- 7) EtOH 단독 투여군과 비교하여, 초음파 처리 인삼열매 추출물은 HO-1의 단백질 발현량을 유의성있게 증가시켰다.
- 8) EtOH 단독 투여군과 비교하여, 초음파 처리 인삼열매 추출물은 TNF- $\alpha$  단백질 발현량을 유의성있게 감소시켰다.
- 9) EtOH 단독 투여군과 비교하여, 초음파 처리 인삼열매 추출물은 TLR4의 발현량을 유의성 있게 감소시켰다.
- 10) 1.9의 결과를 면역조직화학염색법을 통하여 확인하였다.
- 11) 간 조직의 형태학적인 변화를 H&E 염색법을 통하여 확인하였다.

이상의 결과를 종합해볼 때, EtOH 투여로 유발된 산화적 손상 모델에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 일반 인삼열매 추출물 및 실리마린과 유사하거나 더 강력한 정도의 간 보호효과를 나타낸 것으로 판단되었고, 이러한 효과는 HO-1과 TLR4와 관련이 있는 것으로 확인되었다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 실험물질

- (1) 초음파 처리 인삼 열매 추출물 (100, 250, 500 mg/kg, p.o.)
- (2) 인삼 열매 추출물 (250 mg/kg, p.o.)
- (3) 실리마린 (Sigma Aldrich Korea, 150 mg/kg, p.o.)
- (4) EtOH (Merk, 40 % (v/v), 5 g/kg, p.o.)

## 2) 실험동물 및 실험방법

### (1) 실험물질 투여 및 샘플 채취

63 마리의 수컷 S.D. 랫드 (250-270g)을 7개의 군으로 나누고 (n=12), 1군을 Control 군으로, 2군을 EtOH 단독 투여군으로, 3군을 실리마린 투여 (150 mg/kg) 군으로, 4군을 인삼열매 추출물 투여 (250 mg/kg) 군으로, 5,6,7 군을 각각 초음파처리 인삼열매 추출물 투여 (100, 250, 500 mg/kg) 군으로 나눈뒤, 3주 동안 3,4,5,6,7 군은 각 군에 해당하는 시험물질을 용량별로 투여하였고, 실험물질 투여 후 1시간 후에 2,3,4,5,6,7 군에는 Ethanol (5 g/kg)를 투여하였다. 1군에는 동일한 양의 생리식염수를 투여하였다. 마지막 EtOH 투여 후 24시간 후에 경추탈골법을 통해 희생시킨 랫드로부터 혈액 및 간을 채취하였고, 부고환지방조직 및 간의 무게를 측정하였다. 실험물질 투여기간 동안 랫드의 이상증상, 체중변화, 사료 및 물 섭취량을 매일 기록하였다.

### (2) AST, ALT, $\gamma$ -Glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT) 측정

각 군 별로 채취한 혈액 샘플을 원심분리하여 (15000g, 4°C, 20분) 혈청을 분리하여 분리된 혈청으로 각각의 키트 (Biiivision, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### (3) High density lipoprotein (HDL), Low density lipoprotein (LDL), Total cholesterol 측정

각 군 별로 채취한 혈액 샘플을 원심분리하여 (15000g, 4°C, 20분) 혈청을 분리하여 분리된 혈청으로 각각의 키트 (Biiivision, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### (4) Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) 측정

각 군별로 채취한 간 샘플을 조직용해 버퍼를 사용해 균질화 하여 각각의 키트 (Bioivision, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### (5) Inducible NO synthase (iNOS), Nitric oxide (NO), Malondialdehyde (MDA) 측정

각 군별로 채취한 간 샘플을 조직용해 버퍼를 사용해 균질화 하여 각각의 키트 (Bioivision, CA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### (6) Heme oxygenase-1 (HO-1) 단백질 발현량 측정

각 군별로 채취한 간 샘플을 조직용해 버퍼를 사용해 균질화 하여 효소 면역 분석법 키트 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA, ENZO life Science, NY)를 이용하여 측정하였다.

(7) TNF- $\alpha$  발현량 측정

각 군별로 채취한 간 샘플을 조직용해 버퍼를 사용해 균질화 하여 효소 면역 분석법 키트 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA, Biovision, CA)를 이용하여 측정하였다.

(8) Toll-like receptor 4 (TLR4) 발현량 측정

각 군별로 채취한 간 샘플을 조직용해 버퍼를 사용해 균질화 하여 효소 면역 분석법 키트 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA, CUSABIO Life Science, CN)를 이용하여 측정하였다.

(9) Hematoxyling and Eosin (H&E) 염색

각 군별로 채취한 간 샘플을 10% formalin 용액에 넣어 고정시킨 후 paraffin block을 만들어 H&E 염색법을 통해 간의 상해 정도를 육안으로 확인하였다.

(10) 면역조직화학 (immunohistochemistry) 염색

각 군별로 채취한 간 샘플을 10% formalin 용액에 넣어 고정시킨 후 TLR4 antibody (Abcam, UK)를 처리한 paraffin block을 만들어 TLR4의 발현 정도를 육안으로 확인하여 scoring test를 진행하였다.

3. 실험 결과

1) 이상증상, 체중변화 및 사료/물 섭취량

### Body Weight

	Day 1	Day 28
Control	265.2 $\pm$ 4.7	397.7 $\pm$ 22.8
Ethanol	271.2 $\pm$ 6.1	391.9.3 $\pm$ 23.1
Ethanol + Sil	266.8 $\pm$ 4.3	388.8 $\pm$ 15.9
Ethanol + GBE 250	267.4 $\pm$ 4.9	379.8 $\pm$ 8
Ethanol + UBE 100	265.4 $\pm$ 5	378.6 $\pm$ 17.5
Ethanol + UBE 250	274.3 $\pm$ 10.7	377.6 $\pm$ 20
Ethanol + UBE 500	280.1 $\pm$ 7.5	376.6 $\pm$ 16.9

단위 : g

표 45. S.D. 랫드 체중 변화

실험 기간 도중 외형적인 이상증상은 발견되지 않았고, 사료 및 물 섭취량 (data not shown) 에도 유의성 있는 차이가 없었다. 또한 투약종료 후의 실험 종료시 EtOH 군에서 Control 군과 비교하여 유의성 있는 체중변화가 나타나지는 않았다. 하지만, 이와는 별개로 Control 군에 비하여 EtOH 만을 투여한 군의 체중이 감소하는 경향을 보였고, 특히 GBE 와 UBE를 투여한 군에서 그 감소하는 경향성이 큰 것으로 나타났다. 특히 UBE를 500 mg/kg을 투여한 군의 경우 실험 시작시의 체중은 Control 군에 비하여 다소 무거웠으나, 실험 종료시의 몸무게는 오히려 더 감소하였다.

## 2) 간/체중 비율 및 부고환지방조직/체중 비율

Ethanol 및 실험물질 투여로 인하여 간/체중 비율 (L/B) 에서 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다. 하지만 체내 지방량의 지표조직인 부고환지방조직의 랫드체중비의 결과에서는 그림 2 에서 보듯이 ethanol 투여군에서 control 군에 비하여 유의성있게 증가한 것을 확인할 수 있었고, GBE 250 mg/kg 투여군과 UBE 500 mg/kg 에서는 늘어난 부고환지방조직/체중 비율(F/B) 이 다시금 유의성 있게 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 GBE 와 UBE에 포함된 ginsenoside Re 와 관련된 것으로서, UBE 의 주성분인 ginsenoside Rh1, Rk1, Rg2, Rg3, F4 와 함께 ginsenoside Re 또한 그 효과를 나타낸 것으로 확인 할 수 있었다.

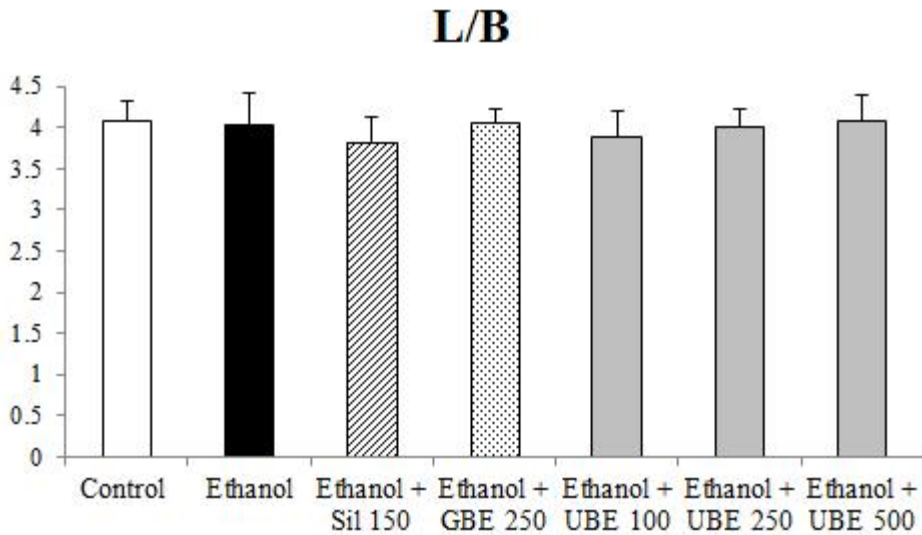


그림 173. 간/체중 비율

## 3) 혈중 AST, ALT, $\gamma$ -GT 레벨

간 손상 정도의 대표적인 지표인 혈중 AST, ALT,  $\gamma$ -GT 레벨을 측정된 결과, ethanol 투여군에서 Control 군에 비해 혈중 AST, ALT,  $\gamma$ -GT 레벨이 유의성있게 상승한 것을 확인할 수 있었다. 그림 3 과 그림 4에서 보듯이 혈중 AST와 ALT 레벨에 GBE 250 mg/kg 의 투여는 혈중 AST와 ALT 의 감소에 영향을 미치지 못하였고, silymarin 150 mg/kg, UBE 100, 250 mg/kg 의 투여는 비슷한 수준의 효과를 나타내었다. UBE 500 mg/kg 의 투여는 가장

## F/B

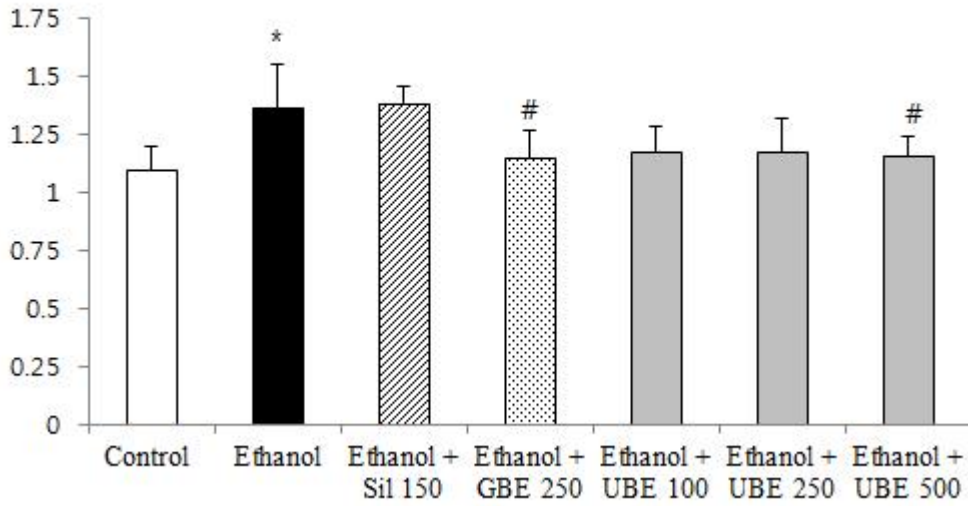


그림 174. 부고환지방/체중 비율. Student's t-test(\*;  $p < 0.05$  vs Control, #;  $p < 0.05$  vs Ethanol)

강력하게 혈중 AST와 ALT의 레벨을 감소시켰다. 그림 5에서 보듯이 silymarin 이나 GBE의 투여는 혈중  $\gamma$ -GT 레벨을 감소시키지 못하였으나 UBE 250, 500 mg/kg의 투여는 혈중  $\gamma$ -GT의 레벨을 유의성 있게 감소시켰다. 이상의 결과를 통해 UBE는 ethanol의 장기간 투여로 인한 간손상을 유의성 있게 감소시키는 것으로 확인되었다.

## AST

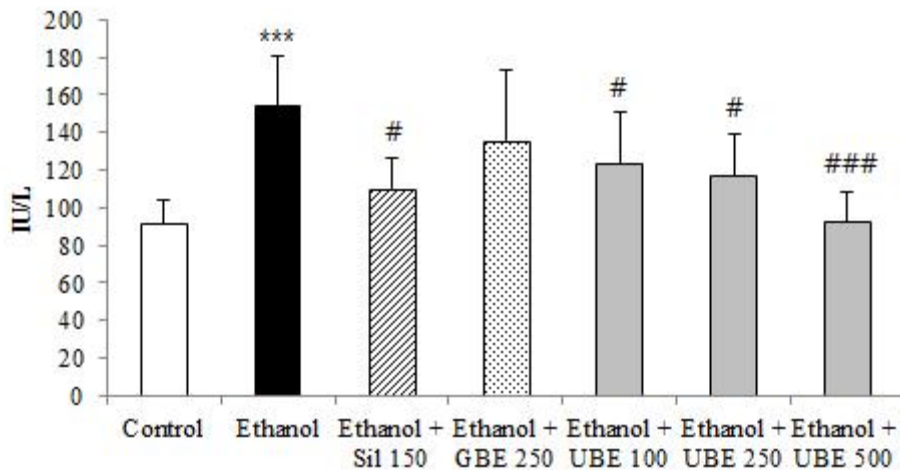


그림 175. 혈중 AST 레벨. Student's t-test(\*\*\*;  $p < 0.005$  vs Control, #;  $p < 0.05$ , ###;  $p < 0.005$  vs Ethanol)



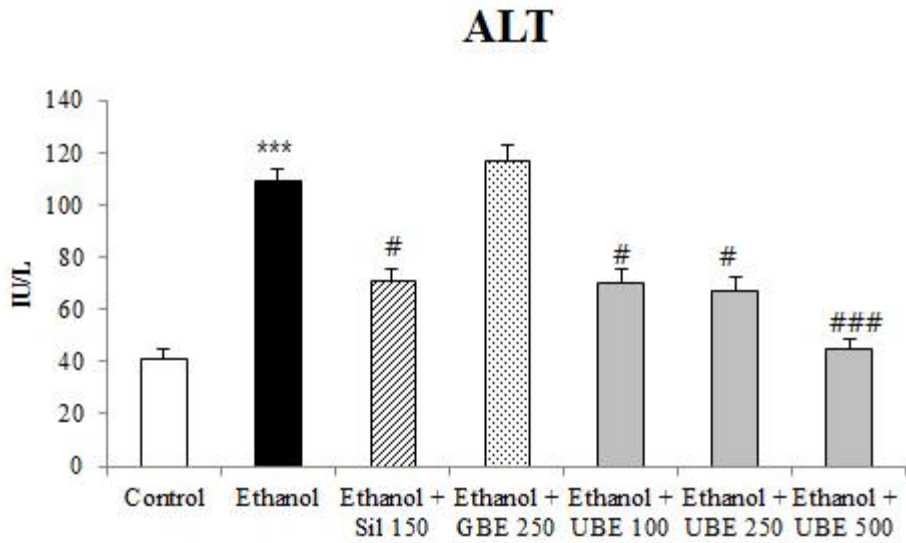


그림 176. 혈중 AST 레벨. Student's t-test(\*\*\*;  $p < 0.005$  vs Control, #;  $p < 0.05$ , ###;  $p < 0.005$  vs Ethanol)

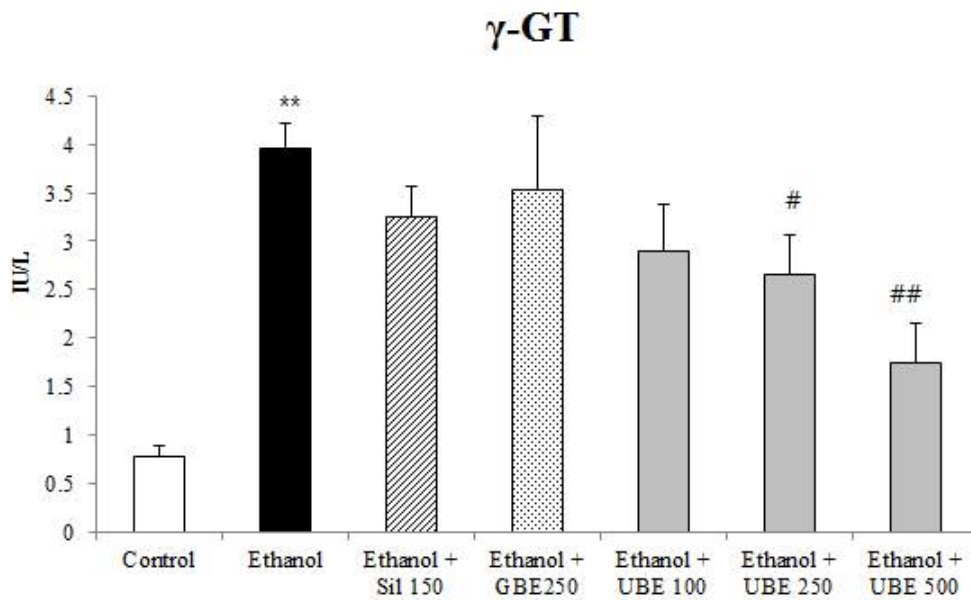


그림 177. 혈중  $\gamma$ -GT 레벨. Student's t-test(\*\*;  $p < 0.01$  vs Control, #;  $p < 0.05$ , ##;  $p < 0.01$  vs Ethanol)

4) 혈중 지질지표 (HDL, LDL, Total cholesterol)

3.2. 의 결과와 연계하여 ethanol 투여로 인한 지방간적 손상에 대한 개선효과를 혈중 지질지표를 통하여 확인하였다. 그림 6.에서 보듯이 GBE 250 mg/kg, UBE 500 mg/kg에서 ethanol 투여로 인하여 감소된 혈중 HDL 레벨이 다른군에서와는 다르게 유의성 있게 증가한 것을 관찰하였다. 또한 혈중 LDL 과 total cholesterol 레벨을 확인하였을 때, ethanol 투여로 인하여 증가된 혈중 LDL 과 total cholesterol level은 GBE 250 mg/kg, UBE 250, 500 mg/kg 투여로 인하여 유의성 있게 감소하였다. 혈중 지질지표 결과에서는 silymarin 은 별다른 효과를 나타내지 못한 것으로 관찰되었다. 이상의 결과를 통해 UBE 는 ethanol의 장기간 투여로 인한 이상 지질지표를 개선시키는 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

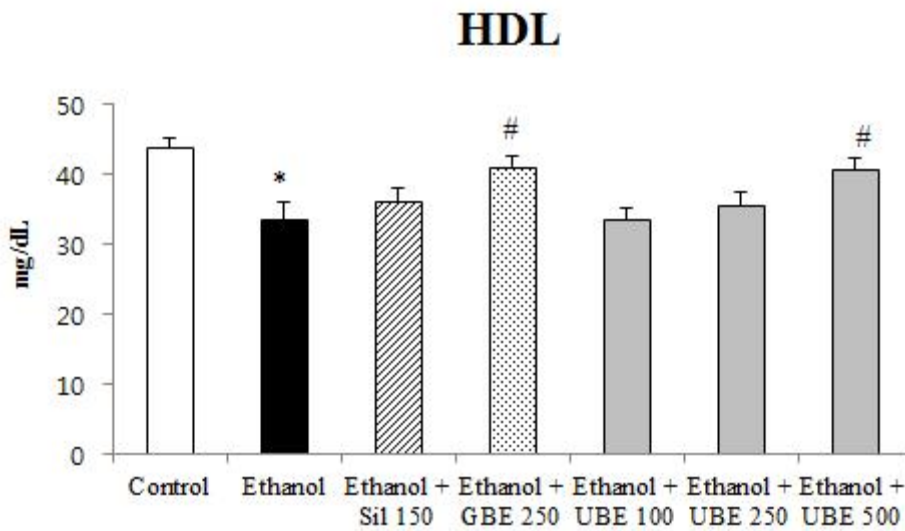


그림 178. 혈중 HDL 레벨. Student's t-test(\*; p<0.05 vs Control, #; p<0.05 vs Ethanol)

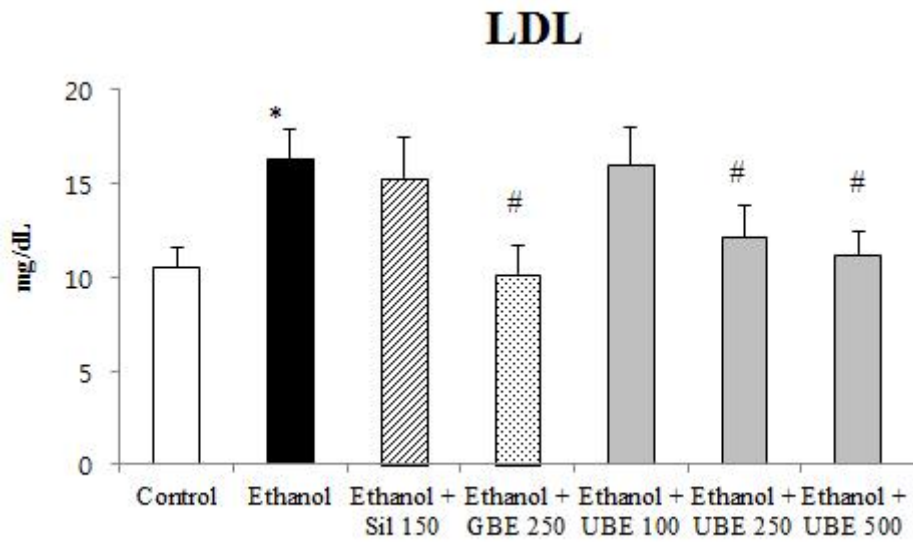


그림 179. 혈중 LDL 레벨. Student's t-test(\*;  $p < 0.05$  vs Control, #;  $p < 0.05$  vs Ethanol)

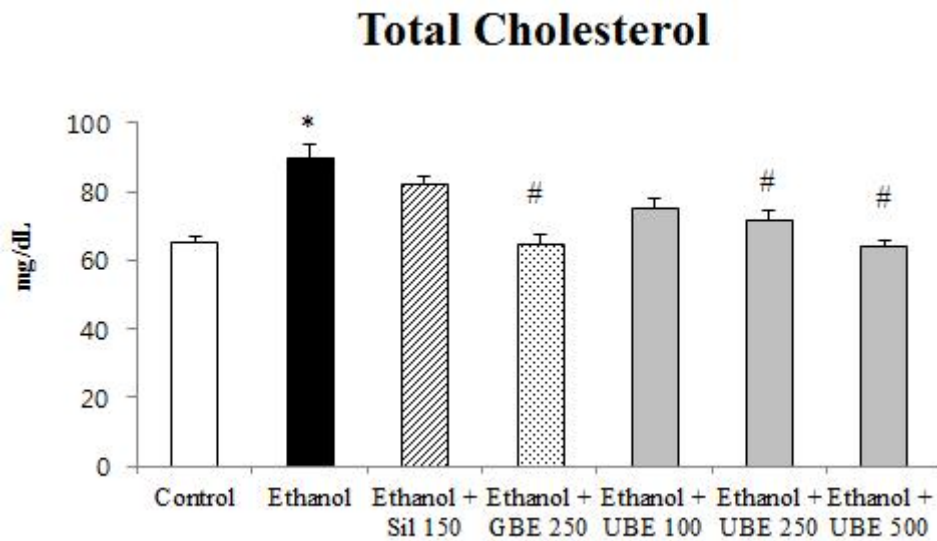


그림 180. 혈중 total cholesterol 레벨. Student's t-test(\*;  $p < 0.05$  vs Control, #;  $p < 0.05$  vs Ethanol)

5) 간 SOD, GPx, CAT 활성도

간에서의 산화적 손상에 있어서 대표적인 항산화 효소인 SOD, GPx, CAT 의 활성을 측정한 결과, EtOH 투여 군에서 그 활성이 유의성 있게 감소하였고, 이러한 감소한 활성은 UBE 250, 500 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 회복되는 것을 확인 할 수 있었다. 항산화 효소의 활성도 증가에서는 silymarin 150 mg/kg 투여군 또한 그 활성도를 유의성있게 회복시키는 것으로 나타났고, SOD 활성도는 GBE 250 mg/kg 투여군에서또한 증가한 것으로 나타났다. 하지만, 다른 항산화효소의 활성도에는 GBE 250 mg/kg 의 투여가 별다른 효과를 나타내지 못하였다. 이상의 결과를 통해 UBE 는 ethanol의 장기간 투여로 인하여 감소된 항산화효소의 활성도를 유의성있게 회복시키는 것으로 확인되었다.

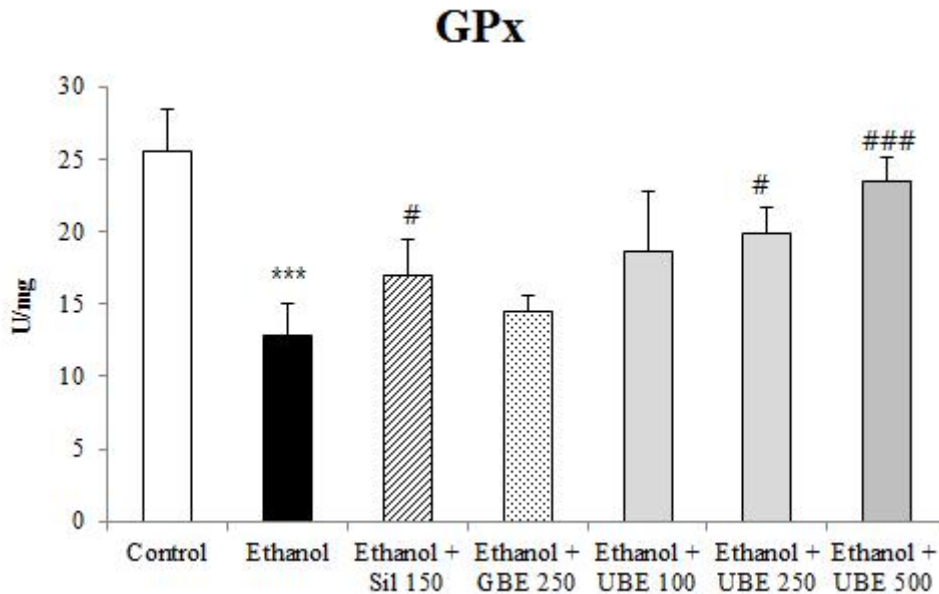


그림 181. 간 GPx 활성도. Student's t-test(\*\*\*; p<0.005 vs Control, #; p<0.05, ###; p<0.005 vs Ethanol)

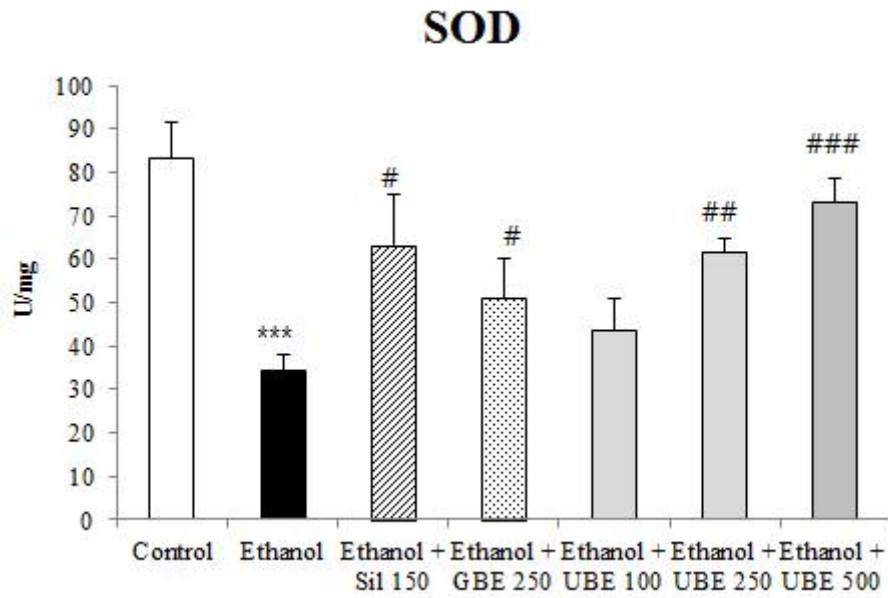


그림 182. 간 SOD 활성도. Student's t-test(\*\*\*;  $p < 0.005$  vs Control, #;  $p < 0.05$ , ##;  $p < 0.01$ , ###;  $p < 0.005$  vs Ethanol)

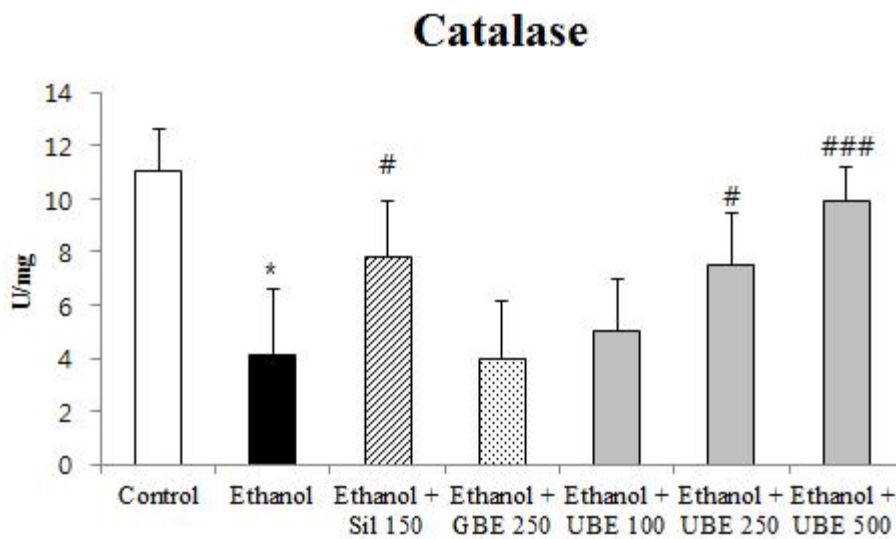


그림 183. 간 CAT 활성도. Student's t-test(\*;  $p < 0.05$  vs Control, #;  $p < 0.05$ , ###;  $p < 0.005$  vs Ethanol)

6) 간 HO-1 단백질 발현량

간에서의 대표적인 항산화 효소중에 하나인 HO-1은 ethanol 투여로 인한 산화적 손상에 대항하여 유의성 단백질 발현량이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 HO-1 단백질의 발현 증가는 UBE 250, 500 mg/kg에서 더욱더 강하게 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 다른 투여군에서 산화적 손상에 대항한 HO-1 단백질의 발현량 증가는 확인되지 않았다. 이상의 결과를 통해 UBE 는 ethanol의 장기간 투여로 인하여 증가된 산화적 손상에 대한 HO-1 의 단백질 발현량을 유의성있게 증가시켜 항산화 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

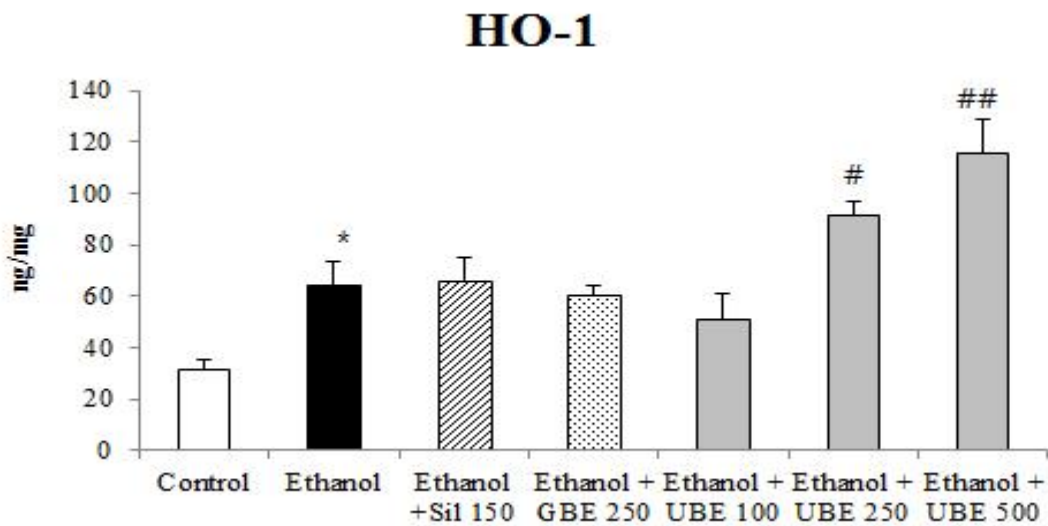


그림 184. 간 HO-1 단백질 발현량. Student's t-test(\*;  $p < 0.05$  vs Control, #;  $p < 0.05$ , ##;  $p < 0.01$  vs Ethanol).

### 7) 간 TNF- $\alpha$ 단백질 발현량

간손상에 대한 대표적인 pro-inflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 단백질 발현량은 ethanol 투여군에서 급격하게 상승하였고, 이는 UBE 100, 250, 500 mg/kg에서 농도의존적으로 감소하였다. 하지만, GBE 250 mg/kg 투여군에서는 감소하는 경향만 보였을 뿐, 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다. 이상의 결과를 통해 UBE는 ethanol 장기간 투여로 인하여 증가된 pro-inflammatory cytokine 인 TNF- $\alpha$ 의 단백질 발현량을 유의성 있게 감소시켜 간에서의 염증 반응을 억제시키는 것으로 확인되었다.

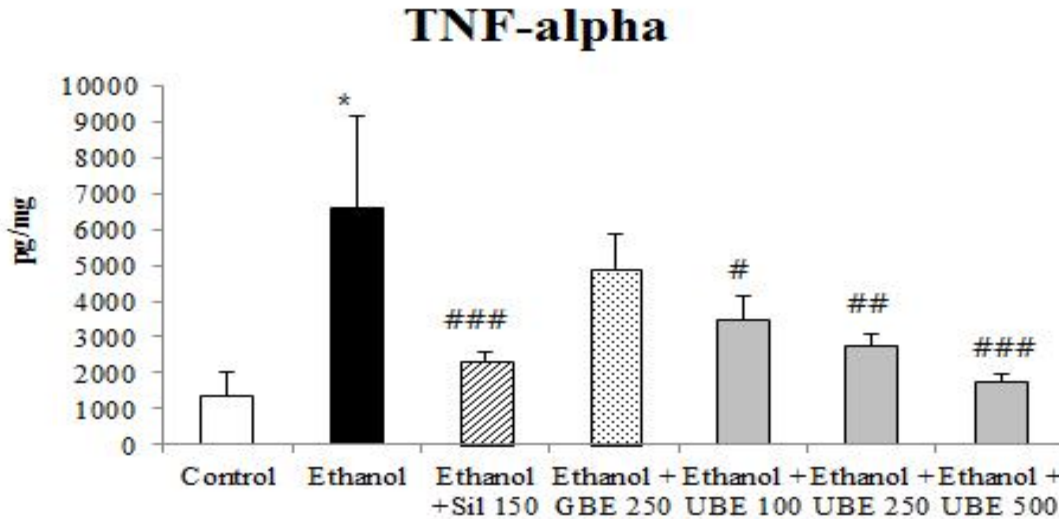


그림 185. 간 TNF- $\alpha$  단백질 발현량. Student's t-test(\*\*\*;  $p < 0.005$  vs Control, #;  $p < 0.05$ , ##;  $p < 0.01$ , ###;  $p < 0.005$  vs Ethanol)

### 8) 간 TLR4 단백질 발현량

그람음성세균 표층의 펩티드글리칸을 둘러싸는 외막의 주요 구성성분인 지질다당류 (Lipopolysaccharide; LPS)를 주요 리간드로 하는 TLR4는 TLR4 신호전달 기전을 통하여 염증 및 세포괴사에 주요한 역할을 하는 수용체로 알려져 있다. 이러한 TLR4의 단백질 발현량은 ethanol 투여로 인하여 유의성 있게 증가하였고, UBE 500 mg/kg 투여군에서 유의성있게 감소하는 것으로 확인되었다.

## TLR4

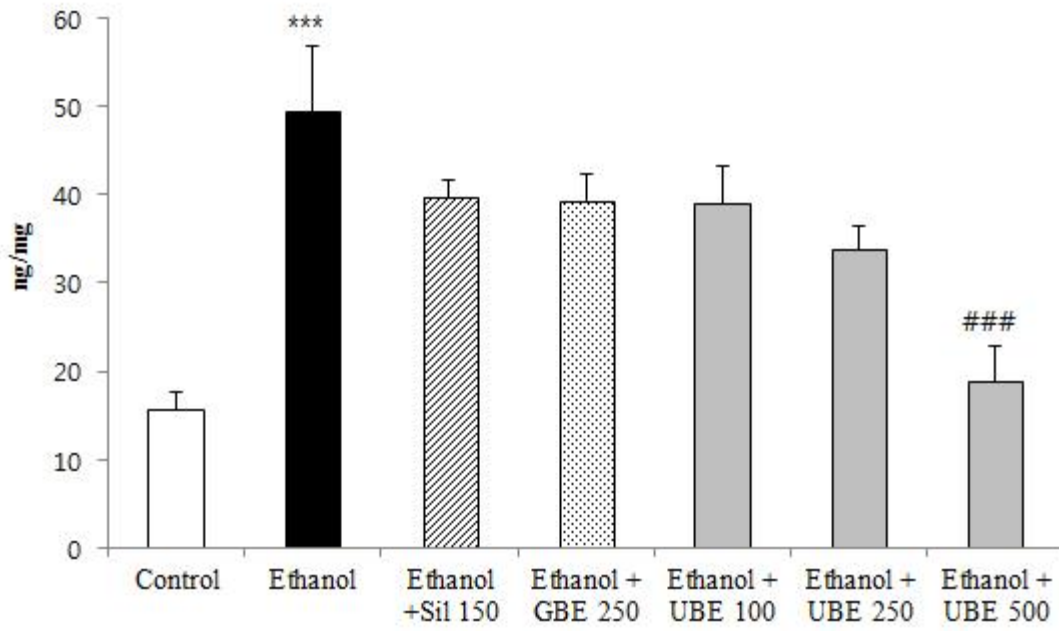
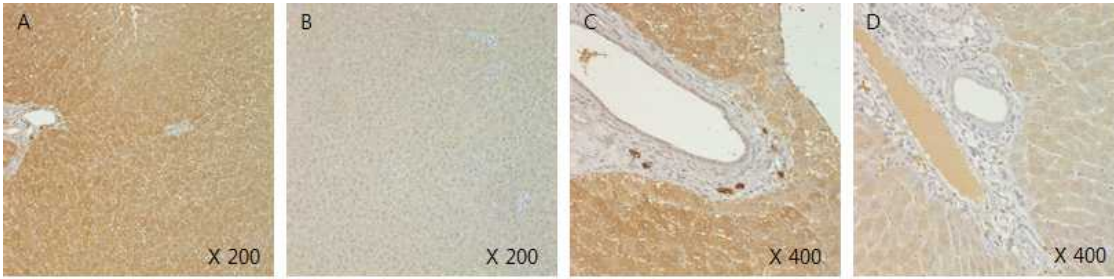


그림 186. 간 TLR4 단백질 발현량. Student's t-test(\*\*\*;  $p < 0.005$  vs Control, ###;  $p < 0.005$  vs Ethanol)

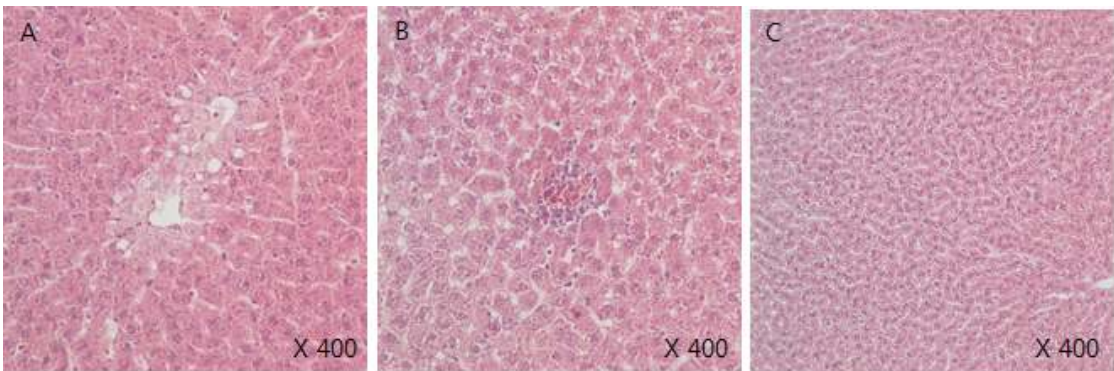


### 9) TLR4 면역화학조직염색



TLR4의 면역화학조직염색 결과, ethanol 처리군의 hepatocyte와 interface stem cell에서 TLR4의 발현이 유의성 있게 증가한 것을 확인하였고(그림 18A, C), UBE 500 mg/kg 투여군에서는 이러한 TLR4의 발현이 유의성 있게 감소한 것을 확인할 수 있었다(그림 18B, D). Silymarin이나 GBE 투여군에서는 이러한 감소가 나타나지 않았다(data not shown).

### 10) H&E 염색



조직의 상해정도를 알아보기 위한 H&E 염색 결과, ethanol 처리군에서는 perivenular fatty change 및 perivenular sclerosis가 빈번하게 목격된 것을 확인할 수 있었다(그림 19A). 또한 necroinflammatory foci도 관찰되었다(그림 19B). 이러한 조직학적 병변은 UBE 군과 silymarin 군에서 유의성 있게 감소하였으나(그림 19C), GBE 군에서는 확인되지 않았다(data not shown).

#### 4. 고찰

이번 연구에서는, 1차년도 과제에 미흡했던 부분을 보완하고, 초음파처리 인삼열매의 간보호 효과의 기전을 파악하고, 그 효과를 보통의 인삼열매추출물과 비교하였다. 1차년도 과제와는 달리 ethanol 투여에 의한 간손상에 대한 초음파처리 인삼열매 추출물의 효과만을 확인하였으며, 그 효과를 다각도로 확인하였다.

실험모델에 있어서 1차년도 연구와의 차이점은 투여기간을 3주에서 4주로 기간을 늘려, ethanol 에 의한 간손상에 대하여 좀 더 만성적인 효과를 확인하였으며, 기존 연구에서 살펴본 지 않았던 지방간에 대한 효과를 더 연구하였고, HO-1의 발현량 증가 및 TLR4 의 발현량 억제를 매개로 하는 간보호효과의 기전또한 대략적으로 파악 할 수 있었다는 점이다.

대표적인 간 손상지표인 ALT, AST,  $\gamma$ -GT 의 경우 UBE의 투여로 인하여 유의성있게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 3, 4, 5). GBE의 경우 이러한 효과는 AST 레벨 감소에서만 확인 할 수 있었다. Silymarin 의 투여의 경우에는 AST, ALT 레벨감소에서 상당한 효과를 나타내었지만,  $\gamma$ -GT의 경우에는 유의성있는 감소효과를 나타내는 대신 경향성만을 보였다.

산화적 스트레스의 대표적인 지표물질이자 항산화효소인 GPx, SOD, CAT 의 활성도의 경우 ethanol 투여로 인하여 유의성있게 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 감소는 silymarin 투여에서도 확인 할 수 있었지만, GBE 의 투여에서는 그 효과가 거의 나타나지 않았고, SOD 활성에만 약간의 기여를 함을 확인 할 수 있었다. 전반적인 경향을 보았을 때 UBE 250, 500 mg/kg 에서는 silymarin 보다 더 강력한 항산화효과를 나타낸 것으로 확인되었다 (그림 9, 10, 11). 뿐만 아니라, UBE는 HO-1 단백질의 발현량 또한 강력히 증가시켰다 (그림 12). 앞서 살펴본 SOD, GPx, CAT는 단순히 산화적 스트레스의 지표물질정도의 의의를 두고 측정하는 것이라면, HO-1 은 실질적인 산화적 스트레스에 대한 회복능력을 측정하는 것에 의미를 두었다. 그 이유는 HO-1의 경우 산화적 손상에 의해 감소되지 않고 오히려 증가하였기 때문이다. 이러한 HO-1 의 증가는 ethanol 단독투여 군에 비해 UBE 250, 500 mg/kg 투여군에서 상당히 많이 증가한 것으로 확인하였고, UBE 의 항산화효과는 HO-1 단백질의 증가와 상당한 연관성을 가지는 것으로 확인되었다.

염증반응의 주요 매개물질인 TNF- $\alpha$ 는 ethanol 투여에 의해 대략 5배 이상 증가하여 TNF- $\alpha$ 가 ethanol 투여에 의한 간손상에 주요 염증반응 매개인자라는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 13). 이러한 TNF- $\alpha$  단백질의 양은 silymarin 과 UBE 투여군에서 유의성 있게 감소하는 것을 확인 할 수 있었는데 이상의 결과는 UBE 가 강력한 항염증 작용을 가진다는 것을 반증한다.

간손상의 대표적인 또다른 매개물질인 NF- $\kappa$ B의 작용을 촉진하는 상위수용체인 TLR4 역시 ethanol 투여에 의하여 유의성있게 증가하는 것을 확인하였다. 이는 ethanol 투여로 인하여 LPS 의 혈관 투과성이 높아져 발생한 결과로 알려져 있는데, 이러한 TLR4 단백질 의 발현량은 UBE 500 mg/kg에서 상당한 유의성을 띄며 감소하였다 (그림 14). 추가연구를 통하여 NF- $\kappa$ B의 발현량 및 TLR4 의 결합단백질의 발현량을 연구한다면 더욱 자세한 기전파악이 가능할 것으로 보인다.

한편, 1차년도 연구와는 달리 ethanol 투여로 인한 유의성 있는 체중감소 대신에 체중감소의 경향성만 파악되었으나, 단순히 체중만을 비교하여서는 체지방감소에 대한 효과를 확인 할 수 없었기에 부고환지방조직/체중 (F/B) 비율을 추가적으로 계산하였다. 이를 통해 UBE 500 mg/kg 과 GBE 250 mg/kg에서 유의성있게 F/B가 감소한 것을 확인 할 수 있었다 (표1, 그림

3). 또한, 대표적인 지질지표물질인 HDL, LDL, Total cholesterol 수치에서 역시 전반적인 지질지표가 UBE 및 GBE 투여에 의해 유의성있게 개선된 것을 확인 할 수 있었다 (그림 6, 7, 8). 이는 silymarin 투여에서는 볼 수 없는 인삼열매추출물만의 고유한 특성으로 확인되었다. 이러한 효과는 GBE의 주성분인 ginsenoside Re에 의한 효과로 추정된다. UBE는 주된 ginsenoside 인 Rh1, Rk1, Rg2, Rg3, F4 뿐만 아니라 ginsenoside Re 또한 적당량 포함하고 있는 것으로 알려져 있기 때문에, UBE는 간에서의 산화적 손상에 대한 예방 뿐만 아니라 지질지표 개선등을 통한 알코올성 지방간에 대한 치료 및 예방효과도 가질 수 있는 것으로 기대된다.

이상의 결과를 요약하여 볼 때, UBE 는 silymarin 이 가지고 있지 않은 지질지표개선효과와 더불어 GBE 투여 군에서는 거의 나타나지 않은 알코올성 간손상 (특히 산화적 손상 및 염증에 관하여)에 탁월한 효과를 가진 한국형 차세대 간보호 물질이 될 가능성을 가지고 있는 것으로 보인다.

이번 연구에서, 초음파 처리 인삼열매 추출물의 간 보호 효과를 알아보기 위하여 2가지의 간 손상모델을 사용하였다.

GalN/LPS로 유도된 급성 간 독성 모델은 널리 알려진 급성 간부전 모델이다. 이러한 모델에서, 간 손상의 지표인 ALT, AST 수치와 산화적 손상에 대한 지표인 SOD, GPx 활성도를 보았을 때, 인삼열매 추출물은, 이미 그 효과가 널리 입증된 실리마린과 유사하거나 더 뛰어난 보호효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 이를 종합해 보았을 때, 인삼 열매 추출물은 간부전과 비 알콜성 지방간 (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ; NAFLD)에 효과적인 예방 · 치료 물질이 될 수 있을 것 이라고 예상된다.

EtOH에 장기간 노출된 랫드에서는, 산화적인 스트레스가 발생하게 되고, 이로 인해 간 독성이 발생하게 된다. 또한 알콜성 지방간 (Alcoholic Fatty Liver Disease ; AFLD)으로 발전할 가능성도 매우 커진다. EtOH의 장기간 투여로 인해 유도된 간 독성 모델에서, 간 손상 지표인 ALT, AST 수치와 산화적 손상에 대한 지표인 SOD, GPx 활성도를 확인하였을 때, 인삼열매 추출물은 이미 그 효과가 널리 입증된 실리마린과 유사하거나, 고농도에서는 더 뛰어난 보호효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 특히, 알코올성 간손상의 마커인  $\gamma$ -GT에 대한 억제작용이 확인됨으로써 향후, 알코올성 간손상 개선 건강기능식품 개발의 중요한 연구자료가 될 것으로 사료된다.

이를 종합해 보았을 때, 인삼 열매 추출물은 EtOH로 인한 산화적 손상과 알콜성 지방간에 효과적인 예방 · 치료 물질이 될 수 있을 것 이라고 예상된다. 이번연구는 연구계획서에 의거 동물시험을 중심으로 이루어졌으며, 앞으로 이러한 인삼 열매 추출물의 간 보호효과에 대한 보다 상세한 기전 연구를 진행 할 예정이다.

## [초음파 처리 인삼열매 추출물의 위장관 운동에 미치는 효과]

### 가. 인삼 열매 추출물이 랫드 대장 평활근 운동성에 미치는 효과

#### 1. 실험 요약

인삼열매 추출물의 랫드 대장 평활근 운동성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 장력 시험을 진행하였다.

1.1. Carbachol 로 유도된 수축 반응에서 인삼열매 추출물은 농도 의존적으로 수축 반응을 감소시켰다.

3.1.2. Methylene blue 와 NOS inhibitor를 처리하여 이완 반응을 감소시킨 모델에서 인삼열매 추출물은 이완반응을 회복시켰다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 인삼열매 추출물은 랫드 대장 평활근의 수축 반응을 감소시키는 것으로 나타났다.

#### 2. 실험 방법

##### 2.1. 실험 물질

2.1.1. 인삼 열매 추출물 (1, 5, 10 mg/ml)

2.1.2. Carbachol (Sigma aldrich  $10^{-6}$  M)

2.1.3. L-NAME (Sigma aldrich  $10^{-6}$  M)

2.1.4. Methylene blue (Sigma aldrich  $10^{-5}$  M)

##### 2.2. 실험 동물 및 실험 방법

###### 2.2.1. 실험 동물 및 대장 평활근 채취

7주령 수컷 S.D. Rat을 이산화탄소 챔버에 넣어 질식사 시킨 후 대장을 채취 해 Krebs's buffer 용액 (116.6 mM NaCl, 21.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.4 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5.4 mM glucose and 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4)에 보관하고, 이 용액 안에서 대장 평활근을 분리하였다. 분리된 대장 평활근의 장력은 Force transducer (FT03 Grass Instruments Co., Quincy, MA)를 통해 측정되어 polygraph (Grass model 79) 에 기록되었다. 대장 평활근 장력의 안정화 시간은 90분이었다.

###### 3.2.2.2. Carbachol 로 유도된 수축반응에 대한 인삼 열매 추출물의 효과

먼저 carbachol을 대장 평활근 조직에 투여하여 수축반응 및 Motility index를 확인하였다. 그

뒤 순서대로 인삼열매 추출물, carbachol을 투여하여 인삼열매 추출물이 carbachol에 의한 수축반응에 끼치는 영향을 확인하였다. 각 실험물질별 투여 간격은 5분이었다.

### 2.2.3. 인삼 열매 추출물의 Methylene blue 와 L-NAME 으로 유도된 이완반응 감소에 대한 이완반응 회복효과

먼저 carbachol을 대장 평활근 조직에 투여하여 수축반응을 확인하였다. 그 뒤 순서대로 Methylene blue 혹은 L-NAME, 인삼열매 추출물, carbachol을 투여하여 인삼열매 추출물이 carbachol에 의한 수축반응에 끼치는 영향을 확인하였다. 각 실험물질 별 안정화 기간은 5분이었다.

## 3. 실험 결과

### 3.1. Carbachol로 유도된 수축반응에 대한 인삼 열매 추출물의 효과

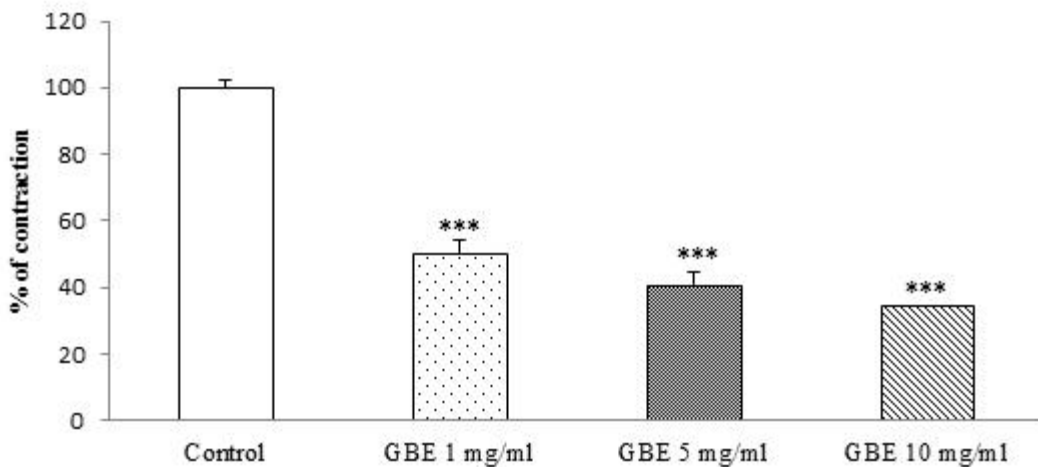


그림 189. 인삼열매 추출물의 carbachol로 유도된 수축반응에 대한 효과. Student's t-test ( \*\*; P < 0.01, \*\*\* ; P < 0.001 vs control)

아무것도 전처리 하지 않은 조직에 대한 Carbachol로 유도된 수축반응에 비해 (Control 군) 인삼 열매 추출물의 전처리는 Carbachol로 인한 수축반응을 유의성 있게 감소시키는 것으로 확인하였다.

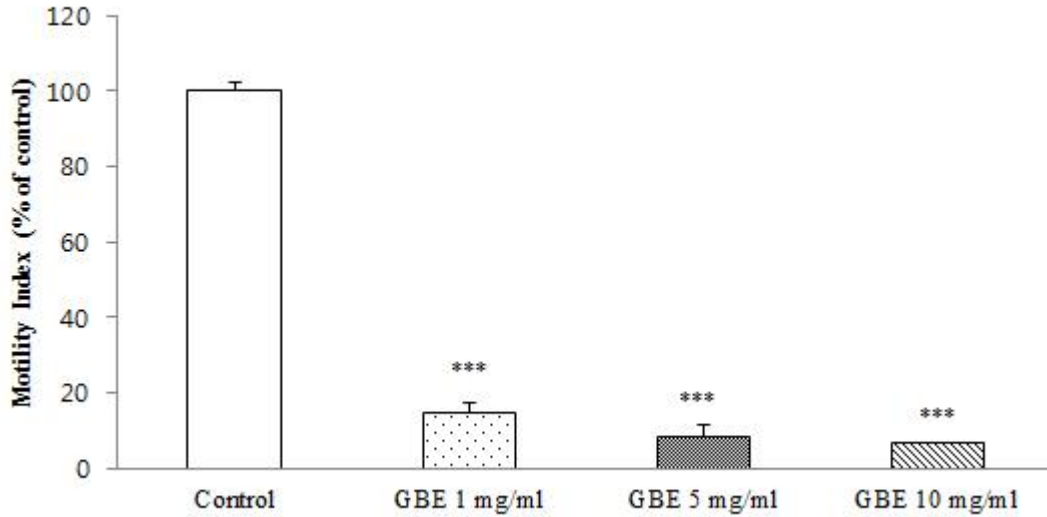


그림 190. 인삼열매 추출물의 carbachol로 유도된 motility index 감소 효과. Student's t-test (\*\*\*,  $P < 0.001$  vs control)

Polygraph에 나타난 수축-이완반응 곡선의 곡선하 면적으로 표현되는 총체적인 위장관 운동성 지표인 motility index를 비교하여 본 결과, 인삼열매 추출물은, carbachol투여로 인한 motility index의 상승을, 모든 농도에서 급격하게 저하 시킨 것으로 나타났다.

### 3.2. 인삼 열매 추출물의 Methylene blue와 L-NAME으로 유도된 이완반응 감소에 대한 이완반응 회복효과

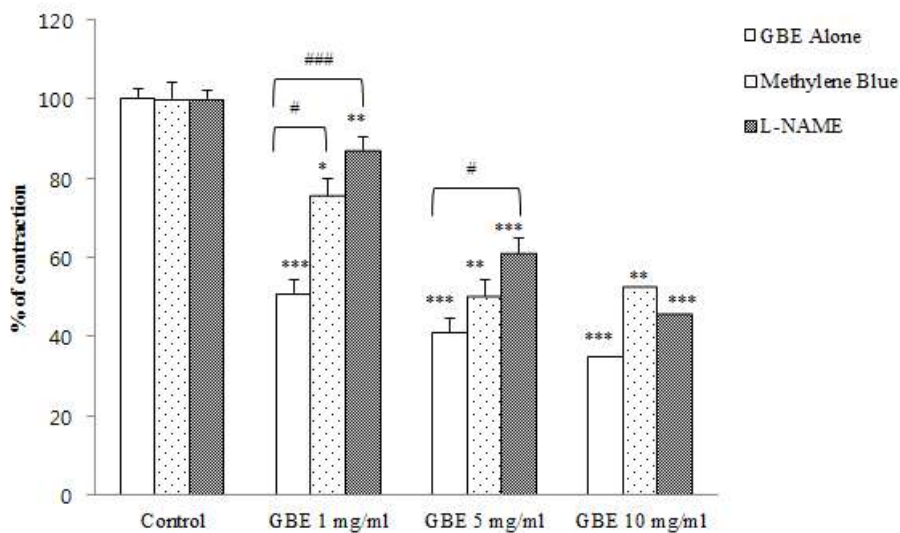


그림 191. 인삼열매 추출물의 Methylene blue 및 L-NAME에 의한 이완반응 감소에 대한 효과. Student's t-test (\*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$ , \*\*\*;  $P < 0.001$  vs control. #;  $P < 0.05$ , ###;  $P < 0.001$  vs GBE Alone.)

인삼열매 추출물만 투여한 군, Methylene blue를 전처리 한 군, L-NAME을 전처리 한 군을, 인삼열매 추출물 농도별로 각각 비교하여 보았을 때, 인삼열매 추출물을 1, 5 mg/ml 농도로 투여한 군에서는 Methylene blue, L-NAME을 각각 투여한 군에 비하여 유의성 있는 수축 반응의 감소가 나타났다. 인삼열매 추출물 10 mg/ml을 투여한 군에서는 각 군별 수축반응의 감소에 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다.

## 나. UTP 및 5-HT 투여로 유도된 고양이 식도하부 평활근 세포의 수축에 대한 GBE의 억제 효과

### 1. 실험 요약

고양이 식도하부 평활근 조직을 single cell로 분리 후, GBE (1, 3, 10 mg/ml)를 2분동안 전 처치하고 UTP 및 5-HT를 처리하여 수축을 유도했을 때 GBE를 전처치하지 않았을 때와 비교하여 얼마나 수축이 억제되는지를 scanning microscopy를 이용하여 실험하였다.

1.1. UTP 단독투여군과 비교하여, GBE 전처치 투여군의 세포 수축이 유의성 있게 감소하였다.

1.2. 5-HT 단독투여군과 비교하여, GBE 전처치 투여군의 세포 수축이 유의성 있게 감소하였다.

이상의 결과를 종합해볼 때, 인삼열매 추출물은 고양이 식도하부 평활근 세포에서 UTP 및 5-HT에 의한 수축반응을 억제한다는 것을 알 수 있다.

### 2. 실험 방법

#### 2.1. 실험물질

2.1.1. 인삼열매 추출물 (1, 3, 10 mg/ml)

2.1.2. UTP (Sigma Aldrich Korea, 1uM)

2.1.3. 5-HT (Sigma Aldrich Korea, 0.1uM)

#### 2.2. 실험동물 및 실험방법

##### 2.2.1. 고양이 식도하부 평활근 조직 채취 및 dispersed single cell 준비

고양이 식도하부 평활근 조직을 채취하여 Kreb's buffer 용액에 담근 상태로, 상피세포를 제거하고 근육세포만을 채취한다. 근육조직은 1 mg/ml papain, 1 mM dithiothreitol, 1 mg/ml BSA and 0.5 mg/ml collagenase를 포함한 normal potassium-HEPES buffer에 넣고 4 °C에서 하룻밤동안 배양하고 꺼내어 37 °C에서 enzymatic digestion 후, 여과 후 원심분리한 세포를 enzyme-free normal potassium-HEPES에 재분산 한다.

##### 2.2.2. Scanning microscopy를 이용한 dispersed single cell 수축 측정

인삼열매 추출물 (1, 3, 10 mg/ml)를 2분 동안 투여한 후, UTP 1 uM를 30초 동안, 5-HT 0.1 uM은 1분 동안 처치한다. 이후 acrolien (1% final concentration)을 처치하여 반응을 종결시킨다. 40~50개의 세포의 길이를 CCD (Charge Coupled Device)가 장착된 현미경을 통



하여 세포상을 컴퓨터 화면에 잡아내고 세포 길이를 측정 (Image analyzer 사용)한다. 세포 수축률(%)은 다음의 식을 이용 하여 구한다.

$$\text{Cell contraction (\%)} = 100 - \frac{\text{mean cell length of experimental group}}{\text{mean cell length of control group}} \times 100$$

### 3. 실험 결과

#### 3.1. 고양이 식도하부 평활근 세포에서 UTP에 의해 유도된 수축반응에 대한 인삼추출물의 억제 효과

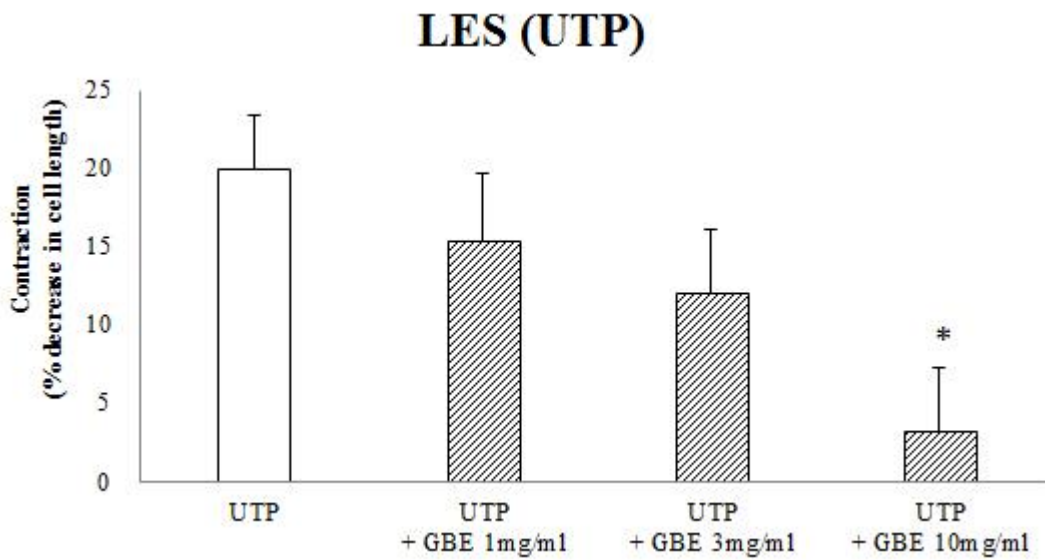


그림 193. UTP에 의한 수축반응에 대한 인삼열매 추출물의 효과. Student's t-test (\*; p<0.05 vs UTP)

Scanning microscopy를 이용하여 UTP에 의해 유도된 식도 평활근 세포의 수축에 대한 인삼 열매 추출물의 억제 효과를 확인한 결과, 인삼열매 추출물의 농도의존적으로 고양이 식도 평활근 세포의 수축에 억제되는 것을 확인하였다.

3.2. 고양이 식도하부 평활근 세포에서 5-HT에 의해 유도된 수축반응에 대한 인삼열매 추출물의 억제 효과

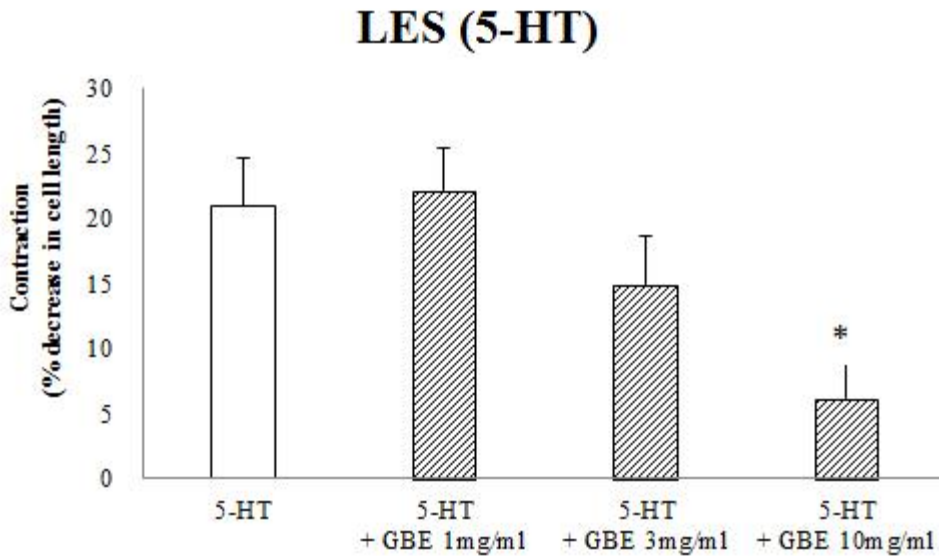


그림 194. 5-HT에 의한 수축반응에 대한 인삼열매 추출물의 효과. Student's t-test (\*; p<0.05 vs 5-HT)

Scanning microscopy를 이용하여 5-HT에 의해 유도된 식도 평활근 세포의 수축에 대한 인삼추출물의 억제 효과를 확인한 결과, GBE의 농도의존적으로 고양이 식도 평활근 세포의 수축에 억제되는 것을 확인하였다.

(고찰)

2. 인삼열매 추출물이 소화기 운동성에 미치는 영향

인삼열매 추출물이 소화기 운동성에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 대장 평활근의 장력시험 및 식도 하부 괄약근의 세포단리 시험을 진행하였다.

대장 평활근의 장력시험에서, CCh로 유도된 수축반응은 인삼열매 추출물에 의하여 유의성 있게 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 인삼열매 추출물의 수축반응 감소 효과를 추가적으로 확인하기 위해서, guanylate cyclase inhibitor 인 Methylene blue 와 NO synthetase inhibitor 인 L-NAME을 각각 전 처리 하였을때의 수축반응 감소효과를 확인하였다. 이완반응을 감소시킨 후 투여된 인삼열매 추출물은 10 mg/ml에서, Methylene blue와 L-NAME 의 이완반응 감소 효과를 사라지게 한 것으로 나타났다. 또한, 총체적인 위장관 운동성 지표인 motility index 를 측정 한 결과에서도 마찬가지로, 인삼열매 추출물은 carbachol에 의한 motility index의 증가를 유의성 있게 감소 시킨 것으로 나타났다. 인삼열매 추출물의 대장 운동성에 대한 추가적인 연구를 진행할 계획이다.

추가로, 식도하부 괄약근 (Lower esophageal sphincter ; LES)에서의 수축반응에 미치는 효과를 알아보기 위하여 세포단리 시험을 진행하였다. 수축제로는 P2Y receptor agonist 인

UTP 와 5-HT을 이용하였다. P2Y receptor 와 5-HT receptor 는 모두 G-protein-coupled receptor로써 소화기 운동기능을 조절하는 중요한 receptor로 알려져 있다. 이 실험에서 인삼 열매 추출물은, UTP 또는 5-HT 으로 유도된 수축 반응을, 10 mg/ml 의 농도에서 유의성 있게 감소시키는 것을 확인 할 수 있었다. 인삼열매 추출물의 수축반응 감소효과에 대한 추가적인 기전 연구를 진행할 계획이다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 인삼열매 추출물은 소화기 괄약근과 평활근의 이완반응에 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났고, 소화기 운동기능을 효과적으로 조절 할 수 있는 물질이 될 수 있을 것으로 예상된다.

## 다. 랫드의 위장관 평활근 수축력, 위 배출능 및 위장관 수송능에 대한 초음파처리 인삼열매 추출물에 대한 영향

### 1. 실험 요약

랫드의 위장관 평활근 및 위 배출능, 위장관 수송능을 포함한 종합적 소화기 운동성에 미치는 초음파처리 인삼열매 추출물의 영향을 알아보기 위하여 위장관 배출능 및 위장관 수송능을 평가하였다.

- 1) 정상 랫드에서의 위장관 배출능 평가에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 유의성 있는 위장관 배출 촉진효과를 나타내지 않았다.
- 2) Cisplatin 투여로 지연된 모델에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 유의성 있는 위장관 배출 회복효과를 나타내지 않았다.
- 3) Loperamide 투여로 지연된 모델에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 유의성 있는 위장관 배출 회복효과를 나타내지 않았다.
- 4) 정상 랫드에서의 위장관 수송능 평가에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 유의성 있는 위장관 수송 촉진 효과를 나타내지 않았다.
- 5) Atropine 투여로 지연된 모델에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 유의성 있는 위장관 수송 회복효과를 나타내지 않았다.
- 6) 개복수술로 지연된 모델에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 유의성 있는 위장관 수송 회복 효과를 나타내지 않았다.

이상의 결과를 종합해볼 때, 초음파처리 인삼열매 추출물의 단회투여로 인한 위배출능 및 위장관 수송능의 유의성 있는 증가 및 지연된 모델에서의 회복효과는 없는 것으로 나타났고, 위장관 평활근의 수축에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

### 2. 실험 방법

#### 10 실험물질

- (1) 초음파 처리 인삼 열매 추출물 (10, 30, 100, 300 mg/kg, p.o.)
- (2) Mosapride, Domperidone (Sigma Aldrich Korea, 10 mg/kg, p.o.)
- (3) Cisplatin (Sigma Aldrich Korea, 10 mg/kg, i.p.)
- (4) Loperamide (Sigma Aldrich Korea, 10 mg/kg, p.o.)
- (5) Atropine (Sigma Aldrich Korea, 1 mg/kg, i.p.)
- (6) Phenol Red (Sigma Aldrich Korea)
- (7) Carbocymethylcellulose (Sigma Aldrich Korea, CMC, 3% as a solvent)
- (8) Trichloroacetic acid (Sigma Aldrich Korea)

#### 2) 실험동물 및 실험방법

## (1) 실험물질 투여 및 샘플 채취

7주령된 수컷 S.D. Rat (250 - 270 g)을 실험동물로 사용하였으며, 각 실험군 별 n 수는 4 이고, 실험 24시간 전부터 절식시킨 동물을 실험에 사용하였다. 위장관 배출능 및 위장관 수송능, 그리고 각각의 지연된 모델에 대한 시험방법은 아래와 같다.

### a. 위장관 배출능

#### i) 정상 랫드에서의 위배출 촉진작용

시험 약물을 경구투여 한 뒤 60분 후 phenol red 용액 2 ml를 강제 급여함. 강제 급여 후 20분 뒤에 위를 적출하고 남아있는 phenol red 용액의 양을 흡광도를 측정하여 비교하였다.

#### ii) Cisplatin 투여로 위배출이 지연된 rat에서 촉진작용

: 시험 약물을 경구투여한 뒤 60분 후 phenol red 용액 2ml를 강제 급여함. 동시에 cisplatin (i.p., 10 mg/kg)을 투여하고, 30분 뒤 위를 적출하여 남아있는 용액의 양을 흡광도를 측정하여 비교하였다.

#### iii) Loperamide 투여로 위배출이 지연된 rat에서 촉진작용

: 시험 약물을 경구투여한 뒤 60분 후 phenol red 용액 2ml를 강제 급여함. 동시에 loperamide (p.o., 10 mg/kg)를 투여하고, 45분 뒤 위를 적출하여 남아있는 용액의 양을 흡광도를 측정하여 비교하였다.

### b. 위장관 수송능

#### i) 정상 랫드에서의 위장관 수송능 촉진작용

시험 약물을 경구투여한 뒤 1시간 후 phenol red 용액을 1ml 투여하고 15분 후 십이지장부터 맹장까지 회수. 회수된 장기를 12등분 하여 각 절편의 흡광도를 측정하여 geometric center를 구하여 비교하였다.

#### ii) Atropine 으로 지연된 위장관 수송능 촉진 작용

시험 약물을 경구투여한 뒤 1시간 후 phenol red 용액 1ml 와 atropine(i.p., 1mg/kg) 을 동시에 투여하고 15분 후 십이지장부터 맹장까지 회수. 회수된 장기를 12등분하여 각 절편의 흡광도를 측정하여 geometric center를 구하여 비교하였다.

#### iii) 개복수술로 지연된 위장관 수송능 촉진 작용 (Postoperative ileus; POI)

랫드에 개복수술 (3 cm)를 진행하고 즉시 회복시킨 뒤 (4시간) i)와 같은 방법으로 실험을 진행하였다.

## (2) 위 배출능 (Gastric emptying; GE) 측정

각 군 별로 채취한 위 샘플을 0.1 N NaOH 용액에서 잘게 자른 후 균질화 시켰다. 균질화된 샘플 1 ml 에 0.1 N NaOH 용액 4 ml를 첨가한 후 4℃에서 24시간동안 보관한 뒤 20 % TCA 용액을 0.5 ml를 첨가후 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 원심분리 된 용액의 상층액 2 ml 와 0.5 N NaOH 2 ml를 1:1로 반응시킨 뒤에 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Phenol red 용액 투여 직후에 적출한 위 샘플을 0 time control 로 설정하였다.

$$GE (\%) = \left[ 1 - \frac{ABS_{560nm} \text{ of test stomach}}{ABS_{560nm} \text{ of 0 time control stomach}} \right] \times 100$$

그림 195. 위장관 배출능 공식

### (3) 위장관 수송능 (Gastrointestinal transit; GIT) 측정

각 군 별로 채취한 소장 샘플을 균일하게 12등분 하여, 각 절편마다 2.2.2. 와 동일한 과정을 거쳐 흡광도를 측정하였다. 위와 가장 가까이에 위치한 절편을 1번, 가장 멀리 있는 절편을 12번으로 순번을 부여한 후에 각각의 절편의 흡광도에 따른 기하학적 평균(geometric center) 을 구하여 위장관 수송능을 측정하였다. Phenol red 용액 투여 직후에 적출한 소장 샘플을 0 time control 로 설정하였다.

$$\text{Geometric center (No.)} = \frac{\sum_{k=1}^{12} a_k \cdot b_k}{\sum_{k=1}^{12} a_k}$$

$a_k$  = Absorbance at 560nm of each segment  
 $b_k$  = Segment No.(1,2,3 ... 12)

그림 196. 위장관 수송능 공식 (기하평균)

### 3. 실험 결과

#### 1) 초음파처리 인삼열매 추출물의 위 배출능에 미치는 효과

이번 연구에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 정상모델 및 지연된 위 배출능 모델 모두에 유의성 있는 효과를 미치지 못하였다 (그림 17).

#### 2) 초음파처리 인삼열매 추출물의 위장관 수송능에 미치는 효과

이번 연구에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 정상모델 및 지연된 위장관 수송능 모델 모두에서 유의성 있는 효과를 미치지 못하였다 (그림 18).

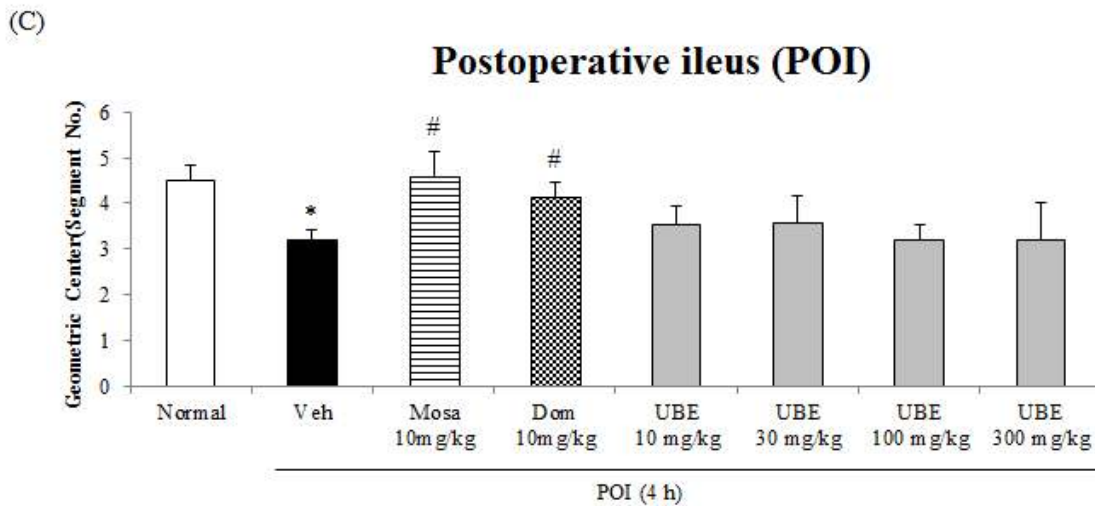
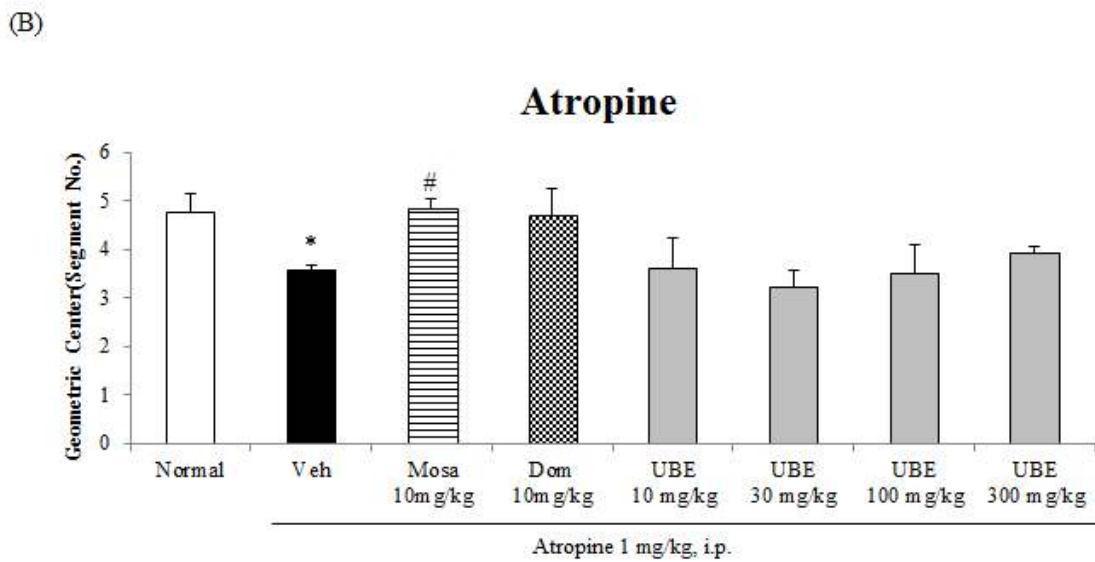
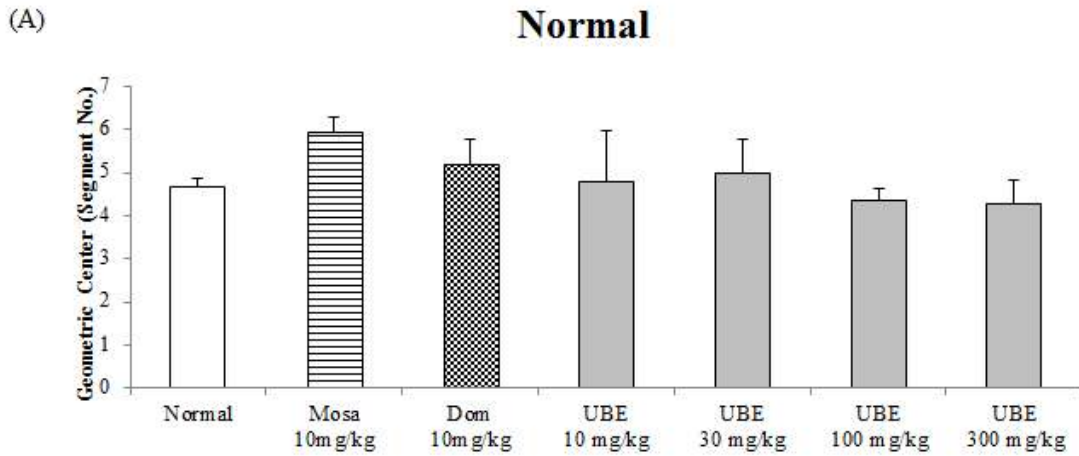
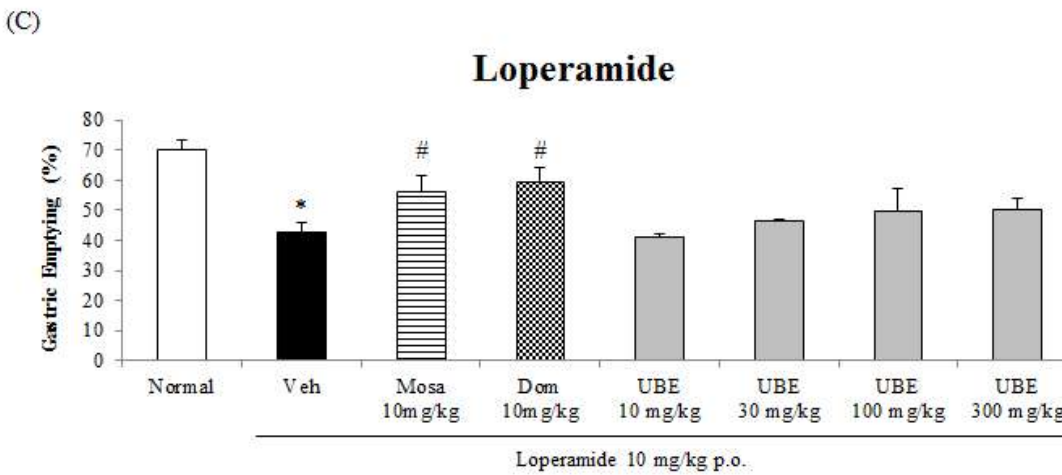
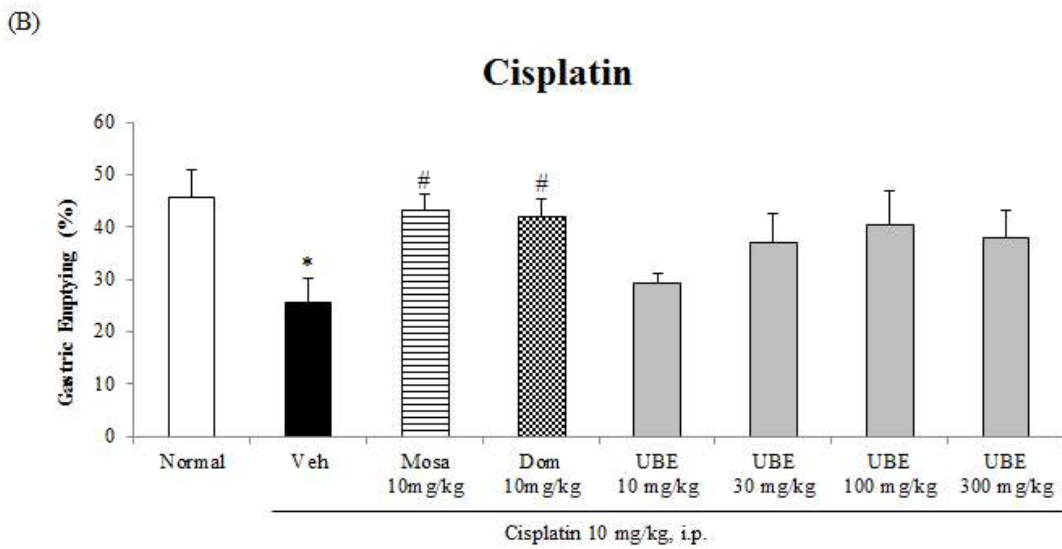
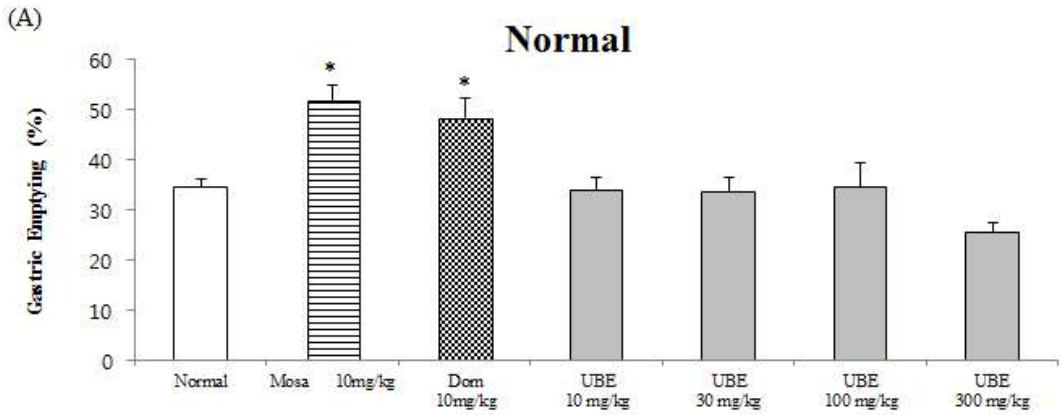


그림 198. 위장관 수송능. (A) 정상모델, (B) atropine 으로 지연된 위장관 수송능, (C) 개 복수술로 지연된 위장관 수송능. Student's t-test (\*;  $p < 0.05$  vs Normal, #;  $p < 0.05$  vs Vehicle)





4. 고찰

그림 197. 위 배출능. (A) 정상모델, (B) cisplatin 으로 지연된 위 배출능, (C) Loperamide 로 지연된 위 배출능. Student's t-test (\*;  $p < 0.05$  vs Normal, #;  $p < 0.05$  vs Vehicle)

#### 4. 고찰

위장관 평활근의 수축력은 소화기 운동에 가장 큰영향을 미치는 요인이다. 이러한 위장관 평활근의 수축의 감소/증가는 위 배출능 및 위장관 수송능의 감소/증가를 의미한다. 음식물을 섭취한 후 뿐만이 아니라 공복상태에서도 지연된 위 배출능 및 위장관 수송능은 역류성 식도염과 위염의 증상을 악화시키는 요인 중에 하나이다. 이번 연구에서는 1차년도 연구결과를 보충하기 위한 연구로써, 초음파처리 인삼열매 추출물이 랫드에서의 위 배출능 및 위장관 수송능에 미치는 영향을 평가하였다.

결과에서, mosapride 및 domperidone 의 경우 positive control 군으로, 유의성 있는 효과를 보였으나, 초음파처리 인삼열매 추출물은 정상적인 위 배출능 및 위장관 수송능에 유의성있는 효과를 나타내지 않았다. Cisplatin은 대표적인 광범위 항암제로서, 위장관 운동성 저하가 대표적인 약물이다. Loperamide는  $\mu$ -opiate 수용체 항진제로서, 모르핀과 비슷한 작용을 통해 위장관 운동성을 저해시키는 대표적인 물질이다. 이러한 물질의 투여로 지연된 위 배출능 모델에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 유의성 있는 위 배출능 촉진효과를 나타내지 않았다.

Atropine은 상경적 무스카린성 아세틸콜린 수용체 길항제로서 항콜린작용을 통하여 위장관 운동성을 저하시킨다. 랫드에서 개복수술은 염증반응, 호르몬작용, 그리고 면역학적 기전등 다양한 기전을 통하여 위장관 운동을 저해시키게 된다. 이러한 지연모델에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 위장관 수송능을 증가시키지 못하였다.

1차년도 결과에서 초음파처리 인삼열매 추출물은 운동성에 유의성 있는 효과를 나타내었으나 이는 대장 평활근 및 식도 하부 괄약근의 수축반응의 억제, 즉 이완에 관련된 효과였다. 모든 결과를 종합하여 보았을 때, 위 배출능 및 위장관 수송능 활성은 위장 및 소장 평활근의 수축에 관련되어 있고, 초음파처리 인삼열매 추출물은 이러한 수축력에 영향을 끼치지 못하는 것으로 나타났다.

[초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 인체적용 시험 IRB 승인]

가. 인체적용시험 시험계획서

## 인 체 적 용 시 험 계 획 서

알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자에서 "UGBE"의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

A Single-center, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Intervention Study for the efficacy and safety of "UGBE" in mild alcoholic liver subjects

시 험 계 획 서 번 호 UGBE-1

버 전 ( 작 성 일 ) 1.1 (2015.04.20)

인 체 적 용 시 험 의 료 자 고연(高研)

인 체 적 용 시 험 수탁 기관 ㈜파마크로(PharmaCRO)

### 기 밀 문 서

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험책임자 및 인체적용시험담당자, 임상시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용 제품을 복용하는 사람에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 고연(高研) 및 ㈜파마크로(PharmaCRO)의 사전서면동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

## ❖ 본 인체적용시험계획서에 사용된 약어 및 용어정의

약어 및 용어	정 의
시험의뢰자	고연(高研)
시험군	UGBE(인삼열매 추출물)
대조군	대조제품(위약)
임상실험실 검사	혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 소변검사
활력징후	혈압, 맥박수 등
ADR	Adverse Drug Reaction
AE	Adverse Events
ALT	Alanine Aminotransferase
ALP	Alkaline Phosphatase
AST	Aspartate Aminotransferase
BUN	Blood Urea Nitrogen
CRA	Clinical Research Associate (임상시험 모니터 요원)
CRF	Case Report Form
CRO	Contract Research Organization
FAS	Full Analysis set
Hb	Hemoglobin
hCG	human Chorionic Gonadotropin
HDL cholesterol	High density Lipoprotein cholesterol
IRB	Institutional Review Board (임상시험심사위원회)
KGCP	Korean good clinical practice (의약품임상시험관리기준)
LDL cholesterol	Low density Lipoprotein cholesterol
PP	Per protocol
RBC	Red Blood Cell
γ-GT	Gamma-glutamyltransferase
TG	Triglyceride
WBC	White Blood Cell

## ❖인체적용시험계획서 개요

인체적용시험 제목	알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자에서 “UGBE”의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험 책임자	세명대학교부속제천한방병원 김형준 교수
인체적용시험 의뢰자	고연(高研)
인체적용시험 기간	IRB 최초 승인일로부터 12 개월
인체적용시험 대상	만 19 세 이상 만 70 세 미만의 성인으로 알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자
인체적용시험 목적	알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자에서 “UGBE”를 복용한 후 간 기능 개선효과 등의 기능성 및 안전성을 평가하고자 한다.
인체적용시험 디자인	단일기관, 무작위 배정, 이중 눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험용 제품	<ul style="list-style-type: none"> <li>시험군: UGBE(인삼열매 추출물)</li> <li>위약군: 대조제품(위약)</li> </ul>
용법·용량 및 복용방법	인체적용시험용 제품을 아침, 저녁 총 2회 식사 직전에 3정씩 하루 6정을 복용한다.
복용기간	12 주
대상자수	총 74 예 [2 군, 최종 평가가능 예수 군당 37 예, 10% 내외 탈락율 고려 시]
선정기준	<p><b>선정기준</b> (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>만 19세 이상 만 70세 미만의 성인 남녀</li> <li>알코올 섭취로 인하여 <math>\gamma</math>-GT가 60이상 250이하인 자</li> <li>본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 들은 후 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 대상자</li> </ol>
제외기준	<p><b>제외기준</b> (다음 조건에 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없다)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>인삼류에 과민증 또는 그 병력이 있는 대상자</li> <li>3개월 이내 간 기능 관련 약물, 건강기능식품을 복용 중인 대상자</li> <li>간염보균자 급성간염환자 및 간경화의 징후가 인정되는 자</li> <li>비알코올성 및 알코올성 지방간으로 확진되어 치료중인 자</li> <li>심한 간 기능 장애(ALT, AST 중 정상 상한치의 2.5배 이상)이거나 특정 질환, 약물, 간염 및 간경화에 의한 간 기능 장애 대상자</li> </ol>

	<ol style="list-style-type: none"> <li>6) 황달, 담석 등 담도계 질환자</li> <li>7) 6개월 내 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 당뇨병, 고혈압 및 고지혈증 진단을 받았거나 뇌졸중 또는 일시적인 허혈성 심장마비의 병력이 있는 대상자</li> <li>8) 최근 5년 내 암 진단 및 치료 받은 적이 있는 대상자</li> <li>9) 율혈성 신부전 및 심한 신기능 장애(serum creatinine &gt; 2.0 mg/dl)가 있는 대상자</li> <li>10) 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 대상자 (우울증, 정신분열증, 간질, 약물중독, 거식증, 이상식욕항진 등)</li> <li>11) 인체적용시험 중 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물 (해열진통제 및 비스테로이드성 소염진통제, 항결핵제, 항생제나 항전간제)을 지속적으로 복용해야 하는 자 (상세내용은 7.2. 병용약물의 허용 및 금기약물/식품을 참고한다.)</li> <li>12) 최근 4주 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제, 또는 제품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물이나 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있거나 기타 임상시험에 참여한 경험이 있는 대상자</li> <li>13) 위장관계 질환(위궤양, 십이지장궤양 등) 및 기타 남용우려가 있는 약물을 복용 중인 대상자</li> <li>14) 임신부, 수유부 및 가임여성으로 참여기간 동안 임신 및 수유의 계획이 있는 대상자</li> <li>15) 연구자 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 대상자</li> </ol>												
<p><b>시험방법</b></p>	<p>대상자가 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의하면 계획서에 따라 필요한 검진 및 검사를 실시한 후, 대상자 적합성 평가결과, 선정기준에 적절한 대상자에 한하여 무작위 배정된다.</p> <p>무작위 배정된 대상자는 12 주간 시험제품 또는 대조제품을 복용하게 된다.</p> <table border="1" data-bbox="486 1279 1230 1429"> <tr> <td>방문 1 (-2~0 주)</td> <td>방문 2 (0 주)</td> <td>방문 3 (6 주±5)</td> <td>방문 4 (12 주±5)</td> </tr> <tr> <td>스크리닝 방문</td> <td>무작위배정방문</td> <td>중간방문</td> <td>종료방문</td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="text-align: center;">투 약</td> </tr> </table>	방문 1 (-2~0 주)	방문 2 (0 주)	방문 3 (6 주±5)	방문 4 (12 주±5)	스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문	투 약			
방문 1 (-2~0 주)	방문 2 (0 주)	방문 3 (6 주±5)	방문 4 (12 주±5)										
스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문										
투 약													
<p><b>기능성 평가</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1차 기능성 평가 변수 (Primary endpoint):             <ul style="list-style-type: none"> <li>- γ-GT 수치의 개선치</li> </ul> </li> <li>• 2차 기능성 평가 변수 (Secondary endpoint):             <ul style="list-style-type: none"> <li>- ALT 수치의 감소치</li> <li>- AST 수치의 감소치</li> <li>- TG 수치의 감소치</li> <li>- γ-GT 수치의 개선율</li> </ul> </li> </ul>												

<p><b>안전성 평가</b></p>	<p>인체적용시험용 제품 복용 전과 복용 중, 복용 12 주 후에 임상실험실 검사 및 활력징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다. 이상반응이 없는 경우라면, 종료 방문 검사로 방문을 종료할 예정이다.</p>
<p><b>병용금지 약물</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 인체적용시험 중 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물 (Acetaminophen, Tylenol 등 해열진통제 및 비스테로이드성 소염진통제, Isoniazid, Rifampin 등 항결핵제나 항생제 및 Cytochrome P450 에 영향을 줄 수 있는 phenobarbital 등의 항전간제)</li> <li>2) 경구용 스테로이드, 호르몬제, 또는 제품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물이나 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물</li> <li>3) 밀크씨슬(카르두스마리아누스)추출물, 표고버섯균사체추출물, 표고버섯균사체, 도라지추출물, 강황추출물, 브로콜리스프라우트분말, 유산균발효다시마추출물, 복분자추출분말, 발효율금, 헛개나무과병추출물 성분을 포함한 간 기능 개선 건강기능식품 및 제품</li> </ol>



❖ 인체적용시험 흐름도

시험항목	스크리닝				Follow up <sup>8)</sup> 추가 방문 필요 시
	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4	
	-2 주 ~ 0 주	0 주(0 일)	6 주(±5 일)	12 주(±5 일)	
대상자 동의	√				
인구학적 조사 <sup>1)</sup>	√				
신체검사 <sup>2)</sup>	√			√	
활력징후 <sup>3)</sup>	√	√	√	√	√
병력 및 동반질환	√				
이학적 검사	√			√	
생활습관 조사 <sup>4)</sup>	√	√	√	√	√
임상실험실 검사 <sup>5)</sup>	√	√	√	√	√
임신여부 검사 <sup>6)</sup>	√	√	√	√	√
대상자 적합성 평가 <sup>7)</sup>	√				
무작위 배정		√			
IP 교부		√	√		
선행/병용약물 조사	√	√	√	√	√
이상반응 확인			√	√	√
IP 반납/복용순응도			√	√	

1) 인구학적 조사: 생년월일, 성별 등을 조사한다.  
 2) 신체검사: 신장과 체중, 신장은 신발을 벗고 cm 단위로 방문 1에서만 측정하고 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용하며 방문 1, 4에서 실시한다.  
 3) 활력징후: 혈압, 맥박수, 체온을 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 측정하며, 2회 측정하여 평균값을 기재한다.  
 4) 생활습관 조사: 흡연/음주/식이/운동습관에 관하여 매 방문 실시한다.  
 5) 임상실험실 검사: 대상자는 채혈하기 전 최소 8시간 이상 금식한 상태로 내원해야 한다.  
 (단, 스크리닝 시 실시한 검사결과에서 특별한 이상이 없는 경우 스크리닝 검사 결과를 방문 2에 사용할 수 있다.)  
 • 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets  
 • 간 기능 검사: γ-GT, ALT, AST  
 • 혈액생화학적 검사: BUN, Creatinine, Uric acid, Total bilirubin, Albumin, Total protein, Alkaline phosphatase, Glucose, Triglyceride, Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol  
 • 소변 검사: pH, Protein, Glucose, WBC, RBC, Specific gravity  
 6) 임신여부 검사: 대상자 중 임신가능성이 있는 경우 소변검사를 통해 임신여부를 확인한다.  
 7) 대상자 적합성 평가: 각각의 스크리닝 검사가 끝난 후 방문 2 이전에 실시한다.  
 8) Follow up: 시험자의 판단에 따라 시험제품 최종 복용 후 혹은 조기종료 후 비정상적인 실험실 결과, 계속되는 이상반응, 중도 탈락, 시험자 판단에 따라 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우 필요에 따라 추적 관찰을 위해 4주 이내 다시 방문하도록 한다.



목 차

❖인체적용시험계획서 개요 .....	3
❖ 인체적용시험 흐름도 .....	6
1. 인체적용시험의 명칭 및 단계.....	10
2. 인체적용시험 의뢰자.....	10
3. 인체적용시험의 목적 및 배경.....	10
3.1. 인체적용시험의 목적.....	10
3.2. 인체적용시험의 배경.....	10
4. 인체적용시험용 제품의 품명, 분량 및 제형.....	11
4.1. 인체적용시험용 제품의 품명.....	11
4.2. 인체적용시험용 제품의 분량 및 제형.....	11
4.3. 라벨 .....	12
4.4. 포장 .....	12
4.5. 시험제품의 관리.....	12
4.6. 미사용 제품의 처리.....	12
5. 대상질환 및 인체적용시험 기간.....	13
5.1. 대상질환.....	13
5.2. 인체적용시험 기간 .....	13
6. 대상자의 선정기준, 제외기준, 목표한 대상자 수 및 근거.....	13
6.1. 선정기준 .....	13
6.2. 제외기준 .....	13
6.3. 목표 대상자 수 및 그 근거.....	14
6.3.1. 대상자 수 .....	14
6.3.2. 대상자 수 산출 및 그 근거.....	14
7. 인체적용시험 방법 .....	16
7.1. 복용 방법 및 복용 기간.....	16
7.2. 병용약물의 허용 및 금기약물/식품.....	16
7.2.1. 병용약물의 허용 .....	16
7.2.2. 금기약물 및 식품.....	16
8. 무작위 배정.....	17
9. 이중눈가림.....	17
10. 관찰항목, 임상검사항목 및 관찰검사 방법.....	18
10.1. 관찰항목, 임상검사항목 .....	18
10.1.1. 대상자 동의.....	18
10.1.2. 인구학적 조사.....	18
10.1.3. 신체검사.....	18
10.1.4. 활력징후.....	18

10.1.5. 병력 및 동반질환.....	18
10.1.6. 이학적 검사.....	18
10.1.7. 생활습관 조사.....	18
10.1.8. 임상실험실 검사 및 임신여부 검사(가임여성).....	19
10.1.9. 대상자 적합성 평가.....	19
10.1.10. 무작위 배정.....	19
10.1.11. IP 교부.....	19
10.1.12. 선행/병용약물 조사.....	20
10.1.13. 이상반응 확인.....	20
10.1.14. IP 반납/복용순응도.....	20
10.2. 방문별 관찰검사 방법.....	20
10.2.1. 방문 1: 스크리닝(-2 주~0 주).....	20
10.2.2. 방문 2: 기준시기 (0 주).....	21
10.2.3. 방문 3: 중간방문 (6 주±5 일).....	21
10.2.4. 방문 4/조기방문: 종료방문(12 주±5 일).....	21
10.2.5. Follow up 방문(필요 시).....	22
<b>11. 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항.....</b>	<b>23</b>
11.1. 예측 이상반응.....	23
11.2. 일반적 주의.....	23
11.3. 임부 및 수유부에 대한 복용.....	23
11.4. 과량복용시의 처치.....	23
<b>12. 중지, 탈락기준.....</b>	<b>24</b>
12.1. 시험자에 의해 중지, 탈락되는 경우.....	24
12.2. 대상자에 의해 중지, 탈락되는 경우.....	24
12.3. 의뢰자의 행정상의 사유.....	24
<b>13. 기능성 평가기준, 평가변수 및 통계분석방법.....</b>	<b>25</b>
13.1. 기능성 평가기준.....	25
13.2. 기능성 평가변수.....	25
13.3. 통계분석 방법.....	25
13.3.1. 분석 대상자군.....	25
13.3.2. 결과 해석의 원칙.....	26
13.3.3. 대상자의 인구학적 기초자료 및 기타 복용 전 특성.....	26
13.3.4. 기능성 평가변수 분석방법.....	26
<b>14. 이상반응을 포함한 안전성 평가기준, 평가변수 및 분석방법.....</b>	<b>28</b>
14.1. 안전성 평가기준.....	28
14.2. 안전성 평가변수 및 분석방법.....	28
<b>15. 이상반응 정의 및 보고 규정.....</b>	<b>29</b>
15.1. 정의.....	29

15.2. 중증도의 평가 기준.....	29
15.3. 시험제품과의 인과관계 평가.....	29
15.4. 이상반응의 기록.....	30
15.5. 중대한 이상반응의 보고.....	30
15.6. 이상반응을 경험한 대상자의 추적조사.....	31
<b>16. 시험 대상자 동의서, 피해자 보상에 대한 규약, 인체적용시험 후 대상자 진료 및 치료 기준 .....</b>	<b>32</b>
16.1. 시험 대상자 설명서 및 동의서.....	32
16.2. 피해자 보상에 대한 규약 .....	32
16.3. 인체적용시험 후 대상자의 진료 및 추적관찰 기준 .....	32
<b>17. 대상자의 안전보호에 관한 대책.....</b>	<b>33</b>
<b>18. 그 밖에 인체적용시험을 안전하게 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항 .....</b>	<b>33</b>
18.1. 윤리적 고려 .....	33
18.2. 인체적용시험 자료의 보관 및 문헌의 열람 .....	33
18.3. 자료 및 대상자 기록의 기밀 유지.....	33
18.4. 보고서 제출 및 출판에 관한 방침.....	34
18.5. 시험계획서 준수에 대한 모니터링.....	34
18.6. 품질관리(QC) 및 보증(QA).....	34
<b>19. 참고문헌.....</b>	<b>35</b>

[별첨 1] 인체적용시험계획서 서명페이지(연구자)

[별첨 1] 인체적용시험계획서 서명페이지(의뢰자)

[별첨 2] 인체적용시험 실시기관 및 인체적용시험 관련 담당자 연락처

[별첨 3] 시험대상자 설명서 및 동의서

[별첨 4] 피해자 보상에 대한 규약

[별첨 5] 인체적용시험용 제품 복용지도

[별첨 6] 대상자 모집 공고문

## 1. 인체적용시험의 명칭 및 단계

알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자에게 “UGBE”의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

## 2. 인체적용시험 의뢰자

기 관 명 고연(高研)

주 소 충북 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112

## 3. 인체적용시험의 목적 및 배경

### 3.1. 인체적용시험의 목적

- 1) 본 시험의 주 목적은 알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자에게 12 주간 시험제품인 “UGBE”를 하루 2회 식사 직전 3정씩 복용하였을 때의  $\gamma$ -GT, ALT, AST 등의 간 지수 개선 효과 등의 기능성을 평가하려는 것이다.
- 2) 두 번째 목적은 활력징후, 임상실험실적 수치들에 대한 영향, 이상반응의 측면에서 “UGBE”의 안전성을 평가하려는 것이다

### 3.2. 인체적용시험의 배경

인삼의 사포닌 성분은 간세포의 단백질 합성과 간세포의 재생을 촉진하는 작용이 있다. 사포닌성분은 실험적으로 여러 가지 간 독성 물질로 야기되는 간 세포의 괴사 등 조직학적 병변을 경감시키고 간의 독성대사에 관여하는 효소(Epoxide hydratase, glutathione transferase, epoxide hydroxylase)를 활성화시켜 간장 장애를 개선, 예방하는 효과가 있다.

한양대 의대 구국회 교수는 바이러스 B 형 간염환자를 대상으로 한 임상시험에서 인삼복용이 식욕, 소화상태, 두통, 오심, 구토 등의 자각증상의 개선 효과 및 급성간염의 조기 회복 촉진과 만성화 예방에 도움을 준다고 보고하였다.

일본 Nissei 병원 Yammamoto 박사는 만성간염(바이러스 C 형)환자에 대해서도 인삼복용이 간 기능의 생화학적 지표개선에 유용성이 있고, 한방제제인 소시호탕과 병용 시 보다 개선효과가 촉진되었다고 보고하였다. 또한, 인삼 사포닌 성분은 알코올 대사에 관여하는 알코올 분해효소(alcohol dehydrogenase), 아세트알데히드 분해효소(acetaldehyde dehydrogenase)의 활성을 증가시켜 알코올 섭취로 야기되는 유해한 작용을 경감시켜 알코올 독성에 예방적 효과를 나타낸다. 실제로 사람을 대상으로 실시한 시험에서도 술을 마신 후 40 분이 경과하였을 때, 혈중 알코올 농도가 술만 마신 사람(0.18%)에 비하여 인삼 엑기스와 술을 함께 마신 경우(0.11%)가 훨씬 낮다는 사실이 입증되었다.

따라서 본 연구진은 선행연구를 통해 인삼 열매 추출물인 UGBE 가 *in vivo* 실험에서 GalN/LPS 단회복용 또는 Ethanol 장기복용에 의한 간 독성 모델에서의 간 보호효과를 확인한 바, 인체적용시험을 통해 건강기능식품 원료로서 개발을 추진하고자 한다. 그러므로 본 시험의 목적은 알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자에게 UGBE 를 복용하게 하여 간 기능 개선 효과 기능성을 확인하고자 하는 시험이다. 또한, 본 시험을 통하여 안전성 여부도 확인하려 한다.

4. 인체적용시험용 제품의 품명, 분량 및 제형

4.1. 인체적용시험용 제품의 품명

- UGBE(인삼열매 추출물)

4.2. 인체적용시험용 제품의 분량 및 제형

1) 시험군

- 시험제품: 이 제품 1 정 (700.0 mg) 중 UGBE(인삼열매 추출물) 336.0 mg

	1 정 중	함유율(%)
인삼열매건조엑스	<b>336.0 mg</b>	48.0
미결정셀룰로스	161.0 mg	23.0
옥수수전분	119.0 mg	17.0
경질무수규산	35.0 mg	5.0
전분글리콜산나트륨	21.0 mg	3.0
스테아리린산마그네슘	9.8 mg	1.4
HPMC	14.0 mg	2.0
글리세린지방산에스테르	1.7 mg	0.2
이산화티타늄	1.5 mg	0.2
식용적색제 40 호	1.0 mg	0.1
합계	700.0mg	100.0

2) 대조군

- 대조제품: 이 제품 1 정 (700.0 mg) 중

옥수수전분	<b>455.0 mg</b>	65.0
미결정셀룰로스	161.0 mg	23.0
경질무수규산	35.0 mg	5.0
전분글리콜산나트륨	21.0 mg	3.0
스테아리린산마그네슘	9.8 mg	1.4
HPMC	14.0 mg	2.0
글리세린지방산에스테르	1.7 mg	0.2
이산화티타늄	1.5 mg	0.2
식용적색제 40 호	1.0 mg	0.1
합계	700.0mg	100.0



#### 4.3. 라벨

- 1) 인체적용시험용 제품은 의약품임상시험관리기준 (의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표 4) 제 8 호 거목의 규정에 따라 의뢰자가 제조(또는 구입) 후, 인체적용시험기관의 관리약사에게 공급하여야 한다.
- 2) 인체적용시험용 제품 라벨의 기재는 의약품 등의 안전에 관한 규칙 제 69 조 6 항에 준하며, 대상자번호를 추가하여 아래와 같이 기입한다. 시험제품에 대한 라벨은 다음과 같은 내용을 포함하여야 한다.
  - ① "인체적용시험용"이라는 표시
  - ② 제품의 코드명 또는 주성분의 일반명
  - ③ 대상자의 시험고유번호
  - ④ 제조번호 및 사용기한 또는 재검사일자
  - ⑤ 저장방법: 직사광선 및 고온 다습한 곳을 피하고 서늘한 곳에서 실온 보관
  - ⑥ 인체적용시험 승인을 받은 자의 상호와 주소
  - ⑦ "인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없음"이라는 표시

#### 4.4. 포장

대상자 74명에 대한 충분한 양의 제품을 포장하고 라벨 하여야 한다.

각 대상자는 0주, 6주 방문 시에 할당된 시험제품을 제공받는다. 인체적용시험용 제품은 bottle 형태로 제공되며, 1 bottle에는 6주 분량(252정) 및 5일 여유 분량(30정)의 시험제품 또는 대조제품이 들어있으며, bottle 외부에는 시험계획서 4.3에서 언급한 라벨이 붙어있다.

#### 4.5. 시험제품의 관리

인체적용시험용 제품은 해당 인체적용시험실시기관의 시험책임자와 관리약사가 관리 책임을 진다. 인체적용시험용 제품은 의뢰자가 지정한 조건(약국 또는 별도 마련된 시건장에 직사광선 및 고온 다습한 곳을 피해 서늘한 곳에 실온 보관)과 관계 법령에 따라 보관하여야 하며, '의약품 임상시험 관리기준 제7호 바목 임상시험용 의약품 관리'에 따라 관리되어야 한다. 인체적용시험 담당자는 재고를 관리하여야 하며, 시험제품의 수령, 배분, 회수 등을 관리한다.

#### 4.6. 미사용 제품의 처리

미사용 제품과 재고는 모두 의뢰자인 고연(高研)에게 돌려주어야 한다. 경우에 따라 사전에 의뢰자의 허락이 있는 경우에는 병원에서 폐기처분 할 수도 있다.

## 5. 대상질환 및 인체적용시험 기간

### 5.1. 대상질환

만 19 세 이상 만 70 세 미만의 성인으로 알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자

### 5.2. 인체적용시험 기간

각 시험기관의 IRB 최종 승인일로부터 12 개월. 단, 대상자 등록 속도에 따라 연장될 수 있다.

## 6. 대상자의 선정기준, 제외기준, 목표한 대상자 수 및 근거

### 6.1. 선정기준

(시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.)

- 1) 만 19세 이상 만 70세 미만의 성인 남녀
- 2) 알코올 섭취로 인하여  $\gamma$ -GT가 60이상 250이하인 자
- 3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 들은 후 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 대상자

### 6.2. 제외기준

(다음 조건의 어느 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없다.)

- 1) 인삼류에 과민증 또는 그 병력이 있는 대상자
- 2) 3개월 이내 간 기능 관련 약물, 건강기능식품을 복용 중인 대상자
- 3) 간염보균자 급성간염환자 및 간경화의 징후가 인정되는 자
- 4) 비알코올성 및 알코올성 지방간으로 확진되어 치료중인 자
- 5) 심한 간 기능 장애(ALT, AST 중 정상 상한치의 2.5배 이상)이거나 특정 질환, 약물, 간염 및 간경화에 의한 간 기능 장애 대상자
- 6) 황달, 담석 등 담도계 질환자
- 7) 6개월 내 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 당뇨병, 고혈압 및 고지혈증 진단을 받았거나 뇌졸중 또는 일시적인 허혈성 심장마비의 병력이 있는 대상자
- 8) 최근 5년 내 암 진단 및 치료 받은 적이 있는 대상자
- 9) 울혈성 신부전 및 심한 신기능 장애(serum creatinine > 2.0 mg/dl)가 있는 대상자
- 10) 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 대상자(우울증, 정신분열증, 간질, 약물중독, 거식증, 이상식욕항진 등)
- 11) 인체적용시험 중 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물(해열진통제 및 비스테로이드성 소염진통제, 항경해제, 항생제나 항진균제)을 지속적으로 복용해야 하는 자  
(상세내용은 7.2. 병용약물의 허용 및 금기약물/식품을 참고한다.)
- 12) 최근 4주 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제, 또는 제품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물이나 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있거나 기타 임상시험에 참여한 경험이 있는 대상자
- 13) 위장관계 질환(위궤양, 십이지장궤양 등) 및 기타 남용우려가 있는 약물을 복용 중인 대상자

- 14) 임신부, 수유부 및 가입여성으로 참여기간 동안 임신 및 수유의 계획이 있는 대상자  
 15) 연구자 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 대상자

### 6.3. 목표 대상자 수 및 그 근거

#### 6.3.1. 대상자 수

대상자 선정기준 및 제외기준에 적합한 지원자를 군당 37명 이상을 등록하여 최종 군당 30명 이상을 분석하기로 계획한다.

	시험군	대조군	합계
기능성평가 레수	30명	30명	60명
중도탈락을 포함한 레수	37명	37명	74명

#### 6.3.2. 대상자 수 산출 및 그 근거

본 연구는 알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자에게 12주간 시험제품인 “UGBE”를 하루 2회 식사 직전 3정씩 복용하였을 때의  $\gamma$ -GT, ALT, AST 등의 간기능 지수 개선 효과 등의 기능성을 평가하려는 것으로 연구 대상자들은 시험군과 대조군에 따라 1:1로 무작위 할당되어 12주간의 복용기간을 거친 후 효과를 평가한다.

본 인체적용시험의 목적은 시험군에서 복용기간 12주 후 baseline (0주) 대비  $\gamma$ -GT 개선치의 변화를 UGBE 복용군과 대조군을 비교하여 우월하다는 것을 증명하고자 한다.

유효한 대상자 수를 산정하기 위하여 다음을 가정하였다.

- (1) 평가변수의 통계적 가설검정은 양측검정으로 한다.
- (2) 유의수준(Level of significance)은 5%
- (3) 제 2종 오류( $\beta$ )는 20%로 하여 검정력(Power of the test)은 80%를 유지
- (4) 시험군과 대조군의 시험예수의 비율, 1 즉, (시험군 예수)=(대조군의 예수)로 함
- (5) 시험제품 섭취 후 시험군과 대조군의 기능성 평가변수를 비교

대상자수 산정을 위하여, 정상인을 대상으로 한약재 추출물(NMED)을 복용한 후 간기능의 개선 효과를 연구한 박상욱 등(2013)의 결과 [참고문헌-21]를 이용하였다.

해당 연구에서는 120명의 질병이 없는 성인을 대상으로 NMED를 12주간 복용한 후 복용 전 대비 복용 후의  $\gamma$ -GT의 개선 효과를 분석한 결과  $28.1 \pm 38.7$  U/L의 유의한 감소를 보인 것으로 조사되었다. 따라서 본 인체적용시험에서의  $\gamma$ -GT의 변화는 28.1 U/L, 표준편차는 38.7 U/L로 각각 예상하였다.



이를 검정하기 위한 가설은 다음과 같다.

$$H_0: d_t = d_c$$

$$H_1: d_t \neq d_c$$

$d_t$ : 시험제품에서  $\gamma$ -GT의 복용 전 대비 12주간 변화량

$d_c$ : 대조제품에서  $\gamma$ -GT의 복용 전 대비 12주간 변화량

이상의 가정에 따라, 본 연구에 필요한 각 군의 대상자 수는 다음과 같이 계산된다.

$$n = 2 \left\{ \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}) * \sigma}{\Delta} \right\}^2$$

$$n = 2 \left\{ \frac{(1.96 + 0.84) * 38.7}{28.1} \right\}^2$$

$$n = 29.74$$

따라서, 각 군당 필요한 대상자수는 30명이 된다. 여기에 군당 중도탈락률 10% 및 순응도 90%를 감안하면, 다음 공식에 의해서 최종 대상자수는 군당 37명으로 총 74명이 된다.

$$N = \left\{ \frac{29.74}{(1-\delta)*C} \right\}$$

$$N = \left\{ \frac{29.74}{(1-0.1)*0.9} \right\}$$

$$N = 36.72$$

## 7. 인체적용시험 방법

### 7.1. 복용 방법 및 복용 기간

- 1) 시험제품 복용기간:  
아침, 저녁 식사 직전에 3정씩 1일 2회(총 6정), UGBE를 baseline(0주)부터 12주간 복용한다.
- 2) 대조제품 복용기간:  
아침, 저녁 식사 직전에 3정씩 1일 2회(총 6정), 대조제품(위약)을 baseline(0주)부터 12주간 복용한다.
- 3) 복용방법: [별첨 5] 인체적용시험용 제품 복용지도 참조
- 4) 복용순응도: 인체적용시험용 제품 복용순응도는 방문 3, 방문 4에 반납된 남은 제품의 용량을 측정하는 것으로 만일 복용순응도가 2회 연속 80% 미만인 경우 또는 복용순응도가 2회 연속 120% 이상인 경우 계획된 순응도에 적합하지 않은 것(non-compliant)으로 간주하여 인체적용시험에서 통계 처리시 제외시킨다. 또한, 과다 복용하지 않도록 복용 지도한다.
- 5) 용기 반납: 대상자들에게 제품을 복용하는 방법과 횟수 등을 알려주고 방문 3, 방문 4(시험종료시)에는 복용하고 남은 제품과 포장용기(bottle)를 반납해야 함을 알려준다.

### 7.2. 병용약물의 허용 및 금기약물/식품

#### 7.2.1. 병용약물의 허용

다음에 열거하는 약물은 인체적용시험기간 동안 병용 복용이 가능하다.

- ① 대상자가 본 인체적용시험에 참가하기 이전부터 투약하고 있던 병용약물 중 본 인체적용시험의 결과 해석에 영향을 미치지 않을 것으로 사료되는 병용약물은 연구자의 판단 하에 허용한다.
- ② 기타 질환 또는 이상반응의 치료를 목적으로 일과성으로 사용되는 약제는 연구자와 상의를 통하여 병용 복용하기로 한다.

모든 병용약물 복용 시 (타 질환 또는 이상반응 발현 시 치료약물 포함) 그 약물에 대한 정보 (제품명, 복용목적, 복용용량, 복용기간 등)를 대상자 증례기록서에 상세히 기록한다.

#### 7.2.2. 금기약물 및 식품

다음 약물의 사용은 시험제품의 안전성 또는 기능성의 평가를 방해할 수 있다. 따라서, 이러한 약물은 인체적용시험 종료 시까지 금지되며, 다음 약물을 복용하는 대상자는 인체적용시험에서 제외되어야 한다.

- 1) 인체적용시험 중 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물(Acetaminophen, Tylenol 등 해열진통제 및 비스테로이드성 소염진통제, Isoniazid, Rifampin 등 항결핵제나 항생제 및 Cytochrome P450에 영향을 줄 수 있는 phenobarbital 등의 항전간제)
- 2) 경구용 스테로이드, 호르몬제, 또는 제품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물이나 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물
- 3) 밀크씨슬(카르두스마리아누스)추출물, 표고버섯균사체추출물, 표고버섯균사체, 도라지추출물, 강황추출물, 브로콜리스프라우트분말, 유산균발효다시마추출물, 복분자추출분말, 발효율금, 헛개나무과병추출물 성분을 포함한 간 기능 개선 건강기능식품 및 제품

## 8. 무작위 배정

선정된 대상자는 시험군 또는 대조군에 1:1 의 비율로 무작위 배정된다. 무작위 배정 코드는 통계 학자에 의해 제공된다.

- ① 연구대상으로 선정된 대상자를 확률에 의거한 무작위배정 방법으로 각 군에 배정한다.
- ② 무작위 배정표 SPSS프로그램의 난수(random number)를 발생시키는 함수를 이용하여 작성한 다.
- ③ 두 군 중의 한 군에 방문일(Day 0) 순서대로 낮은 번호부터 할당된다. 즉, 인체적용시험에 참 여하는 순서대로 무작위 배정표에 따라 배정번호(Randomization Number: RN)를 부여하여 시험군 또는 대조군에 배정되도록 한다.
- ④ 무작위배정계획에 의해 대상자에게 사용할 제품은 시험책임자가 대상자에게 부여한 코드대 로 대상자에게 제공한다.

통계 프로그램의 랜덤코드 프로그램을 이용한 블록 무작위 배정을 실시하여 양군의 대상자수가 거 의 같아지도록 설계한다.

## 9. 이중눈가림

시험진행 중에는 연구자와 대상자 모두 각 대상자가 어느 군에 배정되어 있는지 알지 못하며, 의 학적 긴급상황이 발생하기 전까지는 이중눈가림을 해제하지 않으며, 배정된 군의 비밀을 유지한다. 이상 반응 등으로 이중눈가림을 해제 할 경우 이중눈가림해제 절차에 따라 IRB에 보고하고 의뢰자 에게 알려야 한다.

## 10. 관찰항목, 임상검사항목 및 관찰검사 방법

### 10.1. 관찰항목, 임상검사항목

#### 10.1.1. 대상자 동의

인체적용시험에 들어가기 전, 정상인에 한하여 인체적용시험의 목적과 내용에 대하여 대상자에게 설명하고, 대상자의 자유의사에 따라 서면 동의를 받은 후 스크리닝 검사를 실시한다. 시험 대상자의 적합성 스크리닝 검사는 개개의 대상자에 대하여 스크리닝 방문에 시행하며 스크리닝 방문 검사에 의해 임상적으로 유의한 이상이 있는 대상자는 제외한다.

#### 10.1.2. 인구학적 조사

인구학적 조사는 대상자의 생년월일, 성별, 등과 같은 인구학적 정보를 조사한다.

#### 10.1.3. 신체검사

신장과 체중, 신장은 신발을 벗고 cm 단위로 측정하고 방문 1 에서만 측정하고 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용하며 방문 1, 방문 4 에서 실시한다.

#### 10.1.4. 활력징후

활력징후는 체온, 혈압, 맥박수를 측정한다. 혈압과 맥박수는 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 동일한 혈압계를 사용하여 측정한다.

#### 10.1.5. 병력 및 동반질환

외과적 수술력, 알리지력 등을 포함한 6 개월 이내 과거력 및 현 병력에 대하여 발생시기(발생년도 또는 발생년월), 시험자의 의견 등을 적도록 한다.

#### 10.1.6. 이학적 검사

이학적 검사는 시진, 촉진, 문진에 의해 확인할 수 있는 외관, 피부, 두/경부, 흉부/폐, 복부, 비뇨/생식계, 사지, 근골격계, 신경계, 림프절 등 기타 신체기관 검진을 포함한다.

스크리닝 검사상 발견된 유의할만한 사항은 증례기록서의 이학적 검사란에 기록하고, 인체적용시험용 제품의 복용 개시 후 이상반응의 정의에 부합되는 이학적 소견상의 유의할만한 사항이 발견된 경우에는 증례기록서의 이상반응란에 기록한다. 단, 인체적용시험용 제품의 복용 개시 이전에 발현된 바람직하지 못한 이학적 증상이 발현된 경우에는 현 병력 조사란에 추가하여 기록하도록 한다.

#### 10.1.7. 생활습관 조사

흡연, 음주, 식사, 운동에 대한 생활습관을 매 방문 조사한다. 대상자는 방문 전 24 시간 동안 금주하여야 하며, 24 시간 이내에 음주 시 방문일정을 다시 잡고 방문하여야 한다.

**10.1.8. 임상실험실 검사 및 임신여부 검사(가임여성)**

임상실험실 검사를 위한 혈액채취는 매 방문에서 이루어진다. 방문 1의 임상실험실 검사는 방문 1 이전 2 주 내에 실시한 임상실험실 검사결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 방문 1에서 시행해야 할 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다. 또한, 방문 1 이후 14 일 이내에 방문 2를 진행한 경우 방문 2에서 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다. 대상자들은 방문 전 8 시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식을 금기하여 공복 채혈하도록 한다. 인체적용시험용 제품 최종 복용 후 혹은 조기 종료 후 비정상적인 임상실험실 결과, 계속되는 이상반응 등 시험자 판단에 따라 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우에 필요 항목만 실시한다.

혈액학적 검사	WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets
간 기능 검사	γ-GT, ALT, AST
혈액생화학적 검사	BUN, Creatinine, Uric acid, Total bilirubin, Albumin, Total protein, Alkaline phosphatase, glucose, Triglyceride, Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol
소변검사	pH, Protein, Glucose, WBC, RBC, Specific gravity hCG 임신검사 (대상자 중 임신가능성이 있는 경우에 한하여 각 방문 시 임신여부를 확인한다)

만일 인체적용시험 종료 시점에서 시행한 임상실험실 검사에 임상적으로 문제가 있을 경우에는 추적 조사 방문 시에 이러한 검사들을 다시 시행한다. 임상실험실 검사결과는 시험자가 시기 적절하게 이를 검토해야 한다. 임상실험실 검사치가 정상 범위를 벗어날 경우 시험자는 이에 대한 임상적 의미를 규명하고 해결될 때까지 또는 시험자가 임상적인 관련이 없다고 판정할 때까지 추적 조사한다

**10.1.9. 대상자 적합성 평가**

스크리닝 검사가 끝난 후 또는 방문 2 이전에 평가를 실시한다.

**10.1.10. 무작위 배정**

선정기준/제외기준에 합당한 대상자를 선정한 후 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정하고, 해당하는 인체적용시험용 제품을 처방한다. 무작위 배정은 방문 2에 방문순서에 따라 배정되며, 무작위 배정 후 인체적용시험용 제품을 처방 받도록 한다.

**10.1.11. IP 교부**

무작위배정 후 방문 2, 방문 3에 처방한다.

10.1.12. 선행/병용약물 조사

선행/병용약물 조사는 인체적용시험 참가 3 개월 이내 약물 복용력 또는 인체적용시험 진행 중에 병용한 약물 복용현황(용법, 용량, 복용기간 등)에 대하여 조사한다.

10.1.13. 이상반응 확인

인체적용시험 중 발생하는 모든 이상반응을 기록하는 것은 시험자의 의무이다. 이상반응은 의학진단 용어로 기록하여야 하며, 이것이 불가능한 경우 시험자가 관찰하거나 보고한 증상 및 징후에 대한 용어를 기록하여야 한다. 증례기록지에는 이상반응의 증상 및 증후, 시작일 및 시작시간, 종료일 및 종료시간, 마지막 투약일 및 투약시간, 총기간, 중증도, 경과, 결과, 경중도, 약물과의 인과관계, 취해진 조치가 기재되어야 한다. 세부적인 치료 내용은 CRF의 이상반응 페이지에 기록하여야 한다.

10.1.14. IP 반납/복용순응도

인체적용시험용 제품은 방문 3, 방문 4에서 남은 제품과 포장용기 모두를 반납한다.

인체적용시험용 제품의 복용순응도는 대상자가 반납한 남은 약물의 개수를 세는 것으로 측정한다.

$$\text{복용순응도}(\%) = \frac{\text{복용한 제품수}}{\text{복용해야 할 제품수}} \times 100$$

(처방된 제품수 - 반납한 제품수 - 미반납한 제품수) / (복용 일수 \* 일일복용량)

(소수 첫째 자리에서 반올림 합니다.)

복용순응도가 2 회 연속 80% 미만인 경우 순응도가 낮은(non-compliant)것으로 간주하여 인체적용시험에서 통계 처리시 제외시킨다.

10.2. 방문별 관찰검사 방법

10.2.1. 방문 1: 스크리닝(-2 주~0 주)

인체적용시험에 들어가기 전, 시험의 목적과 내용에 대하여 대상자에게 설명하고, 대상자의 자유의사에 따라 서면 동의를 받은 후 스크리닝 검사를 실시한다. 대상자의 적합성 스크리닝 검사는 개개의 대상자에 대하여 첫 복용 예정일 14 일 이내에 시행하며 다음 검사에 의해 임상적으로 유의한 이상이 있는 대상자는 제외한다.

- 1) 대상자 동의
- 2) 인구학적 조사
- 3) 신체검사
- 4) 활력징후
- 5) 병력 및 동반질환
- 6) 이학적 검사
- 7) 생활습관 조사
- 8) 임상실험실 검사
- 9) 임신여부 검사
- 10) 대상자 적합성 평가

11) 선행약물 조사

**10.2.2. 방문 2: 기준시기 (0 주)**

- 1) 활력징후
- 2) 생활습관 조사
- 3) 임상실험실 검사
- 4) 임신여부 검사
- 5) 무작위배정
- 6) IP 교부
- 7) 선행약물 조사

방문 2 에서 인체적용시험에 적합하다고 판정된 대상자에게 무작위 배정을 진행한 후 인체적용시험용 제품을 처방한다.

**10.2.3. 방문 3: 중간방문 (6 주±5 일)**

- 1) 활력징후
- 2) 생활습관 조사
- 3) 임상실험실 검사
- 4) 임신여부 검사
- 5) IP 교부
- 6) 병용약물 조사
- 7) 이상반응 확인
- 8) IP 반납 및 복용순응도

**10.2.4. 방문 4/조기방문: 종료방문(12 주±5 일)**

- 1) 신체검사
- 2) 활력징후
- 3) 이학적 검사
- 4) 생활습관 조사
- 5) 임상실험실 검사
- 6) 임신여부 검사
- 7) 병용약물 조사
- 8) 이상반응 확인
- 9) IP 반납 및 복용순응도

복용 기간 중에 조기 종료 또는 중도 탈락된 대상자는 종료방문 시 실시해야 할 항목을 실시한다. 종료에 대한 사유와 날짜를 대상자의 의무 기록지 또는 근거문서와 증례기록서의 시험 종료 양식에 기록한다.



10.2.5. Follow up 방문(필요 시)

- 1) 활력징후
- 2) 생활습관 조사
- 3) 임상실험실 검사
- 4) 임신여부 검사
- 5) 병용약물 조사
- 6) 이상반응 확인

인체적용시험용 제품 최종 복용 후 혹은 조기 종료 후 비정상적인 임상실험실 결과, 계속되는 이상반응 등 시험자 판단에 따라 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우나 필요에 따라 추적 관찰을 위해 4 주 이내 다시 방문하도록 한다. 임상실험실 검사는 연구자 판단 하에 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 항목만 실시한다.



## 11. 예측 이상반응 및 사용상의 주의사항

### 11.1. 예측 이상반응

UGBE 복용례가 보고된 적이 없어 이상반응은 알 수 없으나, 과다복용 시 알레르기, 속쓰림, 호흡곤란, 두통, 복통 등이 발생할 수 있을 것으로 예측된다.

### 11.2. 일반적 주의

- 1) 이 제품의 복용으로 건강한 지원자의 정신 및 신체 기능에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되나 과량으로 복용하지 않도록 주의한다.
- 2) 이 제품의 복용으로 발적, 두드러기 또는 다른 알러지 증상이 나타나는 경우 즉시 연구자와 상의하여야 한다.
- 3) 이 제품의 복용으로 두통, 불면, 가슴 두근거림, 혈압상승이 나타날 경우 즉시 연구자와 상의하여야 한다.
- 4) 이 제품의 복용으로 간 질환 및 위장장애가 있을 경우 연구자와 상의하여 이 제품의 복용을 피한다.
- 5) 이 제품의 복용 후 배변이 불편하거나 열이 나거나 염증으로 인한 고열이 있는 경우에는 연구자와 상의 후 제품의 복용을 중지하는 것이 좋다.
- 6) 이 제품의 복용 중단 시 금단증상이나 정서변화의 징후는 없을 것으로 판단되나 신체적·정신적 의존성에 주의하고, 연구자는 약물남용의 경력이 있는 대상자에 대하여 오남용의 증후가 있는지 조심하여 관찰해야 한다.

### 11.3. 임부 및 수유부에 대한 복용

임부에 대한 안전성은 확립되어 있지 않으므로 임부에 대한 사용을 금하며, 약물이 모유 중으로 분비되는지 알려져 있지 않으므로 수유 중 복용을 금한다. 또한 가임여성은 복용기간 중 적절한 피임법을 강구하여야 한다.

### 11.4. 과량복용시의 처치

이 제품의 과량복용 경험은 별로 없으며, 이 제품의 과량복용으로 인한 사망사례는 보고된 바 없다. 이 제품의 과량복용 시 특별히 권장되는 치료법은 없으며 특별한 해독제도 알려진 바 없다. 과량복용 시 기도확보, 심장 및 vital sign 점검, 대증요법 및 보조요법과 같은 일반적인 방법으로 처치가 이루어져야 한다. 조기에 활성탄을 복용하면 이 제품의 흡수를 지연시킬 수 있다. 위 세척이 유익할 수 있다.

**12. 중지, 탈락기준**

모든 대상자는 언제 어느 경우라도 특정 이유의 유무와 상관없이 중도 탈락할 수 있으며, 중도 탈락할 경우 대상자에게 주어질 권리 등의 어떠한 불이익 또는 이익에 손실은 없다.

대상자는 정해진 복용기간을 완료하기 전에 특정한 이유로 인해 중도 탈락될 수 있다. 인체적용시험 실시기관에 다시 방문하는 것을 거절한 대상자를 제외하고, 어떠한 이유로든 복용 기간 중 중도 탈락 또는 조기 종료한 모든 대상자는 **조기 종료 평가(방문 4 평가항목 참조)** 항목에 기술되어 있는 평가들을 완료하도록 한다.

대상자의 요청, 이상반응의 발생, 중대한 계획서 위반, 기타의 인체적용시험을 진행할 수 없는 경우에는 조기 종료될 수 있다. 이때 인체적용시험책임자는 이를 모니터링원에게 구두, 전화 및 서면으로 이를 알려야 한다. 그리고 이에 대한 기록을 증례기록지에 자세히 기록한다.

**12.1. 시험자에 의해 중지, 탈락되는 경우**

- 1) 선정/제외기준에 적합하지 않은 경우
- 2) 갑작스런 사고로 인하여 시험을 계속할 수 없는 경우
- 3) 대상자의 안전성에 문제를 일으킬 수 있다고 담당사가 판단한 경우
- 4) 과도한 예측 이상반응 증상, 사망을 포함한 중대한 이상반응의 경우
- 5) 방문 계획 등에 대한 순응도: 계획된 방문일에 방문하지 않아 안전성 및 기능성 평가를 하지 못하는 경우
- 6) 병용 금지된 약물의 투약 등 시험계획서 위반의 경우
- 7) 인체적용시험용 제품을 용법 용량대로 복용하지 않아 인체적용시험을 진행 할 수 없다고 판단될 경우
- 8) 대상자의 증상 악화로 더 이상 인체적용시험을 진행할 수 없다고 판단될 경우
- 9) 대상자 선정, 제외 기준 위반인 경우
- 10) 기타 시험을 계속하는데 지장을 주는 경우

**12.2. 대상자에 의해 중지, 탈락되는 경우**

- 1) 대상자나 그 가족이 시험 중지를 요청한 경우
- 2) 이상반응 발현으로 인한 중도탈락
- 3) 인체적용시험용 제품 복용거부, 비협조, 동의 철회 등의 기타 이유로 인한 중도탈락

**12.3. 의뢰자의 행정상의 사유**

의뢰자인 고연(高研)은 행정상 사유로 인해 인체적용시험을 조기 종료할 수 있다.

**13. 기능성 평가기준, 평가변수 및 통계분석방법****13.1. 기능성 평가기준**

인체적용시험 진행 일정에 따라 아래의 기능성 평가 항목을 검사한다.

2차 기능성 평가변수에서의 개선율은 [(종료시점(12주째) 수치 - 기저시점 (0주째) 수치)/기저시점 수치] x 100 (%)의 식으로 계산한다.

또한, 개선치 및 감소치의 경우는 "종료시점(12주째) 수치 - 기저시점 (0주째) 수치"를 이용하여 산출한다.

**13.2. 기능성 평가변수**

## 1) 일차 기능성 평가변수

- Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서  $\gamma$ -GT 수치의 개선치

## 2) 이차 기능성 평가변수

- Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서 ALT 수치의 감소치
- Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서 AST 수치의 감소치
- Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서 TG 수치의 감소치
- Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서  $\gamma$ -GT 수치의 개선율

**13.3. 통계분석 방법****13.3.1. 분석 대상자군**

본 인체적용시험의 대상자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety군, FAS(full analysis)군, PP(Per Protocol)군의 세 가지 형태로 분석된다.

1) 안전성 평가(Safety)군

Safety군은 본 인체적용시험에 참여하여 최소한 1회 이상 시험제품 또는 대조제품을 복용한 대상자를 대상으로 한다.

2) FAS군

FAS군은 인체적용시험 제품을 받은 후, 주 평가 변수에 대한 측정이 1회 이상 이루어진 대상자를 대상으로 한다. 무작위 배정되어 인체적용시험 제품을 받은 모든 대상자에서 최소한의 정당한 제외사유를 가진 연구대상자를 제외한 대상자를 대상으로 한다.

이 경우 무작위 배정된 대상자 중 다음에 한해서는 주 분석에서 제외할 수 있다.

- ① 주요한 선정, 제외기준을 위배한 경우
- ② 인체적용시험용 제품을 단 한번이라도 복용하지 않은 경우
- ③ 무작위 배정 이후 자료가 전무한 경우

3) PP군

PP군은 FAS군에 포함되는 대상자 중 인체적용시험계획서에 따라 본 연구를 성공적으로 완료한 대상자를 대상으로 한다.

이 경우 무작위 배정된 대상자 중 다음에 한해서는 PP 분석 시 통계분석에서 제외할 수 있다.

- ① 시험계획서를 위반한 대상자
  - 동의서 미 취득
  - 선정기준/제외기준에 위배된 경우
  - 인체적용시험 기간 동안 병용금지약물을 복용한 경우
  - 시험 개시-종료시점의 주요 검사가 누락된 경우
- ② 금기약물 복용 자, 복용순응도 연속 80% 이하 또는 연속 120% 이상인 대상자, 방문기간을 준수하지 않는 대상자

13.3.2. 결과 해석의 원칙

가능성 평가에 대한 FAS분석을 주 분석으로 하고 PP분석을 별도로 실시하여 FAS분석 결과와 차이가 있는지 평가한다.

FAS군의 경우, 어떤 시점에서 결측치가 발생되거나 인체적용시험이 종료되기 전에 대상자가 탈락하면 가장 최근에 얻은 자료를 마치 해당 시점에서 얻어진 것처럼 자료분석을 실시(Last Observation Carried Forward Analysis)하는 방법으로 분석한다.

안전성 평가에 대한 자료는 Safety군에 대해 실시하여 본 인체적용시험용 제품의 안전성을 평가한다.

모든 통계적 분석은 SPSS version 21.0으로 수행하고, 중간분석을 실시하지 않는다.

13.3.3. 대상자의 인구학적 기초자료 및 기타 복용 전 특성

인구통계학적, 건강 상태에 관하여 시험군과 위약군간 통계학적 차이가 있는지 검정하기 위해 연속형 자료는 평균, 표준편차, 최소값 및 최대값 등을 구하고, t-test를 이용하여 시험군과 위약군과의 평균치를 비교한다. 범주형 자료의 경우 군간 비교를 위해 군간 빈도를 구하고 Chi-square test 또는 Fisher's Exact test 등을 이용하여 분석한다.

13.3.4. 가능성 평가변수 분석방법

인체적용시험 진행 일정에 따라 아래의 가능성평가 항목을 검사한다.

1) 1차 가능성 평가변수 분석방법

Baseline(방문 2) 대비 12 주 후 평가시점(방문 4)에서  $\gamma$ -GT 수치의 개선치

시험군과 대조군에 대하여 복용 전 Baseline(0 주), 종료시점(12 주)의  $\gamma$ -GT 총점 수치를 구하여 복용 전 대비 개선치를 계산하고, 그 개선치가 두 군간의 유의한 차이가 있는지를 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test 를 이용하여 분석한다.

Baseline 수치가 유의한 차이를 보이는 경우 그 차이를 보정하기 위하여 ANCOVA 분석 방법에 의한 분석 결과도 함께 제시한다. 시험군의 변화량이 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 크다면 시험군이 대조군에 비해 우월하다고 판단한다. 또한, paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test 를

이용하여 각 군에서의 Baseline 과 12 주 후에서의  $\gamma$ -GT 수치의 변화가 통계적으로 유의한지 검토한다. 통계적 유의수준은 0.05 로 한다.

2) 2차 기능성 평가변수

① Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서 ALT 수치의 감소치

시험군과 대조군에 대하여 복용 전 Baseline(0주), 종료시점(12주)의 ALT 수치를 측정하여 복용 전 대비 변화 값을 계산하고, 그 변화 값이 두 군간의 유의한 차이가 있는지를 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test를 이용하여 분석한다.

Baseline 수치가 유의한 차이를 보이는 경우 그 차이를 보정하기 위하여 ANCOVA 분석 방법에 의한 분석 결과도 함께 제시한다. 시험군의 변화량이 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 크다면 시험군이 대조군에 비해 우월하다고 판단한다. 또한, paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 각 군에서의 Baseline과 12주 후에서의 ALT 수치의 변화가 통계적으로 유의한지 검토한다. 통계적 유의수준은 0.05로 한다.

② Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서 AST 수치의 감소치

시험군과 대조군에 대하여 복용 전 Baseline(0 주), 종료시점(12 주)의 AST 수치를 측정 하여 복용 전 대비 변화 값을 계산하고, 그 변화 값이 두 군간의 유의한 차이가 있는지를 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test를 이용하여 분석한다.

Baseline 수치가 유의한 차이를 보이는 경우 그 차이를 보정하기 위하여 ANCOVA 분석 방법에 의한 분석 결과도 함께 제시한다. 시험군의 변화량이 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 크다면 시험군이 대조군에 비해 우월하다고 판단한다. 또한, paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 각 군에서의 Baseline과 12주 후에서의 AST 수치의 변화가 통계적으로 유의한지 검토한다. 통계적 유의수준은 0.05로 한다.

③ Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서 TG 수치의 감소치

시험군과 대조군에 대하여 복용 전 Baseline(0 주), 종료시점(12 주)의 TG 수치를 측정하여 복용 전 대비 변화 값을 계산하고, 그 변화 값이 두 군간의 유의한 차이가 있는지를 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test 를 이용하여 분석한다.

Baseline 수치가 유의한 차이를 보이는 경우 그 차이를 보정하기 위하여 ANCOVA 분석 방법에 의한 분석 결과도 함께 제시한다. 시험군의 변화량이 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 크다면 시험군이 대조군에 비해 우월하다고 판단한다. 또한, paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test 를 이용하여 각 군에서의 Baseline 과 12 주 후에서의 TG 수치의 변화가 통계적으로 유의한지 검토한다. 통계적 유의수준은 0.05 로 한다.

④ Baseline(방문 2) 대비 12주 후 평가시점(방문 4)에서  $\gamma$ -GT 수치의 개선율

시험군과 대조군에 대하여 복용 전 Baseline(0 주), 종료시점(12 주)의  $\gamma$ -GT 수치를 측정하여 복용 전 대비 변화율을 계산하고, 그 변화율이 두 군간의 유의한 차이가 있는지를 Student's t-test 또는 Mann-Whitney U test 를 이용하여 분석한다.



Baseline 수치가 유의한 차이를 보이는 경우 그 차이를 보정하기 위하여 ANCOVA 분석 방법에 의한 분석 결과도 함께 제시한다. 시험군의 변화량이 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 크다면 시험군이 대조군에 비해 우월하다고 판단한다. 또한, paired t-test 또는 Wilcoxon signed rank test 를 이용하여 각 군에서의 Baseline 과 12 주 후에서의  $\gamma$ -GT 수치의 변화가 통계적으로 유의한지 검토한다. 통계적 유의수준은 0.05 로 한다.

#### 14. 이상반응을 포함한 안전성 평가기준, 평가변수 및 분석방법

##### 14.1. 안전성 평가기준

- (1) 이상반응
- (2) 임상실험실 검사결과
- (3) 이학적 검사결과
- (4) 활력징후 결과

##### 14.2. 안전성 평가변수 및 분석방법

- (1) 이상반응

이상반응은 발생건수와 발생한 대상자에 대해 각각 건수와 비율을 모두 구하도록 하며 군간 발생자 비율에 차이가 있는지 Chi-square test 또는 Fisher' Exact test를 이용하여 비교한다.

- (2) 임상 실험실 검사 결과

각 실험실 결과치에 대하여, 스크리닝 방문(0주) 대비 종료방문(12주) 시 정상/비정상 변화율을 빈도 및 백분율로 요약하여 제시하고, McNemar Chi-square test를 이용하여 각 군에서의 12주간 변화를 평가한다.

- (3) 이학적 검사 결과

이학적 검사 결과에 대하여, 스크리닝 방문(0주) 대비 종료방문(12주) 시 정상/비정상 변화율을 빈도 및 백분율로 요약하여 제시하고, McNemar Chi-square test를 이용하여 각 군에서의 12주간 변화를 평가한다.

- (4) 활력 징후

각 활력 징후 결과치에 대하여, 스크리닝 방문(0주) 대비 종료방문(12주) 시 변화가 있는지 관찰된 결과치를 제시하고, 군간 변화량에 차이가 있는지 Student's t-test를 이용하여 분석한다.

## 15. 이상반응 정의 및 보고 규정

### 15.1. 정의

#### 1) 이상반응(Adverse Events, AE)

인체적용시험용 제품을 복용한 대상자에게 발생한 모든 유해하고 의도하지 않은 증후(症候, sign, 실험실 실험 결과의 이상 등을 포함한다), 증상(症狀, symptom) 또는 질병을 말하며, 해당 인체적용시험 제품과 반드시 인과관계를 가져야 하는 것은 아니다.

#### 2) 이상약물반응(Adverse Drug Reaction, ADR)

인체적용시험용 제품의 임의 용량에서 발생한 모든 유해하고 의도하지 않은 반응으로서 인체적용시험용 제품과의 인과관계를 부정할 수 없는 경우를 말한다.

#### 3) 중대한 이상반응/이상약물반응(Serious AE/ADR)

중대한 이상반응 또는 이상약물반응 중에서 다음 어느 하나에 해당하는 경우를 말한다.

- ① 사망하거나 생명에 대한 위험이 발생한 경우
- ② 입원할 필요가 있거나 입원 기간을 연장할 필요가 있는 경우
- ③ 영구적이거나 중대한 장애 및 기능 저하를 가져온 경우
- ④ 태아에게 기형 또는 이상을 초래하는 경우

시험자는 인체적용시험기간 중에 발생한 모든 중대한 이상반응은 해당절차에 따라 관계기관에 보고하도록 한다. 중대한 이상반응은 이를 발견한 후 24시간 이내에 보고하여야 한다. 시험의뢰자, 시험책임자, 시험담당자는 다음과 같은 의무를 가진다.

### 15.2. 중증도의 평가 기준

이상반응의 중증도 평가는 최대강도(maximal intensity)에 의거하여 아래의 3 단계 기준에 따라 분류한다.

- 1) 경증(Mild): 증상 또는 증후를 지각할 수는 있으나 쉽게 참을 수 있는 정도
- 2) 중등도(Moderate): 일상 생활을 방해할 만큼 불편한 정도
- 3) 중증(Severe): 정상적인 일상 생활을 수행 할 수 없을 정도

### 15.3. 시험제품과의 인과관계 평가

시험제품 복용과 이상반응 발생의 연관성 여부 및 정도는 시험자의 임상적 판단에 근거한다. 이때 다음의 기준을 판단의 지표로 사용하여 '관련 가능성이 있음(Possibly)' 이상인 경우 시험제품과 인과론적 관련이 있다고 판단한다.

#### 1) 명확히 관련 있음(Definitely)

- 시험제품을 복용하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
- 이상반응이 다른 어떤 이유보다 시험제품 복용에 의해 가장 개연성 있게 설명되는 경우
- 시험제품의 복용 중단으로 이상반응이 사라지는 경우

- 시험제품 재복용(가능한 경우에만 실시) 결과가 양성인 경우
  - 이상반응이 시험제품 또는 동일 계열의 건강기능식품에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우
- 2) 관련이 있다고 생각됨(Probably)
- 시험제품을 복용하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
  - 이상반응이 다른 어떤 이유보다 시험제품 복용으로 가장 개연성 있게 설명되는 경우
  - 시험제품의 복용 중단으로 이상반응이 사라지는 경우
- 3) 관련 가능성이 있음(Possibly)
- 시험제품을 복용하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우
  - 이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 시험제품 복용에 기인한다고 판단되는 경우
  - 시험제품 복용 중단으로 이상반응이 사라지는 경우
- 4) 관련 가능성이 없음(Unlikely, probably not)
- 시험제품을 복용하였다는 증거가 있는 경우
  - 이상반응에 대해 보다 가능성 있는 원인이 있는 경우
  - 시험제품의 복용 중단 결과 음성이거나 모호한 경우
  - 시험제품 재복용 결과가 음성이거나 모호한 경우
- 5) 명확히 관련 없음(Not related, None)
- 대상자가 시험제품을 복용 하지 않은 경우
  - 시험제품 복용과 이상반응 발현간의 시간적 순서가 타당하지 않은 경우
  - 이상반응에 대해 다른 명백한 원인이 있는 경우
- 6) 불명(Unknown, unassessable)
- 연관성을 판단하기에 근거가 부족한 경우
  - 근거자료의 질적 수준이 떨어지거나 데이터 간의 일관성이 없는 경우

#### 15.4. 이상반응의 기록

인체적용시험 중 발생하는 모든 이상반응을 기록하는 것은 시험자의 의무이다. 이상반응은 의학진단 용어로 기록하여야 하며, 이것이 불가능한 경우 시험자가 관찰하거나 보고한 증상 및 징후에 대한 용어를 기록하여야 한다.

증례기록지(CRF)에는 이상반응의 증상 및 증후, 시작일 및 시작시간, 종료일 및 종료시간, 마지막 투약일 및 복용시간, 총기간, 중증도, 경과, 결과, 경중도, 시험제품과의 인과관계, 취해진 조치가 기재되어야 한다. 세부적인 내용은 증례기록서의 이상반응 페이지에 기록하여야 한다.

#### 15.5. 중대한 이상반응의 보고

예측하지 못한 중대한 이상반응이 투약기간 도중에 발생하는 경우, 인체적용시험용 제품과의 인과관계와 관계없이 시험자가 아래의 ㈜파마크로 연락처로 24시간 이내에 보고한다. 또한 기타 관련된 시험자, 심사위원회에 중대하고 예상하지 못한 모든 이상반응을 보고하여야 한다.

담당자명: ㈜파마크로 박은영 Tel: 02-529-1310/1410 Fax: 02-521-1180 주 소: 서울 서초구 강남대로 275 강남메인타워 11층
--



시험자는 이상반응을 모두 기술하기 위해 모니터에게 우선적으로 보고하고 이후에 서면으로 충분히 기술된 보고서를 작성하여 보고하도록 한다. 해당사항이 있는 경우 병원 의무기록이나 검사기록을 포함하도록 한다. 연구가 종료한 후라도 연구과정과 연관된 이상반응이라고 판단한 경우 담당 모니터에게 보고하도록 한다.

#### 15.6. 이상반응을 경험한 대상자의 추적조사

시험자는 이상반응이 나타난 대상자에 대해 증상이 가라앉고 비정상적 임상실험실 검사치가 기준으로 회복되거나, 혹은 관찰된 변화에 대해 만족스러운 설명이 될 때까지 추적 관찰 한다. 또한 이상반응의 진행 경과에 대한 보고서를 담당 모니터에게 제출하도록 한다.

## 16. 시험 대상자 동의서, 피해자 보상에 대한 규약, 인체적용시험 후 대상자 진료 및 치료 기준

### 16.1. 시험 대상자 설명서 및 동의서

시험자는 시험에 참여하는 지원자들이 인체적용시험 참여 유무를 결정하기 전에 Helsinki 선언 및 KGCP 에 따라 충분한 정보를 제공한다. 인체적용시험을 위한 시험대상자 설명서[별첨 3]를 통해 해당 인체적용시험과 관련된 모든 정보를 지원자들이 이해할 수 있는 언어로 제공하고, 시험에 대해 자세한 것을 질문할 수 있는 충분한 기회를 준다. 또한 시험대상자 설명서를 대상자에게 읽어줄 수 있지만, 대상자가 서명하기 전에 읽을 충분한 시간을 줄 것이다. 대상자의 자유의사에 따라 서면으로 동의서[별첨 3]를 받는다. 또한 지원자는 시험 중 언제라도 자유의사에 의해 시험을 그만둘 수 있으며 또한 이를 알고 있다.

시험대상자 설명서 및 동의서[별첨 3]는 이 시험계획서와 함께 IRB 의 승인을 받을 것이다. 동의서 및 설명서는 대상자가 이해할 수 있도록 작성한다. 대상자의 동의는 대상자의 서명, 동의일을 기록하고 보관될 것이다. 대상자 동의양식은 IRB 에서 승인 받은 대로 사용될 것이며, 대상자의 서명 후 원본 1 부는 시험책임자가, 사본 1 부는 대상자가 각각 보관할 것이다.

시험대상자 설명서[별첨 3]은 의약품임상시험관리기준(의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표 4)따라 필요한 요소를 포함하여 작성된다.

### 16.2. 피해자 보상에 대한 규약

[별첨 4] 피해자 보상에 대한 규약 참조

### 16.3. 인체적용시험 후 대상자의 진료 및 추적관찰 기준

시험자의 판단에 따라 인체적용시험용 제품 최종 복용 후 혹은 조기 복용 중지 후 비정상적인 임상실험실 결과, 계속되는 이상반응, 중도 탈락, 시험자 판단에 따라 추적 관찰이 필요하다고 여겨지는 경우 필요에 따라 추적 관찰을 위해 4 주 이내 다시 방문하도록 한다.

- 1) 활력징후
- 2) 생활습관 조사
- 3) 임상실험실 검사
- 4) 임신여부 검사
- 5) 병용약물 확인
- 6) 이상반응 확인

**17. 대상자의 안전보호에 관한 대책**

본 인체적용시험은 임상시험 관리기준 및 인체적용시험 관련법규에 따라 과학적이고 윤리적으로 진행될 것이다. 또한 본 인체적용시험은 헬싱키 선언에 입각하여 인간의 존엄성 및 권익을 존중함과 더불어 대상자에게 불이익을 초래되지 않도록 실시될 것이다.

임상시험심사위원회는 임상시험 관리기준에 따라 본 인체적용시험계획서를 평가/승인하고 인체적용시험이 인체적용시험계획서에 따라 진행되는지 정기적으로 평가할 것이다.

시험자는 대상자를 인체적용시험에 등록하기 전에 각 대상자들의 건강상태를 확인하여 인체적용시험에 참여할 수 있는지를 확인하여야 한다. 또한 시험자는 인체적용시험용 제품에 관하여 충분히 숙지하고 대상자의 안전을 보장하기 위해 최선을 다할 것이다.

인체적용시험으로 인한 이상반응이 발생한 경우 대상자가 회복할 때까지 적절한 의료조치가 취해지고 인체적용시험연구자는 가입된 피해자 보험에 따라 보상할 것이다.

**18. 그 밖에 인체적용시험을 안전하게 과학적으로 실시하기 위하여 필요한 사항****18.1. 윤리적 고려**

본 인체적용시험계획서(시험대상자 설명서 및 동의서 포함)은 윤리적이고 과학적으로 시행되어야 하며 KGCP 에 따라 인체적용시험개시 전에 임상시험심사위원회로부터 승인을 받아야 한다. 승인을 받은 시험계획서에 따라 진행되며, 헬싱키 선언을 준수 할 것이다. 시험계획서의 변경은 마찬가지로 임상시험심사위원회(IRB)의 승인을 받아야 한다.

시험과 관련한 이상반응은 지원자의 부담 없이 치료될 것이며, 영구적 불구 등의 발생은 의뢰자가 보상할 것이다. 또한 본 시험은 임상시험 관리기준(KGCP)에 준하여 실시될 것이다.

**18.2. 인체적용시험 자료의 보관 및 문헌의 열람**

인체적용시험 관련 문서에는 모든 작업일지, 근원서류, 모니터링 기록과 약속 일정, 인체적용시험 의뢰자-시험자간의 서신교환과 규정문서 등이 포함된다(예: 시험자가 서명한 인체적용시험 계획서와 그 개정판, 임상시험심사위원회 관련 서신, 허가관련서류, 서명된 시험대상자동의서, 인체적용시험용 제품 수령증, 수불기록).

근거문서는 모든 관찰기록과 임상활동에 관한 기록, 인체적용시험의 평가와 재구성에 필요한 모든 보고서와 기록을 포함한다. 따라서 근거문서에는 인체적용시험 계획서에 근거하여 실시된 모든 처치에 대한 기록 또는 이와 유사한 기록이 모두 포함한다.

관찰기록은 가능한 한 그 원본을 근거문서로서 보관해야 한다. 그러나 복사본이 원본과 정확히 동일하고 깨끗하며 읽기 쉽도록 기록되어 있으면 복사본도 근거문서로 간주할 수 있다. 이러한 문서들은 인체적용시험의 완료일로부터(또는 품목허가일로부터) 3 년간 보존되어야 한다. 다만, 식품의약품안전처장이 지시하거나 인체적용시험 연구자가 그 필요성이 있다고 판단한 경우에는 보존기간을 연장하여야 한다.

**18.3. 자료 및 대상자 기록의 기밀 유지**

모든 대상자명은 비밀을 유지하도록 하고, 시험을 시작할 때 부여한 번호에 의해 기록 및 평가를 한다. 대상자의 신원에 대한 모든 기록은 비밀보장이 되도록 주의한다. 다만 모니터요원, 점검을 실시하는 자,

심사위원회 및 식품의약품안전처장은 대상자의 비밀보장을 침해하지 않고 관련 규정이 정하는 범위 안에서 시험절차와 자료의 신뢰성을 검증하기 위해 대상자에 대한 기록을 열람할 수 있다.

#### 18.4. 보고서 제출 및 출판에 관한 방침

원칙적으로 본 인체적용시험결과는 시험의뢰자의 소유이다. 그러나, 인체적용시험연구자는 시험의뢰자와 상의 후 시험의 결과를 독립적으로 전문지에 기재하거나 발표할 권리가 있으며, 발표논문을 제출하기 30 일전에 초록 사본은 시험의뢰자에게 제공하여야 한다. 시험의뢰자는 인체적용시험연구자와 협의 후 인체적용시험연구자와는 별도로 시험 결과를 학회에 발표할 수 있는 권리가 있다. 시험의뢰자는 초록을 제출하기 전에 적어도 30 일간 충분히 연구와 협의 및 검토하여야 한다.

#### 18.5. 시험계획서 준수에 대한 모니터링

모니터는 시험의 진행을 모니터링 하기 위한 목적으로 연구시설에 대한 방문을 수행하게 된다. 시험자는 시험제품의 보관장소, 시험에 관련된 서류에 대해 인체적용시험 모니터 또는 본 업무의 위임자가 접근할 수 있도록 동의하고 협조하여야 한다. 또한 식품의약품안전처장으로부터 실태조사 및 의뢰자의 점검을 받는 경우에도 시험자는 해당업무에 동의하고 협조하여야 한다.

#### 18.6. 품질관리(QC) 및 보증(QA)

데이터는 직접 CRF 에 기입한다. 수정 시에는 원본이 보이도록 수정하고자 하는 곳에 가로로 한 줄을 긋고 새로 기입한다. 수정한 곳에 수정한 사람의 이니셜과 서명, 날짜를 기입한다. 증례기록지 및 자료는 ㈜파마크로에서 모니터 한다.

시험의 신뢰성을 보증하기 위하여 시험에 관련된 모든 주요사항을 문서로 작성하여 시험의 기초자료와 함께 인체적용시험 완료일로부터(또는 품목허가일로부터) 3 년간 보존하며 시험계획서, 결과보고서 및 시험기초자료에 대하여 임상연구심사위원회의 심사와 평가를 받는다.

**19. 참고문헌**

- 1) Namba T. The encyclopedia of Wakan-Yaku with color pictures. *Osaka: Hoikusha.* (1980)
- 2) Park JD. Recent studies on the chemical constituents of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A.Meyer). *Korea J Ginseng Sci.* 20:389-415 (1996)
- 3) Sanata S, Kondo N, Shoji J, Tanaka O, Shibata S. Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginseng-R0, Rb1, Rb2, Rc and Rd. *Chem Pharm Bull.* 22:421-428 (1974)
- 4) Kitagawa I, Taniyama T, Shibuya H, Nota T, Yoshikawa M. Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra (2) : Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. *Yakugaku Zasshi.* 107:495-505 (1987)
- 5) Ko SK, Bae HM, Cho OS, Im BO, Chung SH, Lee BY. Analysis of ginsenoside composition of ginseng berry and seed. *Food Science and Biotechnology.* 17:1379-1382 (2008)
- 6) Dey L, Zhang L, Yuan CS. Anti-diabetic and anti-obese effects of ginseng berry extract: comparison between intraperitoneal and oral administrations. *Am J Chin Med.* 30:645-647. (2002)
- 7) Huo YS. Anti-senility action of saponin in *Panax ginseng* fruit in 327 cases. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 4:593-596 (1984)
- 8) Zhang SC, Jiang XL. The anti-stress effect of saponins extracted from *Panax ginseng* fruit and the hypophyseal-adrenal system. *Yao Xue Xue Bao.* 16:860-863 (1981)
- 9) Bae HM, Cho OS, Kim SJ, Im BO, Cho SH, Lee S, Kim MG, Kim KT, Leem KH, Ko SK. Inhibitory effects of ginsenoside Re isolated from ginseng berry on histamine and cytokine release in human mast cells and human alveolar epithelial cells. *J Ginseng Res.* 36:369-374. (2012)
- 10) Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H, Zhang R. *In vitro* anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother Pharmacol.* 59:589-601. (2007)
- 11) Lee SA, Jo HK, Im BO, Kim S, Whang WK, Ko SK. Changes in the contents of prosapogenin in the red ginseng (*Panax ginseng*) depending on steaming batches. *J Ginseng Res.* 36:102-106 (2012)
- 12) Ko SK, Lee KH, Hong JK, Kang SA, Sohn UD, Im BO, Han ST, Yang BW, Chung SH, Lee BY. Change of ginsenoside composition in ginseng extract by the vinegar process. *Food Science and Biotechnology.* 14:509-513 (2005)
- 13) Zheng H, Jeong Y, Song J, Ji GE. Oral administration of ginsenoside Rh1 inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions induced by oxazolone in hairless mice. *Int Immunopharmacol.* 11:511-518. (2011)
- 14) Keum YS, Han SS, Chun KS, Park KK, Park JH, Lee SK, Surh YJ. Inhibitory effects of the ginsenoside Rg3 on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF-kappaB activation and tumor

- promotion. *Mutat Res.* 523-524:75-85. (2003)
- 15) Kim ND, Kang SY, Park JH, Schini-Kerth VB. Ginsenoside Rg3 mediates endothelium-dependent relaxation in response to ginsenosides in rat aorta: role of K<sup>+</sup> channels. *Eur J Pharmacol.* 367:41-49. (1999)
- 16) Yang L, Hao J, Zhang J, Xia W, Dong X, Hu X, Kong F, Cui X. Ginsenoside Rg3 promotes beta-amyloid peptide degradation by enhancing gene expression of neprilysin. *J Pharm Pharmacol.* 61:375-380. (2009)
- 17) Lee WM, Kim SD, Park MH, Cho JY, Park HJ, Seo GS, Rhee MH. Inhibitory mechanisms of dihydroginsenoside Rg3 in platelet aggregation: critical roles of ERK2 and cAMP. *J Pharm Pharmacol.* 60:1531-1536. (2008)
- 18) Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, Kwon H, Surh YJ. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett.* 150:41-48. (2000)
- 19) Jeong SJ, Han SH, Kim DY, Lee JC, Kim HS, Kim BH, Lee JS, Hwang EH, Park JK. Effects of mRg2, a mixture of ginsenosides containing 60% Rg2, on the ultraviolet B-induced DNA repair synthesis and apoptosis in NIH3T3 cells. *Int J Toxicol.* 26:151-158 (2007)
- 20) Quan HY, Yuan HD, Jung MS, Ko SK, Park YG, Chung SH. Ginsenoside Re lowers blood glucose and lipid levels via activation of AMP-activated protein kinase in HepG2 cells and high-fat diet fed mice. *Int J Mol Med.* 29:73-80 (2012)
- 21) 박상욱, 권용범, 김기태, 신선미, 임강현, 고희, 송미경, 정윤철, 김호철, 박주연. NMED-01과 NMED-02의 간기능 개선에 대한 인체 효능 평가. *대한분초학회지.* 28(6): 31-38 (2013)
- 22) 의약품 임상시험 관리기준 (의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표 4호)



# Case Report Form

Protocol No: UGBE-1

Initials	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Family</td><td>First Name</td><td></td><td></td></tr></table>					Family	First Name		
Family	First Name								
Screening No.	S <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>								
Random No.	R <table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>								

### Confidential Documents

Notice: All or part of the information in this document is to be considered as the confidential property of Koyeon Company and PharmaCRO Inc., not to be divulged to unauthorized persons in any form (publication or presentation) without the express written consent of Koyeon Company.

**CRF Guideline**

**[내용기입]**

1. 검정색 볼펜을 사용하여 읽기 쉽도록 명확하게 한 칸에 한 자씩 왼쪽에서 오른쪽으로 기록한다.
2. 대상자 정보란 작성 시 스크리닝 번호를 먼저 부여한 후 스크리닝을 통과한 대상자에 대해서 무작위배정 번호를 부여한다.
3. 빈칸은 최대 길이의 답에 알맞게 제시되므로 공란이 없도록 모든 항목을 기록한다.
4. 숫자 작성 시 그 수치가 한자리일 경우 다음의 예시 1)과 같이 기록한다. 예시 1) 

0	0	7
---	---	---

  
 소수점 첫째 자리까지 작성해야 하는 경우 둘째 자리에서 반올림하여 기록한다.  
 날짜 작성은 다음의 예시 2) 및 예시 3)을 참고하여 작성한다.

예시 2) 생년월일 1970년 6월 20일

1	9	7	0	0	6	2	0
YYYY			MM		DD		

예시 3) 병력항목에서 날짜가 확실치 않을 경우

1	9	7	0	0	6	U	K
YYYY			MM		DD		

5. 대상자 이니셜 작성 시 기입란이 부족한 경우 제시된 칸 내에서 음절 순으로 적고, 기입란이 남는 경우 “\_”를 작성하여 오류를 방지한다.
6. 허용된 공간 외 바깥이나 여백에 낙서 또는 정보 기입을 하지 않는다.
7. 증례기록서 각 페이지 상단의 대상자 정보란을 기록한다.
8. 증례기록서 내용을 잘 읽고 해당하는 체크박스에 빠짐없이 “√” 표시 한다.
9. 약물 및 의료 기기명 등은 상품명으로 명확하게 기록한다.
10. 문구나 문장이 필요한 경우에는 철자가 분명하게 또박또박 기록한다.
11. 약어 사용 시 의학적으로 분명하고 표준화된 의학용어만을 사용하고 그 외의 약어나 머리글자의 사용을 금한다.
12. 제시된 분류정보에 적합하지 않을 경우 □기타로 체크한 후 구체적 내용을 기록한다.

**[누락정보]**

13. 누락된 정보에는 다음의 약어를 확인하고 해당하는 체크박스에 빠짐없이 “√” 표시한다.
  - ND(Not Done) 시행하지 않음     NA(Not Available/ Not Applicable) 유효하지 않음/적용되지 않음
  - UK (Unknow) 모름

**[기록확인]**

14. 스크리닝 완료 후 스크리닝 종합 평가에 대한 기록을 완료한다.
15. 증례기록서의 이상반응 보고서에 기록된 정보와 중대한 이상반응 상세보고서의 기록이 일치한 지 확인한다.
16. 증례기록서가 페이지 순서대로 있는지 또는 누락 및 훼손된 것은 없는지 확인한다.

**[수정절차]**

17. 기재 사항을 수정할 경우에는 예시 5)를 참고하여 한 줄을 긋고 “기록오기”라 적은 뒤 가능한 한 가까운 곳에 수정내용, 수정일 그리고 수정한 사람의 이름(또는 서명)을 작성한다. 수정액의 사용을 금한다.

예시 5)

X	Y	Z	
A	B	C	13/03/20 기록오기/이름(서명)

18. 수정정보를 지우거나 겹쳐 쓰지 않는다. 수정 이전의 기록은 읽을 수 있게 한다
19. 증례기록서의 원본을 복사하여 사용하지 않는다.



### Contents

- Visit 1: 스크리닝 (-14 일~0 일)
- Visit 2: 투여 직전 (0 일, Week 0)
- Visit 3: 투여 6 주 ± 5 일 (42 일, Week 6)
- Visit 4/조기종료: 투여 12 주 ± 5 일 (84 일, Week 12/조기종료)
- 추가방문 / 추적조사 (필요 시)
- 병용약물 / 이상반응 보고 양식
- 인체적용시험종료 양식

### Study Flow Chart

시험항목	스크리닝	복용기간			Follow-up
	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4 (종료방문)	
	-14 일~0 일	0 주(0 일)	6 주(±5 일)	12 주(±5 일)	필요시
대상자 동의	V				
인구학적 조사	V				
신체검사	V			V	
활력징후	V	V	V	V	V
병력 및 동반질환	V				
이학적 검사	V			V	
생활습관 조사	V	V	V	V	V
임상실험실 검사	V	V	V	V	V
임신여부 검사	V	V	V	V	V
대상자 적합성 평가	V				
무작위 배정		V			
IP 교부		V	V		
선행/병용약물 조사	V	V	V	V	V
이상반응 확인			V	V	V
IP 반납/복용순응도			V	V	

Protocol No.	Screening	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	-14 일 to 0 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	4

# Visit 1

## 투여전 (-14일 ~ 0일)

Protocol No.	Screening	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	-14 일 to 0 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	5

방문일
방문일을 기록하여 주십시오.
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 년 YYYY      월 MM      일 DD

대상자 동의서
대상자에게 본 인체적용시험에 관해 상세히 설명하고 서면 동의 받았습니까?
<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
서면동의일
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 년 YYYY      월 MM      일 DD

인구학적 조사	
성 별	<input type="checkbox"/> 남 <input type="checkbox"/> 여
생년월일	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 년 YYYY      월 MM      일 DD
나 이	만 <input type="text"/> 세
* 만 19 세 이상 만 70 세 미만 대상자는 본 인체적용시험에 참여할 수 있습니다. * (동의년도)-(출생년도)=00 세 (동의일 기준 생일이 지나지 않은 경우 -1 세)	

신체검사	
신 장	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> cm
체 중	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> kg
* 신장은 신을 벗고 cm 단위로 측정합니다. * 체중은 반올림하여 소수 점 첫째 자리까지 기재합니다.	

활력징후(Vital Sign)	
혈압(mmHg)	수축기(SBP)      이완기(DBP)
	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
맥 박(beats/min)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
체온(°C)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>
* 맥박은 5 분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 측정하며, 각 방문 시마다 같은 팔에서 측정합니다.	

Protocol No.	Screening	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	-14 일 to 0 일	S <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	R <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	6

### 선행약물(Medication) 조사

지난 3개월 내에 복용한 약물 또는 현재 복용중인 약물이 있습니까?

- No       Yes    ☞ "선행/병용약물 page"에 자세한 사항을 기재하십시오.

### 병력 및 동반질환

대상자가 지난 6 개월 내에 경험하였거나 현재 가지고 있는 질환이 있습니까?

- No  
 Yes    ☞ 아래에 자세히 기재 하십시오.

진단명	발생시기 (년 YYYY/ 월 MM)	Ongoing		소 건
		Yes	No	
	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

### 임신검사(Pregnancy)

NA    ▶ 남성, 폐경여성(마지막 생리일 이후 2년 이상된 여성), 외과적 불임수술을 받은 가임기 여성은 "NA"에 해당

검체 채취일     

년 YYYY      월 MM      일 DD

검사 결과       Negative       Positive      ☞ "Positive"인 경우 인체적용시험에 참여할 수 없습니다.

Protocol No.	Screening	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	-14 일 to 0 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	7

생활습관 조사			
방문 전 24시간 동안 금주하였습니까?			
<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No      ☞ "No"인 경우 인체적용시험에 참여할 수 없습니다.			
흡연 습관		음주 습관	
비흡연자	<input type="checkbox"/>	비음주자	<input type="checkbox"/>
과거 흡연자 → 흡연 종료 나이 _____세	<input type="checkbox"/>	과거 음주자 → 음주 종료 나이 _____세	<input type="checkbox"/>
흡연자 → _____갑/주	<input type="checkbox"/>	음주자 <input type="checkbox"/> 보통으로 마신다 (소주 360ml 1/2 병 이하/주) <input type="checkbox"/> 많이 마신다 (소주 360ml 1/2 병 초과/주)	<input type="checkbox"/>
식사 습관		운동 습관	
규칙적	<input type="checkbox"/>	전혀 하지 않음	<input type="checkbox"/>
		불규칙적 (30 분 이상 주 3 회 이하)	<input type="checkbox"/>
불규칙적	<input type="checkbox"/>	규칙적 (30 분 이상 주 3 회 이상) → _____회 / 주	<input type="checkbox"/>

이학적 검사			
방문 당시 어떤 비정상의 내용이 있습니까? <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No			
No.	분류 번호	비정상 내용	임상적 의미
1	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
2	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
3	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
4	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS <input type="checkbox"/> CS
▶ 소 견: _____			
☞ 분류번호의 기재는 아래의 표를 참고하여 기재하고 검사결과 비정상임에도 불구하고 대상자로 선정하고자 할 경우 소견란에 그 사유를 기록하십시오.			
표. 분류번호 - 이학적검사			
01	General appearance	06	Heart/Circulation
02	Skin and Mucosa	07	Abdomen
03	HEENT	08	Renal/ Genitourinary
04	Breast	09	Rectal
05	Lung	10	Lymph nodes
		11	Neurological/ Psychiatric
		12	Extremities
		13	Musculoskeletal
		14	Others

Protocol No.	Screening	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	-14 일 to 0 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	8

임상실험실 검사(Laboratory test)							
검체 채취일		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	YYYY/MM/DD	
혈액학검사(Hematology)		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음			<input type="text"/>	<input type="text"/>	YYYY/MM/DD
항목	검사치	재검치	Normal	Abnormal		소견	
				NCS	CS		
WBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
RBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Hemoglobin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Hematocrit			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Platelets			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
혈액화학검사(Blood Chemistry)		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음			<input type="text"/>	<input type="text"/>	YYYY/MM/DD
γ-GT			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
ALT			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
AST			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
BUN			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Creatinine			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Uric acid			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Total bilirubin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Albumin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Total protein			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
ALP			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Glucose			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Triglyceride			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Total cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
HDL cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
LDL cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
소변검사(Urine Analysis)		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음			<input type="text"/>	<input type="text"/>	YYYY/MM/DD
pH			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Protein			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Glucose			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
WBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
RBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Specific gravity			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<p>* 실험실적검사가 있는 날에는 공복상태(방문 전 8 시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식 금기)로 실시기관을 방문하도록 교육하십시오.</p> <p>1. 재검치가 기록된 경우 재검치에 의해 정상여부를 표기하고 NCS/CS 판단하여 표기하십시오.</p> <p>2. Abnormal, CS 인 경우 소견을 기록하십시오.</p>							

CRF\_Version 1.1(2015.04.20)

Protocol No.	Screening	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	-14 일 to 0 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	9

대상자의 인체적용시험참여 적합성(Eligibility) 평가		
선정기준 (Inclusion Criteria)		
선정기준 각 항목의 해당란에 √ 하시오.	예	아니오
1. 만 19세 이상 만 70세 미만의 성인 남녀	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. 알코올 섭취로 인하여 γ-GT 가 60 이상 250 이하인 자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 들은 후 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
> 한 항목이라도 "아니오"에 체크되었다면 →본 인체적용시험에 참여할 수 없음		
제외기준 (Exclusion Criteria)		
1. 인삼류에 과민증 또는 그 병력이 있는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. 3개월 이내 간 기능 관련 약물, 건강기능식품을 복용중인 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. 간염보균자 급성간염환자 및 간경화의 징후가 인정되는 자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. 비알코올성 및 알코올성 지방간으로 확진되어 치료중인 자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. 심한 간 기능 장애(ALT, AST 중 정상 상한치의 2.5배 이상)이거나 특정 질환, 약물, 감염 및 간경화에 의한 간 기능 장애 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. 황달, 담석 등 담도계 질환자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. 6개월 내 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 당뇨병, 고혈압 및 고지혈증 진단을 받았거나 뇌졸중 또는 일시적인 허혈성 심장마비의 병력이 있는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. 최근 5년 내 암 진단 및 치료 받은 적이 있는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. 울혈성 신부전 및 심한 신기능 장애(serum creatinine > 2.0 mg/dl)가 있는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 현재 질환을 앓고 있는 대상자 (우울증, 정신분열증, 간질, 약물중독, 거식증, 이상식욕항진 등)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. 인체적용시험 중 결과에 영향을 미칠 수 있다고 판단되는 약물(해열진통제 및 비스테로이드성 소염진통제, 항결핵제, 항생제나 항진균제)을 지속적으로 복용해야 하는 자 (상세내용은 7.2. 병용약물의 허용 및 금기약물/식품을 참고한다.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. 최근 4주 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제, 또는 제품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물이나 간 기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 경험이 있거나 기타 임상시험에 참여한 경험이 있는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. 위장관계 질환(위궤양, 십이지장궤양 등) 및 기타 남용우려가 있는 약물을 복용중인 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14. 임신부, 수유부 및 가임여성으로 참여기간 동안 임신 및 수유의 계획이 있는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. 연구자 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 대상자	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
> 한 항목이라도 "예"에 체크되었다면 →본 인체적용시험에 참여할 수 없음		

CRF\_Version 1.1(2015.04.20)

Protocol No.	Screening	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	-14 일 to 0 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	10

스크리닝 종합 평가
<p>본 대상자의 인체적용시험 참여는 적합합니까?</p> <p><input type="checkbox"/> Yes      <input type="checkbox"/> No <i>만약 "No"라고 표기되었다면 그 사유를 기술하여 주십시오.</i></p> <p><input type="checkbox"/> 선정/제외기준 위반</p> <p><input type="checkbox"/> 동의철회</p> <p><input type="checkbox"/> 연구자의 판단</p> <p><input type="checkbox"/> 기타 _____</p>

인체적용시험자 확인
<p>본인은 본 대상자에 대한 해당검사를 빠짐없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 증례기록서에 기록된 모든정보가 정확함을 확인합니다.</p> <p>인체적용시험 책임자 서명 (또는 시험책임자의 위임을 받은자)</p> <p>서명일 <input type="text"/></p> <p style="text-align: center;">년 YYYY      월 MM      일 DD</p>



Protocol No.	Visit 2	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	0 주	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	11

## Visit 2

### 투여직전 (0일, Week 0)

---

CRF\_Version 1.1(2015.04.20)

Protocol No.	Visit 2	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	0 주	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	12

<b>방문일</b>
방문일을 기록하여 주십시오.
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
년 YYYY      월 MM      일 DD

<b>활력징후(Vital Sign)</b>		<input type="checkbox"/> ND
혈압(mmHg)	수축기(SBP)	이완기(DBP)
	<input type="text"/>	<input type="text"/>
맥 박(beats/min)	<input type="text"/>	
체온(°C)	<input type="text"/>	
* 맥박은 5 분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 측정하며, 각 방문 시마다 같은 팔에서 측정합니다.		

<b>생활습관 조사</b>		<input type="checkbox"/> ND	
방문 전 24시간 동안 금주하였습니까?			
<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No      * "No"인 경우 인체적용시험에 참여할 수 없습니다.			
<b>흡연 습관</b>		<b>음주 습관</b>	
비흡연자	<input type="checkbox"/>	비음주자	<input type="checkbox"/>
과거 흡연자	<input type="checkbox"/>	과거 음주자	<input type="checkbox"/>
→ 흡연 종료 나이 _____세		→ 음주 종료 나이 _____세	
흡연자	<input type="checkbox"/>	음주자	<input type="checkbox"/>
→ _____갑/주		<input type="checkbox"/> 보통으로 마신다 (소주 360ml 1/2 병 이하/주) <input type="checkbox"/> 많이 마신다 (소주 360ml 1/2 병 초과/주)	
<b>식사 습관</b>		<b>운동 습관</b>	
규칙적	<input type="checkbox"/>	전혀 하지 않음	<input type="checkbox"/>
		불규칙적 (30 분 이상 주 3 회 이하)	<input type="checkbox"/>
불규칙적	<input type="checkbox"/>	규칙적 (30 분 이상 주 3 회 이상)	<input type="checkbox"/>
		→ _____회 / 주	

<b>임신검사(Pregnancy)</b>		<input type="checkbox"/> ND
<input type="checkbox"/> NA    ▶ 남성, 폐경여성(마지막 생리일 이후 2년 이상된 여성), 외과적 불임수술을 받은 가임기 여성은 "NA"에 해당		
검체 채취일	<input type="text"/>	
	년 YYYY      월 MM      일 DD	
검사 결과	<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive    * "Positive"인 경우 본 인체적용시험에 참여할 수 없습니다.	

Protocol No.	Visit 2	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	0 주	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	13

임상실험실 검사(Laboratory test) <input type="checkbox"/> Visit 1 과 동일 <input type="checkbox"/> ND						
검체 채취일		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	YYYY/MM/DD	
혈액화학검사(Hematology)		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음	<input type="text"/>	<input type="text"/>	YYYY/MM/DD	
항목	검사치	재검치	Normal	Abnormal		소견
				NCS	CS	
WBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemoglobin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hematocrit			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Platelets			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
혈액화학검사(Blood Chemistry)		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	YYYY/MM/DD
γ-GT			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ALT			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
AST			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BUN			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Creatinine			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uric acid			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total bilirubin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Albumin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total protein			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ALP			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Triglyceride			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HDL cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LDL cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
소변검사(Urine Analysis)		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	YYYY/MM/DD
pH			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Protein			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
WBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Specific gravity			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<p>* 실험실적검사가 있는 날에는 공복상태(방문 전 8 시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식 금기)로 실시기관을 방문하도록 교육하십시오.</p> <p>1. 재검치가 기록된 경우 재검치에 의해 정상여부를 표기하고 NCS/CS 판단하여 표기하십시오.</p> <p>2. Abnormal, CS 인 경우 소견을 기록하십시오.</p>						

CRF\_Version 1.1(2015.04.20)

Protocol No.	Visit 2	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	0 주	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	14

선행약물(Medication) 조사	<input type="checkbox"/> ND
지난 방문 이후 복용한 약물 또는 현재 복용중인 약물이 있습니까?	
<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes      ☞ "선행/병용약물 page"에 자세한 사항을 기재하십시오.	

무작위 배정	<input type="checkbox"/> ND
무작위배정이 되었습니까? <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
무작위배정 번호	R <input type="text"/>

인체적용시험용 제품 처방 및 교부	<input type="checkbox"/> ND
인체적용시험용 제품이 처방 되었습니까? <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
인체적용시험용 제품 처방 및 교부일	<input type="text"/> 년 YYYY      월 MM      일 DD

인체적용시험자 확인
본인은 본 대상자에 대한 해당검사를 빠짐없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 증례기록서에 기록된 모든정보가 정확함을 확인합니다.
인체적용시험 책임자 서명 (또는 시험책임자의 위임을 받은자)
서명일
<input type="text"/> 년 YYYY      월 MM      일 DD

CRF\_Version 1.1(2015.04.20)

Protocol No.	Visit 3	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	6 주 ± 5 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	15

## Visit 3

**투여 중 (6주 ± 5일, Week 6)**

Protocol No.	Visit 3	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	6 주 ± 5 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	16

**방문일**

방문일을 기록하여 주십시오.

년 YYYY      월 MM      일 DD

**활력징후(Vital Sign)  ND**

혈압(mmHg)      수축기(SBP)      이완기(DBP)

맥 박(beats/min)     

체온(°C)     

\* 맥박은 5 분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 측정하며, 각 방문 시마다 같은 팔에서 측정합니다.

**병용약물(Medication) 조사  ND**

지난 방문 이후 복용한 약물 또는 현재 복용중인 약물이 있습니까?

No       Yes      ⇨ "선행/병용약물 page"에 자세한 사항을 기재하십시오.

**생활습관 조사  ND**

방문 전 24시간 동안 금주하였습니까?

Yes       No      ⇨ "No"인 경우 다시 일정을 잡아 방문해 주십시오.

흡연 습 관		음 주 습 관	
비흡연자	<input type="checkbox"/>	비음주자	<input type="checkbox"/>
과거 흡연자 → 흡연 종료 나이 _____세	<input type="checkbox"/>	과거 음주자 → 음주 종료 나이 _____세	<input type="checkbox"/>
흡연자 → _____갑/주	<input type="checkbox"/>	음주자 <input type="checkbox"/> 보통으로 마신다 (소주 360ml 1/2 병 이하/주) <input type="checkbox"/> 많이 마신다 (소주 360ml 1/2 병 초과/주)	<input type="checkbox"/>
식 사 습 관		운 동 습 관	
규칙적	<input type="checkbox"/>	전혀 하지 않음	<input type="checkbox"/>
		불규칙적 (30 분 이상 주 3 회 이하)	<input type="checkbox"/>
불규칙적	<input type="checkbox"/>	규칙적 (30 분 이상 주 3 회 이상) → _____회 / 주	<input type="checkbox"/>

Protocol No.	Visit 3	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	6 주 ± 5 일	S <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	R <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	17

이상반응(Adverse Events) <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ND</span>
<p>대상자가 지난 방문 이후에 이상반응이 있었습니까?</p> <p><input type="checkbox"/> No                      <input type="checkbox"/> Yes ☞ "이상반응 page"에 자세한 사항을 기재하십시오.</p> <p>대상자가 지난 방문 이후에 중대한 이상반응이 있었습니까?</p> <p><input type="checkbox"/> No                      <input type="checkbox"/> Yes ☞ 주파마크로에 24 시간 이내에 보고하십시오.</p>

임신검사(Pregnancy) <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ND</span>
<p><input type="checkbox"/> NA ▶ 남성, 폐경여성(마지막 생리일 이후 2년 이상된 여성), 외과적 불임수술을 받은 가임기 여성은 "NA"에 해당</p> <p>검체 채취일 <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/></p> <p style="text-align: center;">년 YYYY                      월 MM                      일 DD</p> <p>검사 결과    <input type="checkbox"/> Negative    <input type="checkbox"/> Positive    ☞ "Positive"인 경우 본 인체적용시험에 참여할 수 없습니다.</p>

Protocol No.	Visit 3	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	6 주 ± 5 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	18

<b>임상실험실 검사(Laboratory test)</b>						<input type="checkbox"/> ND
검체 채취일		<input type="text"/>				YYYY/MM/DD
<b>혈액학검사(Hematology)</b>		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음				YYYY/MM/DD
항목	검사치	재검치	Normal	Abnormal		소견
				NCS	CS	
WBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemoglobin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hematocrit			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Platelets			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>혈액화학검사(Blood Chemistry)</b>		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음				YYYY/MM/DD
γ-GT			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ALT			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
AST			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BUN			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Creatinine			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uric acid			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total bilirubin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Albumin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total protein			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ALP			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Triglyceride			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HDL cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LDL cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>소변검사(Urine Analysis)</b>		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음				YYYY/MM/DD
pH			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Protein			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
WBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Specific gravity			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<p>* 실험실적검사가 있는 날에는 공복상태(방문 전 8 시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식 금기)로 실시기관을 방문하도록 교육하십시오.</p> <p>1. 재검치가 기록된 경우 재검치에 의해 정상여부를 표기하고 NCS/CS 판단하여 표기하십시오.</p> <p>2. Abnormal, CS 인 경우 소견을 기록하십시오.</p>						

CRF\_Version 1.1(2015.04.20)



Protocol No.	Visit 3	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	6 주 ± 5 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	19

<b>복용순응도</b> <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ND</span>			
반납일 <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 년 YYYY 월 MM 일 DD			
복용 시작 일	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mm/dd	복용 일수	<input type="text"/>
복용 중단 일	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mm/dd		
처방된 시험제품의 수	<input type="text"/>	순응도(%)	<input type="text"/>
반납한 시험제품의 수	<input type="text"/>		
복용한 시험제품의 수	<input type="text"/>	복용한 수: 처방된 수 - 반납한 수 - 미반납 수	
복용해야 할 시험제품의 수	<input type="text"/>	복용해야 할 수: 복용일수 * 일일복용량(6 tab)	
$\text{순응도(%)} = \frac{\text{복용한 시험제품의 수}}{\text{복용해야 할 시험제품의 수}} \times 100$ <span style="float: right;">☞ 순응도는 소수 첫째 자리에서 반올림하여 기재</span>			
미복용 시험제품 반납여부	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	미반납 수	<input type="text"/>
☞ 미반납 인체적용시험용 제품이 있는 경우 아래 사유란에 그 사유를 기재하여 주십시오.			
사유: _____			

<b>인체적용시험용 제품 처방 및 교부</b> <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ND</span>	
인체적용시험용 제품이 처방 되었습니까?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
인체적용시험용 제품 처방 및 교부일	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 년 YYYY 월 MM 일 DD

<b>인체적용시험자 확인</b>	
본인은 본 대상자에 대한 해당검사를 빠짐없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 증례기록서에 기록된 모든정보가 정확함을 확인합니다.	
인체적용시험 책임자 서명 (또는 시험책임자의 위임을 받은자)	_____
서명일	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 년 YYYY 월 MM 일 DD

Protocol No.	Visit 4	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	12 주 ± 5 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	20

**Visit 4**

투여 12주 ± 5일 (Week 12)

**인체적용시험 조기종료**

Protocol No.	Visit 4	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	12 주 ± 5 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	21

방문일
방문일을 기록하여 주십시오.
<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
년 YYYY      월 MM      일 DD

신체검사	<input type="checkbox"/> ND
체    중	<input type="text"/> · <input type="text"/> kg
* 체중은 반올림하여 소수 점 첫째 자리까지 기재합니다.	

활력징후(Vital Sign)	<input type="checkbox"/> ND
혈압(mmHg)	수축기(SBP)      이완기(DBP)
	<input type="text"/> / <input type="text"/>
맥 박(beats/min)	<input type="text"/>
체온(°C)	<input type="text"/> · <input type="text"/>
* 맥박은 5 분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 측정하며, 각 방문시마다 같은 팔에서 측정합니다.	

병용약물(Medication) 조사	<input type="checkbox"/> ND
지난 방문 이후 복용한 약물 또는 현재 복용중인 약물이 있습니까?	
<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes      ⇨ "선행/병용약물 page"에 자세한 사항을 기재하십시오.	

이상반응(Adverse Events)	<input type="checkbox"/> ND
대상자가 지난 방문 이후에 이상반응이 있었습니까?	
<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes      ⇨ "이상반응 page"에 자세한 사항을 기재하십시오.	
대상자가 지난 방문 이후에 중대한 이상반응이 있었습니까?	
<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes      ⇨ 중파마크로에 24 시간 이내에 보고하십시오.	

임신검사(Pregnancy)	<input type="checkbox"/> ND
<input type="checkbox"/> NA    ▶ 남성, 폐경여성(마지막 생리일 이후 2 년 이상된 여성), 외과적 불임수술을 받은 가임기 여성은 "NA"에 해당	
검체 채취일	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	년 YYYY      월 MM      일 DD
검사 결과	<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive      ⇨ "Positive"인 경우 본 인체적용시험에 참여할 수 없습니다.

Protocol No.	Visit 4	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	12 주 ± 5 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	22

생활습관 조사 <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ND</span>			
방문 전 24시간 동안 금주하였습니까? <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No <i>"No"인 경우 다시 일정을 잡아 방문해 주십시오.</i>			
흡연습관		음주습관	
비흡연자	<input type="checkbox"/>	비음주자	<input type="checkbox"/>
과거 흡연자 → 흡연 종료 나이 _____세	<input type="checkbox"/>	과거 음주자 → 음주 종료 나이 _____세	<input type="checkbox"/>
흡연자 → _____갑/주	<input type="checkbox"/>	음주자 <input type="checkbox"/> 보통으로 마신다 (소주 360ml 1/2 병 이하/주) <input type="checkbox"/> 많이 마신다 (소주 360ml 1/2 병 초과/주)	<input type="checkbox"/>
식사습관		운동습관	
규칙적	<input type="checkbox"/>	전혀 하지 않음	<input type="checkbox"/>
		불규칙적 (30 분 이상 주 3회 이하)	<input type="checkbox"/>
불규칙적	<input type="checkbox"/>	규칙적 (30 분 이상 주 3회 이상) → _____회 / 주	<input type="checkbox"/>

이학적 검사 <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ND</span>					
방문 당시 어떤 비정상 내용이 있습니까? <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> Yes    <input type="checkbox"/> No</span>					
No.	분류 번호	비정상 내용	임상적 의미		
1	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS	<input type="checkbox"/> CS	
2	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS	<input type="checkbox"/> CS	
3	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS	<input type="checkbox"/> CS	
4	<input type="text"/>		<input type="checkbox"/> NCS	<input type="checkbox"/> CS	
▶ 소 견: _____					
<i>☞ 분류번호의 기재는 아래의 표를 참고하여 기재하고 검사결과 비정상임에도 불구하고 대상자로 선정하고자 할 경우 소견란에 그 사유를 기록하십시오.</i>					
표. 분류번호 - 이학적검사					
01	General appearance	06	Heart/Circulation	11	Neurological/ Psychiatric
02	Skin and Mucosa	07	Abdomen	12	Extremities
03	HEENT	08	Renal/ Genitourinary	13	Musculoskeletal
04	Breast	09	Rectal	14	Others
05	Lung	10	Lymph nodes		

Protocol No.	Visit 4	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	12 주 ± 5 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	23

<b>임상실험실 검사(Laboratory test)</b> <input type="checkbox"/> ND						
검체 채취일		<input type="text"/> YYYY/MM/DD				
<b>혈액학검사(Hematology)</b>		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음		YYYY/MM/DD		
항목	검사치	재검치	Normal	Abnormal		소견
				NCS	CS	
WBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemoglobin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hematocrit			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Platelets			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>혈액화학검사(Blood Chemistry)</b>		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음		YYYY/MM/DD		
γ-GT			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ALT			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
AST			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BUN			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Creatinine			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uric acid			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total bilirubin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Albumin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total protein			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ALP			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Triglyceride			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HDL cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LDL cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>소변검사(Urine Analysis)</b>		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음		YYYY/MM/DD		
pH			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Protein			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
WBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Specific gravity			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<p>* 실험실적검사가 있는 날에는 공복상태(방문 전 8 시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식 금기)로 실시기관을 방문하도록 교육하십시오.</p> <p>1. 재검치가 기록된 경우 재검치에 의해 정상여부를 표기하고 NCS/CS 판단하여 표기하십시오.</p> <p>2. Abnormal, CS 인 경우 소견을 기록하십시오.</p>						

CRF\_Version 1.1(2015.04.20)

Protocol No.	Visit 4	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	12 주 ± 5 일	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	24

<b>복용순응도</b> <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> ND</span>			
반납일 <input type="text"/>			
년 YYYY      월 MM      일 DD			
복용 시작 일	<input type="text"/> mm/dd	복용 일수	<input type="text"/>
복용 중단 일	<input type="text"/> mm/dd		
처방된 시험제품의 수	<input type="text"/>	순응도(%)	<input type="text"/>
반납한 시험제품의 수	<input type="text"/>		
복용한 시험제품의 수	<input type="text"/>	복용한 수: 처방된 수 - 반납한 수 - 미반납 수	
복용해야 할 시험제품의 수	<input type="text"/>	복용해야 할 수: 복용일수 * 일일복용량(6 tab)	
$\text{순응도(%)} = \frac{\text{복용한 시험제품의 수}}{\text{복용해야 할 시험제품의 수}} \times 100$ <small>☞ 순응도는 소수 첫째 자리에서 반올림하여 기재</small>			
미복용 시험제품 반납여부	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	미반납 수	<input type="text"/>
☞ 미반납 인체적용시험용 제품이 있는 경우 아래 사유란에 그 사유를 기재하여 주십시오.			
사 유: _____			

<b>인체적용시험자 확인</b>	
본인은 본 대상자에 대한 해당검사를 빠짐없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 증례기록서에 기록된 모든정보가 정확함을 확인합니다.	
인체적용시험 책임자 서명 (또는 시험책임자의 위임을 받은자) _____	
서명일	<input type="text"/>
	년 YYYY      월 MM      일 DD

Protocol No.	추가방문 /추적조사	Screening No.	Random No	Initials	Page
UGBE-1		S <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	R <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	25

추 가 방 문(필요시)

추 적 조 사(필요시)

Protocol No.	추가방문	Screening No.	Random No	Initials	Page
UGBE-1	Unscheduled Visit	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	26

#### 방문일

방문일을 기록하여 주십시오.

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
년 YYYY			월 MM		일 DD		

#### 방문사유

#### Comments

#### 인체적용시험자 확인

본인은 본 대상자에 대한 해당검사를 빠짐없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 증례기록서에 기록된 모든정보가 정확함을 확인합니다.

인체적용시험 책임자 서명  
(또는 시험책임자의 위임을 받은자)

서명일

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
년 YYYY			월 MM		일 DD		



Protocol No.	추적조사	Screening No.	Random No	Initials	Page
UGBE-1	Follow up Visit	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	27

**방문일**

방문일을 기록하여 주십시오.

/  /   
 년 YYYY      월 MM      일 DD

**활력징후(Vital Sign)**

ND

혈압(mmHg)                      수축기(SBP)                      이완기(DBP)  
 /                        /   
 맥 박(beats/min)                        
 체온(°C)                       .

\* 맥박은 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 측정하며, 각 방문시마다 같은 팔에서 측정합니다.

**임신검사(Pregnancy)**

ND

NA ▶ 남성, 폐경여성(마지막 생리일 이후 2년 이상된 여성), 외과적 불임수술을 받은 가임기 여성은 "NA"에 해당

검체 채취일                       /  /   
 년 YYYY                      월 MM                      일 DD

검사 결과                       Negative                       Positive                      ☞ "Positive"인 경우 인체적용시험에 참여할 수 없습니다.

**생활습관 조사**

ND

방문 전 24시간 동안 금주하였습니까?

Yes                       No                      ☞ "No"인 경우 다시 일정을 잡아 방문해 주십시오.

흡연 습 관		음 주 습 관	
비흡연자	<input type="checkbox"/>	비음주자	<input type="checkbox"/>
과거 흡연자 → 흡연 종료 나이 _____세	<input type="checkbox"/>	과거 음주자 → 음주 종료 나이 _____세	<input type="checkbox"/>
흡연자 → _____갑/주	<input type="checkbox"/>	음주자 <input type="checkbox"/> 보통으로 마신다 (소주 360ml 1/2 병 이하/주) <input type="checkbox"/> 많이 마신다 (소주 360ml 1/2 병 초과/주)	<input type="checkbox"/>
식 사 습 관		운 동 습 관	
규칙적	<input type="checkbox"/>	전혀 하지 않음	<input type="checkbox"/>
		불규칙적 (30분 이상 주 3회 이하)	<input type="checkbox"/>
불규칙적	<input type="checkbox"/>	규칙적 (30분 이상 주 3회 이상) → _____회 / 주	<input type="checkbox"/>

Protocol No.	추적조사	Screening No.	Random No	Initials	Page
UGBE-1	Follow up Visit	S <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	R <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	28

**선행/병용약물조사**  ND

지난 방문 이후 대상자가 복용한 약물 또는 현재 복용중인 약물이 있습니까?

- No       Yes *☞ "선행/병용약물page"에 자세한 사항을 기재하십시오.*

**이상반응(Adverse Events)**  ND

대상자가 지난 방문 이후에 이상반응이 있었습니까?

- No       Yes *☞ "이상반응 page"에 자세한 사항을 기재하십시오.*

대상자가 지난 방문 이후에 중대한 이상반응이 있었습니까?

- No       Yes *☞ 주파마크로에 24 시간 이내에 보고하십시오.*

<b>Protocol No.</b>	<b>추적조사</b>	<b>Screening No.</b>	<b>Random No</b>	<b>Initials</b>	<b>Page</b>
UGBE-1	Follow up Visit	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	29

<b>임상실험실 검사(Laboratory test)</b>						<input type="checkbox"/> ND
<b>검체 채취일</b>		<input type="text"/>				YYYY/MM/DD
<b>혈액학검사(Hematology)</b>		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음				YYYY/MM/DD
항목	검사치	재검치	Normal	Abnormal		소견
				NCS	CS	
WBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hemoglobin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hematocrit			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Platelets			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>혈액화학검사(Blood Chemistry)</b>		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음				YYYY/MM/DD
γ-GT			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ALT			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
AST			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
BUN			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Creatinine			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uric acid			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total bilirubin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Albumin			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total protein			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ALP			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Triglyceride			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Total cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
HDL cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
LDL cholesterol			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>소변검사(Urine Analysis)</b>		재검 <input type="checkbox"/> 없음 <input type="checkbox"/> 있음				YYYY/MM/DD
pH			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Protein			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Glucose			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
WBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
RBC			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Specific gravity			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
* 실험실적검사가 있는 날에는 공복상태(방문 전 8 시간 이내에 물을 제외한 음료수나 음식 금기)로 실시기관을 방문하도록 교육하십시오. 1. 재검치가 기록된 경우 재검치에 의해 정상여부를 표기하고 NCS/CS 판단하여 표기하십시오. 2. Abnormal, CS 인 경우 소견을 기록하십시오.						

CRF\_Version 1.1(2015.04.20)

Protocol No.	추적조사	Screening No.	Random No	Initials	Page
UGBE-1	Follow up Visit	S <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	R <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	30

**인체적용시험자 확인**

본인은 본 대상자에 대한 해당검사를 빠짐없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 증례기록서에 기록된 모든정보가 정확함을 확인합니다.

인체적용시험 책임자 서명  
(또는 시험책임자의 위임을 받은자)

\_\_\_\_\_

서명일

년 YYYY      월 MM      일 DD

CRF\_Version 1.1(2015.04.20)

Protocol No.	선행·병용약물	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1	/이상반응	S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	31

■ 선행/병용약물

■ 이상반응

Protocol No.	선행·병용 약물	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1		S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	32-1

선행/병용약물								
인체적용시험 참여 전(3개월 이내) 및 인체적용시험기간 동안 병용한 약물이 있습니까? <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes (→ 병용약물이 있다면 ☑표시하고 세부항목을 기재하십시오.)								
No	약물명	1일 총복용량 (용량/단위)	경로	복용기간(yyyy/mm/dd)		지속 여부		부 용 목적
				시작일	종료일	Y	N	
1				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
4				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
5				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
6				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
7				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
8				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
9				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
10				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
11				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
12				<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
1.경로: ID = intradermal, SL = sublingual, IL = intralesional, PO = oral, PR = per rectum, SC= subcutaneous, TD = transdermal, IM = intramuscular, TO = topical, IV = intravenous, PV = per vagina, OT = other, IH = inhalation 2. 지속여부: "Yes"로 체크한 경우 종료일은 "-"로 표기 하십시오 3. 복용 목적: 효능,효과 및 약효로 기입하지 않고, 해당 기저병력과 일치하여 기입하십시오 예) 해열제->감기, 투여목적은 감기로 기입하십시오. 4. 약물명은 상품명으로 기재하여 주십시오. Comment:								

추가 병용약물 페이지 있음

Protocol No.	이상 반응	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1		S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	33-1

이상반응			
유의한 이상반응이 있었습니까? <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes (→이상반응이 있다면 <input checked="" type="checkbox"/> 표시하고 세부항목을 기재하십시오.)			
항목	Events 1	Events 2	Events 3
증상 및 증후			
발현일	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> yyyy mm dd	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> yyyy mm dd	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> yyyy mm dd
소실일	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> yyyy mm dd	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> yyyy mm dd	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> yyyy mm dd
이상반응 정도	<input type="checkbox"/> 경도 <input type="checkbox"/> 중등도 <input type="checkbox"/> 중증	<input type="checkbox"/> 경도 <input type="checkbox"/> 중등도 <input type="checkbox"/> 중증	<input type="checkbox"/> 경도 <input type="checkbox"/> 중등도 <input type="checkbox"/> 중증
보고 방법	<input type="checkbox"/> 질문 <input type="checkbox"/> 측정 <input type="checkbox"/> 관찰 <input type="checkbox"/> 자발적보고	<input type="checkbox"/> 질문 <input type="checkbox"/> 측정 <input type="checkbox"/> 관찰 <input type="checkbox"/> 자발적보고	<input type="checkbox"/> 질문 <input type="checkbox"/> 측정 <input type="checkbox"/> 관찰 <input type="checkbox"/> 자발적보고
SAE 해당 여부	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes (SAE 보고서 작성)	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes (SAE 보고서 작성)	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes (SAE 보고서 작성)
인체적용시험용 제품과 인과관계	<input type="checkbox"/> UK <input type="checkbox"/> 명확히 관련 없음 <input type="checkbox"/> 관련가능성 없음 <input type="checkbox"/> 관련가능성 있음 <input type="checkbox"/> 관련이 있다고 생각됨 <input type="checkbox"/> 명확히 관련이 있음	<input type="checkbox"/> UK <input type="checkbox"/> 명확히 관련 없음 <input type="checkbox"/> 관련가능성 없음 <input type="checkbox"/> 관련가능성 있음 <input type="checkbox"/> 관련이 있다고 생각됨 <input type="checkbox"/> 명확히 관련이 있음	<input type="checkbox"/> UK <input type="checkbox"/> 명확히 관련 없음 <input type="checkbox"/> 관련가능성 없음 <input type="checkbox"/> 관련가능성 있음 <input type="checkbox"/> 관련이 있다고 생각됨 <input type="checkbox"/> 명확히 관련이 있음
예측 여부	<input type="checkbox"/> 예측된 이상반응 <input type="checkbox"/> 예측하지 못한 이상반응	<input type="checkbox"/> 예측된 이상반응 <input type="checkbox"/> 예측하지 못한 이상반응	<input type="checkbox"/> 예측된 이상반응 <input type="checkbox"/> 예측하지 못한 이상반응
이상반응 처치	<input type="checkbox"/> 취해진 조치 없음 <input type="checkbox"/> 인체적용시험제품 복용 용량 변경/일시적 중단 <input type="checkbox"/> 인체적용시험제품 복용 중단 <input type="checkbox"/> 치료약물 병용 투여 <input type="checkbox"/> 비약물 치료 <input type="checkbox"/> 입원/입원 기간 연장 <input type="checkbox"/> 기타	<input type="checkbox"/> 취해진 조치 없음 <input type="checkbox"/> 인체적용시험제품 복용 용량 변경/일시적 중단 <input type="checkbox"/> 인체적용시험제품 복용 중단 <input type="checkbox"/> 치료약물 병용 투여 <input type="checkbox"/> 비약물 치료 <input type="checkbox"/> 입원/입원 기간 연장 <input type="checkbox"/> 기타	<input type="checkbox"/> 취해진 조치 없음 <input type="checkbox"/> 인체적용시험제품 복용 용량 변경/일시적 중단 <input type="checkbox"/> 인체적용시험제품 복용 중단 <input type="checkbox"/> 치료약물 병용 투여 <input type="checkbox"/> 비약물 치료 <input type="checkbox"/> 입원/입원 기간 연장 <input type="checkbox"/> 기타
이상반응 결과	<input type="checkbox"/> 이상반응 회복, 후유증 없음 <input type="checkbox"/> 이상반응 회복, 후유증 있음 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행없음 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행중 <input type="checkbox"/> 사망 <input type="checkbox"/> 추적관찰 실패	<input type="checkbox"/> 이상반응 회복, 후유증 없음 <input type="checkbox"/> 이상반응 회복, 후유증 있음 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행없음 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행중 <input type="checkbox"/> 사망 <input type="checkbox"/> 추적관찰 실패	<input type="checkbox"/> 이상반응 회복, 후유증 없음 <input type="checkbox"/> 이상반응 회복, 후유증 있음 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행없음 <input type="checkbox"/> 이상반응 지속, 치료 진행중 <input type="checkbox"/> 사망 <input type="checkbox"/> 추적관찰 실패
* 이상반응이 지속되는 경우 소실일에 “—”로 표기 하십시오.			
본인은 본 대상자에게 발생한 모든 이상반응을 확인하였습니다.			
시험자 서명 _____	날짜 <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> yyyy/mm/dd		

추가 이상반응 페이지 있음

Protocol No.	인체적용 시험종료	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1		S <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	R <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	34

## 인체적용시험 종료



Protocol No.	인체적용 시험종료	Screening No.	Random No.	Initials	Page
UGBE-1		S <input type="text"/>	R <input type="text"/>	<input type="text"/>	35

### Study Termination

대상자가 시험계획에 따라 시험이 끝까지 완료되었습니까?	
<input type="checkbox"/> Yes	완료일: <input type="text"/> 년 YYYY <input type="text"/> 월 MM <input type="text"/> 일 DD
<input type="checkbox"/> No <small>☞ 아래에 자세히 기재 하십시오.</small>	
➢ 중도탈락일:	<input type="text"/> 년 YYYY <input type="text"/> 월 MM <input type="text"/> 일 DD
➢ 중도탈락 이유	
<input type="checkbox"/> 대상자 선정기준/제외기준 위반	<input type="checkbox"/> 추적조사 실패
<input type="checkbox"/> 이상반응/병발질환	<input type="checkbox"/> 행정상 사유
<input type="checkbox"/> 효과부족	<input type="checkbox"/> 사망
<input type="checkbox"/> 치료거부/동의철회	<input type="checkbox"/> 기타
<input type="checkbox"/> 인체적용시험계획서위반	사유 _____

이중눈가림 해제 여부	<input type="checkbox"/> NA
<input type="checkbox"/> No	
<input type="checkbox"/> Yes <small>☞ 아래에 자세히 기재 하십시오</small>	
이중 눈가림 해제 날짜	<input type="text"/> 년 YYYY <input type="text"/> 월 MM <input type="text"/> 일 DD
이중 눈가림 해제 사유	_____
<small>☞ "Yes"이 경우 이중눈가림 해제 절차에 따라 해제하였고, "Random Code Break Logs"를 기재하여야 합니다.</small>	

인체적용시험책임자 소견	
본인은 본 대상자에 대한 해당검사를 빠짐없이 실시하고 세심히 관찰하였으며, 본 증례기록서에 기록된 모든정보가 정확함을 확인합니다.	
인체적용시험 책임자 서명	_____
서명일	<input type="text"/> 년 YYYY <input type="text"/> 월 MM <input type="text"/> 일 DD

(IRB 결과 통지서)



결과통지서

Version 1.0

결과통지서

2015년 03월 20일에 접수된 연구계획서에 대하여 세명대학교부속제천한방병원 기관윤리심의위원회에서 심의하여 다음과 같이 결정하였음을 통지합니다.

연구과제명	알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자에서 "UGBE"의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험			
연구책임자	성명	김 형 준	소속	세명대학교
	직위	교 수		

심의대상	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서(신규)		<input type="checkbox"/> 중대한 이상반응		
	<input type="checkbox"/> 연구계획서(시정/보완)		<input type="checkbox"/> 위반/이탈사례		
	<input type="checkbox"/> 연구계획변경		<input type="checkbox"/> 연구(조기)종료/결과보고		
	<input type="checkbox"/> 지속심의/중간보고		<input type="checkbox"/> 기타 :		
심의일자	2015년 04월 07일		심의장소	세미나실	
심의종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정식심사	<input type="checkbox"/> 신속심사	<input type="checkbox"/> 지속심사	<input type="checkbox"/> 심서면제	
심의결과	<input type="checkbox"/> 승인	<input checked="" type="checkbox"/> 시정승인	<input type="checkbox"/> 보완	<input type="checkbox"/> 반려	<input type="checkbox"/> 중지/보류
승인일자	2015년 4월14일	연구 승인기간	IRB 승인일로부터 12개월		
승인번호	2015-03-01		관련근거	회의록	
심의된 서류	<input checked="" type="checkbox"/> 연구심의 신청서		<input type="checkbox"/> 심의면제 신청서		
	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서 (요약 포함)		<input type="checkbox"/> 서면동의면제 자가정검표		
	<input checked="" type="checkbox"/> 연구대상자 동의서		<input type="checkbox"/> 대상자 동의면제 사유서		
	<input checked="" type="checkbox"/> 연구대상자 설명문		<input type="checkbox"/> 식약처 또는 주관연구기관 승인서		
	<input checked="" type="checkbox"/> 중재기록서		<input type="checkbox"/> 제조(수입)품목 허가증 사본		
	<input checked="" type="checkbox"/> 임상시험자 자료집		<input type="checkbox"/> 연구계획 변경신청서		
	<input checked="" type="checkbox"/> 이해상충서약서 (연구자)		<input type="checkbox"/> 지속심사 신청서		
	<input checked="" type="checkbox"/> 연구책임자 CV		<input type="checkbox"/> 이상반응 보고서		
	<input type="checkbox"/> 연구윤리교육 이수증 (2년 이내)		<input type="checkbox"/> (조기)종료보고서		
	<input checked="" type="checkbox"/> 연구대상자 보상규약		<input type="checkbox"/> 결과보고서		
<input checked="" type="checkbox"/> 연구대상자 모집관련 문서		<input checked="" type="checkbox"/> 기타 : 시험제품 복용지도			
심의의견	상기 과제의 연구계획서 및 제출된 서류를 정식심사에서 검토한 결과, 효과 및 안전성이 완전히 입증되지 않은 시험제품으로 인한 잠재적인 부작용이 예상되지만 대상자에게 부가되는 위험은 최소위험을 상회하지 않고, 대상자에게 기대되는 직결이익이 위험을 상회하는 것으로 판단합니다. 투표에 참여한 위원 5명 중 2명이 "승인"에 찬성, 3명이 "시정승인"에 찬성하여 본 과제의 최종 심사 의견을 "시정승인"으로 결정합니다.				



결과통지서

※ 모든 연구자들은 아래의 사항을 준수하여야 합니다.

1. 승인된 계획서에 따라 연구를 수행하여야 합니다.
2. 위원회의 승인을 받은 동의서를 사용하여야 합니다.
3. 모국어가 한국어가 아닌 연구대상자들에게는 승인된 동의서를 연구대상자의 모국어로 언중된 번역본을 사용할 것이며 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회의 승인을 받아야 합니다.
4. 연구진행에 있어 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행하여야 하며 연구대상자들의 보호를 위해 취해진 어떠한 불금상황에서의 변경도 즉각 위원회에 보고하여야 합니다.
5. 위원회에서 승인된 계획서에 따라 수행된 어떠한 연구대상자라도 사망, 입원, 심각한 질병에 대하여는 위원회에 서면으로 보고하여야 합니다.
6. 연구 또는 연구대상자의 안전에 대해 유해한 영향을 미칠 수 있는 어떠한 새로운 정보도 즉각적으로 위원회에 보고하여야 합니다.
7. 위원회의 요구가 있을 때에는 연구의 진행과 관련된 보고를 위원회에 제출하여야 합니다.
8. 위원회가 심의한 과제에 대해 조사 및 감독 차원에서 현장점검을 실시할 시 응할한 점검 절차 진행을 위해 연구자는 연구진행과 관련된 서류를 준비하고 협조하여야 합니다.
9. 연구대상자 모집공고를 사용할 시에는 사용 전에 위원회의 승인을 받아야 합니다.
10. 동의는 강제 혹은 부당한 영향이 없는 상태에서 충분한 설명에 근거하여 수행되어야 하며, 잠재적인 연구대상자에게 연구에 참여여부를 고려할 수 있도록 충분히 기회를 제공하여야 합니다.
11. 연구자와 그밖에 이해당사자는 연구계획서 승인을 광고나 홍보, 상업적 목적으로 사용할 수 없습니다.
12. 위원회의 심사결과 시정요구에 대해 모두 이행 및 충족될 경우에만 연구를 진행할 수 있습니다.
13. 위원회가 시정 및 보편을 요구한 경우 시정·보편 계획을 1개월 이내에 본 위원회에 제출하여야 합니다. 심사통지 후 6개월까지 자료를 제출하지 않으면 위원회는 해당 연구를 중지시킬 수 있습니다.
14. 시정계획은 신속성사로 진행되고 보편계획은 정식성사로 진행되며, 승인일과 승인 유효기간은 심의 결과에 따라 결정됩니다.
15. 승인기간 이후에도 연구를 지속하기 위해서는 적어도 승인 만료 2개월 전까지 연구의 진행 상황에 대하여 중간보고를 하여야 합니다.
16. 연구 종료 후 3개월 이내에 종료보고를 하여야 합니다.
17. 연구와 관련된 기록은 연구가 종료된 시점을 기준으로 최소 3년간 보관하여야 합니다.

세명대학교부속제천한방병원  
기관윤리심의위원회



본 통지서에 기재된 사항은 세명대학교부속제천한방병원 기관윤리심의위원회에 기록된 내용이 일치함을 증명합니다.  
 본 세명대학교부속제천한방병원 기관윤리심의위원회는 생명윤리 및 안전에 관한 법률과 관련 법규를 준수합니다.  
 본 연구와 이해상충(Conflict of Interest)이 있는 직원이 있을 경우 연구의 성격에서 배제하였습니다.  
 본 통지서의 사본은 세명대학교부속제천한방병원 기관윤리심의위원회에서 보관합니다.

## (CRO와 인체적용시험기관과의 역할분담)

CRO기관에서는 프로토콜 작성 및 임상시험 진행의 관리와 결과보고서등을 전체적으로 맡아 진행하며, 궁극적으로 식약처에는 제2협동(인체적용시험기관, 세명대 한방바이오임상지원센터)에서 나온 임상시험 결과를 바탕으로 건강기능식품의 인증까지를 전체적으로 진행하는데 도움을 주는 기관입니다.

그러나 프로토콜은 전임상시험의 결과를 바탕으로 사람을 대상으로 시험을 하기위한 계획서로 임상시험을 실제적으로 직접 진행하는 인체적용시험 책임자인 2협동 김형준 교수 및 연구원들과 수개월간의 지속적인 협의 및 회의과정을 거쳐 완성하게 되었으며 CRO가 혼자 힘으로 단독작성할 수는 없는 것입니다.

또한 이렇게 작성된 프로토콜 및 CRF를 바탕으로 김형준 교수는 2015년 4월 7일 개최된 임상시험 윤리위원회인 IRB 심의를 받았으며, 결과로 나온 IRB의 시정승인 내용을 모두 수정하여 최종 IRB심사를 마쳤습니다. 그 이후 4월 21일 간기능 개시미팅을 세명대학교 부속 한방병원에서 개최하고 뒤이어 임상시험 보험을 가입함으로 본격적인 임상시험을 준비하였습니다. 2015년 5월부터는 임상시험 피험자를 병원에 등록하여 2015년 6월 8일 현재 17명의 임상시험 조건에 합격한 등록자를 모집하여 혈액검사시행 및 시험약을 교부하였고 피험자들에 대한 교통비용을 지급준비중에 있습니다.

과제 선정시 연구계획서에 제출한 연구과제 초기의 계획서에는 제2협동의 임상시험 계획이 총 60명의 간기능 저하 임상시험 피험자를 임상시험 준비가 필요한 2차년도와 임상시험이 본격화된 3차년도에 각각 20명과 40명을 모집하여 진행할 계획이었으나, 실제로 2차년도의 연구진행과정에서 식약처와 협의한 결과 74명으로 피험자를 늘리라는 권고를 받아 인체적용시험의 진행이 시간과 비용상으로 조금더 촉박해진 상황이 되었습니다. 이에 2협동의 임상시험진행은 1차년도(2015년 7월 14일까지)에 총 24명, 2차년도에 50명의 피험자 모집을 할 수 있도록 피험자수를 증가시키는 방향으로 계획을 수정하여 연구를 진행해 나가고 있으며 임상시험 비용도 이에 맞추어 적절히 사용되도록 계획하고 있다.

1) 원료 및 기능성분(또는 지표성분)에 관한 자료

지표물질 : 초음파 인삼열매 엑스의 주성분으로 표준품 확보 등 고려하여 지표물질을 Re, Rg2, Rg3, Rh1을 지표물질로 한다.

규격 : 초음파 인삼열매 엑스의 주성분인 Re, Rg2, Rg3, Rh1의 합이 5%-10%(W/W) 또는 50mg/g-100mg/g 으로 한다.

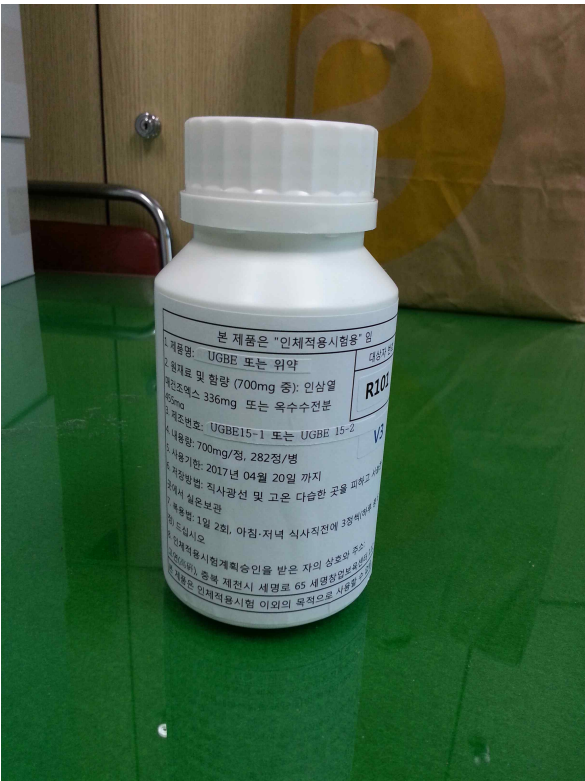
**초음파 처리 인삼열매 엑스(시험약)의 인삼사포닌 함량**

	(%,w/w)
Ginsenosides	인삼열매초음파열추출
Rb1	0.226±0.016
Rb2	0.919±0.003
Rc	0.183±0.002
Rd	1.240±0.017
Re	1.771±0.096
Rf	0.090±0.001
Rg1	0.161±0.023
Rg2	2.264±0.016
20S-Rg3	1.241±0.006
20R-Rg3	0.728±0.004
Rg5(E)	2.115±0.012
Rg6	0.586±0.019
Rh1	3.030±0.021
Rh2	0.175±0.004
Rh4	0.154±0.001
Rg5(Z)+ Rk1	0.859±0.008
Rk3	0.097±0.001
F1	0.038±0.007
F4	2.436±0.008
Total ginsenosides <sup>a</sup>	18.373
Diol/Triol <sup>b)</sup>	0.386

2) 시험약 라벨

본 제품은 “인체적용시험용” 임	
1. 제품명: UGBE 또는 위약	대상자 번호
2. 원재료 및 함량(700 mg 중): 인삼열매건조엑스 336 mg 또는 옥수수전분 455 mg	
3. 제조번호: UGBE15-1 또는 UGBE15-2	
4. 내용량: 700 mg/정, 282 정/병	
5. 사용기한: 2017년 04월 20일 까지	
6. 저장방법: 직사광선 및 고온 다습한 곳을 피하고 서늘한 곳에서 실온 보관	
7. 복용법: <u>1일 2회, 아침·저녁 식사직전에 3정씩 (하루 총 6정) 드십시오.</u>	
8. 인체적용시험계획승인을 받은 자의 상호와 주소: 고연(高研), 충북 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112	
본 제품은 인체적용시험 이외의 목적으로 사용할 수 없음	

3) 시험약 사진



#### 4) 시험약 복용방법 및 주의사항

##### ① 시험제품 복용방법 및 규격에 관한 내용

- 식사 직전에 복용
- 1회 3정 씩 1일 2회 복용(시험제품 1정 당 700mg 함유 - 초음파 인삼열매 엑스 333mg + 부형제 367mg, 대조제품 1정 당 부형제 700mg 함유)
- 포장의 단위 : Bottle이고, 하루 6정씩, 6주 분량, 총 282정(252정;6주+ 30정;5일 여유분)의 시험제품 또는 대조제품이 들어있다.)
- 제품의 보관 및 관리 방법 : 냉장 보관

##### ② 시험제품에 대한 주의사항 및 부작용에 대한 자료

- 인삼 및 홍삼 제품에 부작용이 있는 사람(피부 발진, 승열 부작용 등)
- 당뇨 및 혈전 처방약을 복용하고 있는 사람은 제외

[초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 인체적용 시험]

인체적용시험 제 목	알코올 섭취로 손상된 경증 간 기능 저하 대상자에서 "UGBE"의 간 기능 개선 효과 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인체적용시험 책임자	세명대학교부속제천한방병원 김형준 교수
인체적용시험 의뢰자	고연(高研)

1. 연구 진행 현황

IRB 심의 현황

- 1) IRB 심의 의뢰: 2015년 03월 20일  
IRB 심의 결과 통보일: 2015년 04월 14일(시정승인)
- 2) IRB 시정 계획 의뢰: 2015년 04월 20일  
IRB 시정 승인 통보일: 2015년 04월 30일(승인)
  - 변경사유: 인체적용시험계획서(V1.0->1.1)  
IRB 시정승인에 따른 변경 및 추가  
인체적용시험실시기관(V1.0->1.1)  
공동연구자 추가 및 관리약사 삭제  
대상자 모집공고문 (V1.0->1.1)  
오기수정  
동의서(V1.0->1.1)  
계획서 변경에 따른 음주조절에 대한 내용 추가  
증례기록서(V1.0->1.1)  
계획서 변경에 따른 증례기록서 양식 변경
- 3) IRB 1차 시험계획 변경: 2015년 11월 26일  
IRB 심의 결과 통보일: 2015년 12월 07일(승인)
  - 변경사유: 인체적용시험 실시기관(V1.0->V1.1)  
승인 받은 대상자 모집공고문을 원내와 원외에 게시하고자 함.
- 4) IRB 2차 시험계획 변경: 2016년 02월 18일  
IRB 심의 결과 통보일: 2016년 02월 24일(승인)
  - 변경사유: 인체적용시험 실시기관(V1.1->V1.2)  
연구간호사 이윤숙-> 권태선 변경
- 5) IRB 3차 시험계획 변경: 2016년 03월 17일  
IRB 심의 결과 통보일: 2016년 03월 21일(승인)
  - 변경사유: 동의서(V1.1->V1.2)  
연구대상자 정보에서 취약한 연구대상자 추가



**IP(Investigational Product) 현황**

연구 계약일: 2014년 10월 31일

약물 입고일: 2015년 04월 21일

개시마팅: 2015년 04월 21일

연구개시일 (첫 대상자 등록일): 2015년 05월 21일

**2. 시험대상자 등록현황(2016-07-29 기준)**

Planned	ICF	Screening	Scr. out	Enrollment	Ongoing	Drop out	Study end
74	205	205	131	74	11	4	59

**3. Drop-out 관련**

Subject No.	Drop-out Date	Reason for Drop-out
R130	2015.08.26	동의철회
R143	2016.03.02	동의철회
R150	2016.05.04	동의철회
R165	2016.06.23	동의철회

**4. 인체적용시험 관련 문서**

Document	Version	Effective date	Others
Protocol	1.1	2015-04-30	-
Informed Consent Form	1.1	2015-04-30	-
Informed Consent Form	1.2	2016-03-21	-
Case Report Form	1.1	2015-04-30	-
Investigator's Brochure	1.0	2015-04-14	-

**5. 향후 일정(예정)**

Last Patient Visit: 9월 중순

Close Out Visit(COV), Data collection: 10월 초

Data entry, Query, DCF(Data Clarification Form), STAT: 10월 중순

임상시험 결과보고서(CSR) 초안: 11월 중순~11월 말

**6. 확인된 사항**

1) window period 관련

- R106 V4 방문일이 2015-08-19로 window period 1일을 지나서 방문함.
- R158 V3 방문일이 2016-05-28로 window period 7일을 지나서 방문함.
- R158 V4 방문일이 2016-07-07로 window period 7일을 지나서 방문함.

→ 이는 본 인체적용시험계획서 Window period 위반으로 Deviation log를 남기고 연구 진행 하기로 함.

\* 최종보고서 제본일인 2016년 10월 25일 현재 최종보고서에서 보고한바와 같이 11월 중순 인체적용시험 결과 데이터가 CRO로부터 보고되기 때문에 미기재됨을 양해바랍니다.

[초음파 처리 인삼열매 조성물의 안전성(독성)시험[단회독성, 4주 DRF, 유전독성 (염색체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험), 13주 반복독성시험 및 4주 회복시험]

## 가. 초음파처리 인삼열매 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

### 요 약

본 시험은 시험물질인 초음파처리 인삼열매 추출물을 Sprague-Dawley계 암수 6주령 랫드에 단회 경구투여시 나타나는 독성을 평가하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

군구성은 시험물질 5,000 mg/kg투여용량군 및 대조군 (주사용수)으로 구성하였고, 암수 각각 5 마리씩 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다.

암수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

암수 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1일 및 2일에 시험물질색변이관찰되었으나, 투여 후 4일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

본 시험의 조건 하에서 초음파처리 인삼열매 추출물을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

## 1. 시험실시의 개요

### 1.1 시험목적

암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 초음파처리 인삼열매 추출물을 단회 경구투여 시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시하였다.

### 1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practices를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2013-40호 (2013년4월5일)

### 1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시하였다.

- “의약품등의독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2013-121호 (2013년4월5일)

### 1.4 동물윤리

본 시험은 동물보호법 (제정 1991년5월31일 법률제4379호, 일부개정 2013년 8월13일 법률 제12051호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다(승인번호: 140088).

## 1.5 수의학적 관리

본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

## 1.6 시험의뢰자

명칭            고연 (高研)  
주소            우390-711 충북 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112  
TEL            +82-43-649-1433            FAX            +82-43-649-1759

## 1.7 시험기관

명칭            (주)바이오톡스텍  
주소            우363-883 충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 53  
TEL            + 82-43-210-7777            FAX            + 82-43-210-7778

## 1.8 시험책임자

성명            서동석  
소속            일반독성1부

## 1.9 시험일정

시험개시일       2014년2월12일  
동물입수일       2014년2월13일  
군분리일         2014년2월19일  
실험개시일       2014년2월20일  
투여일           2014년2월20일  
부검일           2014년3월6일  
실험종료일       2014년3월7일  
시험종료일       2014년00월00일

## 1.10 시험담당자

검역            이진희  
시험물질보관    김은애  
병리            장호송  
통계            이진완  
시험물질의 조제  유길호  
투여            김수지  
관찰 및 측정    김수지, 최혜인, 주수정, 박태욱, 서동석  
부검            최수정, 한영환

## 1.11 기록 및 자료의 보관

### 1.11.1 보관기간 시험종료 후 5년

이후의 보관은 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

### 1.11.2 보관장소

명칭 (주)바이오톡스텍 자료보관실  
주소 우363-883 충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 53

### 1.11.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 최종보고서, 기초자료 및 그 외 기록문서, 통신연락문서

## 2. 시험재료 및 방법

### 2.1 시험물질

#### 2.1.1 물질명

초음파처리 인삼열매 추출물 (Ultrasonication processed ginseng berry extract)

#### 2.1.2 Lot No. UGBE(001)

#### 2.1.3 성상 갈색분말

#### 2.1.4 성분 Ginsenosides

#### 2.1.5 친화성 Hydrophilic

#### 2.1.6 제조일 2014년 1월 22일

#### 2.1.7 유효기간 2016년 1월 22일(제조 후 2년)

#### 2.1.8 보관조건 냉장(4.5~6.5°C), 제습

#### 2.1.9 취급시 주의사항 인습성

#### 2.1.10 제공자

명칭 고연(高研)  
주소 우 390-711 충북 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112

#### 2.1.11 수령일 2014년 1월 27일

#### 2.1.12 잔여시험물질의 처리 시험종료 후 반환

## 2.2 부형제

### 2.2.1 주사용수

### 2.2.2 DBA 3006

### 2.2.3 실온

### 2.2.4 Choongwae Rharma Corp., Korea

## 2.3 시험물질의 조제 및 조제물의 분석

### 2.3.1 시험물질의 조제

시험물질을 전자저울 (CP323S, Sartorius, Germany)로 칭량하여 유리조제병에 넣고, 부형제를 일부 넣어 교반기로 현탁시키고, 부형제를 가하여 규정농도 (500mg/mL)로 조제하였다. 조제물은 투여당일 조제하였다.

### 2.3.2 조제물의 분석

조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

## 2.4 시험계

### 2.4.1 종 및 계통 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF

### 2.4.2 생산자 및 구입처 ORIENTBIO INC., Korea

### 2.4.3 종 및 계통의 선택이유

Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

### 2.4.4 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 12 마리, 5주령, 111.5 ~ 127.4 g / 암컷, 12 마리, 5주령, 114.2 ~ 125.5 g

### 2.4.5 투여시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 10 마리, 6주령, 150.0 ~ 164.1 g / 암컷, 10 마리, 6주령, 129.7 ~ 145.1 g

### 2.4.6 검역·순화

반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울 (CP3202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중변화 (Table 5)를 확인하여 모든 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

### 2.4.7 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다.

관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다.

#### 2.4.8 군분리

군분리는 모든 동물에 대하여 순화종료일 (군분리일)에 실시하였다. 군분리일의 평균체중에 가까운 암수 각 10마리를 선발하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 2군, 군당 5마리로 군분리하였다.

#### 2.4.9 잔여동물의 처리

잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰다.

### 2.5 사육환경조건

#### 2.5.1 동물실번호 B332

#### 2.5.2 사육상자의 종류, 크기

스테인레스 철망사육상자, 260W×350D×210H (mm)

#### 2.5.3 사육상자당 수용동물 수 3 마리 (검역·순화기간) / 1 마리 (관찰기간)

#### 2.5.4 온도 21.2 ~ 23.1°C

#### 2.5.5 상대습도 46.9 ~ 62.1%

#### 2.5.6 환기횟수 10 ~ 15회/시간

#### 2.5.7 명암주기 (조명시간) 12시간/일 (오전 7시부터 오후 7시)

#### 2.5.8 조도 150 ~ 300 Lux

#### 2.5.9 사육기재의 교환 및 세척

사육상자 및 급이기는 1회/2주 빈도로 교환하였다.

사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

### 2.6 사료

#### 2.6.1 종류

실험동물용 고품사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)

#### 2.6.2 Lot No. 2918C-100813MA, 2918C-120113MA

#### 2.6.3 제조자 Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.

#### 2.6.4 급이방법

급이기에 고품사료를 넣어 자유 섭취시켰다.

### 2.6.5 사료의 분석 및 확인

사료의 분석은 Harlan Laboratories, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인하였다.

## 2.7 음수

### 2.7.1 종류 및 급수방법

청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여 자유 섭취시켰다.

### 2.7.2 음수의 분석 및 확인

음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충북 청원군 오송읍 오송생명1로 184)에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」(환경부령 제439호, 2011년12월30일, 일부개정)의 전 항목에 대하여 실시하였다. 모든 항목에 대한 검사는 1회/년, 미생물 검사는 1회/월 실시하여, 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인하였다.

## 2.8 투여

### 2.8.1 투여경로

경구투여

### 2.8.2 투여경로의 선택이유

시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.

### 2.8.3 투여방법 및 투여횟수

투여액량은 10 mL/kg으로 하였고, 개체별 투여액량은 절식 후 (투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (3 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다.

## 2.9 군구성 및 투여용량

### 2.9.1 군구성

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (ml/Kg)	동물수(개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	5(1101~1105)	5(2101~2105)
G2 시험물질 투여군	5,000	10	5(1201~1205)	5(2201~2205)

### 2.9.2 투여용량설정

시험물질의 임상적용예정용량은 1,000 mg/human/day (1일, 성인 60 kg 기준)

16.7+ mg/kg)이다. 본시험의 예비시험 (Biotoxtech Study No.: B14017P)으로 5,000 mg/10 mL/kg을 암수 각 1 마리에 단회 경구투여한 결과 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서, 본시험의 투여용량은 5,000 mg/kg의 단일 시험물질 투여군을 설정하였다. 대조군에 는시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

## 2.10 관찰 및 검사

2.10.1 일반증상 관찰 투여당일 (0일)에는 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태 (독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 1일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

### 2.10.2 체중측정

체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7일 및 14일 (부검일)에 측정하였다.

### 2.10.3 부검

관찰기간 종료 후, 모든 동물에 대해서 CO<sub>2</sub>가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다.

### 2.10.4 조직병리학적 검사

부검 시 육안소견이 관찰되지 않아, 조직병리학적 검사를 실시하지 않았다.

## 2.11 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중 결과는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. Folded-F 검정법을 사용하여 등분산성을 검정한 결과 (유의수준: 0.05), 등분산이 인정되어 Student t-test를 실시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 사망유무

(Table 1)

관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군 및 대조군에서 사망례는 없었다.

### 3.2 일반증상

(Table 2, Table 6)

암수 5,000 mg/kg투여군에서 시험물질색변 (compound colored stool)이 투여 후 1및 2일에 수컷 4례 및 암컷 전례에서 관찰되었고, 투여 후 3일에는 암컷 2례에서만 관찰되었으나, 투여 후 4일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다.

이러한 증상은 시험물질 투여에 기인한 일시적인 변화로 판단된다.

### 3.3 체중변화

(Figure 1, Figure 2, Table 3, Table 7)



관찰기간 동안, 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.

### 3.4 육안적 부검소견

(Table 4, Table 8)

부검시, 암수 5,000 mg/kg 투여군 및 대조군에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

## 4. 결론

본 시험의 조건 하에서 초음파처리 인삼열매 추출물을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

## FIGURES

Figure 1. Body Weights in Male SD Rats

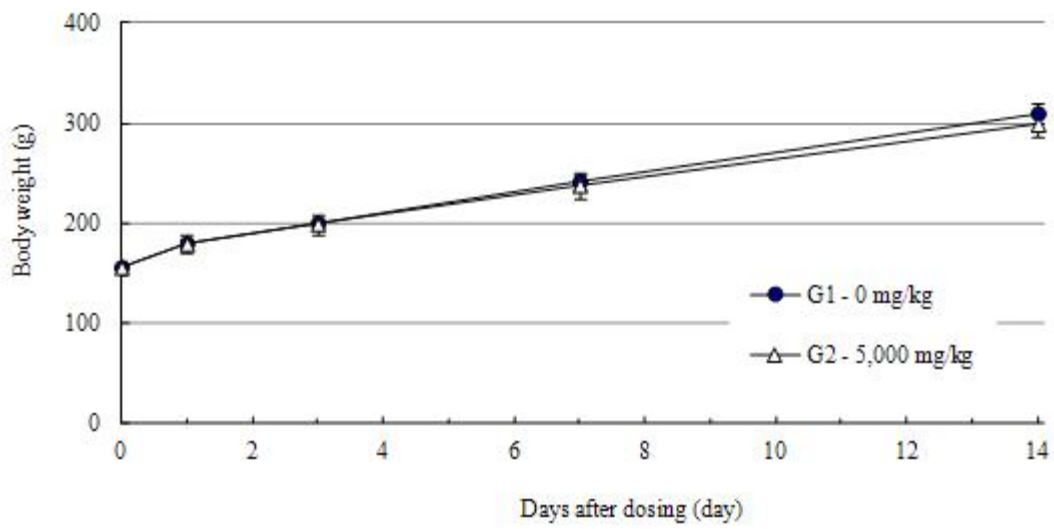
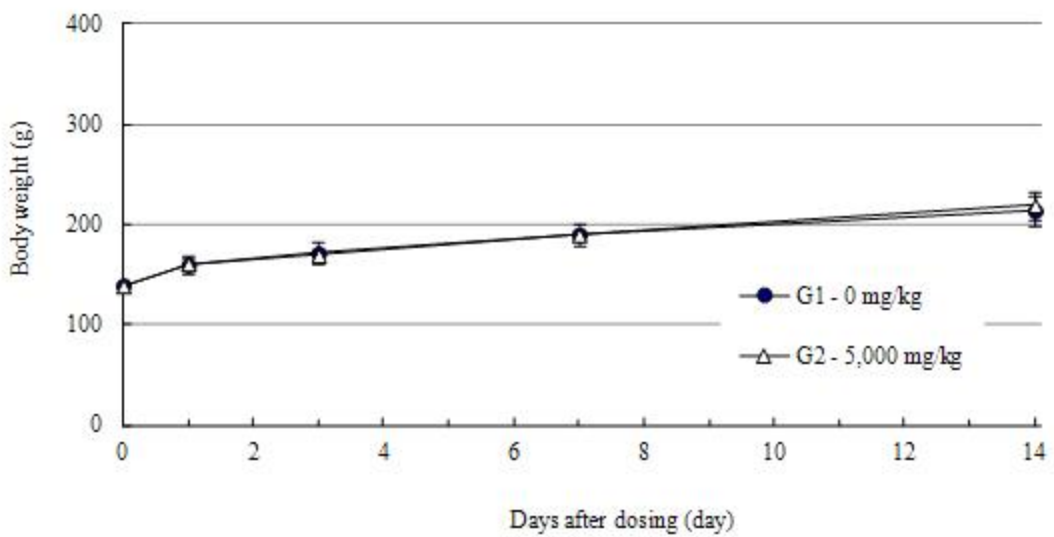


Figure 2. Body Weights in Female SD Rats



## SUMMARY TABLES

Table 1. Summary of Mortality

Sex	Group/ Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after dosing														Mortality	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G2 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	G2 5,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Table 2. Summary of Clinical Signs

Sex	Group/ Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Hours(Day 0) after dosing				
				0.5	1	2	4	6
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA	5	5	5	5	5

Sex	Group/ Dose (mg/kg)	No. of animals	Clinical signs	Days after Dosing													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA Compound-colored stool	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	5	NOA Compound-colored stool	5	5	2	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

NOA: No Observable Abnormality Clinical

Table 3. Mean Body Weights

Sex	Group/Dose (mg/kg)		Days after dosing					Gain 0~14
			0	1	3	7	14	
Male	G1 0	Mean	156.7	180.2	200.7	242.2	310.3	153.7
		S.D.	4.6	4.7	4.2	7.1	10.6	7.9
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	Mean	156.5	180.1	199.8	238.4	299.4	143.0
		S.D.	6.7	9.1	9.8	13.0	13.6	8.9
		N	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	Mean	139.2	159.5	171.4	189.9	214.0	74.8
		S.D.	5.5	9.1	10.8	11.2	14.1	10.6
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 5,000	Mean	138.9	160.8	169.6	189.8	219.3	80.3
		S.D.	4.2	6.1	4.9	4.8	14.2	11.6
		N	5	5	5	5	5	5

Table 4. Summary of Necropsy Findings

Sex	Male		Female	
Group/ Dose(mg/kg)	G1 0	G2 5,000	G1 0	G2 5,000
No.of animals	5	5	5	5
Unremarkable findings	5	5	5	5
No.of examined	5	5	5	5

External surface and all organs in body cavity were unremarkable.

### INDIVIDUAL ANIMAL DATA

Table 5. Individual Body Weights during an Acclimation Period

(g)							
Male				Female			
Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group assignment	Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group assignment
1101	1010	111.5	176.9	2101	2006	115.3	164.2
1102	1002	116.5	177.7	2102	2012	117.8	149.0
1103	1006	116.6	177.3	2103	2005	123.8	164.9
1105	1004	118.1	185.5	2104	2008	120.5	157.9
1201	1003	123.8	181.2	2105	2010	125.5	158.5
1202	1011	114.6	173.2	2201	2007	122.2	154.7
1203	1001	119.1	178.5	2202	2011	114.2	157.2
1204	1007	127.4	187.1	2203	2003	121.1	158.4
1205	1005	120.3	175.5	2204	2004	115.3	155.4
	1008	123.4	185.1	2205	2002	123.7	162.2
	1009	114.8	170.2		2001	119.7	165.9
	1012	123.2	190.7		2009	119.0	145.0
	Mean	119.1	179.9		Mean	119.8	157.8
	S.D	4.7	6.1		S.D.	3.7	6.3
	N	12	12		N	12	12

Table 6. Individual Clinical Signs

Sex : Male

Group/ Dose (mg/Kg)	Animal ID	Clinical Signs	Hours (Day 0) after dosing				
			0.5	1	2	4	6
G1 0	1101		-	-	-	-	-
	1102		-	-	-	-	-
	1103		-	-	-	-	-
	1104		-	-	-	-	-
	1105		-	-	-	-	-
G2 5,000	1201		-	-	-	-	-
	1202		-	-	-	-	-
	1203		-	-	-	-	-
	1204		-	-	-	-	-
	1205		-	-	-	-	-

Group/ Dose (mg/Kg)	Animal ID	Clinical Signs	Days after dosing													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	1101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 5,000	1201	Compoud-colored stool	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1202	Compoud-colored stool	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1203	Compoud-colored stool	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1204		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1205	Compoud-colored stool	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No observable abnormality+ : Observable abnormality-

Table 7. Individual Body Weights

Sex : Male								(g)
Group/ Dose(mg/kg)	Animal ID	Days after dosing					Gain	
		0	1	3	7	14	0~14	
G1 0	1101	154.2	178.7	199.3	242.0	321.3	158.1	
	1102	153.3	173.8	195.6	230.9	294.1	140.8	
	1103	152.6	179.0	200.5	243.0	307.4	154.8	
	1104	160.7	185.5	207.1	250.2	322.4	161.7	
	1105	162.5	184.0	201.2	245.1	315.5	153.0	
	<b>Mean</b>		<b>156.7</b>	<b>180.2</b>	<b>200.7</b>	<b>242.2</b>	<b>310.3</b>	<b>153.7</b>
	<b>S.D.</b>		<b>4.6</b>	<b>4.7</b>	<b>4.2</b>	<b>7.1</b>	<b>10.6</b>	<b>7.9</b>
<b>N</b>		<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 5,000	1201	150.0	172.6	193.7	230.8	288.3	138.3	
	1202	155.3	178.1	198.6	241.5	309.1	153.8	
	1203	164.1	190.1	211.1	247.5	306.2	142.1	
	1204	150.3	170.6	187.5	220.1	281.5	131.2	
	1205	162.6	189.1	207.9	252.1	321.0	149.4	
	<b>Mean</b>		<b>156.5</b>	<b>180.1</b>	<b>199.8</b>	<b>238.4</b>	<b>299.4</b>	<b>143.0</b>
	<b>S.D.</b>		<b>6.7</b>	<b>9.1</b>	<b>9.8</b>	<b>13.0</b>	<b>13.6</b>	<b>8.9</b>
<b>N</b>		<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
Sex : Female								(g)
Group/ Dose(mg/kg)	Animal ID	Days after dosing					Gain	
		0	1	3	7	14	0~14	
G1 0	2101	139.2	166.3	184.7	199.4	219.3	80.1	
	2102	129.7	146.5	155.8	173.3	195.4	65.7	
	2103	143.0	168.6	177.6	200.4	233.4	90.4	
	2104	141.9	154.2	169.1	191.6	214.7	72.8	
	2105	142.3	161.8	169.6	185.0	207.4	65.1	
	<b>Mean</b>		<b>139.2</b>	<b>159.5</b>	<b>171.4</b>	<b>189.9</b>	<b>214.0</b>	<b>74.8</b>
	<b>S.D.</b>		<b>5.5</b>	<b>9.1</b>	<b>10.8</b>	<b>11.2</b>	<b>14.1</b>	<b>10.6</b>
<b>N</b>		<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 5,000	2201	140.3	157.8	168.5	186.0	215.2	74.9	
	2202	137.6	162.7	170.3	188.3	205.8	68.2	
	2203	137.9	159.7	169.2	191.6	213.6	75.7	
	2204	133.8	153.9	163.1	185.6	218.5	84.7	
	2205	145.1	170.1	176.9	197.3	243.3	98.2	
	<b>Mean</b>		<b>138.9</b>	<b>160.8</b>	<b>169.6</b>	<b>189.8</b>	<b>219.3</b>	<b>80.3</b>
	<b>S.D.</b>		<b>4.2</b>	<b>6.1</b>	<b>4.9</b>	<b>4.8</b>	<b>14.2</b>	<b>11.6</b>
<b>N</b>		<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 8. Individual Necropsy Findings

Sex : Male

Group/ Dose(mg/kg)	Animal ID	Organ*	Necropsy findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	1101	All	Unremarkable findings	S	14
	1102	All	Unremarkable findings	S	14
	1103	All	Unremarkable findings	S	14
	1104	All	Unremarkable findings	S	14
	1105	All	Unremarkable findings	S	14
G2 5,000	1201	All	Unremarkable findings	S	14
	1202	All	Unremarkable findings	S	14
	1203	All	Unremarkable findings	S	14
	1204	All	Unremarkable findings	S	14
	1205	All	Unremarkable findings	S	14

\*External surface and organs in body cavity S :scheduled

Sex : Female

Group/ Dose(mg/kg)	Animal ID	Organ*	Necropsy findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	2101	All	Unremarkable findings	S	14
	2102	All	Unremarkable findings	S	14
	2103	All	Unremarkable findings	S	14
	2104	All	Unremarkable findings	S	14
	2105	All	Unremarkable findings	S	14
G2 5,000	2201	All	Unremarkable findings	S	14
	2202	All	Unremarkable findings	S	14
	2203	All	Unremarkable findings	S	14
	2204	All	Unremarkable findings	S	14
	2205	All	Unremarkable findings	S	14

\*External surface and organs in body cavity S :scheduled



## Results of the Preliminary Study

1. 시험번호: B14017P

### 2. 시험목적

본시험에서의 투여용량을 결정하기 위하여 non-GLP 시험으로 수행하였다.

### 3. 시험내용

3.1 동물종, 계통, 성별, 주령 및 마리수

랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), 암수, 6 주령, 각 1 마리

3.2 투여용량

5,000 mg/10 mL/kg

3.3 투여방법

투여액량은 10 mL/kg으로 하였고, 개체별 투여액량은 절식 후 (투여 당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 위내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다.

### 4. 시험결과

4.1 사망례: 사망례는 관찰되지 않았다.

4.2 일반증상: 투여 후 1일에 시험물질색변이 암수에서 관찰되었다.

4.3 체중변화

Dose (mg/kg)	Sex	Animal ID	Days after dosing		
			0	1	3
5,000	Male	1001	160.4	181.2	204.3
	Female	2001	142.4	150.3	173.7

### 5. 결론

5,000 mg/kg을 투여한 결과, 시험물질 투여에 기인한 사망례가 관찰되지 않아 본시험 투여용량은 5,000 mg/kg으로 설정하였다.

## Results of the Preliminary Study

1. 시험번호 : B14017P

## 2. 시험목적

본시험에서의 투여용량을 결정하기 위하여 non-GLP 시험으로 수행하였다.

## 3. 시험내용

### 3.1 동물종, 계통, 성별, 주령 및 마리수

랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), 암수, 6 주령, 각 1 마리

### 3.2 투여용량

5,000 mg/10 mL/kg

### 3.3 투여방법

투여액량은 10 mL/kg으로 하였고, 개체별 투여액량은 절식 후 (투여 당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 위내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 음수는 자유섭취시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다.

## 4. 시험결과

4.1 사망례: 사망례는 관찰되지 않았다.

4.2 일반증상: 투여 후 1일에 시험물질색변이 암수에서 관찰되었다.

### 4.3 체중변화

Dose (mg/kg)	Sex	Animal ID	Days after dosing		
			0	1	3
5,000	Male	1001	160.4	181.2	204.3
	Female	2001	142.4	150.3	173.7

## 5. 결론

5,000 mg/kg을 투여한 결과, 시험물질 투여에 기인한 사망례가 관찰되지 않아 본시험 투여용량은 5,000 mg/kg으로 설정하였다.

## 나. 초음파처리 인삼열매 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 4주 반복 경구투여 용량 결정시험

### 요 약

본 시험은 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 초음파처리 인삼열매 추출물을 4주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였다.

시험물질을 0 (주사용수), 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day으로 군당 암수 각 5 마리에 4주간 반복 경구투여하였다.

관찰기간 동안 일반증상 관찰, 체중 및 사료섭취량을 측정하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 부검시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

관찰기간 동안, 암수 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 일반증상의 이상 및 사망례는 관찰되지 않았다.

체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검소견에 있어서, 암수 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사에서도 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질투여에 기인한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다.

이상으로, 본 시험조건하에서 초음파처리 인삼열매 추출물을 4주간 반복 경구 투여한 결과, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 독성학적으로 의미있는 변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 13주 반복 경구투여 독성시험에서는 5,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비 2.5로 하여 2,000 및 800mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하는 것이 합당할 것으로 판단한다.

## 1. 시험실시의 개요

### 1.1 시험목적

암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 초음파처리 인삼열매 추출물을 4주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였다.

### 1.2 Good Laboratory Practice Regulations

Non-GLP

### 1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 참고하여 실시하였다.

- “의약품등의독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2013-121호 (2013년4월5일)

### 1.4 동물윤리

본 시험은 동물보호법 (제정 1991년5월31일 법률 제4379호, 일부개정 2013년 8월13일 법률 제12051호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호: 140089).

### 1.5 수의학적 관리

본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

### 1.6 시험의뢰자

명칭            고연 (高研)  
주소            우390-711 충북 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112  
TEL            +82-43-649-1433            FAX            +82-43-649-1759

### 1.7 시험기관

명칭            (주)바이오톡스텍  
주소            우363-883 충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 53  
TEL            + 82-43-210-7777            FAX            + 82-43-210-7778

### 1.8 시험책임자

### 1.9 시험일정

시험개시일	2014년2월12일
동물입수일	2014년2월13일
군분리일	2014년2월19일
실험개시일	2014년2월20일
투여기간	2014년2월20일 ~ 3월19일
부검일	2014년3월20일
실험종료일	2014년4월4일
시험종료일	2014년00월00일



2.1.8 보관조건 냉장 (3.8 ~ 6.5°C), 제습

2.1.9 취급시 주의사항 인습성

2.1.10 제공자

명칭 고연 (高研)

주소 우390-711 충북 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112

2.1.11 수령일 2014년1월27일

2.1.12 잔여시험물질의 처리 시험 종료 후 반환

## 2.2 부형제

2.2.1 명칭 주사용수

2.2.2 Lot No. DBA3006

2.2.3 보관조건 실온

2.2.4 제조자 Choongwae Pharma Corp., Korea

## 2.3 시험물질의 조제 및 조제물의 분석

2.3.1 시험물질의 조제

시험물질을 전자저울 (CP323S, Sartorius, Germany)로 칭량하여 조제병에 넣고, 부형제를 일부 넣어 교반기로 현탁시키고, 부형제를 가하여 규정농도(80, 200 및 500 mg/mL)로 조제하였다. 조제물은 4주간 매일 조제하였다.

2.3.2 조제물의 분석

조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

## 2.4 시험계

2.4.1 종 및 계통 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF

2.4.2 생산자 및 구입처 ORIENTBIO INC., Korea

2.4.3 종 및 계통의 선택이유

Sprague-Dawley 랫드는 의약품 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.

2.4.4 입수시 성별, 동물수, 수령 및 체중범위

수컷, 24마리, 5주령, 119.9 ~ 144.6 g / 암컷, 24마리, 5주령, 103.3 ~ 117.3g

#### 2.4.5 투여개시시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

수컷, 20마리, 6주령, 191.6 ~ 210.0 g / 암컷, 20마리, 6주령, 137.9 ~ 157.8 g

#### 2.4.6 검역·순화

반입시 동물의 외관 검사를 실시하고, 전자저울 (CP3202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하였다. 7일간의 순화기간 중에 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

순화기간 종료일에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중변화 (Table 10)를 확인하였다

#### 2.4.7 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다.

관찰기간 중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 color 개체식별카드를 부착하였다.

#### 2.4.8 군분리

군분리는 모든 동물에 대하여 순화종료일 (군분리일)에 실시하였다. 군분리일의 평균 체중에 가까운 암수 각 20 마리를 선발하였다. 선발한 동물을 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암수 각 4군, 군당 5마리로 군분리하였다.

#### 2.4.9 잔여동물의 처리

잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰다.

### 2.5 사육환경조건

#### 2.5.1 동물실번호 B332

#### 2.5.2 사육상자의 종류, 크기 스테인레스 철망사육상자, 260W×350D×210H(mm)

#### 2.5.3 사육상자당 수용동물 수 3 마리 (검역·순화기간) / 1 마리 (관찰기간)

#### 2.5.4 온도 21.0 ~ 23.4°C

#### 2.5.5 상대습도 46.9 ~ 62.1%

#### 2.5.6 환기횟수 10 ~ 15 회/시간

#### 2.5.7 명암주기 (조명시간) 12 시간/일 (오전 7 시부터 오후 7 시)

#### 2.5.8 조도 150 ~ 300 Lux

### 2.5.9 사육기재의 교환 및 세척

사육상자 및 급이기는 1회/2주 빈도로 교환하였다.

사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

## 2.6 사료

### 2.6.1 종류

실험동물용 고품사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet 2918C)

2.6.2 Lot No. 2918C-100813MA, 2918C-120113MA

2.6.3 제조자 Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.

### 2.6.4 급이방법

급이기에 고품사료를 넣어 자유 섭취시켰다.

### 2.6.5 사료의 분석 및 확인

사료의 분석은 Harlan Laboratories, Inc.에서 제공한 사용 로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인하였다.

## 2.7 음수

### 2.7.1 종류 및 급수방법

청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사하여, 자유 섭취시켰다.

### 2.7.2 음수의 분석 및 확인

음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충북 청원군 오송읍 오송생명1로 184)에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」(환경부령 제439호,2011년12월30일, 일부개정)의 전 항목에 대하여 실시하였다. 모든 항목에 대한 검사는 1회/년, 미생물 검사는 1회/월 실시하여, 그 분석결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지를 확인하였다.

## 2.8 투여

### 2.8.1 투여경로 경구투여

### 2.8.2 투여경로의 선택이유

시험물질의 임상적용예정경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였다.

### 2.8.3 투여방법 및 투여횟수

투여액량은 10 mL/kg으로 하였고, 개체별 투여액량은 최근의 측정체중을 기준으로 산출하였다. 매일 오전에 경구투여용 존대를 부착한 일회용 주사기 (3 및 5 mL)를 이용하여 4주간 1일 1회 위내에 강제투여 하였다.



## 2.9 군구성 및 투여용량

### 2.9.1 군구성

#### 2.9.2 투여용량설정

시험물질의 임상적용예정용량은 1,000 mg/human/day (1일, 성인 60 kg 기준시 16.7mg/kg)이다. 단회 경구투여 독성시험의 예비시험 (Biototech Study No.: B14017P)으로 5,000mg/10mL/kg을 암수 각 1마리에 단회 경구투여한 결과 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서, 시험의뢰자와의 협의하에 본 시험에서는 5,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고, 공비 2.5를 적용한 2,000 및 800mg/Wkg/day를 중 및 저용량으로 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

## 2.10 관찰 및 검사

이하의 관찰, 측정 및 검사일은 투여개시일을 1일로 하여, 투여개시일부터 7일간을 투여 1주로 계산하였다.

### 2.10.1 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 1일 1회 일반증상을 관찰하고, 1일 2회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다. 관찰은 투여 1일부터 4주간 실시하였다.

### 2.10.2 체중측정

모든 동물에 대하여, 투여개시일 (투여전), 투여 개시 후 주 1회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단, 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하였다.

### 2.10.3 사료섭취량 측정

모든 동물에 대하여, 투여개시 전의 사료섭취량은 군분리일부터 투여개시일까지 1일간의 섭취량을 측정하였고, 투여 1주째는 7일간의 섭취량을, 투여 4주째에는 6일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였다.

### 2.10.4 혈액학적 검사

모든 동물에 대하여 부검 전 약 18시간 이상 절식시킨 후, 부검일에 isoflurane으로 마취하여 배대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액학적 검사는 채취한 혈액 약 1 mL을 EDTA 함유 tube에 넣은 후, 혈구 분석기 (ADVIA 2120i, SIEMENS, Germany)로 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
알라닌 아미노기전이효소 (alanine aminotransferase, ALT)	U/L	JSCC(UV Kinetic)
아스파테이트 아미노기전이효소 (aspartate aminotransferase, AST)	U/L	JSCC(UV Kinetic)
알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase, ALT)	U/L	4-Nitrophenyl-phosphate 2Na (JSCC Transferable)
혈액요소질소 (blood urea nitrogen, BUN)	mg/dL	Urease_GLDH
크레아티닌(creatinine, Crea)	mg/dL	Jaffe
총단백(total protein, TP)	g/dL	Biuret
알부민(albumin, Alb)	g/dL	BCG
A/G ratio	-	Calculated
총콜레스테롤 (total cholesterol, T-Chol)	mg/dL	Cholesterol oxidase-HMMPS
트리글리세라이드 (triglycerides, TG)	mg/dL	GPO-HMMPS Glycerol Blanking
혈당(glucose, Glu)	mg/dL	Hexokinase-G6PDH

#### 2.10.5 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 배대동맥에서 채취한 혈액 중 혈액학적 검사용 혈액을 제외한 나머지 혈액을 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리 후 혈청을 취하여 이용하였다. 혈액생화학 분석기 (7180, HITACHI, Japan)로 다음 항목들을 측정하였다.

항목	단위	측정방법
적혈구수 (erythrocyte count, RBC)	$\times 10^6 \text{ cells}/\mu\text{l}$	Flow cytometry
혈색소량 (hemoglobin, HGB)	g/dL	Flow cytometry, Cyanmethemoglobin
헤마토크리트치(hematocrit, HCT)	%	Calculated
평균적혈구용적 (mean corpuscular volume, MCV)	fL	Flow cytometry
평균적혈구헤모글로빈량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)	pg	Calculated
평균적혈구헤모글로빈농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL	
혈소판수 (platelet, PLT)	$\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$	Flow cytometry
백혈구수(leucocyte count, WBC)	$\times 10^3 \text{ cells}/\mu\text{l}$	Flow cytometry, Peroxidase stain

### 2.10.6 부검

모든 동물에 대해서 투여 29일에 isoflurane 마취 하에 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다. 부검을 실시한 모든 동물에 대해서 전신의 장기·조직에 대하여 상세한 육안검사를 실시하였다.

### 2.10.7 장기중량 측정

모든 동물에 대하여 다음의 장기에 대한 습중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기중량비를 산출하였다. 좌우가 있는 장기 (#)는 좌우를 합하여 무게를 측정하였다.

- 뇌 (brain)
- 간 (liver)
- 신장# (kidney)
- 심장 (heart)
- 비장 (spleen)

### 2.10.8 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기·조직을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액 (neutral buffered formalin)에 고정하고, 그 중 고환은 Davidson 고정액에 고정하였다.

- 뇌 (brain)
- 갑상선 및 부갑상선 (thyroid and parathyroid)
- 폐 및 기관지 (lung with bronchi)
- 간 (liver)
- 신장 (kidney)
- 위 (stomach)
- 공장 (jejunum)
- 맹장 (cecum)
- 직장 (rectum)
- 흉선 (thymus)
- 심장 (heart)
- 비장 (spleen)
- 부신 (adrenal)
- 십이지장 (duodenum)
- 회장 (ileum)
- 결장 (colon)
- 췌장 (pancreas)
- 고환 (testis)
- 난소 (ovary)
- 부고환 (epididymis)
- 자궁 (uterus)

고정된 장기·조직 중 아래의 장기·조직에 대하여 탈수·파라핀, 조직의 파라핀 포매등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하였다. 박절과정을 거쳐 검체를 제작하여 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 검체 제작 후 잔여장기·조직 및 고정 장기·조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존하였다.

- 뇌 (brain)
- 간 (liver)
- 신장 (kidney)
- 심장 (heart)
- 비장 (spleen)
- 폐 (lung)

조직병리학적 검사는 아래의 검체 제작된 장기·조직에 대하여 검경하였다.

- 대조군과 고용량군의 모든 개체

### 2.11 자료의 통계처리

실험에서 얻어진 체중, 사료섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 결과는 SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산인 경우, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성 (유의수준: 0.05)이 관찰되면 Dunnett's t-test의 다중검정을 실

시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 등분산이 기각되면 Kruskal-Wallis test를 실시하여 유의성 (유의수준: 0.05)이 관찰되면 Steel test의 다중검정을 실시하여 유의성을 확인하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 일반증상

(Table 1, Table 11)

관찰기간 동안, 암수 대조군 및 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

시험물질색변 (compound-colored stool)이 암수 800 mg/kg/day 투여군에서 투여 4 ~28일에 3 ~ 5마리, 암수 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서는 투여 2 ~ 28일에 1 ~5마리에서 관찰되었다. 관찰된 시험물질색변은 시험물질의 과량투여에 의한 착색변으로 판단된다.

유연 (salivation)이 암컷5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 28일에 투여직후 1마리에서 관찰되었다. 상기의 증상은 우발적인 것으로 시험물질에 의한 독성반응으로 판단되지 않는다.

#### 3.2 체중변화

(Figure 1, Figure 2, Table 2, Table 12)

암수 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다.

#### 3.3 사료섭취량

(Table 3, Table 13)

암수 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 통계학적으로 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다.

#### 3.4 혈액학적 검사

(Table 4, Table 14)

암수 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 변화는 용량의존성이 없으며, 경미한 변화로서 독성학적인 의미는 없다고 판단한다.

#### 3.5 혈액생화학적 검사

(Table 5, Table 15)

암수 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

암컷 시험물질 투여군에서 관찰된 변화는 모두 용량의존성이 없거나, 경미한 변화이고, 조직병리학적 검사에서 형태적인 변화가 동반되지 않아 독성학적인 의미는 없다고 판단한다.

#### 3.6 장기중량

(Table 6, Table 7, Table 16, Table 17)

암수 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

암컷 시험물질 투여군에서 관찰된 변화는 모두 용량의존성이 없거나, 경미한 변화이고, 조직병리학적 검사에서 형태적인 변화가 동반되지 않아 독성학적인 의미는 없다고 판단한다.

### 3.7 부검

(Table 8, Table 18)

암수 800, 2,000 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

### 3.8 조직병리학적 검사

(Table 9, Table 19)

암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 변화로 판단되는 결과는 없었다.

암수 5,000 mg/kg/day 투여군의 간 및 신장에서 관찰된 소견들은 모두 자연발생적으로 Sprague-Dawley 랫드에서 흔히 관찰되는 병변이며, 대조군에서도 관찰되었으며, 우발적 또는 산발적으로 분포하였으므로 모두 독성학적인 의미는 없는 것으로 판단된다.

## 4. 결론

본 시험 조건하에서 초음파처리 인삼열매 추출물을 Sprague-Dawley 계 암수 랫드에 4주간 반복 경구투여한 결과, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 독성학적으로 의미있는 변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 13주 반복 경구투여 독성시험에서는 5,000 mg/kg/day를 고용량으로 설정하고 공비 2.5로 하여 2,000 및 800 mg/kg/day를 중용량 및 저용량으로 설정하는 것이 합당할 것으로 판단된다.

## FIGURES

Figure 1. Body Weights in Male SD Rats

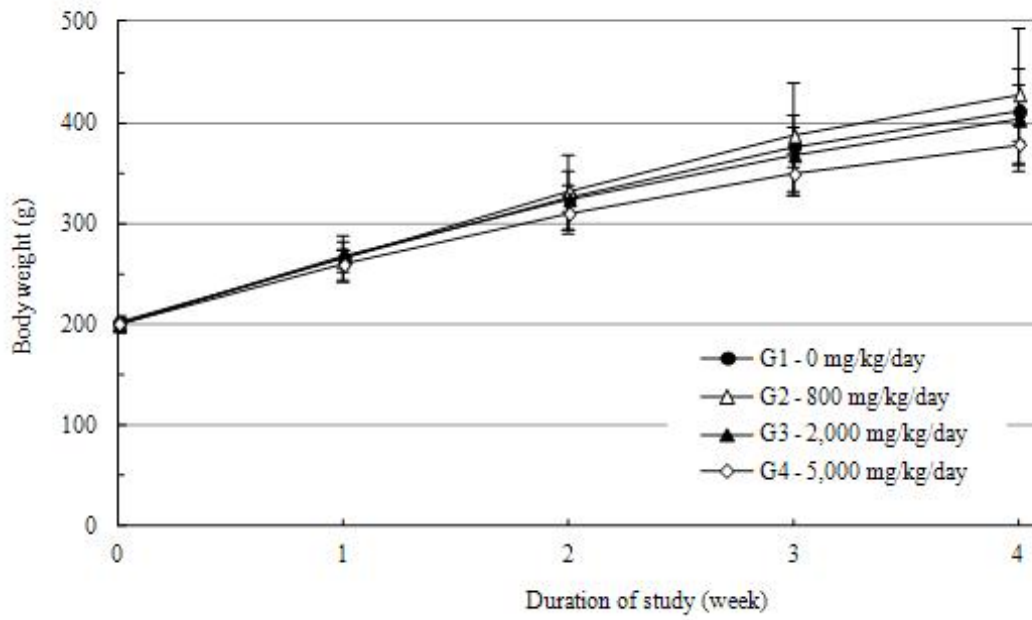
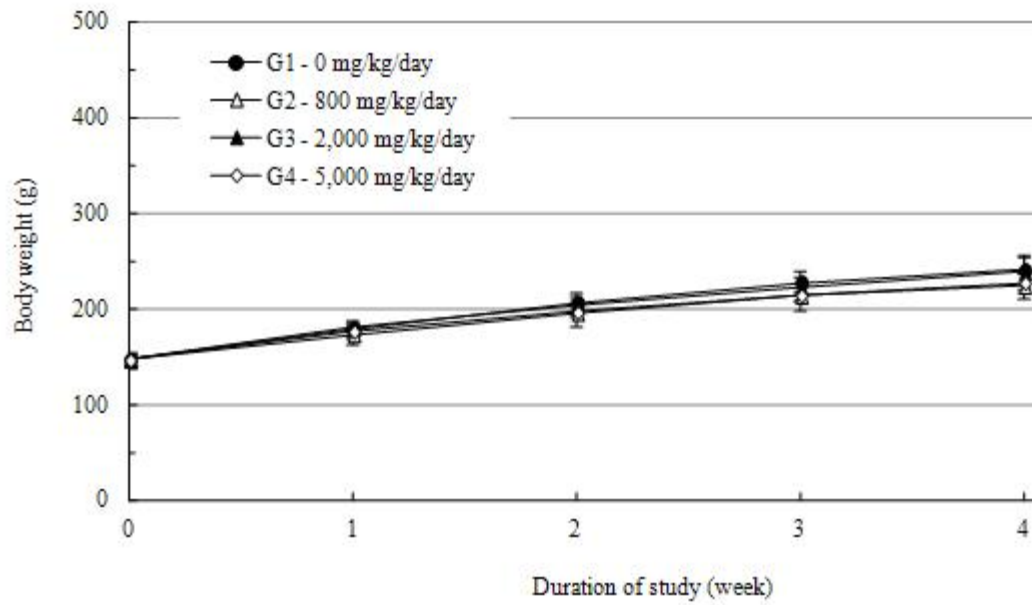


Figure 2. Body Weights in Female SD Rats



## SUMMARY TABLES

Table 1. Summary of Clinical Signs

Sex Male			
Group/ Dose(mg/kg/day)	No. of animal	Clinic sign	No. of animal affected
G2 800	5	compound-clored stool	5
G3 2,000	5	compound-clored stool	5
G4 5,000	5	compound-clored stool	5
Sex Female			
Group/ Dose(mg/kg/day)	No. of animal	Clinic sign	No. of animal affected
G2 800	5	compound-clored stool	5
G3 2,000	5	compound-clored stool	5
G4 5,000	5	compound-clored stool Salibation(after dosing)	5 1

Table 1. (Continued)

Sex Male			Day													
Group/ Dose (mg/kg/day)	No. of animal	Clinical sign	Day													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 800	5	NOA compound-colored stool	5	5	5	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2
G3 2,000	5	NOA compound-colored stool	5	4	1				1	1	1	1	1	1	1	
G4 5,000	5	NOA compound-colored stool	5					1	1							
				5	5	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	
			Day													
Group/Dose (mg/kg/day)	No. of animal	Clinical sign	Day													
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
G2 800	5	NOA compound-colored stool	1	2	2						1					
G3 2,000	5	NOA compound-colored stool	4	3	3	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	
G4 5,000	5	NOA compound-colored stool	1									1	1			
			4	5	4	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	
			4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

NOA: No Observable AbnormalityGroup



Table 1. (Continued)

Sex Female			Day														
Group/ Dose (mg/kg/day)	No. of animal	Clinical sign	Day														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 800	5	NOA compound-colored stool	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2
G3 2,000	5	NOA compound-colored stool	5	4	1					1	1	1	1	1	1	1	1
G4 5,000	5	NOA compound-colored stool	5						1	1							
				5	5	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5

			Day														
Group/Dose (mg/kg/day)	No. of animal	Clinical sign	Day														
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
G1 0	5	NOA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 800	5	NOA compound-colored stool	1	2	2							1					
G3 2,000	5	NOA compound-colored stool	4	3	3	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	NOA compound-colored stool	1														
			4	5	4	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5	5

NOA: No Observable AbnormalityGroup

Table 2. Mean Body Weights

		Sex : Male					(g)
Group/ Dose(mg/kg/day)		Week					
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	201.0	265.0	326.0	376.3	410.6	
	S.D.	6.9	8.6	13.1	20.5	27.5	
	N	5	5	5	5	5	
G2 800	Mean	200.0	266.5	331.9	386.7	427.9	
	S.D.	7.4	21.7	37.2	54.2	66.9	
	N	5	5	5	5	5	
G3 2,000	Mean	199.6	268.2	323.8	367.8	403.1	
	S.D.	7.0	15.2	28.8	40.0	50.0	
	N	5	5	5	5	5	
G4 5,000	Mean	200.2	258.7	309.5	348.5	378.1	
	S.D.	5.4	15.2	18.9	21.0	20.5	
	N	5	5	5	5	5	

		Sex : Female					(g)
Group/ Dose(mg/kg/day)		Week					
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	147.6	180.0	206.9	228.1	241.0	
	S.D.	6.2	5.7	10.4	12.9	13.5	
	N	5	5	5	5	5	
G2 800	Mean	147.7	173.9	195.9	214.0	224.4	
	S.D.	6.4	9.9	13.8	15.0	13.4	
	N	5	5	5	5	5	
G3 2,000	Mean	147.4	181.0	204.7	222.0	239.0	
	S.D.	6.5	8.0	9.1	12.9	17.5	
	N	5	5	5	5	5	
G4 5,000	Mean	147.1	177.0	197.2	214.7	228.1	
	S.D.	7.8	6.4	3.5	4.6	9.9	
	N	5	5	5	5	5	

Table 3. Mean Food Consumption

		Sex : Male					(g/Day)
Group/ Dose(mg/kg/day)		Week					
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	27.8	30.6	34.7	36.6	35.6	
	S.D.	2.0	2.1	2.5	2.3	2.9	
	N	5	5	5	5	5	
G2 800	Mean	27.7	30.2	34.8	27.5	37.5	
	S.D.	2.4	4.0	5.8	7.2	7.3	
	N	5	5	5	5	5	
G3 2,000	Mean	27.7	30.8	33.6	34.2	34.2	
	S.D.	1.9	1.2	2.0	3.1	3.3	
	N	5	5	5	5	5	
G4 5,000	Mean	25.8	27.4	29.5	29.7	30.1	
	S.D.	1.5	2.1	2.8	2.4	1.2	
	N	5	5	5	5	5	

		Sex : Female					(g/Day)
Group/ Dose(mg/kg/day)		Week					
		0	1	2	3	4	
G1 0	Mean	18.3	21.4	22.9	24.0	24.4	
	S.D.	1.8	0.7	0.9	1.2	1.2	
	N	5	5	5	5	5	
G2 800	Mean	17.5	20.4	21.3	22.5	22.2	
	S.D.	2.1	1.5	1.9	1.9	1.6	
	N	5	5	5	5	5	
G3 2,000	Mean	19.7	22.1	23.0	24.0	24.8	
	S.D.	1.9	1.5	1.1	1.4	1.3	
	N	5	5	5	5	5	
G4 5,000	Mean	18.7	20.4	21.7	22.0	22.7	
	S.D.	3.5	0.9	0.5	0.8	1.1	
	N	5	5	5	5	5	

Table 4. Mean Hematological Parameters

Sex : Male									
Group/ Dose (mg/kg/day)		RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu\ell$ )	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	7.77	14.4	43.9	56.5	18.5	32.8	947	12.72
	S.D.	0.37	0.3	1.0	1.7	0.7	0.3	75	0.85
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 800	Mean	7.80	14.7	45.1	57.8	18.8	32.6	918	10.39
	S.D.	0.18	0.7	2.0	1.5	0.6	0.3	47	1.89
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,000	Mean	7.66	14.7	44.6	58.3	19.2	32.9	927	11.37
	S.D.	0.29	0.4	1.4	1.8	0.8	0.6	146	2.92
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	7.56	14.3	43.6	57.8	19.0	32.9	934	10.75
	S.D.	0.28	0.4	1.2	1.2	0.6	0.5	136	1.48
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex : Female									
Group/ Dose (mg/kg/day)		RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu\ell$ )	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu\ell$ )
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	7.59	14.5	43.1	56.8	19.2	33.7	992	6.99
	S.D.	0.24	0.5	2.1	1.5	0.3	0.5	84	1.14
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 800	Mean	7.98	15.0	44.0	55.2	18.8	34.1	982	5.16
	S.D.	0.21	0.3	0.8	1.3	0.5	0.4	112	1.11
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,000	Mean	7.60	14.9	43.4	57.1	19.6	34.3	867	6.36
	S.D.	0.30	0.5	1.5	1.1	0.6	0.6	99	1.62
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	7.57	14.5	42.5	56.2	19.2	34.1	853	4.58#
	S.D.	0.33	0.5	1.5	1.3	0.5	0.3	33	0.22
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Steel test: #  $p < 0.05$ .

Table 5. Mean Clinical Chemistry

		Sex Male				
Group/ Dose(mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)
G1 0	Mean	31.5	78.7	655.1	12.5	0.43
	S.D.	5.6	12.9	110.0	1.1	0.02
	N	5	5	5	5	5
G2 800	Mean	28.8	79.1	671.1	13.2	0.43
	S.D.	6.7	9.1	154.8	1.7	0.02
	N	5	5	5	5	5
G3 2,000	Mean	28.5	77.5	557.0	12.7	0.43
	S.D.	3.1	5.3	90.4	1.0	0.04
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	28.7	77.7	682.2	13.2	0.44
	S.D.	3.7	6.8	97.8	1.7	0.01
	N	5	5	5	5	5

Group/ Dose(mg/kg/day)		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	Glu (mg/dL)
G1 0	Mean	5.4	2.3	0.73	64	34	123
	S.D.	0.2	0.1	0.05	12	3	10
	N	5	5	5	5	5	5
G2 800	Mean	5.6	2.3	0.70	69	35	130
	S.D.	0.3	0.1	0.03	17	13	8
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,000	Mean	5.7	2.3	0.69	68	34	123
	S.D.	0.4	0.2	0.04	10	12	11
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	5.3	2.3	0.76	55	47	125
	S.D.	0.1	0.0	0.04	11	17	9
	N	5	5	5	5	5	5

Table 5. (Continued)

Sex Female							
Group/ Dose(mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	
G1 0	Mean	19.9	74.7	382.0	12.4	0.45	
	S.D.	3.7	17.7	39.1	2.2	0.05	
	N	5	5	5	5	5	
G2 800	Mean	29.5**	83.9	348.4	12.3	0.45	
	S.D.	6.0	10.4	59.0	2.2	0.02	
	N	5	5	5	5	5	
G3 2,000	Mean	27.2	82.8	350.9	11.7	0.42	
	S.D.	3.9	9.1	35.0	2.1	0.04	
	N	5	5	5	5	5	
G4 5,000	Mean	25.0	76.1	324.5	17.5*	0.48	
	S.D.	3.8	8.2	61.0	3.3	0.03	
	N	5	5	5	5	5	

Group/ Dose(mg/kg/day)		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	Glu (mg/dL)
G1 0	Mean	5.9	2.7	0.83	83	22	119
	S.D.	0.2	0.1	0.06	12	15	8
	N	5	5	5	5	5	5
G2 800	Mean	5.9	2.7	0.85	81	15	120
	S.D.	0.3	0.2	0.06	8	6	5
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,000	Mean	6.0	2.7	0.83	84	19	130
	S.D.	0.2	0.1	0.03	18	6	7
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	6.0	2.7	0.82	76	14	113
	S.D.	0.3	0.2	0.05	14	5	12
	N	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Dunnett's t-test: \* p<0.05, \*\* p<0.01.

Table 6. Mean Absolute Organ Weights

Sex: Male		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	378.1	1.99	1.36	11.62	0.82	2.76
	S.D.	27.1	0.06	0.06	1.42	0.08	0.28
	N	5	5	5	5	5	5
G2 800	Mean	391.9	1.97	1.30	12.60	0.77	2.94
	S.D.	58.0	0.14	0.24	3.00	0.11	0.59
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,000	Mean	371.8	1.95	1.24	11.97	0.82	2.69
	S.D.	44.1	0.17	0.17	2.45	0.15	0.36
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	345.7	1.95	1.13	10.60	0.67	2.56
	S.D.	17.7	0.07	0.10	0.93	0.09	0.20
	N	5	5	5	5	5	5

Sex: Female		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	224.6	1.89	0.83	6.92	0.55	1.82
	S.D.	12.1	0.05	0.06	0.45	0.06	0.11
	N	5	5	5	5	5	5
G2 800	Mean	207.2	1.84	0.72 *	6.20 *	0.49	1.67
	S.D.	14.5	0.11	0.05	0.39	0.08	0.20
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,000	Mean	217.5	1.80	0.78	6.87	0.49	1.73
	S.D.	14.5	0.09	0.08	0.35	0.08	0.20
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	208.0	1.84	0.73 *	6.38	0.42	1.77
	S.D.	7.9	0.11	0.05	0.38	0.04	0.17
	N	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Dunnett's t-test: \* p<0.05.

Table 7. Mean Relative Organ Weights

Sex: Male		(g/100g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	378.1	0.53	0.36	3.06	0.22	0.73
	S.D.	27.1	0.04	0.04	0.17	0.01	0.06
	N	5	5	5	5	5	5
G2 800	Mean	391.9	0.51	0.33	3.19	0.20	0.75
	S.D.	58.0	0.08	0.03	0.37	0.01	0.09
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,000	Mean	371.8	0.53	0.33	3.19	0.22	0.72
	S.D.	44.1	0.04	0.03	0.31	0.02	0.05
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	345.7	0.57	0.33	3.06	0.19	0.74
	S.D.	17.7	0.03	0.03	0.14	0.03	0.04
	N	5	5	5	5	5	5

Sex: Female		(g/100g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	Mean	224.6	0.84	0.37	3.08	0.24	0.81
	S.D.	12.1	0.05	0.02	0.09	0.03	0.03
	N	5	5	5	5	5	5
G2 800	Mean	207.2	0.89	0.35	3.00	0.24	0.81
	S.D.	14.5	0.05	0.02	0.24	0.04	0.06
	N	5	5	5	5	5	5
G3 2,000	Mean	217.5	0.83	0.36	3.17	0.23	0.79
	S.D.	14.5	0.07	0.02	0.26	0.04	0.05
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	208.0	0.89	0.35	3.07	0.20	0.85
	S.D.	7.9	0.06	0.02	0.18	0.02	0.07
	N	5	5	5	5	5	5



Table 8. Summary of Necropsy Findings

Sex	Male				Female			
Group /	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Dose (mg/kg/day)	0	800	2,000	5,000	0	800	2,000	5,000
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5
Unremarkable findings	5	5	5	5	5	5	5	5
No. of examined	5	5	5	5	5	5	5	5

External surface and all organs in body cavity were unremarkable.

Table 9. Summary of Histopathological Findings

Organ / Findings	Sex	Male		Female		
	Group / Dose (mg/kg/day) No. of animals	G1	G4	G1	G4	
Kidney	-Basophilic tubules	±	0	1	0	1
	-Interstitial nephritis, focal	±	0	0	0	1
	-Mineralization, corticomedullary junction	±	0	0	1	0
	-Nephrogenic rest	++	0	0	0	1
	No. of examined	5	5	5	5	
Liver	-Cell infiltration, mononuclear Cell, centrilobular	±	1	1	0	0
	-Microgranuloma	<+>	0	0	1	1
	-Vacuolation, periportal	+	0	0	3	0
	No. of examined	5	5	5	5	

There were unremarkable changes in the brain, heart, lung and spleen of Groups 1 and 4.

Grade- ±: minimal, +: mild, ++: moderate

<+>: Presence in "presence or not" basis.

## INDIVIDUAL ANIMAL DATA

Table 10. Individual Body Weights during an Acclimation Period

(g)							
Male				Female			
Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group assignment	Animal ID	Temporary Animal ID	Receipt	Group assignment
1101	1016	136.8	201.0	2101	2020	114.4	148.6
1102	1014	127.9	193.1	2102	2012	108.0	152.1
1103	1010	122.5	187.0	2103	2008	108.7	142.5
1104	1011	133.2	192.8	2104	2017	110.9	145.2
1105	1021	122.0	196.2	2105	2011	107.8	143.9
1201	1003	119.9	185.4	2201	2019	113.2	143.1
1202	1015	130.3	200.5	2202	2004	114.6	153.4
1203	1001	126.3	187.5	2203	2006	110.7	143.8
1204	1013	128.7	198.4	2204	2023	113.2	141.8
1205	1006	136.1	198.1	2205	2016	103.3	145.6
1301	1005	128.0	195.3	2301	2003	108.6	139.7
1302	1002	138.9	193.7	2302	2018	117.3	145.9
1303	1024	132.2	183.5	2303	2002	107.0	143.6
1304	1022	133.2	200.2	2304	2022	110.6	152.3
1305	1018	135.7	198.0	2305	2007	110.7	139.9
1401	1009	135.1	192.4	2401	2001	115.5	152.6
1402	1020	128.2	189.5	2402	2009	107.6	141.5
1403	1012	126.2	201.1	2403	2013	108.0	143.9
1404	1023	144.6	196.8	2404	2014	111.0	145.1
1405	1008	129.8	189.5	2405	2021	105.4	143.7
	1004	126.5	182.9		2005	105.9	137.7
	1007	130.6	181.2		2010	108.5	136.7
	1017	143.4	206.3		2015	113.1	156.6
	1019	134.0	204.7		2024	110.7	163.7
	<b>Mean</b>	<b>131.3</b>	<b>194.0</b>		<b>Mean</b>	<b>110.2</b>	<b>145.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6.2</b>	<b>7.0</b>		<b>S.D.</b>	<b>3.4</b>	<b>6.3</b>
	<b>N</b>	<b>24</b>	<b>24</b>		<b>N</b>	<b>24</b>	<b>24</b>

Table 11. Individual Clinical Signs

Sex: Male																
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	Day													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	1101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 800	1201	Compound-colored stool	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1202	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	1203	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1204	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1205	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G3 2,000	1301	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1302	Compound-colored stool	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1303	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1304	Compound-colored stool	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1305	Compound-colored stool	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G4 5,000	1401	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	1402	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1403	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1404	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1405	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality

Table 11. (Continued)

Sex: Male																	
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	Day														
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
G1 0	1101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 800	1201	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1202	Compound-colored stool	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1203	Compound-colored stool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1204	Compound-colored stool	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	1205	Compound-colored stool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G3 2,000	1301	Compound-colored stool	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	1302	Compound-colored stool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1303	Compound-colored stool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1304	Compound-colored stool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1305	Compound-colored stool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G4 5,000	1401	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1402	Compound-colored stool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1403	Compound-colored stool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1404	Compound-colored stool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1405	Compound-colored stool	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality

Table 11. (Continued)

Sex: Female																
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	Day													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	2101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 800	2201	Compound-colored stool	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2202	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	2203	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2204	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2205	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G3 2,000	2301	Compound-colored stool	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2302	Compound-colored stool	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2303	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2304	Compound-colored stool	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2305	Compound-colored stool	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G4 5,000	2401	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	2402	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2403	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2404	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2405	Compound-colored stool	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality

Table 12. Individual Body Weights

Sex: Male		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	1101	208.2	271.5	320.4	362.4	397.0
	1102	201.3	267.0	332.1	389.9	427.0
	1103	191.6	252.3	321.4	373.6	407.8
	1104	197.1	260.8	310.9	352.3	374.9
	1105	206.8	273.5	345.1	403.1	446.5
	<b>Mean</b>	<b>201.0</b>	<b>265.0</b>	<b>326.0</b>	<b>376.3</b>	<b>410.6</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6.9</b>	<b>8.6</b>	<b>13.1</b>	<b>20.5</b>	<b>27.5</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	1201	192.4	258.3	329.1	384.4	424.4
	1202	210.0	299.4	378.6	455.4	514.2
	1203	192.9	251.4	306.3	347.6	377.7
	1204	201.8	276.9	358.3	423.8	472.3
	1205	203.0	246.6	287.3	322.5	350.9
	<b>Mean</b>	<b>200.0</b>	<b>266.5</b>	<b>331.9</b>	<b>386.7</b>	<b>427.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>7.4</b>	<b>21.7</b>	<b>37.2</b>	<b>54.2</b>	<b>66.9</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	1301	201.2	278.3	345.5	400.5	445.7
	1302	197.1	262.1	313.2	351.1	379.9
	1303	188.8	245.1	281.0	311.7	335.5
	1304	206.3	283.7	353.9	411.3	458.3
	1305	204.6	271.8	325.4	364.3	396.3
	<b>Mean</b>	<b>199.6</b>	<b>268.2</b>	<b>323.8</b>	<b>367.8</b>	<b>403.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>7.0</b>	<b>15.2</b>	<b>28.8</b>	<b>40.0</b>	<b>50.0</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	1401	198.8	256.7	312.9	366.8	400.3
	1402	198.0	252.7	298.5	333.5	366.0
	1403	205.4	279.6	339.7	375.5	400.5
	1404	205.8	265.8	306.3	336.5	360.4
	1405	193.0	238.9	290.2	330.4	363.1
	<b>Mean</b>	<b>200.2</b>	<b>258.7</b>	<b>309.5</b>	<b>348.5</b>	<b>378.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>5.4</b>	<b>15.2</b>	<b>18.9</b>	<b>21.0</b>	<b>20.5</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 12. (Continued)

Sex: Female		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	2101	157.8	179.5	210.4	240.4	245.2
	2102	147.2	189.0	221.9	242.3	259.4
	2103	147.1	180.2	205.0	224.6	243.1
	2104	144.0	173.5	193.2	212.2	222.8
	2105	141.7	177.9	204.2	221.0	234.5
	<b>Mean</b>	<b>147.6</b>	<b>180.0</b>	<b>206.9</b>	<b>228.1</b>	<b>241.0</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6.2</b>	<b>5.7</b>	<b>10.4</b>	<b>12.9</b>	<b>13.5</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	2201	145.6	166.9	193.9	212.1	222.7
	2202	157.0	186.3	204.0	219.7	226.4
	2203	145.2	169.5	186.4	204.5	220.6
	2204	140.2	164.0	180.2	197.5	207.5
	2205	150.6	182.6	214.8	236.3	244.8
	<b>Mean</b>	<b>147.7</b>	<b>173.9</b>	<b>195.9</b>	<b>214.0</b>	<b>224.4</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6.4</b>	<b>9.9</b>	<b>13.8</b>	<b>15.0</b>	<b>13.4</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	2301	139.1	169.7	194.3	211.0	226.9
	2302	150.9	184.1	211.6	226.6	242.1
	2303	143.1	176.0	197.1	206.9	221.7
	2304	155.6	189.6	215.5	238.2	266.8
	2305	148.4	185.5	205.0	227.4	237.3
	<b>Mean</b>	<b>147.4</b>	<b>181.0</b>	<b>204.7</b>	<b>222.0</b>	<b>239.0</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6.5</b>	<b>8.0</b>	<b>9.1</b>	<b>12.9</b>	<b>17.5</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	2401	156.9	183.8	197.9	217.2	233.2
	2402	137.9	180.0	200.2	217.1	233.3
	2403	149.7	169.6	191.1	209.9	211.2
	2404	150.3	170.7	198.5	209.7	227.3
	2405	140.5	180.8	198.2	219.7	235.3
	<b>Mean</b>	<b>147.1</b>	<b>177.0</b>	<b>197.2</b>	<b>214.7</b>	<b>228.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>7.8</b>	<b>6.4</b>	<b>3.5</b>	<b>4.6</b>	<b>9.9</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 13. Individual Food Consumption

Sex: Male		(g/day)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	1101	27.4	30.2	32.7	34.0	34.1
	1102	26.6	27.8	32.8	36.1	36.3
	1103	28.1	31.7	37.3	38.7	36.7
	1104	25.9	30.0	33.3	35.0	31.6
	1105	31.1	33.3	37.5	39.2	39.2
	<b>Mean</b>	<b>27.8</b>	<b>30.6</b>	<b>34.7</b>	<b>36.6</b>	<b>35.6</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.0</b>	<b>2.1</b>	<b>2.5</b>	<b>2.3</b>	<b>2.9</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	1201	25.2	27.7	34.0	36.7	35.9
	1202	30.5	35.5	39.2	44.5	45.5
	1203	25.6	26.1	29.5	30.9	31.1
	1204	29.7	33.3	42.1	45.3	44.6
	1205	27.3	28.3	29.2	30.3	30.2
	<b>Mean</b>	<b>27.7</b>	<b>30.2</b>	<b>34.8</b>	<b>37.5</b>	<b>37.5</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.4</b>	<b>4.0</b>	<b>5.8</b>	<b>7.2</b>	<b>7.3</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	1301	26.0	29.9	33.9	35.7	35.6
	1302	25.4	29.5	33.0	32.8	32.6
	1303	28.5	30.3	30.4	29.8	30.1
	1304	29.9	32.3	35.8	37.9	39.0
	1305	28.5	31.9	34.7	35.0	33.6
	<b>Mean</b>	<b>27.7</b>	<b>30.8</b>	<b>33.6</b>	<b>34.2</b>	<b>34.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.9</b>	<b>1.2</b>	<b>2.0</b>	<b>3.1</b>	<b>3.3</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	1401	24.1	25.2	28.3	30.0	30.6
	1402	24.4	26.5	27.8	28.9	30.5
	1403	27.2	30.5	34.3	33.6	31.6
	1404	26.8	28.6	29.3	27.4	28.4
	1405	26.7	26.4	27.6	28.5	29.3
	<b>Mean</b>	<b>25.8</b>	<b>27.4</b>	<b>29.5</b>	<b>29.7</b>	<b>30.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.5</b>	<b>2.1</b>	<b>2.8</b>	<b>2.4</b>	<b>1.2</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	



Table 13. (Continued)

Sex: Female		(g/day)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		0	1	2	3	4
G1 0	2101	21.3	20.8	23.7	25.6	25.3
	2102	16.9	22.1	23.6	24.1	26.0
	2103	18.8	21.5	23.1	24.5	23.8
	2104	17.2	22.0	22.5	23.1	23.6
	2105	17.2	20.6	21.4	22.7	23.4
	<b>Mean</b>	<b>18.3</b>	<b>21.4</b>	<b>22.9</b>	<b>24.0</b>	<b>24.4</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.8</b>	<b>0.7</b>	<b>0.9</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	2201	16.1	20.6	22.4	23.1	22.4
	2202	19.9	21.3	22.1	23.9	23.1
	2203	15.9	18.1	19.5	20.7	20.4
	2204	16.0	20.0	19.1	20.3	20.7
	2205	19.6	21.9	23.3	24.4	24.2
	<b>Mean</b>	<b>17.5</b>	<b>20.4</b>	<b>21.3</b>	<b>22.5</b>	<b>22.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.1</b>	<b>1.5</b>	<b>1.9</b>	<b>1.9</b>	<b>1.6</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	2301	17.0	20.3	22.8	23.3	23.7
	2302	20.2	21.2	23.0	24.5	25.5
	2303	19.2	22.2	21.4	22.1	23.1
	2304	20.1	22.3	23.1	24.4	25.1
	2305	22.1	24.4	24.6	25.8	26.4
	<b>Mean</b>	<b>19.7</b>	<b>22.1</b>	<b>23.0</b>	<b>24.0</b>	<b>24.8</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.9</b>	<b>1.5</b>	<b>1.1</b>	<b>1.4</b>	<b>1.3</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	2401	22.2	21.2	21.7	23.3	22.6
	2402	15.1	21.4	22.5	21.7	24.0
	2403	22.3	20.0	21.1	22.0	21.0
	2404	18.8	19.1	21.7	22.2	23.1
	2405	15.3	20.5	21.4	21.0	22.7
	<b>Mean</b>	<b>18.7</b>	<b>20.4</b>	<b>21.7</b>	<b>22.0</b>	<b>22.7</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3.5</b>	<b>0.9</b>	<b>0.5</b>	<b>0.8</b>	<b>1.1</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 14. Individual Hematological Parameters

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ( $\times 10^4$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	1101	7.98	14.5	44.3	55.5	18.2	32.7	885	13.52
	1102	8.05	14.9	45.2	56.1	18.5	33.0	850	13.74
	1103	7.26	14.2	42.6	58.7	19.5	33.2	1004	11.90
	1104	8.07	14.3	44.0	54.5	17.7	32.6	975	12.12
	1105	7.50	14.1	43.2	57.6	18.8	32.6	1021	12.33
	<b>Mean</b>	<b>7.77</b>	<b>14.4</b>	<b>43.9</b>	<b>56.5</b>	<b>18.5</b>	<b>32.8</b>	<b>947</b>	<b>12.72</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.37</b>	<b>0.3</b>	<b>1.0</b>	<b>1.7</b>	<b>0.7</b>	<b>0.3</b>	<b>75</b>	<b>0.85</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	1201	7.89	15.3	46.8	59.3	19.4	32.8	933	8.89
	1202	7.84	14.8	45.7	58.2	18.8	32.3	923	9.28
	1203	7.81	15.0	45.5	58.3	19.3	33.0	872	11.07
	1204	7.97	14.9	46.0	57.7	18.7	32.4	875	9.29
	1205	7.50	13.4	41.6	55.4	17.9	32.3	985	13.41
	<b>Mean</b>	<b>7.80</b>	<b>14.7</b>	<b>45.1</b>	<b>57.8</b>	<b>18.8</b>	<b>32.6</b>	<b>918</b>	<b>10.39</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.18</b>	<b>0.7</b>	<b>2.0</b>	<b>1.5</b>	<b>0.6</b>	<b>0.3</b>	<b>47</b>	<b>1.89</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	1301	7.60	15.2	46.3	60.9	20.0	32.8	805	14.67
	1302	7.97	14.9	45.4	56.9	18.7	32.8	1137	10.70
	1303	7.36	14.4	42.7	58.0	19.5	33.7	780	11.30
	1304	7.96	14.4	45.0	56.6	18.1	32.1	993	13.22
	1305	7.40	14.5	43.8	59.1	19.5	33.1	921	6.98
	<b>Mean</b>	<b>7.66</b>	<b>14.7</b>	<b>44.6</b>	<b>58.3</b>	<b>19.2</b>	<b>32.9</b>	<b>927</b>	<b>11.37</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.29</b>	<b>0.4</b>	<b>1.4</b>	<b>1.8</b>	<b>0.8</b>	<b>0.6</b>	<b>146</b>	<b>2.92</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	1401	7.18	14.3	42.9	59.8	20.0	33.4	1001	9.81
	1402	7.94	15.1	45.6	57.5	19.0	33.0	953	12.83
	1403	7.53	14.1	43.6	57.8	18.8	32.5	753	9.00
	1404	7.70	14.1	43.7	56.7	18.3	32.3	855	10.63
	1405	7.45	14.1	42.4	57.0	18.9	33.1	1108	11.46
	<b>Mean</b>	<b>7.56</b>	<b>14.3</b>	<b>43.6</b>	<b>57.8</b>	<b>19.0</b>	<b>32.9</b>	<b>934</b>	<b>10.75</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.28</b>	<b>0.4</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	<b>0.6</b>	<b>0.5</b>	<b>136</b>	<b>1.48</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 14. (Continued)

Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ( $\times 10^4$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	2101	7.31	14.0	40.8	55.9	19.1	34.2	1125	8.22
	2102	7.63	14.5	43.4	56.8	19.0	33.4	934	7.80
	2103	7.41	14.1	41.1	55.4	19.1	34.4	914	5.93
	2104	7.91	15.0	44.7	56.6	19.0	33.5	1018	5.66
	2105	7.67	15.0	45.4	59.2	19.6	33.2	971	7.36
	<b>Mean</b>	<b>7.59</b>	<b>14.5</b>	<b>43.1</b>	<b>56.8</b>	<b>19.2</b>	<b>33.7</b>	<b>992</b>	<b>6.99</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.24</b>	<b>0.5</b>	<b>2.1</b>	<b>1.5</b>	<b>0.3</b>	<b>0.5</b>	<b>84</b>	<b>1.14</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	2201	8.05	14.9	44.5	55.3	18.6	33.6	794	6.06
	2202	7.91	14.9	43.2	54.7	18.9	34.5	798	5.64
	2203	8.24	15.5	45.0	54.6	18.8	34.5	999	6.08
	2204	8.04	14.6	43.3	53.9	18.2	33.8	1025	3.56
	2205	7.66	15.0	44.0	57.3	19.6	34.2	843	4.47
	<b>Mean</b>	<b>7.98</b>	<b>15.0</b>	<b>44.0</b>	<b>55.2</b>	<b>18.8</b>	<b>34.1</b>	<b>892</b>	<b>5.16</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.21</b>	<b>0.3</b>	<b>0.8</b>	<b>1.3</b>	<b>0.5</b>	<b>0.4</b>	<b>112</b>	<b>1.11</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	2301	7.78	15.1	44.7	57.4	19.4	33.8	866	5.68
	2302	7.62	15.5	44.2	58.0	20.4	35.1	863	4.58
	2303	7.22	14.2	41.0	56.7	19.7	34.7	737	8.53
	2304	7.41	14.6	43.1	58.2	19.8	34.0	1017	7.52
	2305	7.98	14.9	44.2	55.4	18.7	33.7	854	5.49
	<b>Mean</b>	<b>7.60</b>	<b>14.9</b>	<b>43.4</b>	<b>57.1</b>	<b>19.6</b>	<b>34.3</b>	<b>867</b>	<b>6.36</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.30</b>	<b>0.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.1</b>	<b>0.6</b>	<b>0.6</b>	<b>99</b>	<b>1.62</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	2401	7.86	14.5	42.5	54.1	18.4	34.0	860	4.74
	2402	7.01	13.8	40.2	57.4	19.7	34.4	816	4.79
	2403	7.76	15.3	44.3	57.1	19.7	34.5	838	4.54
	2404	7.64	14.5	42.8	56.1	19.0	33.8	905	4.60
	2405	7.59	14.5	42.6	56.1	19.1	34.0	845	4.24
	<b>Mean</b>	<b>7.57</b>	<b>14.5</b>	<b>42.5</b>	<b>56.2</b>	<b>19.2</b>	<b>34.1</b>	<b>853</b>	<b>4.58</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.33</b>	<b>0.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.3</b>	<b>0.5</b>	<b>0.3</b>	<b>33</b>	<b>0.22</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 15. Individual Clinical Chemistry

Sex: Male						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)
G1 0	1101	41.3	101.2	794.7	13.1	0.43
	1102	28.6	73.6	537.1	13.1	0.44
	1103	29.7	77.3	633.6	10.8	0.41
	1104	27.5	69.8	569.7	13.5	0.46
	1105	30.4	71.8	740.3	11.9	0.40
	<b>Mean</b>	<b>31.5</b>	<b>78.7</b>	<b>655.1</b>	<b>12.5</b>	<b>0.43</b>
	<b>S.D.</b>	<b>5.6</b>	<b>12.9</b>	<b>110.0</b>	<b>1.1</b>	<b>0.02</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	1201	23.1	91.3	639.5	11.7	0.41
	1202	24.1	71.4	593.9	15.3	0.43
	1203	38.2	86.5	836.8	11.5	0.44
	1204	24.9	72.4	469.6	12.8	0.43
	1205	33.6	74.1	815.5	14.6	0.46
	<b>Mean</b>	<b>28.8</b>	<b>79.1</b>	<b>671.1</b>	<b>13.2</b>	<b>0.43</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6.7</b>	<b>9.1</b>	<b>154.8</b>	<b>1.7</b>	<b>0.02</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	1301	32.1	85.7	685.9	12.3	0.43
	1302	26.0	78.6	578.4	13.3	0.44
	1303	30.0	76.6	576.7	14.2	0.44
	1304	24.6	74.9	491.1	11.9	0.48
	1305	30.0	71.6	452.7	11.8	0.38
	<b>Mean</b>	<b>28.5</b>	<b>77.5</b>	<b>557.0</b>	<b>12.7</b>	<b>0.43</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3.1</b>	<b>5.3</b>	<b>90.4</b>	<b>1.0</b>	<b>0.04</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	1401	26.6	68.7	558.4	14.5	0.46
	1402	32.7	81.5	802.9	15.4	0.44
	1403	24.3	78.6	735.6	11.1	0.43
	1404	27.5	73.4	610.9	12.6	0.43
	1405	32.4	86.2	703.0	12.6	0.45
	<b>Mean</b>	<b>28.7</b>	<b>77.7</b>	<b>682.2</b>	<b>13.2</b>	<b>0.44</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3.7</b>	<b>6.8</b>	<b>97.8</b>	<b>1.7</b>	<b>0.01</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 15. (Continued)

Sex: Male							
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	Glu (mg/dL)
G1 0	1101	5.3	2.3	0.77	55	36	135
	1102	5.6	2.4	0.75	59	36	126
	1103	5.6	2.2	0.65	56	28	128
	1104	5.4	2.3	0.74	85	34	119
	1105	5.1	2.2	0.76	63	35	109
	<b>Mean</b>	<b>5.4</b>	<b>2.3</b>	<b>0.73</b>	<b>64</b>	<b>34</b>	<b>123</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>	<b>0.05</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	1201	6.0	2.4	0.67	68	39	138
	1202	5.8	2.4	0.71	74	35	137
	1203	5.2	2.2	0.73	40	25	132
	1204	5.5	2.2	0.67	85	55	124
	1205	5.4	2.3	0.74	79	21	121
	<b>Mean</b>	<b>5.6</b>	<b>2.3</b>	<b>0.70</b>	<b>69</b>	<b>35</b>	<b>130</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3</b>	<b>0.1</b>	<b>0.03</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>8</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	1301	6.3	2.7	0.75	76	49	141
	1302	5.5	2.2	0.67	56	19	118
	1303	5.4	2.2	0.69	57	31	114
	1304	5.6	2.3	0.70	73	41	115
	1305	5.8	2.3	0.66	76	29	127
	<b>Mean</b>	<b>5.7</b>	<b>2.3</b>	<b>0.69</b>	<b>68</b>	<b>34</b>	<b>123</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.4</b>	<b>0.2</b>	<b>0.04</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>11</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	1401	5.4	2.3	0.74	59	50	129
	1402	5.1	2.3	0.82	38	36	139
	1403	5.2	2.2	0.73	66	73	118
	1404	5.4	2.3	0.74	53	28	120
	1405	5.3	2.3	0.77	59	49	117
	<b>Mean</b>	<b>5.3</b>	<b>2.3</b>	<b>0.76</b>	<b>55</b>	<b>47</b>	<b>125</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.1</b>	<b>0.0</b>	<b>0.04</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>9</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 15. (Continued)

Sex: Female						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)
G1 0	2101	25.1	87.6	337.1	11.1	0.40
	2102	20.5	70.6	425.1	13.1	0.45
	2103	20.9	55.9	378.7	11.2	0.43
	2104	14.9	97.9	351.3	16.1	0.52
	2105	18.3	61.4	417.9	10.7	0.43
	<b>Mean</b>	<b>19.9</b>	<b>74.7</b>	<b>382.0</b>	<b>12.4</b>	<b>0.45</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3.7</b>	<b>17.7</b>	<b>39.1</b>	<b>2.2</b>	<b>0.05</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	2201	20.8	84.5	384.3	12.5	0.46
	2202	27.6	67.9	301.7	11.1	0.47
	2203	36.2	94.4	434.0	15.9	0.44
	2204	29.1	81.2	323.1	10.1	0.43
	2205	33.9	91.7	298.7	12.0	0.46
	<b>Mean</b>	<b>29.5</b>	<b>83.9</b>	<b>348.4</b>	<b>12.3</b>	<b>0.45</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6.0</b>	<b>10.4</b>	<b>59.0</b>	<b>2.2</b>	<b>0.02</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	2301	27.5	95.2	358.8	12.7	0.48
	2302	31.1	85.8	345.4	13.4	0.44
	2303	30.0	82.7	298.9	12.9	0.43
	2304	26.0	80.2	396.6	10.9	0.41
	2305	21.3	70.2	354.8	8.4	0.36
	<b>Mean</b>	<b>27.2</b>	<b>82.8</b>	<b>350.9</b>	<b>11.7</b>	<b>0.42</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3.9</b>	<b>9.1</b>	<b>35.0</b>	<b>2.1</b>	<b>0.04</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	2401	20.3	89.8	289.6	17.9	0.43
	2402	28.7	77.9	422.9	20.6	0.50
	2403	21.6	71.6	344.7	19.3	0.49
	2404	27.8	71.4	276.4	17.9	0.49
	2405	26.7	70.0	288.7	12.0	0.47
	<b>Mean</b>	<b>25.0</b>	<b>76.1</b>	<b>324.5</b>	<b>17.5</b>	<b>0.48</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3.8</b>	<b>8.2</b>	<b>61.0</b>	<b>3.3</b>	<b>0.03</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 15. (Continued)

Sex: Female							
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	Glucose (mg/dL)
G1 0	2101	6.1	2.6	0.74	94	47	109
	2102	5.9	2.7	0.84	89	21	121
	2103	6.1	2.9	0.91	84	22	131
	2104	5.8	2.7	0.87	63	8	118
	2105	5.8	2.6	0.81	86	14	117
	<b>Mean</b>	<b>5.9</b>	<b>2.7</b>	<b>0.83</b>	<b>83</b>	<b>22</b>	<b>119</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>	<b>0.06</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>8</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	2201	5.9	2.6	0.79	82	10	123
	2202	6.0	2.7	0.82	73	12	118
	2203	5.9	2.8	0.90	93	14	125
	2204	6.3	3.0	0.91	82	25	124
	2205	5.6	2.5	0.81	77	12	112
	<b>Mean</b>	<b>5.9</b>	<b>2.7</b>	<b>0.85</b>	<b>81</b>	<b>15</b>	<b>120</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>	<b>0.06</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	2301	6.1	2.7	0.79	96	12	127
	2302	6.2	2.8	0.82	108	20	123
	2303	6.0	2.7	0.82	70	13	126
	2304	5.8	2.7	0.87	66	26	138
	2305	5.7	2.6	0.84	79	23	138
	<b>Mean</b>	<b>6.0</b>	<b>2.7</b>	<b>0.83</b>	<b>84</b>	<b>19</b>	<b>130</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>	<b>0.03</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	2401	5.8	2.6	0.81	76	19	121
	2402	5.7	2.6	0.84	74	14	126
	2403	6.3	2.9	0.85	100	20	101
	2404	6.2	2.9	0.88	66	10	101
	2405	5.9	2.5	0.74	64	8	118
	<b>Mean</b>	<b>6.0</b>	<b>2.7</b>	<b>0.82</b>	<b>76</b>	<b>14</b>	<b>113</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>	<b>0.05</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>12</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 16. Individual Absolute Organ Weights

Sex: Male								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W.	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney	
G1 0	1101	362.5	1.93	1.41	10.37	0.74	2.54	
	1102	395.4	2.04	1.32	12.48	0.83	2.75	
	1103	375.6	2.06	1.36	12.03	0.79	3.11	
	1104	343.9	1.97	1.43	9.94	0.78	2.43	
	1105	413.1	1.95	1.30	13.27	0.96	2.95	
	<b>Mean</b>	<b>378.1</b>	<b>1.99</b>	<b>1.36</b>	<b>11.62</b>	<b>0.82</b>	<b>2.76</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>27.1</b>	<b>0.06</b>	<b>0.06</b>	<b>1.42</b>	<b>0.08</b>	<b>0.28</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		
G2 800	1201	391.1	1.92	1.41	13.99	0.73	3.00	
	1202	458.7	2.13	1.60	16.18	0.95	3.88	
	1203	350.4	1.77	1.06	9.53	0.70	2.81	
	1204	438.7	1.98	1.36	13.88	0.78	2.78	
	1205	320.5	2.07	1.05	9.41	0.68	2.25	
	<b>Mean</b>	<b>391.9</b>	<b>1.97</b>	<b>1.30</b>	<b>12.60</b>	<b>0.77</b>	<b>2.94</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>58.0</b>	<b>0.14</b>	<b>0.24</b>	<b>3.00</b>	<b>0.11</b>	<b>0.59</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		
G3 2,000	1301	407.3	2.04	1.32	14.67	1.03	3.06	
	1302	352.1	1.79	1.06	10.35	0.71	2.33	
	1303	311.6	1.75	1.05	8.79	0.64	2.28	
	1304	421.6	2.04	1.41	13.97	0.90	2.91	
	1305	366.6	2.14	1.35	12.08	0.81	2.89	
	<b>Mean</b>	<b>371.8</b>	<b>1.95</b>	<b>1.24</b>	<b>11.97</b>	<b>0.82</b>	<b>2.69</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>44.1</b>	<b>0.17</b>	<b>0.17</b>	<b>2.45</b>	<b>0.15</b>	<b>0.36</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		
G4 5,000	1401	363.8	1.95	1.16	11.55	0.79	2.53	
	1402	331.7	1.90	1.18	9.48	0.70	2.45	
	1403	366.1	2.01	1.18	11.56	0.64	2.92	
	1404	331.5	1.87	1.18	10.41	0.69	2.46	
	1405	335.4	2.03	0.95	10.00	0.55	2.45	
	<b>Mean</b>	<b>345.7</b>	<b>1.95</b>	<b>1.13</b>	<b>10.60</b>	<b>0.67</b>	<b>2.56</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>17.7</b>	<b>0.07</b>	<b>0.10</b>	<b>0.93</b>	<b>0.09</b>	<b>0.20</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		



Table 16. (Continued)

Sex: Female								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W.	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney	
G1 0	2101	232.6	1.94	0.79	7.39	0.58	1.87	
	2102	239.1	1.91	0.86	7.35	0.53	1.86	
	2103	226.4	1.80	0.91	6.88	0.61	1.95	
	2104	209.5	1.91	0.81	6.61	0.56	1.66	
	2105	215.4	1.90	0.77	6.38	0.45	1.76	
	<b>Mean</b>	<b>224.6</b>	<b>1.89</b>	<b>0.83</b>	<b>6.92</b>	<b>0.55</b>	<b>1.82</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>12.1</b>	<b>0.05</b>	<b>0.06</b>	<b>0.45</b>	<b>0.06</b>	<b>0.11</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		
G2 800	2201	207.1	1.75	0.66	5.83	0.47	1.55	
	2202	211.0	1.92	0.69	6.26	0.45	1.90	
	2203	198.4	1.93	0.74	5.78	0.62	1.54	
	2204	190.5	1.70	0.71	6.53	0.40	1.49	
	2205	229.0	1.91	0.79	6.61	0.52	1.88	
	<b>Mean</b>	<b>207.2</b>	<b>1.84</b>	<b>0.72</b>	<b>6.20</b>	<b>0.49</b>	<b>1.67</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>14.5</b>	<b>0.11</b>	<b>0.05</b>	<b>0.39</b>	<b>0.08</b>	<b>0.20</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		
G3 2,000	2301	207.2	1.82	0.69	6.53	0.44	1.51	
	2302	224.0	1.90	0.77	6.46	0.44	1.69	
	2303	201.5	1.83	0.76	7.07	0.56	1.60	
	2304	238.4	1.79	0.90	7.04	0.59	2.01	
	2305	216.5	1.65	0.78	7.25	0.42	1.82	
	<b>Mean</b>	<b>217.5</b>	<b>1.80</b>	<b>0.78</b>	<b>6.87</b>	<b>0.49</b>	<b>1.73</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>14.5</b>	<b>0.09</b>	<b>0.08</b>	<b>0.35</b>	<b>0.08</b>	<b>0.20</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		
G4 5,000	2401	211.7	1.66	0.80	6.32	0.47	1.65	
	2402	212.1	1.93	0.76	7.03	0.38	1.72	
	2403	195.1	1.82	0.68	6.15	0.39	1.61	
	2404	206.3	1.90	0.70	6.35	0.45	1.87	
	2405	214.9	1.91	0.71	6.06	0.43	2.02	
	<b>Mean</b>	<b>208.0</b>	<b>1.84</b>	<b>0.73</b>	<b>6.38</b>	<b>0.42</b>	<b>1.77</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>7.9</b>	<b>0.11</b>	<b>0.05</b>	<b>0.38</b>	<b>0.04</b>	<b>0.17</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		

Table 17. Individual Relative Organ Weights

Sex: Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W. (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	1101	362.5	0.53	0.39	2.86	0.20	0.70
	1102	395.4	0.52	0.33	3.16	0.21	0.70
	1103	375.6	0.55	0.36	3.20	0.21	0.83
	1104	343.9	0.57	0.42	2.89	0.23	0.71
	1105	413.1	0.47	0.31	3.21	0.23	0.71
	<b>Mean</b>	<b>378.1</b>	<b>0.53</b>	<b>0.36</b>	<b>3.06</b>	<b>0.22</b>	<b>0.73</b>
	<b>S.D.</b>	<b>27.1</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>	<b>0.17</b>	<b>0.01</b>	<b>0.06</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	1201	391.1	0.49	0.36	3.58	0.19	0.77
	1202	458.7	0.46	0.35	3.53	0.21	0.85
	1203	350.4	0.51	0.30	2.72	0.20	0.80
	1204	438.7	0.45	0.31	3.16	0.18	0.63
	1205	320.5	0.65	0.33	2.94	0.21	0.70
	<b>Mean</b>	<b>391.9</b>	<b>0.51</b>	<b>0.33</b>	<b>3.19</b>	<b>0.20</b>	<b>0.75</b>
	<b>S.D.</b>	<b>58.0</b>	<b>0.08</b>	<b>0.03</b>	<b>0.37</b>	<b>0.01</b>	<b>0.09</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	1301	407.3	0.50	0.32	3.60	0.25	0.75
	1302	352.1	0.51	0.30	2.94	0.20	0.66
	1303	311.6	0.56	0.34	2.82	0.21	0.73
	1304	421.6	0.48	0.33	3.31	0.21	0.69
	1305	366.6	0.58	0.37	3.30	0.22	0.79
	<b>Mean</b>	<b>371.8</b>	<b>0.53</b>	<b>0.33</b>	<b>3.19</b>	<b>0.22</b>	<b>0.72</b>
	<b>S.D.</b>	<b>44.1</b>	<b>0.04</b>	<b>0.03</b>	<b>0.31</b>	<b>0.02</b>	<b>0.05</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	1401	363.8	0.54	0.32	3.17	0.22	0.70
	1402	331.7	0.57	0.36	2.86	0.21	0.74
	1403	366.1	0.55	0.32	3.16	0.17	0.80
	1404	331.5	0.56	0.36	3.14	0.21	0.74
	1405	335.4	0.61	0.28	2.98	0.16	0.73
	<b>Mean</b>	<b>345.7</b>	<b>0.57</b>	<b>0.33</b>	<b>3.06</b>	<b>0.19</b>	<b>0.74</b>
	<b>S.D.</b>	<b>17.7</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	<b>0.14</b>	<b>0.03</b>	<b>0.04</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 17. (Continued)

Sex: Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W. (g)	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney
G1 0	2101	232.6	0.83	0.34	3.18	0.25	0.80
	2102	239.1	0.80	0.36	3.07	0.22	0.78
	2103	226.4	0.80	0.40	3.04	0.27	0.86
	2104	209.5	0.91	0.39	3.16	0.27	0.79
	2105	215.4	0.88	0.36	2.96	0.21	0.82
	<b>Mean</b>	<b>224.6</b>	<b>0.84</b>	<b>0.37</b>	<b>3.08</b>	<b>0.24</b>	<b>0.81</b>
	<b>S.D.</b>	<b>12.1</b>	<b>0.05</b>	<b>0.02</b>	<b>0.09</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G2 800	2201	207.1	0.85	0.32	2.82	0.23	0.75
	2202	211.0	0.91	0.33	2.97	0.21	0.90
	2203	198.4	0.97	0.37	2.91	0.31	0.78
	2204	190.5	0.89	0.37	3.43	0.21	0.78
	2205	229.0	0.83	0.34	2.89	0.23	0.82
	<b>Mean</b>	<b>207.2</b>	<b>0.89</b>	<b>0.35</b>	<b>3.00</b>	<b>0.24</b>	<b>0.81</b>
	<b>S.D.</b>	<b>14.5</b>	<b>0.05</b>	<b>0.02</b>	<b>0.24</b>	<b>0.04</b>	<b>0.06</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G3 2,000	2301	207.2	0.88	0.33	3.15	0.21	0.73
	2302	224.0	0.85	0.34	2.88	0.20	0.75
	2303	201.5	0.91	0.38	3.51	0.28	0.79
	2304	238.4	0.75	0.38	2.95	0.25	0.84
	2305	216.5	0.76	0.36	3.35	0.19	0.84
	<b>Mean</b>	<b>217.5</b>	<b>0.83</b>	<b>0.36</b>	<b>3.17</b>	<b>0.23</b>	<b>0.79</b>
	<b>S.D.</b>	<b>14.5</b>	<b>0.07</b>	<b>0.02</b>	<b>0.26</b>	<b>0.04</b>	<b>0.05</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	2401	211.7	0.78	0.38	2.99	0.22	0.78
	2402	212.1	0.91	0.36	3.31	0.18	0.81
	2403	195.1	0.93	0.35	3.15	0.20	0.83
	2404	206.3	0.92	0.34	3.08	0.22	0.91
	2405	214.9	0.89	0.33	2.82	0.20	0.94
	<b>Mean</b>	<b>208.0</b>	<b>0.89</b>	<b>0.35</b>	<b>3.07</b>	<b>0.20</b>	<b>0.85</b>
	<b>S.D.</b>	<b>7.9</b>	<b>0.06</b>	<b>0.02</b>	<b>0.18</b>	<b>0.02</b>	<b>0.07</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Table 18. Individual Necropsy Findings

Sex: Male					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Organ*	Necropsy findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	1101	All	Unremarkable findings	S	29
	1102	All	Unremarkable findings	S	29
	1103	All	Unremarkable findings	S	29
	1104	All	Unremarkable findings	S	29
	1105	All	Unremarkable findings	S	29
G2 800	1201	All	Unremarkable findings	S	29
	1202	All	Unremarkable findings	S	29
	1203	All	Unremarkable findings	S	29
	1204	All	Unremarkable findings	S	29
	1205	All	Unremarkable findings	S	29
G3 2,000	1301	All	Unremarkable findings	S	29
	1302	All	Unremarkable findings	S	29
	1303	All	Unremarkable findings	S	29
	1304	All	Unremarkable findings	S	29
	1305	All	Unremarkable findings	S	29
G4 5,000	1401	All	Unremarkable findings	S	29
	1402	All	Unremarkable findings	S	29
	1403	All	Unremarkable findings	S	29
	1404	All	Unremarkable findings	S	29
	1405	All	Unremarkable findings	S	29

\* External surface and organs in body cavity

S: Scheduled

Table 18. (Continued)

Sex: Female					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Organ*	Necropsy findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	2101	All	Unremarkable findings	S	29
	2102	All	Unremarkable findings	S	29
	2103	All	Unremarkable findings	S	29
	2104	All	Unremarkable findings	S	29
	2105	All	Unremarkable findings	S	29
G2 800	2201	All	Unremarkable findings	S	29
	2202	All	Unremarkable findings	S	29
	2203	All	Unremarkable findings	S	29
	2204	All	Unremarkable findings	S	29
	2205	All	Unremarkable findings	S	29
G3 2,000	2301	All	Unremarkable findings	S	29
	2302	All	Unremarkable findings	S	29
	2303	All	Unremarkable findings	S	29
	2304	All	Unremarkable findings	S	29
	2305	All	Unremarkable findings	S	29
G4 5,000	2401	All	Unremarkable findings	S	29
	2402	All	Unremarkable findings	S	29
	2403	All	Unremarkable findings	S	29
	2404	All	Unremarkable findings	S	29
	2405	All	Unremarkable findings	S	29

\* External surface and organs in body cavity

S: Scheduled

Table 19. Individual Histopathological Findings

Sex: Male										
Group / Dose (mg/kg/day)	G1 / 0					G4 / 5,000				
Animal ID	1101	1102	1103	1104	1105	1401	1402	1403	1404	1405
Type of sacrifice	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
Organ / Findings										
Brain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Basophilic tubules								±		
Liver	-	-		-	-	-	-		-	-
-Cell infiltration, mononuclear cell, centrilobular			±					±		
Lung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S: Scheduled  
 -: Unremarkable  
 Grade- ±: minimal

Sex: Female										
Group / Dose (mg/kg/day)	G1 / 0					G4 / 5,000				
Animal ID	2101	2102	2103	2104	2105	2401	2402	2403	2404	2405
Type of sacrifice	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
Organ / Findings										
Brain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney										
-Mineralization, corticomedullary junction	±									
-Basophilic tubules									±	
-Interstitial nephritis, focal										±
-Nephrogenic rest									++	
Liver										
-Microgranuloma	<+>					<+>				
-Vacuolation, periportal		+		+	+					
Lung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S: Scheduled  
 -: Unremarkable  
 <+>: Presence in "presence or not" basis.  
 Grade- ±: minimal, +: mild, ++: moderate

## 다. 초음파처리 인삼열매 추출물의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

### 요약

시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성 살모넬라균 (TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주) 및 트립토판 요구성 대장균 (WP2uvrA(pKM101) 균주)을 이용하여 대사활성화비존재하 및 존재하의 경우에 대해 각각 검토하였다.

본시험의 최고용량을 설정하기 위해, 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1 및 19.5 µg/plate으로 용량설정시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA100, TA1535, TA1537 균주 및 대사활성화존재하의 TA1537 균주의 313 µg/plate 이상에서 관찰되었다. 대사활성화비존재하의 TA98 및 WP2uvrA(pKM101) 균주, 대사활성화존재하의 TA98, TA100, TA1535 및 WP2uvrA(pKM101) 균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조균 및 양성대조균을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 (µg/plate)
TA98, WP2uvrA(pKM101)	-	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA100, TA1535, TA1537	-	313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77
TA98, TA100, TA1535, WP2uvrA(pKM101)	+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA1537	+	313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77

본시험의 결과, 시험물질균에서 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀돌연변이콜로니수는 음성대조균의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다.

각 균주에 대한 양성대조균의 복귀돌연변이콜로니수는 음성대조균과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물의 유전자돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단된다.

## 1. 시험실시의 개요

### 1.1 시험목적

시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균(*Escherichia coli*)을 이용하여 검토하였다.

### 1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2013-40호 (2013년4월5일)

### 1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

- “의약품등의독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2013-121호 (2013년4월5일)

### 1.4 시험의뢰자

명칭 고연 (高研)

주소 우390-711 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112

TEL + 82-43-649-1433 FAX + 82-43-649-1759

### 1.5 시험기관

명칭 (주)바이오톡스텍

주소 우363-883 충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 53

TEL + 82-43-210-7777 FAX + 82-43-210-7778

### 1.6 시험책임자

성명 김선경

소속 특수독성부

### 1.7 시험일정

시험개시일 2014년 2월 20일

실험개시일 2014년 2월 26일

용량설정시험

- 균주 접종일 2014년 2월 25일

- 시험물질 처리일 2014년 2월 26일

- 균주 배양일 2014년 2월 26일 ~ 2월 28일

- 복귀변이콜로니수 계측일 2014년 2월 28일

본시험

- 균주 접종일 2014년 3월 4일



- 시험물질 처리일	2014년 3월 5일
- 균주 배양일	2014년 3월 5일 ~ 3월 7일
- 복귀변이콜로니수 계측일	2014년 3월 7일
실험종료일	2014년 3월 7일
시험종료일	2014년 00월 00일

### 1.8 시험담당자

균주의 배양	김수환, 이에나, 박초롱
시험물질 보관	김은애
시험물질 조제	김진아
시험물질 처리	홍승영, 이에나, 박초롱
복귀변이콜로니수 계측	김수환, 이에나, 김선경

### 1.9 기록 및 자료의 보관

#### 1.9.1 보관기간 시험종료 후 5년간 보관

이후의 보관은 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

#### 1.9.2 보관장소

명칭 (주)바이오톡스텍 자료보관실

주소 우363-883 충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 53

#### 1.9.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 최종보고서, 기초자료, 기록문서 및 통신연락문서

## 2. 시험재료 및 방법

### 2.1 시험물질

#### 2.1.1 물질명 초음파처리 인삼열매 추출물

(Ultrasonication processed ginseng berry extract)

#### 2.1.2 Lot No. UGBE (001)

#### 2.1.3 성상 갈색분말

#### 2.1.4 성분 Ginsenosides

#### 2.1.5 친화성 Hydrophilic

#### 2.1.6 위험성 인습성

#### 2.1.7 제조일 2014년 1월 22일

#### 2.1.8 유효기간 2016년 1월 22일 (제조 후 2년)

#### 2.1.9 보관조건 냉장 (3.8 ~ 6.5°C), 제습

#### 2.1.10 취급시 주의사항 특이사항 없음

#### 2.1.11 제공자

명칭 고연 (高研)

주소 우390-711 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112

#### 2.1.12 수령일 2014년 1월 27일

#### 2.1.13 잔여시험물질의 처리 시험종료 후 반환

### 2.2 음성대조물질

#### 2.2.1 명칭 주사용수

#### 2.2.2 Lot No. 12037

#### 2.2.3 보관조건 실온

#### 2.2.4 제조사 Choongwae Pharma Corp., Korea

#### 2.2.5 선택이유 본시험의 부형제인 주사용수를 선택하였다.

## 2.3 양성대조물질

명칭	Lot No.	보관조건	제조사
Sodium azide (SA)	BCBJ9887V	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-Nitrofluorene (2-NF)	S43858V	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-Aminoanthracene (2-AA)	STBD3302V	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
9-Aminoacridine (9-AA)	09820CEV	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide(AF2)	STQ3987	실온	Wako, Japan

## 2.4 조제 및 분석

### 2.4.1 시험물질의 조제

#### 2.4.1.1 부형제

##### 2.4.1.1.1 명칭 주사용수

##### 2.4.1.1.2 Lot No. 12037

##### 2.4.1.1.3 선택이유

용량설정시험의 최고용량인 50 mg/mL (주사용수 및 DMSO), 100 mg/mL (acetone), 200 mg/mL (THF)을 조제하기 위해, 시험의뢰자가 제공한 정보 및 부형제 검토를 실시한 결과, 주사용수에는 균일하게 현탁되었고, DMSO, acetone 및 tetrahydrofuran (THF)에는 용해 또는 현탁되지 않았기 때문에, 주사용수를 선택하였다.

#### 2.4.1.2 조제방법

시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시하였다.

필요량의 시험물질을 칭량한 후 (CP323S, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하여 균일하게 현탁시킨 후, 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계희석하여 조제하였다.

### 2.4.2 양성물질의 조제

각 균주에 대한 양성대조물질의 용량은 본 기관의 배경데이터에 기초하여 설정하였다. Sodium azide (SA)는 주사용수 (Lot No.: 12037, Choongwae Pharma Corp., Korea)에, 2-Nitrofluorene (2-NF), 9-Aminoacridine (9-AA), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2) 및 2-Aminoanthracene (2-AA)는 dimethyl sulfoxide (Lot No.: K44487231, DMSO, Merck, Germany)에 조제하고, 조제된 양성대조물질은 초저온냉동고 (OPR-DFU-657CEV, Operon, -80 ~ -60°C)에 동결보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.

<각 균주에 대한 양성대조물질의 종류와 용량>

S9 mix	균주명	명칭	용량 (µg/plate)
-	TA98	2-NF	5.0
	TA100	SA	1.5
	TA1535	SA	1.5
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	AF2	0.005
+	TA98	2-AA	1.0
	TA100	2-AA	2.0
	TA1535	2-AA	3.0
	TA1537	2-AA	3.0
	WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	2-AA	2.0

2.4.3 시험물질액의 분석

시험물질액의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

## 2.5 균주

### 2.5.1 종 및 균주명

Salmonella typhimurium TA98

Salmonella typhimurium TA100

Salmonella typhimurium TA1535 Salmonella typhimurium TA1537

Escherichia coli WP2uvrA(pKM101)

### 2.5.2 선택이유

변이원성물질에 대한 감수성이 높고, 변이원성시험에 가장 일반적으로 사용되고 있으며, 가이드라인에서 추천되고 있는 균주를 사용하였다.

### 2.5.3 입수 및 보관

균주는 2011년 10월 28일에 Molecular Toxicology, Inc. (MOLTOXTM, Inc., U.S.A.)에서 구입하였다. 입수된 각 균주를 nutrient broth 배지에 접종하여 8시간 동안 진탕배양 (37°C, 130 rpm)한 후, 각 균주의 유전자형 (genotype), 자발복귀변이콜로니수 및 양성대조물질에 대한 감수성을 확인하였다.

각 균주의 특성을 확인한 후, 균주 현탁액과 DMSO를 1:0.09의 비율로 혼합하여 동결보존용 튜브에 분주하고 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하였다.

<각 균주의 유전자형>

종	균주명	유전자형	
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa</i> Δ <i>uvrB</i> (pKM101)
	TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa</i> Δ <i>uvrB</i> (pKM101)
	TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfa</i> Δ <i>uvrB</i>
	TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfa</i> Δ <i>uvrB</i>
<i>Escherichia coli</i>	WP2uvrA(pKM101)	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i> (pKM101)

### 2.5.4 전배양

동결보관된 각 균주를 해동하여 nutrient broth 배지에 접종하고 진탕배양 (37°C, 130 rpm)하였다. 전배양 종료 후, 각 균주의 흡광도를 UV/VIS spectrophotometer(측정파장 660 nm, V-550, Jasco, Japan)를 이용하여 측정하고, 균수가 1×10<sup>9</sup> cells/mL 이상 되는 것을 확인한 후 시험에 사용하였다.

## 2.6 배지

### 2.6.1 Nutrient broth 배지

Nutrient broth No.2 (Oxoid, UK)를 칭량한 후, 소량의 초순수를 첨가하여 stirrer로 교반하여 용해시켰다. 최종농도가 2.5%가 되도록 초순수를 첨가하였다. 조제후 고압증기 멸균하였다.

### 2.6.2 최소 glucose 한천평판배지

Bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 첨가하여 조제하여 고압증기 멸균하였다. 멸

균 후 Vogel-Bonner (VB) salts 10배 농축액과 20% glucose (JunseiChemical Co., Ltd., Japan)를 각각 첨가하고 플레이트에 분주하여 실온 방치하였다.

<최소 glucose 한천평판배지의 조성>

성 분	각 성분의 함유량
Bacto agar	15 g
VB salts 10배 농축액	100 mL
20% glucose	100 mL
초순수	800 mL
총 액량	1 L

<VB salts 10배 농축액의 조성>

성 분	사용량	제조사
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
구연산	1.829 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g	Junsei Chemical Co., Ltd., Japan
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3.58 g	YAKURI PURE CHEMICALS Co., Ltd., Japan
초순수	100 mL	-

### 2.6.3 Top agar

염화나트륨 및 bacto agar (BD, U.S.A.)를 칭량한 후, 초순수를 첨가하여 각각 0.5 및 0.6%가 되게 조제한 후, 고압증기멸균 하였다. 멸균 후, 살모넬라균주용 top agar는 0.5 mM L-Histidine/D-Biotin 혼합액 (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하고, 대장균용 top agar는 0.5 mM L-Tryptophan (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 10:1의 비율로 혼합하여 조제 하였다.

## 2.7 S9 mix의 조제

### 2.7.1 입수 및 보관

S9과 Cofactor A를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하고, 유효기간 내에 사용하였다.

<S9의 특성>

사용동물	Sprague-Dawley rat [Cr1:CD(SD)]
성별, 주령	수컷, 7주령
장기	간장
유도물질	Phenobarbital (PB) 및 5,6-benzoflavone (BF)

투여용량 및 투여횟수	PB: 30 mg/kg 1회 (1일째), 60 mg/kg 3회 (2 ~ 4일째) BF: 80 mg/kg 1회 (3일째)
투여경로	복강내투여

### 2.7.2 S9 mix 조성

성분	각 성분의 함유량	
S9	0.1 mL	
Cofactor A	0.4 mol/L MgCl <sub>2</sub>	0.02 mL (8 μmol)
	1.65 mol/L KCl	0.02 mL (33 μmol)
	1.0 mol/L Glucose-6-phosphate	0.005 mL (5 μmol)
	0.1 mol/L NADPH	0.04 mL (4 μmol)
	0.1 mol/L NADH	0.04 mL (4 μmol)
	0.2 mol/L Sodium phosphate buffer, pH 7.4	0.5 mL (100 μmol)
	정제수	0.275 mL
총 액량	1 mL	

### 2.7.3 S9 mix의 조제방법

S9 mix는 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결보관된 S9 (Lot No.: 13100407)과 Cofactor A (Lot No.: A13100107)를 해동하여 1 : 9의 비율로 혼합하여 조제하였다.

## 2.8 용량설정시험

본시험의 용량을 결정하기 위하여 용량설정시험을 실시하였다.

### 2.8.1 용량

가이드라인에서 추천하는 5,000 μg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 4로 1,250, 313, 78.1 및 19.5 μg/plate의 4용량을 설정하였다. 또한 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

### 2.8.2 시험방법

용량설정시험은 본시험과 동일한 방법 및 조건으로 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하였다.

### 2.8.3 본시험의 용량설정

#### 2.8.3.1 용량설정시험의 결과

시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA100, TA1535, TA1537 균주 및 대사

활성화존재하의 TA1537 균주의 313 µg/plate 이상에서 관찰되었다. 대사활성화비존재하의 TA98 및 WP2uvrA(pKM101) 균주, 대사활성화존재하의 TA98, TA100, TA1535 및 WP2uvrA(pKM101) 균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다.

시험물질의 침전은 대사활성비존재하 및 존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

### 2.8.3.2 본시험의 용량

본시험의 최고용량은 생육저해가 관찰된 최저용량으로 하여 대사활성화비존재하의 TA100, TA1535, TA1537 균주 및 대사활성화존재하의 TA1537 균주는 313 µg/plate으로 하고, 이하 공비 2로 5용량의 시험물질균을 설정하였다. 대사활성화비존재하의 TA98 및 WP2uvrA(pKM101) 균주, 대사활성화존재하의 TA98, TA100, TA1535 및 WP2uvrA(pKM101) 균주는 생육저해가 관찰되지 않았기 때문에, 5,000 µg/plate을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 4용량의 시험물질균을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 (µg/plate)
TA98, WP2uvrA(pKM101)	-	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA100, TA1535, TA1537	-	313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77
TA98, TA100, TA1535, WP2uvrA(pKM101)	+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA1537	+	313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77

또한, 음성대조균 및 양성대조균을 설정하였다.

## 2.9 본시험

### 2.9.1 시험방법

본시험은 프리인큐베이션법으로 실시하였다. 또한, 대사활성화비존재하 및 존재하의 2계열로 하였다.

본시험에서는 각 용량당 3매의 플레이트를 사용하였다.

각각의 플레이트에 균주명, 용량, 음성대조균, 양성대조균 및 S9 mix 존재유무를 식별한 번호를 기입하였다.

### 2.9.2 처리방법

대사활성화비존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성 및 양성대조물질을 각각 100 µL씩 건열 멸균 한 유리시험관에 넣고, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 각 균주현탁액 100 µL를 첨가한 후, 37°C에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에는 살모넬라용 top agar를, WP2uvrA(pKM101) 균주에는 대장균용 top agar를 각각 2 mL씩 첨가하여 vortexing 하였다. 그 후, 현탁액을 최소 glucose 한천평판배지에 증층하여 실온에서 방치하였다.

대사활성화존재하에서는 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 대신에 S9 mix 500 µL를 첨가하였다. 그 외의 처리는 동일하게 실시하였다.



### 2.9.3 배양법 및 배양시간

Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기 (DK-LI020-P, Daiki scientificCo., LT, Korea, VS-1203P3-LN L, Visionsci co., Ltd., Korea)에서 48시간 배양하였다.

### 2.9.4 무균검사

잡균에 의한 오염유무를 확인하기 위해 최고용량의 시험물질액 100 µL, 0.1 mol/L 인산완충액 (pH 7.4) 500 µL 및 S9 mix 500 µL를 건열멸균한 유리시험관에 각각 넣고, 37°C 배양기에서 20분간 진탕하였다. 진탕 종료 후, top agar를 가해서 vortexing 한 후, nutrient broth 한천평판배지에 증충하여 실온에 방치하였다. Top agar가 굳은 후 플레이트를 뒤집어서 37°C 배양기에서 48시간 배양한 후, 미생물의 오염으로 인한 콜로니 형성 유무를 확인하였다.

### 2.9.5 확인시험

아래의 경우에 해당하지 않았기 때문에 확인시험은 실시하지 않았다.

- . 용량설정시험과 본시험의 결과에서 재현성이 확보되지 않은 경우
- . 생육저해가 확인되지 않은 용량이 4용량 이상이 확보되지 않은 경우

## 2.10 관찰 및 계측

### 2.10.1 시험물질의 침전의 관찰

시험물질의 처리시 및 콜로니 수 계측시에 시험물질의 침전에 대해 육안으로 관찰하고 기록하였다.

### 2.10.2 콜로니수의 계측

배양 종료후, 복귀변이콜로니수를 콜로니카운터 (ProtoCOL, SYNBIOSIS, UK)로 자동계측하였다. 자동계측이 정확하지 않을 경우에는 육안계수를 실시하였다.

### 2.10.3 Background lawn의 관찰

생육저해 유무를 확인하기 위해, 복귀변이콜로니수 계측시, background lawn의 형성유무를 확인하였다. 생육저해의 판정기준은 background lawn이 음성대조군과 비교시 얇아지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였다.

## 2.11 시험의 성립조건

아래의 조건을 모두 만족하는 경우 성립으로 하였다.

- .음성 및 양성대조군에서의 평균복귀변이콜로니수가 Historical control data 의 범위내 또는 양성대조군의 복귀변이콜로니수가 음성대조군의 2배 이상일 것.
- . 4용량 이상에서 생육저해가 관찰되지 않을 것.
- . 오염이 없을 것.

## 2.12 결과의 판정

아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

.적어도 1개 균주에서 복귀변이콜로니수가 1용량 이상에서 음성대조군에 비해 2배 이상 증가하고, 증가에 따른 용량의존성이 있거나, 재현성이 있을 것.

### 2.13 자료의 통계처리

복귀변이콜로니수의 측정치에 관해서는 실측치를 표기하고, 평균치 및 표준편차를 구하며 통계학적 방법은 사용하지 않았다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 용량설정시험 (Figures 1 ~ 4, Tables 1 ~ 2)

본시험의 최고용량을 설정하기 위해, 2.8의 시험방법에 따라, 용량설정시험을 실시한 결과, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )
TA98, WP2uvrA(pKM101)	-	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA100, TA1535, TA1537	-	313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77
TA98, TA100, TA1535, WP2uvrA(pKM101)	+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA1537	+	313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77

시험물질의 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

### 3.2 본시험 (Figures 5 ~ 11, Tables 3 ~ 4)

#### 3.2.1 복귀변이콜로니수의 계측

본시험의 결과, 시험물질군에서 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다.

각 균주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

#### 3.2.2 시험물질에 의한 생육저해 및 침전

시험물질에 의한 생육저해는 대사활성화비존재하의 TA100, TA1535 및 TA1537균주와 대사활성화존재하의 TA1537 균주의 313  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 관찰되었다.

대사활성화비존재하의 TA98 및 WP2uvrA(pKM101) 균주, 대사활성화존재하의 TA98, TA100, TA1535 및 WP2uvrA(pKM101) 균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다

시험물질의 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

### 3.3 Historical Control Data (Table 5)

대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 음성대조군 및 양성대조군의

복귀변이콜로니수의 평균치는 historical control data의 범위내에 속하였다.

### 3.4 시험의 성립

해당시험은 음성대조군 및 양성대조군의 복귀변이콜로니수의 평균치가 historical control data 범위내에 속하였고, 각 군주에 있어서의 양성대조군의 복귀변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다. 또한, 생육저해가 인정되지 않는 용량이 4용량 이상이었으며, 잡균에 의한 오염도 확인되지 않았기 때문에 해당시험은 적절하게 실시되었다고 판단하였다.

### 4. 결론

이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판정되었다.

## FIGURES

Figure 1. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation  
(Dose Range Finding Study : TA98, TA1535 and TA1537)

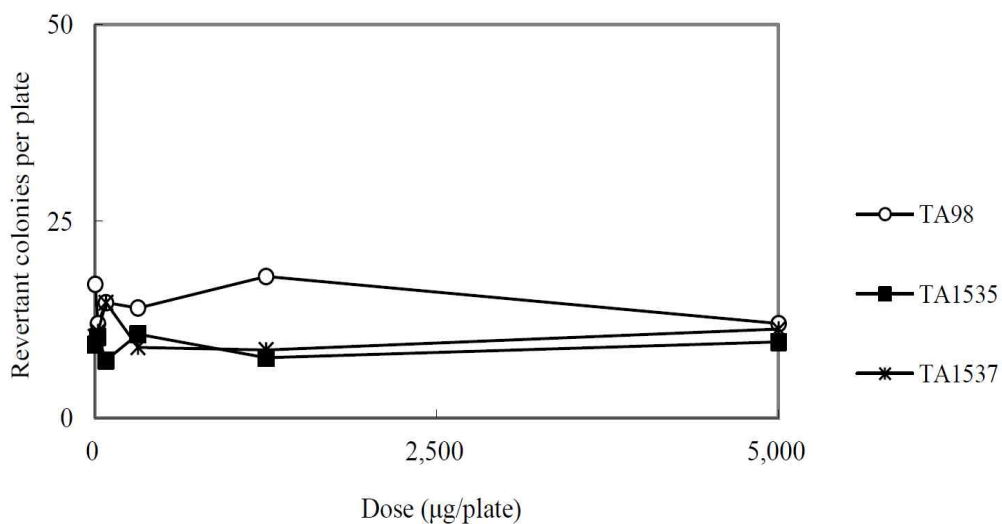


Figure 2. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation  
(Dose Range Finding Study : TA100 and WP2 *uvrA*(pKM101))

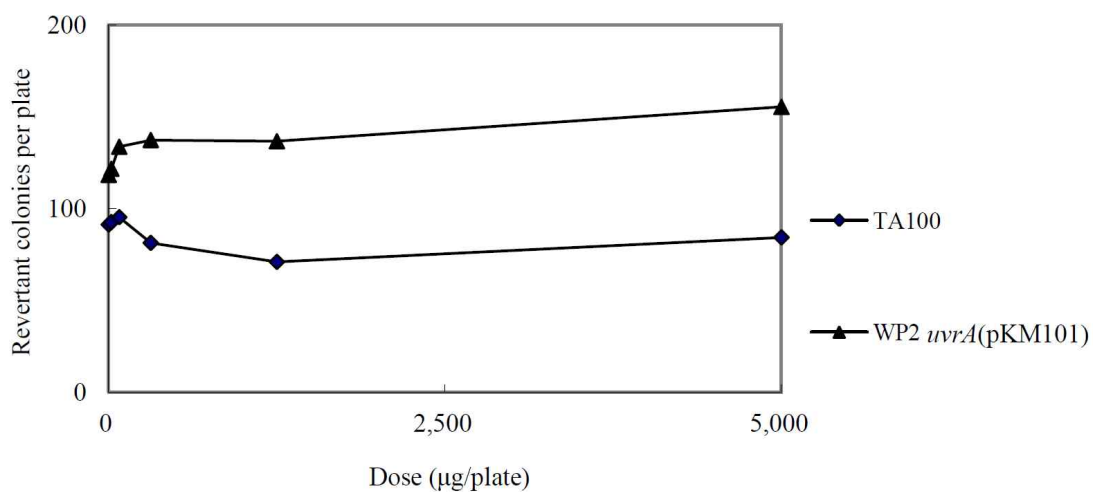


Figure 3. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation  
(Dose Range Finding Study : TA98, TA1535 and TA1537)

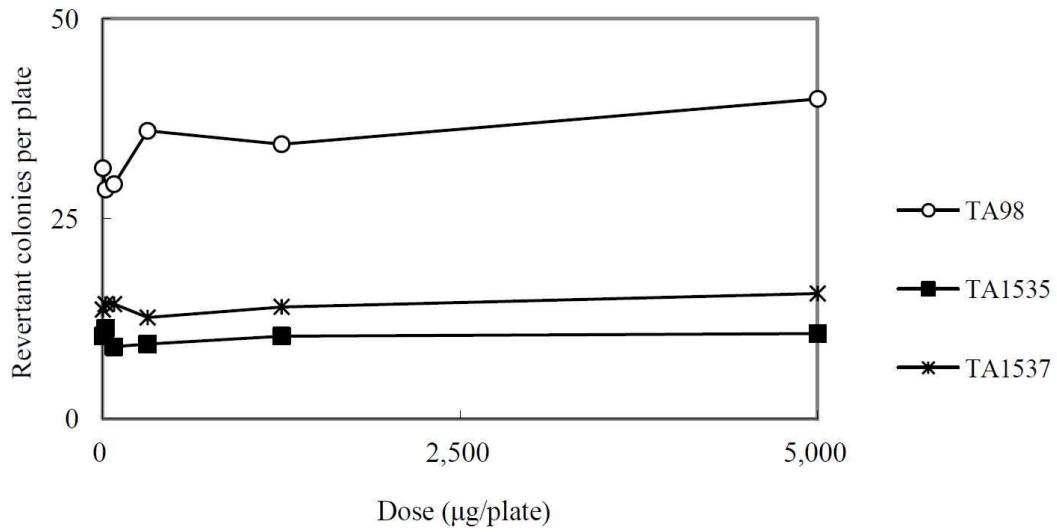
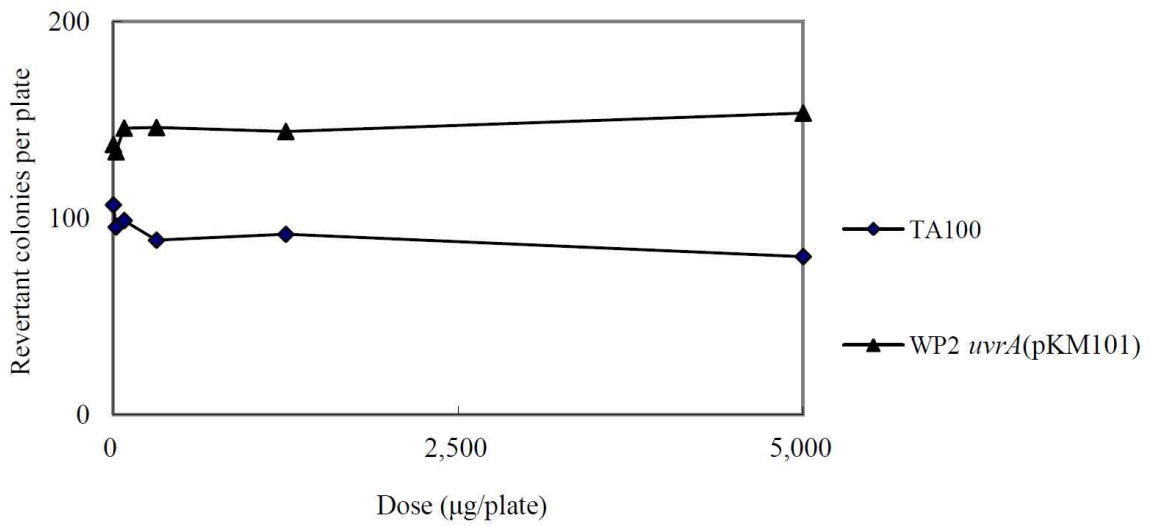
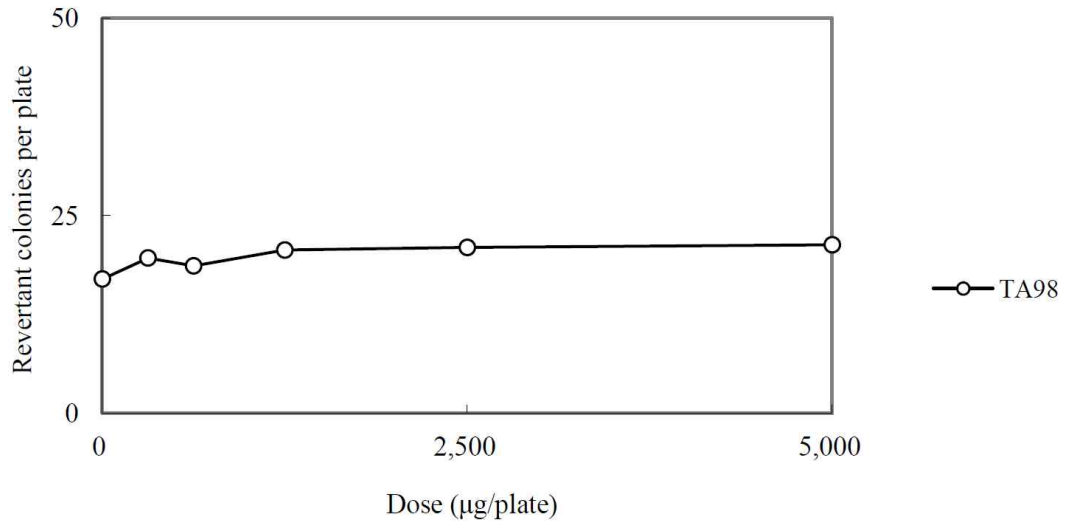


Figure 4. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation  
(Dose Range Finding Study : TA100 and WP2 *uvrA*(pKM101))

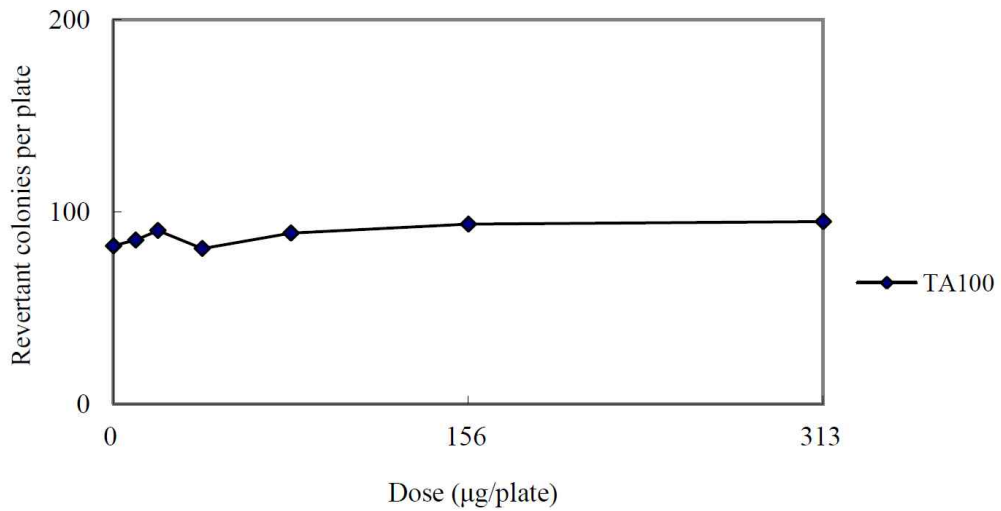


- 1) Figure 5. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation
- 2) (Main Study: TA98)



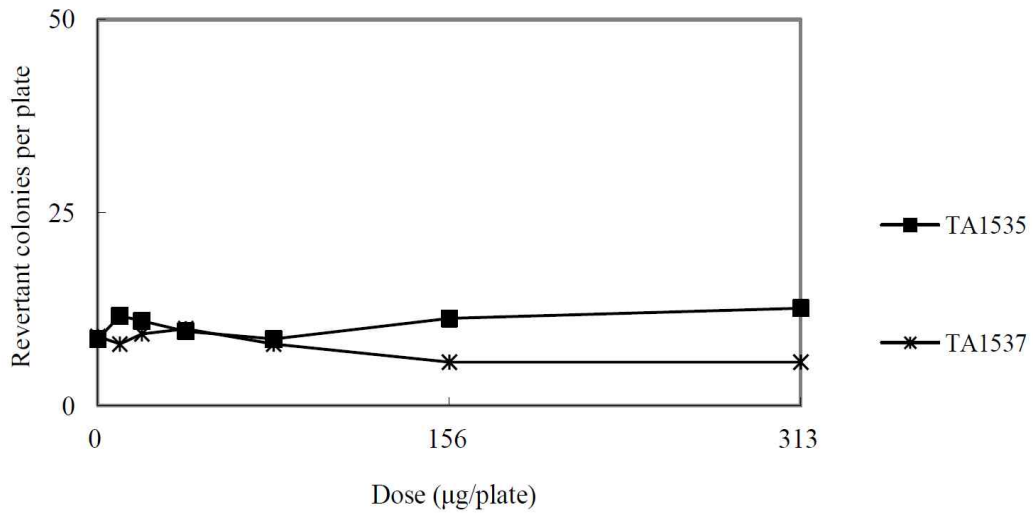
3) Figure 6. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation

4) (Main Study : TA100)



5) Figure 7. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation

6) (Mainstudy:TA1535andTA1537)

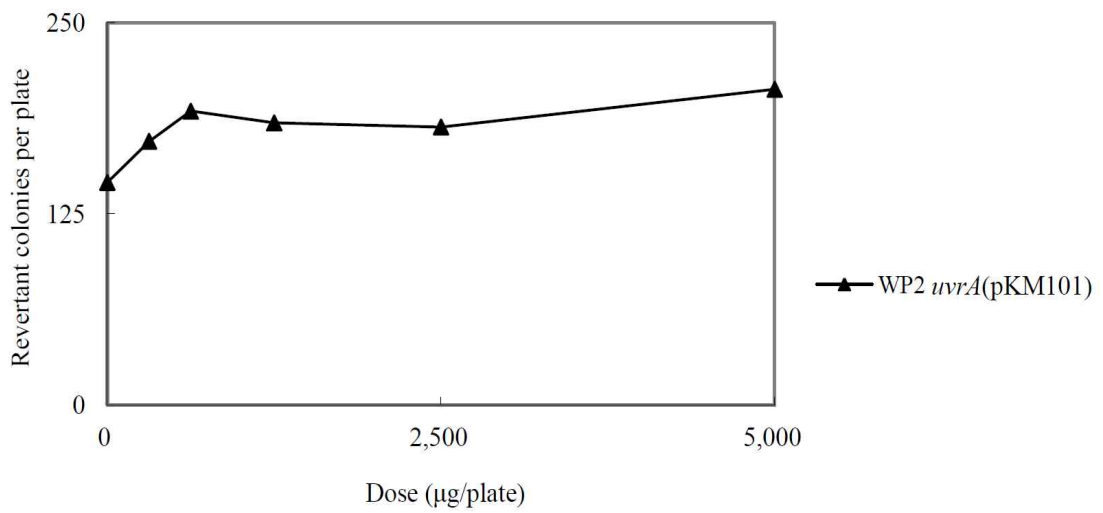


7)

8)

9) Figure 8. Dose-response Curve in the Absence of Metabolic Activation

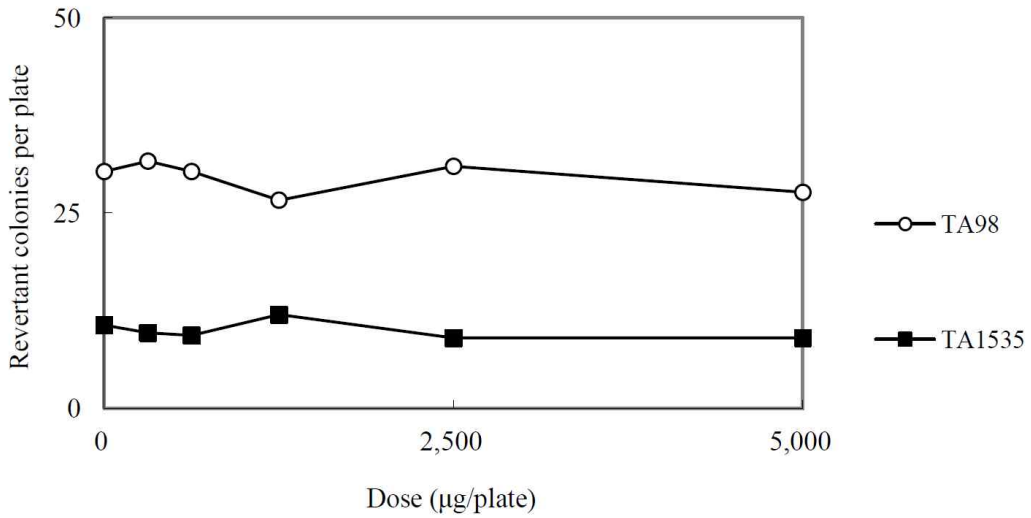
10) (Main Study : WP2 *uvrA*(pKM101))



11)

12) Figure 9. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation

13) (Main Study : TA98 and TA1535)

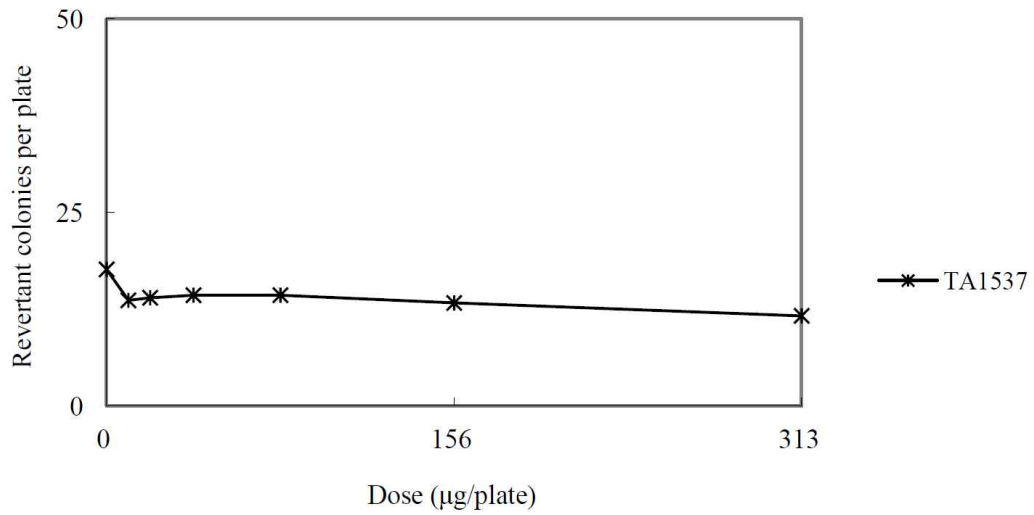


14)

15)

16) Figure 10. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation

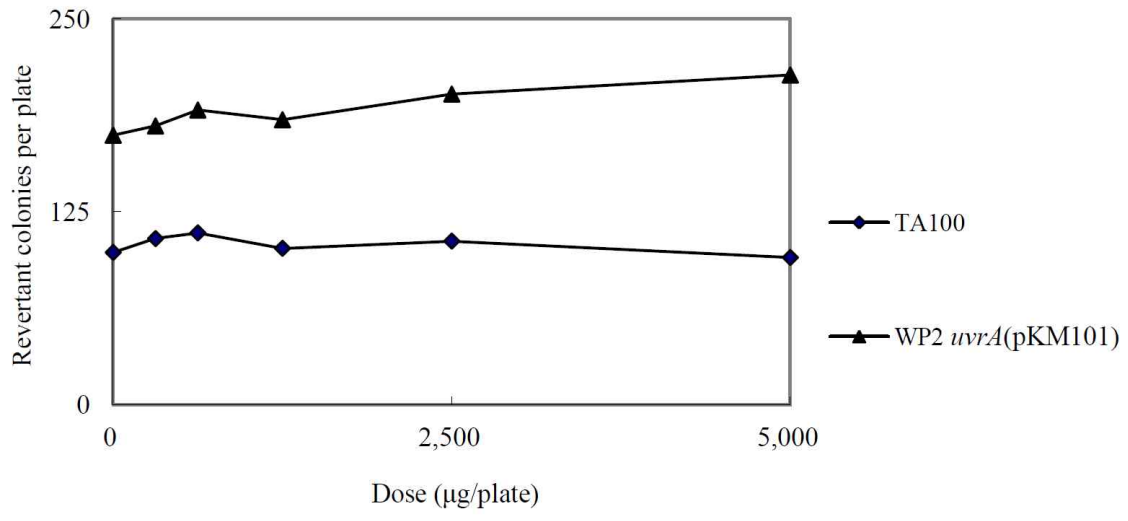
17) (Main Study : TA1537)



18) Figure 11. Dose-response Curve in the Presence of Metabolic Activation

19) (MainStudy:TA100 and WP2uvrA(pKM101))





TABLES

20) Table 1. The Number of Revertant Colonies per Plate in Absence of Metabolic Activation

21) (Dose Range Finding Study)

Strain	Test substance	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	19 , 17 , 15	17	2
		19.5	11 , 10 , 15	12	3
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	78.1	17 , 16 , 11	15	3
		313	13 , 16 , 13	14	2
		1,250	22 , 20 , 12	18	5
		5,000	10 , 12 , 14	12	2
2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	495 , 559 , 567	540	39	
TA100	Water for injection	0	95 , 82 , 97	91	8
		19.5	102 , 82 , 94	93	10
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	78.1	86 , 84 , 116	95	18
		313	88* , 75* , 81*	81	7
		1,250	68* , 74* , 71*	71	3
		5,000	81* , 86* , 86*	84	3
Sodium azide (SA)	1.5	503 , 536 , 494	511	22	
TA1535	Water for injection	0	10 , 7 , 11	9	2
		19.5	11 , 6 , 14	10	4
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	78.1	8 , 6 , 8	7	1
		313	9* , 11* , 12*	11	2
		1,250	6* , 7* , 10*	8	2
		5,000	10* , 8* , 11*	10	2
Sodium azide (SA)	1.5	403 , 458 , 437	433	28	
TA1537	Water for injection	0	9 , 11 , 11	10	1
		19.5	12 , 11 , 10	11	1
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	78.1	13 , 15 , 16	15	2
		313	13* , 10* , 4*	9	5
		1,250	6* , 8* , 12*	9	3
		5,000	11* , 12* , 11*	11	1
9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	274 , 270 , 245	263	16	
WP2uvrA (pKM101)	Water for injection	0	117 , 120 , 118	118	2
		19.5	115 , 135 , 115	122	12
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	78.1	135 , 135 , 131	134	2
		313	136 , 156 , 120	137	18
		1,250	129 , 136 , 145	137	8
		5,000	163 , 158 , 145	155	9
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)	0.005	930 , 1002 , 884	939	59	

S.D.: Standard Deviation

\*: Indicated growth inhibition

Table 2. The Number of Revertant Colonies per Plate in Presence of Metabolic Activation (Dose Range Finding Study)

Strain	Test substance	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	31 , 33 , 30	31	2
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	19.5	29 , 25 , 32	29	4
		78.1	23 , 31 , 34	29	6
		313	37 , 39 , 32	36	4
		1,250	38 , 32 , 33	34	3
		5,000	40 , 38 , 42	40	2
	2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	211 , 312 , 240	254	52
TA100	Water for injection	0	107 , 114 , 99	107	8
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	19.5	80 , 93 , 113	95	17
		78.1	104 , 101 , 91	99	7
		313	86 , 89 , 91	89	3
		1,250	109 , 74 , 92	92	18
		5,000	71 , 91 , 79	80	10
	2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	532 , 479 , 472	494	33
TA1535	Water for injection	0	13 , 7 , 11	10	3
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	19.5	12 , 10 , 12	11	1
		78.1	5 , 10 , 12	9	4
		313	9 , 8 , 11	9	2
		1,250	7 , 12 , 12	10	3
		5,000	10 , 11 , 11	11	1
	2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	83 , 95 , 80	86	8
TA1537	Water for injection	0	12 , 15 , 14	14	2
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	19.5	14 , 13 , 16	14	2
		78.1	14 , 14 , 15	14	1
		313	11* , 13* , 14*	13	2
		1,250	14* , 15* , 13*	14	1
		5,000	17* , 20* , 10*	16	5
	2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	97 , 120 , 103	107	12
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	Water for injection	0	136 , 123 , 153	137	15
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	19.5	131 , 129 , 141	134	6
		78.1	149 , 158 , 130	146	14
		313	158 , 143 , 137	146	11
		1,250	157 , 138 , 137	144	11
		5,000	163 , 141 , 156	153	11
	2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	318 , 317 , 288	308	17

S.D.: Standard Deviation

\*: Indicated growth inhibition

22) Table 3. The Number of Revertant Colonies per Plate in Absence of Metabolic

23) Activation (Main Study)

Strain	Test substance	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	18 , 15 , 18	17	2
		313	21 , 18 , 20	20	2
		625	19 , 15 , 22	19	4
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	1,250	16 , 20 , 26	21	5
		2,500	23 , 19 , 21	21	2
		5,000	24 , 22 , 18	21	3
		2-Nitrofluorene (2-NF)	5.0	636 , 785 , 606	676
TA100	Water for injection	0	86 , 78 , 83	82	4
		9.77	85 , 71 , 100	85	15
		19.5	107 , 87 , 77	90	15
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	39.1	90 , 78 , 75	81	8
		78.1	89 , 100 , 78	89	11
		156	71 , 105 , 105	94	20
		313	101* , 81* , 103*	95	12
Sodium azide (SA)	1.5	574 , 574 , 555	568	11	
TA1535	Water for injection	0	10 , 9 , 7	9	2
		9.77	14 , 13 , 8	12	3
		19.5	12 , 10 , 11	11	1
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	39.1	12 , 8 , 9	10	2
		78.1	8 , 7 , 11	9	2
		156	13 , 8 , 13	11	3
		313	13* , 11* , 14*	13	2
Sodium azide (SA)	1.5	479 , 505 , 457	480	24	
TA1537	Water for injection	0	13 , 7 , 7	9	3
		9.77	6 , 7 , 11	8	3
		19.5	7 , 11 , 10	9	2
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	39.1	8 , 15 , 7	10	4
		78.1	7 , 7 , 10	8	2
		156	4 , 5 , 8	6	2
		313	4* , 9* , 4*	6	3
9-Aminoacridine (9-AA)	80.0	391 , 472 , 389	417	47	
24) WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	Water for injection	0	137 , 155 , 145	146	9
		313	161 , 171 , 186	173	13
		625	194 , 186 , 197	192	6
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	1,250	192 , 183 , 179	185	7
		2,500	181 , 192 , 173	182	10
		5,000	214 , 207 , 199	207	8
		2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF2)	0.005	1081 , 1074 , 1127	1094

S.D.: Standard Deviation

\*: Indicated growth inhibition

25) Table 4. The Number of Revertant Colonies per Plate in Presence of Metabolic Activation (Main Study)

Strain	Test substance	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Water for injection	0	28 , 32 , 31	30	2
		313	32 , 30 , 33	32	2
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	625	25 , 38 , 28	30	7
		1,250	28 , 20 , 32	27	6
		2,500	31 , 30 , 32	31	1
		5,000	21 , 28 , 34	28	7
2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	196 , 234 , 215	215	19	
TA100	Water for injection	0	105 , 95 , 96	99	6
		313	105 , 116 , 102	108	7
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	625	118 , 107 , 109	111	6
		1,250	104 , 99 , 101	101	3
		2,500	91 , 112 , 115	106	13
		5,000	96 , 85 , 105	95	10
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	286 , 398 , 365	350	58	
TA1535	Water for injection	0	8 , 13 , 11	11	3
		313	14 , 8 , 7	10	4
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	625	7 , 9 , 12	9	3
		1,250	11 , 13 , 12	12	1
		2,500	9 , 10 , 8	9	1
		5,000	9 , 10 , 8	9	1
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	110 , 113 , 72	98	23	
TA1537	Water for injection	0	18 , 17 , 18	18	1
		9.77	9 , 16 , 16	14	4
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	19.5	17 , 13 , 12	14	3
		39.1	18 , 18 , 7	14	6
		78.1	11 , 13 , 19	14	4
		156	10 , 14 , 16	13	3
313	14* , 10* , 11*	12	2		
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	127 , 77 , 113	106	26	
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	Water for injection	0	159 , 186 , 179	175	14
		313	177 , 182 , 183	181	3
	Ultrasonication processed ginseng berry extract	625	192 , 186 , 195	191	5
		1,250	172 , 193 , 189	185	11
		2,500	192 , 200 , 212	201	10
		5,000	201 , 224 , 216	214	12
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	417 , 311 , 368	365	53	

S.D.: Standard Deviation

\*: Indicated growth inhibition

26) Table 5. Historical Control Data

Historical negative control values of revertant colonies									
Strain	S9 mix	N	Mean	±	S.D.	Range			
						Lower	Upper		
TA100	-	152	74.8	±	11.3	43.8	105.9		
	+	152	84.4	±	12.6	51.5	117.4		
TA1535	-	152	9.0	±	1.8	3.4	14.6		
	+	152	8.5	±	2.0	3.1	13.9		
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-	152	114.3	±	21.2	57.4	171.2		
	+	152	135.3	±	20.6	80.1	190.5		
TA98	-	152	16.3	±	2.9	7.9	24.7		
	+	152	23.8	±	3.8	13.9	33.6		
TA1537	-	152	6.8	±	1.5	2.6	10.9		
	+	152	13.7	±	2.4	7.6	19.8		
Historical positive control values of revertant colonies									
Strain	S9 mix	Positive control	Dose (µg/plate)	N	Mean	±	S.D.	Range	
								Lower	Upper
TA100	-	SA	1.5	152	529.1	±	71.1	369.8	688.3
	+	2-AA	2.0	137	484.8	±	126.2	199.5	770.1
TA1535	-	SA	1.5	152	442.1	±	56.8	305.2	579.0
	+	2-AA	3.0	137	100.4	±	25.7	42.3	158.5
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	-	AF2	0.005	152	719.7	±	172.8	308.9	1130.6
	+	2-AA	2.0	137	413.4	±	74.3	222.0	604.9
TA98	-	2-NF	5.0	152	580.4	±	100.5	332.7	828.1
	+	2-AA	1.0	137	275.5	±	60.7	147.9	403.0
TA1537	-	9-AA	80.0	152	362.2	±	114.9	78.9	645.5
	+	2-AA	3.0	137	131.4	±	34.9	49.8	213.0

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, Acetone, 0.5% methyl cellulose 1,500centipoise solution, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution

- 27) SA : Sodium azide  
 2-AA : 2-Aminoanthracene  
 AF2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
 2-NF : 2-Nitrofluorene  
 9-AA : 9-Aminoacridine

The above historical control values were obtained from the data pooled from June 7, 2012 to Dec. 28, 2013.

The range was calculated by the control limit of X derived from  $\bar{X}-\bar{R}$ - $\bar{R}_s$  value.

## 라. 초음파처리 인삼열매 추출물의 마우스를 이용한 소핵시험

### 요 약

시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발 유무를 평가하기 위하여 수컷 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구투여하여 검토하였다.

본시험의 최고용량을 설정하기 위해, 5000mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 2500, 1250, 625 및 313 mg/kg으로 용량설정시험을 실시한 결과, 모든 용량에서 사망동물은 관찰되지 않았으나, 투여 후 1일째에 1250mg/kg 이상의 용량에서 시험물질색변(Compound-colored stool)이 관찰되었다.

따라서, 본시험의 최고용량은 5000mg/kg으로 하고, 이하 공비 2로 2용량 (2500 및 1250mg/kg)의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군에는 주사용수를, 양성대조군에는 Mitomycin C를 설정하였다.

검체제작설정시험에서는 용량설정시험에서 설정된 최고용량 (5000mg/kg)을 투여한 후, 투여 후 24, 48 및 72시간에 골수를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰한 결과, 모든 관찰시간대에서 소핵유발은 증가되지 않았기 때문에 일반적으로 사용되는 투여 후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 설정하였다.

본시험의 결과, 시험물질군의 다염성적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한, 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 총 적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물은 본 시험의 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

### 1. 시험실시의 개요

#### 1.1 시험목적

마우스골수세포를 이용하여 시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물의 소핵유발유무를 평가하였다.

#### 1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations를 준수하였다.

- “비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2013-40호 (2013년 4월 5일)

#### 1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

- “의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2013-121호 (2013년 4월 5일)

#### 1.4 동물윤리

본 시험은 동물보호법(제정1991년5월31일 법률 제4379호, 일부개정2013년8월13일 법률 제12051호)에 근거한 (주)바이오톡스텍의 동물실험윤리위원회에 의해 승인되었다 (승인번호:140064).

#### 1.5 수의학적 관리

본 시험은 동물보호법 및 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따른 수의학적 관리가 이루어졌다.

#### 1.6 시험의뢰자

명칭 고연(高研)

주소 우390-711 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112

TEL + 82-43-649-1433 FAX + 82-43-649-1759

#### 1.7 시험기관

명칭 (주)바이오톡스텍

주소 우363-883 충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 53

TEL + 82-43-210-7777 FAX + 82-43-210-7778

#### 1.8 시험책임자

성명 김선경

소속 특수독성부

#### 1.9 시험일정

시험개시일	2014년 2월 7일
실험개시일	2014년 3월 10일
용량설정시험	
- 동물입수일	2014년 2월 11일
- 투여일	2014년 2월 17일
- 일반증상 관찰일	2014년 2월 17일 ~2월 20일
검체제작시간 설정시험	
- 동물입수일	2014년 2월 18일
- 투여일	2014년 2월 24일
- 검체제작 및 염색일	2014년 2월 25일 ~2월 28일
- 검체관독일	2014년 3월 4일 ~3월 5일
본시험	
- 동물입수일	2014년 3월 4일



- 검역·순화종료일	2014년 3월 10일
- 군분리일	2014년 3월 10일
- 시험물질 투여일	2014년 3월 10일
- 검체제작 및 염색일	2014년 3월 11일 ~3월 12일
- 검체판독일	2014년 3월 15일 ~3월 25일
실험종료일	2014년 3월 25일
시험종료일	2014년 00월 00일

## 1.10 시험담당자

검역	이진희
검역·순화기간의 일반증상관찰	홍승영, 김수환, 이에나, 박초롱, 김선경
검역·순화기간의 체중측정	홍승영, 김수환, 남혜영
시험물질 보관	김은애
시험물질 조제	김보리, 김진아
투여	홍승영, 김수환, 남혜영
일반증상관찰	홍승영, 김수환, 남혜영, 김선경
체중측정	홍승영
검체제작 및 염색	김수환, 남혜영, 이에나, 박초롱, 김선경
검체판독	홍승영, 김수환
통계	이진완

## 1.11 기록 및 자료의 보관

1.11.1 보관기간 시험종료 후 5년간 보관  
이후의 보관은 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

### 1.11.2 보관장소

명칭 (주)바이오톡스텍 자료보관실  
주소 우363-883 충청북도 청원군 오창읍 연구단지 53

### 1.11.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 최종보고서, 기초자료 및 검체 (평가가능한 품질이 유지되는 기간 동안 보관), 통신연락문서

## 2. 시험재료 및 방법

### 2.1 시험물질

2.1.1 물질명 초음파처리 인삼열매 추출물 (Ultrasonication processed ginseng berry extract)

2.1.2 Lot No. UGBE (001)

2.1.3	성상	갈색분말
2.1.4	성분	Ginsenosides
2.1.5	친화성	Hydrophilic
2.1.6	위험성	인습성
2.1.7	제조일	2014년 1월 22일
2.1.8	유효기간	2016년 1월 22일 (제조 후 2)
2.1.9	보관조건	냉장 (3.8~6.5℃), 제습
2.1.10	취급시 주의사항	특이사항 없음
2.1.11	제공자	
	명칭	고연 (高研)
	주소	우390-711 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112
2.1.12	수령일	2014년 1월 27일
2.1.13	잔여시험물질의 처리	시험종료 후 반환

## 2.2 음성대조물질

2.2.1	명칭	주사용수
2.2.2	Lot No.	DBA3006
2.2.3	보관조건	실온
2.2.4	제조사	Choongwae Pharma Corp., Korea
2.2.5	선택이유	본시험의 부형제인 주사용수를 선택하였다.

## 2.3 양성대조물질

2.3.1	명칭	Mitomycin C (MMC)
2.3.2	Lot No.	SLBC1982V
2.3.3	보관조건	냉장

2.3.4 제조자 Sigma-Aldrich U.S.A.

## 2.4 조제 및 분석

### 2.4.1 시험물질의 조제

#### 2.4.1.1 부형제

##### 2.4.1.1.1 명칭 주사용수

##### 2.4.1.1.2 Lot No. DBA3006

##### 2.4.1.1.3 선택이유

시험의뢰자의 정보 및 부형제 검토를 실시한 결과, 주사용수에 균일하게 현탁되었기 때문에 주사용수를 선택하였다.

##### 2.4.1.2 조제방법

시험물질의 조제는 투여일에 실시하였다.

필요량의 시험물질을 칭량한 후 (CPA224S, CP323S, Santorius, Germany), 현탁시킨 후, 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다.

### 2.4.2 양성물질의 조제

Mitomycin C (MMC) 2 mg에 주사용수 (Lot No.: 12037, Choongwae Pharma Corp., Korea)을 더하여 0.2mg/mL로 조제하였다.

### 2.4.3 시험물질액의 분석

시험물질액의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

## 2.5 시험계

### 2.5.1 종 및 계통 마우스, CrljOri:CD1(ICR),SPF

### 2.5.2 생산자 및 입수처 ORIENTBIO INC., Korea

### 2.5.3 종 및 계통의 선택이유

ICR 마우스는 설치류로서 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

### 2.5.4 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

용량설정시험: 수컷, 10마리, 7주령, 29.0 ~ 31.4g

본시험: 수컷, 27마리, 7주령, 27.9 ~ 32.2g

### 2.5.5 투여시의 동물수, 주령 및 체중

용량설정시험: 수컷, 15마리, 8주령, 32.0 ~ 34.0g

검체제작시간 설정시험: 수컷, 9마리, 8주령, 32.7 ~ 35.5g

본시험: 수컷, 25마리, 8주령, 32.1 ~ 34.9g

#### 2.5.6 검역·순화

반입시 동물의 외관 검사를 실시한 후, 체중을 측정하였다. (BP410S, Sartorius, Germany). 7 일간의 순화기간 중에 매 1회 일반증상을 관찰하였다. 단, 동물입수시 검역실에서 3일간 일반 증상을 관찰한 동물실로 이동하였다.

검역·순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 동물의 건강상태에 이상이 없는 것을 확인하였다.

#### 2.5.7 개체 및 사육상자 식별

순화기간중에는 입수시에 체중 측정한 동물의 꼬리에 적색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 검역·순화기간 중 개체식별카드를 부착하였다.

관찰기간중에는 군분리시에 동물의 꼬리에 청색의 유성펜을 이용하여 개체표시를 하였다. 사육 상자에는 색깔별로 라벨을 부착하여 식별하였다.

#### 2.5.8 군분리

군분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물을 이용하여 순화종료일(군분리일)에 실시하였다. 군분리일에 평균체중에서 벗어난 개체를 순서대로 제외하고, 필요 동물 수 (용량설정 시험: 15마리, 검체제작시간 설정시험: 9마리, 본시험: 25마리)를 선별하였다. 선별한 동물은 각 군의 평균체중이 균등하도록 군분리하였다.

#### 2.5.9 잔여동물의 처리

잔여동물은 군분리 종료후 시험계로부터 제외시켰다.

## 2.6 사육환경조건

2.6.1 검역실번호 A314

2.6.2 동물실번호 A324

2.6.3 사육상자의 종류, 크기

순화기간중: 폴리카보네이트 케이스, 260Wx420Dx180H(mm)

시험기간중: 폴리카보네이트 케이스, 200Wx260Dx130H(mm)

2.6.4 사육상자당 수용동물 수

검역 및 순화기간중:

용량설정시험 8 ~ 9 마리

검체제작시간 설정시험 10 마리

본시험 9 마리

시험기간중:

용량설정시험 3 마리

검체제작시간 설정시험 3 마리

본시험

2.6.5 온도 20.6 ~ 23.0℃ (A314)

21.6 ~ 24.6℃ (A324)

2.6.6 상대습도 48.1 ~ 69.1% (A314)

41.5 ~ 59.0% (A324)

2.6.7 환기회수 10 ~ 15 회/시간

2.6.8 명암주기 (조명시간) 12 시간/일 (오전 7시부터 오후 7시)

2.6.9 조도 150 ~ 300 Lux

2.6.10 사육기재의 교환 및 세척

사육상자 및 급이기는 1회/2주, 급수병은 2회/주 빈도로 교환하였다.

사육기재는 자동세척기를 이용하여 세척하고, 고압증기멸균기를 이용하여 멸균하였다.

## 2.7 사료

2.7.1 종류

실험동물용 고품사료(Teklad Certified Irradiated Global 18% Protein Rodent Dite2918C)

2.7.2 Lot Nos. 2918C-100913MA, 2918C-120113MA

2.7.3 제조자 Harlan Laboratories, Inc., U.S.A.

2.7.4 급이방법

급이기에 고품사료를 넣어 자유섭취시켰다.

2.7.5 사료의 분석 및 확인

사료의 분석은 Harlan Laboratories, Inc.에서 제공받은 사용로트의 분석성적서를 확인하여 분석결과가 본사에서 정한 허용한계치범위 내에 속하는지를 확인하였다.

## 2.8 음수

2.8.1 종류

청주시 수돗물을 필터유수살균기로 여과 후 자외선을 조사한 정제수

2.8.2 음수의 분석 및 확인

음수의 분석은 충청북도 보건환경연구원 (충청북도 청원군 오송읍 오송생명1로 184에 의뢰하여 「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」(환경부령 제439호, 2011년 12월 30일, 일부개정)의 전 항목에 대해 실시하였다. 모든 항목에 대한 검사는 1회/년 미생물 검사는 1회/월 실시하여, 그 분석결과가 본사에서 정한 허용기준치범위 내에 속하는지를 확인하였다.

## 2.9 용량설정시험

본시험의 용량을 설정하기 위해 비GLP 시험으로 실시하였다.

### 2.9.1 투여용량

가이드라인에서 정하고 있는 최고용량은 2000mg/kg이지만, 시험물질이 건강기능식품인 것을 고려하여, 임상예정용량인 1000mg/human/day (1일, 성인 60kg 기준시 16.7mg/kg)의 약 300배에 해당하는 5000mg/kg을 최고용량으로 하고, 이하 2500, 1250, 625 및 313mg/kg의 4 용량을 설정하였다.

### 2.9.2 투여방법

1용량당 3마리로 하였다.

테프론제 존데를 장착한 주사기 (1mL)를 사용하여 강제경구 투여하였다. 투여액량은 10mL/kg으로 하고, 균분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

### 2.9.3 일반증상 및 사망동물 관찰

투여직후, 투여 후 2시간, 투여 후 1, 2, 및 3일에 각 용량별 일반증상 및 사망동물을 관찰하였다.

### 2.9.4 본시험의 용량설정 (Table 1)

용량설정시험의 결과, 모든 용량에서 시험물질에 의한 사망동물은 관찰되지 않았지만, 투여 1 일째에 1250mg/kg 이상의 용량에서 시험물질색변(Compound-colored stool)이 관찰되었다. 따라서, 본시험의 최고용량은 5000mg/kg으로 하고, 이하 공비 2로 2용량 (2500 및 1250mg/kg)의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

## 2.10 검체제작시간 설정시험

본 시험의 검체제작시간 설정하기 위해 비GLP시험으로 실시하였다.

### 2.10.1 투여방법

용량설정시험에서 설정한 최고용량 (5000mg/kg)을 1회 경구투여하고, 투여 후 24, 48 및 72 시간째에 골수세포를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰하였다.

각 시간당 동물은 3마리로 하였다. 투여액량은 10ml/kg로 하고, 균분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

### 2.10.2 일반증상 및 사망동물 관찰 (Table 2)

시험물질 투여직후 (투여 0일), 투여후 2시간, 투여후 1, 2 및 3일에 일반 증상을 관찰하였다. 투여 1일째에 모든 시간대에서 시험물질색변 (Compound-colored stool)이 관찰되었다.

### 2.10.3 검체제작시간의 설정 (Table 3)

투여 후 24, 48 및 72시간에 소핵유발빈도를 확인한 결과, 모든관찰시간대에서 소핵유발은 증

가되지 않았기 때문에 일반적으로 사용되는 투여후 24시간을 본시험의 골수채취시간으로 하였다.

## 2.11 군구성

각군에 5마리의 동물을 사용하여 5군으로 설정하였다.

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	투여 횟수	투여 경로	마리수 (개체번호)
G1 음성대조	0	10	1	경구	5 (1101-1105)
G2 저용량	1,250	10	1	경구	5 (1201-1205)
G3 중용량	2,500	10	1	경구	5 (1301-1305)
G4 고용량	5,000	10	1	경구	5 (1401-1405)
G5 양성대조	2	10	1	복강내	5 (1501-1505)

## 2.12 투여

### 2.12.1 투여경로

경구투여

### 2.12.2 투여경로의 선택이유

시험물질의 임상적용예정경로를 고려하여 경구투여를 선택하였다.

### 2.12.3 투여방법 및 투여횟수

시험물질은 테프론제 존데를 장착한 주사기 (1ml)를 사용하여 1회 강제 경구투여하였다.

음성대조군은 시험물질과 같은 방법으로 부형제를 1회 강제경구 투여하였다.

양성대조물질 MMC는 일반적으로 많이 사용되고 있는 복강에 1mL (26G) 주사기를 이용하여 1회 투여하였다.

투여액량은 10mL/kg로 하고, 군분리시 체중을 기초로 하여 산출하였다.

## 2.13 관찰 및 평가

### 2.13.1 일반증상 및 사망동물 관찰

일반증상 관찰은 투여직후 (투여 0일), 투여후 2시간 및 검체제작일까지 24시간간격으로 실시 하며, 각 용량의 사망동물을 관찰하였다.

### 2.13.2 체중측정

체중은 투여일 (투여 0일) 및 골수채취직전에 측정 (BP410S, Sartorius, Germany)하였다.

2.13.3 골수세포의 채취 및 도말검체의 제작 시험물질 투여후 각군의 검체제작시간에 동물을 경추탈골하였다.

대퇴골을 적출하여 근육질을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200 $\mu$ L의 우태



아 혈청 (Fetal bovine serum, Invitrogen, U.S.A.)을 골수세포부유액은 1000rpm에서 5분간 원심분리 (MICRO17TR, Hanil Science Industrial, Korea)하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드글라스에 떨어뜨려 도말하였다. 개체당 2매의 골수도말검체를 제작하였다. 슬라이드글라스에 개별번호를 기입하고 충분히 건조시킨 후, 메탄올로 고정하였다. 3% Giemsa 염색액 (0.01 mol/L Sörenson 인산완충액 (pH 6.8)으로 조제)으로 30분간 염색하였다.

#### 2.13.4 검체의 관찰

코드화된 골수도말표본을 1,000배 배율의 현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 검체 1장당 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte)를 1,000개씩 관찰하고, 1개체당 2,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 개체마다 다염성적혈구에 대한 소핵다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현율을 구하였다. 골수세포의 증식억제의 지표로서, 검체 1장당 총적혈구 250개를 관찰하여, 1개체당 500개의 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비를 구하였다.

#### 2.14 시험의 성립조건

아래의 조건을 만족하는 경우 성립으로 하였다.

- 음성대조군 및 양성대조군에 있어 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 historical control data의 범위내에 있을 것.

#### 2.15 결과의 판정

아래의 조건을 만족하는 경우 양성으로 판정하였다.

- 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum and Bowman의 추정학적 통계방법을 사용하여 검증하고, 통계학적으로 유의하게 증가할 것.

#### 2.16 자료의 통계처리

소핵다염성적혈구의 출현빈도는 Kastenbaum & Bowman의 추정학적 통계방법을 이용하여 검증하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 다염성적혈구의 출현빈도 및 체중의 변화는 통계처리 프로그램 (version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)을 사용하여 통계해석을 실시하였다. Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다 (유의수준: 0.05). 등분산으로 확인되어, One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하였다 (유의수준: 0.05).

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 일반증상 및 사망동물의 관찰 (Table 4)

시험기간 동안 모든 용량에서 시험물질에 의한 사망동물은 관찰되지 않았지만, 투여 후 1일째에 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg에서 시험물질색변 (Compound-colored stool)이 관찰되었다.

#### 3.2 체중변화 (Table 5)

시험기간 동안 모든 용량에서 음성대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화가 관찰되지 않았다 ( $p \geq 0.05$ , ANOVA).

### 3.3 소핵유발 출현빈도 (Table 6)

시험물질군에서는 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte) 중 소핵다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ( $p \geq 0.05$ , Kastenbaum & Bowman). 또한, 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았다 ( $p \geq 0.05$ , ANOVA).

양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군에 비해 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.01$ , Kastenbaum & Bowman). 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교시 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ( $p \geq 0.05$ , ANOVA).

### 3.4 시험의 성립 (Table 7)

음성대조군 및 양성대조군의 소핵다염성적혈구의 출현빈도는 historical control data의 정상범위에 있었기 때문에 본시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것으로 판단하였다.

## 4. 결론

이상의 결과로부터 시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물은 본시험 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

## TABLES

Table 1. Clinical signs (Dose range finding study)

Test substance	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing				
					0		1	2	3
					Post dosing	2 hours post dosing			
Ultrasonication processed ginseng berry extract	313	P.O.	3	NOA	3	3	3	3	3
	625	P.O.	3	NOA	3	3	3	3	3
	1,250	P.O.	3	NOA	3	3	0	3	3
				Compound-colored stool	0	0	3	0	0
	2,500	P.O.	3	NOA	3	3	0	3	3
				Compound-colored stool	0	0	3	0	0
	5,000	P.O.	3	NOA	3	3	0	3	3
				Compound-colored stool	0	0	3	0	0

NOA: No Observable Abnormality

P.O.: Per Os

Table 2. Clinical signs (Sampling time determining study)

Test substance	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing				
					0				
					Post dosing	2 hours post dosing	1	2	3
Ultrasonication processed ginseng berry extract	5,000	P.O.	3	NOA	3	3	0	-	-
				Compound- colored stool	0	0	3	-	-
			3	NOA	3	3	0	3	-
				Compound- colored stool	0	0	3	0	-
			3	NOA	3	3	0	3	3
				Compound- colored stool	0	0	3	0	0

NOA : No Observable Abnormality

P.O. : Per Os

- : No data

Table 3. Results (Sampling time determining study)

Test Substance	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE
Ultrasonication processed ginseng berry extract	5,000	P.O.	24	B1101	119 / 500	0 / 2000
				B1102	134 / 500	2 / 2000
				B1103	157 / 500	1 / 2000
				Total	410 / 1500	3 / 6000
				% (Mean±S.D.)	27.3 ± 3.83	0.050 ± 0.050
				B1201	163 / 500	0 / 2000
			B1202	136 / 500	0 / 2000	
			B1203	168 / 500	1 / 2000	
			Total	467 / 1500	1 / 6000	
			% (Mean±S.D.)	31.1 ± 3.44	0.017 ± 0.029	
			72	B1301	165 / 500	1 / 2000
				B1302	115 / 500	0 / 2000
				B1303	186 / 500	0 / 2000
				Total	466 / 1500	1 / 6000
				% (Mean±S.D.)	31.1 ± 7.29	0.017 ± 0.029

P.O.: Per Os

S.D.: Standard Deviation

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

Table 4. Clinical signs (Main study)

	Group	Dose (mg/kg)	Route	No. of animals	Clinical signs	Days after dosing		
						0		1
						Post dosing	2 hours post dosing	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	5	NOA	5	5	5
Test substance	Ultrasonication processed ginseng berry extract	1,250	P.O.	5	NOA	5	5	0
					Compound- colored stool	0	0	5
		2,500	P.O.	5	NOA	5	5	0
					Compound- colored stool	0	0	5
		5,000	P.O.	5	NOA	5	5	0
					Compound- colored stool	0	0	5
Positive control	MMC	2	I.P.	5	NOA	5	5	5

NOA : No Observable Abnormality

P.O. : Per Os

I.P. : Intraperitoneal

MMC : Mitomycin C

Table 5. Body weight (Main study)

						(unit: g)	
Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	Days after treatment		
					0	1	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	34.9	34.0
					1102	33.8	32.9
					1103	33.8	33.0
					1104	32.7	31.9
					1105	32.6	31.8
					Mean	33.6	32.7
					S.D.	0.93	0.91
Test substance	1,250	P.O.	24	1201	34.7	33.8	
				1202	33.9	33.5	
				1203	33.3	32.2	
				1204	33.0	32.3	
				1205	32.6	32.4	
				Mean	33.5	32.8	
				S.D.	0.81	0.74	
	2,500	P.O.	24	1301	34.7	33.5	
				1302	33.9	32.4	
				1303	33.3	32.7	
				1304	33.2	32.0	
				1305	32.5	32.0	
				Mean	33.5	32.5	
				S.D.	0.81	0.61	
5,000	P.O.	24	1401	34.4	33.0		
			1402	33.9	33.7		
			1403	33.2	32.6		
			1404	33.2	32.6		
			1405	32.1	32.2		
			Mean	33.4	32.8		
			S.D.	0.87	0.55		
Positive control	MMC	2	I.P.	24	1501	34.3	32.3
					1502	34.0	32.4
					1503	33.2	31.9
					1504	33.2	32.0
					1505	32.1	31.0
					Mean	33.3	31.9
					S.D.	0.85	0.57

P.O. : Per Os

I.P. : Intraperitoneal

S.D. : Standard Deviation

MMC : Mitomycin C

- : No data

Table 6. Results (Main study)

Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	PCE/(PCE+NCE)	MNPCE/ PCE	
Negative control	Water for injection	0	P.O.	24	1101	144 / 500	2 / 2000
					1102	136 / 500	1 / 2000
					1103	152 / 500	1 / 2000
					1104	144 / 500	0 / 2000
					1105	165 / 500	0 / 2000
					Total	741 / 2500	4 / 10000
					%(Mean±S.D.)	29.6 ± 2.19	0.040 ± 0.042
		1,250	P.O.	24	1201	181 / 500	1 / 2000
					1202	133 / 500	2 / 2000
					1203	149 / 500	0 / 2000
					1204	159 / 500	1 / 2000
					1205	145 / 500	0 / 2000
					Total	767 / 2500	4 / 10000
					%(Mean±S.D.)	30.7 ± 3.60	0.040 ± 0.042
Test Substance	Ultrasonication processed ginseng berry extract	2,500	P.O.	24	1301	125 / 500	0 / 2000
					1302	186 / 500	1 / 2000
					1303	157 / 500	0 / 2000
					1304	183 / 500	0 / 2000
					1305	157 / 500	0 / 2000
					Total	808 / 2500	1 / 10000
					%(Mean±S.D.)	32.3 ± 4.93	0.010 ± 0.022
		5,000	P.O.	24	1401	162 / 500	1 / 2000
					1402	173 / 500	5 / 2000
					1403	171 / 500	2 / 2000
					1404	174 / 500	1 / 2000
					1405	135 / 500	0 / 2000
					Total	815 / 2500	9 / 10000
					%(Mean±S.D.)	32.6 ± 3.27	0.090 ± 0.096
Positive control	MMC	2	I.P.	24	1501	141 / 500	141 / 2000
					1502	152 / 500	110 / 2000
					1503	162 / 500	117 / 2000
					1504	131 / 500	88 / 2000
					1505	149 / 500	78 / 2000
					Total	735 / 2500	534† / 10000
					%(Mean±S.D.)	29.4 ± 2.34	5.340 ± 1.242

P.O.: Per Os

I.P. : Intraperitoneal

MMC: Mitomycin C

S.D. : Standard Deviation

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte

Significant difference from negative control by Kastenbaum & Bowman : † p<0.01

Table 7. Historical Control Data



---



---

Historical control data (Micronucleus assay in ICR mice)

---



---

Historical control values of micronucleated polychromatic erythrocytes(MNPCE)

---

Group	Hours after administration (hrs)	Dose (mg/kg)	n	MNPCE/PCE (%) Mean±S.D.	Range [MNPCE/PCE (%)]	
					MIN	MAX
Negative control	24	0	129	0.027 ± 0.024	0.000	0.100
Positive control	24	2	129	5.780 ± 1.495	1.295	10.26

---

Historical control values of ratio of polychromatic erythrocytes(PCE) to total erythrocytes

---

Group	Hours after administration (hrs)	Dose (mg/kg)	n	PCE/NCE+PCE (%) Mean±S.D.	Range [PCE/NCE+PCE (%)]	
					MIN	MAX
Negative control	24	0	129	35.33 ± 4.546	21.70	48.97
Positive control	24	2	129	32.95 ± 4.653	18.99	46.91

---

Negative control : Including water for injection, normal saline injection, olive oil, corn oil, DMSO, PBS, 0.5% methyl cellulose 1,500cP solution, 0.5% CMC-Na solution, DMSO:Co-solvent:DW (4:80:16), 5% dextrose injectable solution, Cosolvent:water for injection (25:75), 40% PEG 400, 0.5% Citric acid, 5% lactose-monohydrate etc.

Positive control : Mitomycin C (2 mg/kg, I.P., single administration)

The above historical control values were obtained from the data pooled from Dec. 9, 2009 to Dec. 23, 2013 (24hr).

The range was calculated by the control limit from Mean ± 3×S.D.

**마. 초음파처리 인삼열매 추출물의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험**

**요약**

시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물의 염색체이상 유발성 유무를 검토하기 위하여 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포를 이용하여 염색체이상시험을 실시하였다. 본시험의 최고용량을 설정하기 위해, 5,000 µg/mL을 최고용량으로 하고, 이하 2,500, 1,000, 500, 250, 100, 50, 10 및 5 µg/mL로 세포증식억제시험을 실시한 결과, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포독성이 관찰되어, 50% 세포증식억제 용량 (Inhibition concentration 50%: IC50)을 산출한 결과, 1,599.2 µg/mL이었다. 단시간처리법의 대사활성화비존재하에서는 모든 용량에서 세포독성을 명확하게 50% 이상 억제하는 용량은 관찰되지 않았고, 단시간처리법의 대사활성화존재하의 모든 용량에서는 세포독성이 관찰되지 않았다. 따라서 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 단시간처리법의 대사활성화비존재하는 5,000 µg/mL에서 약 47%의 세포독성이 관찰되었기 때문에, 판독 가능한 3용량을 확보하기 위해 이하 공비 2로 3용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 각각의 처리 계열에 대해 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량 (µg/mL)		
			5,000,	2,500,
단시간처리법	-	625		
	+	5,000, 2,500, 1,250		
연속처리법	-	1,600, 800, 400, 200		

**다.**

본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량인 5,000 µg/mL에서 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 15.5%로, 10% 이상의 양성으로 확인되었다. 또한, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량인 1,600 µg/mL 용량에서는 50% 이상의 세포독성은 없었으나, 분열중기세포 200개가 확보되지 않았기 때문에 염색체이상 유무를 확인할 수 없었다. 따라서, 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 양성결과의 용량반응성 및 재현성을 확인하고, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 판독 가능한 최고용량에 대한 염색체이상 유발성을 확인하기 위해 아래의 용량으로 추가시험을 실시하였다. 또한, 각각의 처리계열에 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	추가시험의 용량 (µg/mL)
단시간처리법	-	5,000, 4,000, 3,000
연속처리법	-	1,400, 1,200, 1,000

추가시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 4,000 및 5,000 µg/mL 에서 구조이

상을 가진 세포의 출현빈도가 각각 8.5% 및 22.0%로, 10% 이상의 양성으로 확인되었으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가되었다.

단시간처리법의 대사활성화존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 용량에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성도 관찰되지 않았다.

각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 10% 이상으로 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가되었다.

이상의 결과로부터 시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물은 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 5,000 µg/mL에서 15.5% (본시험) 및 22.0% (추가시험), 4,000 µg/mL에서 8.5%로, 본 시험의 판정조건에 따라 각각 양성 (10% 이상) 및 의 양성 (5% 이상 ~ 10% 미만)으로 판정되었다. 단시간처리법의 대사활성화존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 5% 미만의 음성으로 판정되었다.

양성으로 판정된 용량의 세포증식률은 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 5,000 µg/mL에서 38.4% (본시험) 및 36.0% (추가시험)로 음성대조군과 비교하여 60% 이상의 세포독성이 관찰되었으며, 의양성으로 판정된 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 4,000 µg/mL에서의 세포증식률은 58.4%로, 음성대조군과 비교하여 50% 미만의 세포독성이 관찰되었다.

세포독성에 의한 염색체이상 유발 가능성에 대해서는 세포독성이 높을 경우에 유전독성에 의한 것이 아니라 세포사에 의한 2차적 요인 (apoptosis, endonuclease 방출)에 의해 염색체이상이 유발되는 경우도 있다고 알려져 있다(6).

본 시험에서 염색체이상 유발빈도가 10% 이상인 용량에서 세포독성이 60% 이상 관찰된 것으로부터, 염색체이상은 유전독성에 의한 것이 아니라 세포독성에 의해 유발된 것으로 사료된다. 또한, 대사활성계를 적용한 계열 (단시간처리법의 대사활성화존재하)에서 최고용량인 5,000 µg/mL까지 염색체이상 유발성은 음성이었으며, 생체내 소핵시험 (BTT Study No.: B14021)에서도 5,000 mg/kg까지 소핵유발성이 음성으로 판정된 것으로부터 생체내 유전독성 유발 가능성은 낮을 것으로 판단된다.

## 1. 시험실시의 개요

### 1.1 시험목적

시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물에 대해 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell line)를 사용하여 염색체이상 유발성의 유무를 검토하였다.

### 1.2 Good Laboratory Practice Regulations

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations를 준수하였다.

-“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제2013-40호 (2013년 4월 5일)

### 1.3 시험기준

본 시험은 다음의 시험기준을 근거하여 실시하였다.

-“의약품등의독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제2013-121호 (2013년 4월 5일)

#### 1.4 시험의뢰자

명칭            고연 (高研)  
주소            우390-711        충청북도        제천시        세명로        65  
                  세명창업보육센터 112  
TEL            +  
                  82-43-649-1433        FAX            + 82-43-649-1759

#### 1.5 시험기관

명칭            (주)바이오톡스텍  
주소            우363-883 충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 53  
TEL            +  
                  82-43-210-7777        FAX            + 82-43-210-7778

#### 1.6 시험책임자

성명            김선경  
소속            특수독성부

#### 1.7 시험일정

시험개시일	2014년 2월 20일
실험개시일	2014년 3월 11일
세포증식억제시험	
- 세포 분주일	2014년 3월 4일
- 시험물질 처리일	2014년 3월 5일
- 세포 배양일	2014년 3월 5일 ~ 3월 6일
- 흡광도 측정일	2014년 3월 6일
본시험	
- 세포 분주일	2014년 3월 10일
- 시험물질 처리일	2014년 3월 11일
- 세포 배양일	2014년 3월 11일 ~ 3월 12일
- 검체제작 및 염색일	2014년 3월 12일 ~ 3월 14일
- 검체판독일	2014년 3월 23일 ~ 3월 25일
추가시험	
- 세포 분주일	2014년 3월 31일
- 시험물질 처리일	2014년 4월 1일
- 세포 배양일	2014년 4월 1일 ~ 4월 2일
- 검체제작 및 염색일	2014년 4월 2일 ~ 4월 4일
- 검체판독일	2014년 4월 9일 ~ 4월 10일
실험종료일	2014년 4월 10일
시험종료일	2014년 00월 00일

## 1.8 시험담당자

세포의 배양	남혜영
시험물질 보관	김은애
시험물질 조제	김진아, 이미영
시험물질 처리	남혜영
검체제작 및 염색	남혜영, 이영내, 김선경, 이미영
검체판독	박초롱, 김선경
통계	이진완

## 1.9 기록 및 자료의 보관

### 1.9.1 보관기간

시험종료 후 5년간 보관

이후의 보관은 시험의뢰자와 협의하여 결정한다.

### 1.9.2 보관장소

명칭 (주)바이오톡스텍 자료보관실

주소 우363-883 충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 53

### 1.9.3 보관기록 및 자료의 종류

시험계획서, 시험계획서 변경기록서, 최종보고서, 기초자료, 기록문서, 검체 (평가 가능한 품질이 유지되는 기간 동안 보관) 및 통신연락문서

## 2. 시험재료 및 방법

### 2.1 시험물질

#### 2.1.1 물질명

초음파처리 인삼열매 추출물

(Ultrasonicationprocessedginsengberryextract)

2.1.2 Lot No. UGBE (001)

2.1.3 성상 갈색분말

2.1.4 성분 Ginsenosides

2.1.5 친화성 Hydrophilic

2.1.6 위험성 인습성

2.1.7 제조일 2014년 1월 22일

2.1.8 유효기간 2016년 1월 22일 (제조 후 2년)

2.1.9 보관조건 냉장 (3.7~6.5°C), 제습

2.1.10 취급시 주의사항 특이사항 없음

2.1.11 제공자

명칭 고연 (高研)

주소 우390-711 충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 112

2.1.12 수령일 2014년 1월 27일

2.1.13 잔여시험물질의 처리 시험종료 후 반환

### 2.2 음성대조물질

2.2.1 명칭 주사용수

2.2.2 Lot No. 12037

2.2.3 보관조건 실온

2.2.4 제조자 Choongwae Pharma Corp., Korea

2.2.5 선택이유 본시험의 부형제인 주사용수를 선택하였다.

### 2.3 양성대조물질

명칭	Lot No.	보관조건	제조사
Mitomycin C (MMC)	SLBF1702V	냉장	Sigma-Aldrich, U.S.A.
Benzol[a]pyrene (B[a]P)	SLBC6864V	실온	Sigma-Aldrich, U.S.A.

### 2.4 조제 및 분석

#### 2.4.1 시험물질의 조제

##### 2.4.1.1 부형제

2.4.1.1.1 명칭 주사용수

2.4.1.1.2 Lot No. 12037

##### 2.4.1.1.3 선택이유

세포증식억제시험의 최고용량인 5,000 µg/mL의 10배 stock (수용액) 또는 100배 stock (유기용매)를 조제하기 위해, 시험의뢰자가 제공한 정보 및 부형제 검토를 실시한 결과, 주사용수에는 균일하게 현탁되었고, DMSO, acetone 및 tetrahydrofuran (THF)에는 용해 또는 현탁되지 않았기 때문에, 주사용수를 선택하였다.

##### 2.4.1.2 조제방법

시험물질의 조제는 시험물질 처리일에 실시하였다.

최고용량의 10배 stock을 조제하기 위하여, 필요량의 시험물질을 칭량한 후 (LA230S, CP323S, Sartorius, Germany), 조제용기에 넣고 소량의 부형제를 가하여 vortex mixer로 교반하여 현탁시킨 후, 부형제로 규정용량이 되도록 조제하였다. 이하 용량에 대해서는 단계희석하여 조제하였다.

#### 2.4.2 양성물질의 조제

MMC는 dimethyl sulfoxide (Lot No.: K44487231, DMSO, Merck, Germany)를 가하여 vortex mixer로 용해시켜 10 µg/mL의 stock solution을 조제하였다.

B[a]P는 필요량을 칭량한 후 DMSO (Lot No.: K44487231)를 가하여 vortex mixer로 용해시켜 2,000 µg/mL의 stock solution을 조제하였다.

조제된 각각의 양성대조물질은 튜브에 분주하여 초저온냉동고 (OPR-DFU-657CEV, Operon, -80 ~ -60°C)에 동결보관하고, 처리일에 해동하여 사용하였다.



계열	S9 mix	명칭	Stock	최종처리용량 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
			concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
단시간처리법	-	MMC	10	0.1
	+	B[a]P	2,000	20
연속처리법	-	MMC	10	0.1

### 2.4.3 시험물질액의 분석

시험물질액의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않았다.

## 2.5 세포주

### 2.5.1 명칭

Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 배양세포

### 2.5.2 선택이유

검출감도가 높아 염색체이상시험에 많이 사용되고 있으며 가이드라인에서도 추천하는 Chinese Hamster Lung (CHL/IU) 세포주를 선택하였다.

### 2.5.3 입수 및 보관

CHL/IU 세포주 (Lot No.: 3375917)는 2011년 11월 24일에 American Type Culture Collection (ATCC, U.S.A.)에서 구입하여, 10% Fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, U.S.A.)를 포함한 Eagle's Minimum Essential Medium (Eagle's MEM, Lonza Walkersville Inc., U.S.A.)이 들어있는 75 cm<sup>2</sup>플라스크 (Nunc, Denmark)에 넣고, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기 (MCO-20AIC, SANYO, Japan)에서 배양하였다. Hoechst Stain Kit (MPBIOMEDICALS, Japan)를 사용하여 세포의 마이크로 플라즈마의 오염유무에 대해 확인하고, 배양된 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 배양플라스크에 가하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 분리하였다. 세포현탁액을 튜브에 옮겨 담고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하였다. 1×10<sup>6</sup>cells/mL이 되도록 FBS를 첨가한 후, DMSO (Merck, Germany)의 최종농도가 10%가 되도록 첨가한 후, 동결보존용 튜브에 분주하고, 초저온냉동고 (-80 ~ -60°C)에서 하루동안 방치한 후, 액체질소탱크에 사용시까지 보관하였다.

### 2.5.4 계대배양

동결된 세포를 37°C로 설정된 항온수조에서 녹인 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지가 들어 있는 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm<sup>2</sup>플라스크에 옮겨, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

세포가 배양플라스크 바닥면적에 70~80%이상 생육할 때 세포형태를 관찰하고, 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리하였다. 세포현탁액을 50

mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시켰다. 세포현탁액을 75 cm<sup>2</sup>플라스크에 옮겨, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

### 2.5.5 전배양

염색체이상시험에는 세포 계대수가 27이내인 세포를 사용하였다.

대수증식기의 세포에 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플라스크 바닥으로부터 세포를 분리한 후, 50 mL 튜브에 넣고, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 10% FBS를 포함한 EMEM 배지에 현탁시킨 후, 혈구계수판을 이용하여 세포수를 계수하여 5×10<sup>4</sup>cells/mL세포현탁액을 만든 후, 세포증식억제시험용은 96 well 플레이트 (200 µL/well; Nunc, Denmark), 분시험용은 60 mm 플레이트 (5 mL/plate, BD, U.S.A.)에 분주하여 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 1일간 배양하였다. 각 플레이트에 식별번호를 기입하였다.

## 2.6 배지

시험에 사용할 배지를 조제하기 위하여, EMEM에 비활성화된 FBS를 최종농도 10%가 되도록 첨가한 후, 10,000 units/mL의 Penicillin G sodium과 10,000 µg/mL의 streptomycin sulfate를 포함한 혼합액 (Invitrogen, U.S.A.)을 100 : 1의 비율로 첨가하였다. 조제 후 사용시까지 냉장 (2 ~ 8°C) 보관하였다.

## 2.7 S9 mix의 조제

### 2.7.1 입수 및 보관

S9과 Cofactor C를 오리엔탈효모공업주식회사 (Japan)로부터 구입하여 초저온 냉동고 (-80 ~ -60°C)에 보관하고, 유효기간 내에 사용하였다.

### < S9의 특성 >

사용동물	Sprague-Dawley rat [CrI:CD(SD)]
성별, 주령	수컷, 7주령
장기	간장
유도물질	Phenobarbital (PB) 및 5,6-benzoflavone (BF)
투여용량 및 투여횟수	PB: 30 mg/kg 1회 (1일째), 60 mg/kg 3회 (2 ~ 4일째) BF: 80 mg/kg 1회 (3일째)
투여경로	복강내투여

### 2.7.2 S9 mix 조성

성 분		각 성분의 함유량
S9		0.3 mL
Cofactor C	50 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	0.1 mL (5 $\mu$ mol)
	330 mmol/L KCl	0.1 mL (33 $\mu$ mol)
	50 mmol/L Glucose-6-phosphate	0.1 mL (5 $\mu$ mol)
	40 mmol/L NADP	0.1 mL (4 $\mu$ mol)
	20 mmol/L HEPES완충액 (pH 7.2)	0.2 mL (4 $\mu$ mol)
	정제수	0.1 mL
총 액량		1 mL

### 2.7.3 S9 mix의 조제방법

S9 mix는 필요량을 사용시에 조제하였다. 동결보관 된 S9 (Lot No.: 13112909)과 Cofactor C (Lot No.: C13112709)를 해동하여 2 : 4.7의 비율로 혼합하여 조제 하였다.

## 2.8 세포증식억제시험

본시험의 용량을 설정하기 위해 비GLP로 실시하였다.

### 2.8.1 용량

가이드라인에서 추천한 5,000  $\mu$ g/mL을 최고용량으로 하고, 이하 2,500, 1,000, 500, 250, 100, 50, 10 및 5  $\mu$ g/mL의 8용량을 설정하였다. 또한, 음성대조군을 설정 하였다.

### 2.8.2 처리방법

전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리하였다. 한 용량당 4 well을 사용하였다.

계열별로 아래와 같이 조제하여 처리하였다.

계열	S9 mix	처리군	조제량 (mL)			분주량 ( $\mu$ L/well)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성대조물질 또는 시험물질액	
단시간처리법	-	음성대조	0.90	-	0.1	200
		시험물질	0.90	-	0.1	200
	+	음성대조	0.90	0.17	0.1	200
		시험물질	0.90		0.1	200
연속처리법	-	음성대조	0.90	-	0.1	200
		시험물질	0.90	-	0.1	200

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, well내를 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)로 세정하고, 신선한 배양액 200  $\mu$ L를 가해 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 시험물질의 침전은 시험물질액의 처리시, 처리종료시 및 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

### 2.8.3 흡광도 측정

모든 well에 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL D-PBS)를 50  $\mu$ L씩 첨가하여 4시간 더 배양한 후에 배양액을 버리고 건조시켰다. 여기에 DMSO를 150  $\mu$ L씩 첨가하여 침전물을 용해시켰다. ELISA reader (ELx808IU, BioTek, U.S.A.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.8.4 본시험의 용량설정의 이유

#### 2.8.4.1 세포증식억제시험의 결과 (Table 1)

연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포독성이 관찰되어, 50% 세포증식억제 용량 (Inhibition concentration 50%: IC<sub>50</sub>)을 산출한 결과, 1,599.2  $\mu$ g/mL이었다. 단시간처리법의 대사활성화비존재하에서는 모든 용량에서 세포독성을 명확하게 50% 이상 억제하는 용량은 관찰되지 않았고, 단시간처리법의 대사활성화존재하의 모든 용량에서는 세포독성이 관찰되지 않았다.

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

#### 2.8.4.2 본시험의 용량

본시험의 최고용량은 단시간처리법의 대사활성화비존재하는 5,000  $\mu$ g/mL으로 하고, 5,000  $\mu$ g/mL에서 약 47%의 세포독성이 관찰되었기 때문에, 관독 가능한 3용량을 확보하기 위해 이하 공비 2로 3용량의 시험물질군을 설정하였다. 단시간처리법의 대사활성화존재하는 5,000  $\mu$ g/mL을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 2용량의 시험물질군을 설정하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 1,600  $\mu$ g/mL을 최고용량으로 하고, 이하 공비 2로 3용량의 시험물질군을 설정하였다. 또한, 각각의 처리계열에 대해 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량 ( $\mu$ g/mL)
단시간처리법	-	5,000, 2,500, 1,250, 625
	+	5,000, 2,500, 1,250
연속처리법	-	1,600, 800, 400, 200

## 2.9 본시험

### 2.9.1 처리방법

전배양 종료 후, 각 플레이트는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 합 3계열로 분리하였다. 한 용량당 2개의 플레이트를 사용하였다. 계열별로 아래와 같이 조제하여 처리하였다.

계열	S9 mix	처리군	조제량 (mL)			분주량 (mL/plate)
			EMEM with 10% FBS	S9 mix	음성(양성)대조물질 또는 시험물질액	
단시간처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5
	+	음성대조	9.53	2.17	1.3	5
		시험물질	9.53		1.3	5
		양성대조	10.7		0.13	5
연속처리법	-	음성대조	11.7	-	1.3	5
		시험물질	11.7		1.3	5
		양성대조	12.87		0.13	5

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하는 시험물질을 6시간 처리한 후, 플레이트 내를 D-PBS로 세정하고, 신선한 배양액 5 mL를 가해 18시간 더 배양하였다. 연속처리법의 대사활성화비존재하는 시험물질을 24시간 연속처리하였다. 단시간처리법 및 연속처리법 모두 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.

시험물질의 침전은 시험물질액의 처리시, 처리종료시 및 배양종료시에 각 용량별로 관찰하였다.

### 2.9.2 세포증식률

본시험 진행시, 세포현탁액 2 mL을 6 well 플레이트 (Nunc, Denmark)에 분주한 후, 각 계열에 대해 각 용량의 시험물질액, 양성대조물질 및 음성대조물질을 처리하였다. 배양 종료 후, 세포수를 혈구계수판을 이용하여 계수하여 세포증식률을 구하였다.

### 2.9.3 검체제작

배양종료 2시간 전에 Colcemid 용액 (Invitrogen, U.S.A.)을 최종농도가 0.2 µg/mL 되게 첨가하여 세포분열을 중기에서 정지시켰다. 배양종료 후 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 처리하여 플레이트 바닥으로부터 세포를 떼어낸 후, 1,000 rpm 에서 5분간 원심분리 (FLETA 5, 한일과학)하였다. 상등액을 버리고 37°C에서 보온한 0.075 mol/L KCl 수용액을 5 mL 첨가하여 37°C에서 20분간 처리하였다. 냉각한 고정액 (methanol : acetic acid = 3 : 1) 1 mL을 첨가한 후, 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거한 후, 5 mL의 냉각한 고정액을 첨가한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 고정하였다. 이러한 고정작업을 1회 반복하여 세포를 고정하였다. 얻어진 세포부유액을 슬라이드글라스 2군데에 1방울씩 떨어뜨려 1장의 슬라이드 표본을 제작하였다. 건조 후, 슬라이드글라스에 코드화된 번호를 기입하였다. 3%

Giemsa 염색액으로 20분간 염색한 후, 초순수로 세척한 후 건조하였다.

#### 2.9.4 추가시험

본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량인 5,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 15.5%로, 양성으로 확인되었다. 양성결과의 용량반응성 및 재현성을 확인하기 위해, 2,500 및 5,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  용량 사이를 세분화하여 추가시험을 실시하였다. 또한, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량인 1,600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 세포증식률이 약 78%로, 50% 이상이었으나, 분열중기세포 200개가 확보되지 않아 염색체이상 유무를 확인할 수 없었다. 따라서, 판독 가능한 최고용량에 대해 염색체이상 유발 가능성을 확인하기 위해, 800 및 1,600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  용량 사이를 세분화하여 추가시험을 실시하였다. 추가시험은 아래의 용량으로 본시험과 동일한 방법으로 실시하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

계열	S9 mix	추가시험의 용량 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
단시간처리법	-	5,000, 4,000, 3,000
연속처리법	-	1400, 1,200, 1,000

#### 2.10 관찰

슬라이드 표본관찰은 단시간처리법에서 연속처리법의 순서로 실시하였다.

단시간처리법에서 양성의 결과가 확인되었지만, 양성의 결과를 명확히 하기 위해 연속처리법의 슬라이드 관찰을 실시하였다.

염색체 관찰의 대상용량은 각 처리법 모두 용량당 200개의 분열중기상이 관찰 가능한 3용량을 설정하였다.

각 슬라이드당 100개, 1개 용량 당 최소 200개의 분열중기세포를 현미경 (BX51, Olympus, Japan, 400 및 600배 배율)으로 관찰하였다.

구조이상에 대해서는 염색분체절단 (chromatid break; ctb), 염색분체교환 (chromatid exchange; cte), 염색체절단 (chromosome break; csb), 염색체교환 (chromosome exchange; cse), 갭 (gap), 단편화 (fragmentation; frg) 및 기타 (other; o)를 관찰하였다.

1개의 분열중기상에 다수의 gap 및 절단 등이 포함된 것은 단편화 (fragmentation; frg)로 기록하였다. 갭 (gap)은 염색분체의 폭 보다도 좁은 비염색성 부위로, 결과 기록시 구조이상에 포함하지 않고, 종합관정에서도 gap을 포함하지 않는 결과로 평가하였다.

또한, 수적 이상에 대해서는 배수체 (polyploidy; pol) 및 핵내배화 (endoreduplication; end)를 관찰하였다.

이러한 이상을 1개 이상 가지는 세포를 이상세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록하였다.

#### 2.11 시험의 성립조건

아래의 조건을 모두 만족 하는 경우 성립으로 하였다.

- 염색체이상출현빈도가 음성대조군에서는 5% 미만, 양성대조군은 10% 이상일 것.
- 시험물질군에서 분열중기상을 200개 관찰한 용량이 3용량 이상일 것.
- 세포의 오염이 없을 것.

## 2.12 결과의 판정

염색체이상을 가진 세포 (gap은 제외)의 출현빈도에 대해 Toshio Sofuni등의 판정기준에 따라 아래와 같이 판정하였다.

이상세포의 평균 출현율	판정
5% 미만	음성 (-)
5% 이상 ~ 10% 미만	의양성 (±)
10% 이상	양성 (+)

양성으로 판정되어, D20 및 TR값을 구하였다.

D20: 20%의 세포에 염색체이상이 출현할 수 있는 농도 (mg/mL)

D <sub>20</sub> (mg/mL)	판정
0.01 미만	Strong clastogenic activity
0.01 이상 ~ 1미만	Medium clastogenic activity
1이상	Weak clastogenic activity

TR값: 단위용량 (mg/mL)당의 염색분체형교환 (cte) 출현빈도의 비교치

## 2.13 자료의 통계처리

염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도는 SAS version 9.3, SAS Institute Inc., U.S.A.을 사용하여 통계해석을 실시하였다. 음성으로 판정된 계열에 대해서는 염색체이상을 가지는 세포의 출현빈도에 대해서 Fisher's exact test에 의해 음성대조군과 시험물질처리군간 및 음성대조군과 양성대조군간의 유의차 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01) 검증을 실시하였다. 양성으로 판정된 계열에 대해서는 용량의존성에 대해 Cochran-Armitage trend test에 의해 유의차 검증을 실시하였다 (유의수준: 양측 0.05 및 0.01).

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 본시험 (Table 2, Figures 1 ~ 2)

### 3.1.1 세포증식률

세포증식률은 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 0, 625, 1,250, 2,500 및 5,000 µg/mL에서 100, 90.7, 77.9, 81.4 및 38.4%, 대사활성화존재하의 0, 1,250, 2,500 및 5,000 µg/mL에서 100, 102, 100 및 92.8%, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 0, 200, 400, 800 및 1,600 µg/mL에서 100, 114, 113, 80.7 및 77.8%였다.

### 3.1.2 시험물질의 침전

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

### 3.1.3 염색체이상 관찰 대상용량

검체제작시, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하의 최고용량인 5,000 µg/mL에서 관찰가능한 분열중기상 200개가 확보되어, 최고용량을 포함한 3용량 이상을, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 최고용량인 1,600 µg/mL에서 관찰 가능한 분열중기상 200개가 확보되지 않았기 때문에, 최고용량을 제외한 3용량을 염색체이상관찰 대상용량으로 설정하였다.

계열	S9 mix	염색체이상관찰 대상용량 (µg/mL)
단시간처리법	-	5,000, 2,500, 1,250,
	625	
연속처리법	+	5,000, 2,500, 1,250
	-	800, 400, 200

### 3.1.4 염색체이상출현빈도

단시간처리법의 대사활성화비존재하의 5,000 µg/mL에서 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 15.5%로, 10% 이상의 염색체이상 유발작용이 확인되었으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성이 관찰되었다 (Cochran-Armitage trend test,  $p < 0.01$ ). 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로, 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 통계학적인 유의성도 관찰되지 않았다 (Fisher's exact test,  $p \geq 0.05$ ).

단시간처리법의 대사활성화존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성도 관찰되지 않았다 (Fisher's exact test,  $p \geq 0.05$ ).

각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 10% 이상으로, 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가되었다 (Fisher's exact test,  $p < 0.01$ ).

## 3.2 추가시험 (Table 3, Figures 3 ~4)

### 3.2.1 세포증식률

세포증식률은 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 0, 3,000, 4,000 및 5,000 µg/mL에서



100, 57.1, 58.4 및 36.0%, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 0, 1,000, 1,200 및 1,400  $\mu$  g/mL에서 100, 68.6, 59.7 및 53.5%였다

### 3.2.2 시험물질의 침전

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

### 3.2.3 염색체이상 관찰 대상용량

염색체이상관찰 대상용량은 아래와 같다.

계열	S9 mix	염색체이상관찰대상용량 ( $\mu$ g/mL)
단시간처리법	-	5,000, 4,000, 3,000
연속처리법	-	1,400, 1,200, 1,000

### 3.2.4 염색체이상출현빈도

단시간처리법의 대사활성화비존재하의 4,000 및 5,000  $\mu$ g/mL에서 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 각각 8.5% 및 22%로, 10% 이상의 염색체이상 유발작용이 확인되었으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다 (Cochran-Armitage trend test,  $p < 0.01$ ). 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로, 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 통계학적인 유의성도 관찰되지 않았다 (Fisher's exact test,  $p \geq 0.05$ ).

연속처리법의 대사활성화비존재하에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성도 관찰되지 않았다 (Fisher's exact test,  $p \geq 0.05$ ).

각 처리계열의 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 10% 이상으로, 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가되었다 (Fisher's exact test,  $p < 0.01$ ).

## 3.3 D20 및 TR value

시험물질의 clastogenic potential을 확인하기 위해 D20(20%의 세포에 구조이상이 출현할 수 있는 농도)을 구한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하에서 6.250 mg/mL (본시험) 및 4.899 mg/mL (추가시험)로, 판정기준에 따라 weak clastogenic으로 분류되었다.

또한, 구조이상에 대해 농도당 교환형 구조이상의 출현율인 translocation (TR)값은 단시간처리법의 대사활성화비존재하에서 2.7 (본시험) 및 3.7 (추가시험)이었다. 양성대조물질인 MMC의 TR값은 단시간처리법의 대사활성화비존재하에서 160,000 (본시험), 135,000 (추가시험)이었다

참고로, 양성대조물질의 MMC의 D20은 0.000032 mg/mL<sup>5</sup>)이다.

## 3.4 Historical Control Data (Table 4)

음성대조군 및 양성대조군의 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 historical control data의

범위 내에 있었다.

### 3.5 시험의 성립

음성대조군에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만이었으며, 양성대조군에서 구조 이상을 가진 세포의 출현빈도는 10% 이상이었다. 또한, 시험물질군의 3용량에서 200개의 분열중기상이 관찰 가능하였으며, 세포의 오염도 없었기 때문에 해당시험은 적절한 시험조건하에서 실시된 것이 확인되었다.

### 4. 결론

이상의 결과로부터 시험물질 초음파처리 인삼열매 추출물은 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 5,000 µg/mL에서 15.5% (본시험) 및 22.0% (추가시험), 4,000 µg/mL에서 8.5%로, 본 시험의 판정조건에 따라 각각 양성 (10% 이상) 및 의양성 (5% 이상 ~ 10% 미만)으로 판정되었다. 단시간처리법의 대사활성화존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재하에서는 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도가 5% 미만의 음성으로 판정되었다.

양성으로 판정된 용량의 세포증식률은 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 5,000 µg/mL에서 38.4% (본시험) 및 36.0% (추가시험)로 음성대조군과 비교하여 60% 이상의 세포독성이 관찰되었으며, 의양성으로 판정된 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 4,000 µg/mL에서의 세포증식률은 58.4%로, 음성대조군과 비교하여 50% 미만의 세포독성이 관찰되었다.

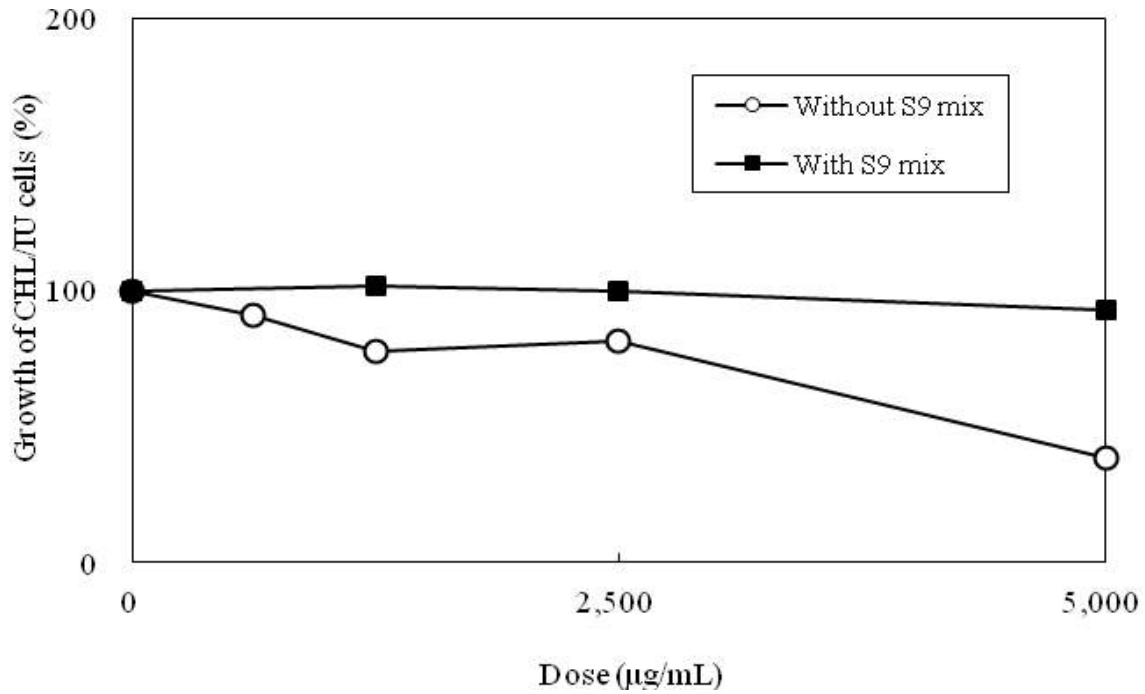
세포독성에 의한 염색체이상 유발 가능성에 대해서는 세포독성이 높을 경우에 유전독성에 의한 것이 아니라 세포사에 의한 2차적 요인 (apoptosis, endonuclease 방출)에 의해 염색체 이상이 유발되는 경우도 있다고 알려져 있다(6).

본 시험에서 염색체이상 유발빈도가 10% 이상인 용량에서 세포독성이 60% 이상 관찰된 것으로부터, 염색체이상은 유전독성에 의한 것이 아니라 세포독성에 의해 유발된 것으로 사료된다. 또한, 대사활성계를 적용한 계열 (단시간처리법의 대사활성화존재하)에서 최고용량인 5,000 µg/mL까지 염색체이상 유발성은 음성이었으며, 생체내 소핵시험 (BTT Study No.: B14021)에서도 5,000 mg/kg까지 소핵유발성이 음성으로 판정된 것으로부터 생체내 유전독성 유발 가능성은 낮을 것으로 판단된다..

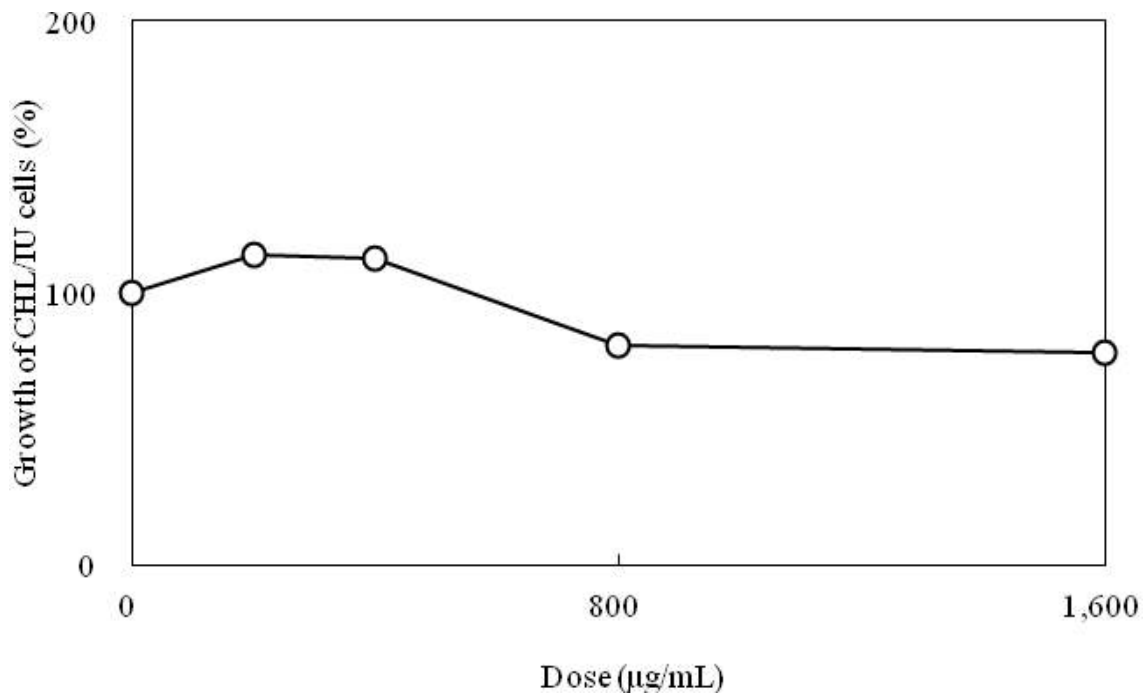
라. FIGURES

마.

1) Figure 1. Dose-survival Curve of the Main Study (Short time treatments without and with S9 mix)



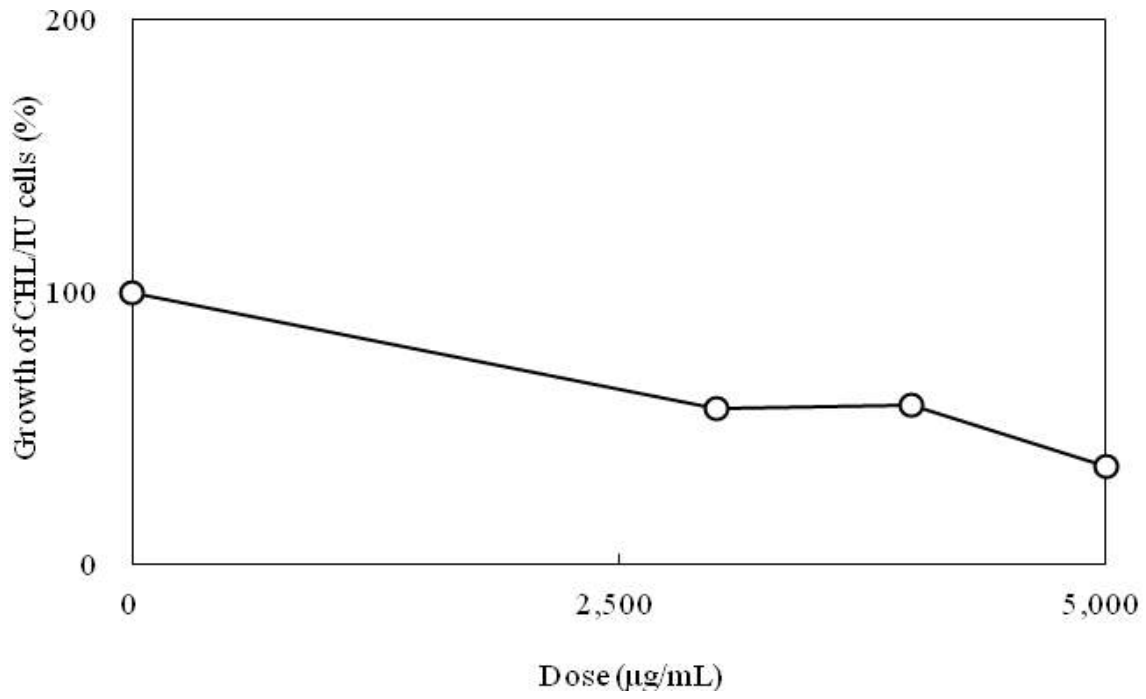
2) Figure 2. Dose-survival Curve of the Main Study (Continuous treatment without S9 mix)



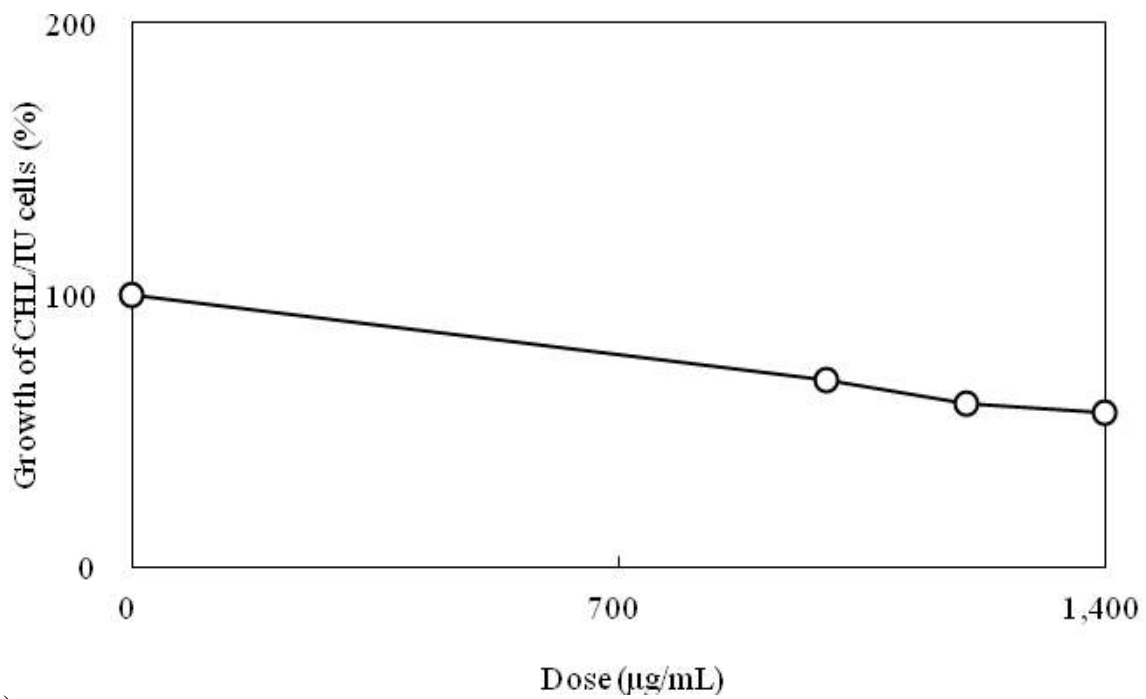
3) Figure 3. Dose-survival Curve of the Additional Study (Short time treatment without

S9 mix)

4)



5) Figure 4. Dose-survival Curve of the Additional Study (Continuous treatment without S9 mix)



6)

## 바. TABLES

1) Table 1. Summary of Cell Growth Inhibition Study

Test substance	Dose (μg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time (hr)	Growth of cells (OD) (Mean±S.D.)			Growth rate (%)
Water for injection	0	-	6-18	1.301	±	0.049	100
Ultrasonication processed ginseng berry extract	5	-	6-18	1.255	±	0.034	96.5
	10	-	6-18	1.314	±	0.070	101
	50	-	6-18	1.277	±	0.050	98.2
	100	-	6-18	1.227	±	0.030	94.3
	250	-	6-18	1.338	±	0.136	103
	500	-	6-18	1.278	±	0.131	98.2
	1,000	-	6-18	1.237	±	0.072	95.1
	2,500	-	6-18	0.914	±	0.032	70.3
	5,000	-	6-18	0.691	±	0.030	53.1
Water for injection	0	+	6-18	1.022	±	0.060	100
Ultrasonication processed ginseng berry extract	5	+	6-18	1.069	±	0.011	105
	10	+	6-18	0.979	±	0.103	95.8
	50	+	6-18	1.079	±	0.040	106
	100	+	6-18	1.138	±	0.006	111
	250	+	6-18	1.227	±	0.027	120
	500	+	6-18	1.157	±	0.071	113
	1,000	+	6-18	1.220	±	0.069	119
	2,500	+	6-18	1.153	±	0.045	113
	5,000	+	6-18	1.189	±	0.034	116
Water for injection	0	-	24-0	1.529	±	0.066	100
Ultrasonication processed ginseng berry extract	5	-	24-0	1.471	±	0.129	96.2
	10	-	24-0	1.746	±	0.028	114
	50	-	24-0	1.510	±	0.062	98.8
	100	-	24-0	1.760	±	0.137	115
	250	-	24-0	1.546	±	0.030	101
	500	-	24-0	1.225	±	0.025	80.1
	1,000	-	24-0	1.041	±	0.011	68.1
	2,500	-	24-0	0.313	±	0.013	20.5
	5,000	-	24-0	0.104	±	0.003	6.80

Trt-Rec time : Treatment-Recovery times

S.D.:Standard deviation

Table 2. Summary of Main Study

Test substance	Dose (µg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations						gap (%)	Number of cells with numerical aberrations			TR value
					ctb	csb	cte	cse	frg	total (%)		end	pol	total (%)	
Water for injection	0	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ultrasonication processed ginseng berry extract	625	-	6-18	100	0	0	0	0	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	1.6
				100	0	0	2	0	0	0	0	0	0		
	1,250	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	2,500	-	6-18	100	0	0	1	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	2	2 (1.0)	0.2
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
5,000	-	6-18	100	6	0	13	0	0	31 <sup>#</sup>	0 (0.0)	0	2	4 (2.0)	2.7	
			100	3	0	14	0	0	(15.5)	0	2	0			
MMC	0.1	-	6-18	100	4	0	15	0	0	34*	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	160,000
				100	5	0	17	0	0	(17.0)	0	0	0		
Water for injection	0	+	6-18	100	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0	1	2 (1.0)	-
				100	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
Ultrasonication processed ginseng berry extract	1,250	+	6-18	100	0	0	0	0	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)	-
				100	1	0	3	0	0	0	0	0	0		
	2,500	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	5,000	+	6-18	100	0	0	1	0	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0	2	4 (2.0)	-
				100	1	0	1	0	0	0	0	0	2		
B[a]P	20	+	6-18	100	10	0	24	1	0	53*	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	-
				100	9	0	23	0	0	(26.5)	0	0	0		
Water for injection	0	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ultrasonication processed ginseng berry extract	200	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	400	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	800	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	-
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1,600	-	24-0	toxic											-	
MMC	0.1	-	24-0	100	5	0	31	0	0	64*	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	-
				100	5	0	27	1	0	(32.0)	0	0	0		

D20 (mg/mL) (S9-, 6-18hr) : 6.250 mg/mL, TR value (S9-, 6-18hr) : 2.7

Aberration; gap: chromatid and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange,

csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, frg: fragmentation, end: endoreduplication,

pol: polyploidy

MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene

Trt-Rec time : Treatment-Recovery times

Significant difference from negative control by Cochran-Armitage trend test : # p<0.01

Significant difference from negative control by fisher's exact test : \* p<0.01

2) Table 3. Summary of Additional Study

Test substance	Dose (µg/mL)	S9 mix	Trt-Rec Time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations						gap (%)	Number of cells with numerical aberrations			TR value
					ctb	csb	cte	cse	frg	total (%)		end	pol	total (%)	
Water for injection	0	-	6-18	100	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)	-
				100	0	0	1	0	0	0		0	0		
Ultrasonication processed ginseng berry extract	3,000	-	6-18	100	1	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0	2	5 (2.5)	0
				100	0	0	0	0	0	0		0	0		
	4,000	-	6-18	100	4	0	5	0	0	17 <sup>#</sup>	0 (0.0)	0	3	6 (3.0)	1.3
				100	5	1	5	0	0	0		0	1		
	5,000	-	6-18	100	10	0	15	0	0	44 <sup>#</sup>	1 (0.5)	1	2	6 (3.0)	3.7
				100	7	0	22	0	0	0		0	1		
MMC	0.1	-	6-18	100	2	0	14	1	0	31*	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	135,000
				100	2	0	13	0	0	0		0	0		
Water for injection	0	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	-
				100	0	0	0	0	0	0		0	0		
Ultrasonication processed ginseng berry extract	1,000	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	-
				100	0	0	0	0	0	0		0	0		
	1,200	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)	-
				100	0	0	0	0	0	0		0	0		
	1,400	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	2	3 (1.5)	-
				100	0	0	0	0	0	0		0	1		
MMC	0.1	-	24-0	100	8	0	21	0	0	61*	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)	-
				100	6	0	34	2	0	0		0	0		

D<sub>20</sub> (mg/mL) (S9-, 6-18hr) : 4.889 mg/mL, TR value (S9-, 6-18hr) : 3.7

Aberration; gap: chromatid and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange,  
 csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, frg: fragmentation, end: endoreduplication,  
 pol: polyploidy

MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene

Trt-Rec time : Treatment-Recovery times

Significant difference from negative control by Cochran-Armitage trend test : # P>0.01

Significant difference from negative control by fisher's exact test : \* p<0.01

3) Table 4. Historical Control Data

Historical control values of structural aberrations								
Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Structural aberration cells without gap (%) (Mean±S.D.)			Range (%)	
							MIN	MAX
Negative	-	6-18	136	0.1	±	0.2	0	<5
	+	6-18	136	0.1	±	0.3	0	<5
	-	24-0	123	0.1	±	0.3	0	<5
Positive	-	6-18 <sup>a)</sup>	67	21.2	±	4.8	<10	36*
	+	6-18 <sup>b)</sup>	136	18.4	±	5.4	<10	35*
	-	24-0 <sup>a)</sup>	64	29.8	±	8.3	<10	55*

Historical control values of numerical aberrations								
Group	S9 mix	Time of exposure (hr)	N	Numerical aberration cells (%) (Mean±S.D.)			Range (%)	
							MIN	MAX
Negative	-	6-18	136	0.3	±	0.4	0	<5
	+	6-18	136	0.2	±	0.4	0	<5
	-	24-0	123	0.3	±	0.4	0	<5

Negative control : Water for injection, Dimethyl sulfoxide, 0.5% methyl cellulose 1500centipoise solution, 0.5% carboxymethylcellulose sodium salt solution, Acetone, Tetrahydrofuran *etc.*

a : Mitomycin C (0.1 µg/mL)

b : Benzo[a]pyrene (20 µg/mL)

N : The total number of chromosome aberration test

The above historical control values were obtained from the data pooled from June 13, 2011 to Dec. 31, 2013 (MMC).

The above historical control values were obtained from the data pooled from Jan. 1, 2012 to Dec. 31, 2013 (B[a]P).

\* : The range was calculated by the control limit from Mean+3S.D.



바. 초음파 인삼열매 추출물의 13주 반복독성시험 및 4주 회복시험

# 최 종 보 고 서

초음파처리 인삼열매 추출물의  
Sprague-Dawley 랫드를 이용한  
13 주 반복 경구투여 독성시험 및 4 주 회복시험

시험번호 M15105

(주)메드빌

08511 서울특별시 금천구 디지털로 9길 33, 15층 (가산동,  
IT 미래타워)

## 사. 진 술 서

시험제목 초음파처리 인삼열매 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주 반복 경구투여 독성시험 및  
4 주 회복시험

시험번호 M15105

상기 시험은 다음의 Good Laboratory Practice 규정을 준수하였다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-67호 (2014년 2월 12일)

본 보고서는 시험수행을 통해 얻어진 시험기초자료를 토대로 작성되었으며, 모든 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었다.

(주)메드빌

시험책임자 서동석, Ph.D., DKBT \_\_\_\_\_

년 월 일

(주)메드빌

운영책임자 홍은경, Ph.D. \_\_\_\_\_

년 월 일

## 신뢰성보증확인서

시 험 제 목: 초음파처리 인삼열매 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13주 반복  
경구투여 독성시험 및 4주 회복시험

시 험 번 호: M15105

점검내용	실 시 일	시험책임자 및 운영책임자에게 보고일
시험계획서	2015. 08. 25.	2015. 08. 25.
시험계 입수	2015. 08. 26.	2015. 08. 26.
[1주]		
체중 측정	2015. 09. 02.	2015. 09. 02.
시험물질의 보관	2015. 09. 02.	2015. 09. 02.
시험물질의 조제	2015. 09. 02.	2015. 09. 02.
투여	2015. 09. 02.	2015. 09. 02.
일반증상관찰	2015. 09. 02.	2015. 09. 02.
사료공급량 측정	2015. 09. 07.	2015. 09. 07.
사료잔량 측정	2015. 09. 08.	2015. 09. 08.
[4주]		
시험물질의 보관	2015. 09. 23.	2015. 09. 23.
시험물질의 조제	2015. 09. 23.	2015. 09. 23.
[13주]		
시험물질의 보관	2015. 11. 25.	2015. 11. 25.
시험물질의 조제	2015. 11. 25.	2015. 11. 25.
체중 측정	2015. 11. 25.	2015. 11. 25.
투여	2015. 11. 25.	2015. 11. 25.
일반증상관찰	2015. 11. 25.	2015. 11. 25.
안과학적 검사	2015. 11. 25.	2015. 11. 25.
채뇨	2015. 11. 25.	2015. 11. 25.

노검사	2015. 11. 25.	2015. 11. 25.
사료공급량 측정	2015. 11. 30.	2015. 11. 30.
사료잔량 측정	2015. 12. 01.	2015. 12. 01.
채혈	2015. 12. 02.	2015. 12. 02.
부검	2015. 12. 02.	2015. 12. 02.
혈액생화학적 검사	2015. 12. 03.	2015. 12. 03.
혈액 검사	2015. 12. 04.	2015. 12. 04.
긴급 부검	2015. 12. 14.	2015. 12. 14.
검체제작 (삭정)	2015. 12. 15.	2015. 12. 15.
검체제작 (포매)	2015. 12. 24.	2015. 12. 24.
검체제작 (박질)	2015. 12. 28.	2015. 12. 28.
검체제작 (염색)	2016. 01. 19.	2016. 01. 19.
시험기초자료	2016. 05. 12.	2016. 05. 12.
최종보고서(안)	2016. 05. 12.	2016. 05. 12.
최종보고서		

표의 점검내용은 (주)메드빌 신뢰정보증업무담당자가 점검을 실시하고 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

본 시험은 GLP, 시험계획서 및 표준작업지침서(SOP)에 따라 실시되었으며, 해당시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 최종보고서에 정확히 반영되었음을 보증한다.

(주)메드빌  
신뢰정보증책임자

김명화

년 월 일

# 목 차

진 술 서 .....	2
신뢰성보증확인서 .....	3
요 약 .....	8
1. 시험실시의 개요 9	
1.1 시험목적	9
1.2 Good Laboratory Practice Regulations	9
1.3 시험기준	9
1.4 의뢰자	9
1.5 시험기관	9
1.6 시험일정	9
1.7 시험책임자	10
1.8 다지접시험책임자	10
1.9 부문책임자	10
1.10 시험담당자	10
1.11 기록 및 자료의 보관	10
1.12 동물윤리	10
2. 재료 및 방법 11	
2.1 시험물질	11
2.2 부형제	11
2.3 시험물질의 조제 및 분석	11
2.4 시험계	11
2.5 사육환경조건	12
2.6 사료	12
2.7 음수	13
2.8 투여	13
2.9 투여용량 및 시험군의 구성	13
2.10 관찰 및 검사	13
2.11 통계학적 분석	17
3. 결과 및 고찰 18	
3.1 일반증상	18
3.2 체중변화	18
3.3 사료 섭취량	18
3.4 안과학적 검사	18
3.5 뇨 검사	18
3.6 혈액학적 검사	18
3.7 혈액생화학적 검사	19
3.8 장기중량 측정	19
3.9 부검소견	19
3.10 조직병리학적 검사	19
4. 결론 20	
FIGURES .....	21
Figure 1. Body weights in male SD rats .....	22
Figure 2. Body weights in female SD rats .....	22
TABLES .....	23
Table 1-1. Summary of clinical signs (Main Group) .....	24
Table 1-2. Summary of clinical signs (Recovery Group) .....	25
Table 2-1. Summary of body weights (Main Group) .....	26
Table 2-2. Summary of body weights (Recovery Group) .....	28
Table 3-1. Summary of food consumptions (Main Group) .....	29
Table 3-2. Summary of food consumptions (Recovery Group) .....	31

Table 4-1. Summary of ophthalmological examination (Main Group) .....	32
Table 4-2. Summary of ophthalmological examination (Recovery Group) .....	33
Table 5-1. Summary of urinalysis (Main Group) .....	34
Table 5-2. Summary of urinalysis (Recovery Group) .....	36
Table 6-1. Summary of hematological parameters (Main Group) .....	37
Table 6-2. Summary of hematological parameters (Recovery Group) .....	39
Table 7-1. Summary of clinical chemistry (Main Group) .....	40
Table 7-2. Summary of clinical chemistry (Recovery Group) .....	42
Table 8-1. Summary of absolute organ weights (Main Group) .....	43
Table 8-2. Summary of absolute organ weights (Recovery Group) .....	45
Table 9-1. Summary of relative organ weights (Main Group) .....	46
Table 9-2. Summary of relative organ weights (Recovery Group) .....	48
Table 10-1. Summary of necropsy findings (Main Group) .....	49
Table 10-2. Summary of necropsy findings (Recovery Group) .....	50
Table 11-1. Summary of histopathological findings (Main Group) .....	51
Table 11-2. Summary of histopathological findings (Recovery Group) .....	52
<b>APPENDICES</b> .....	<b>53</b>
Appendix 1-1. Individual clinical signs (Main Group) .....	54
Appendix 1-2. Individual clinical signs (Recovery Group) .....	58
Appendix 2-1. Individual body weights (Main Group) .....	59
Appendix 2-2. Individual body weights (Recovery Group) .....	67
Appendix 3-1. Individual food consumption (Main Group) .....	68
Appendix 3-2. Individual food consumption (Recovery Group) .....	76
Appendix 4-1. Individual ophthalmological examination (Main Group) .....	77
Appendix 4-2. Individual ophthalmological examination (Recovery Group) .....	79
Appendix 5-1. Individual urinalysis (Main Group) .....	80
Appendix 5-2. Individual urinalysis (Recovery Group) .....	84
Appendix 6-1. Individual hematological parameters (Main Group) .....	86
Appendix 6-2. Individual hematological parameters (Recovery Group) .....	90
Appendix 7-1. Individual clinical chemistry (Main Group) .....	92
Appendix 7-2. Individual clinical chemistry (Recovery Group) .....	96
Appendix 8-1. Individual absolute organ weights (Main Group) .....	98
Appendix 8-2. Individual absolute organ weights (Recovery Group) .....	102
Appendix 9-1. Individual relative organ weights (Main Group) .....	104
Appendix 9-2. Individual relative organ weights (Recovery Group) .....	108
Appendix 10-1. Individual necropsy findings (Main Group) .....	110
Appendix 10-2. Individual necropsy findings (Recovery Group) .....	112
Appendix 11-1. Individual histopathological findings (Main group) .....	113
Appendix 11-2. Individual histopathological findings (Recovery Group) .....	121
<b>ATTACHMENTS</b> .....	<b>129</b>
Attachment 1. Certificate of analysis .....	130
Attachment 2. Protocol .....	131
Attachment 3. Protocol amendment .....	144
Attachment 4. Protocol deviations .....	145

## 자. 요 약

본 시험은 암·수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 초음파처리 인삼열매 추출물을 13주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 안전성을 평가하고, 4주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하기 위하여 실시하였다.

본 시험의 투여용량은 0, 1250, 2500 및 5000 mg/kg/day로 암·수 각각 10마리에 13주 반복 경구투여하였고, 회복군은 0 및 5,000 mg/kg/day 용량으로 암·수 각각 5마리에 13주 반복 경구투여한 후 4주간 회복 기간을 두었다.

관찰기간 동안, 일반증상, 체중, 사료 섭취량, 안과학적 검사 및 뇨 검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검 시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

관찰기간 동안 암·수 0, 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 사망례는 관찰되지 않았다.

투여기간 동안, 암·수 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg/day 투여군 전례에서 시험물질 색변 (compound-colored feces)이 지속적으로 관찰되었다.

암·수 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 체중, 사료 섭취량, 음수 섭취량, 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검소견에 있어서 시험물질 투여에 기인한 독성학적인 변화는 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사결과, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상으로 볼 때, 초음파처리 인삼열매 추출물을 13주 반복 경구투여 독성시험을 실시한 결과, 무독성량 (NOAEL)은 암·수 모두 5,000 mg/kg/day 이상인 것으로 판단된다





성명

류현열

소속

한국건설생활환경시험연구원

**1.9 부문책임자**

검역

서동석

시험물질보관

한송리

**1.10 시험담당자**

이종민, 정보잉, 김대호투여, 관찰 및 측정

조제

한송리

부검

이종민, 정보잉, 김대호

병리

정보잉

통계

서동석

**1.11 기록 및 자료의 보관**

시험기간 중 발생된 모든 기록과 시험물질은 (주)메드빌의 자료보관실에 보관한다. 보관기간은 최종보고서 승인 후 5년간 보관함을 원칙으로 하며, 그 후 보관에 관해서는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

**1.12 동물윤리**

본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하며, 동물보호법 (법률 제 4379 호, 1991. 5. 31., 법률 제 13023 호, 2015. 1. 20., 일부개정)에 근거한 (주)메드빌 동물실험윤리위원회 (IACUC)에 의해 승인되었다 (승인번호 : 15-42).



암컷, 50 마리, 6 주령, 171.7 ~ 215.3 g

#### 1.4.6 검역 및 순화

입수 시 동물의 일반증상 관찰 및 체중측정 후, 개체식별법에 따랐다. 5 ~ 6 일 이상의 순화기간 중 매일 1 회 일반증상을 관찰하였다. 순화기간 종료일에 체중을 측정하였고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 이상이 없는 동물을 시험에 사용하였다.

#### 1.4.7 개체 및 사육상자 식별

순화기간 중에는 입수 시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하였고, 사육상자에는 순화기간 사육상자카드를 부착하였다.

관찰기간 중에는 군분리 시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하였고, 사육상자에는 사육상자카드를 부착하였다.

#### 1.4.8 군분리

최종검역은 순화종료일에 일반증상 및 체중에 이상이 없는 동물로 군 평균체중 및 표준편차를 계산하여 대조군 및 실험물질 투여군으로 균일하게 배치하였다..

#### 1.4.9 잔여동물의 처리

군분리 후 잔여동물은 시험계로부터 제외하여 SOP 에 따라 처리하였다.

### 1.5 사육환경조건

1.5.1 동물실 번호	동물실 III
1.5.2 사육상자 종류 및 크기	Polycarbonate cage, 420W × 270D × 180H (mm)
1.5.3 사육상자당 수용동물 수	검역·순화기간 5 마리, 시험기간 1 ~ 2 마리
1.5.4 온도	19.1 ~ 25.0°C
1.5.5 상대습도	34.3 ~ 69.1%
1.5.6 환기횟수	10 ~ 20 회/시간
1.5.7 명암주기 (조명시간)	12 시간/일 (08:00 - 20:00)
1.5.8 조도	150 ~ 300 Lux

### 1.6 사료

1.6.1 종류	감마선 멸균된 실험동물용 고형사료 (2918C)
1.6.2 Lot No.	2918C-062215MA
1.6.3 제조사	Harlan Laboratories, Inc.
1.6.4 급이방법	급이기에 고형사료를 넣어 자유 섭취시켰다.
1.6.5 사료의 분석 및 확인	공급원에서 제공한 분석자료의 결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는 것을 확인하였다.

### 1.7 음수

1.7.1 종류 및 급수방법	서울특별시의 수돗물을 UV 멸균 및 필터를 이용하여 여과된 정제수를 Polycarbonate 음수병 (500 mL)에 넣어 자유섭취 시켰다.
1.7.2 음수의 분석 및 확인	“먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙” (환경부령 제 553 호, 2014. 4. 30, 일부개정)의 전 항목에 대하여 외부 기관에 의뢰하여 1 회/년 검사를 실시하며, 그 결과가 본사에서 정한 허용범위 내에 속하는지 확인하였다.

### 1.8 투여

### 1.8.1 투여경로 선택이유

임상예정 경로에 따라 경구투여를 선택 하였다.

### 1.8.2 투여방법 및 투여횟수

투여액량은 10 mL/kg/day 로 하였고, 개체별 투여액량은 최근 체중측정을 기준으로 산출하였다. 투여 당일 경구투여용 위준대를 부착한 일회용 주사기 (3~10 mL)를 이용하여 13주간 1일 1회 위내 강제 경구투여를 실시하였다.

## 1.9 투여용량 및 시험군의 구성

본 시험은 시험의뢰자의 요청에 따라 5,000 mg/kg/day 를 고용량으로 설정하였고, 공비 2 를 적용한 2,500 및 1,250 mg/kg/day 를 중용량 및 저용량으로 설정하였다. 대조군은 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였고, 4 주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하였다.

각 단계별 투여용량은 다음과 같이 설정하였다.

군	투여용량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg/day)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	10 (11001 ~ 11010) + 5* (11011 ~ 11015)	10 (21001 ~ 21010) + 5* (21011 ~ 21015)
G2 저용량군	1,250	10	10 (12001 ~ 12010)	10 (22001 ~ 22010)
G3 중용량군	2,500	10	10 (13001 ~ 13010)	10 (23001 ~ 23010)
G4 고용량군	5,000	10	10 (14001 ~ 14010) + 5* (14011 ~ 14015)	10 (24001 ~ 24010) + 5* (24011 ~ 24015)

\*: 회복군

### 1.10 관찰 및 검사

이하의 관찰, 측정 및 검사일은 투여개시일을 1 일로 하여, 투여개시일부터 7 일간을 투여 1 주로 계산하였다.

#### 1.10.1 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 13 주간 매일 1 회 일반증상을 관찰하였고, 1 일 2 회 빈사 및 사망동물의 유무를 확인하였다. 13 주 투여 종료 후 회복군에 대하여 4 주간 일반증상 관찰을 실시하였다.

#### 1.10.2 사망동물의 처리

사망동물은 발견일에 부검하였고, 장기중량의 측정 및 장기 슬라이드 제작을 하였으나 혈액은 채취하지 못하였다 (측정결과는 평가에서 제외하였다).

#### 1.10.3 체중측정

모든 동물에 대하여 입수일, 군 분리일, 투여 개시 전, 투여 후 및 회복기간에 주 1 회, 부검일에 체중을 측정하였다. 단 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로 체중평가에서 제외하였다.

#### 1.10.4 사료 섭취량 측정

투여 개시 후 주 1 회 사료섭취량을 측정하였다. 측정방법은 사육상자별 급이한 사료량을 측정하고, 익일에 잔량을 측정하여, 개체당 일일 섭취량 (g/rat/day)을 산출하였다.

#### 1.10.5 안과학적 검사

각 군 5 마리의 동물에 대하여 투여 13 주 및 회복 4 주에 실시하였다. 검사는 산동제 점안전 육안으로 동공대광반사 및 전안부를 관찰하고, 점안후 검안경 (binocular indirect ophthalmoscope, HEINE EN 50, HEINE, Germany)으로 전안부, 중간투광체 및 안저에 대한 검사를 실시하였다.

#### 1.10.6 뇨검사

각 군당 5 마리의 동물에 대하여 투여 후 13 주 및 회복 4 주에 대사케이지를 이용하여 신선뇨 (배설 후 약 3 시간 이내의 뇨) 및 축뇨 (배설 후 약 24 시간 이내의 뇨)를 채취하여 아래 항목에 대한 검사를 실시하였다.

	항 목	단 위	측 정 방 법
신선뇨	당 (glucose)	mg/dL	뇨 자동분석기 검사 (CTK Status, SIEMENS, U.S.A.)
	빌리루빈 (bilirubin)	mg/dL	
	케톤체 (ketone body)	mg/dL	
	비중 (specific gravity)	-	
	잠혈 (occult blood)	Ery/uL	
	단백 (protein)	mg/dL	
	pH	-	
	침사	-	원심 분리 후 현미경 검사
축뇨	노량	mL	메스실린더 측정
	색조 및 투명도	-	육안관찰

#### 1.10.7 혈액학적 검사

부검전 16 시간 이상 절식시킨 동물을 isoflurane 으로 마취하여 복대동맥으로부터 채혈한 혈액 중 약 1 mL 를 항응고제인 EDTA-2K 가 들어있는 vacutainer tube (BD, U.S.A.)에 주입한 후 한국건설생활환경시험연구원에 의뢰하여 자동혈액분석기 (ADVIA 2120, SIEMENS, U.S.A.)로 다음 항목을 측정하였다.

항 목	단 위	측 정 방 법
적혈구수 (erythrocyte count, RBC)	$\times 10^6$ cells/ $\mu$ L	Flow cytometry
혈색소량 (hemoglobin, HGB)	g/dL	Flow cytometry, Cyanmethemoglobin
헤마토크리트치 (hematocrit, HCT)	%	Calculated
평균적혈구용적 (mean corpuscular volume, MCV)	fL	Flow cytometry
평균적혈구헤모글로빈량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)	pg	Calculated
평균적혈구헤모글로빈농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL	
혈소판수 (platelet, PLT)	$\times 10^3$ cells/ $\mu$ L	Flow cytometry
백혈구수 (leucocyte count, WBC)	$\times 10^3$ cells/ $\mu$ L	Flow cytometry, Peroxidase stain
백혈구백분율 (WBC differential counting)		
- 중성호성백혈구 (neutrophil, NEU)		
- 림프구 (lymphocyte, LYM)	%	
- 단핵구 (monocyte, MONO)		
- 산호성 백혈구 (eosinophil, EOS)		
- 염기호성 백혈구 (basophil, BASO)		
망상적혈구 (reticulocytes, Reti)	%	Flow cytometry, RNA stain

혈액응고검사는 채혈한 혈액 중 약 1 mL를 3.2% sodium citrate가 담겨있는 vacutainer tube (BD, UK)에 주입하여 혈액응고분석기 (ACL ELITE PRO, Instrumentation Laboratory, U.S.A.)를 이용하여 다음 항목을 측정하였다

항 목	단 위	측 정 방 법
프로트롬빈시간 (prothrombin time, PT)	Sec	Nephelometry
부분활성트롬보플라스틴시간 (activated partial thromboplastin time, APTT)	Sec	Nephelometry

1

1.1

1.2

1.3

1.4

1.5

1.6

1.7

1.8

1.9

1.10

1.10.1

1.10.2

1.10.3

1.10.4

1.10.5

1.10.6

1.10.7

1.10.8 혈액생화학적 검사

채혈한 혈액 중 약 3 mL를 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (BD, UK)에 주입하고 15 - 20 분간 상온에 응고시킨 후, 10 분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청으로 혈액생화학분석기 (Hitachi 7020, HITACHI, Japan)와 전해질분석기 (PDC-800, FUJIFILM, Japan)를 이용하여 다음 항목을 측정하였다.

항 목	단 위	측 정 방 법
ALT (Alanine aminotransferase)	IU/L	IFCC법
AST (Aspartate aminotransferase)	IU/L	IFCC법
ALP (Alkaline phosphatase)	IU/L	P-NPP법
BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dL	Urease-UV법
CRE (Creatinine)	mg/dL	Jaffe법
GLU (Glucose)	mg/dL	UV법
CHO (Total cholesterol)	mg/dL	Enzyme법
TP (Total protein)	g/dL	Biuret법
ALB (Albumin)	g/dL	BCG법
T-BIL (Total bilirubin)	mg/dL	Evelyn-Malloy법
TG (Triglyceride)	mg/dL	Enzyme법
IP (Inorganic phosphorus)	mg/dL	Enzyme법
Ca <sup>2+</sup> (Calcium ion)	mg/dL	O-CPC법
A/G ratio (Albumin/Globulin ratio)	ratio	[ALB/(TP-ALB)] 산출
Cl <sup>-</sup> (Chloride ion)*	mmol/L	전극법
Na <sup>+</sup> (Sodium ion)*	mmol/L	전극법

K<sup>+</sup> (Potassium ion)\*

mmol/L

전극법

\* : 전해질 분석기로 측정

### 1.10.9 부검

모든 동물에 대하여 주시험군은 투여 92 일, 회복군은 120 일에 isoflurane 마취 하에 채혈 및 방혈하여 안락사 시키고 부검하였다.

### 1.10.10 장기중량 측정

모든 동물에 대하여 다음의 장기에 대한 중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대 장기 중량비를 산출하였다. 좌·우가 있는 장기(♯)는 좌·우 무게를 합하여 측정하였다.

#### 측 정 항 목

· 뇌 (brain)	· 뇌하수체 (pituitary)
· 심장 (heart)	· 폐 (lung)
· 간 (liver)	· 비장 (spleen)
· 신장 <sup>♯</sup> (kidney)	· 부신 <sup>♯</sup> (adrenal)
· 고환 <sup>♯</sup> (testis)	· 전립선 (prostate)
· 난소 <sup>♯</sup> (ovary)	· 자궁 (uterus)

### 1.10.11 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음의 장기·조직을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액 (neutral buffered formalin)에 고정하였고, 고환 및 안구는 Davidson 고정액에 고정하였다.

#### 측 정 항 목

· 뇌 (brain)	· 뇌하수체 (pituitary)
· 갑상선 및 부갑상선 <sup>a)</sup> (thyroid and parathyroid)	· 폐 (기관지 포함) (lung including bronchi)
· 흉선 (thymus)	· 심장 (heart)
· 기관 (trachea)	· 비장 (spleen)
· 간 (liver)	· 부신 (adrenal)
· 신장 (kidney)	
· 타액선 (악하선, 설하선, 이하선) (salivary gland: submandibular, sublingual and parotid gland)	
· 식도 (esophagus)	· 위 (stomach)
· 십이지장 (duodenum)	· 공장 (jejunum)
· 회장 (ileum)	· 맹장 (cecum)
· 결장 (colon)	· 직장 (rectum)
· 췌장 (pancreas)	· 고환 (testis)
· 부고환 (epididymis)	· 전립선 (prostate)
· 정낭 (seminal vesicle)	· 난소 (ovary)
· 자궁 (uterus)	· 질 (vagina)
· 방광 (urinary bladder)	· 악하 림프절 (submandibular lymph node)
· 장간막 림프절 (mesenteric lymph node)	
· 안구 (시신경 <sup>a)</sup> 포함) 및 하더리안선 (eye including optic nerve and harderian gland)	
· 유선 (서혜부) (mammary gland: inguinal)	· 피부 (서혜부) (skin: inguinal)





### 3. 결과 및 고찰

#### 1.1 일반증상

(Table 1, Appendix 1)

회복기간 중 대조군의 1 마리 (Animal ID :11015)에서 회복기간 Day 13 에 사망동물이 발생 하였다. 투여기간 동안 암·수 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg/day 투여군 전체에서 색변 (compound-colored feces)이 관찰되었다. 시험물질색변은 시험물질에 의한 착색변으로 시험물질에 의한 독성변화에 기인하는 것은 아닌 것으로 판단하였다.

#### 1.2 체중변화

(Figure 1, Table 2, Appendix 2)

관찰기간 동안, 모든 시험물질 투여군에서 대조군과 비교 시 통계적으로 유의성 있는 체중의 변화는 관찰되지 않았다.

#### 1.3 사료 섭취량

(Table 3, Appendix 3)

관찰기간 동안, 수컷 1,250 mg/kg/day 투여군에서 투여 후 3, 9, 10, 12 주 에 대조군에 비해 유의성 있는 사료섭취량의 감소 또는 감소경향이 관찰되었고, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 후 2, 3 주에 대조군에 비해 유의성 있는 사료섭취량의 감소 또는 감소경향이 관찰되었다. 사료섭취량의 감소는 그 정도가 경미하여 독성학적인 의미는 없는 것으로 사료되었다.

회복기간 동안에는 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 회복 3 주에 대조군에 비해 유의성 있는 사료섭취량의 일시적 증가 또는 증가경향이 관찰되었다.

#### 1.4 안과학적 검사

(Figure 4, Appendix 4)

모든 시험물질 투여군에서 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

#### 1.5 뇨 검사

(Table 5, Appendix 5)

모든 시험물질 투여군에서 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

#### 1.6 혈액학적 검사

(Table 6, Appendix 6)

주시험군의 암·수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암·수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 헤마토크리트치 (HGB)의 수치 감소경향이 관찰되었으나, 경미한 변동으로서, 대부분 배경 데이터 내의 변동이며, 다른 관련 변화가 동반되지 않아 독성학적인 의미는 없는 것으로 판단하였다.

#### 1.7 혈액생화학적 검사

(Table 7, Appendix 7)

주시험군의 암·수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암·수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

수컷 1,250 mg/kg/day 투여군에서 크레아티닌 (Crea)의 수치 증가경향이 관찰되었고, 5,000 mg/kg/day 투여군에서 혈당 (Glu)의 수치 감소경향이 관찰되었지만, 경미한 변동으로서, 대부분 배경 데이터 내의 변동이며, 다른 관련 변화가 동반되지 않아 독성학적인 의미는 없는 것으로 판단하였다.

회복군에는 수컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 인 (P)의 수치가 대조군에 비해 유의성 있는 증가경향이 관찰되었고 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 염화물 (Cl)의 수치가 대조군에 비해 유의성 있는 증가경향이 관찰되었다

## 1.8 장기중량 측정

(Table 8, Table 9, Appendix 8, Appendix 9)

주시험군의 암·수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암·수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여에 의한 영향으로 판단되는 변화는 관찰되지 않았다.

## 1.9 부검소견

(Table 10, Appendix 10)

주시험군의 암·수 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암·수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 소견은 관찰되지 않았다.

## 1.10 조직병리학적 검사

(Table 11, Appendix 11)

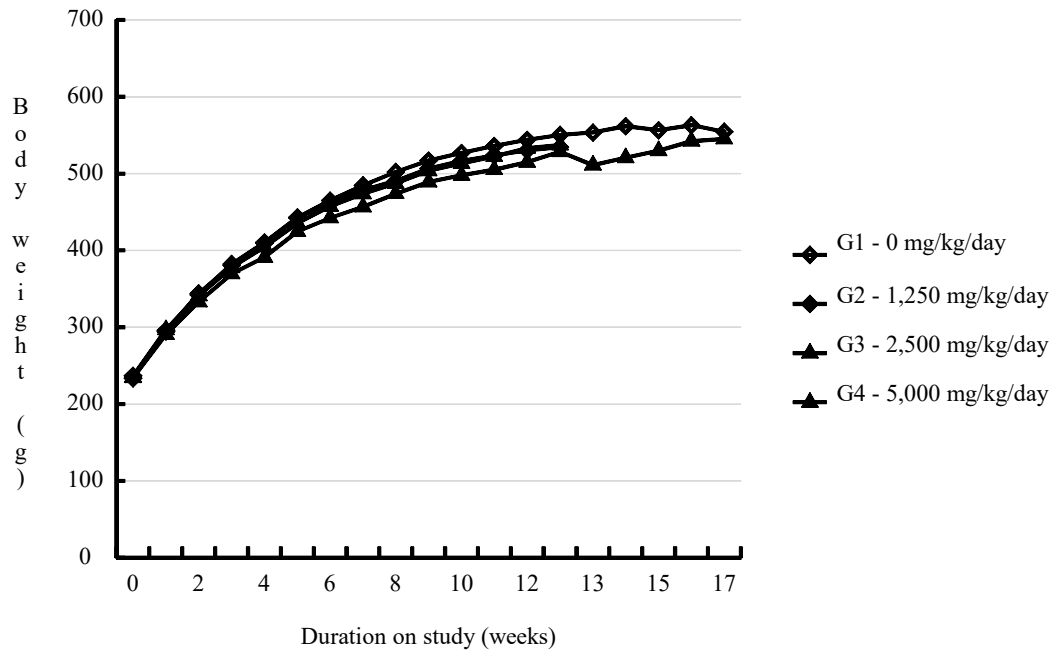
5,000 mg/kg 투여군 및 회복군에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

이 외 관찰된 소견들은 모두 자연발생성으로서 흔히 관찰되는 병변으로 독성학적인 의미는 없었다.

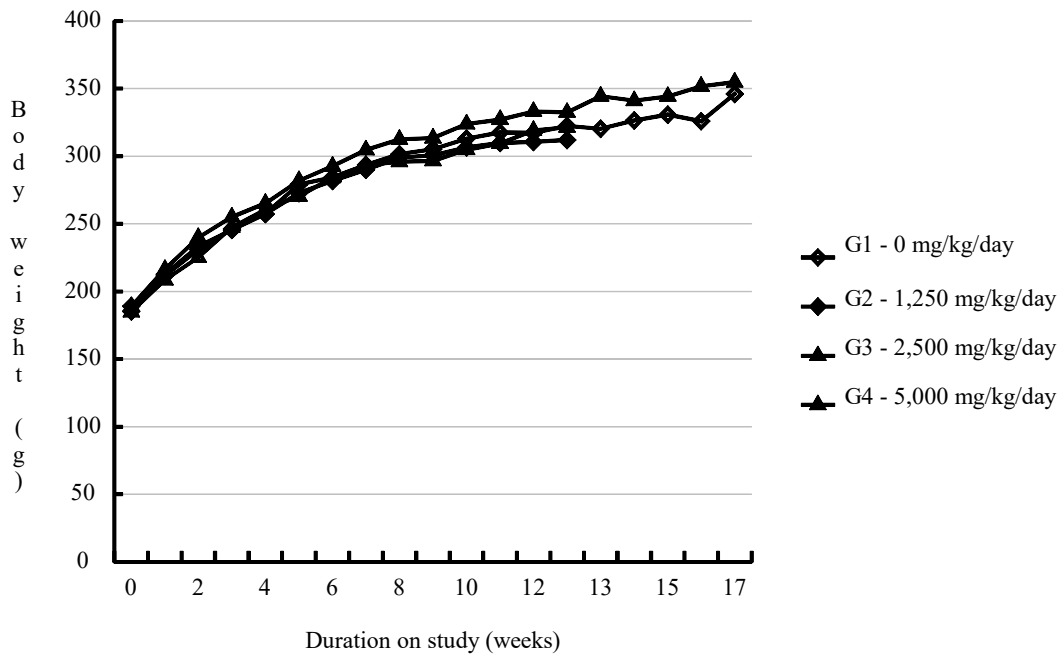
#### 4. 결론

이상으로 본 시험 조건하에서, 초음파처리 인삼열매 추출물을 13 주 반복 경구투여 독성시험을 실시한 결과, 무독성량 (NOAEL)은 암수 모두 5,000 mg/kg/day 이상인 것으로 판단된다

## 차. FIGURES



1) Figure 1. Body weights in male SD rats



2) Figure 2. Body weights in female SD rats

## 카. TABLES

Table 1-1. Summary of clinical signs (Main Group)

Sex: Male					
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical signs	Days		
			1	2	3~92
G1 0	15	NOA	15	15	15
G2 1,250	10	NOA Compound-colored feces	10 0	8 2	0 10
G3 2,500	10	NOA Compound-colored feces	10 0	2 8	0 10
G4 5,000	15	NOA Compound-colored feces	15 0	0 15	0 15

Sex: Female					
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical signs	Days		
			1	2	3~92
G1 0	15	NOA	15	15	15
G2 1,250	10	NOA Compound-colored feces	10 0	6 4	0 10
G3 2,500	10	NOA Compound-colored feces	10 0	2 8	0 10
G4 5,000	15	NOA Compound-colored feces	15 0	0 15	0 15

NOA: No Observable Abnormality



Table 1-2. Summary of clinical signs (Recovery Group)

Sex: Male							
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical signs	Day				
			92	93	94~103	104	105~120
G1 0	5	NOA	5	5	5	4	4
		Death	0	0	0	1	0
G4 5,000	5	NOA	0	4	5	5	5
		Compound-colored feces	5	1	0	0	0

Sex: Female					
Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Clinical signs	Day		
			92	93	94~120
G1 0	5	NOA	5	5	5
G4 5,000	5	NOA	0	3	5
		Compound-colored feces	5	2	0

NOA: No Observable Abnormality

거. Table 2-1. Summary of body weights (Main Group)

Sex: Male		(g)							
Group /		Week							
Dose (mg/kg/day)		0	1	2	3	4	5	6	
G1 0	Mean	236.6	296.0	342.4	382.1	410.4	442.8	464.9	
	S.D.	6.6	11.5	19.7	25.7	30.9	35.8	39.8	
	N	15	15	15	15	15	15	15	
G2 1,250	Mean	233.3	294.6	344.1	380.5	409.6	442.6	461.2	
	S.D.	7.4	9.3	16.2	22.1	23.1	26.7	30.0	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G3 2,500	Mean	235.2	296.7	340.9	377.6	404.4	435.2	457.3	
	S.D.	7.7	10.9	21.4	24.1	28.4	31.2	33.5	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G4 5,000	Mean	234.2	290.5	333.0	369.5	391.0	424.5	442.3	
	S.D.	6.7	18.9	15.7	17.3	19.5	23.2	25.9	
	N	15	15	15	15	15	15	15	

Group /		Week							
Dose (mg/kg/day)		7	8	9	10	11	12	13	
G1 0	Mean	484.6	502.2	516.9	527.0	536.0	544.0	551.4	
	S.D.	46.3	52.2	52.4	56.0	58.2	55.9	53.3	
	N	15	15	15	15	15	15	15	
G2 1,250	Mean	478.4	490.6	506.7	516.6	523.7	530.3	534.5	
	S.D.	32.5	34.7	36.7	38.4	42.2	43.3	43.6	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G3 2,500	Mean	473.5	487.4	503.6	513.2	522.5	533.1	537.3	
	S.D.	36.3	38.9	41.8	43.1	44.4	47.8	46.8	
	N	10	10	10	10	10	10	10	
G4 5,000	Mean	456.8	473.9	489.2	497.9	505.2	514.8	522.8	
	S.D.	28.6	32.1	32.6	37.2	38.1	40.1	41.6	
	N	15	15	15	15	15	15	15	

**Table 2-1. (Continued)**

Sex: Female		(g)						
Group /		Week						
Dose (mg/kg/day)		0	1	2	3	4	5	6
G1 0	Mean	189.1	212.8	233.3	245.4	257.3	279.3	284.3
	S.D.	10.1	10.8	14.4	16.5	17.6	18.8	24.4
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	Mean	185.3	211.6	230.9	246.4	257.3	272.8	281.8
	S.D.	7.4	8.7	13.2	10.1	10.9	13.8	16.9
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	184.8	208.5	225.2	247.4	260.6	270.4	284.1
	S.D.	9.2	14.8	18.0	23.4	25.8	28.4	32.3
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	188.9	216.3	239.9	255.1	265.1	281.9	292.6
	S.D.	10.9	10.3	15.5	18.4	20.3	22.4	23.3
	N	15	15	15	15	15	15	15

Group /		Week						
Dose (mg/kg/day)		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	293.6	301.5	305.2	313.0	317.6	317.3	321.7
	S.D.	22.6	26.6	23.2	23.5	28.3	30.6	30.5
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	Mean	290.0	299.1	300.7	306.6	309.8	310.6	312.1
	S.D.	14.0	16.2	16.3	11.0	13.1	15.0	14.3
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	293.4	295.9	296.5	304.8	309.4	319.1	321.4
	S.D.	27.3	28.9	33.2	27.3	28.6	29.6	31.5
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	304.6	312.5	313.4	323.8	327.0	333.1	336.4
	S.D.	25.9	27.0	27.2	28.6	31.7	32.9	31.1
	N	15	15	15	15	15	15	15

**Table 2-2. Summary of body weights (Recovery Group)**

Sex: Male		(g)				
Group /		Week				
Dose (mg/kg/day)		13	14	15	16	17
G1 0	Mean	553.5	561.7	556.4	563.0	554.5
	S.D.	49.3	45.5	14.8	16.2	8.9
	N	5	5	4	4	4
G4 5,000	Mean	511.1	520.7	529.7	542.2	545.2
	S.D.	58.8	67.1	73.5	76.0	75.3
	N	5	5	5	5	5

Sex: Female		(g)				
Group /		Week				
Dose (mg/kg/day)		13	14	15	16	17
G1 0	Mean	320.3	326.4	330.8	325.9	346.1
	S.D.	32.7	34.4	39.2	36.9	27.6
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	344.4	341.0	344.2	351.6	354.8
	S.D.	32.5	33.9	37.9	37.6	37.7
	N	5	5	5	5	5

Table 3-1. Summary of food consumptions (Main Group)

Sex: Male		(g/rat/day)						
Group /		Week						
Dose (mg/kg/day)		1	2	3	4	5	6	7
G1 0	Mean	28.55	30.11	30.15	29.21	29.87	27.90	27.23
	S.D.	1.64	2.60	2.06	2.76	3.17	2.40	1.67
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	Mean	26.98	29.84	28.08 *	28.70	28.29	27.75	26.05
	S.D.	1.26	2.44	0.98	2.12	1.03	1.86	1.56
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	28.66	29.90	28.26	29.07	28.24	27.64	26.06
	S.D.	2.29	2.40	1.18	2.52	1.91	2.47	2.89
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	26.29	27.65 *	26.95 **	28.21	29.09	26.40	26.54
	S.D.	3.52	1.39	1.92	3.70	2.44	2.52	2.51
	N	15	15	15	15	15	15	15

Group /		Week					
Dose (mg/kg/day)		8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	28.93	25.56	26.95	26.37	25.57	26.64
	S.D.	3.20	2.40	2.61	2.17	2.46	1.65
	N	15	15	15	15	15	0
G2 1,250	Mean	26.99	23.02 ##	24.70 #	23.99	22.50 ##	24.60
	S.D.	0.95	0.27	0.91	1.86	1.58	2.57
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	27.43	24.54	24.71	24.87	24.80	25.64
	S.D.	2.15	1.76	3.53	2.61	1.40	1.48
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	28.40	25.20	25.78	24.41	23.87	25.69
	S.D.	2.40	2.96	2.44	2.73	2.42	2.83
	N	15	15	15	15	15	15

Significantly different from control by Dunnett's T3-test: # p<0.05, ## p<0.01

Significantly different from control by Scheffe test: \* p<0.05, \*\* p<0.01

**Table 3-1. (Continued)**

Sex: Female		(g/rat/day)						
Group /		Week						
Dose (mg/kg/day)		1	2	3	4	5	6	7
G1 0	Mean	19.37	19.79	19.85	21.49	20.52	19.78	20.08
	S.D.	2.20	1.76	2.06	1.33	2.44	2.95	1.51
	N	15	15	15	15	15	15	15
G2 1,250	Mean	18.72	19.89	18.74	19.62	20.67	19.02	19.01
	S.D.	0.97	2.34	2.18	2.28	3.10	2.67	2.60
	N	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	17.92	19.40	18.81	20.31	21.21	19.75	19.55
	S.D.	1.51	3.06	2.20	2.89	2.34	3.34	3.06
	N	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	19.01	20.11	21.15	21.47	21.35	18.81	22.04
	S.D.	1.74	2.08	2.71	3.48	2.30	3.65	2.60
	N	15	15	15	15	15	15	15

		(g/day)					
Group /		Week					
Dose (mg/kg/day)		8	9	10	11	12	13
G1 0	Mean	21.12	17.89	20.09	19.57	18.95	18.98
	S.D.	2.07	3.03	2.39	1.60	2.38	2.28
	N	15	15	15	15	15	0
G2 1,250	Mean	19.89	18.09	20.17	18.36	17.91	19.30
	S.D.	1.33	0.80	3.24	2.30	2.19	0.37
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	20.67	16.84	19.61	19.17	17.42	19.51
	S.D.	3.45	2.54	3.69	2.48	1.28	2.95
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	21.44	18.30	18.87	20.20	19.27	18.53
	S.D.	2.77	2.56	2.70	2.16	1.79	1.83
	N	15	15	15	15	15	15

㉔. Table 3-2. Summary of food consumptions (Recovery Group)

Sex: Male		(g/rat/day)			
Group /		Week			
Dose (mg/kg/day)		14	15	16	17
G1 0	Mean	23.92	28.50	28.05	23.03
	S.D.	1.75	0.46	1.15	2.51
	N	5	4	4	4
G4 5,000	Mean	28.40	28.26	27.20	26.72
	S.D.	5.63	5.15	1.69	3.36
	N	5	5	5	5

Sex: Female		(g/rat/day)			
Group /		Week			
Dose (mg/kg/day)		14	15	16	17
G1 0	Mean	18.46	19.64	18.36	17.40
	S.D.	3.36	3.33	1.75	2.25
	N	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	20.04	22.58	24.06 **	18.34
	S.D.	2.43	3.92	2.81	2.72
	N	5	5	5	5

Significantly different from control by Student t-test: \*\* p<0.01

**Table 4-1. Summary of ophthalmological examination (Main Group)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 1,250	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 2,500	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5



III. Table 4-2. Summary of ophthalmological examination (Recovery Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	4	Normal	4	4	4	4	4	4	4	4
G4 5,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Findings	Right eye				Left eye			
			Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Trans- parent media	Fundus
G1 0	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	5	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5

서. Table 5-1. Summary of urinalysis (Main Group)

Sex: Male					
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0	G2 / 1,250	G3 / 2,500	G4 / 5,000
No. of animals		5	5	5	5
Volume (mL)	Mean	11.9	12.7	11.2	12.6
	S.D	1.9	1.8	2.8	2.0
Glucose (mg/dL)	Negative	5	5	5	5
	Trace				
	1+				
	2+				
	3+				
Bilirubin (mg/dL)	Negative	5	5	5	4
	1+				1
	2+				
	3+				
Ketone body (mg/dL)	Negative		1		
	Trace	3	1	1	
	1+	2	2	4	5
	2+		1		
	3+				
Specific gravity	≤1.005				
	1.010		1		
	1.015	4	4	5	5
	1.020	1			
	1.025				
	≥1.030				
Occult blood (Ery/uL)	Negative		4	4	5
	Trace intact	1	1		
	Trace lysed	2		1	
	1+	2			
	2+				
	3+				
Protein (mg/dL)	Negative		1		
	Trace				
	1+	4	2	1	
	2+	1	2	4	4
	3+				1
pH	5.0				
	5.5				
	6.0				
	6.5				
	7.0				
	7.5				
	8.0				
	8.5	4	2	2	1
	≥9.0	1	3	3	4

**Table 5-1. (Continued)**

Sex : Female					
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0	G2 / 1,250	G3 / 2,500	G4 / 5,000
No. of animals		5	5	5	5
Volume (mL)	Mean	9.1	7.5	6.6	12.9
	S.D	5.0	2.1	2.8	6.7
Glucose (mg/dL)	Negative	4	2	4	3
	Trace		3	1	2
	1+	1			
	2+				
	3+				
Bilirubin (mg/dL)	Negative	4	3	1	1
	1+	1	1	4	2
	2+		1		2
	3+				
Ketone body (mg/dL)	Negative	1			
	Trace	1	1		1
	1+	2	2	5	3
	2+	1	2		1
	3+				
Specific gravity	≤1.005				
	1.010		1	3	2
	1.015		2	2	2
	1.020	4	1		1
	1.025	1			
	≥1.030		1		
Occult blood (Ery/uL)	Negative		1	5	4
	Trace intact				1
	Trace lysed	3	4		
	1+	1			
	2+				
	3+	1			
Protein (mg/dL)	Negative				
	Trace				
	1+	2			1
	2+	1	3	2	1
3+	2	2	3	3	
pH	5.0				
	5.5				
	6.0				
	6.5				
	7.0				
	7.5	1	1		
	8.0				
	8.5	3	1		1
	≥9.0	1	3	5	4

Table 5-2. Summary of urinalysis (Recovery Group)

Sex		Male		Female	
		G1 / 0	G4 / 5,000	G1 / 0	G4 / 5,000
Group / Dose (mg/kg)					
No. of animals		4	5	5	5
Volume (mL)	Mean	7.9	7.4	7.5	7.9
	S.D	2.9	2.6	3.5	3.5
Glucose (mg/dL)	Negative	4	4	5	5
	Trace		1		
	1+				
	2+				
	3+				
Bilirubin (mg/dL)	Negative	3	3	4	4
	1+	1	2	1	1
	2+				
	3+				
Ketone body (mg/dL)	Negative			1	1
	Trace	3	4	3	3
	1+	1	1	1	1
	2+				
	3+				
Specific gravity	≤1.005				
	1.010	1			
	1.015	1	2	3	4
	1.020	2	2	1	1
	1.025			1	
	≥1.030		1		
Occult blood (Ery/uL)	Negative	4	5	5	5
	Trace intact				
	Trace lysed				
	1+				
	2+				
	3+				
Protein (mg/dL)	Negative				
	Trace				
	1+	2	2	4	4
	2+	2	3	1	1
	3+				
pH	5.0				
	5.5				
	6.0				
	6.5				
	7.0				
	7.5				
	8.0				
	8.5		1		1
	≥9.0	4	4	5	4

㉔. Table 6-1. Summary of hematological parameters (Main Group)

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	9.06	15.8	46.6	51.5	17.5	33.9	1002	1.74
	S.D.	0.42	0.6	1.8	1.4	0.5	0.5	153	0.26
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	8.73	15.0	44.7	51.3	17.2	33.5	771	1.71
	S.D.	0.50	0.9	2.4	1.4	0.7	0.6	414	0.43
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	8.78	15.3	45.5	51.9	17.5	33.7	971	1.56
	S.D.	0.40	0.5	1.5	1.6	0.7	0.4	194	0.33
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	8.69	14.9 *	44.4	51.2	17.2	33.6	960	1.72
	S.D.	0.35	0.5	1.2	1.3	0.7	0.7	159	0.40
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	4.08	0.90	2.95	0.09	0.10	0.00	10.0	28.9
	S.D.	1.11	0.30	0.97	0.04	0.04	0.00	0.6	7.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	3.71	0.68	2.81	0.08	0.10	0.00	9.9	26.2
	S.D.	1.30	0.26	1.09	0.04	0.04	0.00	0.7	3.8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	3.84	0.79	2.85	0.09	0.08	0.00	9.6	25.5
	S.D.	1.67	0.47	1.15	0.05	0.03	0.00	0.4	4.1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	4.83	0.64	3.93	0.11	0.08	0.00	10.3	26.8
	S.D.	1.12	0.23	0.98	0.05	0.04	0.00	0.5	3.3
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Scheffe test: \*  $p < 0.05$

**Table 6-1. (Continued)**

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)		RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	Mean	7.79	14.2	41.3	53.0	18.2	34.4	871	1.87
	S.D.	1.62	3.0	8.7	1.0	0.3	0.6	433	0.66
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	7.98	14.5	41.9	52.6	18.2	34.7	1129	1.94
	S.D.	0.48	0.6	2.3	1.7	0.9	1.3	128	0.52
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	7.61	13.9	39.3	51.7	18.3	35.4	1012	1.78
	S.D.	1.36	2.3	6.9	1.6	1.5	2.4	411	0.36
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	7.69	14.3	41.0	53.2	18.7	35.1	974	1.88
	S.D.	0.66	0.9	3.7	1.2	0.9	1.6	247	0.49
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	Mean	2.07	0.29	1.66	0.05	0.06	0.00	9.8	19.3
	S.D.	1.40	0.20	1.25	0.03	0.04	0.00	0.6	2.7
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	2.25	0.34	1.80	0.04	0.05	0.00	9.8	25.7
	S.D.	0.73	0.13	0.64	0.02	0.02	0.00	0.6	6.6
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	2.19	0.48	1.56	0.05	0.09	0.00	9.9	20.9
	S.D.	0.84	0.32	0.56	0.02	0.06	0.00	0.4	1.6
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	2.11	0.45	1.53	0.06	0.05	0.00	9.8	22.8
	S.D.	0.89	0.37	0.60	0.05	0.03	0.00	0.5	3.3
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

表 6-2. Summary of hematological parameters (Recovery Group)

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC	HGB	HCT	RBC Indices			PLT	Reti
		( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	(g/dL)	(%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	(%)
G1 0	Mean	8.73	15.8	43.1	49.4	18.1	36.7	1017	1.81
	S.D.	0.50	0.6	1.8	1.1	0.5	0.3	116	0.17
	N	4	4	4	4	4	4	4	4
G4 5,000	Mean	8.24	15.7	42.1	51.2	19.2	37.4	904	1.89
	S.D.	0.61	0.4	2.5	1.7	1.5	2.5	110	0.26
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC	WBC Differential Counting (%)					PT	APTT
		( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	NEU	LYM	MONO	EOS	BASO	(sec)	(sec)
G1 0	Mean	4.20	0.63	3.38	0.09	0.09	0.00	13.7	31.0
	S.D.	1.53	0.15	1.38	0.03	0.04	0.00	0.4	3.7
	N	4	4	4	4	4	4	4	4
G4 5,000	Mean	4.29	1.08	3.00	0.10	0.08	0.00	13.7	29.7
	S.D.	1.20	0.61	1.14	0.02	0.01	0.00	0.4	3.2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex: Female									
Group / Dose (mg/kg/day)		RBC	HGB	HCT	RBC Indices			PLT	Reti
		( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	(g/dL)	(%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	(%)
G1 0	Mean	8.02	15.5	42.5	52.9	19.4	36.5	1018	1.85
	S.D.	0.26	0.6	2.1	1.0	0.3	0.4	55	0.52
	N	4	4	4	4	4	4	4	4
G4 5,000	Mean	7.83	15.3	41.5	53.0	19.5	36.8	1099	1.85
	S.D.	0.32	0.5	1.5	1.4	0.6	0.3	22	0.15
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		WBC	WBC Differential Counting (%)					PT	APTT
		( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	NEU	LYM	MONO	EOS	BASO	(sec)	(sec)
G1 0	Mean	1.35	0.22	1.06	0.03	0.05	0.00	14.5	25.3
	S.D.	0.86	0.11	0.72	0.02	0.02	0.00	0.5	4.0
	N	4	4	4	4	4	4	5	5
G4 5,000	Mean	2.33	0.31	1.91	0.06	0.05	0.00	14.3	23.2
	S.D.	1.21	0.15	1.11	0.05	0.02	0.00	0.4	2.2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

㉑. Table 7-1. Summary of clinical chemistry (Main Group)

Sex: Male										
Group /		ALT	AST	ALP	Glu	BUN	Crea	T-Bili	T-Chol	TG
Dose (mg/kg/day)		(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
G1 0	Mean	35	87	300	111	19	0.5	0.00	105	44
	S.D.	8	22	76	14	4	0.0	0.03	14	16
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	34	76	252	108	18	0.6 #	0.00	105	58
	S.D.	6	12	59	20	1	0.0	0.03	12	34
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	29	76	249	97	17	0.5	-0.04	84	33
	S.D.	9	27	56	23	3	0.1	0.02	22	14
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	31	87	244	91 ##	20	0.5	-0.02	97	44
	S.D.	5	19	32	9	2	0.1	0.02	19	17
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group /		TP	Alb	A/G	P	Ca	Na	K	Cl
Dose (mg/kg/day)		(g/dL)	(g/dL)	ratio	(mg/dL)	(mg/dL)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)
G1 0	Mean	7.7	2.8	0.57	6.45	10.1	137	5.6	99
	S.D.	0.3	0.2	0.03	0.62	0.4	12	0.9	10
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	7.8	2.8	0.56	6.26	10.0	132	5.1	93
	S.D.	0.3	0.1	0.02	0.39	0.3	15	0.8	12
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	6.8	2.5	0.56	5.72	8.8	126	4.9	89
	S.D.	1.4	0.5	0.03	1.16	1.7	16	0.6	12
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	7.5	2.8	0.59	6.52	9.8	136	5.2	96
	S.D.	0.8	0.3	0.03	1.10	1.0	5	0.6	5
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

Significantly different from control by Dunnett's T3-test: # p<0.05, ## p<0.01

타.  
 띠.  
 허.  
 고.  
 노.  
 도.



**Table 7-1. (Continued)**

Sex: Female										
Group /		ALT	AST	ALP	Glu	BUN	Crea	T-Bili	T-Chol	TG
Dose (mg/kg/day)		(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
G1 0	Mean	34	94	168	107	20	0.6	0.05	117	37
	S.D.	13	40	35	16	4	0.1	0.02	23	26
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	34	92	215	110	20	0.6	0.03	131	35
	S.D.	9	18	84	18	4	0.0	0.02	32	14
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	33	91	176	104	20	0.6	0.03	118	26
	S.D.	6	13	44	17	6	0.1	0.03	27	8
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	31	78	225	120	22	0.6	0.03	125	30
	S.D.	7	13	89	22	4	0.1	0.02	30	20
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Group /		TP	Alb	A/G	P	Ca	Na	K	Cl
Dose (mg/kg/day)		(g/dL)	(g/dL)	ratio	(mg/dL)	(mg/dL)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)
G1 0	Mean	8.0	3.3	0.69	6.09	9.9	142	5.4	102
	S.D.	0.3	0.2	0.04	0.73	0.2	1	0.7	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	8.1	3.3	0.68	6.54	10.0	142	5.4	102
	S.D.	0.5	0.2	0.03	0.82	0.5	1	0.6	1
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	8.3	3.4	0.69	5.91	10.0	142	5.0	103
	S.D.	0.4	0.2	0.05	1.06	0.4	1	0.4	2
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	8.2	3.3	0.68	6.33	10.2	141	5.1	101
	S.D.	0.3	0.3	0.10	1.04	0.4	1	0.4	3
	N	10	10	10	10	10	10	10	10

**표. Table 7-2. Summary of clinical chemistry (Recovery Group)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	Mean	28	66	244	116	16	0.6	-0.04	108	34
	S.D.	3	7	47	10	2	0.1	0.02	13	27
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
G4 5,000	Mean	33	72	257	105	18	0.6	-0.01	121	32
	S.D.	8	9	62	5	4	0.1	0.01	24	19
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	7.8	2.9	0.59	6.12	8.0	140	8.9	101
	S.D.	0.4	0.2	0.04	0.08	0.2	2	0.4	2
	N	4	4	4	4	4	4	4	4
G4 5,000	Mean	7.9	2.9	0.57	6.78 **	8.3	139	9.0	101
	S.D.	0.3	0.2	0.03	0.28	0.3	1	0.2	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Student t-test: \*\* p<0.01

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	Mean	26	65	118	128	17	0.6	0.04	100	21
	S.D.	5	18	13	21	1	0.1	0.04	18	10
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	42	93	151	128	19	0.7	0.05	118	26
	S.D.	16	30	32	13	3	0.1	0.04	15	9
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	Mean	8.0	3.3	0.70	4.59	8.0	142	4.9	104
	S.D.	0.3	0.1	0.02	1.07	0.1	1	0.6	1
	N	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	8.2	3.4	0.71	5.03	8.2	141	4.4	102 *
	S.D.	0.3	0.2	0.03	0.67	0.2	1	0.6	2
	N	5	5	5	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Student t-test: \* p<0.05

☐. Table 8-1. Summary of absolute organ weights (Main Group)

Sex: Male		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	525.6	2.1694	0.0129	1.5685	1.8462	13.9677
	S.D.	60.9	0.1182	0.0017	0.1045	0.1935	1.1803
	N	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	511.6	2.1921	0.0115	1.5220	1.8950	13.9396
	S.D.	44.3	0.1151	0.0018	0.1059	0.1442	1.5416
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	512.8	2.2216	0.0127	1.6227	1.8537	14.5205
	S.D.	47.0	0.1196	0.0023	0.2000	0.2113	1.7671
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	501.3	2.1734	0.0135	1.6287	1.9665	14.7974
	S.D.	33.8	0.0899	0.0015	0.2231	0.1582	1.3971
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.8971	3.4066	0.0601	4.1708	0.5923
	S.D.	0.0895	0.3222	0.0096	0.2865	0.1545
	N	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	0.9040	3.1483	0.0602	4.1541	0.6539
	S.D.	0.1750	0.2550	0.0072	0.4184	0.1285
	N	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	0.9323	3.3283	0.0609	4.3327	0.6439
	S.D.	0.1459	0.2713	0.0068	0.4702	0.0989
	N	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	0.9548	3.4620	0.0608	4.2715	0.6468
	S.D.	0.1725	0.3311	0.0082	0.2092	0.1920
	N	10	10	10	10	10

**Table 8-1. (Continued)**

Sex: Female		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	307.4	2.0452	0.0165	1.1007	1.4943	8.4204
	S.D.	28.4	0.0990	0.0019	0.1109	0.1282	1.4705
	N	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	301.5	2.2066	0.0168	1.1252	1.4621	8.6020
	S.D.	13.1	0.3873	0.0024	0.1062	0.0560	1.5750
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	304.5	2.0019	0.0172	1.0828	1.4461	8.7894
	S.D.	27.3	0.1263	0.0035	0.0896	0.1544	0.9512
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	312.1	2.0759	0.0168	1.1217	1.5501	9.5743
	S.D.	30.4	0.0649	0.0020	0.0957	0.0852	1.3795
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.6850	2.0046	0.0901	0.1224	0.6860
	S.D.	0.1218	0.2413	0.0118	0.0288	0.3405
	N	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	0.6968	2.0642	0.0842	0.1180	0.9025
	S.D.	0.0898	0.2014	0.0093	0.0250	0.4925
	N	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	0.6890	2.0700	0.0812	0.1386	0.7400
	S.D.	0.1149	0.2245	0.0129	0.0378	0.3307
	N	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	0.7452	2.4662	0.1275	0.1518	0.8797
	S.D.	0.3190	0.7575	0.1222	0.1297	0.3779
	N	10	10	10	10	10

**Table 8-2. Summary of absolute organ weights (Recovery Group)**

Sex: Male		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	558.3	2.3200	0.0137	1.8070	2.1768	17.1396
	S.D.	49.3	0.1032	0.0020	0.3120	0.5532	6.3748
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	513.0	2.1961	0.0137	1.5200	1.8148	14.2744
	S.D.	77.3	0.1404	0.0022	0.3003	0.2423	2.7175
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.9667	3.8859	0.0666	4.4809	0.6264
	S.D.	0.1576	1.2125	0.0039	0.3471	0.1267
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	0.8895	3.1339	0.0500 *	3.9383	0.5387
	S.D.	0.1176	0.4591	0.0097	0.5701	0.1702
	N	5	5	5	5	5

Significantly different from control by Student t-test: \* p<0.05

Sex: Female		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	309.3	2.0662	0.0162	1.0566	1.6354	8.0937
	S.D.	38.9	0.0549	0.0029	0.1103	0.2712	1.0835
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	336.4	2.1006	0.0173	1.1318	1.5930	9.1201
	S.D.	39.0	0.0828	0.0019	0.1055	0.1672	1.7561
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.6201	2.1627	0.0800	0.0943	0.6185
	S.D.	0.0957	0.3008	0.0146	0.0157	0.0716
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	0.7154	2.2533	0.0758	0.1257	0.5377
	S.D.	0.1201	0.1767	0.0123	0.0368	0.1047
	N	5	5	5	5	5

**Table 9-1. Summary of relative organ weights (Main Group)**

Sex: Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	525.6	0.4196	0.0025	0.3027	0.3561	2.6884
	S.D.	60.9	0.0673	0.0004	0.0460	0.0596	0.3766
	N	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	511.6	0.4304	0.0023	0.2983	0.3719	2.7239
	S.D.	44.3	0.0303	0.0005	0.0176	0.0315	0.1799
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	512.8	0.4355	0.0025	0.3169	0.3617	2.8269
	S.D.	47.0	0.0329	0.0006	0.0299	0.0286	0.1560
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	501.3	0.4352	0.0027	0.3247	0.3930	2.9500
	S.D.	33.8	0.0341	0.0004	0.0365	0.0319	0.1689
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.1722	0.6553	0.0116	0.8009	0.1147
	S.D.	0.0216	0.0959	0.0025	0.0896	0.0358
	N	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	0.1758	0.6195	0.0118	0.8161	0.1288
	S.D.	0.0250	0.0726	0.0013	0.0971	0.0281
	N	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	0.1813	0.6503	0.0119	0.8462	0.1255
	S.D.	0.0178	0.0305	0.0014	0.0673	0.0150
	N	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	0.1903	0.6919	0.0121	0.8545	0.1303
	S.D.	0.0311	0.0685	0.0015	0.0571	0.0426
	N	10	10	10	10	10

**Table 9-1. (Continued)**

Sex: Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	307.4	0.6684	0.0054	0.3590	0.4881	2.7311
	S.D.	28.4	0.0424	0.0006	0.0295	0.0437	0.3419
	N	10	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	301.5	0.7356	0.0056	0.3737	0.4853	2.8456
	S.D.	13.1	0.1544	0.0007	0.0363	0.0150	0.4588
	N	10	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	304.5	0.6606	0.0057	0.3567	0.4747	2.9010
	S.D.	27.3	0.0550	0.0012	0.0280	0.0224	0.3572
	N	10	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	312.1	0.6713	0.0054	0.3612	0.4996	3.0759
	S.D.	30.4	0.0727	0.0007	0.0342	0.0406	0.3928
	N	10	10	10	10	10	10

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.2223	0.6529	0.0296	0.0402	0.2243
	S.D.	0.0325	0.0628	0.0051	0.0106	0.1116
	N	10	10	10	10	10
G2 1,250	Mean	0.2307	0.6839	0.0280	0.0393	0.3014
	S.D.	0.0237	0.0482	0.0034	0.0089	0.1667
	N	10	10	10	10	10
G3 2,500	Mean	0.2264	0.6799	0.0267	0.0450	0.2488
	S.D.	0.0337	0.0411	0.0031	0.0101	0.1274
	N	10	10	10	10	10
G4 5,000	Mean	0.2374	0.7908	0.0415	0.0464	0.2859
	S.D.	0.0916	0.2202	0.0407	0.0318	0.1227
	N	10	10	10	10	10

**Table 9-2. Summary of relative organ weights (Recovery Group)**

Sex: Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	558.3	0.4179	0.0025	0.3222	0.3863	3.0191
	S.D.	49.3	0.0380	0.0004	0.0304	0.0622	0.8038
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	336.4	0.4326	0.0027	0.2957	0.3559	2.7784
	S.D.	39.0	0.0423	0.0004	0.0319	0.0401	0.2696
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	Mean	0.1726	0.6864	0.0120	0.8042	0.1141
	S.D.	0.0149	0.1449	0.0010	0.0476	0.0301
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	0.1751	0.6126	0.0098	0.7745	0.1060
	S.D.	0.0268	0.0535	0.0020	0.1190	0.0364
	N	5	5	5	5	5

Sex: Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)		B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	Mean	309.3	0.6753	0.0053	0.3426	0.5419	2.6151
	S.D.	38.9	0.0742	0.0008	0.0147	0.1577	0.0938
	N	5	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	336.4	0.6320	0.0052	0.3379	0.4752	2.6950
	S.D.	39.0	0.0860	0.0008	0.0248	0.0373	0.2479
	N	5	5	5	5	5	5

Group / Dose (mg/kg/day)		Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	Mean	0.2004	0.7010	0.0260	0.0308	0.2005
	S.D.	0.0173	0.0703	0.0044	0.0062	0.0113
	N	5	5	5	5	5
G4 5,000	Mean	0.2125	0.6738	0.0228	0.0369	0.1636
	S.D.	0.0254	0.0558	0.0048	0.0074	0.0479
	N	5	5	5	5	5



**Table 10-1. Summary of necropsy findings (Main Group)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	No. of examined	Organ	Findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	10	All	Unremarkable	S	92
G2 1,250	10	All	Unremarkable	S	92
G3 2,500	10	All	Unremarkable	S	92
G4 5,000	10	All	Unremarkable	S	92

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)	No. of examined	Organ	Findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	10	All	Unremarkable	S	92
G2 1,250	10	All	Unremarkable	S	92
G3 2,500	10	All	Unremarkable	S	92
G4 5,000	10	All	Unremarkable	S	92

S: scheduled

**Table 10-2. Summary of necropsy findings (Recovery Group)**

Sex: Male					
Group / Dose (mg/kg)	No. of examined	Organ	Findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1	9	All	Unremarkable	S	120
0	1	All	Unremarkable	U	104
G4 5,000	10	All	Unremarkable	S	120
Sex: Female					
Group / Dose (mg/kg)	No. of examined	Organ	Findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1	10	All	Unremarkable	S	120
0					
G4 5,000	10	All	Unremarkable	S	120

S: scheduled    U: unscheduled

**Table 11-1. Summary of histopathological findings (Main Group)**

Organ / Findings	Sex	Male		Female		
	Group	G1	G4	G1	G4	
	Dose (mg/kg/day)	0	5,000	0	5,000	
	No. of animals	10	10	10	10	
Adrenal	-Thickening, Zona glomerulosa	±	0	2	0	0
	-Vacuolation, cortical	±	3	2	0	0
		+	3	2	0	0
		++	1	2	0	0
	No. of examined		10	10	10	10
Kidney	-Cell infiltration, inflammatory, cortical	±	0	2	0	0
	-Inflammation	+++	0	0	0	1
	-Mineralization, cortico-medullary junction	±	0	0	1	0
	-Mineralization, medullary	±	0	0	0	1
	-Tubular basophilia, cortical	±	0	1	0	0
	-Tubular dilatation, cortical and medullary	±	2	2	1	0
		+	0	0	1	0
No. of examined		10	10	10	10	
Liver	-Cell infiltration, mononuclear	±	3	3	1	0
	No. of examined		10	10	10	10
Mesenteric lymph node	-Appearance, pigmented macrophages	±	0	2	2	2
	No. of examined		10	10	10	10
Pancreas	-Vacuolation, acinar cells	±	0	0	1	0
		+	0	0	0	1
	No. of examined		10	10	10	10
Pituitary	-Cyst, pars distalis	<+>	2	0	0	0
	No. of examined		10	10	10	10
Prostate	-Cell infiltration, inflammatory, interstitial	±	2	2		
		+	0	1		
	No. of examined		10	10		
Spleen	-Deposit, pigment	±	7	5	6	8
		+	0	0	0	1
	-Extramedullary hematopoiesis	±	2	1	1	1
		+	0	0	0	1
	No. of examined		10	10	10	10
Thymus	-Hyperplasia, epithelial tubules and cords	<+>	2	2	0	1
	No. of examined		10	10	10	10
Thyroid	-Cell infiltration, inflammatory, focal	±	1	0	0	0
	-Ultimobranchial cyst	<+>	2	0	0	1
	No. of examined		10	10	10	10

There were unremarkable changes in the brain, cecum, colon, duodenum, epididymis, esophagus, eye including optic nerve, femur including bone marrow, harderian gland, heart, ileum, jejunum, lung including bronchi, mammary gland: inguinal, ovary(female), parathyroid, rectum, salivary gland (sublingual, submandibular), seminal vesicle(male), skin: inguinal, spinal cord (thoracic), sternum including bone marrow, stomach, submandibular lymph node, testis(male), tongue, trachea, urinary bladder, utreus(female) and vagina(female) of Groups 1 and 4.

Grade- ±: minimal, +: mild, ++: moderate, +++: marked

<+>: Presence in "presence or not" basis.

**Table 11-2. Summary of histopathological findings (Recovery Group)**

Organ / Findings	Sex Group	Male		Female			
		G1	G4	G1	G4		
		0	5,000	0	5,000		
No. of animals		5	5	5	5		
Adrenal	-Vacuolation, cortical	±	2	1	0	0	
		+	0	2	0	0	
		+++	1	0	0	0	
		No. of examined	5	5	5	5	
Haderian gland	-Cell infiltration, inflammatory	±	0	0	1	0	
		No. of examined	5	5	5	5	
Kidney	-Cell infiltration, inflammatory, cortical	±	1	1	0	0	
		-Mineralization, cortico-medullary junction	±	0	0	1	0
		-Retrograde nephropathy	±	1	0	0	0
		-Tubular dilatation, cortical and medullary	+	0	0	0	1
		No. of examined	5	5	5	5	
Liver	-Cell infiltration, mononuclear	±	0	1	0	0	
		No. of examined	5	5	5	5	
Lung including bronchi	-Cell infiltration, inflammatory, focal	±	0	1	0	0	
		No. of examined	5	5	5	5	
Mesenteric lymph node	-Appearance, pigmented macorphages	±	2	3	3	2	
		No. of examined	5	5	5	5	
Prostate	-Cell infiltration, inflammatory, interstitial	±	1	0			
		+	0	1			
		++	0	1			
		No. of examined	5	5			
Spleen	-Deposit, pigment	±	2	3	2	1	
		+	2	2	3	4	
	-Extramedullary hematopoiesis	±	0	1	0	0	
		No. of examined	5	5	5	5	
Thymus	-Hyperplasia, epithelial tubules and cords	<+>	0	0	3	2	
		No. of examined	5	5	5	5	
Thyroid	-Ultimobranchial cyst	<+>	0	2	0	1	
		No. of examined	5	5	5	5	

There were unremarkable changes in the brain, cecum, colon, duodenum, epididymis, esophagus, eye including optic nerve, femur including bone marrow, heart, ileum, jejunum, mammary gland: inguinal, ovary(female), pancreas, parathyroid, pituitary, rectum, salivary gland (sublingual, submandibular), seminal vesicle(male), skin: inguinal, spinal cord (thoracic), sternum including bone marrow, stomach, submandibular lymph node, testis(male), tongue, trachea, urinary bladder, utreus(female) and vagina(female) of Groups 1 and 4.

Grade- ±: minimal, +: mild, ++: moderate, +++: marked

<+>: Presence in "presence or not" basis.

## **Ⅴ. APPENDICES**

**호. Appendix 1-1. Individual clinical signs (Main Group)**

Sex: Male					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical signs	Days		
			1	2	3 ~ 92
G1 0	11001		-	-	-
	11002		-	-	-
	11003		-	-	-
	11004		-	-	-
	11005		-	-	-
	11006		-	-	-
	11007		-	-	-
	11008		-	-	-
	11009		-	-	-
	11010		-	-	-
	11011		-	-	-
	11012		-	-	-
	11013		-	-	-
	11014		-	-	-
	11015		-	-	-
G2 1,250	12001	Compound-colored feces	-	-	+
	12002	Compound-colored feces	-	-	+
	12003	Compound-colored feces	-	-	+
	12004	Compound-colored feces	-	-	+
	12005	Compound-colored feces	-	-	+
	12006	Compound-colored feces	-	-	+
	12007	Compound-colored feces	-	-	+
	12008	Compound-colored feces	-	-	+
	12009	Compound-colored feces	-	+	+
	12010	Compound-colored feces	-	+	+

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality

구.

누.

Appendix 1-1. (Continued)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical signs	Days		
			1	2	3 ~ 92
G3 2,500	13001	Compound-colored feces	-	+	+
	13002	Compound-colored feces	-	+	+
	13003	Compound-colored feces	-	+	+
	13004	Compound-colored feces	-	+	+
	13005	Compound-colored feces	-	-	+
	13006	Compound-colored feces	-	-	+
	13007	Compound-colored feces	-	+	+
	13008	Compound-colored feces	-	+	+
	13009	Compound-colored feces	-	+	+
	13010	Compound-colored feces	-	+	+
G4 5,000	14001	Compound-colored feces	-	+	+
	14002	Compound-colored feces	-	+	+
	14003	Compound-colored feces	-	+	+
	14004	Compound-colored feces	-	+	+
	14005	Compound-colored feces	-	+	+
	14006	Compound-colored feces	-	+	+
	14007	Compound-colored feces	-	+	+
	14008	Compound-colored feces	-	+	+
	14009	Compound-colored feces	-	+	+
	14010	Compound-colored feces	-	+	+
	14011	Compound-colored feces	-	+	+
	14012	Compound-colored feces	-	+	+
	14013	Compound-colored feces	-	+	+
	14014	Compound-colored feces	-	+	+
	14015	Compound-colored feces	-	+	+

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality

두.

루.

Appendix 1-1. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical signs	Days		
			1	2	3 ~ 92
G1 0	21001		-	-	-
	21002		-	-	-
	21003		-	-	-
	21004		-	-	-
	21005		-	-	-
	21006		-	-	-
	21007		-	-	-
	21008		-	-	-
	21009		-	-	-
	21010		-	-	-
	21011		-	-	-
	21012		-	-	-
	21013		-	-	-
	21014		-	-	-
	21015		-	-	-
G2 1,250	22001	Compound-colored feces	-	+	+
	22002	Compound-colored feces	-	+	+
	22003	Compound-colored feces	-	-	+
	22004	Compound-colored feces	-	-	+
	22005	Compound-colored feces	-	-	+
	22006	Compound-colored feces	-	-	+
	22007	Compound-colored feces	-	+	+
	22008	Compound-colored feces	-	+	+
	22009	Compound-colored feces	-	-	+
	22010	Compound-colored feces	-	-	+

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality

무.

부.



Appendix 1-1. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical signss	Days		
			1	2	3 ~ 92
G3 2,500	23001	Compound-colored feces	-	-	+
	23002	Compound-colored feces	-	-	+
	23003	Compound-colored feces	-	+	+
	23004	Compound-colored feces	-	+	+
	23005	Compound-colored feces	-	+	+
	23006	Compound-colored feces	-	+	+
	23007	Compound-colored feces	-	+	+
	23008	Compound-colored feces	-	+	+
	23009	Compound-colored feces	-	+	+
	23010	Compound-colored feces	-	+	+
G4 5,000	24001	Compound-colored feces	-	+	+
	24002	Compound-colored feces	-	+	+
	24003	Compound-colored feces	-	+	+
	24004	Compound-colored feces	-	+	+
	24005	Compound-colored feces	-	+	+
	24006	Compound-colored feces	-	+	+
	24007	Compound-colored feces	-	+	+
	24008	Compound-colored feces	-	+	+
	24009	Compound-colored feces	-	+	+
	24010	Compound-colored feces	-	+	+
	24011	Compound-colored feces	-	+	+
	24012	Compound-colored feces	-	+	+
	24013	Compound-colored feces	-	+	+
	24014	Compound-colored feces	-	+	+
	24015	Compound-colored feces	-	+	+

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality

수.

우.

**주. Appendix 1-2. Individual clinical signs (Recovery Group)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	Day				
			92	93	94 ~ 103	104	105~120
G1 0	11011		-	-	-	-	-
	11012		-	-	-	-	-
	11013		-	-	-	-	-
	11014		-	-	-	-	-
	11015	Death	-	-	-	+	
G4 5,000	14011	Compound-colored feces	+	-	-	-	-
	14012	Compound-colored feces	+	-	-	-	-
	14013	Compound-colored feces	+	-	-	-	-
	14014	Compound-colored feces	+	-	-	-	-
	14015	Compound-colored feces	+	+	-	-	-

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Clinical sign	Day		
			92	93	94 ~ 120
G1 0	21011		-	-	-
	21012		-	-	-
	21013		-	-	-
	21014				
	21015		-	-	-
G4 5,000	24011	Compound-colored feces	+	-	-
	24012	Compound-colored feces	+	-	-
	24013	Compound-colored feces	+	+	-
	24014	Compound-colored feces	+	+	-
	24015	Compound-colored feces	+	-	-

-: No observable abnormality, +: Observable abnormality

추.

쿠.

투. Appendix 2-1. Individual body weights (Main Group)

Sex: Male		(g)							
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		0	1	2	3	4	5	6	
G1 0	11001	245.2	315.7	383.6	425.8	457.5	489.0	522.4	
	11002	243.3	287.2	326.0	357.5	379.3	405.3	423.9	
	11003	244.1	312.3	356.4	400.3	434.2	469.8	490.9	
	11004	240.1	301.9	359.7	396.6	437.2	477.0	506.4	
	11005	242.9	308.5	357.7	400.1	441.0	489.2	515.1	
	11006	233.4	301.3	349.7	396.3	415.6	446.9	469.7	
	11007	232.8	284.5	319.7	343.4	369.3	394.7	413.5	
	11008	233.3	287.4	329.9	356.5	384.6	409.6	434.3	
	11009	233.1	278.0	314.6	348.5	377.7	409.3	427.5	
	11010	223.3	280.4	316.9	359.6	377.9	409.7	422.7	
	11011	241.9	294.1	339.3	380.1	408.3	440.8	459.3	
	11012	235.7	290.8	332.3	367.0	386.2	413.8	433.0	
	11013	239.4	305.0	352.5	401.0	419.5	446.4	463.9	
	11014	235.8	294.9	336.6	381.9	405.2	436.2	460.5	
	11015	225.2	297.8	360.4	417.5	462.9	504.2	531.0	
		<b>Mean</b>	<b>236.6</b>	<b>296.0</b>	<b>342.4</b>	<b>382.1</b>	<b>410.4</b>	<b>442.8</b>	<b>464.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6.6</b>	<b>11.5</b>	<b>19.7</b>	<b>25.7</b>	<b>30.9</b>	<b>35.8</b>	<b>39.8</b>	
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	
G2 1,250	12001	238.2	302.1	337.9	380.0	408.4	433.3	451.5	
	12002	245.1	294.7	329.8	360.1	390.4	415.6	426.8	
	12003	237.5	312.9	364.1	404.0	435.4	467.0	492.9	
	12004	238.0	284.5	317.9	346.0	364.0	392.7	403.2	
	12005	234.9	295.0	332.8	353.3	393.8	433.8	453.2	
	12006	233.8	295.5	364.2	408.8	429.3	481.1	500.9	
	12007	230.6	298.1	354.3	396.8	425.9	460.6	472.5	
	12008	230.2	291.9	352.3	390.1	418.2	455.5	477.3	
	12009	226.8	293.0	356.8	395.5	433.3	458.0	480.7	
	12010	218.1	278.6	330.6	370.7	397.2	427.9	453.2	
		<b>Mean</b>	<b>233.3</b>	<b>294.6</b>	<b>344.1</b>	<b>380.5</b>	<b>409.6</b>	<b>442.6</b>	<b>461.2</b>
		<b>S.D.</b>	<b>7.4</b>	<b>9.3</b>	<b>16.2</b>	<b>22.1</b>	<b>23.1</b>	<b>26.7</b>	<b>30.0</b>
		<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Male		(g)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		0	1	2	3	4	5	6
G3 2,500	13001	245.4	300.6	341.1	388.3	421.1	456.4	480.1
	13002	240.9	299.1	333.9	373.4	396.5	431.6	448.6
	13003	241.4	287.7	311.9	342.8	370.8	391.5	403.1
	13004	241.0	309.2	360.5	392.7	420.4	449.9	471.8
	13005	239.5	304.2	366.0	408.0	435.7	462.5	485.9
	13006	231.9	304.1	359.9	402.7	428.6	458.7	482.3
	13007	230.5	300.0	343.7	371.0	396.8	432.0	462.4
	13008	229.4	284.9	312.7	341.3	362.2	388.5	411.9
	13009	231.4	303.0	362.9	397.4	438.6	476.6	500.5
	13010	220.2	274.1	316.7	358.5	373.6	404.2	426.3
	<b>Mean</b>	<b>235.2</b>	<b>296.7</b>	<b>340.9</b>	<b>377.6</b>	<b>404.4</b>	<b>435.2</b>	<b>457.3</b>
	<b>S.D.</b>	<b>7.7</b>	<b>10.9</b>	<b>21.4</b>	<b>24.1</b>	<b>28.4</b>	<b>31.2</b>	<b>33.5</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	246.5	309.8	348.6	376.6	394.6	417.8	425.8
	14002	239.7	304.1	335.9	360.3	378.5	411.1	426.3
	14003	239.1	284.8	320.6	359.3	385.2	413.7	425.5
	14004	237.1	297.1	343.8	390.1	413.0	454.3	474.2
	14005	232.1	294.0	329.8	362.5	380.9	410.6	439.1
	14006	233.9	294.9	353.0	388.1	410.7	441.2	464.5
	14007	232.3	293.6	342.5	386.2	404.4	442.4	469.3
	14008	234.5	314.7	346.2	387.3	412.6	456.7	476.9
	14009	221.1	285.3	320.4	349.4	375.0	416.6	415.2
	14010	224.0	279.2	332.4	387.3	418.6	431.4	438.5
	14011	243.7	304.4	340.7	374.8	396.4	409.6	436.0
	14012	232.3	296.3	342.2	375.7	403.3	468.5	489.4
	14013	233.5	283.8	324.2	359.0	373.1	402.5	428.6
	14014	234.2	233.8	291.1	332.1	358.2	395.3	421.9
	14015	229.0	281.4	322.9	353.3	360.5	395.2	403.5
<b>Mean</b>	<b>234.2</b>	<b>290.5</b>	<b>333.0</b>	<b>369.5</b>	<b>391.0</b>	<b>424.5</b>	<b>442.3</b>	
<b>S.D.</b>	<b>6.7</b>	<b>18.9</b>	<b>15.7</b>	<b>17.3</b>	<b>19.5</b>	<b>23.2</b>	<b>25.9</b>	
<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Male		(g)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	11001	544.7	555.0	583.9	599.8	611.6	621.9	625.6
	11002	433.4	448.2	457.0	467.2	473.2	487.7	493.3
	11003	520.5	567.3	556.6	567.5	578.8	587.5	591.9
	11004	530.6	558.9	576.1	589.4	608.6	606.5	609.7
	11005	540.3	573.2	589.0	608.5	618.4	615.0	622.6
	11006	490.9	501.3	516.0	525.9	534.3	548.7	559.5
	11007	425.8	437.9	449.0	460.4	468.4	475.1	489.0
	11008	445.4	460.8	475.8	484.7	483.2	491.1	503.8
	11009	440.0	444.2	458.7	458.7	462.7	475.9	492.6
	11010	442.5	456.9	477.8	484.2	499.5	504.5	514.8
	11011	477.6	490.4	505.2	508.9	515.3	527.2	530.9
	11012	456.4	462.3	484.3	492.8	503.2	507.3	516.7
	11013	478.6	497.5	510.6	516.1	520.0	528.7	528.9
	11014	471.0	493.7	509.7	521.9	536.9	549.0	552.4
	11015	570.7	585.4	603.6	618.8	626.1	633.9	638.6
		<b>Mean</b>	<b>484.6</b>	<b>502.2</b>	<b>516.9</b>	<b>527.0</b>	<b>536.0</b>	<b>544.0</b>
	<b>S.D.</b>	<b>46.3</b>	<b>52.2</b>	<b>52.4</b>	<b>56.0</b>	<b>58.2</b>	<b>55.9</b>	<b>53.3</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
G2 1,250	12001	467.9	478.7	493.3	499.3	508.2	517.0	522.5
	12002	447.5	454.5	468.3	473.6	476.0	474.9	480.3
	12003	513.8	522.0	541.5	550.3	564.2	566.0	569.3
	12004	413.0	419.2	435.9	440.8	443.2	448.2	450.1
	12005	470.0	486.0	497.9	512.9	519.5	525.1	533.8
	12006	524.2	539.0	566.5	575.8	592.7	596.6	601.1
	12007	484.8	502.1	521.0	530.9	537.7	548.7	553.6
	12008	497.4	507.1	519.0	536.1	541.1	555.4	563.1
	12009	494.9	512.8	521.2	528.6	535.1	543.9	542.1
	12010	470.6	484.7	502.4	517.2	519.2	526.9	528.8
		<b>Mean</b>	<b>478.4</b>	<b>490.6</b>	<b>506.7</b>	<b>516.6</b>	<b>523.7</b>	<b>530.3</b>
	<b>S.D.</b>	<b>32.5</b>	<b>34.7</b>	<b>36.7</b>	<b>38.4</b>	<b>42.2</b>	<b>43.3</b>	<b>43.6</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Male		(g)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G3 2,500	13001	497.6	513.0	532.0	540.5	550.0	569.7	571.1
	13002	461.1	476.3	495.9	506.0	510.1	510.9	515.2
	13003	414.0	423.5	434.7	439.4	443.4	458.7	462.3
	13004	494.3	510.4	530.6	534.3	542.8	560.0	566.4
	13005	513.7	529.1	543.2	550.3	561.7	567.5	556.7
	13006	500.1	509.9	530.2	539.4	553.8	557.6	563.4
	13007	473.5	492.0	505.5	518.6	523.4	532.4	540.1
	13008	425.8	436.2	446.5	461.4	474.3	474.2	482.9
	13009	513.0	532.4	552.1	571.5	583.2	607.6	615.8
	13010	442.1	451.1	465.1	470.4	481.8	492.5	499.5
	<b>Mean</b>	<b>473.5</b>	<b>487.4</b>	<b>503.6</b>	<b>513.2</b>	<b>522.5</b>	<b>533.1</b>	<b>537.3</b>
<b>S.D.</b>	<b>36.3</b>	<b>38.9</b>	<b>41.8</b>	<b>43.1</b>	<b>44.4</b>	<b>47.8</b>	<b>46.8</b>	
<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	14001	441.7	454.1	469.6	475.9	482.5	485.9	490.6
	14002	436.0	447.7	465.4	474.3	482.5	489.5	501.0
	14003	436.9	445.7	457.6	466.7	479.7	492.0	511.8
	14004	488.7	506.4	522.5	530.1	537.2	546.4	548.6
	14005	453.8	472.7	494.5	500.1	509.6	523.9	532.3
	14006	491.6	520.1	536.2	556.2	563.7	575.9	583.7
	14007	488.1	501.4	515.8	533.7	538.0	549.4	554.5
	14008	488.8	506.1	523.2	532.7	542.3	548.7	559.8
	14009	435.3	445.0	466.1	468.8	473.6	487.1	489.0
	14010	451.8	469.5	481.7	490.4	498.2	503.7	515.4
	14011	444.6	463.1	473.9	489.0	494.3	512.5	517.2
	14012	509.6	534.9	550.5	567.2	577.9	594.2	609.3
	14013	436.1	460.3	470.9	471.0	485.0	480.6	489.3
	14014	434.2	455.4	471.4	469.7	463.8	478.4	481.3
	14015	414.2	425.5	438.9	442.4	449.0	454.4	458.3
	<b>Mean</b>	<b>456.8</b>	<b>473.9</b>	<b>489.2</b>	<b>497.9</b>	<b>505.2</b>	<b>514.8</b>	<b>522.8</b>
<b>S.D.</b>	<b>28.6</b>	<b>32.1</b>	<b>32.6</b>	<b>37.2</b>	<b>38.1</b>	<b>40.1</b>	<b>41.6</b>	
<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Female		(g)							
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		0	1	2	3	4	5	6	
G1 0	21001	180.3	208.3	229.7	239.4	252.5	269.3	272.2	
	21002	179.0	206.8	223.7	229.8	244.7	273.1	250.6	
	21003	189.5	212.3	239.1	244.7	266.7	278.4	286.4	
	21004	194.6	210.4	240.3	252.6	258.9	283.7	293.2	
	21005	176.9	197.0	200.0	211.5	241.7	259.2	274.1	
	21006	186.9	211.2	234.3	241.4	226.7	255.7	243.7	
	21007	188.0	211.6	224.9	249.5	256.3	270.9	280.4	
	21008	204.7	213.1	238.8	261.8	267.7	297.7	302.7	
	21009	189.9	229.0	244.2	257.9	271.4	305.3	306.4	
	21010	203.2	213.9	235.5	250.4	262.2	282.4	284.7	
	21011	186.1	231.1	252.4	241.4	264.5	285.7	287.2	
	21012	180.9	205.4	228.7	239.6	261.7	298.4	325.7	
	21013	177.2	197.2	211.3	224.4	227.9	239.6	246.0	
	21014	190.4	211.1	242.5	255.9	259.2	282.6	295.2	
	21015	208.8	232.9	254.2	281.0	297.3	307.0	316.6	
	<b>Mean</b>	<b>189.1</b>	<b>212.8</b>	<b>233.3</b>	<b>245.4</b>	<b>257.3</b>	<b>279.3</b>	<b>284.3</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>10.1</b>	<b>10.8</b>	<b>14.4</b>	<b>16.5</b>	<b>17.6</b>	<b>18.8</b>	<b>24.4</b>	
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	
G2 1,250	22001	179.7	198.9	218.8	243.6	255.1	260.7	269.6	
	22002	187.6	220.8	254.5	241.9	260.8	293.3	311.5	
	22003	178.1	199.2	213.1	235.6	249.3	259.6	256.8	
	22004	188.9	207.8	230.6	240.7	239.3	260.8	268.3	
	22005	173.6	208.6	233.5	229.1	254.1	274.2	279.5	
	22006	183.0	217.1	232.2	253.4	257.0	274.3	306.0	
	22007	188.3	207.7	239.7	252.7	265.9	295.1	285.3	
	22008	189.7	216.4	215.6	251.9	254.2	260.3	284.4	
	22009	184.3	214.4	225.6	251.7	255.7	265.8	271.3	
	22010	200.1	225.3	245.3	263.6	281.2	283.4	285.6	
		<b>Mean</b>	<b>185.3</b>	<b>211.6</b>	<b>230.9</b>	<b>246.4</b>	<b>257.3</b>	<b>272.8</b>	<b>281.8</b>
		<b>S.D.</b>	<b>7.4</b>	<b>8.7</b>	<b>13.2</b>	<b>10.1</b>	<b>10.9</b>	<b>13.8</b>	<b>16.9</b>
		<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Female		(g)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		0	1	2	3	4	5	6
G3 2,500	23001	171.7	202.8	215.5	228.8	229.6	248.0	261.0
	23002	177.9	193.7	215.4	217.3	227.5	240.4	242.2
	23003	185.2	224.7	238.4	274.4	290.5	282.7	287.0
	23004	183.0	194.5	208.4	241.5	255.8	259.6	265.0
	23005	178.0	207.5	221.3	239.8	251.1	269.7	281.3
	23006	184.1	202.6	214.3	244.1	270.9	271.9	296.5
	23007	183.2	189.1	200.5	218.1	229.0	225.4	242.2
	23008	198.3	234.8	246.9	277.3	284.9	312.4	337.4
	23009	184.4	217.1	256.4	252.7	293.2	310.5	323.0
	23010	202.2	217.9	234.9	280.1	273.8	283.3	305.1
	<b>Mean</b>	<b>184.8</b>	<b>208.5</b>	<b>225.2</b>	<b>247.4</b>	<b>260.6</b>	<b>270.4</b>	<b>284.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>9.2</b>	<b>14.8</b>	<b>18.0</b>	<b>23.4</b>	<b>25.8</b>	<b>28.4</b>	<b>32.3</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	191.0	218.0	241.8	273.3	284.2	302.8	307.0
	24002	181.5	224.0	243.1	258.4	239.6	287.7	297.1
	24003	189.7	205.6	233.5	250.7	269.6	277.4	287.3
	24004	169.4	204.1	209.9	221.4	243.9	250.2	278.3
	24005	178.2	208.2	222.6	239.3	242.2	255.5	267.6
	24006	180.2	213.7	239.8	247.8	259.2	259.6	264.3
	24007	188.9	226.1	253.7	268.6	279.9	313.7	335.2
	24008	195.0	215.5	247.0	251.0	269.8	278.7	297.1
	24009	200.1	223.9	264.7	282.7	290.2	301.5	307.7
	24010	198.2	193.1	221.5	237.7	227.8	257.6	264.7
	24011	185.4	219.1	255.0	266.4	283.2	317.5	324.4
	24012	182.4	218.9	224.2	247.5	259.2	268.3	268.7
	24013	186.3	220.7	244.5	250.6	274.5	283.3	296.7
	24014	192.5	218.8	236.9	240.1	257.3	267.2	271.4
	24015	215.3	235.1	259.9	290.4	296.2	307.7	320.9
	<b>Mean</b>	<b>188.9</b>	<b>216.3</b>	<b>239.9</b>	<b>255.1</b>	<b>265.1</b>	<b>281.9</b>	<b>292.6</b>
	<b>S.D.</b>	<b>10.9</b>	<b>10.3</b>	<b>15.5</b>	<b>18.4</b>	<b>20.3</b>	<b>22.4</b>	<b>23.3</b>
<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	



Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Female		(g)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G1 0	21001	281.8	283.7	286.7	303.5	306.2	305.1	311.6
	21002	269.1	272.4	300.5	289.4	278.6	281.1	283.9
	21003	297.8	292.9	297.6	302.0	322.4	315.9	321.6
	21004	313.6	316.6	314.0	331.3	336.1	324.0	333.0
	21005	277.6	280.1	285.2	311.8	294.3	296.1	302.4
	21006	256.5	261.9	270.3	274.8	277.3	280.1	281.8
	21007	292.1	305.8	301.9	306.6	312.8	321.8	324.2
	21008	311.1	351.2	339.3	330.1	353.8	381.2	389.4
	21009	316.6	333.1	334.1	345.4	352.5	337.4	337.4
	21010	292.1	307.7	303.2	328.6	336.3	337.0	339.1
	21011	291.7	308.4	307.0	313.2	313.1	322.6	324.8
	21012	315.1	315.0	319.5	322.2	332.6	318.2	323.2
	21013	254.7	259.5	263.4	266.9	270.5	263.6	271.7
	21014	303.0	302.6	312.0	319.7	318.7	314.4	318.2
	21015	331.4	331.8	342.8	349.3	358.4	361.2	363.6
		<b>Mean</b>	<b>293.6</b>	<b>301.5</b>	<b>305.2</b>	<b>313.0</b>	<b>317.6</b>	<b>317.3</b>
	<b>S.D.</b>	<b>22.6</b>	<b>26.6</b>	<b>23.2</b>	<b>23.5</b>	<b>28.3</b>	<b>30.6</b>	<b>30.5</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
G2 1,250	22001	285.1	289.1	289.4	298.8	303.5	303.2	304.1
	22002	292.2	298.2	320.8	323.9	298.3	312.8	321.3
	22003	272.8	290.2	283.6	291.5	299.6	301.7	300.4
	22004	272.4	270.4	280.5	291.1	292.9	282.8	282.3
	22005	281.6	300.9	303.8	308.8	324.6	319.8	316.9
	22006	291.1	298.3	308.4	308.3	314.0	322.6	321.2
	22007	305.5	326.2	326.5	316.8	333.9	330.2	328.2
	22008	293.1	291.1	283.0	299.8	301.2	293.4	302.3
	22009	287.7	304.5	299.5	311.5	310.7	314.9	320.1
	22010	318.4	322.0	311.6	315.4	318.8	324.3	323.9
		<b>Mean</b>	<b>290.0</b>	<b>299.1</b>	<b>300.7</b>	<b>306.6</b>	<b>309.8</b>	<b>310.6</b>
	<b>S.D.</b>	<b>14.0</b>	<b>16.2</b>	<b>16.3</b>	<b>11.0</b>	<b>13.1</b>	<b>15.0</b>	<b>14.3</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 2-1. (Continued)

Sex: Female		(g)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		7	8	9	10	11	12	13
G3 2,500	23001	267.9	267.9	273.0	284.9	302.0	317.8	318.0
	23002	257.2	258.4	255.0	261.6	263.5	267.3	267.1
	23003	303.9	329.2	324.2	327.2	343.1	351.3	348.2
	23004	281.8	294.2	286.0	288.2	299.2	306.9	306.2
	23005	284.6	292.1	283.2	299.6	301.6	308.1	311.2
	23006	308.2	304.2	309.9	309.1	302.2	318.1	331.1
	23007	259.0	251.1	246.7	275.2	275.1	282.9	279.3
	23008	330.6	317.1	325.9	330.4	330.9	342.1	342.6
	23009	329.9	334.0	349.7	345.1	355.0	361.5	367.5
	23010	311.0	310.4	311.7	326.8	321.2	335.1	342.8
	<b>Mean</b>	<b>293.4</b>	<b>295.9</b>	<b>296.5</b>	<b>304.8</b>	<b>309.4</b>	<b>319.1</b>	<b>321.4</b>
	<b>S.D.</b>	<b>27.3</b>	<b>28.9</b>	<b>33.2</b>	<b>27.3</b>	<b>28.6</b>	<b>29.6</b>	<b>31.5</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	327.1	337.4	333.3	340.3	352.9	352.9	352.4
	24002	298.1	294.1	315.3	316.7	318.1	316.0	319.8
	24003	307.2	312.5	306.5	326.8	332.5	335.4	330.7
	24004	291.2	318.5	309.1	303.2	298.8	315.8	329.1
	24005	274.6	275.1	280.1	294.6	297.2	291.9	302.9
	24006	280.9	292.7	284.6	305.6	306.1	314.0	314.5
	24007	351.1	358.1	367.6	388.6	384.8	392.6	401.3
	24008	322.5	315.0	306.2	316.4	332.2	343.2	341.3
	24009	321.2	335.1	323.0	337.3	335.9	343.0	345.2
	24010	266.0	264.2	277.0	288.1	284.5	275.7	287.1
	24011	329.4	341.2	348.5	355.0	382.5	375.2	370.1
	24012	274.4	290.9	285.2	291.1	291.8	296.7	299.3
	24013	314.3	320.1	319.0	330.5	328.9	358.3	361.1
	24014	279.7	292.2	297.9	302.9	301.2	319.1	320.7
	24015	331.2	339.7	348.2	359.6	358.0	366.6	370.6
	<b>Mean</b>	<b>304.6</b>	<b>312.5</b>	<b>313.4</b>	<b>323.8</b>	<b>327.0</b>	<b>333.1</b>	<b>336.4</b>
<b>S.D.</b>	<b>25.9</b>	<b>27.0</b>	<b>27.2</b>	<b>28.6</b>	<b>31.7</b>	<b>32.9</b>	<b>31.1</b>	
<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

平. Appendix 2-2. Individual body weights (Recovery Group)

Sex: Male		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		13	14	15	16	17
G1 0	11011	530.9	534.2	550.5	554.4	560.5
	11012	516.7	542.6	548.1	553.6	554.4
	11013	528.9	532.5	548.5	556.8	561.0
	11014	552.4	558.3	578.6	587.3	541.9
	11015	638.6	641.0	643.2 *		
	<b>Mean</b>	<b>553.5</b>	<b>561.7</b>	<b>556.4</b>	<b>563.0</b>	<b>554.5</b>
	<b>S.D.</b>	<b>49.3</b>	<b>45.5</b>	<b>14.8</b>	<b>16.2</b>	<b>8.9</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	
G4 5,000	14011	517.2	517.7	519.7	531.9	532.5
	14012	609.3	635.0	657.6	673.7	675.5
	14013	489.3	493.8	493.5	508.3	514.7
	14014	481.3	496.2	504.7	517.4	522.0
	14015	458.3	460.7	473.2	479.5	481.4
	<b>Mean</b>	<b>511.1</b>	<b>520.7</b>	<b>529.7</b>	<b>542.2</b>	<b>545.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>58.8</b>	<b>67.1</b>	<b>73.5</b>	<b>76.0</b>	<b>75.3</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Sex: Female		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week				
		13	14	15	16	17
G1 0	21011	324.8	327.3	324.6	329.6	331.2
	21012	323.2	340.9	348.3	333.3	328.6
	21013	271.7	273.1	271.8	272.7	370.9
	21014	318.2	323.3	330.1	318.1	319.3
	21015	363.6	367.3	379.1	375.9	380.6
	<b>Mean</b>	<b>320.3</b>	<b>326.4</b>	<b>330.8</b>	<b>325.9</b>	<b>346.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>32.7</b>	<b>34.4</b>	<b>39.2</b>	<b>36.9</b>	<b>27.6</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	370.1	356.9	378.9	365.0	371.5
	24012	299.3	292.6	301.5	306.0	309.0
	24013	361.1	367.9	366.7	376.9	379.8
	24014	320.7	318.9	304.5	318.2	320.3
	24015	370.6	368.9	369.5	392.1	393.4
	<b>Mean</b>	<b>344.4</b>	<b>341.0</b>	<b>344.2</b>	<b>351.6</b>	<b>354.8</b>
	<b>S.D.</b>	<b>32.5</b>	<b>33.9</b>	<b>37.9</b>	<b>37.6</b>	<b>37.7</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

\* : Death (Day 103)

㉔. Appendix 3-1. Individual food consumption (Main Group)

Sex: Male		(g/rat/day)							
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week							
		1	2	3	4	5	6	7	
G1 0	11001	29.35	28.90	30.75	29.00	28.85	27.15	27.15	
	11002	29.35	28.90	30.75	29.00	28.85	27.15	27.15	
	11003	29.15	32.15	29.05	32.20	33.35	31.40	29.10	
	11004	29.15	32.15	29.05	32.20	33.35	31.40	29.10	
	11005	29.45	31.60	30.35	30.10	30.95	29.00	29.20	
	11006	29.45	31.60	30.35	30.10	30.95	29.00	29.20	
	11007	27.25	26.35	30.00	27.15	27.25	23.95	24.80	
	11008	27.25	26.35	30.00	27.15	27.25	23.95	24.80	
	11009	26.95	29.65	29.40	30.10	30.00	27.10	25.00	
	11010	26.95	29.65	29.40	30.10	30.00	27.10	25.00	
	11011	26.15	28.45	28.85	24.70	29.20	27.85	27.15	
	11012	26.15	28.45	28.85	24.70	29.20	27.85	27.15	
	11013	30.00	30.30	29.15	28.25	25.60	26.75	27.40	
	11014	30.00	30.30	29.15	28.25	25.60	26.75	27.40	
	11015	31.70	36.80	37.20	35.10	37.70	32.10	28.80	
	<b>Mean</b>	<b>28.55</b>	<b>30.11</b>	<b>30.15</b>	<b>29.21</b>	<b>29.87</b>	<b>27.90</b>	<b>27.23</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>1.64</b>	<b>2.60</b>	<b>2.06</b>	<b>2.76</b>	<b>3.17</b>	<b>2.40</b>	<b>1.67</b>	
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	
G2 1,250	12001	25.80	32.10	27.35	30.25	28.20	26.25	24.15	
	12002	25.80	32.10	27.35	30.25	28.20	26.25	24.15	
	12003	26.60	29.90	28.90	30.10	28.95	27.00	25.80	
	12004	26.60	29.90	28.90	30.10	28.95	27.00	25.80	
	12005	29.15	32.70	28.30	30.65	29.75	31.15	28.55	
	12006	29.15	32.70	28.30	30.65	29.75	31.15	28.55	
	12007	27.25	27.40	29.15	26.10	27.05	27.65	25.20	
	12008	27.25	27.40	29.15	26.10	27.05	27.65	25.20	
	12009	26.10	27.10	26.70	26.40	27.50	26.70	26.55	
	12010	26.10	27.10	26.70	26.40	27.50	26.70	26.55	
		<b>Mean</b>	<b>26.98</b>	<b>29.84</b>	<b>28.08</b>	<b>28.70</b>	<b>28.29</b>	<b>27.75</b>	<b>26.05</b>
		<b>S.D.</b>	<b>1.26</b>	<b>2.44</b>	<b>0.98</b>	<b>2.12</b>	<b>1.03</b>	<b>1.86</b>	<b>1.56</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	

Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Male		(g/rat/day)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		1	2	3	4	5	6	7
G3 2,500	13001	30.30	28.95	27.20	28.00	29.35	29.55	26.70
	13002	30.30	28.95	27.20	28.00	29.35	29.55	26.70
	13003	27.35	27.20	28.25	27.25	25.45	24.90	23.30
	13004	27.35	27.20	28.25	27.25	25.45	24.90	23.30
	13005	31.30	34.00	28.90	33.75	28.45	31.10	31.00
	13006	31.30	34.00	28.90	33.75	28.45	31.10	31.00
	13007	25.20	29.00	26.95	27.65	27.20	26.95	25.40
	13008	25.20	29.00	26.95	27.65	27.20	26.95	25.40
	13009	29.15	30.35	30.00	28.70	30.75	25.70	23.90
	13010	29.15	30.35	30.00	28.70	30.75	25.70	23.90
	<b>Mean</b>	<b>28.66</b>	<b>29.90</b>	<b>28.26</b>	<b>29.07</b>	<b>28.24</b>	<b>27.64</b>	<b>26.06</b>
<b>S.D.</b>	<b>2.29</b>	<b>2.40</b>	<b>1.18</b>	<b>2.52</b>	<b>1.91</b>	<b>2.47</b>	<b>2.89</b>	
<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	14001	27.35	28.50	24.45	23.95	28.05	26.00	24.85
	14002	27.35	28.50	24.45	23.95	28.05	26.00	24.85
	14003	26.25	27.70	25.50	28.30	29.40	21.80	24.55
	14004	26.25	27.70	25.50	28.30	29.40	21.80	24.55
	14005	24.85	26.35	25.85	26.90	27.65	26.75	27.40
	14006	24.85	26.35	25.85	26.90	27.65	26.75	27.40
	14007	31.35	30.50	30.70	36.40	34.25	27.60	29.35
	14008	31.35	30.50	30.70	36.40	34.25	27.60	29.35
	14009	27.50	27.80	28.35	29.40	28.55	26.15	23.75
	14010	27.50	27.80	28.35	29.40	28.55	26.15	23.75
	14011	27.90	26.85	26.90	27.50	30.45	30.10	26.85
	14012	27.90	26.85	26.90	27.50	30.45	30.10	26.85
	14013	18.95	26.65	26.70	25.80	26.85	28.00	30.55
	14014	18.95	26.65	26.70	25.80	26.85	28.00	30.55
	14015	26.10	26.00	27.30	26.60	26.00	23.20	23.50
<b>Mean</b>	<b>26.29</b>	<b>27.65</b>	<b>26.95</b>	<b>28.21</b>	<b>29.09</b>	<b>26.40</b>	<b>26.54</b>	
<b>S.D.</b>	<b>3.52</b>	<b>1.39</b>	<b>1.92</b>	<b>3.70</b>	<b>2.44</b>	<b>2.52</b>	<b>2.51</b>	
<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Male		(g/rat/day)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week					
		8	9	10	11	12	13
G1 0	11001	29.25	24.20	25.45	27.00	24.95	26.00
	11002	29.25	24.20	25.45	27.00	24.95	26.00
	11003	32.10	27.80	29.40	30.70	29.80	28.05
	11004	32.10	27.80	29.40	30.70	29.80	28.05
	11005	29.35	27.40	29.40	27.45	26.20	28.35
	11006	29.35	27.40	29.40	27.45	26.20	28.35
	11007	27.60	24.00	23.30	24.10	24.15	25.20
	11008	27.60	24.00	23.30	24.10	24.15	25.20
	11009	27.05	23.75	25.10	25.15	23.15	26.70
	11010	27.05	23.75	25.10	25.15	23.15	26.70
	11011	25.45	23.85	26.50	25.70	23.95	24.95
	11012	25.45	23.85	26.50	25.70	23.95	24.95
	11013	27.20	24.70	26.65	26.10	24.35	25.35
	11014	27.20	24.70	26.65	26.10	24.35	25.35
	11015	38.00	32.00	32.70	23.10	30.40	30.40
		<b>Mean</b>	<b>28.93</b>	<b>25.56</b>	<b>26.95</b>	<b>26.37</b>	<b>25.57</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3.20</b>	<b>2.40</b>	<b>2.61</b>	<b>2.17</b>	<b>2.46</b>	<b>1.65</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
G2 1,250	12001	26.00	22.85	23.30	23.35	22.90	22.35
	12002	26.00	22.85	23.30	23.35	22.90	22.35
	12003	27.10	23.15	24.65	21.20	20.05	23.70
	12004	27.10	23.15	24.65	21.20	20.05	23.70
	12005	28.25	23.45	24.95	23.75	21.85	22.30
	12006	28.25	23.45	24.95	23.75	21.85	22.30
	12007	25.95	22.75	24.60	25.30	24.55	28.70
	12008	25.95	22.75	24.60	25.30	24.55	28.70
	12009	27.65	22.90	26.00	26.35	23.15	25.95
	12010	27.65	22.90	26.00	26.35	23.15	25.95
		<b>Mean</b>	<b>26.99</b>	<b>23.02</b>	<b>24.70</b>	<b>23.99</b>	<b>22.50</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.95</b>	<b>0.27</b>	<b>0.91</b>	<b>1.86</b>	<b>1.58</b>	<b>2.57</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Male		(g/rat/day)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week					
		8	9	10	11	12	13
G3 2,500	13001	28.45	23.75	25.25	26.90	24.40	25.90
	13002	28.45	23.75	25.25	26.90	24.40	25.90
	13003	25.10	22.65	20.10	21.20	24.45	25.40
	13004	25.10	22.65	20.10	21.20	24.45	25.40
	13005	30.60	27.65	27.75	28.25	27.40	27.90
	13006	30.60	27.65	27.75	28.25	27.40	27.90
	13007	25.35	24.20	21.70	24.15	23.80	25.50
	13008	25.35	24.20	21.70	24.15	23.80	25.50
	13009	27.65	24.45	28.75	23.85	23.95	23.50
	13010	27.65	24.45	28.75	23.85	23.95	23.50
		<b>Mean</b>	<b>27.43</b>	<b>24.54</b>	<b>24.71</b>	<b>24.87</b>	<b>24.80</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.15</b>	<b>1.76</b>	<b>3.53</b>	<b>2.61</b>	<b>1.40</b>	<b>1.48</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	26.35	23.50	26.25	23.50	22.95	22.45
	14002	26.35	23.50	26.25	23.50	22.95	22.45
	14003	28.40	21.40	24.15	23.30	21.95	23.55
	14004	28.40	21.40	24.15	23.30	21.95	23.55
	14005	28.30	26.80	25.80	26.65	27.45	28.05
	14006	28.30	26.80	25.80	26.65	27.45	28.05
	14007	30.85	29.45	27.90	27.80	26.50	30.05
	14008	30.85	29.45	27.90	27.80	26.50	30.05
	14009	25.90	21.55	23.20	21.55	23.00	24.00
	14010	25.90	21.55	23.20	21.55	23.00	24.00
	14011	32.75	27.90	30.20	28.00	25.70	28.15
	14012	32.75	27.90	30.20	28.00	25.70	28.15
	14013	27.75	26.50	24.85	21.60	21.00	25.55
	14014	27.75	26.50	24.85	21.60	21.00	25.55
	14015	25.40	23.80	22.00	21.40	20.90	21.80
		<b>Mean</b>	<b>28.40</b>	<b>25.20</b>	<b>25.78</b>	<b>24.41</b>	<b>23.87</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.40</b>	<b>2.96</b>	<b>2.44</b>	<b>2.73</b>	<b>2.42</b>	<b>2.83</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Female		(g/rat/day)						
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week						
		1	2	3	4	5	6	7
G1 0	21001	21.35	17.75	20.45	23.25	21.80	19.00	18.30
	21002	21.35	17.75	20.45	23.25	21.80	19.00	18.30
	21003	18.30	18.30	17.85	21.80	20.45	18.60	18.75
	21004	18.30	18.30	17.85	21.80	20.45	18.60	18.75
	21005	16.00	17.90	18.25	19.20	16.20	15.55	18.25
	21006	16.00	17.90	18.25	19.20	16.20	15.55	18.25
	21007	22.45	22.80	21.15	20.35	19.95	21.95	21.80
	21008	22.45	22.80	21.15	20.35	19.95	21.95	21.80
	21009	19.75	19.95	17.35	20.90	23.65	22.95	21.75
	21010	19.75	19.95	17.35	20.90	23.65	22.95	21.75
	21011	19.15	20.80	22.30	21.90	22.40	24.00	19.95
	21012	19.15	20.80	22.30	21.90	22.40	24.00	19.95
	21013	20.40	20.15	19.55	22.15	18.15	17.05	21.20
	21014	20.40	20.15	19.55	22.15	18.15	17.05	21.20
	21015	15.70	21.50	24.00	23.30	22.60	18.50	21.20
	<b>Mean</b>	<b>19.37</b>	<b>19.79</b>	<b>19.85</b>	<b>21.49</b>	<b>20.52</b>	<b>19.78</b>	<b>20.08</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.20</b>	<b>1.76</b>	<b>2.06</b>	<b>1.33</b>	<b>2.44</b>	<b>2.95</b>	<b>1.51</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
G2 1,250	22001	18.95	20.85	16.10	16.80	22.05	17.20	17.25
	22002	18.95	20.85	16.10	16.80	22.05	17.20	17.25
	22003	17.30	15.55	18.70	18.50	18.65	15.10	17.15
	22004	17.30	15.55	18.70	18.50	18.65	15.10	17.15
	22005	19.75	20.40	18.50	20.75	18.35	21.70	20.65
	22006	19.75	20.40	18.50	20.75	18.35	21.70	20.65
	22007	19.55	20.80	17.95	18.90	25.85	19.65	16.90
	22008	19.55	20.80	17.95	18.90	25.85	19.65	16.90
	22009	18.05	21.85	22.45	23.15	18.45	21.45	23.10
	22010	18.05	21.85	22.45	23.15	18.45	21.45	23.10
		<b>Mean</b>	<b>18.72</b>	<b>19.89</b>	<b>18.74</b>	<b>19.62</b>	<b>20.67</b>	<b>19.02</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.97</b>	<b>2.34</b>	<b>2.18</b>	<b>2.28</b>	<b>3.10</b>	<b>2.67</b>	<b>2.60</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>



Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Female		(g/rat/day)						
Group /	Animal	Week						
Dose (mg/kg/day)	ID	1	2	3	4	5	6	7
G3 2,500	23001	17.45	14.10	15.40	16.85	20.75	14.50	15.55
	23002	17.45	14.10	15.40	16.85	20.75	14.50	15.55
	23003	17.60	20.00	18.85	20.75	18.95	21.00	17.20
	23004	17.60	20.00	18.85	20.75	18.95	21.00	17.20
	23005	18.95	20.55	19.00	19.80	20.80	19.10	21.15
	23006	18.95	20.55	19.00	19.80	20.80	19.10	21.15
	23007	15.70	19.45	18.80	19.00	20.10	19.85	20.10
	23008	15.70	19.45	18.80	19.00	20.10	19.85	20.10
	23009	19.90	22.90	22.00	25.15	25.45	24.30	23.75
	23010	19.90	22.90	22.00	25.15	25.45	24.30	23.75
		<b>Mean</b>	<b>17.92</b>	<b>19.40</b>	<b>18.81</b>	<b>20.31</b>	<b>21.21</b>	<b>19.75</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.51</b>	<b>3.06</b>	<b>2.20</b>	<b>2.89</b>	<b>2.34</b>	<b>3.34</b>	<b>3.06</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	19.65	18.10	22.80	24.15	22.85	18.65	22.90
	24002	19.65	18.10	22.80	24.15	22.85	18.65	22.90
	24003	16.10	18.55	18.70	19.25	24.35	17.25	19.95
	24004	16.10	18.55	18.70	19.25	24.35	17.25	19.95
	24005	17.55	18.15	18.30	19.30	20.00	15.15	18.15
	24006	17.55	18.15	18.30	19.30	20.00	15.15	18.15
	24007	19.55	22.95	23.45	26.05	23.45	18.20	24.85
	24008	19.55	22.95	23.45	26.05	23.45	18.20	24.85
	24009	18.20	19.95	21.70	16.85	18.20	16.55	21.70
	24010	18.20	19.95	21.70	16.85	18.20	16.55	21.70
	24011	20.75	21.20	18.85	24.85	22.65	21.00	23.55
	24012	20.75	21.20	18.85	24.85	22.65	21.00	23.55
	24013	21.50	19.60	20.85	18.35	19.20	19.05	20.50
	24014	21.50	19.60	20.85	18.35	19.20	19.05	20.50
	24015	18.50	24.70	28.00	24.50	18.80	30.40	27.40
	<b>Mean</b>	<b>19.01</b>	<b>20.11</b>	<b>21.15</b>	<b>21.47</b>	<b>21.35</b>	<b>18.81</b>	<b>22.04</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.74</b>	<b>2.08</b>	<b>2.71</b>	<b>3.48</b>	<b>2.30</b>	<b>3.65</b>	<b>2.60</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Female		(g/rat/day)					
Group /	Animal	Week					
Dose (mg/kg/day)	ID	8	9	10	11	12	13
G1 0	21001	21.20	21.10	18.10	19.60	18.55	16.80
	21002	21.20	21.10	18.10	19.60	18.55	16.80
	21003	18.25	17.35	21.05	18.95	15.20	19.05
	21004	18.25	17.35	21.05	18.95	15.20	19.05
	21005	18.55	16.30	17.35	20.00	17.85	17.85
	21006	18.55	16.30	17.35	20.00	17.85	17.85
	21007	23.45	15.95	18.05	20.25	22.90	15.75
	21008	23.45	15.95	18.05	20.25	22.90	15.75
	21009	20.50	22.60	21.50	16.85	21.30	21.20
	21010	20.50	22.60	21.50	16.85	21.30	21.20
	21011	21.10	13.20	23.80	22.00	18.30	21.35
	21012	21.10	13.20	23.80	22.00	18.30	21.35
	21013	23.25	19.40	19.00	18.35	19.60	18.70
	21014	23.25	19.40	19.00	18.35	19.60	18.70
	21015	24.20	16.60	23.70	21.60	16.80	23.30
	<b>Mean</b>	<b>21.12</b>	<b>17.89</b>	<b>20.09</b>	<b>19.57</b>	<b>18.95</b>	<b>18.98</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.07</b>	<b>3.03</b>	<b>2.39</b>	<b>1.60</b>	<b>2.38</b>	<b>2.28</b>
	<b>N</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
G2 1,250	22001	19.65	18.65	18.75	16.05	17.35	18.90
	22002	19.65	18.65	18.75	16.05	17.35	18.90
	22003	20.10	17.70	15.75	17.35	15.60	19.10
	22004	20.10	17.70	15.75	17.35	15.60	19.10
	22005	17.85	19.10	24.95	22.10	18.95	19.55
	22006	17.85	19.10	24.95	22.10	18.95	19.55
	22007	21.80	18.10	19.60	16.85	21.40	19.10
	22008	21.80	18.10	19.60	16.85	21.40	19.10
	22009	20.05	16.90	21.80	19.45	16.25	19.85
	22010	20.05	16.90	21.80	19.45	16.25	19.85
		<b>Mean</b>	<b>19.89</b>	<b>18.09</b>	<b>20.17</b>	<b>18.36</b>	<b>17.91</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.33</b>	<b>0.80</b>	<b>3.24</b>	<b>2.30</b>	<b>2.19</b>	<b>0.37</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 3-1. (Continued)

Sex: Female		(g/rat/day)						
Group /	Animal	Week						
Dose (mg/kg/day)	ID	8	9	10	11	12	13	
G3 2,500	23001	18.45	16.85	15.10	17.00	17.15	17.30	
	23002	18.45	16.85	15.10	17.00	17.15	17.30	
	23003	20.20	15.70	19.25	17.30	17.80	15.30	
	23004	20.20	15.70	19.25	17.30	17.80	15.30	
	23005	17.95	16.80	17.10	19.25	15.30	22.75	
	23006	17.95	16.80	17.10	19.25	15.30	22.75	
	23007	19.75	13.75	21.40	18.75	17.85	20.40	
	23008	19.75	13.75	21.40	18.75	17.85	20.40	
	23009	27.00	21.10	25.20	23.55	19.00	21.80	
	23010	27.00	21.10	25.20	23.55	19.00	21.80	
	<b>Mean</b>		<b>20.67</b>	<b>16.84</b>	<b>19.61</b>	<b>19.17</b>	<b>17.42</b>	<b>19.51</b>
	<b>S.D.</b>		<b>3.45</b>	<b>2.54</b>	<b>3.69</b>	<b>2.48</b>	<b>1.28</b>	<b>2.95</b>
	<b>N</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	23.25	21.40	19.45	19.55	19.30	16.05	
	24002	23.25	21.40	19.45	19.55	19.30	16.05	
	24003	23.75	14.60	17.30	20.15	18.95	22.25	
	24004	23.75	14.60	17.30	20.15	18.95	22.25	
	24005	22.50	17.30	17.95	17.75	18.60	19.20	
	24006	22.50	17.30	17.95	17.75	18.60	19.20	
	24007	23.10	19.65	19.50	21.45	23.10	17.95	
	24008	23.10	19.65	19.50	21.45	23.10	17.95	
	24009	16.25	18.20	15.45	17.55	17.30	19.05	
	24010	16.25	18.20	15.45	17.55	17.30	19.05	
	24011	18.05	21.80	21.00	22.65	17.60	17.65	
	24012	18.05	21.80	21.00	22.65	17.60	17.65	
	24013	22.15	15.70	17.60	19.90	19.65	17.30	
	24014	22.15	15.70	17.60	19.90	19.65	17.30	
	24015	23.50	17.20	26.50	25.00	20.10	19.10	
<b>Mean</b>		<b>21.44</b>	<b>18.30</b>	<b>18.87</b>	<b>20.20</b>	<b>19.27</b>	<b>18.53</b>	
<b>S.D.</b>		<b>2.77</b>	<b>2.56</b>	<b>2.70</b>	<b>2.16</b>	<b>1.79</b>	<b>1.83</b>	
<b>N</b>		<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

3. Appendix 3-2. Individual food consumption (Recovery Group)

Sex: Male		(g/rat/day)			
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week			
		14	15	16	17
G1 0	11011	22.15	28.10	27.05	25.20
	11012	22.15	28.10	27.05	25.20
	11013	24.55	28.90	29.05	20.85
	11014	24.55	28.90	29.05	20.85
	11015	26.20	-	-	-
	<b>Mean</b>	<b>23.92</b>	<b>28.50</b>	<b>28.05</b>	<b>23.03</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.75</b>	<b>0.46</b>	<b>1.15</b>	<b>2.51</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	
G4 5,000	14011	34.50	33.90	28.40	30.40
	14012	34.50	33.90	28.40	30.40
	14013	25.00	24.65	27.45	24.40
	14014	25.00	24.65	27.45	24.40
	14015	23.00	24.20	24.30	24.00
	<b>Mean</b>	<b>28.40</b>	<b>28.26</b>	<b>27.20</b>	<b>26.72</b>
	<b>S.D.</b>	<b>5.63</b>	<b>5.15</b>	<b>1.69</b>	<b>3.36</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Sex: Female		(g/rat/day)			
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Week			
		14	15	16	17
G1 0	21011	22.00	16.50	16.70	17.20
	21012	22.00	16.50	16.70	17.20
	21013	16.85	20.35	18.75	15.70
	21014	16.85	20.35	18.75	15.70
	21015	14.60	24.50	20.90	21.20
	<b>Mean</b>	<b>18.46</b>	<b>19.64</b>	<b>18.36</b>	<b>17.40</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3.36</b>	<b>3.33</b>	<b>1.75</b>	<b>2.25</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	17.50	19.40	24.40	16.40
	24012	17.50	19.40	24.40	16.40
	24013	21.15	22.55	21.55	17.95
	24014	21.15	22.55	21.55	17.95
	24015	22.90	29.00	28.40	23.00
	<b>Mean</b>	<b>20.04</b>	<b>22.58</b>	<b>24.06</b>	<b>18.34</b>
	<b>S.D.</b>	<b>2.43</b>	<b>3.92</b>	<b>2.81</b>	<b>2.72</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

**⌒. Appendix 4-1. Individual ophthalmological examination (Main Group)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Right eye				Left eye			
		Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus
G1 0	11001	-	-	-	-	-	-	-	-
	11002	-	-	-	-	-	-	-	-
	11003	-	-	-	-	-	-	-	-
	11004	-	-	-	-	-	-	-	-
	11005	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250	12001	-	-	-	-	-	-	-	-
	12002	-	-	-	-	-	-	-	-
	12003	-	-	-	-	-	-	-	-
	12004	-	-	-	-	-	-	-	-
	12005	-	-	-	-	-	-	-	-
G3 2,500	13001	-	-	-	-	-	-	-	-
	13002	-	-	-	-	-	-	-	-
	13003	-	-	-	-	-	-	-	-
	13004	-	-	-	-	-	-	-	-
	13005	-	-	-	-	-	-	-	-
G4 5,000	14001	-	-	-	-	-	-	-	-
	14002	-	-	-	-	-	-	-	-
	14003	-	-	-	-	-	-	-	-
	14004	-	-	-	-	-	-	-	-
	14005	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Normal

**Appendix 4-1. (Continued)**

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Right eye				Left eye			
		Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus
G1 0	21001	-	-	-	-	-	-	-	-
	21002	-	-	-	-	-	-	-	-
	21003	-	-	-	-	-	-	-	-
	21004	-	-	-	-	-	-	-	-
	21005	-	-	-	-	-	-	-	-
G2 1,250	22001	-	-	-	-	-	-	-	-
	22002	-	-	-	-	-	-	-	-
	22003	-	-	-	-	-	-	-	-
	22004	-	-	-	-	-	-	-	-
	22005	-	-	-	-	-	-	-	-
G3 2,500	23001	-	-	-	-	-	-	-	-
	23002	-	-	-	-	-	-	-	-
	23003	-	-	-	-	-	-	-	-
	23004	-	-	-	-	-	-	-	-
	23005	-	-	-	-	-	-	-	-
G4 5,000	24001	-	-	-	-	-	-	-	-
	24002	-	-	-	-	-	-	-	-
	24003	-	-	-	-	-	-	-	-
	24004	-	-	-	-	-	-	-	-
	24005	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Normal

Ξ. Appendix 4-2. Individual ophthalmological examination (Recovery Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Right eye				Left eye			
		Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus
G1 0	11011	-	-	-	-	-	-	-	-
	11012	-	-	-	-	-	-	-	-
	11013	-	-	-	-	-	-	-	-
	11014	-	-	-	-	-	-	-	-
G4 5,000	14011	-	-	-	-	-	-	-	-
	14012	-	-	-	-	-	-	-	-
	14013	-	-	-	-	-	-	-	-
	14014	-	-	-	-	-	-	-	-
	14015	-	-	-	-	-	-	-	-

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Right eye				Left eye			
		Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus	Pupil light reflex	Anterior segment	Transparent media	Fundus
G1 0	21011	-	-	-	-	-	-	-	-
	21012	-	-	-	-	-	-	-	-
	21013	-	-	-	-	-	-	-	-
	21014	-	-	-	-	-	-	-	-
	21015	-	-	-	-	-	-	-	-
G4 5,000	24011	-	-	-	-	-	-	-	-
	24012	-	-	-	-	-	-	-	-
	24013	-	-	-	-	-	-	-	-
	24014	-	-	-	-	-	-	-	-
	24015	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Normal

**Appendix 5-1. Individual urinalysis (Main Group)**

Sex: Male												
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0					G2 / 1,250					
Animal ID		11001	11002	11003	11004	11005	12001	12002	12003	12004	12005	
Volume (mL)		13.1	8.9	12.4	13.6	11.4	13.4	10.4	11.4	13.4	15.0	
Glucose (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Bilirubin (mg/dL)	Negative 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Ketone body (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Specific gravity	≤1.005 1.010 1.015 1.020 1.025 ≥1.030	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Occult blood (Ery/uL)	Negative Trace intact Trace lysed 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
Protein (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
pH	5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 ≥9.0	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	



**Appendix 5-1. (Continued)**

Sex : Male		G3 / 2,500					G4 / 5,000				
Group / Dose (mg/kg)		13001	13002	13003	13004	13005	14001	14002	14003	14004	14005
Animal ID											
Volume (mL)		8.5	10.2	9.2	13.1	15.1	12.4	10.6	14.1	15.1	10.9
Glucose (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Bilirubin (mg/dL)	Negative 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Ketone body (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Specific gravity	≤1.005 1.010 1.015 1.020 1.025 ≥1.030	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Occult blood (Ery/uL)	Negative Trace intact Trace lysed 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Protein (mg/dL)	Negative Trace 1+ 2+ 3+	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
pH	5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 ≥9.0	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v

**Appendix 5-1. (Continued)**

Sex: Female											
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0					G2 / 1,250				
Animal ID		21001	21002	21003	21004	21005	22001	22002	22003	22004	22005
Volume (mL)		13.0	5.0	6.2	15.8	5.4	7.1	6.1	9.8	5.1	9.6
Glucose (mg/dL)	Negative	v	v		v	v			v		v
	Trace						v	v		v	
	1+			v							
	2+										
	3+										
Bilirubin (mg/dL)	Negative	v	v		v	v			v	v	v
	1+			v				v			
	2+						v				
	3+										
Ketone body (mg/dL)	Negative					v					
	Trace				v			v			
	1+	v	v							v	v
	2+			v			v	v			
	3+										
Specific gravity	≤1.005										
	1.010						v				
	1.015							v	v		
	1.020	v	v	v	v					v	
	1.025					v					
	≥1.030										v
Occult blood (Ery/uL)	Negative								v		
	Trace intact										
	Trace lysed	v	v		v		v	v		v	v
	1+			v							
	2+										
3+					v						
Protein (mg/dL)	Negative										
	Trace										
	1+				v	v					
	2+	v							v	v	v
3+		v	v			v	v				
pH	5.0										
	5.5										
	6.0										
	6.5										
	7.0										
	7.5			v							v
	8.0										
	8.5	v			v	v				v	
	≥9.0		v				v	v	v		

**Appendix 5-1. (Continued)**

Sex: Female		G3 / 2,500					G4 / 5,000				
Group / Dose (mg/kg)		23001	23002	23003	23004	23005	24001	24002	24003	24004	24005
Animal ID											
Volume (mL)		6.1	6.9	4.1	11.1	4.6	22.9	5.9	8.7	16.1	11.1
Glucose (mg/dL)	Negative		v	v	v	v	v			v	v
	Trace	v						v	v		
	1+										
	2+										
	3+										
Bilirubin (mg/dL)	Negative				v					v	
	1+	v	v	v		v	v				v
	2+							v	v		
	3+										
Ketone body (mg/dL)	Negative									v	
	Trace										
	1+	v	v	v	v	v	v		v		v
	2+							v			
3+											
Specific gravity	≤1.005		v								
	1.010	v			v	v		v	v		
	1.015			v						v	v
	1.020						v				
	1.025										
	≥1.030										
Occult blood (Ery/uL)	Negative	v	v	v	v	v		v	v	v	v
	Trace intact						v				
	Trace lysed										
	1+										
	2+										
3+											
Protein (mg/dL)	Negative									v	
	Trace										
	1+				v						v
	2+	v				v					
3+		v	v		v		v	v	v		
pH	5.0										
	5.5										
	6.0										
	6.5										
	7.0										
	7.5										
	8.0										
	8.5						v				
	≥9.0	v	v	v	v	v		v	v	v	v

**Appendix 5-2. Individual urinalysis (Recovery Group)**

Sex: Male											
Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0				G4 / 5,000					
Animal ID		11011	11012	11013	11014	14011	14012	14013	14014	14015	
Volume (mL)		8.0	7.5	11.5	4.5	5.5	4.5	12.0	9.0	7.0	
Glucose (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v		
	Trace									v	
	1+										
	2+										
	3+										
Bilirubin (mg/dL)	Negative	v	v	v		v		v	v		
	1+				v		v			v	
	2+										
	3+										
Ketone body (mg/dL)	Negative										
	Trace	v	v	v		v	v	v		v	
	1+				v				v		
	2+										
	3+										
Specific gravity	≤1.005										
	1.010	v									
	1.015		v						v	v	
	1.020			v	v	v	v				
	1.025										
	≥1.030							v			
Occult blood (Ery/uL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
	Trace intact										
	Trace lysed										
	1+										
	2+										
	3+										
Protein (mg/dL)	Negative										
	Trace										
	1+	v	v			v		v			
	2+			v	v		v		v	v	
	3+										
pH	5.0										
	5.5										
	6.0										
	6.5										
	7.0										
	7.5										
	8.0										
	8.5								v		
	≥9.0	v	v	v	v	v	v	v		v	

**Appendix 5-2. (Continued)**

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)		G1 / 0					G4 / 5,000				
		21011	21012	21013	21014	21015	24011	24012	24013	24014	24015
Volume (mL)		8.5	9.7	3.5	4.1	11.6	3.5	12.2	8.5	5.4	10.1
Glucose (mg/dL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
	Trace										
	1+										
	2+										
	3+										
Bilirubin (mg/dL)	Negative	v	v	v		v	v	v	v	v	
	1+				v			v			
	2+										
	3+										
Ketone body (mg/dL)	Negative			v			v				
	Trace	v	v			v		v	v	v	
	1+				v			v			
	2+										
	3+										
Specific gravity	≤1.005										
	1.010										
	1.015		v	v		v	v	v	v	v	
	1.020				v			v			
	1.025	v									
	≥1.030										
Occult blood (Ery/uL)	Negative	v	v	v	v	v	v	v	v	v	
	Trace intact										
	Trace lysed										
	1+										
	2+										
	3+										
Protein (mg/dL)	Negative										
	Trace										
	1+	v	v	v		v	v	v	v	v	
	2+				v			v			
	3+										
pH	5.0										
	5.5										
	6.0										
	6.5										
	7.0										
	7.5										
	8.0										
	8.5									v	
≥9.0	v	v	v	v	v	v	v	v	v		

### III. Appendix 6-1. Individual hematological parameters (Main Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	11001	8.85	15.4	45.6	51.6	17.4	33.7	949	1.49
	11002	9.62	16.3	48.2	50.1	16.9	33.8	923	1.43
	11003	9.04	16.3	47.2	52.3	18.1	34.6	736	1.61
	11004	9.85	16.4	48.7	49.5	16.7	33.7	1050	1.95
	11005	8.77	15.1	44.9	51.2	17.2	33.6	790	2.32
	11006	8.47	15.4	44.4	52.5	18.2	34.7	1106	1.73
	11007	9.15	15.8	46.8	51.1	17.3	33.9	1150	1.70
	11008	8.98	15.2	45.7	50.9	17.0	33.4	1193	1.57
	11009	8.68	15.4	44.8	51.6	17.7	34.3	1119	1.81
	11010	9.16	16.6	49.8	54.4	18.1	33.3	999	1.82
		<b>Mean</b>	<b>9.06</b>	<b>15.8</b>	<b>46.6</b>	<b>51.5</b>	<b>17.5</b>	<b>33.9</b>	<b>1002</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.42</b>	<b>0.6</b>	<b>1.8</b>	<b>1.4</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>153</b>	<b>0.26</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	8.81	15.3	45.1	51.2	17.4	34.0	65	1.39
	12002	9.38	15.0	45.0	48.0	16.0	33.4	665	1.26
	12003	9.25	16.0	47.7	51.6	17.3	33.6	1216	1.42
	12004	9.16	15.8	47.3	51.7	17.3	33.4	790	1.50
	12005	7.82	13.7	40.8	52.2	17.5	33.5	57	1.72
	12006	8.40	14.7	43.7	52.0	17.5	33.7	1107	2.07
	12007	9.16	15.8	47.6	51.9	17.2	33.2	794	1.79
	12008	8.36	13.3	41.6	49.7	15.9	32.0	1079	2.74
	12009	8.38	15.2	44.0	52.5	18.1	34.4	1107	1.56
	12010	8.56	15.1	44.5	51.9	17.6	34.0	831	1.69
		<b>Mean</b>	<b>8.73</b>	<b>15.0</b>	<b>44.7</b>	<b>51.3</b>	<b>17.2</b>	<b>33.5</b>	<b>771</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.50</b>	<b>0.9</b>	<b>2.4</b>	<b>1.4</b>	<b>0.7</b>	<b>0.6</b>	<b>414</b>	<b>0.43</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	9.15	15.0	45.0	49.1	16.4	33.4	1099	1.44
	13002	8.56	15.1	44.1	51.6	17.6	34.2	614	1.57
	13003	8.65	15.5	45.1	52.1	17.9	34.3	893	1.40
	13004	9.00	15.5	46.6	51.8	17.2	33.2	1211	1.17
	13005	9.47	16.1	48.7	51.5	17.0	33.1	894	1.30
	13006	8.59	14.8	44.0	51.2	17.3	33.7	1095	1.25
	13007	8.03	15.3	44.8	55.7	19.0	34.1	974	1.82
	13008	9.02	16.0	47.3	52.4	17.8	33.9	726	1.61
	13009	8.57	14.8	44.3	51.8	17.3	33.4	1012	2.25
	13010	8.80	15.2	45.1	51.3	17.3	33.8	1192	1.81
		<b>Mean</b>	<b>8.78</b>	<b>15.3</b>	<b>45.5</b>	<b>51.9</b>	<b>17.5</b>	<b>33.7</b>	<b>971</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.40</b>	<b>0.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.6</b>	<b>0.7</b>	<b>0.4</b>	<b>194</b>	<b>0.33</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	8.04	14.8	42.9	53.3	18.5	34.6	763	1.64
	14002	8.69	15.3	45.5	52.3	17.6	33.6	811	1.50
	14003	8.55	14.5	44.0	51.5	17.0	33.0	1014	1.57
	14004	9.08	15.5	46.0	50.6	17.1	33.7	865	1.64
	14005	8.81	15.3	45.0	51.0	17.4	34.0	1033	1.26
	14006	8.19	14.3	42.7	52.1	17.5	33.5	1118	1.94
	14007	8.99	15.3	45.9	51.0	17.0	33.4	1213	1.46
	14008	8.95	14.6	44.0	49.2	16.3	33.1	1034	2.44
	14009	8.98	14.3	44.1	49.1	15.9	32.4	1017	1.41
	14010	8.58	15.3	44.3	51.6	17.9	34.6	733	2.37
		<b>Mean</b>	<b>8.69</b>	<b>14.9</b>	<b>44.4</b>	<b>51.2</b>	<b>17.2</b>	<b>33.6</b>	<b>960</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.35</b>	<b>0.5</b>	<b>1.2</b>	<b>1.3</b>	<b>0.7</b>	<b>0.7</b>	<b>159</b>	<b>0.40</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 6-1. (Continued)

Sex: Male									
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	11001	4.11	0.85	2.99	0.12	0.11	0.00	11.6	46.2
	11002	4.92	1.30	3.34	0.09	0.13	0.01	9.4	39.6
	11003	3.60	1.05	2.37	0.05	0.10	0.00	9.6	24.2
	11004	3.92	0.86	2.82	0.11	0.09	0.00	9.7	27.4
	11005	5.06	1.33	3.52	0.09	0.09	0.00	9.5	27.2
	11006	4.81	0.57	4.00	0.05	0.15	0.00	9.7	25.6
	11007	4.60	1.15	3.18	0.15	0.08	0.00	9.9	24.3
	11008	5.29	0.69	4.38	0.11	0.05	0.00	10.1	24.5
	11009	2.31	0.73	1.47	0.07	0.03	0.00	10.4	26.7
	11010	2.16	0.48	1.47	0.02	0.17	0.00	9.8	23.4
		<b>Mean</b>	<b>4.08</b>	<b>0.90</b>	<b>2.95</b>	<b>0.09</b>	<b>0.10</b>	<b>0.00</b>	<b>10.0</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.11</b>	<b>0.30</b>	<b>0.97</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>	<b>0.00</b>	<b>0.6</b>	<b>7.7</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	2.61	0.35	2.16	0.04	0.06	0.01	10.9	28.6
	12002	4.38	0.81	3.37	0.07	0.09	0.00	10.8	20.9
	12003	3.07	0.65	2.29	0.05	0.06	0.00	10.5	21.6
	12004	2.96	0.87	1.90	0.05	0.12	0.00	10.7	27.9
	12005	2.45	0.42	1.92	0.05	0.05	0.00	9.2	28.1
	12006	6.51	0.80	5.44	0.08	0.12	0.00	9.0	33.4
	12007	4.80	1.00	3.47	0.14	0.13	0.00	9.4	28.2
	12008	4.44	1.04	2.98	0.15	0.16	0.00	9.8	24.4
	12009	2.70	0.41	2.13	0.08	0.05	0.00	9.3	24.6
	12010	3.13	0.48	2.42	0.10	0.11	0.00	9.4	23.9
		<b>Mean</b>	<b>3.71</b>	<b>0.68</b>	<b>2.81</b>	<b>0.08</b>	<b>0.10</b>	<b>0.00</b>	<b>9.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.30</b>	<b>0.26</b>	<b>1.09</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>	<b>0.00</b>	<b>0.7</b>	<b>3.8</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	7.47	1.82	5.32	0.14	0.10	0.00	9.5	36.1
	13002	4.02	0.87	2.92	0.07	0.12	0.00	9.5	24.7
	13003	2.84	0.63	2.11	0.05	0.04	0.00	9.5	23.7
	13004	2.06	0.15	1.83	0.02	0.04	0.00	9.4	21.4
	13005	1.96	0.46	1.35	0.06	0.08	0.00	9.6	23.2
	13006	2.28	0.34	1.84	0.04	0.05	0.00	9.4	22.3
	13007	4.65	0.88	3.50	0.12	0.08	0.00	9.0	25.5
	13008	4.86	1.13	3.48	0.08	0.13	0.00	9.6	26.6
	13009	4.14	0.96	2.90	0.18	0.06	0.00	10.7	27.3
	13010	4.11	0.66	3.25	0.09	0.07	0.00	9.5	24.5
		<b>Mean</b>	<b>3.84</b>	<b>0.79</b>	<b>2.85</b>	<b>0.09</b>	<b>0.08</b>	<b>0.00</b>	<b>9.6</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.67</b>	<b>0.47</b>	<b>1.15</b>	<b>0.05</b>	<b>0.03</b>	<b>0.00</b>	<b>0.4</b>	<b>4.1</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	3.62	0.67	2.70	0.10	0.10	0.00	10.6	23.1
	14002	3.37	0.46	2.74	0.08	0.05	0.00	10.7	27.1
	14003	4.82	0.40	4.31	0.05	0.04	0.00	10.3	26.9
	14004	5.22	1.01	3.91	0.13	0.12	0.00	9.7	27.2
	14005	5.52	0.47	4.92	0.06	0.05	0.00	9.9	33.0
	14006	2.93	0.32	2.39	0.11	0.04	0.00	9.9	30.3
	14007	6.03	0.66	5.13	0.12	0.05	0.00	10.0	29.1
	14008	5.25	0.66	4.21	0.13	0.09	0.00	11.5	23.7
	14009	5.59	0.88	4.40	0.13	0.12	0.00	9.9	24.5
	14010	5.92	0.87	4.59	0.22	0.13	0.00	10.5	23.4
		<b>Mean</b>	<b>4.83</b>	<b>0.64</b>	<b>3.93</b>	<b>0.11</b>	<b>0.08</b>	<b>0.00</b>	<b>10.3</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.12</b>	<b>0.23</b>	<b>0.98</b>	<b>0.05</b>	<b>0.04</b>	<b>0.00</b>	<b>0.5</b>	<b>3.3</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 6-1. (Continued)

Sex: Female										
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)	
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)			
G1 0	21001	3.23	5.9	16.8	52.0	18.4	35.4	56	2.19	
	21002	8.38	15.3	43.4	51.8	18.2	35.1	80	1.36	
	21003	8.04	14.2	41.9	52.1	17.7	33.9	1051	1.19	
	21004	8.39	15.4	45.6	54.4	18.3	33.7	867	3.35	
	21005	8.19	15.0	44.5	54.3	18.3	33.7	1230	2.41	
	21006	8.64	15.4	45.0	52.1	17.9	34.3	1053	1.45	
	21007	7.98	14.6	42.0	52.6	18.3	34.9	1142	1.37	
	21008	8.66	15.8	45.7	52.8	18.2	34.5	1034	1.55	
	21009	8.41	15.7	45.1	53.7	18.7	34.7	1086	1.73	
	21010	8.00	14.6	42.9	53.7	18.3	34.1	1111	2.08	
		<b>Mean</b>	<b>7.79</b>	<b>14.2</b>	<b>41.3</b>	<b>53.0</b>	<b>18.2</b>	<b>34.4</b>	<b>871</b>	<b>1.87</b>
		<b>S.D.</b>	<b>1.62</b>	<b>3.0</b>	<b>8.7</b>	<b>1.0</b>	<b>0.3</b>	<b>0.6</b>	<b>433</b>	<b>0.66</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G2 1,250	22001	7.71	13.7	39.3	51.0	17.7	34.7	1067	1.61	
	22002	7.25	13.6	38.2	52.7	18.7	35.5	980	2.75	
	22003	7.21	14.7	39.0	54.1	20.3	37.6	1187	1.56	
	22004	8.25	15.0	42.7	51.8	18.2	35.1	1106	1.94	
	22005	8.25	14.9	43.7	52.9	18.0	34.1	901	1.53	
	22006	7.81	14.0	42.0	53.7	17.9	33.3	1287	2.13	
	22007	8.33	15.0	43.5	52.2	18.1	34.6	1095	1.65	
	22008	7.98	14.9	44.6	56.0	18.7	33.4	1307	2.88	
	22009	8.35	14.3	42.4	50.8	17.2	33.7	1210	1.93	
	22010	8.62	15.1	43.8	50.8	17.6	34.6	1154	1.38	
		<b>Mean</b>	<b>7.98</b>	<b>14.5</b>	<b>41.9</b>	<b>52.6</b>	<b>18.2</b>	<b>34.7</b>	<b>1129</b>	<b>1.94</b>
		<b>S.D.</b>	<b>0.48</b>	<b>0.6</b>	<b>2.3</b>	<b>1.7</b>	<b>0.9</b>	<b>1.3</b>	<b>128</b>	<b>0.52</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G3 2,500	23001	4.27	7.7	21.7	50.9	17.9	35.2	45	1.67	
	23002	8.14	14.1	41.6	51.2	17.4	34.0	1203	2.02	
	23003	8.57	15.5	44.4	51.8	18.1	34.8	966	1.13	
	23004	8.63	14.6	42.9	49.7	16.9	33.9	1280	1.71	
	23005	6.85	14.3	36.3	53.0	20.9	39.5	1001	2.20	
	23006	8.65	14.4	42.1	48.6	16.7	34.3	1153	1.78	
	23007	7.08	12.8	37.5	53.0	18.0	34.0	1557	1.40	
	23008	8.29	14.8	43.4	52.3	17.9	34.2	1218	1.66	
	23009	7.13	15.2	37.9	53.1	21.3	40.2	671	1.82	
	23010	8.46	15.3	45.2	53.5	18.1	33.8	1022	2.38	
		<b>Mean</b>	<b>7.61</b>	<b>13.9</b>	<b>39.3</b>	<b>51.7</b>	<b>18.3</b>	<b>35.4</b>	<b>1012</b>	<b>1.78</b>
		<b>S.D.</b>	<b>1.36</b>	<b>2.3</b>	<b>6.9</b>	<b>1.6</b>	<b>1.5</b>	<b>2.4</b>	<b>411</b>	<b>0.36</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	24001	6.13	12.4	31.9	52.0	20.2	38.9	626	2.46	
	24002	7.74	14.6	41.6	53.7	18.9	35.2	872	1.06	
	24003	7.19	13.1	38.2	53.1	18.3	34.4	1234	2.38	
	24004	7.74	14.2	40.4	52.2	18.4	35.3	995	1.63	
	24005	7.95	14.3	42.9	54.0	18.0	33.4	1156	2.49	
	24006	8.41	14.8	43.2	51.4	17.7	34.3	1091	1.47	
	24007	8.33	15.6	45.5	54.6	18.7	34.2	543	1.70	
	24008	7.90	14.9	42.8	54.2	18.9	34.9	1312	1.49	
	24009	8.05	14.3	42.0	52.2	17.8	34.0	908	2.11	
	24010	7.50	15.0	41.0	54.7	20.0	36.6	998	2.04	
		<b>Mean</b>	<b>7.69</b>	<b>14.3</b>	<b>41.0</b>	<b>53.2</b>	<b>18.7</b>	<b>35.1</b>	<b>974</b>	<b>1.88</b>
		<b>S.D.</b>	<b>0.66</b>	<b>0.9</b>	<b>3.7</b>	<b>1.2</b>	<b>0.9</b>	<b>1.6</b>	<b>247</b>	<b>0.49</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	



Appendix 6-1. (Continued)

Sex: Female										
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)	
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO			
G1 0	21001	0.57	0.14	0.39	0.02	0.02	0.00	9.4	18.7	
	21002	4.59	0.71	3.69	0.07	0.10	0.00	9.3	25.6	
	21003	1.18	0.16	0.96	0.02	0.04	0.00	9.6	19.6	
	21004	1.28	0.54	0.59	0.03	0.13	0.00	9.4	20.5	
	21005	1.59	0.17	1.38	0.02	0.02	0.00	10.2	17.7	
	21006	0.92	0.28	0.58	0.02	0.04	0.00	10.4	20.9	
	21007	2.29	0.14	2.05	0.04	0.04	0.00	10.8	15.6	
	21008	3.27	0.41	2.68	0.09	0.07	0.00	10.6	18.8	
	21009	1.03	0.16	0.78	0.05	0.03	0.00	9.2	19.2	
	21010	3.93	0.20	3.54	0.09	0.06	0.00	9.1	16.6	
		<b>Mean</b>	<b>2.07</b>	<b>0.29</b>	<b>1.66</b>	<b>0.05</b>	<b>0.06</b>	<b>0.00</b>	<b>9.8</b>	<b>19.3</b>
		<b>S.D.</b>	<b>1.40</b>	<b>0.20</b>	<b>1.25</b>	<b>0.03</b>	<b>0.04</b>	<b>0.00</b>	<b>0.6</b>	<b>2.7</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G2 1,250	22001	3.70	0.52	3.02	0.06	0.07	0.00	10.7	40.0	
	22002	1.50	0.29	1.09	0.04	0.07	0.00	9.9	22.2	
	22003	1.74	0.40	1.22	0.03	0.07	0.00	9.0	19.3	
	22004	2.26	0.45	1.73	0.03	0.05	0.00	9.9	21.5	
	22005	2.01	0.29	1.65	0.03	0.04	0.00	10.0	21.3	
	22006	2.29	0.22	1.96	0.05	0.04	0.00	10.7	22.7	
	22007	2.26	0.20	1.93	0.05	0.06	0.00	9.5	32.5	
	22008	2.64	0.50	2.01	0.05	0.07	0.00	9.9	31.1	
	22009	1.16	0.17	0.93	0.02	0.02	0.00	9.3	22.6	
	22010	2.97	0.34	2.49	0.08	0.04	0.00	9.4	23.6	
		<b>Mean</b>	<b>2.25</b>	<b>0.34</b>	<b>1.80</b>	<b>0.04</b>	<b>0.05</b>	<b>0.00</b>	<b>9.8</b>	<b>25.7</b>
		<b>S.D.</b>	<b>0.73</b>	<b>0.13</b>	<b>0.64</b>	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.6</b>	<b>6.6</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G3 2,500	23001	0.59	0.08	0.48	0.01	0.01	0.00	9.1	21.9	
	23002	3.13	0.77	2.12	0.06	0.16	0.00	10.0	21.0	
	23003	1.62	0.36	1.09	0.03	0.12	0.00	10.1	24.3	
	23004	3.47	0.88	2.38	0.09	0.08	0.00	9.7	21.1	
	23005	1.78	0.33	1.31	0.04	0.10	0.00	9.6	21.9	
	23006	2.92	1.04	1.74	0.05	0.07	0.00	10.4	19.4	
	23007	1.80	0.23	1.48	0.03	0.05	0.00	10.2	20.3	
	23008	2.29	0.52	1.65	0.07	0.04	0.00	10.1	18.8	
	23009	2.01	0.48	1.28	0.04	0.19	0.00	9.7	20.9	
	23010	2.28	0.14	2.06	0.03	0.03	0.00	9.7	19.5	
		<b>Mean</b>	<b>2.19</b>	<b>0.48</b>	<b>1.56</b>	<b>0.05</b>	<b>0.09</b>	<b>0.00</b>	<b>9.9</b>	<b>20.9</b>
		<b>S.D.</b>	<b>0.84</b>	<b>0.32</b>	<b>0.56</b>	<b>0.02</b>	<b>0.06</b>	<b>0.00</b>	<b>0.4</b>	<b>1.6</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	24001	3.39	1.30	1.69	0.20	0.11	0.00	9.5	20.3	
	24002	3.51	0.93	2.41	0.07	0.09	0.00	9.2	19.6	
	24003	1.24	0.28	0.90	0.03	0.04	0.00	10.0	21.4	
	24004	2.20	0.32	1.77	0.04	0.05	0.00	9.5	22.5	
	24005	1.35	0.32	0.95	0.03	0.03	0.01	10.1	24.4	
	24006	1.61	0.18	1.39	0.02	0.01	0.00	9.1	20.5	
	24007	1.46	0.44	0.89	0.03	0.09	0.00	9.8	28.3	
	24008	2.37	0.33	1.94	0.06	0.03	0.00	9.7	19.8	
	24009	2.82	0.30	2.39	0.07	0.05	0.00	10.1	22.7	
	24010	1.12	0.14	0.94	0.02	0.02	0.00	11.0	28.5	
		<b>Mean</b>	<b>2.11</b>	<b>0.45</b>	<b>1.53</b>	<b>0.06</b>	<b>0.05</b>	<b>0.00</b>	<b>9.8</b>	<b>22.8</b>
		<b>S.D.</b>	<b>0.89</b>	<b>0.37</b>	<b>0.60</b>	<b>0.05</b>	<b>0.03</b>	<b>0.00</b>	<b>0.5</b>	<b>3.3</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	

스.

으.

ㄷ. Appendix 6-2. Individual hematological parameters (Recovery Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)	
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)			
G1 0	11011	9.47	16.7	45.7	48.3	17.6	36.4	873	1.73	
	11012	8.54	15.6	42.4	49.7	18.3	36.8	1104	1.73	
	11013	8.35	15.7	42.5	50.8	18.8	37.0	972	2.06	
	11014	8.57	15.3	41.7	48.7	17.8	36.6	1117	1.70	
	11015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Mean</b>	<b>8.73</b>	<b>15.8</b>	<b>43.1</b>	<b>49.4</b>	<b>18.1</b>	<b>36.7</b>	<b>1017</b>	<b>1.81</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>0.50</b>	<b>0.6</b>	<b>1.8</b>	<b>1.1</b>	<b>0.5</b>	<b>0.3</b>	<b>116</b>	<b>0.17</b>	
<b>N</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>		
G4 5,000	14011	8.39	15.8	42.3	50.5	18.8	37.2	869	1.60	
	14012	7.38	15.9	38.2	51.8	21.6	41.7	909	1.85	
	14013	7.90	15.0	41.8	52.9	19.0	35.9	1088	2.22	
	14014	8.61	16.2	45.0	52.3	18.9	36.1	846	1.70	
	14015	8.92	15.7	43.4	48.7	17.6	36.1	806	2.07	
	<b>Mean</b>	<b>8.24</b>	<b>15.7</b>	<b>42.1</b>	<b>51.2</b>	<b>19.2</b>	<b>37.4</b>	<b>904</b>	<b>1.89</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>0.61</b>	<b>0.4</b>	<b>2.5</b>	<b>1.7</b>	<b>1.5</b>	<b>2.5</b>	<b>110</b>	<b>0.26</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	11011	5.75	0.61	4.88	0.10	0.15	0.00	13.4	30.4
	11012	5.09	0.77	4.11	0.12	0.07	0.00	13.9	30.1
	11013	3.60	0.71	2.75	0.08	0.05	0.00	13.3	27.3
	11014	2.35	0.43	1.78	0.05	0.08	0.00	14.1	36.1
	11015	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Mean</b>	<b>4.20</b>	<b>0.63</b>	<b>3.38</b>	<b>0.09</b>	<b>0.09</b>	<b>0.00</b>	<b>13.7</b>	<b>31.0</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.53</b>	<b>0.15</b>	<b>1.38</b>	<b>0.03</b>	<b>0.04</b>	<b>0.00</b>	<b>0.4</b>	<b>3.7</b>
<b>N</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	
G4 5,000	14011	5.84	1.55	4.06	0.12	0.08	0.00	14.3	30.8
	14012	5.24	0.70	4.30	0.11	0.09	0.00	13.2	28.7
	14013	2.97	0.51	2.26	0.10	0.09	0.01	13.4	30.2
	14014	3.78	1.91	1.67	0.10	0.07	0.00	13.6	33.8
	14015	3.62	0.75	2.72	0.06	0.07	0.00	13.9	25.1
	<b>Mean</b>	<b>4.29</b>	<b>1.08</b>	<b>3.00</b>	<b>0.10</b>	<b>0.08</b>	<b>0.00</b>	<b>13.7</b>	<b>29.7</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.20</b>	<b>0.61</b>	<b>1.14</b>	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>0.4</b>	<b>3.2</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

11015 : Dead animal

츠.

크.

트.

프.

Appendix 6-2. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	RBC ( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	Reti (%)
					MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)		
G1 0	21011	-	-	-	-	-	-	-	-
	21012	7.87	14.9	41.0	52.1	19.0	36.4	1038	1.49
	21013	8.40	16.4	45.5	54.2	19.6	36.1	1046	1.66
	21014	7.96	15.4	41.5	52.1	19.3	37.0	1052	1.62
	21015	7.84	15.3	41.8	53.3	19.5	36.5	936	2.61
	<b>Mean</b>	<b>8.02</b>	<b>15.5</b>	<b>42.5</b>	<b>52.9</b>	<b>19.4</b>	<b>36.5</b>	<b>1018</b>	<b>1.85</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.26</b>	<b>0.6</b>	<b>2.1</b>	<b>1.0</b>	<b>0.3</b>	<b>0.4</b>	<b>55</b>	<b>0.52</b>
<b>N</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	
G4 5,000	24011	7.92	15.3	41.9	52.9	19.3	36.5	1097	1.94
	24012	7.84	15.1	40.9	52.2	19.2	36.8	1072	1.73
	24013	8.26	15.6	42.7	51.7	18.9	36.5	1130	1.81
	24014	7.76	15.9	42.9	55.3	20.5	37.1	1107	1.70
	24015	7.38	14.5	39.2	53.0	19.7	37.1	1087	2.05
	<b>Mean</b>	<b>7.83</b>	<b>15.3</b>	<b>41.5</b>	<b>53.0</b>	<b>19.5</b>	<b>36.8</b>	<b>1099</b>	<b>1.85</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.32</b>	<b>0.5</b>	<b>1.5</b>	<b>1.4</b>	<b>0.6</b>	<b>0.3</b>	<b>22</b>	<b>0.15</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	WBC ( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	WBC Differential Counting (%)					PT (sec)	APTT (sec)
			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO		
G1 0	21011	-	-	-	-	-	-	14.6	32.1
	21012	2.61	0.37	2.12	0.06	0.05	0.00	13.9	23.2
	21013	1.06	0.19	0.79	0.02	0.05	0.00	14.3	21.9
	21014	1.06	0.19	0.79	0.01	0.07	0.00	15.3	24.8
	21015	0.68	0.12	0.53	0.01	0.03	0.00	14.2	24.7
	<b>Mean</b>	<b>1.35</b>	<b>0.22</b>	<b>1.06</b>	<b>0.03</b>	<b>0.05</b>	<b>0.00</b>	<b>14.5</b>	<b>25.3</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.86</b>	<b>0.11</b>	<b>0.72</b>	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.5</b>	<b>4.0</b>
<b>N</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	4.39	0.31	3.85	0.14	0.08	0.00	14.4	21.9
	24012	1.47	0.18	1.24	0.02	0.03	0.00	14.3	20.3
	24013	1.43	0.24	1.13	0.02	0.03	0.00	13.7	25.0
	24014	2.00	0.24	1.67	0.04	0.03	0.00	14.1	23.2
	24015	2.37	0.56	1.66	0.08	0.06	0.00	14.8	25.5
	<b>Mean</b>	<b>2.33</b>	<b>0.31</b>	<b>1.91</b>	<b>0.06</b>	<b>0.05</b>	<b>0.00</b>	<b>14.3</b>	<b>23.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.21</b>	<b>0.15</b>	<b>1.11</b>	<b>0.05</b>	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>	<b>0.4</b>	<b>2.2</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

21011 : blood sample was coagulated  
호.

가.

나.

다.

라. Appendix 7-1. Individual clinical chemistry (Main Group)

Sex: Male										
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	11001	33	92	290	101	21	0.5	-0.02	106	38
	11002	47	123	360	106	16	0.6	0.00	106	55
	11003	31	71	413	134	18	0.6	-0.05	115	44
	11004	48	128	367	109	17	0.5	-0.02	111	57
	11005	28	62	254	104	18	0.5	-0.03	85	60
	11006	27	89	251	97	21	0.5	-0.03	104	36
	11007	43	83	360	132	26	0.5	0.06	131	67
	11008	32	76	316	122	24	0.5	0.02	94	32
	11009	28	76	199	95	14	0.5	0.01	112	33
	11010	28	74	187	112	14	0.5	0.04	83	14
		<b>Mean</b>	<b>35</b>	<b>87</b>	<b>300</b>	<b>111</b>	<b>19</b>	<b>0.5</b>	<b>0.00</b>	<b>105</b>
	<b>S.D.</b>	<b>8</b>	<b>22</b>	<b>76</b>	<b>14</b>	<b>4</b>	<b>0.0</b>	<b>0.03</b>	<b>14</b>	<b>16</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	38	85	338	98	17	0.6	0.02	115	105
	12002	41	86	314	93	20	0.6	-0.07	89	37
	12003	37	83	332	94	17	0.6	0.03	113	105
	12004	40	67	196	104	19	0.6	0.02	88	16
	12005	33	60	209	124	17	0.5	-0.02	109	60
	12006	25	70	182	120	17	0.6	-0.02	96	86
	12007	32	60	238	135	17	0.5	0.03	98	60
	12008	41	94	276	72	17	0.6	0.00	126	74
	12009	29	72	196	112	19	0.6	0.00	115	25
	12010	24	83	235	130	15	0.6	0.00	104	16
		<b>Mean</b>	<b>34</b>	<b>76</b>	<b>252</b>	<b>108</b>	<b>18</b>	<b>0.6</b>	<b>0.00</b>	<b>105</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>59</b>	<b>20</b>	<b>1</b>	<b>0.0</b>	<b>0.03</b>	<b>12</b>	<b>34</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	25	79	180	62	17	0.4	-0.03	74	25
	13002	51	86	283	84	18	0.6	-0.07	100	27
	13003	21	36	235	80	10	0.4	-0.01	50	20
	13004	22	36	135	78	11	0.4	-0.04	56	24
	13005	29	55	244	88	16	0.4	0.00	110	50
	13006	32	76	293	108	20	0.6	-0.04	112	31
	13007	25	123	303	100	19	0.6	-0.06	74	42
	13008	29	100	309	111	19	0.5	-0.04	72	30
	13009	25	84	262	124	19	0.6	-0.03	98	62
	13010	27	84	245	138	16	0.6	-0.04	95	22
		<b>Mean</b>	<b>29</b>	<b>76</b>	<b>249</b>	<b>97</b>	<b>17</b>	<b>0.5</b>	<b>-0.04</b>	<b>84</b>
	<b>S.D.</b>	<b>9</b>	<b>27</b>	<b>56</b>	<b>23</b>	<b>3</b>	<b>0.1</b>	<b>0.02</b>	<b>22</b>	<b>14</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	37	70	258	84	23	0.6	-0.05	117	62
	14002	24	52	232	89	18	0.5	-0.02	65	20
	14003	33	83	263	90	24	0.5	0.00	98	42
	14004	31	92	286	101	22	0.5	0.01	115	64
	14005	26	70	243	78	17	0.5	-0.02	68	34
	14006	35	93	268	100	19	0.6	0.00	111	52
	14007	25	108	190	84	19	0.5	-0.01	112	61
	14008	38	115	212	82	22	0.6	-0.02	87	20
	14009	32	99	212	107	20	0.6	-0.02	90	32
	14010	29	84	280	93	20	0.5	-0.05	103	49
		<b>Mean</b>	<b>31</b>	<b>87</b>	<b>244</b>	<b>91</b>	<b>20</b>	<b>0.5</b>	<b>-0.02</b>	<b>97</b>
	<b>S.D.</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	<b>32</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>0.1</b>	<b>0.02</b>	<b>19</b>	<b>17</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 7-1. (Continued)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	11001	7.9	2.9	0.58	6.58	10.2	143	5.9	102
	11002	7.8	2.9	0.59	6.05	10.1	150	6.3	109
	11003	7.9	2.8	0.55	5.51	9.9	141	6.6	101
	11004	8.1	2.9	0.56	6.16	10.3	143	5.9	101
	11005	7.5	2.6	0.53	7.69	10.5	143	5.8	102
	11006	8.0	3.0	0.60	6.84	10.2	154	6.3	116
	11007	8.1	3.0	0.59	6.96	10.9	122	5.6	88
	11008	7.5	2.9	0.63	5.95	9.6	127	4.5	90
	11009	7.3	2.6	0.55	6.10	9.4	128	5.0	94
	11010	7.3	2.6	0.55	6.64	9.9	119	3.7	83
		<b>Mean</b>	<b>7.7</b>	<b>2.8</b>	<b>0.57</b>	<b>6.45</b>	<b>10.1</b>	<b>137</b>	<b>5.6</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>	<b>0.03</b>	<b>0.62</b>	<b>0.4</b>	<b>12</b>	<b>0.9</b>	<b>10</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	7.9	2.9	0.58	6.73	10.2	118	4.5	82
	12002	8.0	2.9	0.57	6.25	9.6	129	5.5	91
	12003	7.8	2.8	0.56	6.67	9.9	152	6.2	112
	12004	8.0	3.0	0.60	6.08	10.4	137	5.3	99
	12005	8.1	3.0	0.59	6.80	10.2	139	6.0	97
	12006	7.9	2.7	0.52	6.36	10.2	146	5.4	103
	12007	7.2	2.6	0.57	6.20	9.6	118	4.7	81
	12008	7.8	2.7	0.53	5.95	9.8	147	5.3	105
	12009	7.6	2.7	0.55	5.91	9.9	129	4.1	91
	12010	7.7	2.8	0.57	5.62	9.7	103	3.5	72
		<b>Mean</b>	<b>7.8</b>	<b>2.8</b>	<b>0.56</b>	<b>6.26</b>	<b>10.0</b>	<b>132</b>	<b>5.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3</b>	<b>0.1</b>	<b>0.02</b>	<b>0.39</b>	<b>0.3</b>	<b>15</b>	<b>0.8</b>	<b>12</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	5.1	1.8	0.55	4.35	6.7	121	5.3	90
	13002	8.3	3.0	0.57	6.59	10.1	127	5.8	92
	13003	4.8	1.7	0.55	4.42	6.5	110	4.1	76
	13004	4.8	1.7	0.55	3.88	6.4	96	4.0	66
	13005	6.2	2.2	0.55	5.36	8.1	112	4.3	75
	13006	7.9	2.7	0.52	6.31	9.7	138	5.1	98
	13007	7.7	2.8	0.57	7.32	10.5	140	5.4	98
	13008	7.7	2.9	0.60	6.67	9.6	140	5.1	100
	13009	7.7	2.9	0.60	6.25	10.2	138	4.8	97
	13010	7.9	2.9	0.58	6.07	10.0	141	5.3	99
		<b>Mean</b>	<b>6.8</b>	<b>2.5</b>	<b>0.56</b>	<b>5.72</b>	<b>8.8</b>	<b>126</b>	<b>4.9</b>
	<b>S.D.</b>	<b>1.4</b>	<b>0.5</b>	<b>0.03</b>	<b>1.16</b>	<b>1.7</b>	<b>16</b>	<b>0.6</b>	<b>12</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	7.4	2.7	0.57	6.31	9.8	136	6.8	97
	14002	5.8	2.3	0.66	4.24	7.6	130	4.9	93
	14003	7.3	2.7	0.59	6.40	9.9	137	5.0	98
	14004	8.4	3.1	0.58	8.04	11.3	142	5.7	100
	14005	6.5	2.4	0.59	5.27	8.4	124	4.9	84
	14006	7.9	2.8	0.55	6.47	10.4	136	5.1	96
	14007	7.7	2.8	0.57	7.29	10.1	138	4.8	100
	14008	8.3	2.9	0.54	6.93	10.1	139	4.9	101
	14009	7.9	3.0	0.61	6.67	9.9	138	4.9	97
	14010	7.8	2.9	0.59	7.53	10.2	136	5.2	94
		<b>Mean</b>	<b>7.5</b>	<b>2.8</b>	<b>0.59</b>	<b>6.52</b>	<b>9.8</b>	<b>136</b>	<b>5.2</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.8</b>	<b>0.3</b>	<b>0.03</b>	<b>1.10</b>	<b>1.0</b>	<b>5</b>	<b>0.6</b>	<b>5</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 7-1. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	21001	39	72	193	116	24	0.6	0.02	128	58
	21002	67	204	161	119	23	0.7	0.06	94	42
	21003	24	69	141	100	15	0.5	0.05	92	24
	21004	36	87	194	118	18	0.6	0.01	156	101
	21005	30	85	154	109	14	0.5	0.06	110	19
	21006	32	104	213	120	16	0.6	0.05	107	16
	21007	27	78	160	82	26	0.5	0.06	102	30
	21008	28	83	98	88	21	0.6	0.06	102	15
	21009	27	76	206	89	25	0.6	0.07	123	43
	21010	25	84	157	127	21	0.6	0.07	156	26
		<b>Mean</b>	<b>34</b>	<b>94</b>	<b>168</b>	<b>107</b>	<b>20</b>	<b>0.6</b>	<b>0.05</b>	<b>117</b>
	<b>S.D.</b>	<b>13</b>	<b>40</b>	<b>35</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>0.1</b>	<b>0.02</b>	<b>23</b>	<b>26</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	29	92	215	102	20	0.6	0.00	111	57
	22002	55	109	217	110	24	0.7	0.04	110	33
	22003	29	83	195	101	17	0.6	0.00	122	19
	22004	29	128	192	92	16	0.5	0.06	81	25
	22005	30	83	245	117	20	0.6	0.05	141	50
	22006	41	76	436	150	26	0.6	0.04	190	36
	22007	39	109	150	83	25	0.6	0.00	153	45
	22008	27	82	196	118	14	0.6	0.04	103	25
	22009	32	83	154	116	18	0.6	0.03	164	42
	22010	32	74	147	112	15	0.6	0.02	137	17
		<b>Mean</b>	<b>34</b>	<b>92</b>	<b>215</b>	<b>110</b>	<b>20</b>	<b>0.6</b>	<b>0.03</b>	<b>131</b>
	<b>S.D.</b>	<b>9</b>	<b>18</b>	<b>84</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>0.0</b>	<b>0.02</b>	<b>32</b>	<b>14</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	26	72	128	111	19	0.5	0.00	115	33
	23002	30	84	253	121	18	0.6	-0.01	135	31
	23003	27	94	163	92	15	0.6	0.02	72	25
	23004	40	101	170	79	19	0.7	-0.01	119	22
	23005	30	92	154	88	17	0.6	0.02	96	19
	23006	34	89	254	113	17	0.5	0.07	121	18
	23007	38	89	167	115	24	0.6	0.08	179	37
	23008	32	117	185	113	21	0.6	0.02	112	19
	23009	43	91	145	82	35	0.7	0.02	107	39
	23010	27	76	138	125	19	0.6	0.06	120	16
		<b>Mean</b>	<b>33</b>	<b>91</b>	<b>176</b>	<b>104</b>	<b>20</b>	<b>0.6</b>	<b>0.03</b>	<b>118</b>
	<b>S.D.</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>44</b>	<b>17</b>	<b>6</b>	<b>0.1</b>	<b>0.03</b>	<b>27</b>	<b>8</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	26	98	400	83	24	0.8	0.04	131	82
	24002	29	78	206	127	18	0.7	0.00	88	15
	24003	25	88	223	106	25	0.7	0.02	100	25
	24004	47	85	282	117	23	0.6	0.08	169	35
	24005	36	78	237	162	22	0.6	0.02	98	18
	24006	32	75	323	142	24	0.6	0.01	161	23
	24007	25	66	119	110	19	0.5	0.03	114	29
	24008	32	90	166	113	18	0.6	0.04	98	16
	24009	23	60	163	108	19	0.6	0.01	154	18
	24010	38	61	132	134	29	0.6	0.04	141	37
		<b>Mean</b>	<b>31</b>	<b>78</b>	<b>225</b>	<b>120</b>	<b>22</b>	<b>0.6</b>	<b>0.03</b>	<b>125</b>
	<b>S.D.</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>89</b>	<b>22</b>	<b>4</b>	<b>0.1</b>	<b>0.02</b>	<b>30</b>	<b>20</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 7-1. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	21001	7.9	3.3	0.72	5.87	9.8	141	6.3	99
	21002	8.0	3.2	0.67	6.10	10.0	141	6.9	103
	21003	7.7	3.1	0.67	5.73	9.7	142	5.1	102
	21004	8.1	3.1	0.62	6.52	9.8	141	5.3	101
	21005	7.7	3.1	0.67	5.99	9.8	143	5.3	100
	21006	8.1	3.4	0.72	4.55	9.7	143	5.2	106
	21007	7.8	3.3	0.73	5.85	10.1	143	4.7	102
	21008	8.4	3.5	0.71	6.06	10.2	143	4.4	103
	21009	8.1	3.2	0.65	7.02	10.0	143	5.6	103
	21010	8.5	3.5	0.70	7.17	10.3	143	5.0	103
		<b>Mean</b>	<b>8.0</b>	<b>3.3</b>	<b>0.69</b>	<b>6.09</b>	<b>9.9</b>	<b>142</b>	<b>5.4</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>	<b>0.04</b>	<b>0.73</b>	<b>0.2</b>	<b>1</b>	<b>0.7</b>	<b>2</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	8.0	3.2	0.67	6.31	9.7	140	6.1	101
	22002	7.8	3.2	0.70	5.38	9.4	143	5.0	101
	22003	8.0	3.4	0.74	5.77	9.7	143	5.1	104
	22004	7.3	2.9	0.66	6.31	9.3	142	5.4	103
	22005	8.0	3.2	0.67	6.94	10.1	141	5.9	102
	22006	8.6	3.3	0.62	8.07	10.7	144	6.4	104
	22007	8.8	3.7	0.73	7.63	10.6	141	5.3	102
	22008	7.7	3.1	0.67	6.07	9.7	144	5.0	103
	22009	8.7	3.5	0.67	6.63	10.5	142	5.5	103
	22010	8.0	3.2	0.67	6.31	10.1	142	4.6	101
		<b>Mean</b>	<b>8.1</b>	<b>3.3</b>	<b>0.68</b>	<b>6.54</b>	<b>10.0</b>	<b>142</b>	<b>5.4</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.5</b>	<b>0.2</b>	<b>0.03</b>	<b>0.82</b>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>0.6</b>	<b>1</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	8.3	3.5	0.73	7.20	10.5	140	5.0	102
	23002	8.4	3.3	0.65	4.54	9.7	141	5.3	104
	23003	8.1	3.5	0.76	4.21	9.8	142	4.6	102
	23004	8.4	3.3	0.65	5.82	9.6	142	5.4	104
	23005	7.7	3.1	0.67	5.92	9.5	141	4.9	104
	23006	8.0	3.1	0.63	5.55	9.7	140	4.8	103
	23007	9.1	3.8	0.72	6.91	10.7	142	4.7	100
	23008	8.3	3.4	0.69	7.38	10.4	142	5.7	101
	23009	8.0	3.2	0.67	6.20	9.8	143	5.1	106
	23010	8.6	3.7	0.76	5.36	10.4	143	4.4	102
		<b>Mean</b>	<b>8.3</b>	<b>3.4</b>	<b>0.69</b>	<b>5.91</b>	<b>10.0</b>	<b>142</b>	<b>5.0</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.4</b>	<b>0.2</b>	<b>0.05</b>	<b>1.06</b>	<b>0.4</b>	<b>1</b>	<b>0.4</b>	<b>2</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	8.3	2.4	0.41	7.08	10.7	138	5.7	93
	24002	8.1	3.2	0.65	4.47	9.8	140	5.4	103
	24003	7.9	3.3	0.72	5.11	9.5	140	5.2	104
	24004	8.4	3.4	0.68	5.64	10.1	141	5.2	98
	24005	7.8	3.4	0.77	5.77	10.7	142	5.2	103
	24006	8.6	3.4	0.65	7.13	10.5	140	5.5	101
	24007	8.1	3.5	0.76	7.20	10.2	141	4.8	103
	24008	7.8	3.3	0.73	7.73	10.0	141	4.4	100
	24009	8.7	3.6	0.71	6.52	10.4	143	4.6	102
	24010	8.2	3.4	0.71	6.62	10.4	142	5.3	103
		<b>Mean</b>	<b>8.2</b>	<b>3.3</b>	<b>0.68</b>	<b>6.33</b>	<b>10.2</b>	<b>141</b>	<b>5.1</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.10</b>	<b>1.04</b>	<b>0.4</b>	<b>1</b>	<b>0.4</b>	<b>3</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Table 7-2. Individual clinical chemistry (Recovery Group)

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	11011	28	63	287	116	14	0.6	-0.01	123	72
	11012	25	59	189	126	18	0.6	-0.03	106	36
	11013	31	68	278	102	18	0.5	-0.04	113	16
	11014	29	75	221	118	15	0.6	-0.06	91	13
	11015	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Mean</b>	<b>28</b>	<b>66</b>	<b>244</b>	<b>116</b>	<b>16</b>	<b>0.6</b>	<b>-0.04</b>	<b>108</b>	<b>34</b>
	<b>S.D.</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>47</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>0.1</b>	<b>0.02</b>	<b>13</b>	<b>27</b>
<b>N</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	
G4 5,000	14011	28	66	363	107	18	0.5	0.01	108	28
	14012	27	74	230	108	13	0.5	0.00	112	62
	14013	29	59	264	109	25	0.7	-0.01	153	38
	14014	33	76	220	105	17	0.7	-0.02	93	16
	14015	47	83	210	96	16	0.6	-0.02	137	18
	<b>Mean</b>	<b>33</b>	<b>72</b>	<b>257</b>	<b>105</b>	<b>18</b>	<b>0.6</b>	<b>-0.01</b>	<b>121</b>	<b>32</b>
	<b>S.D.</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>62</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>0.1</b>	<b>0.01</b>	<b>24</b>	<b>19</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	11011	8.2	2.9	0.55	6.04	8.2	139	8.9	100
	11012	7.4	2.8	0.61	6.05	8.1	138	9.3	99
	11013	7.5	2.7	0.56	6.19	7.8	140	8.4	103
	11014	8	3.1	0.63	6.18	7.9	142	8.8	101
	11015	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Mean</b>	<b>7.8</b>	<b>2.9</b>	<b>0.59</b>	<b>6.12</b>	<b>8.0</b>	<b>140</b>	<b>8.9</b>	<b>101</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.4</b>	<b>0.2</b>	<b>0.04</b>	<b>0.08</b>	<b>0.2</b>	<b>2</b>	<b>0.4</b>	<b>2</b>
<b>N</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	
G4 5,000	14011	7.4	2.6	0.54	6.63	8.2	139	8.8	101
	14012	7.7	2.9	0.60	6.52	7.9	138	9.0	100
	14013	8.2	3.0	0.58	7.02	8.6	140	9.3	101
	14014	8.0	2.9	0.57	6.58	8.1	140	8.8	101
	14015	8.2	2.9	0.55	7.14	8.5	140	9.2	103
	<b>Mean</b>	<b>7.9</b>	<b>2.9</b>	<b>0.57</b>	<b>6.78</b>	<b>8.3</b>	<b>139</b>	<b>9.0</b>	<b>101</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>	<b>0.03</b>	<b>0.28</b>	<b>0.3</b>	<b>1</b>	<b>0.2</b>	<b>1</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

11015: Dead animal



Appendix 7-2. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bili (mg/dL)	T-Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)
G1 0	21011	28	89	112	119	18	0.7	0.06	111	28
	21012	18	43	131	131	17	0.6	0.10	123	23
	21013	29	75	99	96	15	0.6	0.01	82	8
	21014	30	63	123	147	18	0.6	0.02	82	12
	21015	27	55	125	147	16	0.7	0.00	100	32
	<b>Mean</b>	<b>26</b>	<b>65</b>	<b>118</b>	<b>128</b>	<b>17</b>	<b>0.6</b>	<b>0.04</b>	<b>100</b>	<b>21</b>
	<b>S.D.</b>	<b>5</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.04</b>	<b>18</b>	<b>10</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	31	74	140	113	18	0.7	0.01	95	25
	24012	58	136	128	124	18	0.7	0.11	127	20
	24013	29	89	153	122	21	0.6	0.05	125	42
	24014	60	105	204	133	23	0.7	0.06	132	27
	24015	30	59	128	148	14	0.6	0.01	110	18
	<b>Mean</b>	<b>42</b>	<b>93</b>	<b>151</b>	<b>128</b>	<b>19</b>	<b>0.7</b>	<b>0.05</b>	<b>118</b>	<b>26</b>
	<b>S.D.</b>	<b>16</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>0.1</b>	<b>0.04</b>	<b>15</b>	<b>9</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	A/G ratio	P (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)
G1 0	21011	8.2	3.4	0.71	6.29	8.2	141	6.0	103
	21012	7.8	3.2	0.70	4.91	7.9	141	4.4	103
	21013	8.0	3.3	0.70	3.99	7.9	144	4.8	106
	21014	7.7	3.2	0.71	3.54	7.9	143	4.7	104
	21015	8.3	3.3	0.66	4.23	8.0	143	4.6	103
	<b>Mean</b>	<b>8.0</b>	<b>3.3</b>	<b>0.70</b>	<b>4.59</b>	<b>8.0</b>	<b>142</b>	<b>4.9</b>	<b>104</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3</b>	<b>0.1</b>	<b>0.02</b>	<b>1.07</b>	<b>0.1</b>	<b>1</b>	<b>0.6</b>	<b>1</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	8.1	3.3	0.69	6.04	8.2	142	5.5	103
	24012	8.2	3.5	0.74	5.20	8.3	140	4.3	100
	24013	8.6	3.6	0.72	5.01	8.4	140	4.2	100
	24014	8.3	3.4	0.69	4.61	8.3	142	3.9	103
	24015	7.9	3.2	0.68	4.29	7.8	141	4.3	102
	<b>Mean</b>	<b>8.2</b>	<b>3.4</b>	<b>0.71</b>	<b>5.03</b>	<b>8.2</b>	<b>141</b>	<b>4.4</b>	<b>102</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3</b>	<b>0.2</b>	<b>0.03</b>	<b>0.67</b>	<b>0.2</b>	<b>1</b>	<b>0.6</b>	<b>2</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

II]. Appendix 8-1. Individual absolute organ weights (Main Group)

Sex: Male		(g)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	11001	598.2	2.1704	0.0123	1.5686	1.9449	15.3109
	11002	465.8	2.2144	0.0132	1.4932	1.7846	14.2753
	11003	572.5	2.0321	0.0114	1.4458	1.5909	13.1945
	11004	590.0	2.0873	0.0142	1.4584	1.9496	15.2335
	11005	465.2	2.3125	0.0159	1.8175	2.1233	15.6067
	11006	476.5	2.3440	0.0122	1.5718	2.0213	14.2525
	11007	605.1	2.0351	0.0146	1.6161	1.8944	13.6665
	11008	533.6	2.0910	0.0131	1.5766	1.5157	11.9871
	11009	458.6	2.3048	0.0127	1.5452	1.7028	13.2538
	11010	490.0	2.1020	0.0097	1.5917	1.9349	12.8960
		<b>Mean</b>	<b>525.6</b>	<b>2.1694</b>	<b>0.0129</b>	<b>1.5685</b>	<b>1.8462</b>
	<b>S.D.</b>	<b>60.9</b>	<b>0.1182</b>	<b>0.0017</b>	<b>0.1045</b>	<b>0.1935</b>	<b>1.1803</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	493.6	2.2263	0.0148	1.4455	1.8255	14.2173
	12002	459.8	2.1055	0.0093	1.4999	1.9850	12.7350
	12003	543.2	2.2418	0.0124	1.5195	1.8255	15.1723
	12004	427.7	2.0582	0.0137	1.2830	1.6755	11.1765
	12005	497.6	2.2606	0.0100	1.5818	1.9305	14.1445
	12006	578.4	2.3180	0.0105	1.6265	2.1718	15.1658
	12007	535.4	2.0801	0.0098	1.5828	2.0207	15.3847
	12008	540.6	2.3469	0.0115	1.6216	1.7612	15.9292
	12009	534.7	2.2603	0.0107	1.4616	1.8106	13.0614
	12010	505.4	2.0235	0.0124	1.5976	1.9438	12.4089
		<b>Mean</b>	<b>511.6</b>	<b>2.1921</b>	<b>0.0115</b>	<b>1.5220</b>	<b>1.8950</b>
	<b>S.D.</b>	<b>44.3</b>	<b>0.1151</b>	<b>0.0018</b>	<b>0.1059</b>	<b>0.1442</b>	<b>1.5416</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	533.4	2.3771	0.0118	1.6059	2.0019	14.2837
	13002	493.8	2.2726	0.0087	1.5356	1.7373	14.1612
	13003	436.1	2.0388	0.0154	1.4709	1.6701	11.7873
	13004	538.1	2.2495	0.0125	1.6587	2.0331	16.6807
	13005	549.1	2.3634	0.0136	2.1101	2.1338	16.9098
	13006	540.4	2.2468	0.0137	1.5574	1.8548	14.9201
	13007	514.9	2.2338	0.0143	1.6862	2.0062	14.7688
	13008	460.8	2.2470	0.0111	1.5332	1.4195	12.2398
	13009	590.3	2.1756	0.0100	1.7053	1.9099	16.2375
	13010	471.1	2.0116	0.0154	1.3638	1.7704	13.2157
		<b>Mean</b>	<b>512.8</b>	<b>2.2216</b>	<b>0.0127</b>	<b>1.6227</b>	<b>1.8537</b>
	<b>S.D.</b>	<b>47.0</b>	<b>0.1196</b>	<b>0.0023</b>	<b>0.2000</b>	<b>0.2113</b>	<b>1.7671</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	470.2	2.2006	0.0133	1.7244	1.8902	14.3475
	14002	460.3	2.2114	0.0121	1.5066	2.0932	13.3377
	14003	474.6	2.2724	0.0140	1.5239	2.0172	15.1086
	14004	529.4	2.0356	0.0136	1.7461	1.8692	15.5347
	14005	500.2	2.0680	0.0151	1.4999	1.7919	14.5005
	14006	556.7	2.2876	0.0124	1.6405	2.1081	16.5085
	14007	531.4	2.1870	0.0124	1.6405	2.0956	16.5532
	14008	532.7	2.2353	0.0131	2.1648	2.1965	16.0648
	14009	469.9	2.1785	0.0167	1.3577	1.7102	13.5056
	14010	488.0	2.0572	0.0119	1.4822	1.8926	12.5129
		<b>Mean</b>	<b>501.3</b>	<b>2.1734</b>	<b>0.0135</b>	<b>1.6287</b>	<b>1.9665</b>
	<b>S.D.</b>	<b>33.8</b>	<b>0.0899</b>	<b>0.0015</b>	<b>0.2231</b>	<b>0.1582</b>	<b>1.3971</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 8-1. (Continued)

Sex: Male		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	11001	1.0224	3.6551	0.0682	4.4405	0.7244
	11002	0.9280	3.4120	0.0586	3.5999	0.4179
	11003	1.0347	3.1906	0.0651	4.2568	0.4815
	11004	0.8584	3.4494	0.0566	4.1534	0.3933
	11005	0.8377	4.0951	0.0819	4.6008	0.8432
	11006	0.9905	3.2444	0.0554	3.9945	0.7897
	11007	0.8351	3.6676	0.0549	4.3814	0.6298
	11008	0.8526	3.1323	0.0472	4.1938	0.5083
	11009	0.7934	3.1546	0.0553	4.1829	0.5251
	11010	0.8186	3.0648	0.0577	3.9039	0.6100
		<b>Mean</b>	<b>0.8971</b>	<b>3.4066</b>	<b>0.0601</b>	<b>4.1708</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0895</b>	<b>0.3222</b>	<b>0.0096</b>	<b>0.2865</b>	<b>0.1545</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	0.9435	3.6150	0.0613	4.5681	0.6666
	12002	0.6835	3.1108	0.0613	3.6675	0.7701
	12003	0.9326	3.3330	0.0594	4.4288	0.6505
	12004	0.6463	2.9756	0.0562	4.2765	0.6078
	12005	0.8155	3.3001	0.0561	3.8475	0.4063
	12006	0.9877	2.9146	0.0794	4.5440	0.5112
	12007	0.8868	3.2511	0.0569	4.0031	0.6198
	12008	1.2795	3.2504	0.0535	4.7279	0.8386
	12009	0.9498	3.0155	0.0570	3.4799	0.6955
	12010	0.9145	2.7173	0.0605	3.9974	0.7729
		<b>Mean</b>	<b>0.9040</b>	<b>3.1483</b>	<b>0.0602</b>	<b>4.1541</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.1750</b>	<b>0.2550</b>	<b>0.0072</b>	<b>0.4184</b>	<b>0.1285</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	0.9167	3.1759	0.0632	4.2955	0.6592
	13002	0.8003	3.1591	0.0501	4.0213	0.5778
	13003	0.7943	3.0193	0.0662	3.8387	0.5040
	13004	1.1611	3.4436	0.0626	4.3269	0.7520
	13005	0.9261	3.7477	0.0655	5.2632	0.7501
	13006	1.0407	3.4392	0.0720	4.5304	0.7585
	13007	0.9427	3.3643	0.0597	4.8447	0.7246
	13008	0.7112	2.9468	0.0539	4.0573	0.5225
	13009	1.1335	3.7302	0.0630	4.4425	0.5659
	13010	0.8960	3.2568	0.0528	3.7061	0.6248
		<b>Mean</b>	<b>0.9323</b>	<b>3.3283</b>	<b>0.0609</b>	<b>4.3327</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.1459</b>	<b>0.2713</b>	<b>0.0068</b>	<b>0.4702</b>	<b>0.0989</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	0.8302	3.5262	0.0542	4.2714	0.5089
	14002	0.8312	3.5207	0.0630	4.4351	0.7918
	14003	0.9913	3.8078	0.0657	4.1325	1.0147
	14004	1.1235	3.5232	0.0568	4.1890	0.4581
	14005	1.2784	3.6203	0.0553	4.1881	0.8498
	14006	0.8822	3.7871	0.0728	4.4108	0.6060
	14007	0.9367	3.4814	0.0742	4.7476	0.7299
	14008	1.1256	3.5332	0.0536	4.2030	0.4262
	14009	0.7369	2.6755	0.0503	4.0485	0.5386
	14010	0.8120	3.1445	0.0619	4.0888	0.5438
		<b>Mean</b>	<b>0.9548</b>	<b>3.4620</b>	<b>0.0608</b>	<b>4.2715</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.1725</b>	<b>0.3311</b>	<b>0.0082</b>	<b>0.2092</b>	<b>0.1920</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 8-1. (Continued)

Sex: Female								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver	
G1 0	21001	295.8	2.0439	0.0166	0.9715	1.3972	8.7194	
	21002	269.5	1.8958	0.0164	1.0951	1.5784	6.0639	
	21003	295.6	1.8916	0.0177	1.0860	1.3912	7.8194	
	21004	327.8	2.0975	0.0145	1.1024	1.3875	9.5319	
	21005	288.2	1.9970	0.0154	1.0547	1.5348	8.2503	
	21006	274.9	2.0050	0.0164	0.9965	1.3067	6.8933	
	21007	298.9	2.1440	0.0132	1.0735	1.4183	7.8995	
	21008	347.9	2.1776	0.0196	1.3553	1.6575	8.5041	
	21009	346.5	2.1346	0.0166	1.0562	1.6293	9.0764	
	21010	328.6	2.0649	0.0186	1.2156	1.6425	11.4457	
		<b>Mean</b>	<b>307.4</b>	<b>2.0452</b>	<b>0.0165</b>	<b>1.1007</b>	<b>1.4943</b>	<b>8.4204</b>
	<b>S.D.</b>	<b>28.4</b>	<b>0.0990</b>	<b>0.0019</b>	<b>0.1109</b>	<b>0.1282</b>	<b>1.4705</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G2 1,250	22001	289.8	2.0720	0.0170	1.1058	1.3660	7.8190	
	22002	310.0	2.2540	0.0211	1.2547	1.5164	7.7532	
	22003	285.6	1.9953	0.0160	1.2739	1.4295	7.4214	
	22004	279.1	3.2375	0.0116	0.9652	1.3959	6.3051	
	22005	306.0	2.0474	0.0185	1.0855	1.4950	8.7019	
	22006	305.4	2.0758	0.0167	1.1517	1.4946	10.2217	
	22007	318.0	2.3953	0.0182	1.2430	1.4912	8.5128	
	22008	297.4	2.0276	0.0170	1.1065	1.4401	7.9326	
	22009	307.1	2.0492	0.0163	1.0732	1.5450	11.8226	
	22010	316.1	1.9114	0.0158	0.9929	1.4469	9.5297	
		<b>Mean</b>	<b>301.5</b>	<b>2.2066</b>	<b>0.0168</b>	<b>1.1252</b>	<b>1.4621</b>	<b>8.6020</b>
	<b>S.D.</b>	<b>13.1</b>	<b>0.3873</b>	<b>0.0024</b>	<b>0.1062</b>	<b>0.0560</b>	<b>1.5750</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G3 2,500	23001	302.6	1.8430	0.0151	1.0375	1.3724	8.7139	
	23002	254.5	2.0275	0.0138	1.0385	1.2044	7.9667	
	23003	324.3	2.1505	0.0147	1.0839	1.5393	8.1946	
	23004	287.5	1.8252	0.0144	0.8871	1.3138	7.0834	
	23005	293.3	1.9247	0.0141	1.1048	1.3200	8.4624	
	23006	312.8	1.9473	0.0161	1.1060	1.5947	9.1193	
	23007	277.6	1.9521	0.0243	1.0380	1.3729	10.0412	
	23008	320.5	2.1265	0.0199	1.1832	1.6178	9.5920	
	23009	349.2	2.1937	0.0187	1.1702	1.6732	8.6129	
	23010	322.7	2.0289	0.0204	1.1788	1.4520	10.1079	
		<b>Mean</b>	<b>304.5</b>	<b>2.0019</b>	<b>0.0172</b>	<b>1.0828</b>	<b>1.4461</b>	<b>8.7894</b>
	<b>S.D.</b>	<b>27.3</b>	<b>0.1263</b>	<b>0.0035</b>	<b>0.0896</b>	<b>0.1544</b>	<b>0.9512</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	
G4 5,000	24001	330.4	2.1174	0.0171	1.2925	1.7632	12.4960	
	24002	302.1	2.0602	0.0122	1.0228	1.5013	8.0063	
	24003	314.3	2.0826	0.0188	1.0789	1.5480	8.9612	
	24004	298.1	2.1179	0.0177	1.2412	1.5992	8.9998	
	24005	288.0	2.1351	0.0146	1.0198	1.4951	8.6765	
	24006	293.4	2.0157	0.0167	1.1738	1.4552	10.0247	
	24007	381.9	1.9688	0.0172	1.1821	1.5632	9.6143	
	24008	315.4	1.9864	0.0176	1.0961	1.5374	8.9960	
	24009	326.3	2.1394	0.0188	1.0776	1.5394	11.3526	
	24010	271.1	2.1353	0.0175	1.0321	1.4986	8.6160	
		<b>Mean</b>	<b>312.1</b>	<b>2.0759</b>	<b>0.0168</b>	<b>1.1217</b>	<b>1.5501</b>	<b>9.5743</b>
	<b>S.D.</b>	<b>30.4</b>	<b>0.0649</b>	<b>0.0020</b>	<b>0.0957</b>	<b>0.0852</b>	<b>1.3795</b>	
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	

Appendix 8-1. (Continued)

Sex: Female		(g)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	21001	0.6313	1.9121	0.0785	0.0818	1.1387
	21002	0.4761	1.5376	0.1131	0.1460	0.3975
	21003	0.7012	1.8387	0.0846	0.1061	0.4771
	21004	0.7873	1.9780	0.0954	0.0920	0.4759
	21005	0.8399	2.1430	0.0868	0.1121	1.0970
	21006	0.4934	1.8546	0.0840	0.1314	0.4953
	21007	0.6755	2.1462	0.0781	0.1690	0.4760
	21008	0.7954	2.1813	0.0847	0.1535	0.5044
	21009	0.7264	2.0308	0.0882	0.0978	0.5151
	21010	0.7237	2.4237	0.1075	0.1347	1.2828
		<b>Mean</b>	<b>0.6850</b>	<b>2.0046</b>	<b>0.0901</b>	<b>0.1224</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.1218</b>	<b>0.2413</b>	<b>0.0118</b>	<b>0.0288</b>	<b>0.3405</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	0.6301	2.0368	0.0972	0.1040	0.9327
	22002	0.7058	2.0132	0.0816	0.1127	0.6391
	22003	0.6411	1.7049	0.0712	0.1733	0.4074
	22004	0.5741	1.8629	0.0827	0.1057	1.3744
	22005	0.7276	2.0727	0.0856	0.0866	0.4432
	22006	0.8616	2.3557	0.1020	0.1377	1.8961
	22007	0.8295	2.2131	0.0832	0.1333	0.4517
	22008	0.6576	1.9206	0.0830	0.1004	1.0011
	22009	0.6463	2.1655	0.0823	0.1236	1.2797
	22010	0.6944	2.2962	0.0735	0.1026	0.5999
		<b>Mean</b>	<b>0.6968</b>	<b>2.0642</b>	<b>0.0842</b>	<b>0.1180</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0898</b>	<b>0.2014</b>	<b>0.0093</b>	<b>0.0250</b>	<b>0.4925</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	0.6293	2.0178	0.0836	0.1420	0.5336
	23002	0.5412	1.8478	0.0679	0.0923	1.3475
	23003	0.7150	2.1838	0.0722	0.1379	0.4566
	23004	0.8757	1.6937	0.0605	0.1616	0.4857
	23005	0.6289	2.0500	0.0836	0.1271	0.9397
	23006	0.6926	2.1737	0.0809	0.1756	0.5142
	23007	0.5884	1.9312	0.0815	0.0671	0.6577
	23008	0.5887	2.0347	0.0806	0.1366	0.5813
	23009	0.7811	2.4797	0.1043	0.1978	0.6076
	23010	0.8491	2.2878	0.0972	0.1476	1.2757
		<b>Mean</b>	<b>0.6890</b>	<b>2.0700</b>	<b>0.0812</b>	<b>0.1386</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.1149</b>	<b>0.2245</b>	<b>0.0129</b>	<b>0.0378</b>	<b>0.3307</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	1.6280	4.6056	0.0974	0.1239	0.6207
	24002	0.6202	2.1945	0.4738	0.0863	0.8704
	24003	0.6427	2.3636	0.0945	0.1156	0.7662
	24004	0.6182	2.1382	0.0894	0.0884	1.0840
	24005	0.6656	2.3031	0.0964	0.1066	1.0603
	24006	0.6500	2.2779	0.0950	0.1292	0.5598
	24007	0.7118	2.3015	0.0941	0.5161	0.5052
	24008	0.6243	2.0767	0.0607	0.1545	0.6305
	24009	0.7928	2.2826	0.0916	0.1050	1.7880
	24010	0.4982	2.1187	0.0824	0.0920	0.9120
		<b>Mean</b>	<b>0.7452</b>	<b>2.4662</b>	<b>0.1275</b>	<b>0.1518</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.3190</b>	<b>0.7575</b>	<b>0.1222</b>	<b>0.1297</b>	<b>0.3779</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

λ]. **Appendix 8-2. Individual absolute organ weights (Recovery Group)**

Sex: Male (g)							
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	11011	532.9	2.4107	0.0103	1.6192	2.1024	14.2675
	11012	527.6	2.2773	0.0149	1.8269	1.9086	14.7704
	11013	528.2	2.3765	0.0149	1.5531	1.8760	14.5857
	11014	559.4	2.1585	0.0135	1.7014	1.8469	13.5609
	11015	643.2	2.3771	0.0151	2.3344	3.1501	28.5133
	<b>Mean</b>	<b>558.3</b>	<b>2.3200</b>	<b>0.0137</b>	<b>1.8070</b>	<b>2.1768</b>	<b>17.1396</b>
	<b>S.D.</b>	<b>49.3</b>	<b>0.1032</b>	<b>0.0020</b>	<b>0.3120</b>	<b>0.5532</b>	<b>6.3748</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	508.7	2.1519	0.0166	1.5413	1.8191	13.2026
	14012	647.0	2.3819	0.0148	1.9850	2.1276	18.7109
	14013	470.7	2.2771	0.0111	1.5036	1.9427	14.9347
	14014	482.3	2.1591	0.0121	1.1559	1.4883	11.9699
	14015	456.5	2.0105	0.0141	1.4141	1.6961	12.5537
	<b>Mean</b>	<b>513.0</b>	<b>2.1961</b>	<b>0.0137</b>	<b>1.5200</b>	<b>1.8148</b>	<b>14.2744</b>
	<b>S.D.</b>	<b>77.3</b>	<b>0.1404</b>	<b>0.0022</b>	<b>0.3003</b>	<b>0.2423</b>	<b>2.7175</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	11011	0.9193	3.6006	0.0646	4.2043	0.7129
	11012	0.8932	2.8936	0.0691	4.2363	0.7436
	11013	0.9298	3.3323	0.0672	4.6791	0.6964
	11014	0.8484	3.6117	0.0611	4.2859	0.5083
	11015	1.2430	5.9914	0.0711	4.9989	0.4710
	<b>Mean</b>	<b>0.9667</b>	<b>3.8859</b>	<b>0.0666</b>	<b>4.4809</b>	<b>0.6264</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.1576</b>	<b>1.2125</b>	<b>0.0039</b>	<b>0.3471</b>	<b>0.1267</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	0.8463	3.3265	0.0551	3.2406	0.5882
	14012	0.9982	3.7979	0.0564	4.6445	0.5963
	14013	1.0132	2.9585	0.0502	3.6222	0.2401
	14014	0.7299	2.5672	0.0332	3.8026	0.5990
	14015	0.8601	3.0195	0.0551	4.3815	0.6700
	<b>Mean</b>	<b>0.8895</b>	<b>3.1339</b>	<b>0.0500</b>	<b>3.9383</b>	<b>0.5387</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.1176</b>	<b>0.4591</b>	<b>0.0097</b>	<b>0.5701</b>	<b>0.1702</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Appendix 8-2. (Continued)

Sex: Female								(g)
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W.	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver	
G1 0	21011	307.6	2.0478	0.0134	1.0306	1.5783	8.4284	
	21012	312.0	2.0211	0.0197	1.1226	1.4715	8.3822	
	21013	255.2	2.0223	0.0130	0.9114	2.0937	6.4232	
	21014	306.5	2.0888	0.0173	1.0168	1.4031	7.8554	
	21015	365.1	2.1512	0.0177	1.2015	1.6302	9.3795	
	<b>Mean</b>	<b>309.3</b>	<b>2.0662</b>	<b>0.0162</b>	<b>1.0566</b>	<b>1.6354</b>	<b>8.0937</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>38.9</b>	<b>0.0549</b>	<b>0.0029</b>	<b>0.1103</b>	<b>0.2712</b>	<b>1.0835</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		
G4 5,000	24011	352.3	1.9858	0.0167	1.0698	1.8198	9.0358	
	24012	285.5	2.0725	0.0177	1.0469	1.4662	7.1567	
	24013	367.6	2.1036	0.0153	1.1858	1.6037	9.9616	
	24014	304.7	2.2133	0.0166	1.0636	1.3998	7.8474	
	24015	372.0	2.1277	0.0204	1.2927	1.6757	11.5992	
	<b>Mean</b>	<b>336.4</b>	<b>2.1006</b>	<b>0.0173</b>	<b>1.1318</b>	<b>1.5930</b>	<b>9.1201</b>	
	<b>S.D.</b>	<b>39.0</b>	<b>0.0828</b>	<b>0.0019</b>	<b>0.1055</b>	<b>0.1672</b>	<b>1.7561</b>	
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	21011	0.6268	2.2822	0.1033	0.1012	0.5617
	21012	0.5491	1.8743	0.0756	0.0679	0.6437
	21013	0.5023	1.8073	0.0631	0.0993	0.5424
	21014	0.6882	2.4053	0.0769	0.0940	0.6223
	21015	0.7342	2.4443	0.0809	0.1091	0.7226
	<b>Mean</b>	<b>0.6201</b>	<b>2.1627</b>	<b>0.0800</b>	<b>0.0943</b>	<b>0.6185</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0957</b>	<b>0.3008</b>	<b>0.0146</b>	<b>0.0157</b>	<b>0.0716</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	0.8336	2.1156	0.0778	0.1393	0.6158
	24012	0.6676	2.0568	0.0732	0.0946	0.6756
	24013	0.7355	2.3623	0.0561	0.1237	0.4231
	24014	0.5342	2.2435	0.0847	0.0903	0.5029
	24015	0.8059	2.4884	0.0872	0.1806	0.4712
	<b>Mean</b>	<b>0.7154</b>	<b>2.2533</b>	<b>0.0758</b>	<b>0.1257</b>	<b>0.5377</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.1201</b>	<b>0.1767</b>	<b>0.0123</b>	<b>0.0368</b>	<b>0.1047</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

o]. **Appendix 9-1. Individual relative organ weights (Main Group)**

Sex: Male		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	11001	598.2	0.3628	0.0021	0.2622	0.3251	2.5595
	11002	465.8	0.4754	0.0028	0.3206	0.3831	3.0647
	11003	572.5	0.3550	0.0020	0.2525	0.2779	2.3047
	11004	590.0	0.3538	0.0024	0.2472	0.3304	2.5819
	11005	465.2	0.4971	0.0034	0.3907	0.4564	3.3548
	11006	476.5	0.4919	0.0026	0.3299	0.4242	2.9911
	11007	605.1	0.3363	0.0024	0.2671	0.3131	2.2586
	11008	533.6	0.3919	0.0025	0.2955	0.2841	2.2465
	11009	458.6	0.5026	0.0028	0.3369	0.3713	2.8901
	11010	490.0	0.4290	0.0020	0.3248	0.3949	2.6318
		<b>Mean</b>	<b>525.6</b>	<b>0.4196</b>	<b>0.0025</b>	<b>0.3027</b>	<b>0.3561</b>
	<b>S.D.</b>	<b>60.9</b>	<b>0.0673</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0460</b>	<b>0.0596</b>	<b>0.3766</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	493.6	0.4510	0.0030	0.2928	0.3698	2.8803
	12002	459.8	0.4579	0.0020	0.3262	0.4317	2.7697
	12003	543.2	0.4127	0.0023	0.2797	0.3361	2.7931
	12004	427.7	0.4812	0.0032	0.3000	0.3917	2.6132
	12005	497.6	0.4543	0.0020	0.3179	0.3880	2.8425
	12006	578.4	0.4008	0.0018	0.2812	0.3755	2.6220
	12007	535.4	0.3885	0.0018	0.2956	0.3774	2.8735
	12008	540.6	0.4341	0.0021	0.3000	0.3258	2.9466
	12009	534.7	0.4227	0.0020	0.2733	0.3386	2.4428
	12010	505.4	0.4004	0.0025	0.3161	0.3846	2.4553
		<b>Mean</b>	<b>511.6</b>	<b>0.4304</b>	<b>0.0023</b>	<b>0.2983</b>	<b>0.3719</b>
	<b>S.D.</b>	<b>44.3</b>	<b>0.0303</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.0176</b>	<b>0.0315</b>	<b>0.1799</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	533.4	0.4457	0.0022	0.3011	0.3753	2.6779
	13002	493.8	0.4602	0.0018	0.3110	0.3518	2.8678
	13003	436.1	0.4675	0.0035	0.3373	0.3830	2.7029
	13004	538.1	0.4180	0.0023	0.3083	0.3778	3.0999
	13005	549.1	0.4304	0.0025	0.3843	0.3886	3.0795
	13006	540.4	0.4158	0.0025	0.2882	0.3432	2.7609
	13007	514.9	0.4338	0.0028	0.3275	0.3896	2.8683
	13008	460.8	0.4876	0.0024	0.3327	0.3081	2.6562
	13009	590.3	0.3686	0.0017	0.2889	0.3235	2.7507
	13010	471.1	0.4270	0.0033	0.2895	0.3758	2.8053
		<b>Mean</b>	<b>512.8</b>	<b>0.4355</b>	<b>0.0025</b>	<b>0.3169</b>	<b>0.3617</b>
	<b>S.D.</b>	<b>47.0</b>	<b>0.0329</b>	<b>0.0006</b>	<b>0.0299</b>	<b>0.0286</b>	<b>0.1560</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	470.2	0.4680	0.0028	0.3667	0.4020	3.0514
	14002	460.3	0.4804	0.0026	0.3273	0.4547	2.8976
	14003	474.6	0.4788	0.0029	0.3211	0.4250	3.1834
	14004	529.4	0.3845	0.0026	0.3298	0.3531	2.9344
	14005	500.2	0.4134	0.0030	0.2999	0.3582	2.8989
	14006	556.7	0.4109	0.0022	0.2947	0.3787	2.9654
	14007	531.4	0.4116	0.0023	0.3087	0.3944	3.1150
	14008	532.7	0.4196	0.0025	0.4064	0.4123	3.0157
	14009	469.9	0.4636	0.0036	0.2889	0.3639	2.8741
	14010	488.0	0.4216	0.0024	0.3037	0.3878	2.5641
		<b>Mean</b>	<b>501.3</b>	<b>0.4352</b>	<b>0.0027</b>	<b>0.3247</b>	<b>0.3930</b>
	<b>S.D.</b>	<b>33.8</b>	<b>0.0341</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0365</b>	<b>0.0319</b>	<b>0.1689</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>



Appendix 9-1. (Continued)

Sex: Male		(g/100 g body weight)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	11001	0.1709	0.6110	0.0114	0.7423	0.1211
	11002	0.1992	0.7325	0.0126	0.7728	0.0897
	11003	0.1807	0.5573	0.0114	0.7435	0.0841
	11004	0.1455	0.5846	0.0096	0.7040	0.0667
	11005	0.1801	0.8803	0.0176	0.9890	0.1813
	11006	0.2079	0.6809	0.0116	0.8383	0.1657
	11007	0.1380	0.6061	0.0091	0.7241	0.1041
	11008	0.1598	0.5870	0.0088	0.7859	0.0953
	11009	0.1730	0.6879	0.0121	0.9121	0.1145
	11010	0.1671	0.6255	0.0118	0.7967	0.1245
		<b>Mean</b>	<b>0.1722</b>	<b>0.6553</b>	<b>0.0116</b>	<b>0.8009</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0216</b>	<b>0.0959</b>	<b>0.0025</b>	<b>0.0896</b>	<b>0.0358</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	12001	0.1911	0.7324	0.0124	0.9255	0.1350
	12002	0.1487	0.6766	0.0133	0.7976	0.1675
	12003	0.1717	0.6136	0.0109	0.8153	0.1198
	12004	0.1511	0.6957	0.0131	0.9999	0.1421
	12005	0.1639	0.6632	0.0113	0.7732	0.0817
	12006	0.1708	0.5039	0.0137	0.7856	0.0884
	12007	0.1656	0.6072	0.0106	0.7477	0.1158
	12008	0.2367	0.6013	0.0099	0.8746	0.1551
	12009	0.1776	0.5640	0.0107	0.6508	0.1301
	12010	0.1809	0.5377	0.0120	0.7909	0.1529
		<b>Mean</b>	<b>0.1758</b>	<b>0.6195</b>	<b>0.0118</b>	<b>0.8161</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0250</b>	<b>0.0726</b>	<b>0.0013</b>	<b>0.0971</b>	<b>0.0281</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	13001	0.1719	0.5954	0.0118	0.8053	0.1236
	13002	0.1621	0.6398	0.0101	0.8144	0.1170
	13003	0.1821	0.6923	0.0152	0.8802	0.1156
	13004	0.2158	0.6400	0.0116	0.8041	0.1398
	13005	0.1687	0.6825	0.0119	0.9585	0.1366
	13006	0.1926	0.6364	0.0133	0.8383	0.1404
	13007	0.1831	0.6534	0.0116	0.9409	0.1407
	13008	0.1543	0.6395	0.0117	0.8805	0.1134
	13009	0.1920	0.6319	0.0107	0.7526	0.0959
	13010	0.1902	0.6913	0.0112	0.7867	0.1326
		<b>Mean</b>	<b>0.1813</b>	<b>0.6503</b>	<b>0.0119</b>	<b>0.8462</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0178</b>	<b>0.0305</b>	<b>0.0014</b>	<b>0.0673</b>	<b>0.0150</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	14001	0.1766	0.7499	0.0115	0.9084	0.1082
	14002	0.1806	0.7649	0.0137	0.9635	0.1720
	14003	0.2089	0.8023	0.0138	0.8707	0.2138
	14004	0.2122	0.6655	0.0107	0.7913	0.0865
	14005	0.2556	0.7238	0.0111	0.8373	0.1699
	14006	0.1585	0.6803	0.0131	0.7923	0.1089
	14007	0.1763	0.6551	0.0140	0.8934	0.1374
	14008	0.2113	0.6633	0.0101	0.7890	0.0800
	14009	0.1568	0.5694	0.0107	0.8616	0.1146
	14010	0.1664	0.6444	0.0127	0.8379	0.1114
		<b>Mean</b>	<b>0.1903</b>	<b>0.6919</b>	<b>0.0121</b>	<b>0.8545</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0311</b>	<b>0.0685</b>	<b>0.0015</b>	<b>0.0571</b>	<b>0.0426</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 9-1. (Continued)

Sex: Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	21001	295.8	0.6910	0.0056	0.3284	0.4723	2.9477
	21002	269.5	0.7035	0.0061	0.4063	0.5857	2.2501
	21003	295.6	0.6399	0.0060	0.3674	0.4706	2.6453
	21004	327.8	0.6399	0.0044	0.3363	0.4233	2.9078
	21005	288.2	0.6929	0.0053	0.3660	0.5325	2.8627
	21006	274.9	0.7294	0.0060	0.3625	0.4753	2.5076
	21007	298.9	0.7173	0.0044	0.3592	0.4745	2.6429
	21008	347.9	0.6259	0.0056	0.3896	0.4764	2.4444
	21009	346.5	0.6160	0.0048	0.3048	0.4702	2.6195
	21010	328.6	0.6284	0.0057	0.3699	0.4998	3.4832
		<b>Mean</b>	<b>307.4</b>	<b>0.6684</b>	<b>0.0054</b>	<b>0.3590</b>	<b>0.4881</b>
	<b>S.D.</b>	<b>28.4</b>	<b>0.0424</b>	<b>0.0006</b>	<b>0.0295</b>	<b>0.0437</b>	<b>0.3419</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	289.8	0.7150	0.0059	0.3816	0.4714	2.6981
	22002	310.0	0.7271	0.0068	0.4047	0.4892	2.5010
	22003	285.6	0.6986	0.0056	0.4460	0.5005	2.5985
	22004	279.1	1.1600	0.0042	0.3458	0.5001	2.2591
	22005	306.0	0.6691	0.0060	0.3547	0.4886	2.8438
	22006	305.4	0.6797	0.0055	0.3771	0.4894	3.3470
	22007	318.0	0.7532	0.0057	0.3909	0.4689	2.6770
	22008	297.4	0.6818	0.0057	0.3721	0.4842	2.6673
	22009	307.1	0.6673	0.0053	0.3495	0.5031	3.8498
	22010	316.1	0.6047	0.0050	0.3141	0.4577	3.0148
		<b>Mean</b>	<b>301.5</b>	<b>0.7356</b>	<b>0.0056</b>	<b>0.3737</b>	<b>0.4853</b>
	<b>S.D.</b>	<b>13.1</b>	<b>0.1544</b>	<b>0.0007</b>	<b>0.0363</b>	<b>0.0150</b>	<b>0.4588</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	302.6	0.6091	0.0050	0.3429	0.4535	2.8797
	23002	254.5	0.7967	0.0054	0.4081	0.4732	3.1303
	23003	324.3	0.6631	0.0045	0.3342	0.4747	2.5269
	23004	287.5	0.6349	0.0050	0.3086	0.4570	2.4638
	23005	293.3	0.6562	0.0048	0.3767	0.4501	2.8852
	23006	312.8	0.6225	0.0051	0.3536	0.5098	2.9154
	23007	277.6	0.7032	0.0088	0.3739	0.4946	3.6171
	23008	320.5	0.6635	0.0062	0.3692	0.5048	2.9928
	23009	349.2	0.6282	0.0054	0.3351	0.4792	2.4665
	23010	322.7	0.6287	0.0063	0.3653	0.4500	3.1323
		<b>Mean</b>	<b>304.5</b>	<b>0.6606</b>	<b>0.0057</b>	<b>0.3567</b>	<b>0.4747</b>
	<b>S.D.</b>	<b>27.3</b>	<b>0.0550</b>	<b>0.0012</b>	<b>0.0280</b>	<b>0.0224</b>	<b>0.3572</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	330.4	0.6409	0.0052	0.3912	0.5337	3.7821
	24002	302.1	0.6820	0.0040	0.3386	0.4970	2.6502
	24003	314.3	0.6626	0.0060	0.3433	0.4925	2.8512
	24004	298.1	0.7105	0.0059	0.4164	0.5365	3.0191
	24005	288.0	0.7414	0.0051	0.3541	0.5191	3.0127
	24006	293.4	0.6870	0.0057	0.4001	0.4960	3.4167
	24007	381.9	0.5155	0.0045	0.3095	0.4093	2.5175
	24008	315.4	0.6298	0.0056	0.3475	0.4874	2.8523
	24009	326.3	0.6557	0.0058	0.3302	0.4718	3.4792
	24010	271.1	0.7876	0.0065	0.3807	0.5528	3.1782
		<b>Mean</b>	<b>312.1</b>	<b>0.6713</b>	<b>0.0054</b>	<b>0.3612</b>	<b>0.4996</b>
	<b>S.D.</b>	<b>30.4</b>	<b>0.0727</b>	<b>0.0007</b>	<b>0.0342</b>	<b>0.0406</b>	<b>0.3928</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Appendix 9-1. (Continued)

Sex: Female		(g/100 g body weight)				
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	21001	0.2134	0.6464	0.0265	0.0277	0.3850
	21002	0.1767	0.5705	0.0420	0.0542	0.1475
	21003	0.2372	0.6220	0.0286	0.0359	0.1614
	21004	0.2402	0.6034	0.0291	0.0281	0.1452
	21005	0.2914	0.7436	0.0301	0.0389	0.3806
	21006	0.1795	0.6746	0.0306	0.0478	0.1802
	21007	0.2260	0.7180	0.0261	0.0565	0.1593
	21008	0.2286	0.6270	0.0243	0.0441	0.1450
	21009	0.2096	0.5861	0.0255	0.0282	0.1487
	21010	0.2202	0.7376	0.0327	0.0410	0.3904
		<b>Mean</b>	<b>0.2223</b>	<b>0.6529</b>	<b>0.0296</b>	<b>0.0402</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0325</b>	<b>0.0628</b>	<b>0.0051</b>	<b>0.0106</b>	<b>0.1116</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G2 1,250	22001	0.2174	0.7028	0.0335	0.0359	0.3218
	22002	0.2277	0.6494	0.0263	0.0364	0.2062
	22003	0.2245	0.5970	0.0249	0.0607	0.1426
	22004	0.2057	0.6675	0.0296	0.0379	0.4924
	22005	0.2378	0.6774	0.0280	0.0283	0.1448
	22006	0.2821	0.7713	0.0334	0.0451	0.6209
	22007	0.2608	0.6959	0.0262	0.0419	0.1420
	22008	0.2211	0.6458	0.0279	0.0338	0.3366
	22009	0.2105	0.7051	0.0268	0.0402	0.4167
	22010	0.2197	0.1898	0.0233	0.0325	0.1898
		<b>Mean</b>	<b>0.2307</b>	<b>0.6302</b>	<b>0.0280</b>	<b>0.0393</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0237</b>	<b>0.1614</b>	<b>0.0034</b>	<b>0.0089</b>	<b>0.1667</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G3 2,500	23001	0.2080	0.6668	0.0276	0.0469	0.1763
	23002	0.2127	0.7261	0.0267	0.0363	0.5295
	23003	0.2205	0.6734	0.0223	0.0425	0.1408
	23004	0.3046	0.5891	0.0210	0.0562	0.1689
	23005	0.2144	0.6989	0.0285	0.0433	0.3204
	23006	0.2214	0.6949	0.0259	0.0561	0.1644
	23007	0.2120	0.6957	0.0294	0.0242	0.2369
	23008	0.1837	0.6349	0.0251	0.0426	0.1814
	23009	0.2237	0.7101	0.0299	0.0566	0.1740
	23010	0.2631	0.7090	0.0301	0.0457	0.3953
		<b>Mean</b>	<b>0.2264</b>	<b>0.6799</b>	<b>0.0267</b>	<b>0.0450</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0337</b>	<b>0.0411</b>	<b>0.0031</b>	<b>0.0101</b>	<b>0.1274</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
G4 5,000	24001	0.4927	1.3939	0.0295	0.0375	0.1879
	24002	0.2053	0.7264	0.1568	0.0286	0.2881
	24003	0.2045	0.7520	0.0301	0.0368	0.2438
	24004	0.2074	0.7173	0.0300	0.0297	0.3636
	24005	0.2311	0.7997	0.0335	0.0370	0.3682
	24006	0.2215	0.7764	0.0324	0.0440	0.1908
	24007	0.1864	0.6026	0.0246	0.1351	0.1323
	24008	0.1979	0.6584	0.0192	0.0490	0.1999
	24009	0.2430	0.6995	0.0281	0.0322	0.5480
	24010	0.1838	0.7815	0.0304	0.0339	0.3364
		<b>Mean</b>	<b>0.2374</b>	<b>0.7908</b>	<b>0.0415</b>	<b>0.0464</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0916</b>	<b>0.2202</b>	<b>0.0407</b>	<b>0.0318</b>	<b>0.1227</b>
	<b>N</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

3]. **Appendix 9-2. Individual relative organ weights (Recovery Group)**

Sex: Male (g/100 g body weight)

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	11011	532.9	0.4524	0.0019	0.3038	0.3945	2.6773
	11012	527.6	0.4316	0.0028	0.3463	0.3618	2.7995
	11013	528.2	0.4499	0.0028	0.2940	0.3552	2.7614
	11014	559.4	0.3859	0.0024	0.3041	0.3302	2.4242
	11015	643.2	0.3696	0.0023	0.3629	0.4898	4.4330
	<b>Mean</b>	<b>558.3</b>	<b>0.4179</b>	<b>0.0025</b>	<b>0.3222</b>	<b>0.3863</b>	<b>3.0191</b>
	<b>S.D.</b>	<b>49.3</b>	<b>0.0380</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0304</b>	<b>0.0622</b>	<b>0.8038</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	352.3	0.4230	0.0033	0.3030	0.3576	2.5954
	14012	285.5	0.3681	0.0023	0.3068	0.3288	2.8919
	14013	367.6	0.4838	0.0024	0.3194	0.4127	3.1729
	14014	304.7	0.4477	0.0025	0.2397	0.3086	2.4818
	14015	372.0	0.4404	0.0031	0.3098	0.3715	2.7500
	<b>Mean</b>	<b>336.4</b>	<b>0.4326</b>	<b>0.0027</b>	<b>0.2957</b>	<b>0.3559</b>	<b>2.7784</b>
	<b>S.D.</b>	<b>39.0</b>	<b>0.0423</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0319</b>	<b>0.0401</b>	<b>0.2696</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Spleen	Kidney	Adrenal	Testis	Prostate
G1 0	11011	0.1725	0.6757	0.0121	0.7889	0.1338
	11012	0.1693	0.5484	0.0131	0.8029	0.1409
	11013	0.1760	0.6309	0.0127	0.8859	0.1318
	11014	0.1517	0.6456	0.0109	0.7662	0.0909
	11015	0.1933	0.9315	0.0111	0.7772	0.0732
	<b>Mean</b>	<b>0.1726</b>	<b>0.6864</b>	<b>0.0120</b>	<b>0.8042</b>	<b>0.1141</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0149</b>	<b>0.1449</b>	<b>0.0010</b>	<b>0.0476</b>	<b>0.0301</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	14011	0.1664	0.6539	0.0108	0.6370	0.1156
	14012	0.1543	0.5870	0.0087	0.7179	0.0922
	14013	0.2153	0.6285	0.0107	0.7695	0.0510
	14014	0.1513	0.5323	0.0069	0.7884	0.1242
	14015	0.1884	0.6614	0.0121	0.9598	0.1468
	<b>Mean</b>	<b>0.1751</b>	<b>0.6126</b>	<b>0.0098</b>	<b>0.7745</b>	<b>0.1060</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0268</b>	<b>0.0535</b>	<b>0.0020</b>	<b>0.1190</b>	<b>0.0364</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Appendix 9-2. (Continued)

Sex: Female		(g/100 g body weight)					
Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	B.W. (g)	Brain	Pituitary	Heart	Lung	Liver
G1 0	21011	307.6	0.6657	0.0044	0.3350	0.5131	2.7401
	21012	312.0	0.6478	0.0063	0.3598	0.4716	2.6866
	21013	255.2	0.7924	0.0051	0.3571	0.8204	2.5169
	21014	306.5	0.6815	0.0056	0.3317	0.4578	2.5629
	21015	365.1	0.5892	0.0048	0.3291	0.4465	2.5690
	<b>Mean</b>	<b>309.3</b>	<b>0.6753</b>	<b>0.0053</b>	<b>0.3426</b>	<b>0.5419</b>	<b>2.6151</b>
	<b>S.D.</b>	<b>38.9</b>	<b>0.0742</b>	<b>0.0008</b>	<b>0.0147</b>	<b>0.1577</b>	<b>0.0938</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	352.3	0.5637	0.0047	0.3037	0.5165	2.5648
	24012	285.5	0.7259	0.0062	0.3667	0.5136	2.5067
	24013	367.6	0.5723	0.0042	0.3226	0.4363	2.7099
	24014	304.7	0.7264	0.0054	0.3491	0.4594	2.5755
	24015	372.0	0.5720	0.0055	0.3475	0.4505	3.1181
	<b>Mean</b>	<b>336.4</b>	<b>0.6320</b>	<b>0.0052</b>	<b>0.3379</b>	<b>0.4752</b>	<b>2.6950</b>
	<b>S.D.</b>	<b>39.0</b>	<b>0.0860</b>	<b>0.0008</b>	<b>0.0248</b>	<b>0.0373</b>	<b>0.2479</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

Group / Dose (mg/kg/day)	Animal ID	Spleen	Kidney	Adrenal	Ovary	Uterus
G1 0	21011	0.2038	0.7419	0.0336	0.0329	0.1826
	21012	0.1760	0.6007	0.0242	0.0218	0.2063
	21013	0.1968	0.7082	0.0247	0.0389	0.2125
	21014	0.2245	0.7848	0.0251	0.0307	0.2030
	21015	0.2011	0.6695	0.0222	0.0299	0.1979
	<b>Mean</b>	<b>0.2004</b>	<b>0.7010</b>	<b>0.0260</b>	<b>0.0308</b>	<b>0.2005</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0173</b>	<b>0.0703</b>	<b>0.0044</b>	<b>0.0062</b>	<b>0.0113</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	
G4 5,000	24011	0.2366	0.6005	0.0221	0.0395	0.1748
	24012	0.2338	0.7204	0.0256	0.0331	0.2366
	24013	0.2001	0.6426	0.0153	0.0337	0.1151
	24014	0.1753	0.7363	0.0278	0.0296	0.1650
	24015	0.2166	0.6689	0.0234	0.0485	0.1267
	<b>Mean</b>	<b>0.2125</b>	<b>0.6738</b>	<b>0.0228</b>	<b>0.0369</b>	<b>0.1636</b>
	<b>S.D.</b>	<b>0.0254</b>	<b>0.0558</b>	<b>0.0048</b>	<b>0.0074</b>	<b>0.0479</b>
<b>N</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	

**㉔. Appendix 10-1. Individual necropsy findings (Main Group)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Observation	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	11001	All	Unremarkable	S	92
	11002	All	Unremarkable	S	92
	11003	All	Unremarkable	S	92
	11004	All	Unremarkable	S	92
	11005	All	Unremarkable	S	92
	11006	All	Unremarkable	S	92
	11007	All	Unremarkable	S	92
	11008	All	Unremarkable	S	92
	11009	All	Unremarkable	S	92
	11010	All	Unremarkable	S	92
G2 1,250	12001	All	Unremarkable	S	92
	12002	All	Unremarkable	S	92
	12003	All	Unremarkable	S	92
	12004	All	Unremarkable	S	92
	12005	All	Unremarkable	S	92
	12006	All	Unremarkable	S	92
	12007	All	Unremarkable	S	92
	12008	All	Unremarkable	S	92
	12009	All	Unremarkable	S	92
	12010	All	Unremarkable	S	92
G3 2,500	13001	All	Unremarkable	S	92
	13002	All	Unremarkable	S	92
	13003	All	Unremarkable	S	92
	13004	All	Unremarkable	S	92
	13005	All	Unremarkable	S	92
	13006	All	Unremarkable	S	92
	13007	All	Unremarkable	S	92
	13008	All	Unremarkable	S	92
	13009	All	Unremarkable	S	92
	13010	All	Unremarkable	S	92
G4 5,000	14001	All	Unremarkable	S	92
	14002	All	Unremarkable	S	92
	14003	All	Unremarkable	S	92
	14004	All	Unremarkable	S	92
	14005	All	Unremarkable	S	92
	14006	All	Unremarkable	S	92
	14007	All	Unremarkable	S	92
	14008	All	Unremarkable	S	92
	14009	All	Unremarkable	S	92
	14010	All	Unremarkable	S	92

S: scheduled

Appendix 10-1. (Continued)

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Observation	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	21001	All	Unremarkable	S	92
	21002	All	Unremarkable	S	92
	21003	All	Unremarkable	S	92
	21004	All	Unremarkable	S	92
	21005	All	Unremarkable	S	92
	21006	All	Unremarkable	S	92
	21007	All	Unremarkable	S	92
	21008	All	Unremarkable	S	92
	21009	All	Unremarkable	S	92
	21010	All	Unremarkable	S	92
G2 1,250	22001	All	Unremarkable	S	92
	22002	All	Unremarkable	S	92
	22003	All	Unremarkable	S	92
	22004	All	Unremarkable	S	92
	22005	All	Unremarkable	S	92
	22006	All	Unremarkable	S	92
	22007	All	Unremarkable	S	92
	22008	All	Unremarkable	S	92
	22009	All	Unremarkable	S	92
	22010	All	Unremarkable	S	92
G3 2,500	23001	All	Unremarkable	S	92
	23002	All	Unremarkable	S	92
	23003	All	Unremarkable	S	92
	23004	All	Unremarkable	S	92
	23005	All	Unremarkable	S	92
	23006	All	Unremarkable	S	92
	23007	All	Unremarkable	S	92
	23008	All	Unremarkable	S	92
	23009	All	Unremarkable	S	92
	23010	All	Unremarkable	S	92
G4 5,000	24001	All	Unremarkable	S	92
	24002	All	Unremarkable	S	92
	24003	All	Unremarkable	S	92
	24004	All	Unremarkable	S	92
	24005	All	Unremarkable	S	92
	24006	All	Unremarkable	S	92
	24007	All	Unremarkable	S	92
	24008	All	Unremarkable	S	92
	24009	All	Unremarkable	S	92
	24010	All	Unremarkable	S	92

S: scheduled

**7]. Appendix 10-2. Individual necropsy findings (Recovery Group)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Observation	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	11011	All	Unremarkable	S	120
	11012	All	Unremarkable	S	120
	11013	All	Unremarkable	S	120
	11014	All	Unremarkable	S	120
	11015	All	Unremarkable	U	104
G4 5,000	14011	All	Unremarkable	S	120
	14012	All	Unremarkable	S	120
	14013	All	Unremarkable	S	120
	14014	All	Unremarkable	S	120
	14015	All	Unremarkable	S	120

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ	Observation	Type of sacrifice	Day of sacrifice
G1 0	21011	All	Unremarkable	S	120
	21012	All	Unremarkable	S	120
	21013	All	Unremarkable	S	120
	21014	All	Unremarkable	S	120
	21015	All	Unremarkable	S	120
G4 5,000	24011	All	Unremarkable	S	120
	24012	All	Unremarkable	S	120
	24013	All	Unremarkable	S	120
	24014	All	Unremarkable	S	120
	24015	All	Unremarkable	S	120

S: scheduled U : unscheduled





**Appendix 11-1. (Continued)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	GI / 0										
	Animal ID	11001	11002	11003	11004	11005	11006	11007	11008	11009	11010
Type of sacrifice	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
<b>Organ / Findings</b>											
Pancreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parathyroid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pituitary	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Cyst, pars distalis					<+>			<+>			
Prostate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, inflammatory, interstitial			±						±		
Rectum								-			
Salivary gland, sublingual	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivary gland, submandibular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seminal vesicle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Skin: inguinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spinal cord: thoracic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Deposit, pigment				±	±	±	±	±	±	±	±
-Extramedullary hematopoiesis					±		±				
Sternum including bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Squamous cyst											
Submandibular lymph node	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Hyperplasia, epithelial tubules and cords					<+>	<+>					
Thyroid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, inflammatory, focal					±						
-Ultimobranchial cyst				<+>		<+>					
Tongue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trachea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinary bladder	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S: Scheduled

-: Unremarkable

<+>: Presence in "presence or not" basis.

Grade- ±: minimal

**Appendix 11-1. (Continued)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	G4 / 5,000									
	14001	14002	14003	14004	14005	14006	14007	14008	14009	14010
Animal ID										
Type of sacrifice	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
<b>Organ / Findings</b>										
Adrenal					-	-				-
-Vacuolation, cortical	+	±	++	+			±	++		
Brain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cecum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Duodenum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epididymis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esophagus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eye including optic nerve	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Femur including bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Harderian gland	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ileum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jejunum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney		-	-		-	-		-	-	-
-Cell infiltration, inflammatory, cortical				±			±			
-Tubular basophilia, cortical								±		
-Tubular dilatation, cortical and medullary	±							±		
Liver	-	-		-			-	-	-	-
-Cell infiltration, inflammatory,focal			±		±	±				
Lung including bronchi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mammary gland: inguinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesenteric lymph node	-		-	-	-	-		-	-	-
-Appearance, pigmented macorphages		±					±			

S: Scheduled

-: Unremarkable

Grade- ±: minimal, +: mild, ++: moderate

**Appendix 11-1. (Continued)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	G4 / 5,000									
	14001	14002	14003	14004	14005	14006	14007	14008	14009	14010
Animal ID										
Type of sacrifice	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
<b>Organ / Findings</b>										
Pancreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parathyroid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pituitary	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prostate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, inflammatory, interstitial			±					±		+
Rectum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivary gland, sublingual	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivary gland, submandibular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seminal vesicle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Skin: inguinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spinal cord: thoracic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Deposit, pigment			±			±	±		±	±
-Extramedullary hematopoiesis						±				
Sternum including bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Submandibular lymph node	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Hyperplasia, epithelial tubules and cords					<+>	<+>				
Thyroid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tongue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trachea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinary bladder	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S: Scheduled

-: Unremarkable

<+>: Presence in "presence or not" basis.

Grade- ±: minimal, +: mild

**Appendix 11-1. (Continued)**

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	GI / 0									
	21001	21002	21003	21004	21005	21006	21007	21008	21009	21010
Animal ID										
Type of sacrifice	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
Organ / Findings										
Adrenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cecum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Duodenum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esophagus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eye including optic nerve	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Femur including bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Harderian gland	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ileum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jejunum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Mineralization, cortico-medullary junction										±
-Tubular dilatation, cortical and medullary								+	±	
Liver	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, mononuclear								±		
Lung including bronchi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mammary gland: inguinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesenteric lymph node	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Appearance, pigmented macrophages		±					±			

S: Scheduled

-: Unremarkable  
Grade- ±: minimal, +: mild

**Appendix 11-1. (Continued)**

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	GI / 0									
	21001	21002	21003	21004	21005	21006	21007	21008	21009	21010
Animal ID										
Type of sacrifice	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
Organ / Findings										
Ovary	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pancreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Vacuolation, acianr cells								±		
Parathyroid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pituitary	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rectum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivary gland, sublingual	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivary gland, submandibular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Skin: inguinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spinal cord: thoracic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen										
-Deposit, pigment	±	+	±	±	±			±	±	
-Extramedullary hematopoiesis				±						
Sternum including bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Submandibular lymph node	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thyroid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tongue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trachea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinary bladder	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uterus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vagina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S: Scheduled

-: Unremarkable  
Grade- ±: minimal, +: mild

**Appendix 11-1. (Continued)**

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	G4 / 5,000									
	24001	24002	24003	24004	24005	24006	24007	24008	24009	24010
Animal ID										
Type of sacrifice	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
Organ / Findings										
Adrenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cecum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Duodenum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esophagus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eye including optic nerve	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Femur including bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Harderian gland	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ileum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jejunum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney										
-Inflammation	+++									
-Mineralization, medullary							±			
Liver	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lung including bronchi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mammary gland: inguinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesenteric lymph node										
-Appearance, pigmented macorphages	±									±

S: Scheduled

-: Unremarkable

Grade- ±: minimal, +++: marked

**Appendix 11-1. (Continued)**

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	G4 / 5,000									
Animal ID	24001	24002	24003	24004	24005	24006	24007	24008	24009	24010
Type of sacrifice	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
Organ / Findings										
Ovary	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pancreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Vacuolation, acianr cells							+			
Parathyroid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pituitary	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rectum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivary gland, sublingual	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivary gland, submandibular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Skin: inguinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spinal cord: thoracic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spleen										
-Deposit, pigment		±	±	±	±	±	+	±	±	±
-Extramedullary hematopoiesis	+									
Sternum including bone marrow	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Submandibular lymph node	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Hyperplasia, epithelial tubules and cords				<+>						
Thyroid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Ultimobranchial cyst						<+>				
Tongue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trachea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinary bladder	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uterus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vagina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S: Scheduled

-: Unremarkable

<+>: Presence in "presence or not" basis.

Grade- ±: minimal, +: mild



**Appendix 11-2. Individual histopathological findings (Recovery Group)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	G1 / 0				
	11011	11012	11013	11014	11015
Animal ID					
Type of sacrifice	S	S	S	S	U
Day of sacrifice	120	120	120	120	103
<b>Organ / Findings</b>					
Adrenal	-	-			
-Vacuolation, cortical			+++	±	±
Brain	-	-	-	-	-
Cecum	-	-	-	-	-
Colon	-	-	-	-	-
Duodenum	-	-	-	-	-
Epididymis	-	-	-	-	-
Esophagus	-	-	-	-	-
Eye including optic nerve	-	-	-	-	-
Femur including bone marrow	-	-	-	-	-
Harderian gland	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-
Ileum	-	-	-	-	-
Jejunum	-	-	-	-	-
Kidney	-			-	-
-Cell infiltration, inflammatory, cortical			±		
-Retrograde nephropathy		±			
Liver	-	-	-	-	-
Lung including bronchi	-	-	-	-	-
Mammary gland: inguinal	-	-	-	-	-
Mesenteric lymph node	-		-		-
-Appearance, pigmented macorphages		±		±	

S: Scheduled, U: Unscheduled

-: Unremarkable

Grade- ±: minimal, , +++: marked

**Appendix 11-2. (Continued)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	G1 / 0				
	11011	11012	11013	11014	11015
Animal ID					
Type of sacrifice	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	120	120	120	120	120
Organ / Findings					
Pancreas	-	-	-	-	-
Parathyroid	-	-	-	-	-
Pituitary	-	-	-	-	-
Prostate	-	-	-		-
-Cell infiltration, inflammatory, interstitial				±	
Rectum	-	-	-	-	-
Salivary gland, sublingual	-	-	-	-	-
Salivary gland, submandibular	-	-	-	-	-
Seminal vesicle	-	-	-	-	-
Skin: inguinal	-	-	-	-	-
Spinal cord: thoracic	-	-	-	-	-
Spleen					-
-Deposit, pigment	±	+	±	+	
Sternum including bone marrow	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-
Submandibular lymph node	-	-	-	-	-
Testis	-	-	-	-	
Thymus	-	-	-	-	-
Thyroid	-	-	-	-	-
Tongue	-	-	-	-	-
Trachea	-	-	-	-	-
Urinary bladder	-	-	-	-	-

S: Scheduled

-: Unremarkable

Grade- ±: minimal, +: mild

**Appendix 11-2. (Continued)**

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg/day)	G4 / 5,000				
	14011	14012	14013	14014	14015
Animal ID	S	S	S	S	S
Type of sacrifice	120	120	120	120	120
Day of sacrifice					
Organ / Findings					
Adrenal					
-Vacuolation, cortical	+	±	+	-	-
Brain	-	-	-	-	-
Cecum	-	-	-	-	-
Colon	-	-	-	-	-
Duodenum	-	-	-	-	-
Epididymis	-	-	-	-	-
Esophagus	-	-	-	-	-
Eye including optic nerve	-	-	-	-	-
Femur including bone marrow	-	-	-	-	-
Harderian gland	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-
Ileum	-	-	-	-	-
Jejunum	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, inflammatory, cortical		±			
Liver	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, mononuclear		±			
Lung including bronchi	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, inflammatory, focal			±		
Mammary gland: inguinal	-	-	-	-	-
Mesenteric lymph node	-	-	-	-	-
-Appearance, pigmented macrophages		±	±		±

S: Scheduled

-: Unremarkable

Grade- ±: minimal, +: mild

**Appendix 11-2. (Continued)**

Sex: Male					
Group / Dose (mg/kg/day)	G4 / 5,000				
Animal ID	14011	14012	14013	14014	14015
Type of sacrifice	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	120	120	120	120	120
<b>Organ / Findings</b>					
Pancreas	-	-	-	-	-
Parathyroid	-	-	-	-	-
Pituitary	-	-	-	-	-
Prostate	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, inflammatory, interstitial		++		+	
Rectum	-	-	-	-	-
Salivary gland, sublingual	-	-	-	-	-
Salivary gland, submandibular	-	-	-	-	-
Seminal vesicle	-	-	-	-	-
Skin: inguinal	-	-	-	-	-
Spinal cord: thoracic	-	-	-	-	-
Spleen					
-Deposit, pigment	+	±	±	±	+
-Extramedullary hematopoiesis					±
Sternum including bone marrow	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-
Submandibular lymph node	-	-	-	-	-
Testis	-	-	-	-	-
Thymus	-	-	-	-	-
Thyroid		-		-	-
-Ultimobranchial cyst	<+>		<+>		
Tongue	-	-	-	-	-
Trachea	-	-	-	-	-
Urinary bladder	-	-	-	-	-

S: Scheduled

<+>: Presence in "presence or not" basis.

-: Unremarkable

Grade- ±: minimal, +: mild, ++: moderate

**Appendix 11-2. (Continued)**

Sex: Female					
Group / Dose (mg/kg/day)	G1 / 0				
Animal ID	21011	21012	21013	21014	21015
Type of sacrifice	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	120	120	120	120	120
<b>Organ / Findings</b>					
Adrenal	-	-	-	-	-
Brain	-	-	-	-	-
Cecum	-	-	-	-	-
Colon	-	-	-	-	-
Duodenum	-	-	-	-	-
Esophagus	-	-	-	-	-
Eye including optic nerve	-	-	-	-	-
Femur including bone marrow	-	-	-	-	-
Harderian gland	-	-	-	-	-
-Cell infiltration, inflammatory					±
Heart	-	-	-	-	-
Ileum	-	-	-	-	-
Jejunum	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-
-Mineralization, cortico-medullary junction					±
Liver	-	-	-	-	-
Lung including bronchi	-	-	-	-	-
Mammary gland: inguinal	-	-	-	-	-
Mesenteric lymph node	-	-	-	-	-
-Appearance, pigmented macrophages			±	±	±
<b>S: Scheduled</b>					
-: Unremarkable					
Grade-±: minimal					

**Appendix 11-2. (Continued)**

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	G1 / 0				
	21011	21012	21013	21014	21015
Animal ID					
Type of sacrifice	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	120	120	120	120	120
Organ / Findings					
Ovary	-	-	-	-	-
Pancreas	-	-	-	-	-
Parathyroid	-	-	-	-	-
Pituitary	-	-	-	-	-
Rectum	-	-	-	-	-
Salivary gland, sublingual	-	-	-	-	-
Salivary gland, submandibular	-	-	-	-	-
Skin: inguinal	-	-	-	-	-
Spinal cord: thoracic	-	-	-	-	-
Spleen					
-Deposit, pigment	±	+	±	+	+
Sternum including bone marrow	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-
Submandibular lymph node	-	-	-	-	-
Thymus	-		-		
-Hyperplasia, epithelial tubules and cords		<+>		<+>	<+>
Thyroid	-	-	-	-	-
Tongue	-	-	-	-	-
Trachea	-	-	-	-	-
Urinary bladder	-	-	-	-	-
Uterus	-	-	-	-	-
Vagina	-	-	-	-	-

S: Scheduled

<+>: Presence in "presence or not" basis.

-: Unremarkable

Grade- ±: minimal, +: mild

**Appendix 11-2. (Continued)**

Sex: Female					
Group / Dose (mg/kg/day)	G4 / 5,000				
Animal ID	24011	24012	24013	24014	24015
Type of sacrifice	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	120	120	120	120	120
Organ / Findings					
Adrenal	-	-	-	-	-
Brain	-	-	-	-	-
Cecum	-	-	-	-	-
Colon	-	-	-	-	-
Duodenum	-	-	-	-	-
Esophagus	-	-	-	-	-
Eye including optic nerve	-	-	-	-	-
Femur including bone marrow	-	-	-	-	-
Harderian gland	-	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-	-
Ileum	-	-	-	-	-
Jejunum	-	-	-	-	-
Kidney	-	-	-	-	-
-Tubular dilatation, cortical and medullary					+
Liver	-	-	-	-	-
Lung including bronchi	-	-	-	-	-
Mammary gland: inguinal	-	-	-	-	-
Mesenteric lymph node			-	-	-
-Appearance, pigmented macorphages	±	±			
S: Scheduled	-: Unremarkable				
	Grade- ±: minimal, +: mild				

**Appendix 11-2. (Continued)**

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg/day)	G4 / 5,000				
	24011	24012	24013	24014	24015
Animal ID					
Type of sacrifice	S	S	S	S	S
Day of sacrifice	120	120	120	120	120
Organ / Findings					
Ovary	-	-	-	-	-
Pancreas	-	-	-	-	-
Parathyroid	-	-	-	-	-
Pituitary	-	-	-	-	-
Rectum	-	-	-	-	-
Salivary gland, sublingual	-	-	-	-	-
Salivary gland, submandibular	-	-	-	-	-
Skin: inguinal	-	-	-	-	-
Spinal cord: thoracic	-	-	-	-	-
Spleen					
-Deposit, pigment	+	+	±	+	+
Sternum including bone marrow	-	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	-	-
Submandibular lymph node	-	-	-	-	-
Thymus					
-Hyperplasia, epithelial tubules and cords	<+>				<+>
Thyroid	-	-		-	-
-Ultimobranchial cyst			<+>		
Tongue	-	-	-	-	-
Trachea	-	-	-	-	-
Urinary bladder	-	-	-	-	-
Uterus	-	-	-	-	-
Vagina	-	-	-	-	-

S: Scheduled

<+>: Presence in "presence or not" basis.

-: Unremarkable

Grade- ±: minimal, +: mild



## 히. ATTACHMENTS

가. Attachment 1. Certificate of analysis

고연(高研)

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

물 질 명	: 초음파 처리 인삼열매 조성을		
제조번호	: UGBE(001)	제조일자	: 2015.7.22
제조량	: 1,002g	시험일자	: 2015.7.25

시험항목	기 준	결 과	분석자
1.성 상	황갈색~흑갈색의 건조분말	: 갈색	남윤민
2. pH	4.0~6.0	: 4.93	남윤민
3. TLC	TLC silica gel, chloroform:met -hanol:water=70:30:4로 전개 후 묶은 황산 발색시 Rf치 0.38, 0.42, 0.62에 spot확인.	: Rf치 0.38, 0.42, 0.62에 spot확인	남윤민
4.확인시험 (HPLC)	HPLCwaters1525binary HPLC system(water,미국)에서aceton itrile, water(HPLC급, sigma,미국)이며 acatonitrile 의 비율 17%에서 25%(25 분), 40%(50분), 60%(105분), 100%(110분)조건으로 분석 시 ginsenoside Rh1, Rg2, F4 검출.	:ginsenoside Rh1 RT 42.26, ginsenoside Rg2 RT 42.43, ginsenoside F4 RT 54.31에서 검출.	남윤민

분 석 자 :	남윤민	서명 필요.
		일 자
확 인 자 :	남윤민	서명 필요.
		일 자
승 인 자 :	고성권	서명 필요.
		일 자 

# 시 험 계 획 서

초음파처리 인삼열매 추출물의  
Sprague-Dawley 랫드를 이용한  
13 주 반복 경구투여 독성시험 및 4 주 회복시험



시험번호 M15105

(주)메드빌

153-760 서울특별시 금천구 디지털로 9길 33, 15층 (가산동, IT 미래타워)



Study No. M15105

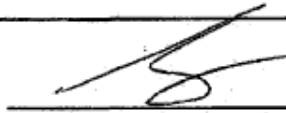
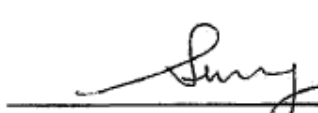
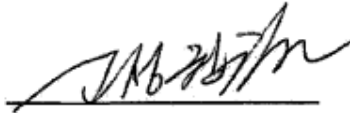
시험계획서의 작성 및 승인

시험제목	초음파처리 인삼열매 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 13 주 반복 경구투여 독성시험 및 4 주 회복시험
시험번호	M15105

시험의뢰자	기관명	고연
	주소	충청북도 제천시 세명로 65 세명창업보육센터 106호 390-711
	연락처	043-649-1433

시험기관	기관명	메드빌
	주소	서울특별시 금천구 디지털로 9길 33, 15층 (가산동, IT미래타워) 153-760
	연락처	02-2027-5775

다지점 시험장소	기관명	한국건설생활환경시험연구원
	주소	인천광역시 연수구 갯벌로 145번길 8 406-840
	연락처	032-859-4049

승인 및 확인	시험책임자	서동석 Ph.D., DKBT	 2015년 8월 25일
	운영책임자	성하정 Ph.D.	 2015년 8월 25일
	시험모니터	고성연 Ph.D.	 2015년 8월 25일



목 차

시험계획서의 작성 및 승인.....2

1. 시험실시의 개요.....4

    1.1 시험목적..... 4

    1.2 Good Laboratory Practice..... 4

    1.3 시험기준..... 4

    1.4 시험일정..... 4

    1.5 시험책임자..... 4

    1.6 다지점시험책임자..... 4

    1.7 시험계획서..... 5

    1.8 최종보고서..... 5

    1.9 기록 및 자료의 보관..... 5

    1.10 동물윤리..... 5

2. 재료 및 방법.....6

    2.1 시험물질..... 6

    2.2 부형제..... 6

    2.3 시험물질의 조제 및 분석..... 6

    2.4 시험계..... 6

    2.5 사육환경조건..... 7

    2.6 사료..... 7

    2.7 음수..... 8

    2.8 투여..... 8

    2.9 시험군의 구성 및 투여용량의 설정..... 8

    2.10 관찰 및 검사..... 9

    2.11 통계학적 분석..... 13



**1. 시험실시의 개요**

**1.1 시험목적**

암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 초음파처리 인삼열매 추출물을 13 주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 4 주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하기 위하여 실시한다.

**1.2 Good Laboratory Practice**

시험의 모든 과정은 다음의 Good Laboratory Practices 규정을 준수한다.

“비임상시험관리기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-67 호 (2014 년 2 월 12 일)

**1.3 시험기준**

본 시험은 다음의 시험기준에 근거하여 실시한다.

“의약품등의 독성시험기준”

식품의약품안전처 고시 제 2014-136 호 (2014 년 7 월 30 일)

**1.4 시험일정**

시험개시일	2015 년 08 월 25 일
동물입수일	2015 년 08 월 26 일
군분리일	2015 년 09 월 01 일 (수컷), 2015 년 09 월 02 일 (암컷)
실험개시일	2015 년 09 월 02 일
투여기간	2015 년 09 월 02 일 ~ 2015 년 12 월 01 일 (수컷) 2015 년 09 월 03 일 ~ 2015 년 12 월 02 일 (암컷)
부검일	2015 년 12 월 02 일 ~ 12 월 03 일 (주시형군) 2015 년 12 월 30 일 ~ 12 월 31 일 (회복군)
실험종료일	2016 년 03 월 31 일
최종보고서 (안) 제출일	2016 년 04 월 29 일

**1.5 시험책임자**

성명	서동석
소속	일반독성

**1.6 다지점시험책임자**

성명	류현열
소속	한국건설생활환경시험연구원



**1.7 시험계획서**

시험계획서는 사본을 시험의뢰자에게 제공하고, 원본은 ㈜메드빌에서 보관한다. 시험계획서 승인 후에 시험계획서의 내용을 변경할 경우, 시험책임자가 시험계획서 변경기록서를 작성하여 운영책임자 및 시험의뢰자의 승인을 받는다.

**1.8 최종보고서**

최종보고서는 표지, 목차, 재료 및 방법, 결과 및 고찰, 결론, 참고자료로 구성한다. 사본을 시험의뢰자에게 제공하고, 원본은 ㈜메드빌의 자료보관실에 보관한다.

**1.9 기록 및 자료의 보관**

시험기간 중에 발생된 모든 기록은 ㈜메드빌의 자료보관실에 보관한다. 보관기간은 최종보고서 승인 후 5년간 보관함을 원칙으로 하며, 그 후 보관에 관해서는 시험기관과 시험의뢰자가 협의하여 결정한다.

**1.10 동물윤리**

본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하며, 동물보호법 (법률 제 4379 호, 1995. 5. 31., 제정, 법률 제 13023 호, 2015. 1. 20., 일부개정)에 근거한 ㈜메드빌의 동물실험윤리위원회 (IACUC)에 의해 승인되었다 (승인번호: 15 - 42).





**2. 재료 및 방법**

**2.1 시험물질**

물질명	초음파처리 인삼열매 추출물
Lot No.	UGBE(001)
성상	갈색분말
성분	Ginsenosides
제조일	2015 년 07 월 22 일
유효기간	2017 년 07 월 21 일 (제조 후 2 년)
입수일	① 2015 년 08 월 07 일, ② 2015 년 08 월 20 일
입수량	① 1105.73 g(용기포함), ② 9274.25 g(용기포함)
보관조건	실온, 제습
취급시 주의사항	인습성
공급처	고연
잔여시험물질의 처리	시험 종료 후 반환

**2.2 부형제**

명칭	주사용수
제조사	대한약품공업, 한국

**2.3 시험물질의 조제 및 분석**

**2.3.1 시험물질의 조제**

시험의뢰자측에서 제공한 정보에 따라 주사용수를 부형제로 사용한다.  
 투여 당일 전자저울로 시험물질을 칭량하여 부형제를 일부 넣어 stirrer를 이용하여 용해시킨 후, 부형제를 가하여 규정농도로 조제한다.  
 조제는 투여당일 매일 조제한다.

**2.3.2 조제물의 분석**

조제물의 안정성, 균질성 및 농도분석은 실시하지 않는다.

**2.4 시험계**

2.4.1	종 및 계통	랫드, Sprague-Dawley (NTac:SD)
2.4.2	공급원	(주)나라바이오텍
2.4.3	시험계 선정 이유	SD 랫드는 일반 독성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 기초자료가 풍부하여 선택하였다.



## Attachment 2. (Continud)



Study No. M15105

- 2.4.4 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위  
수컷, 55 마리, 5 주령, 160.0 - 190.0 g/ 암컷, 55 마리, 5 주령, 140.0 - 170.0 g
- 2.4.5 투여개시시 주령 및 동물수  
6 주령, 암수 각 50 마리
- 2.4.6 검역 및 순화  
반입시 동물의 일반증상 관찰 및 체중측정을 실시한다. 5 일 이상의 순화기간 중 매일 1 회 일반증상을 관찰한다.  
순화기간 종료일에 체중을 측정하고, 일반증상 및 체중변화를 확인하여 시험에 사용한다.
- 2.4.7 개체 및 사육상자 식별  
순화기간 중에는 입수 시에 동물의 꼬리에 청색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 순화기간 개체식별카드를 부착한다.  
관찰기간 중에는 군분리 시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고, 사육상자에는 개체식별카드를 부착한다.
- 2.4.8 군분리  
군분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동물 중에서 군분리일에 실시한다. 군분리는 평균체중에 가까운 암수 각 50 마리를 선발한 후 각 군 평균체중이 균등하도록 암수 각 4 군, 대조군 및 고용량군은 암수 각 15 마리, 저 및 중용량군은 암수 각 10 마리로 군분리한다.
- 2.4.9 잔여동물의 처리  
군분리 후 잔여동물은 시험계로부터 제외시켜 SOP에 따라 처리한다.

## 2.5 사육환경조건

2.5.1	동물실 번호	동물실III
2.5.2	사육상자 종류 및 크기	Polycarbonate cage, 420W × 270D × 180H (mm)
2.5.3	사육상자당 수용동물 수	검역·순화기간 5 마리, 관찰기간 1 - 2 마리
2.5.4	깔짚	Pulp chip
2.5.5	온도	22.0 ± 3.0°C
2.5.6	상대습도	50.0 ± 20.0%
2.5.7	환기횟수	10 - 20 회/시간
2.5.8	명암주기 (조명시간)	12 시간/일 (08:00 - 20:00)
2.5.9	조도	150 - 300 Lux

## 2.6 사료

2.6.1	종류	실험동물용 고형사료
2.6.2	제조사	PMI Nutrition International Inc., U.S.A.





2.10 관찰 및 검사

관찰 및 검사일은 투여개시일을 1 일로 하고, 투여개시일부터 7 일간을 투여 1 주로 하며, 회복개시부터 7 일간을 회복 1 주로 한다.

2.10.1 일반증상 관찰

시험기간 동안 일반증상은 1 일 1 회, 빈사 또는 사망동물의 유무는 1 일 2 회 관찰한다.

2.10.2 빈사 및 사망동물의 처리

시험기간 동안 사망동물은 발견시 신속히 부검하고, 부검을 즉시 실시하지 못하는 경우, 냉장 보관 후 실시한다. 빈사동물은 isoflurane 으로 마취하여 채혈한 후 부검한다. 혈액 및 혈액생화학적 검사는 가능한 범위내에서 생존동물과 동일하게 실시하고, 장기중량의 측정 및 조직병리학적 검사를 실시한다 (측정결과는 평가에서 제외한다).

2.10.3 체중측정

모든 동물에 대하여 투여된, 투여 개시 후 주 1 회, 부검전 및 부검일에 측정한다 (부검일의 측정은 평가에서 제외한다).

2.10.4 사료 공급량 및 잔량측정

실험개시 후 주 1 회 사육상자 별로 일일 공급량 및 잔량을 측정하여 평균 섭취량을 산출한다.

2.10.5 안과학적 검사

각 군 5 마리의 동물에 대하여 투여 13 주 및 회복 4 주에 실시한다. 검사는 산동제 점안전 육안으로 동공대광반사 및 전안부를 관찰하고, 점안후 검안경 (binocular indirect ophthalmoscope, HEINE EN 50, HEINE, Germany)으로 전안부, 중간투광체 및 안저에 대한 검사를 실시한다. 안저에서 시험물질에 의한 영향으로 판단되는 이상이 발견될 경우, 안저를 촬영하고 조직병리학적 검사를 실시한다.

2.10.6 뇨검사

각 군 5 마리의 동물에 대하여 투여 13 주 및 회복 4 주에 신선뇨 (배설 후 약 3 시간 이내의 뇨) 및 축뇨 (배설 후 약 24 시간 이내의 뇨) 를 채취하여 다음 항목을 검사한다.

종 류	항 목	단 위	측 정 방 법
신선뇨	당 (glucose)	mg/dL	요자동분석기 (CTK Status, SIEMENS, U.S.A.) 검사
	빌리루빈 (bilirubin)	mg/dL	
	케톤체 (ketone body)	mg/dL	
	비중 (specific gravity)	-	
	잠혈 (occult blood),	Ery/ $\mu$ L	
	단백 (protein)	mg/dL	
	pH	-	
축뇨	침사	-	원심분리 후 현미경 검사
	뇨량	mL	메스실린더 측정
	색조 및 투명도	-	육안관찰



2.10.7 혈액학적 검사

부검전 16 시간 이상 절식시킨 동물을 isoflurane 으로 마취하여 복대동맥으로부터 채혈한 혈액 중 약 1 mL 를 항응고제인 EDTA-2K 가 들어있는 vacutainer tube (BD, U.S.A.)에 주입한 후 한국건설생활환경시험연구원에 의뢰하여 자동혈액분석기 (ADVIA 2120, SIEMENS, U.S.A.)로 다음 항목을 측정한다.

항 목	단 위	측 정 방 법
적혈구수 (erythrocyte count, RBC)	$\times 10^6$ cells/ $\mu$ L	Flow cytometry
혈색소량 (hemoglobin, HGB)	g/dL	Flow cytometry, Cyanmethemoglobin
헤마토크리트치 (hematocrit, HCT)	%	Calculated
평균적혈구용적 (mean corpuscular volume, MCV)	fL	Flow cytometry
평균적혈구헤모글로빈량 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)	pg	Calculated
평균적혈구헤모글로빈농도 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)	g/dL	Calculated
혈소판수 (platelet, PLT)	$\times 10^3$ cells/ $\mu$ L	Flow cytometry
백혈구수 (leucocyte count, WBC)	$\times 10^3$ cells/ $\mu$ L	
백혈구백분율 (WBC differential counting)		
- 중성호성백혈구 (neutrophil, NEU)		Flow cytometry, Peroxidase stain
- 림프구 (lymphocyte, LYM)	%	
- 단핵구 (monocyte, MONO)		
- 산호성 백혈구 (eosinophil, EOS)		
- 염기호성 백혈구 (basophil, BASO)		
망상적혈구 (reticulocytes, Reti)	%	Flow cytometry, RNA stain

혈액응고검사는 채혈한 혈액 중 약 1 mL 을 3.2% sodium citrate 가 담겨있는 vacutainer tube (BD, UK)에 주입하여 혈액응고분석기 (ACL ELITE PRO, Instrumentation Laboratory, U.S.A.)를 이용하여 다음 항목을 측정한다.

항 목	단 위	측 정 방 법
프로트롬빈시간 (prothrombin time, PT)	Sec	Nephelometry
부분활성트롬보플라스틴시간 (activated partial thromboplastin time, APTT)	Sec	Nephelometry

2.10.8 혈액생화학적 검사

채혈한 혈액 중 약 3 mL 을 clot activator 가 들어있는 vacutainer tube (BD, UK)에 주입하고 15 - 20 분간 상온에 응고시킨 후, 10 분간 원심분리하여 혈청을 분리한다. 분리된 혈청으로 혈액생화학분석기 (Hitachi 7020, HITACHI, Japan)와 전해질분석기 (PDC-800, FUJIFILM, Japan)를 이용하여 다음 항목을 측정한다.

Attachment 2. (Continud)



Study No. M15105

항 목	단 위	측 정 방 법
알라닌 아미노기전이효소 (alanine aminotransferase, ALT)	IU/L	IFCC 법
아스파테이트 아미노기전이효소 (aspartate aminotransferase, AST)	IU/L	IFCC 법
알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase, ALP)	IU/L	P-NPP 법
혈액요소질소 (blood urea nitrogen, BUN)	mg/dL	Urease-UV 법
크레아티닌 (creatinine, Crea)	mg/dL	Jaffe 법
혈당 (glucose, Glu)	mg/dL	UV 법
총콜레스테롤 (total cholesterol, T-Chol)	mg/dL	Enzyme 법
총단백 (total protein, TP)	g/dL	Biuret 법
알부민 (albumin, Alb)	g/dL	BCG 법
총빌리루빈 (total bilirubin, T-Bili)	mg/dL	Evelyn-Malloy 법
트리글리세라이드 (triglycerides, TG)	mg/dL	Enzyme 법
인 (phosphorus, P)	mg/dL	Enzyme 법
칼슘 (calcium, Ca)	mg/dL	O-CPC 법
A/G ratio (albumin/globulin ratio)	ratio	[ALB÷(TP-ALB)]산출
염소* (chloride, Cl)	mmol/L	전극법
나트륨* (sodium, Na)	mmol/L	전극법
칼륨* (potassium, K)	mmol/L	전극법

\*: 전해질분석기로 측정

2.10.9 부검

시험물질 투여종료 후 주시험군은 투여 92 일, 회복군은 투여 120 일에 isoflurane 마취 하에 채혈 및 방혈하여 안락사시키고 부검한다.

2.10.10 장기중량 측정

부검시 다음 장기에 대해 중량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기 중량비를 산출한다. 좌·우가 있는 장기(\*)는 좌·우 무게를 합하여 측정한다.

- 뇌 (brain)
- 심장 (heart)
- 간 (liver)
- 신장# (kidney)
- 고환# (testis)
- 난소# (ovary)
- 뇌하수체 (pituitary)
- 폐 (lung)
- 비장 (spleen)
- 부신# (adrenal)
- 전립선 (prostate)
- 자궁 (uterus)



2.10.11 조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 다음 장기·조직을 적출하여 10% 중성완충포르말린 용액 (neutral buffered formalin)에 고정하고, 고환 및 안구는 Davidson 고정액에 고정한다.

- 뇌 (brain)
- 뇌하수체 (pituitary)
- 갑상선 및 부갑상선<sup>a)</sup> (thyroid and parathyroid)
- 흉선 (thymus)
- 폐 (기관지 포함) (lung including bronchi)
- 기관 (trachea)
- 심장 (heart)
- 간 (liver)
- 비장 (spleen)
- 신장 (kidney)
- 부신 (adrenal)
- 타액선 (악하선, 설하선, 이하선)  
(salivary gland: submandibular, sublingual and parotid gland)
- 식도 (esophagus)
- 위 (stomach)
- 십이지장 (duodenum)
- 공장 (jejunum)
- 회장 (ileum)
- 맹장 (cecum)
- 결장 (colon)
- 직장 (rectum)
- 췌장 (pancreas)
- 고환 (testis)
- 부고환 (epididymis)
- 전립선 (prostate)
- 정낭 (seminal vesicle)
- 난소 (ovary)
- 자궁 (uterus)
- 질 (vagina)
- 방광 (urinary bladder)
- 악하 림프절 (submandibular lymph node)
- 장간막 림프절 (mesenteric lymph node)
- 안구 (시신경<sup>a)</sup> 포함) 및 하더리안선 (eye including optic nerve and harderian gland)
- 유선 (서혜부) (mammary gland: inguinal)
- 피부 (서혜부) (skin: inguinal)
- 흉골 (골수 포함) (sternum including bone marrow)
- 대퇴골 (골수 포함) (femur including bone marrow)
- 혀 (tongue)
- 척수 (흉부) (spinal cord: thoracic)

· 그 외 육안소견이 관찰된 장기·조직

a) 해당 장기·조직이 슬라이드에 존재할 때만 조직병리학적 검사를 실시한다.

조직병리학적 검사를 실시하는 장기·조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하여 박절한 후, Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시한다. 골조직은 Calci-Clear-Rapid<sup>TM</sup> 액을 사용하여 탈회한 후 동일한 조직처리과정을 거친다. 잔여 장기·조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존한다.

조직병리학적 검사는 아래의 장기에 대하여 실시한다.

- 대조군과 고용량군의 모든 개체
- 저용량군 및 중용량군의 빈사 또는 사망개체와 육안소견이 관찰된 장기
- 고용량군에서 시험물질의 영향으로 판단되는 변화가 관찰된 경우에는 저용량군 및 중용량군의 해당 장기



**2.11 통계학적 분석**

체중, 사료섭취량, 뇨량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 장기중량의 자료에 대한 통계학적 분석은 SPSS program (SPSS 16.0)을 사용하여 검정한다.

자료에 대한 등분산는 Levene 검정을 통하여 확인한다 (유의수준: 양측 5%).

주시험군은 등분산인 경우, one-way analysis of variance (ANOVA)을 실시하여 유의성이 인정되면 사후검정으로 Scheffe 검정을 실시하고, 등분산성이 기각되면 Dunnett's T3 검정을 실시하여 대조군과의 유의성을 확인한다 (유의수준: 양측 5%).

회복군은 등분산인 경우 Student T 검정을 실시하고, 등분산이 기각되면 Mann-Whithney U 검정을 실하여 대조군과의 유의성을 확인한다 (유의수준: 양측 5%).



**다. Attachment 3. Protocol amendment**

Not Applicable



#### Attachment 4. Protocol deviations

입수 시 1 마리의 개체가 체중범위를 이탈함

	개체번호	체 중	입수 시 체중범위
이탈내용	2009	139.8 g	140.0 - 170.0 g

평가: 일반증상 관찰결과, 다른 특이한 이상증상이 관찰되지 않았다.

따라서 시험에 미치는 영향은 없는 것으로 판단된다.

[초음파 처리 인삼열매 조성물 시제품 제작(상품명 : 인프로)]

### 가. 시제품 제조

#### 1. 인삼 열매 엑스의 제조

인삼 열매 건조물 각각 500g에 Ethyl alcohol 2,500ml를 가하여 4회 환류 추출후 여과하여 감압농축하여 인삼 열매 엑스를 얻었다.

#### 2. 초음파 인삼열매 엑스 제조

인삼 열매 엑스 1.5kg에 증류수 20ℓ를 가하여 발진기 600W, 진동부 600W, 100℃ 규격의 소니케이터에 넣고, 초음파 처리를 10시간 시행하여 감압하에 농축시켜서 갈색의 추출물을 얻는다.

#### 3. 건조엑스제조공정

건조공정	
사용기기	진공건조기
진공도	400torr 이하
진공챔버온도	75℃ 이하
건조시간	약 20시간
분쇄공정	
사용기기	핀밀
분쇄망	80mesh 체를 통과시킴

#### 4. 시제품의 조성

	%	700 (mg)
인삼열매건조엑스	48	336
미결정셀룰로스	23	161
옥수수전분	17	119
경질무수규산	5	35
전분글리콜산나트륨	3	21
스테아리린산마그네슘	1.4	9.8
HPMC	2	14
글리세린지방산에스테르	0.237	1.659
이산화티타늄	0.218	1.526
식용적색제40호	0.145	1.015
	100	700



시제품 정제 사진





시제품 패키지 사진

## 5. 시제품의 경제성 분석

### 1) 시제품의 단가

인삼열매분쇄물 20 Kg 원가 50,000원

인삼열매 엑스 건조, 20,000 정 타정시 인삼열매분쇄물(20 Kg) 20통(1,000,000원) 소요

포장 비용 (3,000,000원) 총 4,000,000원 소요

인삼열매 엑스 333 mg 1정 당 200원 소요

### 2) 1일 복용량 (2 g) 단가

1일 복용량 2 g으로 산정하였으므로 1일 6정(1정 333 mg) 복용 단가는 1,200원으로 산정

### 3) 100정 포장 단위 판매 전략

100정 포장 인삼열매 정제 건강기능식품 단가 20,000원으로 판매가격 70,000원으로 판매할 계획임.

[사업화 계획]

		코드번호		
		B-13-01		
구분		( 2019 년 ) 개발 종료 후 1년	( 2020 년 ) 개발 종료 후 2년	( 2021 년 ) 개발 종료 후 3년
국 내	시장점유율(%)	5%	20%	30%
	판매량(단위:1개월분/1box)	B to B/ 50,000 box B to C/ 10,000 box	B to B/ 50,000 box B to C/ 50,000 box	B to B/ 100,000 box B to C/ 100,000 box
	판매단가(원)	B to B/ 20,000원(1box) B to C/ 38,000원(1box)	B to B/ 20,000원(1box) B to C/ 38,000원(1box)	B to B/ 20,000원(1box) B to C/ 38,000원(1box)
	국내매출액(백만원)	1,380	2,900	5,800
해 외	시장점유율(%)		0.01%	0.02%
	판매량(단위:1개월분/1box)		B to B/ 100,000 box B to C/ 50,000 box	B to B/ 200,000 box B to C/ 100,000 box
	판매단가(\$)		B to B/ 20(\$/1box) B to C/ 40(\$/1box)	B to B/ 20(\$/1box) B to C/ 40(\$/1box)
	해외매출액(백만\$)		4백만\$	8백만\$
당사 생산능력1)		원료3톤(ton)/3만개이상	원료 20톤(ton)/25만개	원료20톤(ton)/25만개 생 산/ 원료20톤은 시설확장 또는 외주고려

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

##### 4-1. 목표달성도

구분	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	목표의 달성도
1차년도 (2013)	prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼열매 조성물 개발	Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> 등의 홍삼 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 초음파 처리 인삼열매 조성물 개발 여부	100%
	독성시험(단회 및 유전독성시험)	단회독성, 4주 DRF, 유전독성 (염색체이상시험, 복귀돌연변이 시험, 소핵시험) 시험 여부	100%
	간염 및 지방간, 소 화기능 향상에 효과 가 우수한 인삼열매 조성물을 세포수준 및 정상동물모델에 서 스크리닝	갈락토사민 유도 간독성 동물모델에서 초음파 처리 인삼 열매 조성물의 간 보호시험 여부	100%
2차년도 (2014)	기능성 성분 대량 분리 동정	Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> 분리 화학구조 동정 여부	100%
	농약 검사	농약검사 여부	100%
	CRO 업무	Protocol과 CRF의 작성 및 IRB 통과 여부	100%
	인삼열매 조성물 및 지표성분을 대상으 로 간염 및 지방간, 소화기능 지연 동물 모델에서 약효 및 기전 규명	알코올 유도 간독성 동물모델에서 초음파 처리 인삼 열매 조성물의 간 보호시험 여부	100%
	인체적용시험 준비	시험자 모집 여부	100%
3차년도 (2015)	제조공정 표준화	지표성분 (Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> ) 표준화 (벨리테이션) 여부	100%
	독성시험(반복독성시 험)	13주 반복독성시험 및 4주 회복시험 여부	100%
	시제품 제작	시제품 제작 여부	100%
	인체적용시험	인체적용시험 여부	95%

##### 4-2. 관련분야 기여도

- 인삼열매의 간기능 개선, 항산화 작용 등의 기능성을 실험 및 동물모델을 이용한  
효능을 확인함으로써 국내 인삼 부산물을 기반으로 한 기능성 식품 개발의 가능성을  
제시하였으며 농가 소득 증대를 기대할 수 있는 계기를 마련하였음.



- 국내산 농산물의 생리활성 성분을 규명하고 특정 성분을 표준화하여 제조하는 원료 제조방법 연구를 수행하여 원료 표준화를 확립하였음. 이렇게 제조된 원료의 품질 관리를 위한 기준규격을 설정하여 기능성 소재의 품질 관리에 중요한 지표로서 활용이 가능하도록 하였음.
- 원물소재의 특정 성분 함량을 강화하기 위하여 초음파 추출조건을 최적화하고 생산 과정을 확립함으로써 국내 인삼 부산물의 표준화된 원료 그 자체로서의 상품성을 높였으며 화장품 소재로만 한정적으로 사용되고 있는 인삼열매를 이용하여 지표성분 함량을 표준화하고 고부가가치 기능성 소재로 개발함으로써 인삼열매의 산업적 가치를 증대시킴.
- 국내산 천연물로부터 도출된 인삼열매의 간기능 개선 및 항산화 등의 기능성을 입증함으로써 기능식품 마켓쉐어의 대부분을 차지하는 간기능에 대한 해결책으로 활용될 경우 관련질환의 발병률 감소와 국민건강 증진에 기여할 것임.
- 국내산 원료를 이용한 간기능 및 항산화 개선능을 국제 저널에 게재하고 발표함으로써 국내산 기능성 소재의 가능성을 제시하고 기능성 원료개발을 통해 국내 식품관련 기술력을 인정받을 수 있는 계기를 마련하였음.

## 5. 연구결과의 활용계획

구분	기술실시 (이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용계획	1	1	-	3	1	2

- 과제 종료 후 인체적용시험 결과를 통해 참여기업인 고연(高研)에 기술실시를 실시하고, 개별인정형 건강기능식품으로 개발할 예정임. 인체적용 시험 결과 추가 연구가 필요하다고 판단되면 보완하여 추가 시험을 수행하여 제품화 할 예정임.
- 과제가 종료 후에 개별인정형 간기능 개선 건강기능식품 허가를 취득하여 인프로(Inpro)와 람노진생(Rhamnoginseng)이라고 하는 상품명으로 제품을 출시하며, 약국 유통을 담당하는 (주)데일리몰 에 론칭하여 유통판매하기로 계약을 실시하였음.
- 본 연구를 진행하면서 얻어진 기술 및 정보는 관련 학회 및 산업체 연구원에게 세미나 등을 통해 홍보 및 교육을 진행할 예정이며, 연구기간 중에도 한국생약학회, 한국약용작물학회, 한국응용약물학회에서 인삼열매가 기능성 신소재로서의 유용성에 대하여 교육지도하였음.

○ 2015년 한국생약학회 심포지엄에서 인삼열매의 기능성 신소재에 대한 유용성에 대한 교육지도가 언론(약사공론)에 보도되어 약사들에게 홍보하였음.



## 고성권 교수 "인삼의 열매 등 지상부도 연구하자"

### 생약학회 춘계심포지엄서 천연물 신약개발 방향성 제시

2015-05-01 05:48:00    김현주 기자    [프린트](#)    [메일](#)    [twitter](#)    [facebook](#)



세명대학교 한방식품영양학부 고성권 교수

효능이 있다"며 "식초, 열, 초음파, 전자파, 초단파, 발효 기술을 통해 Rg3와 같은 성분을 강화할 필요가 있다. 식초처리 백삼은 항당뇨 제제인 메트포르민과 같은 유효성을 보여주고 있다"고 말했다.

인삼을 이용한 천연물 신약개발에서 효과가 좋은 성분은 강화시키고 인삼의 지하부뿐 아니라 지상부까지 연구하자는 의견이 제기됐다.

세명대학교 한방식품영양학부 고성권 교수는 30일 서울대학교 호암교수회관에서 열린 2015 한국생약학회 춘계심포지엄에서 '기능성 강화 인삼 신소재 개발'에 대해 발표했다.

고 교수는 "홍삼 특유성분으로 알려진 Rg3는 암세포 전이 억제작용 등 다양한

- 지금 바로 뉴스
- \* [정책보험] 여야 "식약처, 이업우피소 사전 대...
  - \* [약국경영] 약국 인테리어 무단 드용...기분 나...
  - \* [정책보험] 품질검사 미 실시 약 출고 등 법 위...
  - \* [제약유통] '냉정하게 보자'...제약바이오주 확...
  - \* [약국경영] 이지향 약사 "건식, 나무만 보지 ...



- 많이 본 기사
- \* [약국경영] 난대 대명사 A약국, 영육의 45년 마...
  - \* [기획분석] 임금 높은 근무약사 일방적 해고 !...
  - \* [약국경영] 다양한 민원에 약국 불시점검 빈번...
  - \* [제약유통] 동원, 일회용 음주속정기 국내 론칭...
  - \* [정책보험] 끊이지 않는 발기부전치료제에 대...
  - \* [제약유통] 유통협-한미간 싸움은 온라인판 돌...
  - \* [제약유통] 200억원대 어린이 주식부자..한미약...
  - \* [정책보험] 분업예외약국 전문약 판매내역서 ...
  - \* [제약유통] '냉정하게 보자'...제약바이오주 확...
  - \* [기획분석] 약국 '가정의 달' 깜짝 이벤트 '눈길'

약공TV 주간 베스트

이 고 교수는 인삼열매, 꽃봉우리 등 인삼의 부산물인 지상부에 대한 연구도 집중해야 한다고 했다.

“인삼 지상부는 사실 폐기물이에요. 여태까지 사용하지 않았던 소재인데 최근 화장품에 사용되기도, 식품파우치와 같은 일반식품으로 일부 출시되고 있어요.”

인삼 지상부는 최근 아모레퍼시픽이 화장품에 인삼열매 엑기스를 주름개선용으로 활용하면서 주목 받기 시작했다.

고 교수는 “인삼의 부산물을 사용하는 것은 매우 의미 있다”며 “우리나라는 인삼 중주국으로 인삼을 거의 전 국토에서 얻을 수 있다. 인삼 부산물 개발은 농가의 경제적 이익은 물론 친환경적”이라고 말했다.

그간 인삼 지하부를 사용하고 남은 지상부의 열매나 잎은 하천에 흘러 버렸고 인삼 주성분인 사포닌이 어독작용을 해 물고기에게 치명적인 영향을 끼쳤다.



인삼 지상부 중 하나인 인삼열매

고 교수의 말에 따르면 인삼 부산물에 기능성 성분이 특히 많이 들어있다고 한다.

그는 “부산물을 활용하는 건 인삼연구자로서 당연한 일”이며 “현재 농림부로부터 과제를 받아 연구를 진행 중”이라고 전했다.

고 교수는 인삼 지상부를 통해 고령화 사회에 맞는 알츠하이머나 파킨슨질환, 나아가 항암보조제에 유효한 성분들을 개발하고자 한다.

듣고 싶은 약 이야기가 있으시면  
제보해주세요(kpanews1@naver.com)

청년기자 뉴스

- "경희대학교 약학과 야구부를 소개합니다"
- 술은 당신의 필수 천연물질을 고갈시키는 '드..'
- 미래의 멋진 한국 약사를 위한 한걸음, 5주간..
- KNAPS, APPS 유치의 쾌거를 이루어내다

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

인삼의 사포닌 성분은 간세포의 단백질 합성과 간세포의 재생을 촉진하는 작용이 있다. 사포닌 성분은 실험적으로 여러 가지 간 독성물질로 야기되는 간세포의 괴사등 조직학적 병변을 경감시키고 간의 독성대사에 관여하는 효소(Epoxide hydratase, glutathione transferase, epoxide hydroxylase)를 활성화 시켜 간장장애를 개선, 예방하는 효과가 있다. 한양대 의대 구국희 교수는 바이러스 B형 간염환자를 대상으로 한 임상실험에서 인삼투여가 식욕, 소화상태, 두통, 오심, 구토등의 자각증상의 개선효과 및 급성간염의 조기회복 촉진과 만성화 예방에 도움을 준다고 보고하였다. 일본 Nissei 병원 Yamamoto 박사는 만성간염(바이러스 C형)환자에 대해서도 인삼투여가 간기능의 생화학적 지표개선에 유용성이 있고, 한방제제인 소시호탕과 병용시 보다 개선효과가 촉진되었다고 보고하였다. 또한, 인삼사포닌 성분은 알콜대사에 관여하는 알콜 분해효소(alcohol dehydrogenase), 아세트알데히드 분해효소(acetaldehyde dehydrogenase)의 활성을 증가시켜 알콜섭취로 야기되는 유해한 작용을 경감시켜 알콜독성에 예방적 효과를 나타낸다. 실제로 사람을 대상으로 한 실험에서도 술을 마신후 40분이 경과하였을 때 혈중 알콜농도가 술만 마신 사람(0.18%)에 비하여 인삼엑기스와 술을 함께 마신 경우(0.11 %)가 훨씬 낮다는 사실이 입증되었다.

## 7. 연구개발결과의 보안등급

해당사항 없음.

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

해당사항 없음.

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

### ○ 기술적 위험요소 분석

인삼열매 추출, 성분분리시 폭발성이 있는 유기용매 사용시 후드 장치가 되있는 실험실 공간에서 시험하도록 함.

1협동 : 동물 및 세포 실험시 별도의 실험 센터 또는 셀룸을 이용하여, 오염 및 교차 오염을 방지하고 있음. 세포 실험실은 청결 및 위생을 위하여 독립 공간이며, 동물 실험센터의 경우 SPF10000 grade 이상의 청정 실험센터를 이용.

### ○ 안전관리대책

연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 따라 산단에서 정기적으로 ,해당 연구실 안전점검 및 정밀안전진단실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진을 실시하고 있으며, 실험실에서 참여연구원대상으로 상해보험을 가입하고 있습니다.

1협동 : 중앙대학교는 산업 및 연구실 안전법에 의거한 안전 교육 및 안전 정기 점검 2회를 국가 해당 기관 및 자체 기관에서 수행 하고 있음. 정기 교육은 6개월 마다 이수해야 하며, 교내에서 상해 보험을 가입하여 실시.

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Microwave Heating Rapidly Alters Ginsenoside Composition of Fresh Ginseng ( <i>Panax ginseng</i> CA Meyer)	고연	교신 저자	Journal of Food and Nutrition Research, 4 ( 6 ) , 394-399	0.7	2016.07.30	단독사사	SCI
2	논문	Modification of ginsenoside composition in red ginseng ( <i>Panax ginseng</i> ) by ultrasonication	고연	교신 저자	Journal of Ginseng Research, 40, 300-303	3.89	2016.06.30	단독사사	SCI
3	논문	Ultrasonication Processed Panax Ginseng Berry Extract induces Apoptosis through an Intrinsic Apoptosis Pathway in HepG2 Cells	중앙대	교신 저자	Archives of Pharmacal Research, accepted	2,22	2016.05.16	단독사사	SCI
4	논문	Pharmacological Action of DA-9701 on the Motility of Feline Stomach Circular Smooth Muscle	중앙대	교신 저자	<i>Pharmazie</i> , 70, 183-192	1.32	2015.03.30	단독사사	SCI
5	논문	The Change of Ginsenoside Composition in Ginseng Berry Extract by the Ultrasonication Process	고연	교신 저자	Y a k h a k Hoeji, 60(2) 58-63	-	2016.06.30	단독사사	등재

## 11. 기타사항

해당사항 없음.

## 12. 참고문헌

1. Namba, T. : The encyclopedia of Wakan-Yaku with color pictures., Hoikusha., Osaka, p. 1 (1980).
2. Park, J. D. : Recent studies on the chemical constituents of Korean Ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Korea J. Ginseng Sci.* 20, 389 (1996).
3. Sanata, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O. and Shibata, S. : Studies on the saponins of ginseng. I. Structure of ginseng-R<sub>0</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc and Rd. *Chem. Pharm. Bull.* 22, 421 (1974).
4. Kitagawa, I., Taniyama, T., Shibuya, H., Nota, T. and Yoshikawa, M. : Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra(2) : Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same *Panax ginseng* root. *Yakugaku Zasshi* 107,95 (1987).
5. Ko, S. K., Bae, H. M., Cho, O. S., Im, B. O., Chung, S. H. and Lee, B. Y. : Analysis of ginsenoside composition of ginseng berry and seed. *Food Sci. Biotechnol.* 17, 1379 (2008).
6. Dey, L., Zhang, L. and Yuan, C. S. : Anti-diabetic and anti-obese effects of ginseng berry extract : comparison between intraperitoneal and oral administrations. *Am. J. Chin. Med.* 30, 645 (2002).
7. Huo, Y. S. : Anti-senility action of saponin in *Panax ginseng* fruit in 327 cases. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 4, 593 (1984).
8. Zhang, S. C. and Jiang, X. L. : The anti-stress effect of saponins extracted from *Panax ginseng* fruit and the hypophyseal-adrenal system. *Yao Xue Xue Bao* 16, 860 (1981).
9. Bae, H. M., Cho, O. S., Kim, S. J, Im, B. O., Cho, S. H., Lee, S., Kim, M. G., Kim, K. T., Leem, K. H. and Ko, S. K. : Inhibitory effects of ginsenoside Re isolated from ginseng berry on histamine and cytokine release in human mast cells and human alveolar epithelial cells. *J. Ginseng Res.* 36, 369 (2012).
10. Wang, W., Zhao, Y., Rayburn, E. R., Hill, D. L., Wang, H. and Zhang, R. : In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated

from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59, 589 (2007).

11. Wu, J. 1., Lin, L. and Chau, F. T. : Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrason. Sonochem.* 8, 347 (2001).

12. Gwak, H. W., Hong, J. T., Ahn, C. H., Kim, K. J., Kim, S. G., Yoon, S. S., Im, B. O., Cho, S. H., Nam, Y. M. and Ko, S. K. : The change of ginsenoside composition in the ginseng(*Panax ginseng*) flower buds by the ultrasonication and vinegar process. *Natural Product Sciences.* 21, 1 (2015).



<별첨작성 양식>

[별첨 1]

### 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 초음파 처리 인삼열매 조성물을 이용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발 (영문) Development of functional strengthening food for improvement of hepatic protective effect using ultrasonication processed ginseng berry extract				
주관연구기관	고연(高研)		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 고연(高研)	
참 여 기 업	고연(高研)		참 임 자	(성명) 고성권	
총연구개발비 (681,000천원)	계	681,000	총 연구 기간	2013. 7.~ 2016. 7.( 3년 0월)	
	정부출연 연구개발비	510,000	총 참 여 수	총 인원	74
	기업부담금	171,000		내부인원	6
	연구기관부담금	-		외부인원	68
<p>○ 연구개발 목표 및 성과  연구목표 : 초음파 처리 인삼열매 조성물을 이용한 간기능 개선 건강기능식품 개발  연구성과 : 논문(8편), 학술발표(6편), 특허(1건)</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, F<sub>4</sub> 등의 홍삼 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 초음파 처리 인삼열매 조성물 개발 및 대량 추출조건 최적화</li> <li>- Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, F<sub>4</sub> 분리 화학구조 동정</li> <li>- 지표성분 (Ginsenoside Rh<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>, F<sub>4</sub>) 표준화 (밸리데이션)</li> <li>- 간독성 동물모델에서 초음파 처리 인삼 열매 조성물의 간 보호효과</li> <li>- 초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 인체적용 시험 IRB 승인</li> <li>- 초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 인체적용 시험</li> <li>- 초음파 처리 인삼열매 조성물의 안전성(독성)시험[단회독성, 4주 DRF, 유전독성 (염색체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험), 13주 반복독성시험 및 4주 회복시험]</li> <li>- 초음파 처리 인삼열매 조성물 시제품 제작(상품명 : 인프로)</li> </ul> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 간기능 개선 기능성 강화 인삼열매 조성물 제품 개발</li> <li>- 국민 건강 향상으로 국가 의료비 절감</li> <li>- 인삼가공식품 시장규모 약 1조원에서 20-30% 확대 예상</li> </ul>					

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	113021-3	
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야	기능성 소재개발		과제구분	단위	
사업명	고부가가치식품기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	초음파 처리 인삼열매 조성물을 이용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	고연(高研)		연구책임자	고성권	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도		170,000	57,000	227,000
	2차년도		170,000	57,000	227,000
	3차년도		170,000	57,000	227,000
	4차년도				
	5차년도				
	계		510,000	171,000	681,000
참여기업	고연(高研)				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2016년 8월 10일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
고연(高研)	대표	고성권

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)

초음파 처리 인삼열매 추출물이 기능성 소재인 진세노사이드 Rh1, Rg2, F4를 고농도로 함유한 조성물 개발에 성공하였고, 이 조성물이 천연 상태의 인삼열매 추출물보다 우수한 간기능 개선 작용이 있음을 동물시험과 시험관내 시험을 통하여 확인하였음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

초음파 처리 인삼열매 추출물을 활용한 간기능 개선 개별인정형 건강기능식품 개발로 농가소득 증대, 인삼산업 활성화, 인류건강 증진에 기여함.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

초음파 처리 인삼열매 추출물을 활용한 간기능 개선 개별인정형 건강기능식품 개발, 인삼 부산물 활용 정책 제안, 천연물신약 개발위한 자료 확보, 기능성화장품 소재 확보

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

초음파 처리 인삼열매 추출물에 대한 유효성, 안전성, 인체적용시험, 지표물질 표준화 등 개별인정형 건강기능식품 개발을 위한 충실한 자료 준비

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

논문 100% 이상 달성하였으며, 학술발표는 300% 달성하였고, 특허는 등록을 위한 의견제출 중이며, 곧, 100% 달성할 것으로 사료됨.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼열매 조성물 개발	10	100%	Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> 등의 홍 삼 활성 prosapogenin 성분을 고농 도로 함유하는 초음파 처리 인삼열 매 조성물 개발 완수
독성시험(단회 및 유전독성시험)	10	100%	단회독성, 4주 DRF, 유전독성 (염색체 이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시 험) 시험 완수
간염 및 지방간, 소화기능 향상에 효 과가 우수한 인삼열매 조성물을 세포 수준 및 정상동물모델에서 스크리닝	10	100%	갈락토사민 유도 간독성 동물모델에 서 초음파 처리 인삼 열매 조성물의 간 보호시험 완수
기능성 성분 대량 분리 동정	5	100%	Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> 분리 화 학구조 동정 완수
농약 검사	5	100%	농약검사 완수
CRO 업무	5	100%	Protocol과 CRF의 작성 및 IRB 통 과 완수
인삼열매 조성물 및 지표성분을 대상 으로 간염 및 지방간, 소화기능 지연 동물모델에서 약효 및 기전 규명	10	100%	알코올 유도 간독성 동물모델에서 초음파 처리 인삼 열매 조성물의 간 보호시험 완수
인체적용시험 준비	10	100%	시험자 모집 완수
제조공정 표준화	10	100%	지표성분 (Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> ) 표준화 (밸리데이션) 완수
독성시험(반복독성시험)	10	100%	13주 반복독성시험 및 4주 회복시 험 완수
시제품 제작	5	100%	시제품 제작 완수
인체적용시험	10	95%	인체적용시험 데이터 정리 중
	100점		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

기능성 강화 소재개발과 더불어 간기능 개선 동물시험 결과가 우수하고, 독성시험에서 안전성이 인정되  
어서, 향후 개별인정형 건강기능식품 허가를 통한 개발이 기대됨,

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

안전성 및 인체적용시험 등 고비용 연구비와 장기간 연구가 필요한 경우 연구기간 및 연구비의 탄력적 지원운영이 필요함.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

초음파 처리 인삼열매 추출물을 활용한 간기능 개선 개별인정형 건강기능식품 개발, 인삼 부산물 활용 정책 제안, 천연물신약 개발위한 자료 확보, 기능성화장품 소재 확보가 가능함.

## IV. 보안성 검토

해당사항 없음.

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	기능성 소재 개발	
연구과제명	초음파 처리 인삼열매 조성물을 이용한 간기능 개선 기능성 강화 식품 개발			
주관연구기관	고연(高研)		주관연구책임자	고성권
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	510,000	171,000	-	681,000
연구개발기간	2013. 7. 16 - 2016. 7. 15			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(언론홍보) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: _____ )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① prosapogenin 성분 고농도 함유 인삼열매 조성물 개발	Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> 등의 홍삼 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 초음파 처리 인삼열매 조성물 개발
② 독성시험(단회 및 유전독성시험)	단회독성, 4주 DRF, 유전독성 (염색체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험) 시험
③ 간염 및 지방간, 소화기능 향상에 효과가 우수한 인삼열매 조성물을 세포수준 및 정상동물모델에서 스크리닝	갈락토사민 유도 간독성 동물모델에서 초음파 처리 인삼 열매 조성물의 간 보호시험
④ 기능성 성분 대량 분리 동정	Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> 분리 화학구조 동정
⑤ 농약 검사	농약검사
⑥ CRO 업무	Protocol과 CRF의 작성 및 IRB 통과
⑦ 인삼열매 조성물 및 지표성분을 대상으로 간염 및 지방간, 소화기능 지연 동물모델에서 약효 및 기전 규명	알코올 유도 간독성 동물모델에서 초음파 처리 인삼 열매 조성물의 간 보호시험
⑧ 인체적용시험 준비	시험자 모집
⑨ 제조공정 표준화	지표성분 (Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> ) 표준화 (밸리레이션)
⑩ 독성시험(반복독성시험)	13주 반복독성시험 및 4주 회복시험
⑪ 시제품 제작	시제품 제작
⑫ 인체적용시험	인체적용시험 데이터 정리 중

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 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						
최종목표	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	4	3	2	3	3	-	-	-
연구기간내 달성실적	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	4	4	6	3	3	-	-	2
달성율(%)	100	0	-	-	-	100	-	-	-	-	-	100	133	300	100	100	-	-	추가

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> 등의 홍삼 활성 prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 초음파 처리 기술(특허 등록)
②	지표물질(Ginsenoside Rh <sub>1</sub> , Rg <sub>2</sub> , F <sub>4</sub> ) 성분분석 표준화 기술
③	인삼열매 정제 제형 기술

### 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	정책 자료	기타
①의 기술	○					○	○			
②의 기술	○							○		
③의 기술	○							○		

\* 각 해당란에 v 표시

### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	기술이전, 제품 개발
②의 기술	제품 품질관리
③의 기술	표준화 제품생산

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문				학술발표	정책 활용		홍보 전 시
											SC I	비 SC I							
최종목표	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	4	3	2	3	3	-	-	-
연구기간 내 달성 실적	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	4	4	6	3	3	-	-	2
연구종료 후 성과창출 계획		1					1					1							

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	prosapogenin 성분을 고농도로 함유하는 인삼열매 초음파 처리 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2016년 10월
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	-		

- 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)